В. Зенгер

ПРИНЦИПЫ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Springer Advanced Texts in Chemistry
Charles R. Cantor, Editor

WOLFRAM SAENGER

Principles of Nucleic Acid Structure

Springer-Verlag
New York Berlin Heidelberg Tokyo

В. Зенгер

ПРИНЦИПЫ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Перевод с английского
канд. физ.-мат. наук
Л. В. МАЛИНИНОЙ

и канд. физ.-мат. наук

В. В. МАХАЛДИАНИ

под редакцией акад.
Б. К. ВАЙНШТЕЙНА

МОСКВА «Мир» 1987

УДК 547.96
356
ББК 24.239

ЗЕД
3-560

4

Зенгер В.

356 Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. Пер. с англ.– М.: Мир, 1987.– 584 с., ил.

В книге известного ученого из ФРГ собраны и систематизированы практически все имеющиеся данные о структуре нуклеиновых кислот.

Рассмотрены структура, конформация и физико-химические свойства компонентов нуклеиновых кислот; силы, стабилизирующие структуру нуклеиновых кислот. Описаны основные типы двойных спиралей ДНК (A, B, C, D, Z) и РНК; спирали, образуемые синтетическими гомополимерами нуклеиновых кислот; гипотетические (расчетные) спирализованные структуры. Приведены данные по сверхспиральной организации ДНК, по структуре нукленово-белковых комплексов; описаны высшие формы организации ДНК (нуклеосомы, хроматин, хромосомы).

Предназначена для биофизиков, генетиков, молекулярных биологов.

3 2007020000–125 / 041(01)–87 149–87, ч. 1

ББК 24.239

Редакция литературы по биологии

им. ГОРЬКОГО
БИБЛ. СТ ЧА
М. Г.
5968 15-87

© 1984 by Springer-Verlag New York Inc. All rights reserved
Authorized translation from English language edition published by Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo

© перевод на русский язык, «Мир», 1987

Предисловие редактора перевода

Строение и функционирование живых организмов определяются структурной информацией, самовоспроизводящимся носителем которой является молекула ДНК. В ДНК же накапливаются разнообразные мутационные изменения, которые приводят к изменчивости организмов и подлежат естественному отбору. Информация, закодированная в ДНК, передается РНК-посреднику и далее воплощается в структуре белков – носителей всех жизненных функций.

Начало великой славе ДНК было положено сравнительно недавно, в 1953 г., когда Джеймс Уотсон и Френсис Крик построили свою знаменитую модель. Мощная интуиция, романтизм в научном поиске позволили этим исследователям собрать в единое целое накопленные к тому времени факты и идеи относительно структуры ДНК. Это – сразу нашедшие свое место правила Чаргаффа о равенстве количеств аденина и тимина, а также гуанина и цитозина в ДНК. Это – выдвинутые Л. Полингом идеи о спиральности цепных биомолекул, получившие блестящее подтверждение в его знаменитой α-спирали. Это – развитые к тому времени строгие кристаллохимические представления о взаимном расположении атомов и связях между ними в органических соединениях.

Основой при построении любой модели, а также при проверке ее справедливости является эксперимент; в данном случае решающую роль сыграл рентгеновский структурный эксперимент. Как раз в то время Розалинде Франклин и Морису Уилкинсу впервые удалось получить хорошие рентгенограммы ДНК, из которых однозначно следовало, что основания в ДНК уложены одно над другим, как в стопке монет. Отказавшись от предположения о том, что сахарофосфатный остов ДНК находится на оси цепной молекулы и поместив его на периферии, Уотсон и Крик пришли к гениальной догадке о комплементарности A—T и G—C, стабилизируемой водородными связями. Тем самым они дали принцип самокомплементарного воспроизведения генетического материала, вытекающий из самой его структуры.

Открытие структуры ДНК явилось по сути дела началом бурного развития молекулярной биологии в ее современном понимании. Другим краеугольным камнем этой науки стали быстро последовавшие за ним рентгеновские расшифровки структуры глобулярных белков. Предста-

влялось чрезвычайно заманчивым не только узнать, *как* построены биомолекулы, но и выяснить *механизм их функционирования* и взаимодействия на молекулярном уровне, т.е. проникнуть в самую основу жизненных процессов. Теперь на наших глазах совершается переход к следующему этапу – от познания этих процессов к сознательному вмешательству в них методами генной инженерии.

В ходе развития молекулярной биологии выявилось много новых функций нуклеиновых кислот. Стала все больше проясняться сложная сеть взаимоотношений между различными нуклеиновыми кислотами и белками. Несмотря на всю красоту модели Уотсона – Крика, простоту заложенных в ней принципов и вытекающих из нее следствий, сами авторы понимали, что нужны гораздо более прямые и строгие доказательства, и спокойно вздохнули лишь спустя 28 лет, когда все принципиальные черты исходной модели получили прямое подтверждение. Решающую роль здесь сыграл полный рентгеноструктурный анализ монокристаллов коротких синтетических олигомеров с заданной нуклеотидной последовательностью.

Вместе с тем тот же рентгеноструктурный анализ, наряду с другими методами, как экспериментальными, так и теоретическими, продемонстрировал конформационное многообразие нуклеиновых кислот. Это многообразие прослеживается на всех уровнях организации, включая низкомолекулярные компоненты ДНК и РНК (основания, нуклеозиды, нуклеотиды), одно- и многоцепочечные полимерные системы и, наконец, комплексы нуклеиновых кислот со специфическими белками.

В книге В. Зенгера, которую мы предлагаем вниманию читателя, впервые подробно и систематически излагаются весьма обширные сведения о структуре нуклеиновых кислот, накопленные к настоящему времени. Главное место в книге уделено данным рентгеноструктурного анализа, включая данные по рентгеновской дифракции на волокнах и монокристаллах. Привлекаются также данные, полученные с помощью спектроскопических методов, в особенности ЯМР, и результаты теоретических расчетов.

Автору книги удалось собрать воедино весь имеющийся материал по конформационным характеристикам нуклеиновых кислот – все эти сведения представлены в многочисленных таблицах и проанализированы в тексте. При этом конформационные параметры полимерных молекул и комплексов оказываются как бы логическим развитием материала по различного рода взаимодействиям между отдельными элементами структуры. В книге подробно обсуждаются наиболее яркие и значительные достижения последних лет: открытие Z-формы ДНК, анализ сверхспиральной организации, данные по структуре нуклеиновобелковых комплексов, в том числе по структуре нуклеосом. Все это делает книгу В. Зенгера единственной в своем роде – все ранее написанные монографии, в которых в той или иной степени обсуждается структура нуклеиновых кислот, уже явно не соответствуют сегодняшнему уровню развития этой области.

Таким образом, данная книга, перевод которой на русский язык выполнен квалифицированными специалистами, будет чрезвычайно полезна всем, кто интересуется структурой важнейшего класса биологических макромолекул.

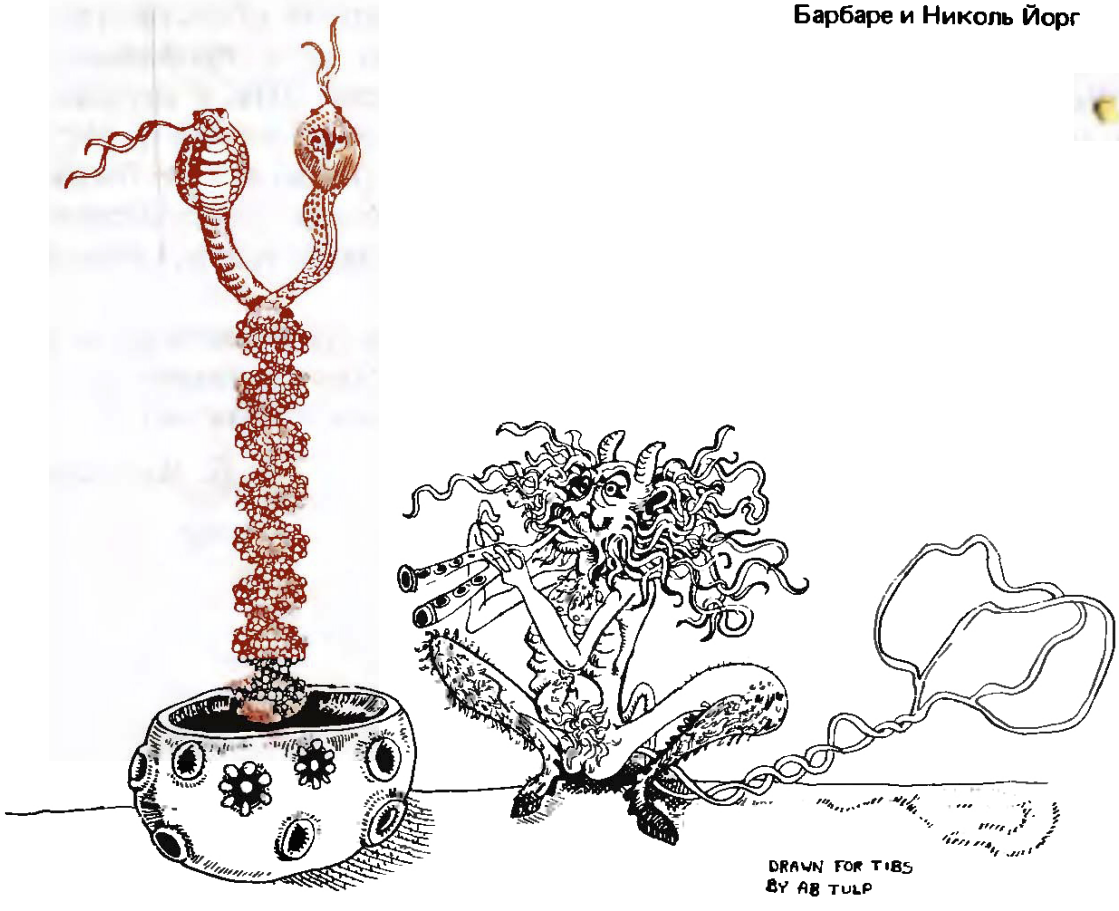
Несколько замечаний по терминологии. Мы отказались от принятой прежде номенклатуры желобков двойной спирали (большой и малый, широкая и узкая бороздка) и называем эти желобки главным и минорным. Мы сочли удачным введенные В. Б. Журкиным названия конформационных параметров спирали: угол наклона (θ_T) и угол крена (θ_R). Несколько смущает принятая автором система нумерации атомов в виде подстрочных индексов (N_3, O_2 и т. д), что напоминает символику химических формул, имеющую совсем другой смысл. Однако во всех случаях контекст устраняет какие бы то ни было неоднозначности.

Разумеется, в книге, посвященной столь обширной области, трудно было рассчитывать на одинаково полный охват всей проблематики. Так, весьма сжато изложен материал по комплексам ДНК с антибиотиками, мало внимания уделено структуре нуклеиновых кислот в составе вирусов, не обсуждаются данные по строению рибосом. Необходимо отметить, однако, что все это является следствием многочисленных белых пятен в наших сегодняшних знаниях о структуре нуклеиновых кислот в различных системах.

Остается выразить надежду, что данная книга будет полезна в том числе и тем читателям, которые в дальнейшем примут активное участие в исследованиях, направленных на устранение этих белых пятен.

Б. К. Вайнштейн

Барбаре и Николь Йорг



Воспроизведено из статьи Campbell A. M. (1978), Straightening out the supercoil, Trends Biochem. Sci., 104–108.

Предисловие

Основой для этой монографии послужил обзор, посвященный структурной организации полинуклеотидов. Я написал его в 1976 г. для книги, которая так и не вышла в свет. Рукопись лежала в столе, пока издательство Springer-Verlag не предложило опубликовать ее как один из томов серии "Springer Advanced Texts in Chemistry". Когда я просмотрел рукопись в 1980 г., то обнаружил, что она безнадежно устарела. Прежде всего была открыта левая спираль ДНК, и это заставило отказаться от представления, что в природе существуют только правые двойные спирали. Фактически все надо было переписывать заново.

Когда я работал над рукописью, мне часто казалось, что я пытаюсь догнать уходящий поезд – такое множество открытий было сделано за последние два года. В настоящее время в структурных исследованиях ДНК наблюдается бум, вызванный, в частности, возможностью получать синтетические олигонуклеотиды любой последовательности. Их можно кристаллизировать либо per se, либо в комплексе с определенными ионами металлов, антибиотиками и белками. В изучении белков также открылись новые горизонты. Сейчас мы знаем пространственную структуру целого ряда белков, связывающихся с ДНК и РНК. Исследуются более сложные системы, включающие соответствующие комплексы, что стало возможным благодаря дальнейшему развитию методов кристаллографии.

Я не могу завершить это короткое предисловие, не поблагодарив тех, кто способствовал появлению моей книги. Это прежде всего Мейнхард Хейдрих и Манфред Штейфа, которые работали с Кембриджским банком данных, извлекая из него нужные наборы координат атомов. Большинство приведенных в книге рисунков, изображающих структуры различных молекул, вычерчено с помощью программ SCHAKAL [1376] и ORTEP [1377]. Иллюстрации, которые нельзя было нарисовать на компьютере, сделал Людвиг Кольб по моим грубым наброскам.

Когда пишешь книгу, трудно обойтись без хорошей библиотеки и помощи ее персонала. Лучшая из библиотек, которые мне доводилось видеть, это библиотека Института экспериментальной медицины Общества Макса Планка. Благодаря помощи ее сотрудников М. Хеншель,

Б. Кюттнер и В. Геллерта я смог получить даже самые экзотические журналы. Перепечатыванием многочисленных вариантов рукописи пришлось заниматься секретарям Шанталь Челли, Дженни Глиссмейер и Петре Гроссе.

И наконец, я хотел бы поблагодарить своего учителя и научного руководителя профессора Фридриха Крамера за руководство и поддержку в течение последних 18 лет.

Геттинген, август 1983. *Вольфрам Зенгер*

ГЛАВА 1

Почему мы изучаем структуру нуклеотидов и нуклеиновых кислот?

Прежде чем приступить к описанию структуры нуклеотидов и нуклеиновых кислот, следует рассмотреть биологическую значимость этого класса молекул и определить цели изучения основ их структурной организации на атомном уровне.

Нуклеотиды выполняют множество функций в живых организмах. Наследственный материал – дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) – представляет собой линейный полимер, мономерными единицами которого являются нуклеотиды. Но даже если бы нуклеотиды не были составной частью ДНК, их все равно следовало бы отнести к разряду наиболее важных биологических молекул.

Нуклеотид состоит из трех компонентов: сахара, гетероциклического основания и фосфата. Сахар (рибоза или дезоксирибоза) присутствует в виде фуранозного кольца, которое соединяется с одним из четырех гетероциклических оснований посредством β-гликозидной связи с образованием четырех природных нуклеозидов: аденозина, гуанозина, цитидина и тимидина [уридина в рибонуклеиновой кислоте (РНК)]. Нуклеотид образуется в результате фосфорилирования 3′- или 5′-гидроксильной группы сахара в составе нуклеозида. Нуклеотид – это не только «кирпичик» для строительства полинуклеотидных цепей ДНК и РНК; он выполняет и другие, независимые функции.

На рис. 1.1 представлены производные аденозина, которые в зависимости от химической модификации выполняют в живой клетке совершенно разные биологические функции. В форме ди- и трифосфата аденозин является источником энергии для множества ферментативных реакций и процессов мышечного сокращения. Роль аденозинтрифосфата иллюстрирует тот факт, что скорость его оборота в живых организмах очень высока: для человека она примерно равна массе тела в сутки. Циклический 3′- и 5′-аденозинфосфат играет роль так называемого «второго посредника», опосредуя действие пептидных гормонов. В составе пуромицина аденозин является мощным ингибитором синтеза белка, а как арабино- или 8-азапроизводное проявляет свойства антибиотика. Аденозиндифосфат, связанный через концевой фосфат с определенными биологическими молекулами, входит в состав двух коферментов: кофермен-

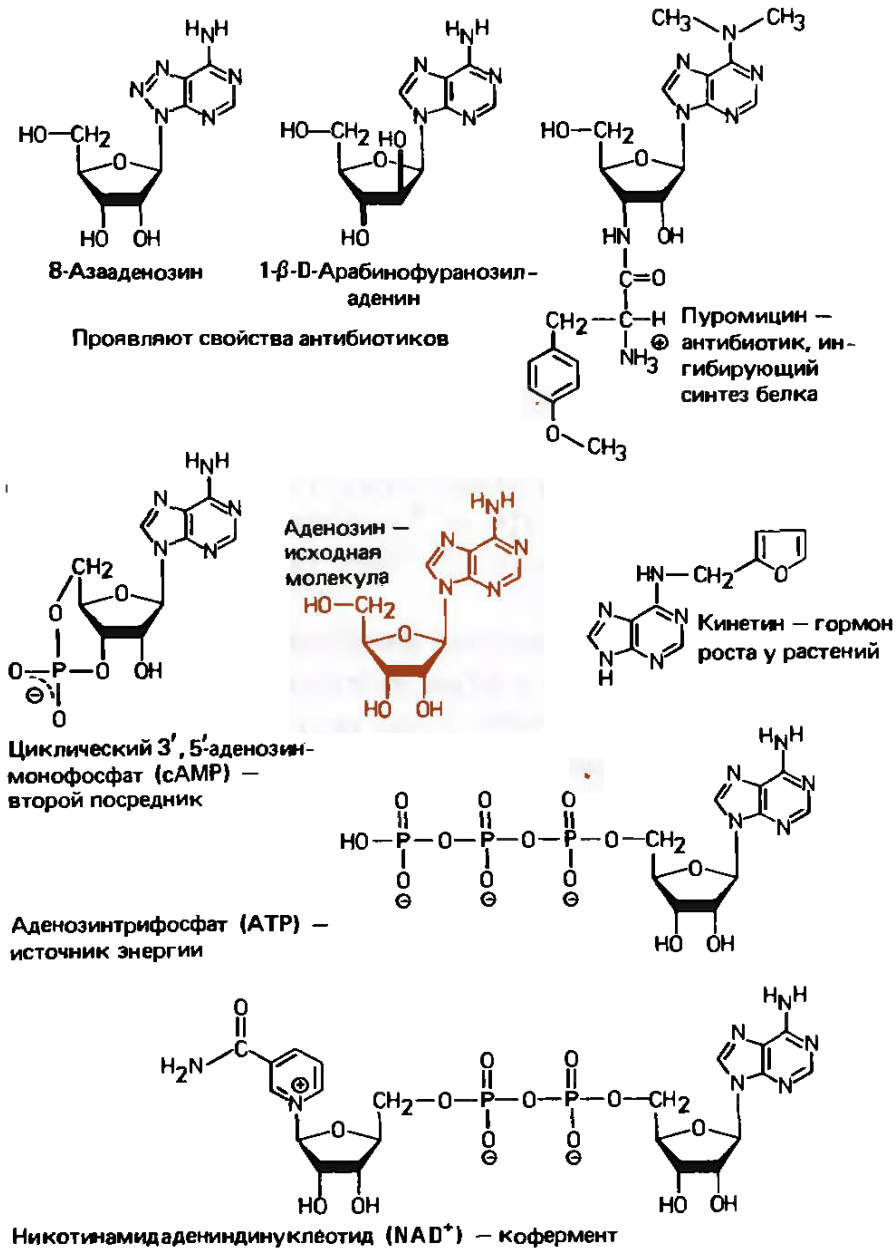


Рис. 1.1. Незначительные химические модификации могут приводить к существенным изменениям свойств биологических молекул. На этой схеме представлены аденозин (в центре) и некоторые из его производных, выполняющие совершенно разные биологические функции.

та A и NAD^+, которые необходимы для функционирования специфических ферментов.

Чтобы понять биологическую роль нуклеотидов, нужно знать их структурные особенности. *Химическая структура* и функции производных аденозина, о которых говорилось выше, известны. Но почему они функционируют именно таким образом и каков механизм их действия? Почему, например, 8-азааденозин проявляет свойства антибиоти-

ка, в то время как с химической точки зрения замещение CH-группы на азагруппу в восьмом положении практически не влияет на электронную структуру соединения? Объяснение в данном случае нужно искать в изменении не электронной структуры нуклеозида, а его *трехмерной структуры*, т.е. конформации, которая и объясняет функциональные особенности 8-азааденозина.

Нуклеозиды и нуклеотиды взаимодействуют с белками на всех стадиях их метаболизма и в процессах регуляции, характер которых требует специфического узнавания двух (или большего числа) реагентов. Это предполагает, что взаимодействующие соединения имеют строго детерминированную пространственную структуру. Следовательно, только установив ее на атомном уровне, можно на атомном же уровне понять механизм функционирования.

Структуру нуклеотидов можно изучать различными методами. Наиболее мощным среди них является рентгеновская кристаллография. Пионером рентгеновских исследований нуклеозидов был Фурберг, который в 1951 г. опубликовал данные о кристаллической структуре цитидина [1] (рис. 1.2). В те дни карты электронной плотности, построенные по многим тысячам отражений, рассчитывались вручную, поэтому основным фактором, лимитирующим определение кристаллической структуры, было время. Для установления структуры даже таких малых молекул, как нуклеозиды, требовались годы. Благодаря современной технике теперь на это уходят не годы, а дни, и к настоящему времени установлена кристаллическая структура более 600 нуклеозидов, нуклеотидов, олигонуклеотидов и их составляющих. Этот огромный материал вместе со спектроскопическими данными и результатами теоретических расчетов позволяет с большой определенностью говорить о структурных особенностях нуклеотидов на атомном уровне.

От нуклеотидов к двойной спирали ДНК. Принцип структурной организации, совершивший революцию в биохимии. В 1951 г., когда Фурберг опубликовал работу о молекулярной структуре первого нуклеозида, строение ДНК было еще неизвестно. Что является основой наследственности? Каким образом наследственный материал – ДНК – воспроизводится от поколения к поколению? Как осуществляется биосинтез белка и по какой системе устанавливается соответствие между нуклеотидной последовательностью в ДНК и последовательностью аминокислот в белке? Даже принимая во внимание полученные в лаборатории Тодда данные о том, что линейная полимерная молекула ДНК состоит из нуклеотидов, связанных друг с другом 3′,5′-фосфодиэфирными связями [2], ответить на эти вопросы, опираясь только на химические данные, было невозможно.

Необходимая для этого дополнительная информация была получена Чаргаффом с сотрудниками, которые показали, что в ДНК с самым различным нуклеотидным составом отношения A/T и G/C всегда равны единице [3]. На первых рентгенограммах волокон ДНК Астбери обнаружил очень сильный меридиональный рефлекс, соответствующий рас-

стоянию 3,4 Å [4]; это означало, что основания уложены одно над другим. Исходя из данных по электрохимическому титрованию, Галланд [5] заключил, что основания связаны друг с другом водородными связями. Новые рентгеновские данные, полученные в лаборатории, где работал Уилкинс, указывали на спиральное строение молекулы ДНК, которая способна принимать разные конформации в зависимости от относительной влажности среды и наличия противоионов [6].

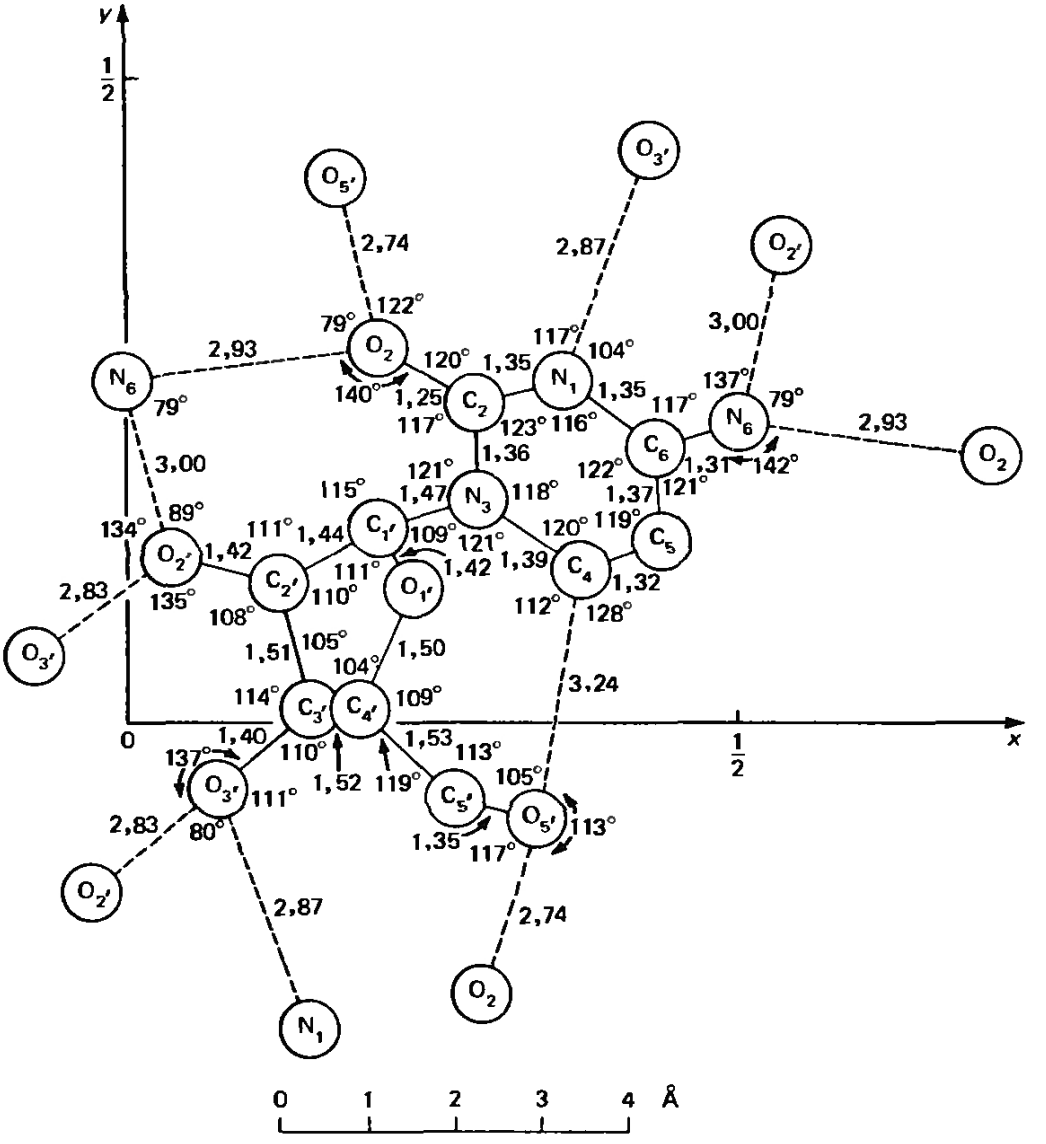


Рис. 1.2. Проекция структуры цитидина на плоскость, перпендикулярную кристаллографической оси *c*, полученная в результате анализа кристаллической структуры. Длины связей выражены в ангстремах; водородные связи обозначены пунктиром. Обратите внимание на то, что атомы C_4 и $O_{5'}$ (по новой номенклатуре атомы C_6 и $O_{5'}$) достаточно близко подходят друг к другу; этот факт был вновь обнаружен лишь много лет спустя (разд. 4.9) после выхода работы, из которой взят этот рисунок [1].

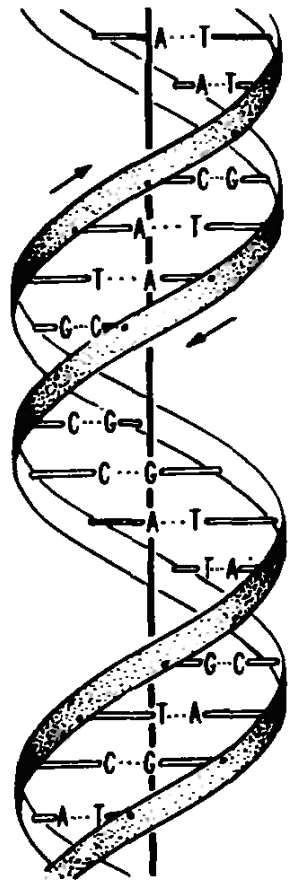


Рис. 1.3. Схематическое изображение двойной спирали ДНК [10]. Сахарофосфатные цепи расположены по периферии молекулы и направлены антипараллельно друг другу. Пары оснований (AT и GC), изображенные в виде жердочек между цепями, расположены друг над другом в центре спирали.

Все части этой головоломки были собраны воедино Уотсоном и Криком [7, 8]. Они предложили модель молекулы ДНК, в которой аденин специфически соединяется с тимином, а гуанин – с цитозином с помощью водородных связей; эта модель полностью объясняла данные Чаргаффа и Галланда. Исходя из рентгеновских данных Астбери и Уилкинса, Уотсон и Крик сделали вывод, что пары оснований уложены наподобие стопки монет на расстоянии 3,4 Å друг от друга. При этом соседние пары повернуты на угол 36°, в результате чего образуется правая двойная спираль с десятью парами оснований на виток (рис. 1.3). Исходя из фурберговской структуры цитидина, Уотсон и Крик приписали каждому нуклеотиду определенные размеры и форму и построили модель спирали, в которой основания расположены вдоль оси спирали, а два сахарофосфатных остова – по периферии и закручены антипараллельно друг на друга.

Это открытие, удостоенное Нобелевской премии в 1962 г. и описанное в занимательной книге Уотсона «Двойная спираль» ([9]; дополнение 1.1), ответило на многие вопросы, выдвинуло ряд новых проблем и привело к бурному развитию целого ряда областей биохимии и генетики. Подчеркнем, что все это стало возможным лишь после того, как была определена структура генетического материала – молекулы ДНК.

От двойной спирали к хромосоме: несколько впечатляющих цифр. Установление структуры ДНК не исчерпало, однако, всех проблем. В клетке молекула ДНК характеризуется более высоким уровнем организации. Суммарная длина ДНК в классах организмов, стоящих на разных ступенях эволюционной лестницы, варьирует от нескольких микрометров до нескольких сантиметров (рис. 1.4). ДНК бывает локализована в вирусных частицах, в клетках прокариот и в ядре эукариотических клеток. В соматических клетках человека находится 46 хромосом, каждая из которых содержит по одной двухцепочечной молекуле ДНК длиной примерно 4 см. Если все молекулы ДНК, заключенные в соматической клетке, соединить друг с другом, получится цепочка длиной

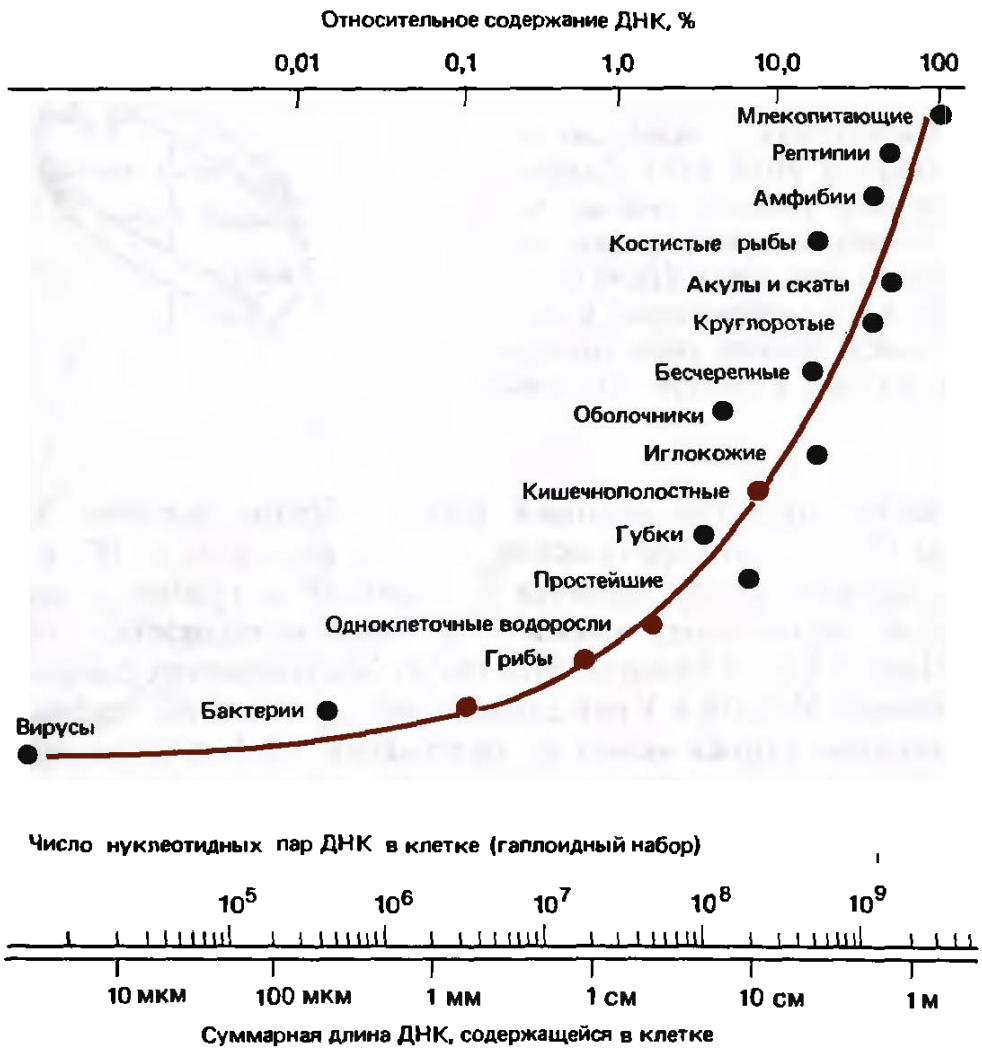


Рис. 1.4. Количество ДНК в клетках организмов, стоящих на разных уровнях организации. Длина ДНК определялась по числу нуклеотидных пар в клетке, при условии что расстояние между соседними парами оснований равно 3,4 Å. Ось ординат не проведена, поэтому точная форма кривой может быть иной; представленная кривая показывает лишь, что с усложнением организма увеличивается содержание ДНК.

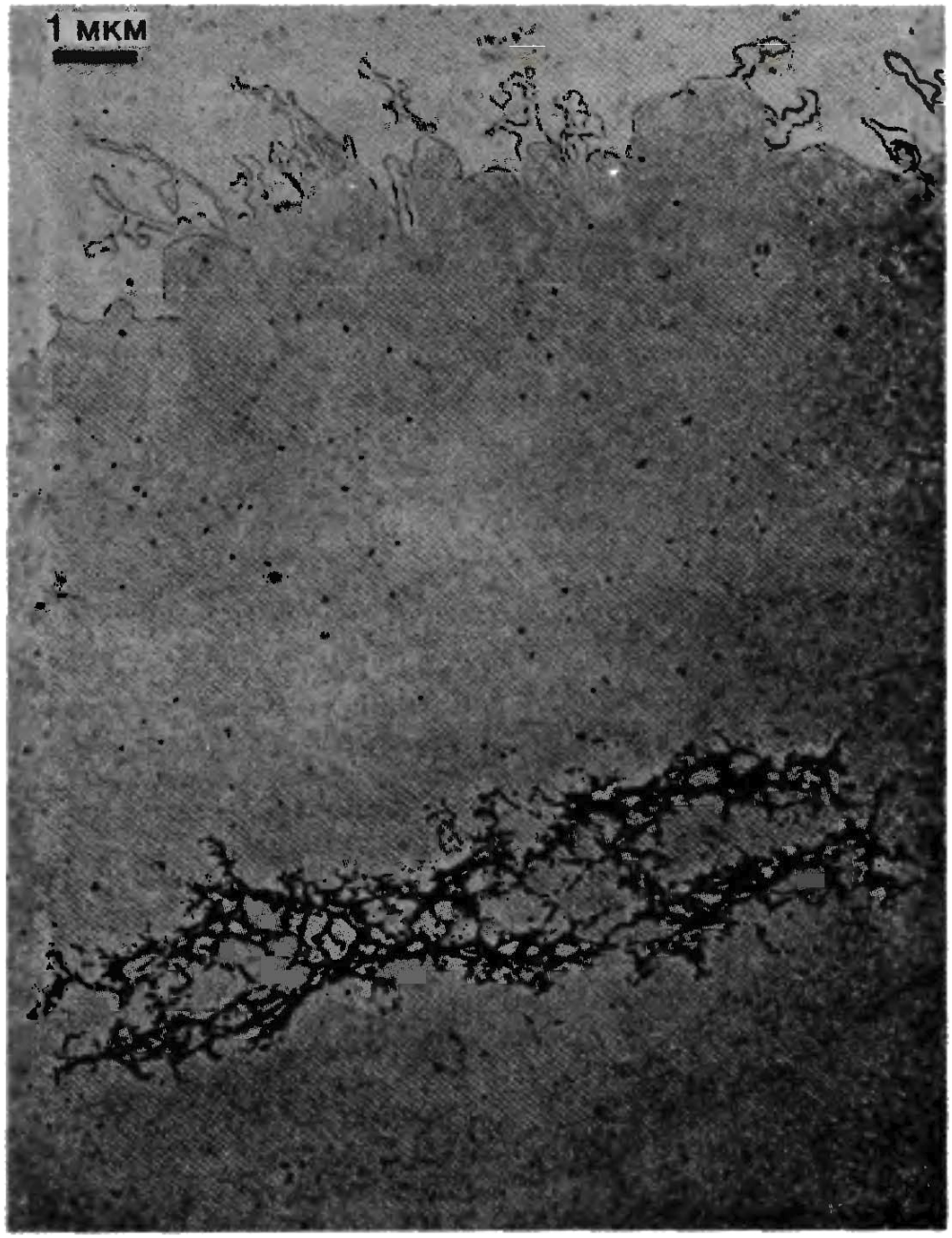


Рис. 1.5. Электронная микрофотография хромосомы из клеток Hela, у которой удалены гистоны, на стадии метафазы [11]. Видны Х-образный контур белкового каркаса и часть окружающей его ДНК.

примерно 2 м. С помощью небольших белков гистонов, содержащих много основных аминокислот, такая двухметровая цепочка упаковывается в ядре диаметром 0,5 мкм. Это соответствует упаковке нити диаметром 0,1 мм и длиной 100 км внутри сферы диаметром 25 см. В ядре помещаются еще и гистоны, которые упорядочивают и удерживают вместе молекулы ДНК. Если удалить гистоны и рассмотреть хромосому под электронным микроскопом, можно увидеть переплетенные цепи ДНК, которые окружают белковый каркас (рис. 1.5).

им. Горького
БИБЛИОТЕКА
М. Г. У.

Box 1.1

Shortened Version of J.D. Watson's Book «The Double Helix»

Hear the song of how the spiral
Complex, twisted, double, chiral
Was discovered. Its construction
Following some shrewd deductuon
Was accomplished. From all sides
"Oh tell it as it was" they cried so
Then he took his pen and paper
And composed the helix caper
Writing of the Cambridge popsy
Turned the world of science
topsy
Turvy like had not before been
Done. The story is no more than
How the structure was
discovered
Secret of the gene uncovered
Biological prediction
Better than a work of fiction
Stylistically breezy
Everything appeared made easy
And it was. The bases, pairing
Found at last – a small red
herring
Notwithstanding. How he found
them
And the hydrogens that bound
them
Was a stroke more accidental
Than a work experimental
Chemistry was not his calling
He had read *one* book by Pauling
Models of the bases he'd made
With them on his desk top he'd
played
Shuffling them and pulling like
with
Like he made no lucky strike
with
Guanine, thymine, adenine. A
Letter came from Pasadena
Horrors: then the day was won
for
Pauling's model was quite done
for
Extra atoms he had set in
Where no atoms should be let in
With some phrases less than
modest
Pauling's model's called the
oddest
Back now to the basic pairing
How's the structure building
faring?
Faster, faster goes the race, then
Everything falls into place when
Tautomers which nature chooses
Are the ones our author uses
Two chains (but here we can't be
sure)
Plus this extra structure feature:
Pauling's outside bases inside
Pauling's inside phosphates
outside
Now they all were quite ecstatic
Soon became they quite dogmatic
Having nature's secret later
Checked against the x-ray data
This was difficult, for Rosie
Found our scientist rather nosey
Bragg compares the book with
Pepys. Is
This the verdict of Maurice? His
Thoughts alas we cannot gainsay
Trumpet blowing's not his forte
Tales like this do have a moral
Whether printed whether oral
Find the right man to advise you
Then you'll get a Nobel prize too.

J. Field

From: Journal of Irreproducible Results, **17**, p. 53 (1968).

Дополнение 1.1

Стихотворная версия книги Дж. Уотсона «Двойная спираль»

Слушай песню, как спиральный,
Скрученный, двойной, хиральный
Комплекс был открыт. Конструкции
После тщательной дедукции
Дали жизнь. Со всех сторон: «О!
Правду, правду!» – исступленно
Люд кричал. Строчил в скрижаль
Автор хохму про спираль –
Как из Кембриджа милашка ми-
р научный кверх тормашками
И вверх дном перевернула вмиг,
Как не снилось никому. Возник-
ла повесть эта, как структура
Родилась и почему ра-
згадать загадку гена
Смог ученый вдохновенно.
Предсказание без мистики
Лучше всякой беллетристики.
В рамках ветреного стиля
Тайны сами в руки плыли –
Так и было. Оснований
Пары я́снились в тумане,
Всем помехам вопреки.
Мановением руки
Пары он открыл – и сходу
Связь посредством водорода.
Взрыв, снискав аплодисменты,
Все затмил эксперименты.
Как его ни ставь высоко,
В химии он не был дока,
Но прочел – не ставь в вину! –
Книгу Полинга – *одну*.
Оснований взял модели,
Тасовал их (шли недели),
Клал их так и клал их эдак,
Ворошил их напоследок.
Но не слушались тимин,
Аденин и гуанин.
Нощно он корпел и денно,
Тут письмо из Пасадены
Подоспело: Что творится!
Полинга модель годится
Для тех атомов добавочных,
Что во всех пособьях справочных
Слыли лишними. Он бурно
(а, быть может, нецензурно)
Отозвался о модели
Полинга. И стал на деле
Основания увязывать.
Что же дальше вам рассказывать?
Гонка пауз не дает –
Но на место все встает
В миг, когда, устав без меры,
Автор наш туатомеры
Выбирает для исхода
Те, что выбрала природа.
Две цепочки (врем едва ли)
Плюс такие вот детали:
Там снаружи все фосфаты,
А совсем не внутрь упрята-
ны, а основанья нужные,
Что по Полингу наружные,
Все внутри. Народ в истерике
И в Европе, и в Америке.
Все вопят: «Он это смог!» Мы
Поспешили статус догмы
Дать открытью, постепенно
Сверив с данными рентгена.
Было трудно: Села Рози
На рефлексы в гордой позе.
Книгу Брэгг назвал скрижалью.
А Морис? С большой печалью
Скажем: был он разозлен,
В трубы дуть он не силен.
Без морали быль невнятна
(Коль не устной, так печатной):
Не теряй напрасно время – и
Ты при Нобелевской премии.

Дж. Филд

Перевод А. Парина

Как организована ДНК в хромосоме? Каким образом осуществляется ее экспрессия? Хотя многие детали этих процессов нам все еще неизвестны, отметим, что физические и химические свойства нуклеиновых кислот и их составляющих тесно связаны с трехмерной структурой этих полимерных молекул. Поэтому на вопрос, поставленный в этой главе, можно ответить следующим образом: принципы структурной организации нуклеотидов и нуклеиновых кислот изучают для того, чтобы понять, как функционируют эти биологические молекулы на атомном уровне.

ГЛАВА 2

Термины, необходимые для описания структуры нуклеиновых кислот

Фундаментальное значение в структурной химии имеет строгое определение терминов, описывающих геометрию молекул. В этой главе мы коснемся тех соглашений и номенклатуры, которые приняты для описания нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Хотя в работах по исследованию нуклеиновых кислот употребляются схемы нумерации атомов и сокращения, рекомендованные комиссией Международного союза общей и прикладной химии (IUPAC) и Международным союзом биохимиков (IUB) [12–14], разногласия в терминологии затрудняли и до сих пор затрудняют определение таких понятий, как длина связи, валентные и торсионные углы [15–18]. Недавно подкомиссия IUPAC-IUB выработала единые стандартные определения [19]. В этой главе мы поясним их и в дальнейшем будем использовать в тексте.

2.1. ОСНОВАНИЯ, НУКЛЕОЗИДЫ, НУКЛЕОТИДЫ И НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ: НОМЕНКЛАТУРА И СИМВОЛЫ

Основной повторяющейся единицей в молекулах дезоксирибонуклеиновой (ДНК) и рибонуклеиновой (РНК) кислот является нуклеотид (рис. 2.1). Нуклеотид состоит из фосфорилированного по 5′-положению сахара в виде фуранозного кольца (β-D-рибоза в РНК или β-D-2′-дезоксирибоза в ДНК), в котором $C_{1'}$-атом связан с одним из четырех гетероциклических оснований посредством β-гликозидной связи $C_{1'}$—N. Гетероциклическими основаниями являются пурины аденин и гуанин и пиримидины цитозин и урацил. Последний присутствует только в РНК, а в ДНК он заменен функционально эквивалентным тимином (5-метилурацил) (рис. 2.2; табл. 2.1).

Свободные основания – аденин (Ade), гуанин (Guo), цитозин (Cyt), урацил (Ura) и тимин (Thy) – содержат атом водорода в девятом (пурины) и первом (пиримидины) положениях, который в составе нуклеозида замещается остатком сахара (рис. 2.2; табл. 2.1). Кроме основных нуклеозидов – аденозина (Ado или A), гуанозина (Guo или G), цитидина (Cyd или C), уридина (Urd или U) и тимидина (dThd или dT) [12] – суще-

ствует множество других природных, синтетических и модифицированных нуклеозидов. Многие из них проявляют свойства антибиотиков. Среди них можно выделить важный класс арабинозидов – нуклеозидов, у которых β-D-рибоза заменена β-D-арабинозой (рис. 2.2) [20, 21].

Нуклеотид – это нуклеозид, в котором фосфорилирован один из гидроксилов сахара. Фосфорилирование нуклеозида может осуществляться по трем положениям: 2′, 3′ или 5′. Например, в адениловой кислоте – аденозин-5′-монофосфате(5′-AMP), называемом также аденилатом, фосфорилирование произошло по положению 5′, а в уридин-3′-монофосфате (3-′UMP) – по 3′. С помощью фосфатных групп могут образовываться также циклические диэфиры нуклеозидов путем формирования

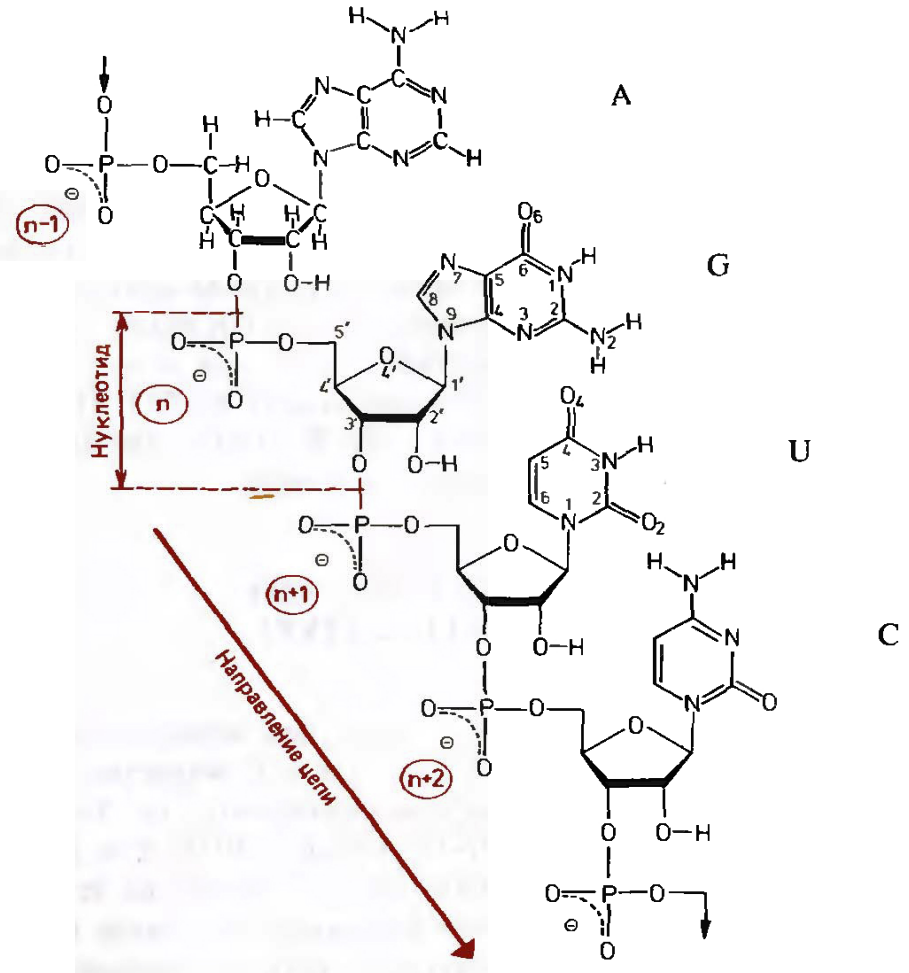


Рис. 2.1. Участок молекулы рибонуклеиновой кислоты (РНК), в которой нуклеозиды аденозин (A), гуанозин (G), уридин (U), цитидин (C) связаны друг с другом 3′,5′-фосфодиэфирными связями. Направление цепи (5′ → 3′) отмечено стрелкой. Для нуклеотида 5′-GMP указана система нумерации атомов. В случае аденозина представлены все водородные атомы, а для остальных нуклеотидов только функциональные. Краткое обозначение данного фрагмента таково: pApGpUpCp или pAGUCp. В дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) вместо гидроксильной группы, связанной с атомом $C_{2'}$, находится атом водорода, а вместо урацила – тимин. (Формулы для G и C содержат ошибки: связи C_6—N_1 в гуанине и N_1—C_2 в цитозине одинарные.)

Таблица 2.1. Сокращения и символы, используемые для обозначения оснований, нуклеозидов и нуклеотидов [38]

Основание		Нуклеотид		Нуклеозид		Другие названия и обозначения
Название	Символ	Название	Символ	Название	Символ	
1. *Рибонуклеозиды и рибонуклеотиды*						
Урацил	Ura	Уридин	Urd или U	Уридиловая кислота	5′-UMP или pU	Уридин-2′-моиофосфат (2′-UMP) Уридин-3′-монофосфат (3′-UMP, Up)
Цитозин	Cyt	Цитидин	Cyd или C	Цитидиловая кислота	5′-CMP или pC	Цитидиндифосфат (CDP, ppC) Цитидилил-(3′,5′)-уридин (CpU)
Аденин	Ade	Адеиозин	Ado или A	Адениловая кислота	5′-AMP или pA	Аденозинтрифосфат (ATP, pppA)
Гуанин	Gua	Гуанозин	Guo или G	Гуаниловая кислота	5′-GMP или pG	Гуанозин-2′,3′-циклофосфат (2′,3′-GMP, G > p, cGMP)
2. *Дезоксирибонуклеозиды и дезоксирибонуклеотиды*[1)]						
Тимин	Thy	Дезокситимидин	dThd или dT	Дезокситимидиловая кислота	5′-dTMP или pdT	Полиадениловая кислота [poly (A)]; сополимер с чередующейся последовательностью dA и dT, poly (дезоксиаденилат – дезокситимидилат), poly d (A—T) или poly (dA—dT) или (dA—dT) или d (A—T)$_n$; для случайного сополимера dA, dT вместо дефиса между символами ставится запятая poly d (A,T) и т. д. Комплекс между poly (A) и poly (U) обозначается poly (A)·poly (U). Аланин-специфичная транспортная РНК из *E. coli* [тРНК^{Ala} (*E. coli*)].
Цитозин	Cyt	Дезоксицитидин	dCyd или dC	Дезоксицитидиловая кислота	5′-dCMP или pdC	
Аденин	Ade	Дезоксиаденозин	dAdo или dA	Дезоксиаденило-вая кислота	5′-dAMP или pdA	
Гуанин	Gua	Дезоксигуанозин	dGuo или dG	Дезоксигуанило-вая кислота	5′-dGMP или pdG	

[1)] Символы, использующиеся для обозначения 2-дезоксирибонуклеозидов и 2-дезокснрибонуклеотидов, отличаются от таковых для рибонуклеозидов и рибонуклеотидов только наличием приставки d.

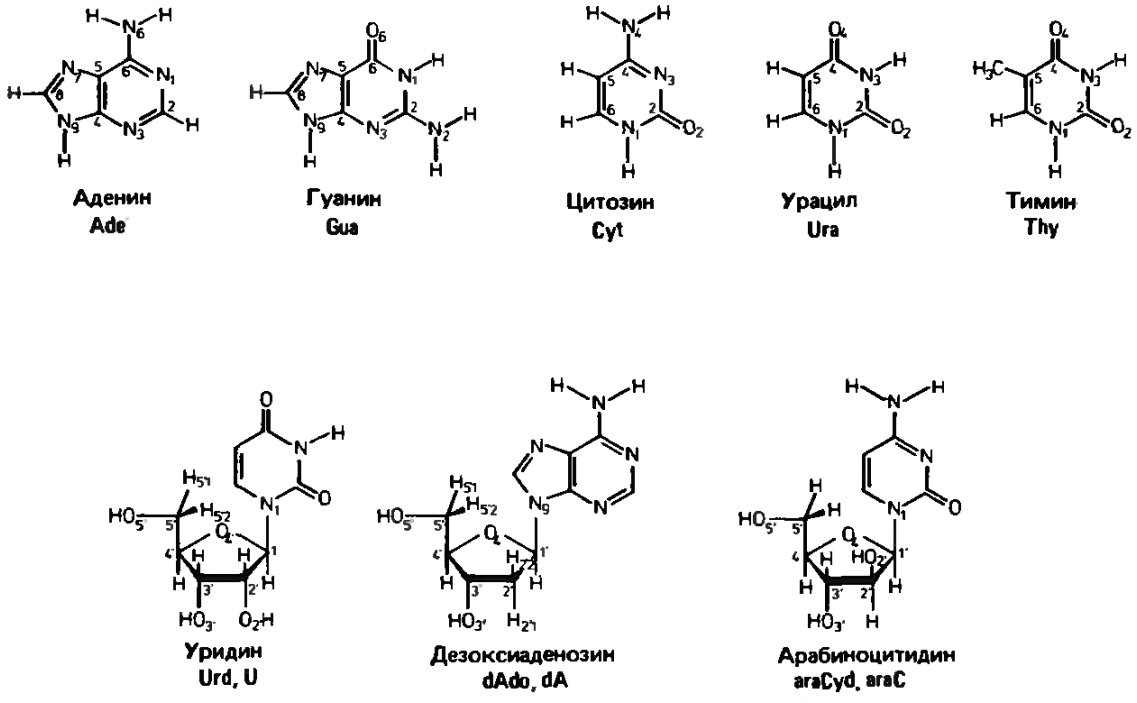
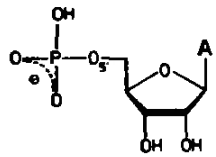


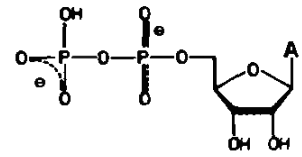
Рис. 2.2. Структурные формулы некоторых оснований, нуклеозидов, нуклеотидов и кофермента NAD^+.

фосфодиэфирных связей между 2′- и 3′-гидроксилами или между 3′- и 5′-гидроксилами в рибонуклеотидах и между 3′- и 5′-гидроксилами в дезоксирибонуклеотидах. Одним из таких диэфиров является аденозин-3′,5′-циклофосфат (3′,5′-cAMP, cAMP, A > p), который играет важную роль так называемого «второго посредника». В богатых энергией ди- и трифосфатах олигофосфатный остаток присоединяется к сахару по 5′-положению; в результате образуется, например, аденозинтрифосфат (ATP, pppA, Ado-5′PPP). В зависимости от степени гидролиза аденозинтрифосфата могут образоваться аденозиндифосфат (ADP, ppA) или аденозинмонофосфат – адениловая кислота (5′-AMP). Аналогичным образом образуются олигофосфаты других нуклеотидов. Все они играют важную роль в биосинтезе полинуклеотидов. Особое место занимает кофермент никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+), состоящий из разделенных пирофосфатной группировкой Ado и никотинамидрибозида (Nir): Ado-5′PP5′-Nir [12] (рис. 2.2).

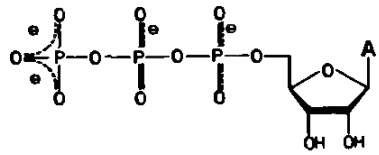
Нуклеотиды в составе олиго- и полинуклеотидов соединяются друг с другом 3′,5′-фосфодиэфирной связью. Тринуклеозиддифосфат с последовательностью G—C—U называют гуанилил-3′-5′-цитидилил-3′,5′-уридином и обозначают GpCpU или просто GCU; при этом 5′-концевым нуклеотидом является G, а 3′-концевым – U. 2′,5′-Фосфодиэфирная связь между нуклеотидами может существовать только в полимерах рибонуклеотидов. В природе такие соединения не обнаружены, они могут быть синтезированы только искусственно. В последнее время интерес к синте-



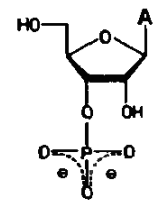
Адениловая кислота, 5′AMP, pA
Аденозин-5′-фосфат



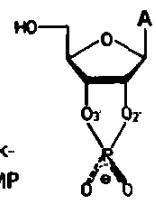
Аденозиндифосфат, ADP, ppA



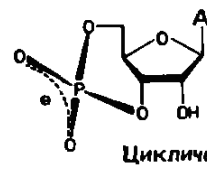
Аденозинтрифосфат,
ATP, pppA



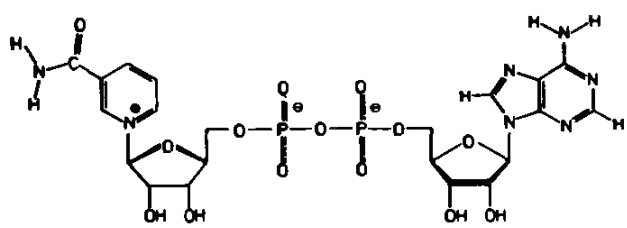
Аденозин-3′-фосфат,
3′AMP, Ap



Циклический
аденозин-2′,3′-цик-
лофосфат, 2′,3′-AMP



Циклический аденозин-3′,5′-фосфат,
3′, 5′ -AMP, циклический AMP



Никотинамидадениндинуклеотид, NAD^+

тическим олигорибонуклеотидам заметно возрос, поскольку оказалось, что они стимулируют активность интерферона.

Полинуклеотиды типа poly(уридилат), poly(дезоксиаденилат) или, короче, poly(U), poly(dA) и т. д. называют синтетическими *гомополимерами.* Poly(дезоксиаденилат–дезокситимидилат)–poly(dA–dT)–называют *гетерополимером* с чередующейся последовательностью. Если dA и dT распределены вдоль цепи случайным образом, то в обозначении полимера дефис заменяется запятой–poly(dA, dT). Poly(U) и poly(A) могут образовывать комплексы в соотношении 1:1 или 2:1. В обозначениях таких комплексов на это указывает точка между символами, отвечающими отдельным цепям: poly(A)·2 poly(U). В обозначении различных тРНК, например $тРНК^{Phe}$ (дрожжи), верхний символ указывает на специфичность тРНК к определенной аминокислоте, а в скобки заключено название источника, откуда выделена данная тРНК (табл. 2.1).

2.2. СИСТЕМА НУМЕРАЦИИ АТОМОВ

На рис. 2.1–2.3 представлена принятая для нуклеотидов система нумерации атомов. Символы, обозначающие атомы сахара, отличаются от таковых для атомов оснований значком «штрих». Остов полинуклеотида описывают в направлении $P \rightarrow O_{5'} \rightarrow C_{5'} \rightarrow C_{4'} \rightarrow C_{3'} \rightarrow O_{3'} \rightarrow P$. В сахарном кольце нумерация такова: $C_{1'} \rightarrow C_{2'} \rightarrow C_{3'} \rightarrow C_{4'} \rightarrow O_{4'} \rightarrow$ $\rightarrow C_{5'}$ (обратите внимание, что ранее принятое обозначение $O_{1'}$ заменено на $O_{4'}$ [19]).

Двум атомам водорода при атоме $C_{5'}$ и при атоме $C_{2'}$ в дезоксирибозе, а также двум свободным атомам кислорода при атомах фосфора приписываются номера 1 и 2, причем это делается следующим образом: если смотреть вдоль цепи в направлении $O_{5'} \rightarrow C_{5'}$, то, двигаясь по часовой стрелке, мы будем последовательно проходить атомы $C_{4'}$, $H_{5'1}$, $H_{5'2}$. Аналогично если смотреть вдоль цепи в направлении $O_{3'} \rightarrow P \rightarrow$ $\rightarrow O_{5'}$, то при движении по часовой стрелке мы будем последовательно проходить атомы $O_{5'}$, O_{P_1}, O_{P_2} (рис. 2.3).

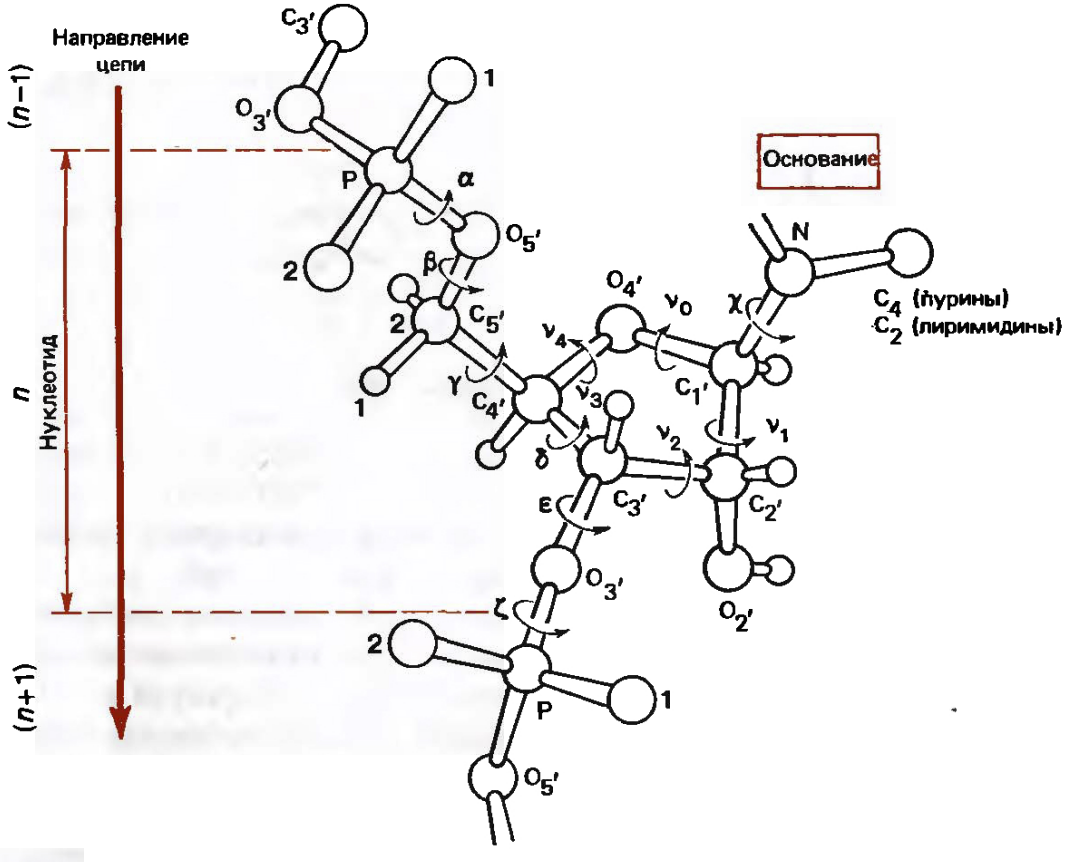


Рис. 2.3. Система нумерации атомов и определение торсионных углов для полирибонуклеотидной цепи. Порядковый номер нуклеотида увеличивается сверху вниз, т. е. в направлении $O_{5'} \rightarrow O_{3'}$. Индексы 1 и 2 приписываются атомам водорода при атоме $C_{5'}$ и атомам кислорода при атоме P согласно правилу, указанному в тексте. В дезоксирибозе атому водорода, замещающему атом $O_{2'}$, приписывается индекс 1, а второму атому водорода – индекс 2. Полное описание торсионных углов дается в табл. 2.2.

2.3. ТОРСИОННЫЕ УГЛЫ (УГЛЫ ВРАЩЕНИЯ) И ИНТЕРВАЛЫ ИХ ЗНАЧЕНИЙ

Трехмерную структуру молекул обычно описывают посредством длин связей, валентных углов и углов вращения групп атомов вокруг связей (торсионных углов). Торсионные углы, описывающие вращение вокруг связи B—C, задаются последовательностью четырех атомов A—B—C—D. *Торсионный угол* (или *угол вращения*) θ на рис. 2.4–это угол между проекциями связей A—B и C—D на плоскость, перпендикулярную связи B—C. Торсионный угол, равный нулю, соответствует наложению связей A—B и C—D друг на друга при проецировании (компланарная, или *цис*-конформация). Торсионный угол считается положительным, если дальняя от наблюдателя, смотрящего вдоль связи B—C, связь повернута по часовой стрелке относительно ближней связи. Значения торсионных углов обычно указывают либо в интервале 0–360°, либо в интервале $-180 \div +180°$ [19, 22].

Торсионный угол может быть определен и как угол между двумя плоскостями, в которых лежат атомы A, B, C и B, C, D соответственно.

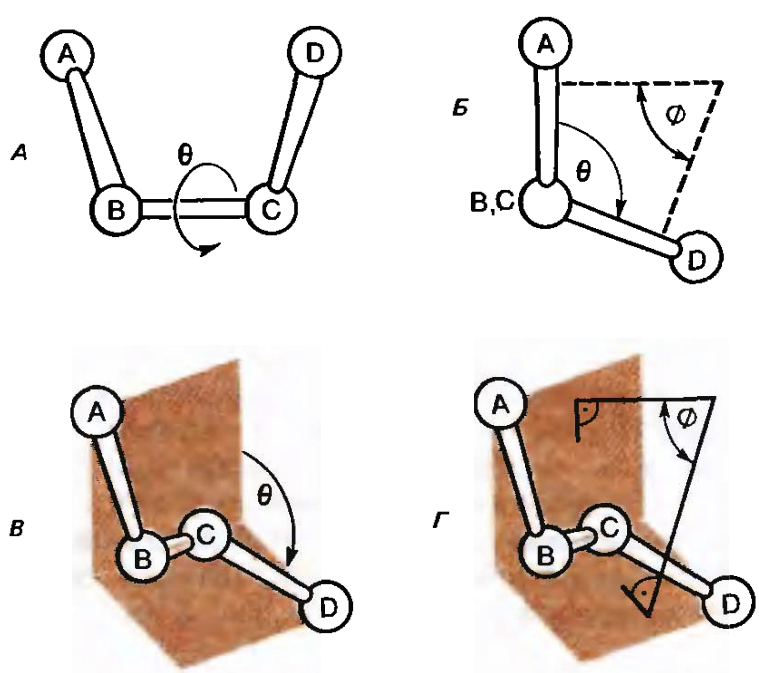


Рис. 2.4. Определение *торсионных* и *двугранных углов*. *А. Торсионный угол* θ (A—B—C—D), описывающий ориентацию связей A—B и C—D относительно центральной связи B—C. *Б.* Вид вдоль связи B→C. θ–это торсионный угол, равный углу между проекциями связей A—B и C—D на плоскость, перпендикулярную связи B—C; дополнительный ему угол ϕ называется *двугранным углом*. Если связи A—B и C—D *цис*-планарны (совпадают при проецировании), то угол θ равен 0°, а ϕ–180°; если дальняя связь C—D повернута относительно ближней связи A—B по часовой стрелке, то углы считаются положительными. *В.* θ определяется как угол между плоскостями A—B—C и B—C—D. *Г. Двугранный угол* ϕ–это угол между нормалями к этим плоскостям.

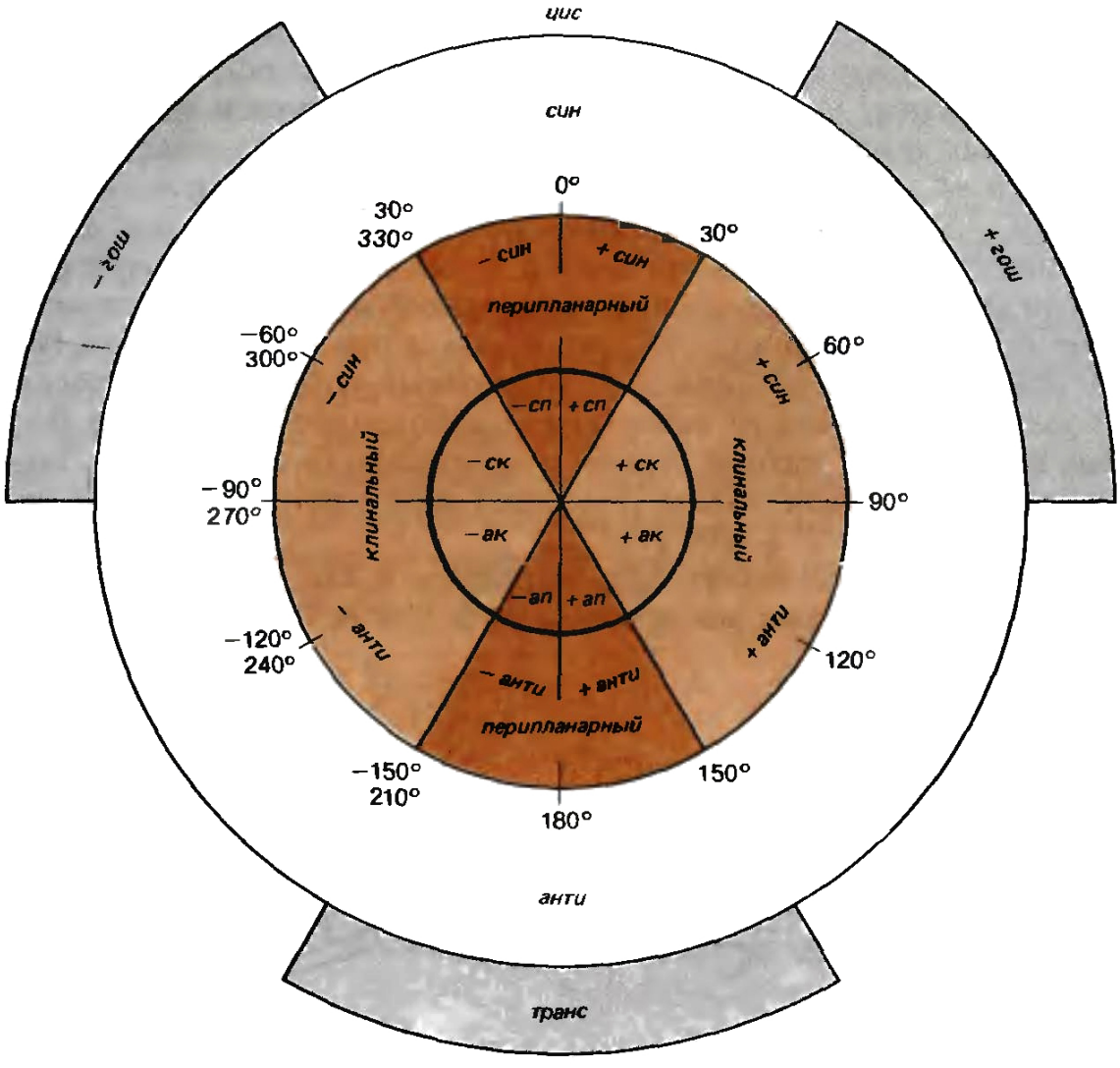


Рис. 2.5. Связь между системой обозначений торсионных углов, используемой в спектроскопии (*цис*, *транс*, *+ гош*, *– гош*), и системой, введенной Клайном и Прелогом (*син*, или *синперипланарный*, *анти*, или *антиперипланарный*, *+ синклинальный*, *– синклинальный*, *+ антиклинальный*, *– антиклинальный*). Последняя рекомендована комиссией IUPAC-IUB по номенклатуре нуклеотидов [19] и используется в данной книге. Интервалы значений *син*, *анти* имеют особое значение в стереохимии нуклеотидов (см. рис. 2.10).

Для определения торсионного угла может быть использован и угол между нормалями к этим плоскостям. Этот *двугранный угол* ф есть не что иное, как угол, дополнительный к торсионному. *В литературе торсионный и двугранный углы часто используют как синонимы, тем не менее путать их друг с другом не следует.*

Молекулы со свободным вращением вокруг одинарных связей принимают не все возможные конформации, а предпочитают только некоторые из них, стерически разрешенные. Поэтому часто бывает удобно

описывать структуру молекул интервалами значений торсионных углов. В органической химии обычно используют разбиение, предложенное Клайном и Прелогом: *син* ($\sim 0°$), *анти* ($\sim 180°$), $\pm$ *синклинальный* ($\sim \pm 60°$) и $\pm$ *антиклинальный* ($\sim \pm 120°$) [23, 24]. В работах по спектроскопии и кристаллографии чаще всего используют такие обозначения: *цис* ($\sim 0°$), *транс* ($\sim 180°$), $\pm$ *гош* ($\sim \pm 60°$). Обе эти системы представлены на рис. 2.5. Мы будем придерживаться системы Клайна–Прелога, поскольку именно она рекомендована подкомиссией IUPAC-IUB по номенклатуре нуклеотидов.

2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОРСИОННЫХ УГЛОВ В НУКЛЕОТИДАХ

Конформация сахарофосфатного остова в направлении $P \rightarrow O_{5'} \rightarrow \rightarrow C_{5'} \rightarrow C_{4'}$ и т. д. описывается торсионными углами α, β, γ, δ, ε, ζ в алфавитном порядке, причем α определяет вращение вокруг связи $P \rightarrow O_{5'}$ (см. табл. 2.2 и рис. 2.3). Пять эндоциклических торсионных углов сахара обозначаются через ν с нижними индексами от 0 до 4; угол, определяющий ориентацию основания относительно сахарного кольца, обозначается через χ. Заметим, что ν_3 и δ описывают ориентацию относительно одной и той же связи: $C_{3'}—C_{4'}$. ν_3 определяет ориентацию в кольце сахара, а δ – вне кольца. Связь между этими углами детально описана в гл. 4.

Таблица 2.2. Определение торсионных углов в нуклеотидах [16][1)]

Торсионный угол	Атомы, образующие этот угол
α	$_{(n-1)}O_{3'}—P—O_{5'}—C_{5'}$
β	$P—O_{5'}—C_{5'}—C_{4'}$
γ	$O_{5'}—C_{5'}—C_{4'}—C_{3'}$
δ	$C_{5'}—C_{4'}—C_{3'}—O_{3'}$
ε	$C_{4'}—C_{3'}—O_{3'}—P$
ζ	$C_{3'}—O_{3'}—P—O_{5'(n+1)}$
χ	$O_{4'}—C_{1'}—N_1—C_2$ (пиримидины)
	$O_{4'}—C_{1'}—N_9—C_4$ (пурины)
ν_0	$C_{4'}—O_{4'}—C_{1'}—C_{2'}$
ν_1	$O_{4'}—C_{1'}—C_{2'}—C_{3'}$
ν_2	$C_{1'}—C_{2'}—C_{3'}—C_{4'}$
ν_3	$C_{2'}—C_{3'}—C_{4'}—O_{4'}$
ν_4	$C_{3'}—C_{4'}—O_{4'}—C_{1'}$

[1)] Атомы с индексами $(n-1)$ и $(n+1)$ принадлежат соседним нуклеотидам.

2.5. КОНФОРМАЦИЯ САХАРНОГО КОЛЬЦА. ЦИКЛ ПСЕВДОВРАЩЕНИЯ

Пятичленное фуранозное кольцо обычно непланарно. Оно может принимать конформацию, подобную конверту (E, от англ. envelope), в которой четыре атома из пяти находятся в одной плоскости, а один атом выходит из нее на расстояние до 0,5 Å, либо изогнутую твист-конформацию (T, от англ. twist), в которой любые два соседних атома смещены в разные стороны от плоскости, построенной по трем оставшимся атомам сахарного кольца [25] (рис. 2.6). В обоих случаях атомы, выходящие из плоскости в ту же сторону, что и атом $C_{5'}$, называют *эндо*-атомами, а атомы, смещенные в противоположную сторону, *экзо*-атомами [26] (рис. 2.7). Соответствующим образом обозначаются

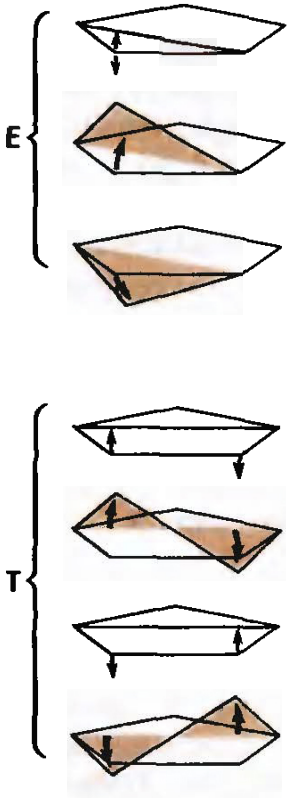


Рис. 2.6. Конформация конверта (E) и твист-конформация (T) пятичленного кольца. В E-конформации четыре атома компланарны, а пятый выступает из плоскости; в T-конформации компланарны три атома, а два отходят в разные стороны от плоскости.

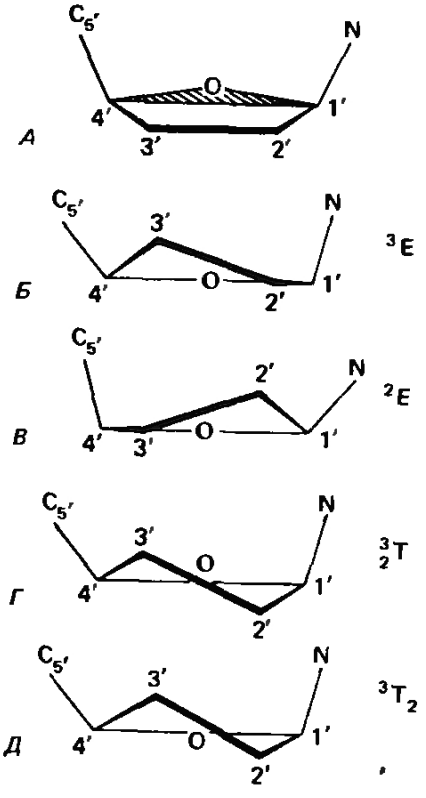


Рис. 2.7. Различные конформации сахара. *А*. Исходное состояние с несуществующим плоским пятичленным сахаром. Треугольник $C_{1'}$—$O_{4'}$—$C_{4'}$ заштрихован. *Б*–*Д*. Плоскость треугольника перпендикулярна плоскости рисунка. *Б*. Конверт $C_{3'}$-*эндо*, или ^{3}E. *В*. Конверт $C_{2'}$-*эндо*, или ^{2}E. *Г*. Симметричная твист-конформация, или полукресло $C_{2'}$-*экзо*–$C_{3'}$-*эндо*, или $^3_2$T. *Д*. Несимметричная твист-конформация с главным $C_{3'}$-*эндо*-выступом и минорным $C_{2'}$-*экзо*-выступом, или ^{3}T$_2$.

и конформации сахарных колец. Следует заметить, что переход из Е- в Т-конформацию происходит очень легко; обычно четыре атома, определяющие плоскость кольца в Е-конформации, редко бывают строго компланарными, а смещение атомов от плоскости кольца в Т-конформации редко бывает симметричным. Большее отклонение от планарности называют главным выступом (major puckering), меньшее – минорным (minor puckering).

При сокращенной записи символы, отвечающие *эндо-* и *экзо*-атомам, ставят либо перед буквами Е и Т, либо после них в зависимости от того, о каком выступе идет речь – о главном или минорном. Несимметричная $^{4}C_{3'}$-*эндо*$-C_{2'}$-*экзо*-твист-конформация, с $C_{3'}$-главным и $C_{2'}$-минорным выступами, обозначается $^{3}T_{2}$. Подобная же, но симметричная конформация обозначается как ${}^{3}_{2}T$. Символ ^{2}E отвечает $C_{2'}$-*эндо*-конверту, а ${}_{3}E-C_{3'}$-*экзо*-конверту (рис. 2.7).

Цикл псевдовращения. Описанные способы обозначения конформаций сахара являются приближенными и не могут отразить все промежуточные состояния, в которых находятся эти соединения. Конформации пятичленных колец были проанализированы весьма изящным методом, основанном на понятии псевдовращения. Впервые этот метод был введен для анализа конформаций циклопентанов [27, 28] и позже применен к замещенной фуранозе [29].

В циклопентанах конформационные изменения происходят не через образование плоских промежуточных форм: максимальный выступ перемещается по кольцу фактически без энергетических барьеров, что приводит к бесконечному числу возможных конформаций, которые описываются максимальным торсионным углом (степенью изгиба кольца ν_{max}) и фазовым углом псевдовращения P [30, 31] (рис. 2.8). Если пятичленное кольцо замещено асимметрично, как в нуклеотидах, возникает энергетический барьер, ограничивающий псевдовращение и приводящий к тому, что кольцо находится предпочтительно в каких-то определенных конформациях (гл. 4).

Фазовый угол псевдовращения P связан с эндоциклическими торсионными углами следующим соотношением [31]:

$$\operatorname{tg} P = \frac{(\nu_4 + \nu_1) - (\nu_3 + \nu_0)}{2\nu_2 (\sin 36^\circ + \sin 72^\circ)}. \qquad (2.1)$$

Фазовый угол определен таким образом, что $P = 0^\circ$, когда торсионный угол ν_2 достигает максимального положительного значения, что соответствует симметричной $C_{2'}$-*экзо*$-C_{3'}$-*эндо*-твист-конформации – ${}^{3}_{2}T$ (рис. 2.7, *Г*). Зеркальному отображению этой конформации соответствует фазовый угол $P = 180^\circ$ (рис. 2.8). Если известен фазовый угол P, то все пять эндоциклических торсионных углов определяются из соотношения

$$\nu_{j+2} = \nu_{max} \cos(P + j\phi), \qquad (2.2)$$

где $j = 0, \ldots 4$, а $\phi = \frac{720^\circ}{5} = 144^\circ$.

ν_{max} определяется при $j = 0$:

$$\nu_{max} = \frac{\nu_2}{\cos P}. \qquad (2.3)$$

Заметим, что изменение P в формуле (2.2) на 180° меняет знак всех углов ν, что приводит к зеркальному отображению конформации, соответствующей данному фазовому углу P.

Рис. 2.9 иллюстрирует теоретически рассчитанные изменения всех пяти эндоциклических торсионных углов в пределах одного полного цикла псевдовращения. Для любого значения P сумма положительных торсионных углов равна сумме отрицательных углов, т.е. во всех слу-

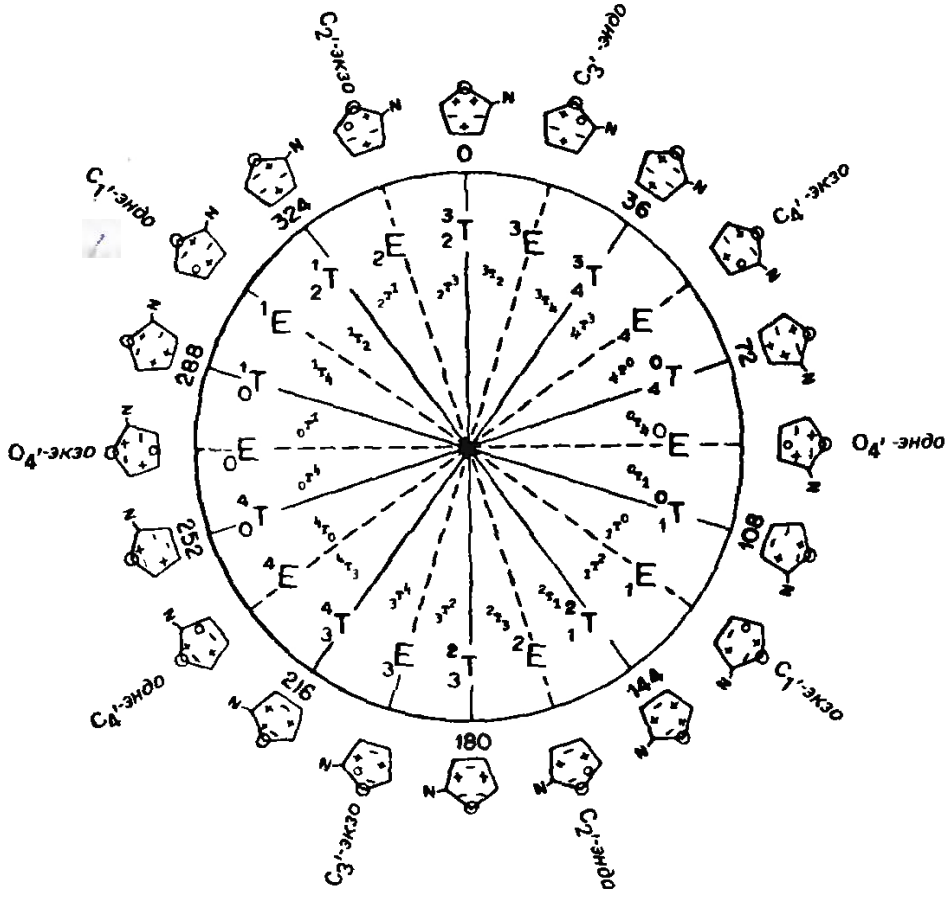


Рис. 2.8. Цикл псевдовращения для фуранозного кольца в нуклеозидах [31]. Приведенные значения фазовых углов кратны 36°. Конформация конверта E и твист-конформация T чередуются каждые 18°. Поворот на 180° приводит к зеркальному отображению исходной конформации. Указаны знаки эндоциклических торсионных углов рибоз (расположенных по окружности): (+) положительный, (−) отрицательный, (0) отвечает 0°.

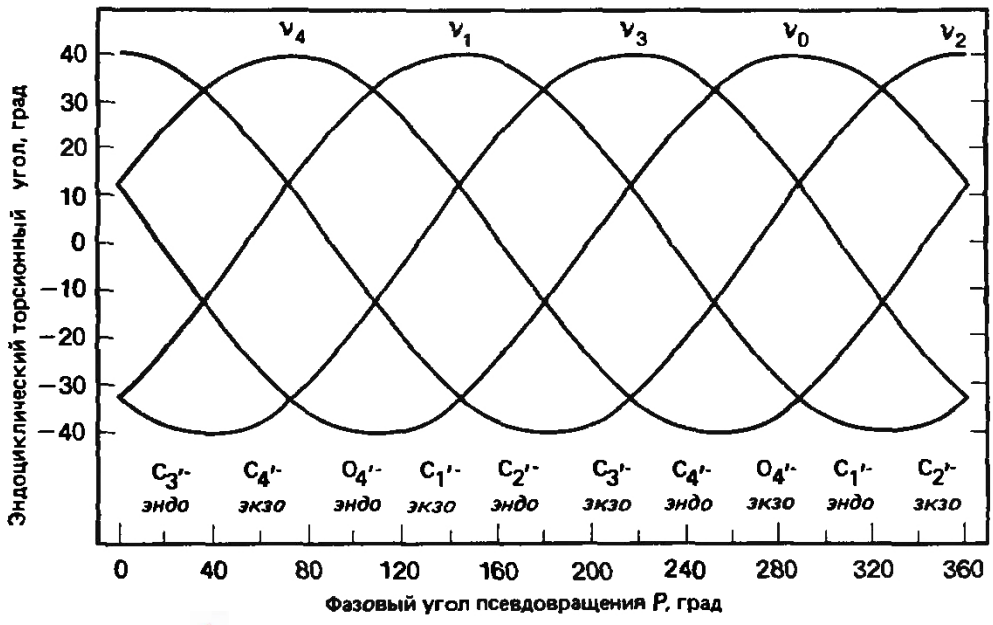


Рис. 2.9. Изменение пяти эндоциклических торсионных углов фуранозы при полном цикле псевдовращения [32].

чаях выполняется условие

$$\nu_0 + \nu_1 + \nu_2 + \nu_3 + \nu_4 = 0. \qquad (2.4)$$

Обратите внимание, что в цикле псевдовращения конформация конверта (E) и изогнутая твист-конформация (T) чередуются через каждые 18°. Четной кратности соответствует конформация T, а нечетной – E. Анализ структуры нуклеотидов показывает, что их конформации соответствуют в основном двум областям цикла псевдовращения: северной N (north), с $0° \leqslant P \leqslant 36°$ ($C_{3'}$-*эндо*-конформация), и южной S (south), с $144° \leqslant P \leqslant 190°$ ($C_{2'}$-*эндо*-конформация).

2.6. *СИН/АНТИ*-КОНФОРМАЦИЯ. ВРАЩЕНИЕ ВОКРУГ ГЛИКОЗИДНОЙ СВЯЗИ

В зависимости от взаимной ориентации основания и сахарного кольца (т.е. от величины угла вращения вокруг гликозидной связи $C_{1'}$—N) различают две основные конформации – *син* и *анти* [33, 34] (рис. 2.10). Они определяются торсионным углом χ (рис. 2.3; табл. 2.2):

$$\chi = \begin{cases} O_{4'}—C_{1'}—N_9—C_4 \text{ (пурины)} \\ O_{4'}—C_{1'}—N_1—C_2 \text{ (пиримидины)} \end{cases}$$

В *анти*-конформации шестичленное кольцо пурина и O_2-атом пиримидина направлены от сахара, тогда как в *син*-конформации они нави-

сают над кольцом либо направлены в его сторону (рис. 2.10). По системе Клайна–Прелога *анти*-конформация обозначается как *ап* (*антипланарная*), а *син*-конформация – *сп* (*син-планарная*). В литературе встречаются и другие определения угла χ. Связь между ними представлена в табл. 2.3 [35].

В кристаллах некоторых природных и химически модифицированных нуклеозидов наблюдается особая *анти*-конформация, в которой связь $C_1'—C_2'$ фактически совмещается в проекции со связью $N_1—C_6$ в пиримидинах и со связью $N_9—C_8$ в пуринах. По системе Клайна–Прелога эту предельную *высокую-анти*-конформацию [36] оснований с углом $\chi \sim -90°$ обозначают сокращенно *–ск*. Поскольку термин «*высокая-анти*», согласно нашему определению угла χ, отвечает просто торсионным углам, меньшим чем у *анти*, во избежание путаницы для обозначения подобной конформации к термину «*высокая-анти*» будет добавляться символ *–ск* в круглых скобках – *высокая-анти* (*–ск*).

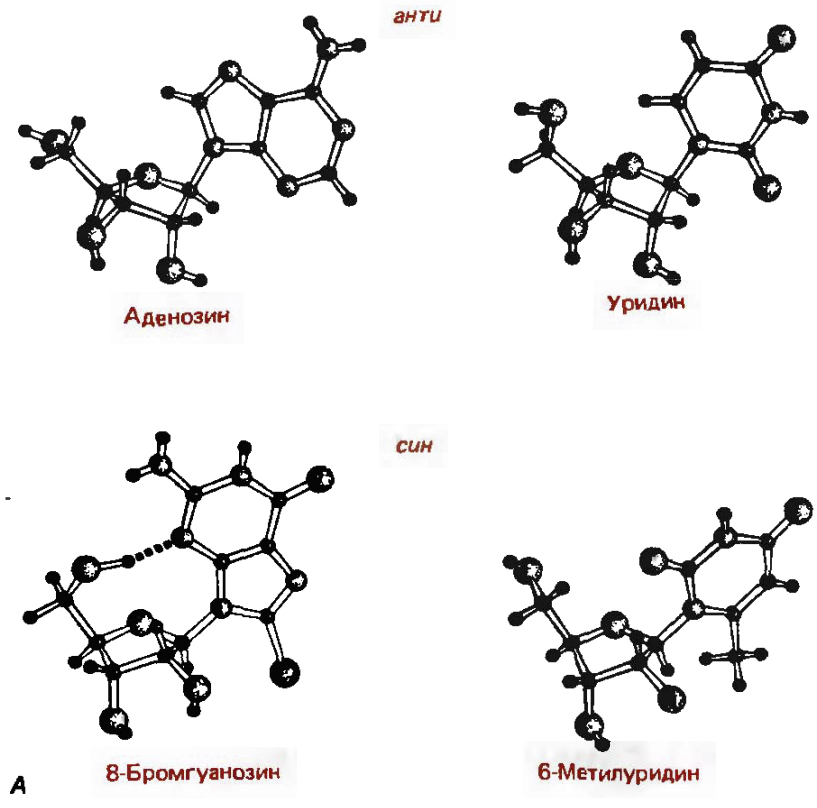


Рис. 2.10. *А*. Схема, иллюстрирующая общую геометрию нуклеозида в *син-* или *анти*-конформациях. Аденозин [39] и уридин [40] находятся в *анти*-ориентации, тогда как 8-бромгуанозии [41] и 6-метилуридин [42] – в *син*-коиформации из-за наличия объемиых заместителей в *орто*-положении относительно гликозидной связи. Стабилизирующая *син*-конформацию 8-бромгуанозина внутримолекулярная водородная связь $O_5'\cdot H\cdots N_3$ обозиачеиа пунктиром. Отметим, что в *анти*-нуклеозидах сахар предпочитает находиться в C_3'-*эндо*-коиформации, а в *син*-нуклеозидах – в C_2'-*эндо*-конформации. Сферы с наименьшим диаметром отвечают атомам Н и далее, по мере увеличения диаметра, – атомам С, N, О соответственно; положение атомов установлено с помощью кристаллографических даниых.

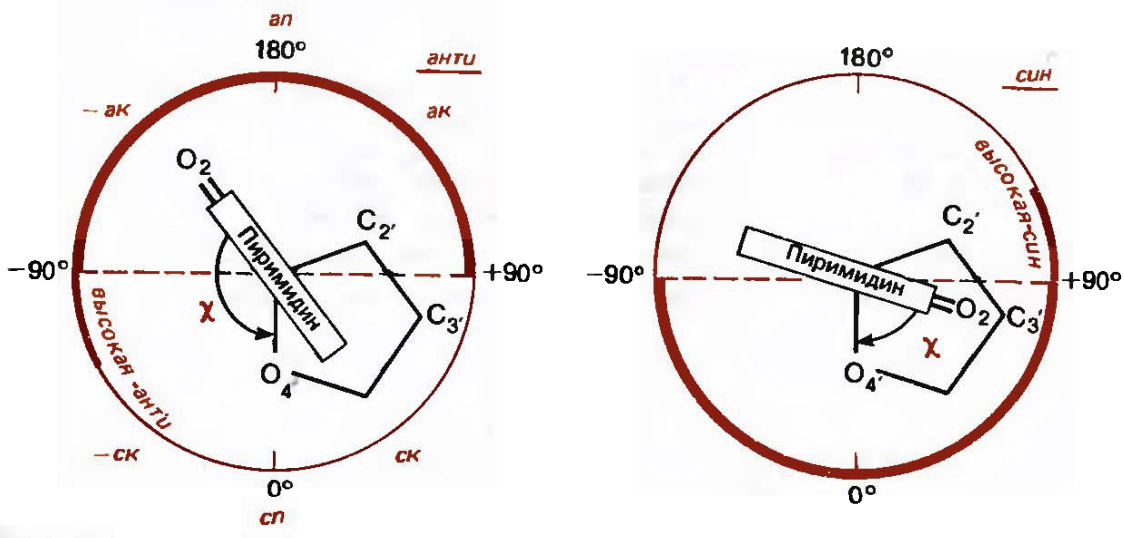


Рис. 2.10. *Б.* Конформации *анти* и *син* в соответствии с рекомендациями IUPAC-IUB [19] на примере пиримидинового нуклеозида. χ – это торсионный угол $O_{4'}$—$C_{1'}$—N_1—C_2 (табл. 2.2). Пиримидиновое основаиие направлено к читателю; основание поворачивается относительно неподвижного сахара. *Высокая-анти(– ск)-область* ($\chi \sim -90°$) фактически является частью области *син*, а *высокая-син(+ ак)* – частью *анти*.

Таблица 2.3. Связь между различиыми определениями торсионного угла относительно гликозидной связи $C_{1'}$—N [$\chi_{принятое} = \chi_{другое}$ + Разность] [35]

	$\chi_{принятое}$	Другие определения	Разность между $\chi_{принятое}$ и $\chi_{другое}$, град
Пурин		$O_{4'}$—$C_{1'}$—N_9—C_8	+ 180
Пиримидин		$O_{4'}$—$C_{1'}$—N_1—C_6	
Пурин	$O_{4'}$—$C_{1'}$—N_9—C_4	$C_{2'}$—$C_{1'}$—N_9—C_8	– 62,5
Пиримидин	$O_{4'}$—$C_{1'}$—N_1—C_2	$C_{2'}$—$C_{1'}$—N_1—C_6	
Пурин		$C_{2'}$—$C_{1'}$—N_9—C_4	+ 116,5
Пиримидин		$C_{2'}$—$C_{1'}$—N_9—C_2	

2.7. ОРИЕНТАЦИЯ ОТНОСИТЕЛЬНО СВЯЗИ $C_{4'}$—$C_{5'}$

Вращаясь вокруг связи $C_{4'}$—$C_{5'}$, атом $O_{5'}$ по-разному ориентируется относительно фуранозного кольца. Это вращение реально приводит к трем конформациям (рис. 2.11), которые принято описывать двумя торсионными углами: ϕ_{oo}($O_{5'}$—$C_{5'}$—$C_{4'}$—$O_{4'}$) и ϕ_{oc}($O_{5'}$—$C_{5'}$—$C_{4'}$—$C_{3'}$) [37] либо угловыми интервалами (+) или (–) (*гош* или *транс*) (табл. 2.4). Для описания ориентации атома $O_{5'}$ относительно связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ IUPAC-IUB рекомендует использовать угол γ ($= \phi_{oc}$) [19].

Таблица 2.4. Разные обозначения интервалов значений торсионного угла относительно экзоциклической связи $C_{4'}$—$C_{5'}$

Принятое	Другие обозначения ориентаций относительно связи $C_{4'}$—$C_{5'}$
+ ск	*гош, гош*; (+)*гош*; *гг*; (+)*г*
− ск	*транс, гош*; *транс*; *тг*; *т*
ап	*гош, транс*; (−)*гош*; *гт*; (−)*г*

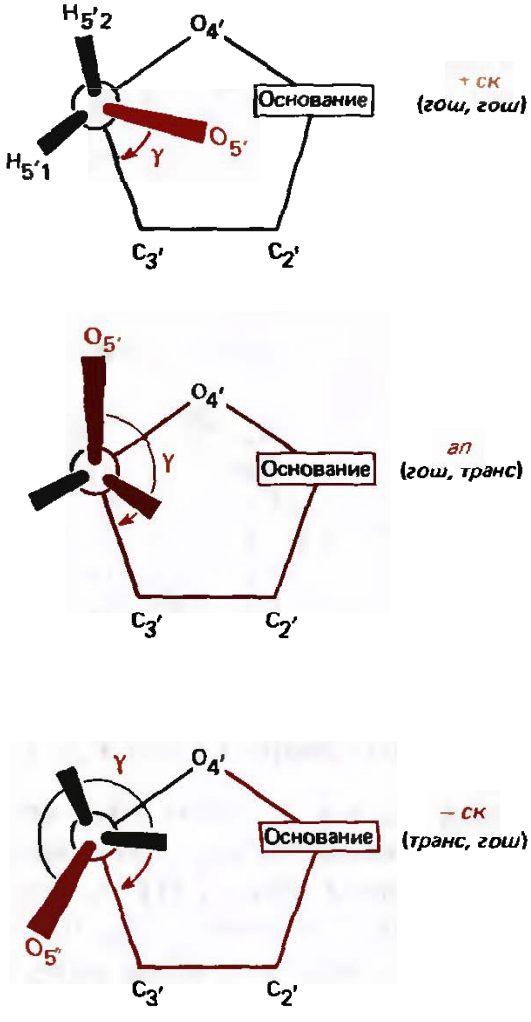


Рис. 2.11. Определение интервалов углов вращения вокруг связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ (наблюдатель смотрит в направлении $C_{5'}$—$C_{4'}$).

2.8. ПАРАМЕТРЫ СПИРАЛИ. СИСТЕМА ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ОСНОВАНИЯМИ

Полинуклеотиды, имеющие спиральную структуру, могут быть описаны спиральными параметрами. Шаг спирали – это расстояние вдоль оси спирали, соответствующее одному полному витку (повороту на 360°). Если n – число нуклеотидов на один виток, а h – расстояние между двумя соседними нуклеотидами вдоль оси спирали, то шаг спирали P будет связан с этими величинами соотношением $P = nh$. Для целочисленных спиралей n целое, но, вообще говоря, оно может быть любым. Угол $t = \frac{360^\circ}{n}$ между двумя соседними нуклеотидами называется углом спирального вращения (рис. 2.12).

Полинуклеотидные цепи в двойной спирали удерживаются вместе в результате комплементарного спаривания оснований [7, 33] (рис. 2.13). Пары оснований AU и GC изоморфны, т.е. сходны по форме. Расстояния $C_{1'} \ldots C_{1'}$ в обеих парах практически одинаковы. Связи $C_{1'}$—N и со-

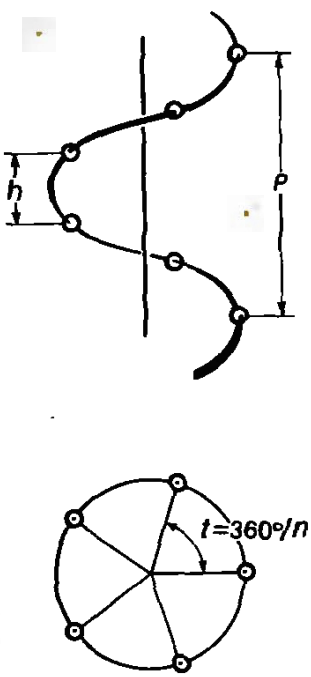


Рис. 2.12. Параметры спирали. P – шаг спирали, h – расстояние между остатками вдоль оси спирали и t – угол спирального вращения. Рассмотрена правая спираль с $n = 5$ остатками на виток.

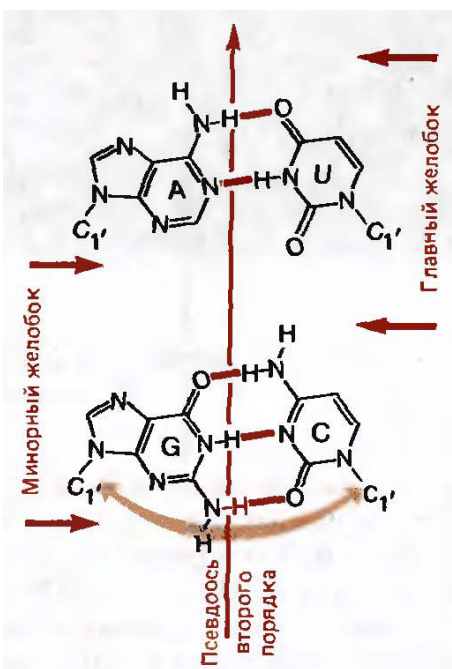


Рис. 2.13. Схематическое изображение пар оснований AU(T) и GC, которые входят в состав РНК (ДНК). Водородные связи N—H···N и N—H···O обозначены жирными цветными линиями. $C_{1'}$—N-гликозидная связь одного основания связана с гликозидной связью спаренного с ней основания (двойная цветная стрелка внизу рисунка) псевдоосью симметрии 2-го порядка (тонкая цветная линия). Указано расположение главного и минорного желобков.

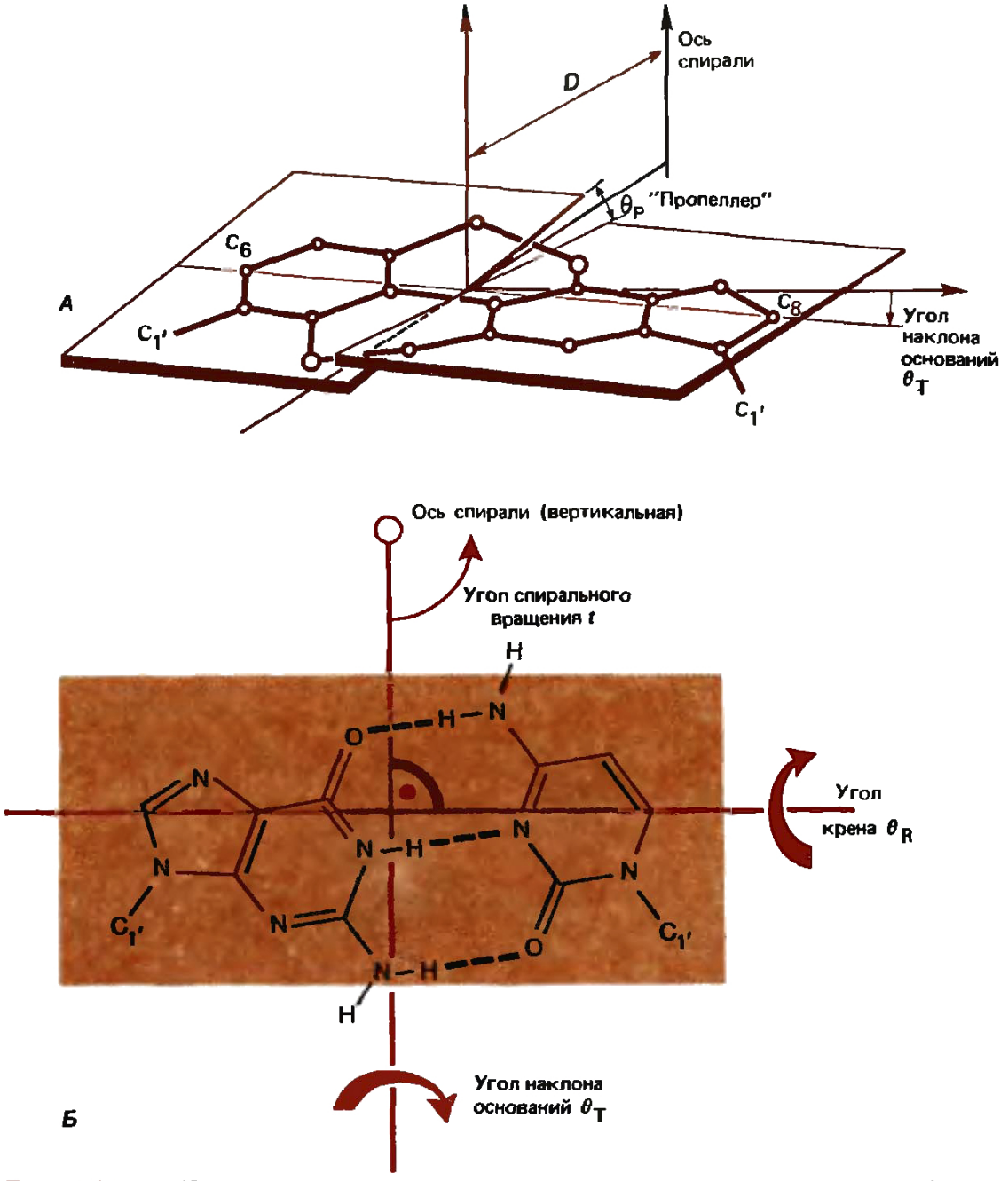


Рис. 2.14. *А.* Два спаренных основаиия ие лежат в одной плоскости: обычио они повернуты друг относительно друга и образуют пропеллер. Угол пропеллера обозиачается через θ_P и определяется двугранным углом между плоскостями оснований; θ_P считается положительным, если ближиее к наблюдателю, смотрящему вдоль длииной оси пары, основание повернуто относительно дальнего по часовой стрелке. *Б.* Ориентация пары основаиий относительно оси спирали задается углом спирального вращеиия t, углом наклона θ_T и углом крена θ_R усредненной плоскости пары (затеиена). Поворот на угол θ_T происходит вокруг псевдооси 2-го порядка (см. рис. 2.13), а поворот на угол θ_R – вокруг перпендикулярной ей оси, проходящей примерно через атомы C_6 (пиримидина) и C_8 (пурина). Углы θ_T и θ_R положительиы, если поворот происходит по часовой стрелке (направление поворота указано жирными стрелками). Углу 0° соответствует плоскость рисунка, перпендикулярная оси спирали. При положительных зиачениях θ_T иже плоскости рисунка оказывается основание, находящееся справа (цитозин), а при положительных зиачениях угла θ_R – атомы, смотрящие в главный желобок (верхняя часть затененной области).

ответствующие сахарофосфатные остовы, находящиеся в антипараллельной ориентации, связаны псевдоосью симметрии 2-го порядка. Такая же псевдосимметрия характерна для двухцепочечных ДНК и РНК.

Обычно центр пар не совпадает с осью спирали, а смещен от нее на некоторое расстояние *D* (рис. 2.14). Кроме того, плоскость пар не строго перпендикулярна оси. Ее отклонение от перпендикулярного положения определяется двумя углами – углом наклона θ_T (tilt) и углом крена θ_R (roll) пары (см. рис. 2.14). Спаренные основания не обязательно компланарны. Они могут быть повернуты друг относительно друга (вокруг длинной оси пары, проходящей через C_6-атом пиримидина и C_8-атом пурина) на угол пропеллера θ_P (propeller), который равен двугранному углу между нормалями к плоскостям оснований.

Молекулы двухцепочечных РНК и ДНК имеют характерные желобки. Как мы уже говорили, пары оснований смещены от оси спирали на некоторое расстояние *D*. Кроме того, две гликозидные связи пары направлены в одну сторону (рис. 2.14). Это приводит к тому, что поверхность спирали не является гладкой, как у цилиндра, а имеет два желобка разной ширины и глубины. Минорный желобок находится там, где располагаются O_2-атом пиримидина и N_3-атом пурина, а главный – с противоположной стороны (рис. 2.13). В тех случаях, когда ось симметрии 2-го порядка либо любая другая ось симметрии совпадает с осью спирали, как это имеет место в $[poly(AH^+)]_2$ или $[poly(G)]_4$, спираль имеет желобки только одного типа (разд. 13.3 и 13.6).

Для описания положения атомов в спиральной молекуле используют цилиндрические координаты *r*, ϕ, *z*, где *r* – расстояние от оси спирали,

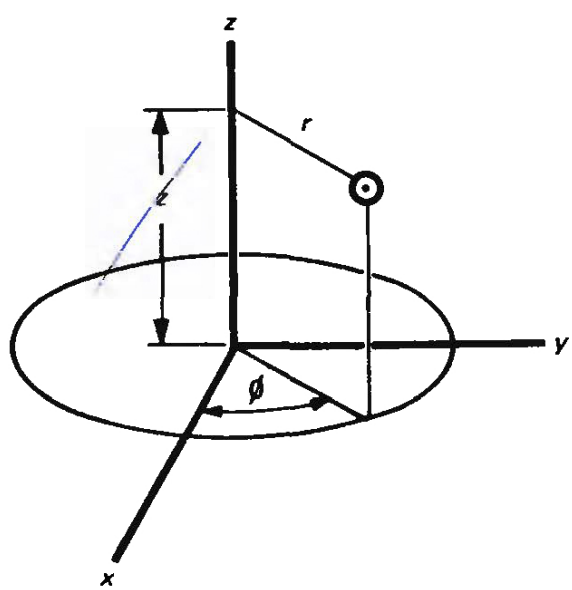


Рис. 2.15. Цилиндрические координаты *r*, ϕ, *z*.

ϕ – азимутальный угол поворота, отсчитываемый от некоторого нулевого направления, а z – расстояние вдоль оси спирали (рис. 2.15). Если двойная спираль обладает осью симметрии 2-го порядка, перпендикулярной оси спирали, то начало координат выбирают таким образом, чтобы положению псевдооси соответствовали координаты $\phi = 0°$ и $z = 0$.

При обозначении водородных связей N—H···N или N—H···O в парах оснований (рис. 2.13) вначале указывают атом, служащий донором протона, а затем атом-акцептор. В паре GC водородные связи обозначают как $GN_1 : CN_3$, $GN_2 : CO_2$ и $CN_4 : GO_6$.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В этой главе описана номенклатура, которая используется в данной книге. Она соответствует рекомендациям комиссии IUPAC-IUB и иногда отличается от обозначений, применяемых разными исследователями.

Интервалы значений торсионных углов обозначаются в соответствии с системой Клайна – Прелога, в которой обычно использующиеся обозначения *+гош*, *–гош* и *транс* заменены на *+синклинальный* (*+ск*), *–синклинальный* (*–ск*) и *антиперипланарный* (*ап*). Торсионные углы сахарофосфатного остова обозначаются буквами греческого алфавита α, β, γ, δ, ε, ζ, начиная от связи $P—O_{5'}$ вниз по спирали до следующей связи $O_{3'}—P$. В сахарном кольце торсионные углы обозначаются буквой ν с нижними индексами от 0 до 4; угол χ описывает вращение вокруг гликозидной связи $O_{4'}—C_{1'}—N_1—C_2$ в пиримидинах и $O_{4'}—C_{1'}—N_9—C_4$ в пуринах.

Изложен подход к описанию конформаций сахарного кольца, основанный на понятии псевдовращения, и проведено его сравнение с $C_{2'}$-*эндо*- и $C_{3'}$-*эндо*-номенклатурой. Определена геометрия пар оснований, водородных связей и двойных спиралей нуклеиновых кислот.

ГЛАВА 3

Методы: рентгеновская кристаллография, расчеты потенциальной энергии и спектроскопия

Структуру нуклеозидов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот исследуют в основном методами рентгеновской кристаллографии. Информативность этих методов зависит от молекулярной массы объекта и от степени его упорядоченности в кристаллической или квазикристаллической матрице. Читателю, не знакомому с методами рентгеновской кристаллографии, следует уяснить те принципы, на которых они основаны. Тогда ему будет легче понять, почему результаты рентгеноструктурного анализа малых молекул – таких, как олигонуклеотиды – вполне однозначны, тогда как установление тонких деталей структуры макромолекул – таких, как тРНК – основано на менее прямой интерпретации данных рентгеноструктурного анализа, с той или иной степенью произвола. Анализ дифракционных картин от квазикристаллических волокон ДНК и РНК позволяет приблизительно оценить ряд общих структурных параметров; построение же по этим параметрам удовлетворительной структурной модели невозможно без привлечения данных, полученных другими методами.

Расчеты потенциальной энергии позволяют получить общее представление о внутренней подвижности молекулы. Они часто используются при уточнении структуры макромолекул и применяются как дополнение к рентгеноструктурному анализу волокон.

Спектроскопические методы, среди которых особое место занимает ЯМР, обсуждаются в этой книге лишь вкратце. Они дополняют данные, полученные кристаллографическими методами, которые носят несколько ограниченный характер из-за статического состояния объекта, и дают представление о динамической структуре молекул в растворе. Наиболее полную картину молекулярной структуры и свойств макромолекул может дать лишь совместное применение спектроскопических и кристаллографических методов, а также теоретических расчетов.

3.1. АНАЛИЗ КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ МАЛЫХ МОЛЕКУЛ

Термин «малые молекулы» используется нами применительно к молекулам, мол. масса которых не превышает 2000, в отличие от глобулярных и фибриллярных макромолекул. Такое разграничение связано с тем, что

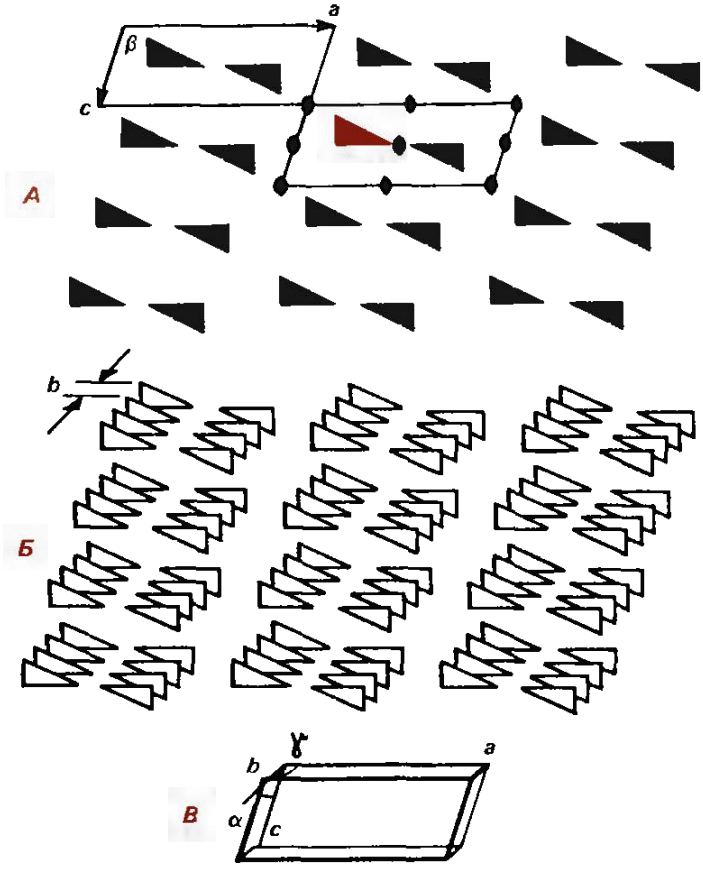


Рис. 3.1. Кристаллический порядок молекул. *А*. Двумерное изображение асимметричной части элементарной ячейки с параметрами *a*, *c*, β. Ось симметрии второго порядка, перпендикулярная плоскости рисунка (символ ●), переводит одну асимметричную часть ячейки (в цвете) в другую (темную); эти две части и образуют элементарную ячейку. *Б*. Периодическое повторение такой плоской решетки в пространстве дает трехмерную кристаллическую решетку. *В*. Элементарная ячейка кристаллической решетки описывается параметрами *a*, *b*, *c* (оси ячейки) и α ($< b$, c), β ($< a$, c), γ ($< a$, b).

и сами рентгеновские дифракционные методы, и получаемые результаты в этих двух случаях различаются. Разрешение определяется качеством кристалла, и в кристаллографии малых молекул оно обычно бывает лучше 1 Å; при этом на карте электронной плотности четко виден каждый атом, и его положение определяется с точностью до 0,002 Å. Разрешение для кристаллов глобулярных макромолекул обычно составляет 2–3 Å. Это означает, что карта электронной плотности не позволяет локализовать отдельные атомы; видны лишь грубые контуры цепочек из атомов, положение которых после встраивания в эти контуры атомной модели определяется с точностью до 0,25 Å. Дифракция на волокнах таких макромолекул, как ДНК, позволяет определить лишь параметры элементарной ячейки и спирали; более полная интерпретация дифракционных данных достигается путем построения молекулярных

моделей с привлечением химических и физических (спектроскопических) данных.

В кристалле молекулы (иногда и молекулы растворителя) образуют регулярную трехмерную матрицу. Основным повторяющимся мотивом является асимметричная часть элементарной ячейки; ее размножение с помощью операций симметрии, свойственных данной пространственной группе, формирует полную элементарную ячейку. Трансляция элементарной ячейки по всем трем направлениям дает кристаллическую решетку (рис. 3.1) [43].

Конечной целью рентгеноструктурного анализа кристаллов является локализация всех атомов в асимметричной части ячейки. Для того чтобы определить параметры элементарной ячейки и пространственную группу, кристалл размерами от 0,1 до 0,5 мм устанавливают в вайсенберговскую или прецессионную камеру и облучают хорошо коллимированным, монохроматическим рентгеновским пучком. Поворот кристалла (с которым синхронизировано движение кассеты с фотопленкой) последовательно выводит в отражающее положение множество плоскостей кристаллической решетки [уравнение (3.1); дополнение 3.1].

Дополнение 3.1

Некоторые формулы, описывающие закон Брэгга, электронную плотность, структурные факторы и R-фактор

Закон Брэгга. На рентгенограмме, приведенной на рис. 3.2, видно множество отражений, каждому из которых соответствуют свои миллеровские индексы *hkl*, где *h*, *k* и *l* – целые числа. Каждый рефлекс *hkl* отвечает семейству параллельных плоскостей кристаллической решетки, находящихся в отражающем положении. Соответствующий угол падения θ_{hkl} связан с расстоянием d_{hkl} между плоскостями законом Брэгга:

$$2d_{hkl}\sin\theta_{hkl} = n\lambda,$$

или

$$d_{hkl} = (n\lambda)/(2\sin\theta_{hkl}). \qquad (3.1)$$

В этом уравнении *n* обозначает порядок отражения *hkl*. Длина волны λ обычно используемого CuK_α-излучения равна 1,542 Å. Заметим, что чем меньше расстояние d_{hkl} (т.е. чем выше разрешение), тем больше угол θ_{hkl}. Поскольку на краях дифракционной картины для кристаллов макромолекул (подобных транспортной РНК) отражения отсутствуют (рис. 3.5), разрешение для таких кристаллов (d_{hkl}) обычно не превышает 2–3 Å.

Электронная плотность. Рентгеновское отражение *hkl* фактически представляет собой волну с длиной λ, амплитудой $|F_{hkl}|$ (называемой *структурной амплитудой*) и фазовым углом α_{hkl}. Последний нельзя измерить: он определяется с помощью «прямых» либо «паттерсоновских» (метод тяжелого атома) методов. Электронная плотность в точке элементарной ячейки с координатами X, Y, Z рассчитывается по формуле

$$\rho(XYZ) = \frac{1}{V}\sum_h\sum_k\sum_l |F_{hkl}|\, e^{i\alpha_{hkl}} e^{-2\pi i(hX+kY+lZ)}, \qquad (3.2)$$

где V – это объем элементарной ячейки, а тройное суммирование осуществляется по всем измеренным рефлексам, число которых обычно составляет несколько тысяч. Поскольку при расчете электронной плотности элементарную ячейку представляют в виде нескольких тысяч точек XYZ, эта процедура предполагает использование быстродействующих ЭВМ.

Структурный фактор. Полученная карта электронной плотности позволяет определить положения атомов. По координатам и факторам атомного рассеяния f_j (они приводятся в таблицах и определяют способность j-го атома рассеивать рентгеновские лучи) рассчитывается структурный фактор F_{hkl}:

$$F_{hkl,\ \text{расч}} = \sum_{j=1}^{m} f_j e^{2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j)} e^{-\text{Temp}_{j,hkl}} \tag{3.3}$$

Суммирование проводится по всем m атомам элементарной ячейки; $\text{Temp}_{j,hkl}$ представляет собой температурный фактор, учитывающий колебания атомов в кристалле. Эти колебания можно рассматривать либо в изотропном приближении, тогда $\text{Temp}_{j,hkl}$ является числом, либо в анизотропном – тогда температурный фактор становится тензором 3 × 3. В первом случае атомы аппроксимируют сферами, а во втором – эллипсоидами, размеры которых определяются амплитудами колебаний.

Структурный фактор F_{hkl} описывает свойства отражения hkl и может быть представлен в виде

$$F_{hkl,\ \text{расч}} = |F_{hkl,\ \text{расч}}| e^{i\alpha_{hkl}}, \tag{3.4}$$

где $|F_{hkl,\ \text{расч}}|$ – величина, которую можно сравнивать со значением $|F_{hkl,\ \text{набл}}|$, определяемым непосредственно по измеренным (наблюдаемым) интенсивностям I_{hkl}.

Фактор расходимости. Чтобы улучшить молекулярную модель, рассчитанные по ней с помощью уравнения (3.3) структурные амплитуды $|F_{hkl,\ \text{расч}}|$ подгоняют под наблюдаемые структурные амплитуды $|F_{hkl,\ \text{набл}}|$, добиваясь минимального среднеквадратичного расхождения между ними, т. е. уточняют атомные координаты и температурные факторы методом наименьших квадратов. В литературе принято оценивать степень совпадения расчета с экспериментом фактором расходимости R:

$$R = \sum_{hkl} \Big| |F_{\text{набл}}| - |F_{\text{расч}}| \Big| \Big/ \sum_{hkl} |F_{\text{набл}}|. \tag{3.5}$$

Суммирование проводят по всем рефлексам.

Структурный фактор $F(R, \zeta)$ *для спиральных молекул.* В рентгеноструктурном анализе волокон пользуются не декартовой системой координат, а цилиндрическими координатами атомов r, ϕ, z (см. рис. 2.15), поэтому в формулах появляется функция Бесселя [95–100]. Формула для структурного фактора, усредненного по угловой координате, имеет вид

$$F(R,\ \zeta) = \sum_n \sum_j f_j J_n(2\pi R r_j) e^{2\pi i (lz_j - n\phi_j)}, \tag{3.6}$$

где R, ζ – радиальная и аксиальная координаты в обратном пространстве, r_j, ϕ_j, z_j – координаты j-го атома в реальном пространстве, а f_j – его фактор рассеяния, в который введена поправка на гидратационную воду [101]. J_n – функция Бесселя n-го порядка. Величина n связана с номером l слоевой линии, периодом спирали c, шагом P и расстоянием h между остатками вдоль оси спирали соотношением

$$\zeta = l/c = n/P + m/h, \tag{3.7}$$

где m – целое число, положительное или отрицательное.

На рис. 3.2 приведена типичная рентгенограмма. Ее симметрия и систематические погасания рефлексов (см. подпись к рис. 3.2) дают информацию о пространственной группе кристалла, а расстояния между рефлексами определяют раэмеры элементарной ячейки. Каждый рефлекс характеризуют индексами Миллера *hkl*, отвечающими тем плоскостям, от которых происходит данное отражение.

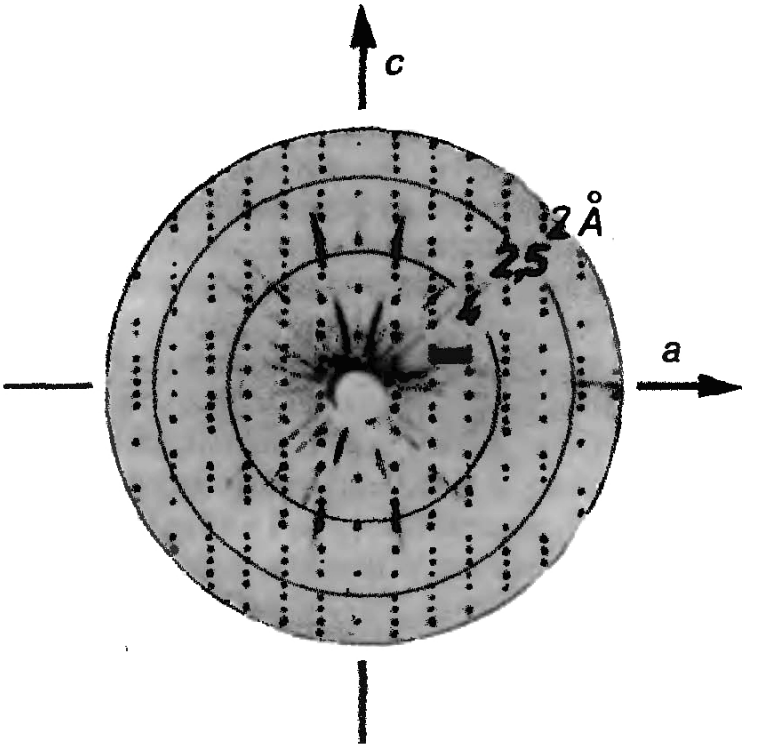


Рис. 3.2. Рентгенограмма кристалла тринуклеозиддифосфата аденилил-(3′,5′)-аденилил-(3′,5′)-аденозина (ApApA). На прецессионной рентгенограмме прямоугольником выделена элементарная ячейка обратной решетки. Угол рассеяния θ определяется отношением расстояния на пленке к расстоянию от кристалла до пленки. С помощью уравнения (3.1) были рассчитаны размеры элементарной ячейки в реальном пространстве: $a = 14{,}155$ Å, $c = 44{,}00$ Å. Вдоль оси a присутствует каждый второй рефлекс, а вдоль оси c – каждый четвертый; систематическое отсутствие остальных рефлексов предполагает наличие винтовых осей 2-го и 4-го порядков. Этот факт и некоторые другие особенности дифракционной картины позволяют сделать вывод, что кристалл принадлежит тетрагональной пространственной группе $P4_12_12$ (или энантиоморфной ей группе $P4_32_12$). Так как в данной пространственной группе все углы элементарной ячейки равны 90°, рентгенограмма обладает зеркальной симметрией относительно осей a и c. Дифракционные пятна имеют разную интенсивность и содержат информацию о распределении атомов в элементарной ячейке. Данная рентгенограмма представляет собой лишь одну из плоскостей обратной решетки. Всего было получено 3260 рефлексов, образующих в совокупности сферу, что соответствует разрешению 0,95 Å [160]. Разные уровни разрешения (в Å) на дифракционной картине указаны окружностями. Прецессионная рентгенограмма была получена д-ром П. Мейнором; излучение CuK_α, расстояние кристалл – пленка 60 мм.

Согласно уравнению (3.1), расстояние между плоскостями d_{hkl} обратно пропорционально синусу угла падения θ_{hkl}, поэтому чем больше расстояния между рефлексами, тем меньше размеры элементарной ячейки, и наоборот. Рентгенограмма представляет собой увеличенное изображение так называемой обратной решетки [44–47].

Информация о «содержимом» элементарной ячейки, т.е. о координатах атомов в асимметричной части, заключена в интенсивности рефлексов. Каждый дифрагированный кристаллом луч *hkl* характеризуется амплитудой $|F_{hkl}|$, которая пропорциональная корню квадратному из интенсивности I_{hkl}, и фазовым углом α_{hkl} (рис. 3.3). Если интенсивность отражений можно непосредственно измерить либо путем денситометрического сканирования рентгенограмм, либо с помощью сцинтилляционного счетчика, вмонтированного в автоматический четырехкружный дифрактометр [48], то получить информацию о фазовых углах отражений можно только расчетным путем. В этом и состоит «фазовая проблема», которая доставляет кристаллографам массу неприятностей.

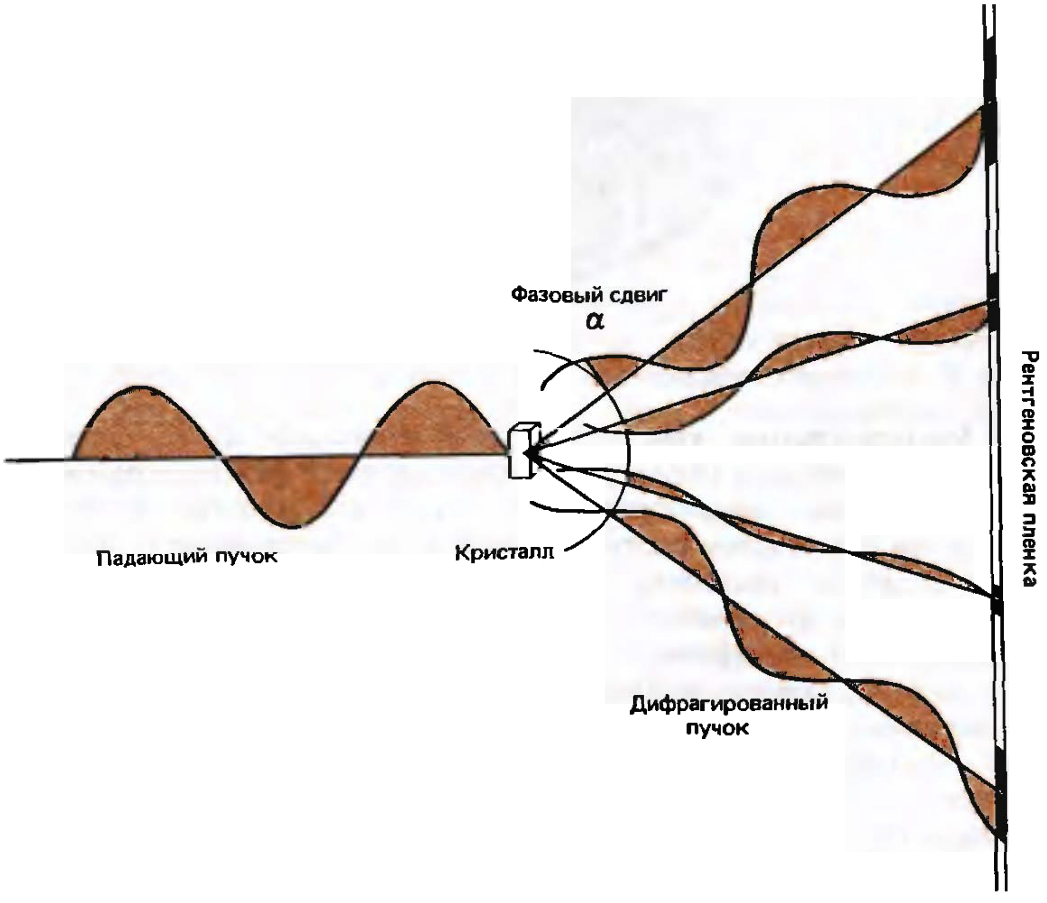


Рис. 3.3. «Фазовая проблема». Кристалл облучают монохроматическим рентгеновским пучком, который после прохождения через кристалл дифрагирует на множество лучей (h, k, l) с разными фазовыми углами α_{hkl} и интенсивностями I_{hkl}. Последние можно измерить по степени почернения пленки, но для расчета электронной плотности с помощью уравнения (3.2) необходимо иметь оба типа данных.

Фазовый угол определяют либо «прямыми методами», извлекая соответствующую информацию из распределения интенсивностей, либо методом «тяжелых атомов», связанным с анализом функции Паттерсона [44–47]. Если известны амплитуда $|F_{hkl}|$ и соответствующие фазовые углы, то с помощью преобразования Фурье можно рассчитать распределение электронной плотности в элементарной ячейке.

Уравнение (3.2) представляет собой преобразование Фурье, которое связывает электронную плотность ρ_{XYZ} в точке X, Y, Z с измеренными амплитудами $|F_{hkl}|$ и с соответствующими фазовыми углами α_{hkl} (дополнение 3.1). На практике элементарную ячейку представляют в виде решетки (растрируют), с помощью ЭВМ рассчитывают электронную плотность в узлах X, Y, Z и вычерчивают соответствующие контурные линии (рис. 3.4).

Зная карту электронной плотности, можно определить положения всех атомов в структуре либо (поскольку фазы вначале часто бывают известны лишь приближенно) только части атомов. В последнем случае установленную часть структуры используют для уточнения фаз α_{hkl}, после чего расчет повторяют вплоть до получения полного решения. Полученные координаты атомов x_j, y_j, z_j обычно уточняют полноматричным методом наименьших квадратов, в котором минимизируется квадрат разности между наблюдаемыми и рассчитанными структурными амплитудами $|F_{\text{набл}}|$ и $|F_{\text{расч}}|$. Последние определяют по координатам атомов молекулярной модели в соответствии с уравнениями (3.3) и (3.4) (см. дополнение 3.1).

В конце процедуры уточнения рассчитывают «разностную электронную плотность» с коэффициентами $|F_{\text{набл}} - F_{\text{расч}}|_{hkl}$, которые подставляют в уравнение (3.2) вместо $|F_{hkl}|$. Это делают для того, чтобы локализовать те атомы, которые в модели были пропущены, т.е. не были учтены при расчете $F_{\text{расч}}$. Обычно такими атомами являются атомы водорода или других элементов, которые статистически распределены по нескольким местам с неполной заселенностью (рис. 3.4, *Б*). Атомы водорода, обладающие одним электроном, рассеивают рентгеновские лучи существенно слабее, чем атомы второго и последующих рядов периодической таблицы, поэтому их координаты удается определить с точностью, на порядок меньшей. Точные координаты атомов водорода определяют методом нейтронной дифракции. Нейтроны рассеиваются атомным ядром, а не электронами, и весьма интенсивно взаимодействуют с водородными атомами.

Формула (3.5) в дополнении 3.1 дает оценку степени совпадения структурных амплитуд, рассчитанных по молекулярным моделям [уравнения (3.3) и (3.4)], с наблюдаемыми (измеренными) величинами. Для хорошо уточненных структур значения *R*-факторов лежат в интервале 0,03–0,07. Обычно на неводородный атом асимметричной части ячейки приходится 100 рефлексов, а поскольку каждому атому соответствует 10 параметров, то отношение числа рефлексов к числу параметров равно 10 : 1. Параметрами атомов являются: три координаты x, y, z, коэффи-

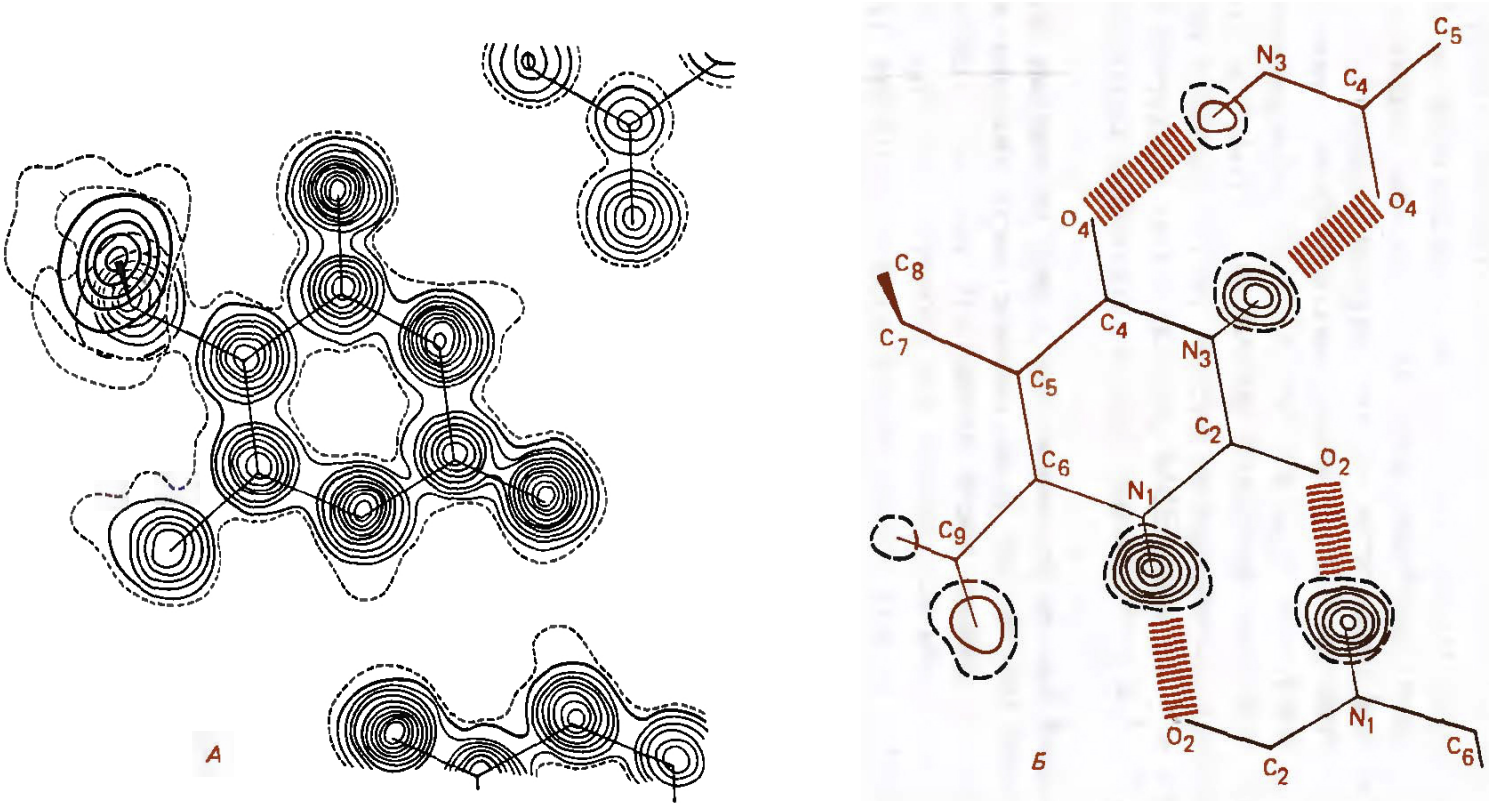


Рис. 3.4. *А*. Распределение электронной плотности ρ_{xyz} в плоскости гетероциклического основания 5-этил-6-метилурацила; разрешение 0,8 Å [161]. Изолинии проведены с интервалом $1e$ Å^{-3} начиная с уровня $1e$ Å^{-3} (пунктир). Четко видны атомы второго ряда периодической таблицы; атом водорода идентифицируется по выступам на пунктирной линии при атомах N. На карту электронной плотности наложено схематическое изображение молекулы (цветные линии). *Б*. Разностный синтез электронной плотности, рассчитанный с коэффициентами $|F_{набл} - F_{расч}|$, где $|F_{набл}|$ – это измеренные структурные амплитуды, а $|F_{расч}|$ – структурные амплитуды, рассчитанные с учетом только атомов второго ряда [161]. Атомы водорода здесь проявляются как плотные сгустки изолиний; на карту наложено схематическое изображение молекулы и указана нумерация атомов. Водородные связи изображены в виде ряда цветных параллельных отрезков, атомы водорода этильной и метильной групп располагаются над плоскостью молекулы и поэтому на рисунке не представлены.

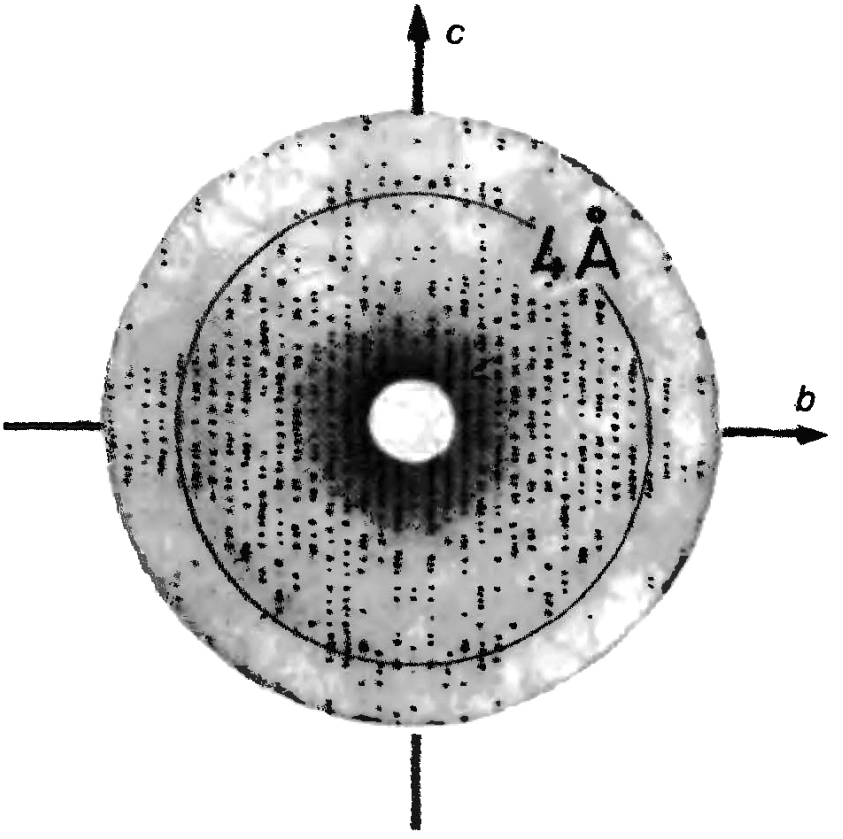


Рис. 3.5. Рентгенограмма фенилаланиновой тРНК дрожжей ($тРНК^{Phe}_{дрожжи}$) [162]. Уровень разрешения 4 Å выделен так же, как и на рис. 3.2. По расстояниям между пятнами были определены параметры элементарной ячейки, $a = 33{,}2$ Å, $b = 56{,}1$ Å, $c = 161$ Å. Систематическое отсутствие каждого второго рефлекса по осям c и a, а также симметрия расположения пятен на рентгенограмме указывают на орторомбическую пространственную группу $P2_122_1$. Обратите внимание, что с улучшением разрешения интенсивность пятен постепенно уменьшается до полного их исчезновения. Предельное разрешение составляет примерно 2,3 Å.

циент заполнения, который в случае неполной упорядоченности показывает, насколько «заселено» положение XYZ (1,0 соответствует полному заселению), и шесть параметров температурного фактора, описывающих колебания атомов в кристаллической решетке. Колеблющийся атом в кристаллической решетке аппроксимируется эллипсоидом, который характеризуется длинами трех главных осей и тремя угловыми параметрами, задающими ориентацию этих осей в элементарной ячейке. Эллипсоид можно заменить сферой сравнимого объема. В этом случае температурный фактор может быть задан только одним параметром и отношение числа рефлексов к числу параметров увеличивается до 20 : 1 [уравнение (3.3)]. Число измеряемых интенсивностей зависит от разрешения, т. е. от интервала 2θ, вне которого дифракционные пятна отсутствуют (рис. 3.5). Разрешение в свою очередь зависит от качества кристалла и от теплового движения атомов в решетке. Для малых мо-

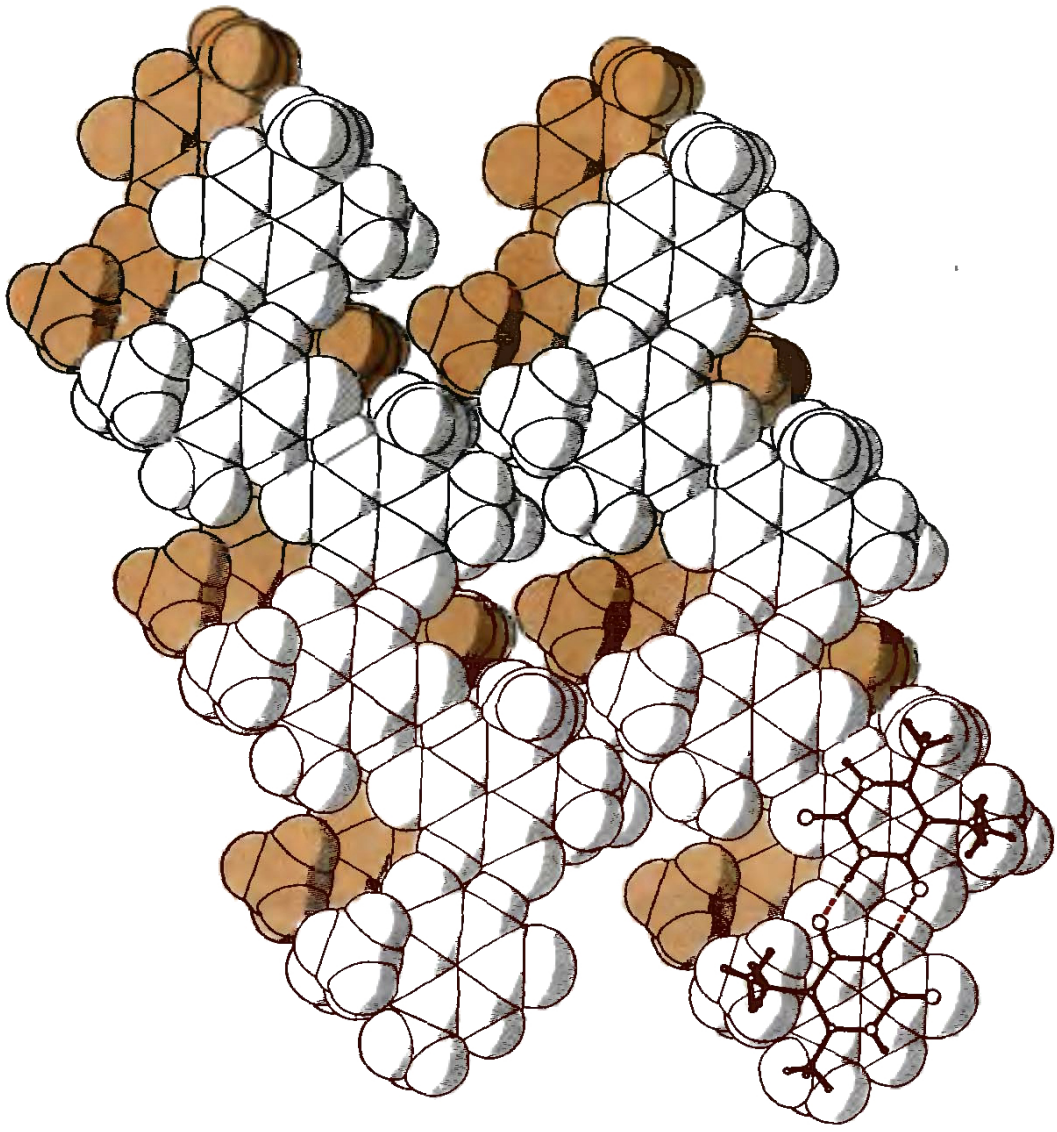


Рис. 3.6. Упаковка молекул 5-этил-6-метилурацила [161] в кристаллической решетке. Молекулы построены с помощью объемных моделей атомов. Сферы, отвечающие атомам водорода, которые принимают участие в образовании водородной связи N—H···O, сплющены. Рисунок сделан по программам и данным Кембриджского банка данных [163].

лекул оно обычно не превышает 0,8 Å, т. е. атомы, расположенные на расстоянии 1,54 Å друг от друга, легко разрешаются (рис. 3.4).

Успешный анализ хорошо уточненной кристаллической структуры позволяет получить значения межатомных расстояний и валентных углов с точностью 0,005–0,01 Å и 0,3–1°. Конформация молекулы задается торсионными углами (гл. 2), точность определения которых составляет 0,8–2°. Размножив операциями симметрии, свойственными данной пространственной группе, содержимое асимметричной части и применив к элементарной ячейке операции трансляции, мы получаем структуру всего кристалла, которая дает представление об упаковке молекул

(рис. 3.6). Эта общая картина позволяет судить о самоорганизации молекулы и о межмолекулярных взаимодействиях — о водородных связях, стэкинге, дипольных, вандерваальсовых и электростатических силах. В настоящее время с помощью рентгеновской кристаллографии можно получить точную структуру молекул с мол. массой, не превышающей 2000 (что соответствует мол. массе гексануклеотида, если принять мол. массу нуклеотида равной в среднем 350).

3.2. РАСЧЕТЫ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЭНЕРГИИ

Если известна кристаллическая структура молекулы, то мы можем рассчитать ее потенциальную энергию. Особый интерес представляют молекулы с внутренним вращением вокруг межатомных связей. В моно- и полинуклеотидах такое вращение возможно вокруг гликозидных, фосфодиэфирных, а также эндо- и экзоциклических ($C_{4'}$—$C_{5'}$) связей сахарного кольца.

При расчетах потенциальной энергии внутреннего вращения варьируют один или несколько параметров в определенных интервалах и рассчитывают расстояния r_{ij} между атомами i, j. Первые такие расчеты были основаны на допущении, что на расстоянии $r_{ij} > r_0$ притяжение

Таблица 3.1. Вандерваальсовы радиусы некоторых атомов, определенные двумя методами: путем измерения расстояния максимального сближения [157] и по Аллингеру [158]

Атом	Радиус, Å		
	максимальное сближение		по Аллингеру
H	1,20		1,50
O (участвующий в образовании одинарной или двойной связи)	1,52	1,40[1)]	1,65
C (в алифатическом соединении)	1,70		1,75 (sp^3)
C (в ароматическом соединении)	1,70		1,85 (sp^2, sp)
N (в алифатическом или ароматическом соединении)	1,55	1,50[1)]	1,70
P	1,80	1,90[1)]	2,05
=S	1,75	1,85[1)]	2,00
—S—	1,80		
F	1,35[1)]		1,60
Cl	1,80[1)]		1,95
Br	1,95[1)]		2,10
I	2,15[1)]		2,25

[1)] Данные взяты из работы [159]. Эти значения, а также значения для H, C, полученные путем оценки расстояния максимального сближения, используются наиболее часто.

отсутствует, а на расстоянии $r_{ij} \leqslant r_0$ имеет место бесконечно большое отталкивание атомов друг от друга (r_0 – это сумма вандерваальсовых радиусов атомов i и j) (табл. 3.1; рис. 3.7) [50–53]. Это приближение «потенциала жесткой сферы» может использоваться для предварительной оценки вращательной свободы молекулы [18, 34, 54]; сегодня, однако, применяются более точные функции потенциальной энергии [55–64].

Вклад в полную энергию взаимодействия $V_{полн}$ между ковалентно несвязанными друг с другом атомами в молекуле вносят дисперсионные силы (лондоновское притяжение $V_п$), отталкивание $V_о$, электростатические кулоновские взаимодействия $V_э$ и потенциалы внутреннего вращения ($V_{вр}$). $V_п$ и $V_о$ обычно комбинируются в форме разрыхляющих потенциалов Букингема «σ-exp» либо «6-12» Леннард-Джонса:

$$V_р = -A_{ij}/r_{ij}^6 + B_{ij}/r_{ij}^{12}. \qquad (3.8)$$

Параметр A_{ij} зависит от типа атомов i, j, и его можно вычислить из поляризуемости атомов и эффективного числа валентных электронов по формуле Слэтера–Кирквуда [60, 65]. Параметры B_{ij} можно получить из A_{ij} с учетом суммы вандерваальсовых радиусов двух взаимодействующих атомов i и j (r_{ij}). Некоторые из этих величин представлены в табл. 3.2. Эти же величины в модифицированной форме приводятся в работе [63].

Электростатический потенциал для двух заряженных атомов, находящихся на расстоянии r_{ij} (Å) друг от друга, имеет размерность ккал·моль$^{-1}$ и может быть аппроксимирован потенциалом простого взаимодействия между зарядами:

$$V_э = 322 e_i e_j / \varepsilon' r_{ij}. \qquad (3.9)$$

Заряды (частичные) e_i и e_j выражаются в единицах заряда электрона e_0 с учетом вклада σ- и π-связей, рассчитываемого с помощью методов

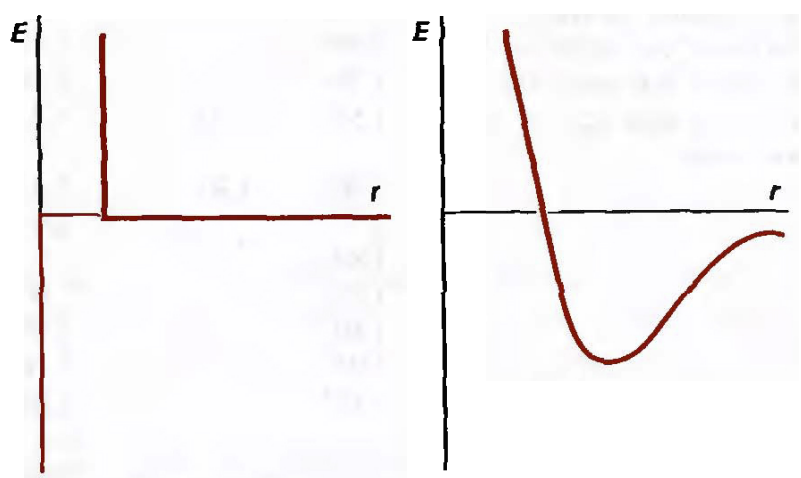


Рис. 3.7. Потенциал жесткой сферы (*слева*) и разрыхляющий потенциал «6-12» Леннард-Джонса (*справа*).

Таблица 3.2. Параметры A_{ij} и B_{ij} для разных пар атомов i, j, используемые в потенциале «6-12» Леннард-Джонса[1)]

Пара атомов	r_{min}, Å	A_{ij}, ккал·Å^6·моль$^{-1}$	B_{ij}, ккал·Å^{12}·моль$^{-1}$
H—H	2,40	46,7	$4{,}46 \cdot 10^3$
H—C	2,90	128	$3{,}80 \cdot 10^4$
H—N	2,75	125	$2{,}70 \cdot 10^4$
H—O	2,72	124	$2{,}51 \cdot 10^4$
H—P	3,10	346	$1{,}54 \cdot 10^5$
C—C	3,40	370	$2{,}86 \cdot 10^5$
C—N	3,25	366	$2{,}16 \cdot 10^5$
C—O	3,22	367	$2{,}05 \cdot 10^5$
C—P	3,60	1000	$1{,}09 \cdot 10^6$
N—N	3,10	363	$1{,}61 \cdot 10^5$
N—O	3,07	365	$1{,}53 \cdot 10^5$
N—P	3,45	990	$8{,}35 \cdot 10^5$
O—O	3,04	367	$1{,}45 \cdot 10^5$
O—P	3,42	995	$7{,}96 \cdot 10^5$
P—P	3,80	2710	$4{,}08 \cdot 10^6$

[1)] r_{min} – это минимальное расстояние между атомами i и j при вандерваальсовом взаимодействии. Данные взяты из работы [65], в которой приводится информация о взаимодействиях с участием галогенов.

квантовой химии, например методом самосогласованного поля в приближении ППДП/2 (полное пренебрежение дифференциальным перекрыванием) [66]. Другие методы оценки зарядов были разработаны Хюккелем [67] и Дель Ре [68, 69]. Распределение зарядов для нуклеотидов приведено на рис. 5.1 [70–72]. Среднее значение безразмерной диэлектрической постоянной ε', учитывающей экранирующее действие растворителя на заряд, обычно принимается равным 3,5–4,0.

Наличие вращательных потенциалов

$$V_{вр} = (V_0/2)(1 + \cos n\theta) \tag{3.10}$$

обусловлено обменными взаимодействиями электронов в связях, примыкающих к той, вокруг которой (на угол θ) происходит вращение, а также вандерваальсовыми силами. Целое число n определяет периодичность барьера вращения. Значения V_0 приведены в табл. 3.3 [73].

На рис. 4.27 представлена энергетическая карта для взаимодействия между несвязанными атомами в зависимости от торсионных углов. Полная энергия равна сумме энергий отдельных взаимодействий

$$V_{полн} = V_р + V_э + V_{вр}, \tag{3.11}$$

и ее часто называют классической потенциальной энергией либо «полуэмпирическим потенциалом».

Таблица 3.3. Примерная высота барьера вращения V_0[1)]

Связь, вокруг которой происходит вращение	V_0, ккал·моль$^{-1}$
C—C	3,11
C—NH_2	1,75
C—OH	0,95
C—NO_2	0,003 (обычное значение для вращения вокруг гликозидной связи)

[1)] Подробнее см. работу [73].

В молекулах нередко происходят изменения длин связей и в особенности валентных углов, которые не могут быть описаны данными методами. Такие отклонения от «идеальной» геометрии можно анализировать методом самосогласованного поля (ССП), дающим более реальную информацию о жесткости молекул. Для еще более детального анализа применяют другие методы квантовой химии, такие, как расширенный метод Хюккеля [75, 76], методы ППДП/2 [66] или КВВМО (конфигурационные взаимодействия возмущенных молекулярных орбиталей) [77, 78], а также неэмпирические методы ab initio [79]. Однако неэмпирические методы применимы только для малых молекул размером не более мононуклеотида. Кроме вращательных потенциалов они дают информацию о распределении заряда, о потенциалах ионизации, электростатических потенциалах и дипольных моментах. К большим системам данные методы неприменимы; в этом случае пользуются полуэмпирическими потенциалами или же разбивают большие системы на малые подсистемы, для которых имеются модельные соединения.

3.3. КРИСТАЛЛОГРАФИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ

Кристаллы тРНК с мол. массой 26 000 получают из водных растворов добавлением спиртов или соли. Такие кристаллы, как и кристаллы белков, содержат от 30 до 80% растворителя и могут рассматриваться как концентрированный раствор. Из-за слабости межмолекулярных контактов, стабилизирующих кристаллы, они очень чувствительны к изменению окружения, поэтому их хранят при строго определенных условиях [47, 80, 81].

При определении пространственной группы и получении рентгеновских данных используются те же методы, что и в случае малых молекул, однако для решения фазовой проблемы применяется иной подход — метод изоморфного замещения. Он основан на введении в кристалл тяжелых атомов (содержащих примерно по 50 электронов) без нарушения кристаллической решетки. Тяжелоатомное замещение производят либо

с помощью ковалентного сшивания реагента с тРНК, либо путем выдерживания кристаллов в растворах, содержащих такие тяжелые атомы, как Pb^{2+}, Sm^{3+}, $AuCl_4^-$ и т. д. Тяжелые атомы диффундируют в области между макромолекулами, заполненные растворителем, и специфически связываются с определенными участками тРНК. О качестве включения тяжелого атома судят по изменению распределения интенсивностей на рентгенограмме; если присоединение прошло изоморфно, расположение пятен не меняется. Для определения фаз необходимо как минимум два изоморфных производных (либо одно производное и набор данных по «аномальному рассеянию»). Грубые оценки фаз получают по расположению тяжелых атомов в элементарной ячейке [82]; по ним строят карту электронной плотности [уравнение (3.2), дополнение (3.1)], которая и заключает в себе информацию о структуре макромолекулы.

В кристаллах тРНК (и белков) межмолекулярные взаимодействия довольно слабы. Группы атомов находятся в интенсивном тепловом движении, особенно на поверхности молекулы. Иногда они просто не упорядочены, что существенно сужает дифракционное поле (ухудшает разрешение) (рис. 3.5). Самые качественные кристаллы тРНК дифрагируют до разрешения 2,5 Å, что отвечает 8000 рефлексам на 1652 неводородных атома. Если уточнять только атомные координаты и изотропный температурный фактор, то и тогда отношение числа рефлексов

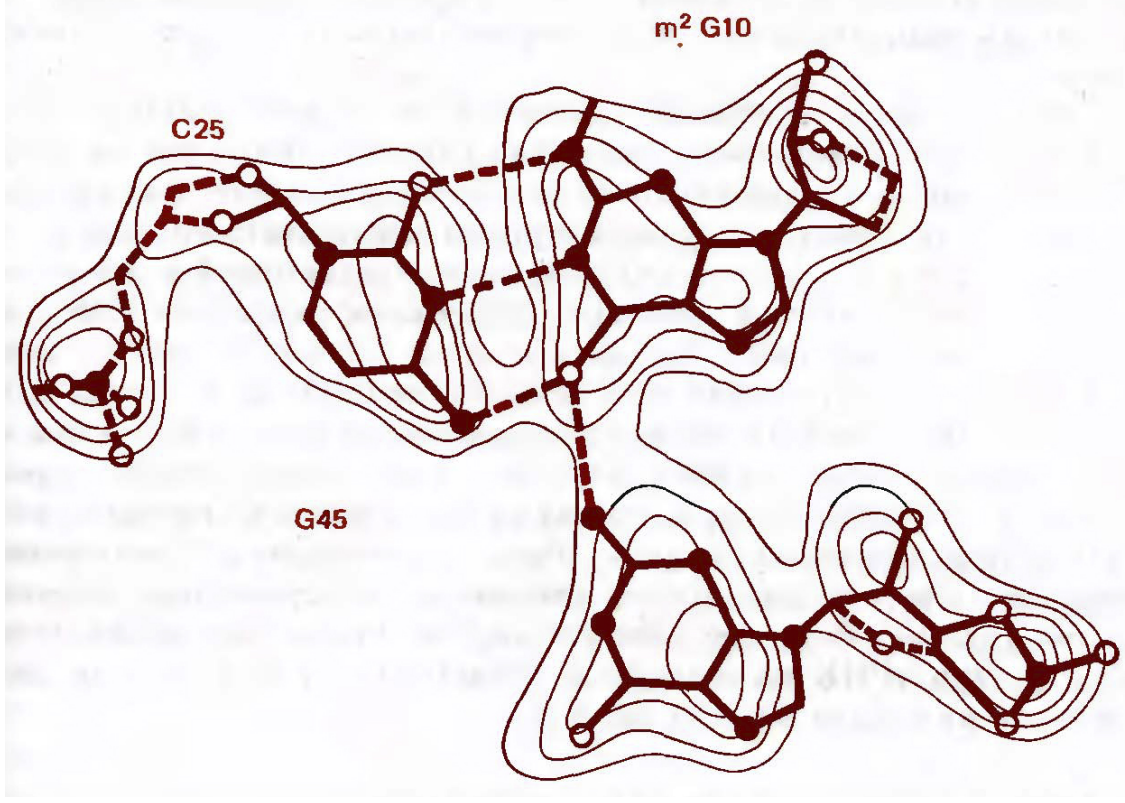


Рис. 3.8. Фрагмент карты электронной плотности $тРНК^{Phe}_{дрожжи}$, полученной с разрешением 2,5 Å, на который наложена проволочная модель фрагмента молекулы [164]. Отдельные атомы на карте не разрешаются, поэтому ее интерпретация менее однозначна, чем в случае малых молекул (рис. 3.4).

к числу параметров окажется равным единице. Этого явно недостаточно для удовлетворительного уточнения модели структуры (напомним, что для малых молекул это отношение лежит в интервале 10–20). Чтобы обойти эту трудность, можно уточнять параметры не отдельных атомов, а целых группировок (оснований, сахаров и фосфатных групп), и минимизировать энергию, варьируя торсионные углы при постоянных значениях валентных углов и длин связей, соответствующих их каноническим значениям, которые рассчитаны по структурам малых молекул.

Отдельные атомы на карте электронной плотности тРНК из-за ограниченности дифракционного поля не разрешаются. На карте электронной плотности основания и сахарные остатки имеют вид дисков, а фосфатные группы – вид сфер более высокой плотности. Интерпретация таких карт, т.е. построение по карте молекулярной модели, проводится с помощью компьютерного графического дисплея либо компаратора Ричардса [83]. В последнем случае строят вручную проволочную модель, добиваясь ее соответствия с картой электронной плотности; модель и карту совмещают с помощью полупрозрачного зеркала, которое устанавливают между ними (рис. 3.8). Поскольку все пурины и пиримидины сходны по форме, распознавание участка нуклеотидной последовательности сопряжено с большими трудностями, чем распознавание белковых фрагментов, у которых размеры боковых групп различаются настолько, что можно (по крайней мере частично) установить аминокислотную последовательность на основании одних только рентгеновских данных.

Распределение электронной плотности отдельных участков молекулы, особенно неспиральных, не всегда удается однозначно интерпретировать, и тогда все зависит от интуиции исследователя. Именно этим объясняется тот факт, что разные группы исследователей иногда делают разные выводы о тонких структурных деталях одной и той же молекулы в одном и том же кристаллографическом окружении. Еще одна проблема кристаллографии больших молекул состоит в том, что существующие методы уточнения модели не всегда сходятся к одному и тому же решению, особенно когда дело касается тех участков молекул, которые видны менее четко [84]. В элементарной ячейке кроме макромолекул присутствуют молекулы растворителя, которые из-за своей неупорядоченности не могут быть надлежащим образом учтены (кроме некоторых из них, прочно связанных с поверхностью макромолекулы). Поэтому R-фактор даже для хорошо уточненных кристаллических структур тРНК не сравним с R-факторами для малых молекул и лежит в интервале 0,5–0,30 [85–87].

3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ВОЛОКОН

Препараты двухцепочечных ДНК и РНК обычно представляют собой гетерогенные наборы молекул. В противоположность глобулярной тРНК, имеющей четкую пространственную структуру, они не могут быть полу-

чены в виде монокристаллов, пригодных для рентгеноструктурного анализа. Для ДНК были получены микрокристаллы с разной морфологией [88–91], однако ни для одного из них не удалось провести детальный структурный анализ [91]. Единственным разумным подходом к исследованию структуры полимерных нуклеиновых кислот является приготовление волокон и очень концентрированных вязких гелей, которые получают осаждением нуклеиновых кислот из водных буферных растворов спиртом [92]. Стержнеобразные спиральные молекулы нуклеиновых кислот образуют параллельные квазикристаллические структуры со случайной азимутальной ориентацией молекул относительно оси волокна. Вследствие этой азимутальной неупорядоченности дифракционная картина, полученная с помощью монохроматического пучка, перпендикулярного оси волокна (рис. 3.9), оказывается сходной с рентгенограммой вращения, и ее можно интерпретировать аналогичным образом [93].

Из-за неупорядоченного расположения молекул в волокнах рефлексы имеют вид дуг, а разрешение обычно не превышает 3 Å. Рефлексы перекрываются, поэтому количество данных, получаемых по рентгенограммам волокон, довольно ограничено: для определения соответствующей элементарной ячейки может быть использовано от 10 до 100 рефлексов. Все это, а также нарушение кристаллического порядка не позволяют рассчитать распределение электронной плотности на основе одних лишь экспериментальных данных. Тем не менее дифракционная картина содержит достаточно информации для того, чтобы получить грубое представление о структурных особенностях спиральной молекулы.

Расстояние между слоевыми линиями, на которых располагаются рефлексы, равно $1/c$ ($Å^{-1}$), где c – это параметр ячейки вдоль оси волокна. Эта повторяющаяся величина для случая спиралей с целым числом нуклеотидов на виток (каковыми являются все природные и синтетические ДНК и РНК [38], кроме ДНК в С-форме [94]) соответствует шагу спирали. Расположение первого меридионального рефлекса в области 2,6–3,8 Å предполагает, что именно таким должно быть расстояние h между нуклеотидами по вертикали, а номер слоевой линии l, на которой находится рефлекс, дает число нуклеотидов n на виток [95].

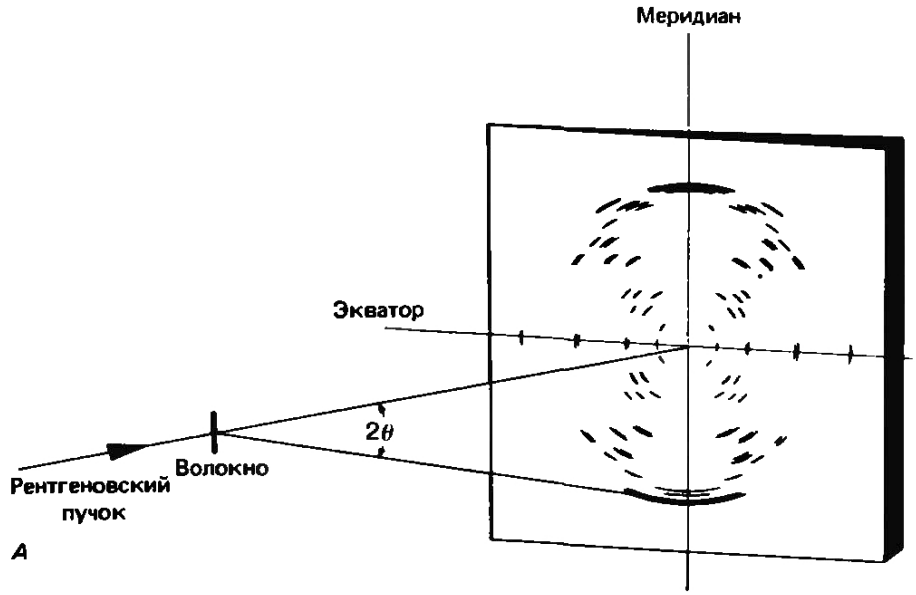
Дифракционные картины спиральных молекул часто имеют крестообразный вид. Такой же вывод следует и из формулы для структурного фактора в случае рассеяния на волокнах [уравнение (3.6)]; эта формула аналогична формуле (3.3) с той лишь разницей, что (3.6) содержит вместо экспоненты функции Бесселя J_n, так как атомные координаты представлены в цилиндрической системе координат (см. рис. 2.15) [95–101]. С увеличением n положение первого основного максимума функции Бесселя сдвигается в область больших R; в результате картина дифракции напоминает косой крест (рис. 3.9, *А*).

Чтобы построить модель, по которой определяются координаты атомов, достаточно знать параметры спирали, параметры элементарной ячейки, которые получают из рентгенограммы, и стереохимию моно-

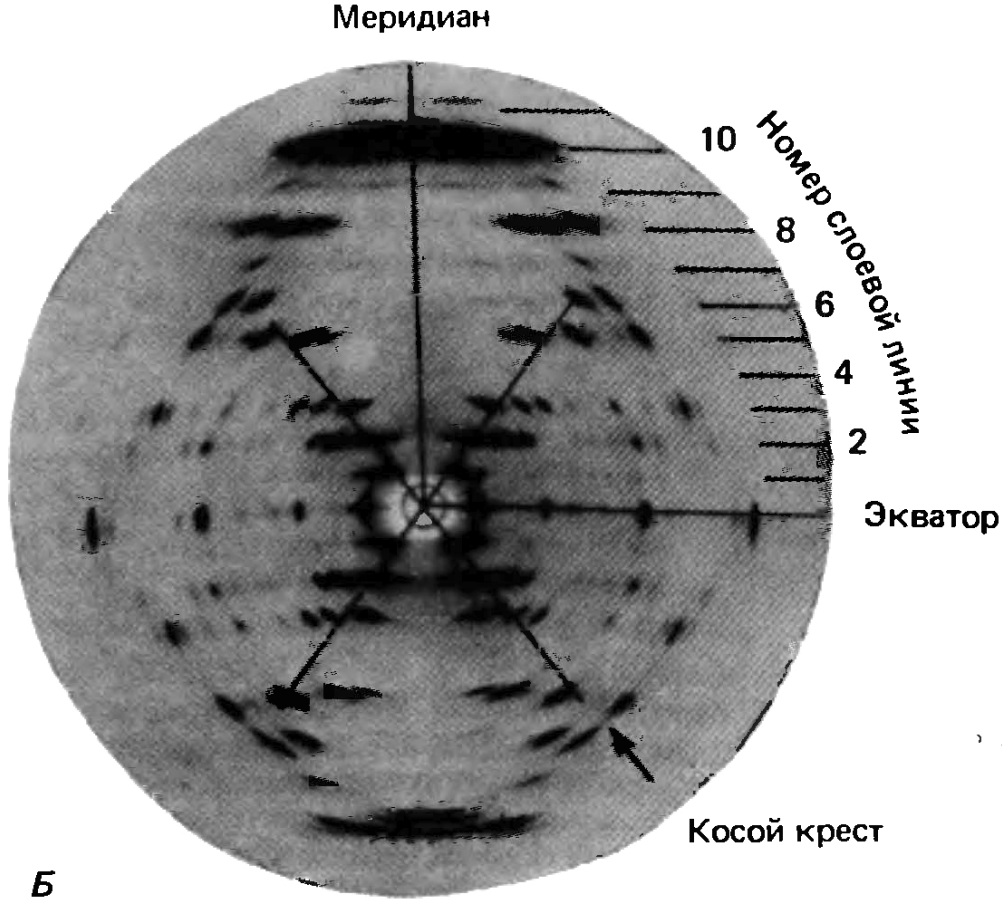
мерных единиц и их ассоциатов, образующихся с помощью водородных связей и стэкинга. Координаты атомов используются для расчета интенсивности дифракции (фурье-преобразование спирали) для каждой слоевой линии по формулам (3.6) и (3.7). Для проверки правильности построенной модели ее сопоставляют с рентгеновской дифракционной картиной. Если необходимого соответствия нет, модель модифицируют путем изменения торсионных углов остова, конформации сахарного кольца, а также путем минимизации потенциальной энергии. Последний этап минимизации разности между значениями наблюдаемых и расчетных структурных амплитуд проводят методом наименьших квадратов с наложенными связями [100, 102]. Значения R-фактора обычно лежат в интервале 0,25–0,4.

Существенно, что из-за отсутствия экспериментальных данных о фазах при расчетах можно не обнаружить, что модель неправильна. Можно привести три примера подобного рода: poly(C), poly(I) и poly(G). Вначале предполагали, что poly(C) представляет собой двойную спираль [103], однако позже, после получения дополнительных данных и более качественных рентгенограмм, было установлено, что этот полимер находится в форме одиночной спирали [104] (разд. 13.1). Далее, вначале считали, что poly(I) и poly(G) существует в виде тройной спирали [105], однако спектроскопические и последние кристаллографические данные показали, что эти полимеры представляют собой четырехцепочечную спираль [106] (разд. 13.6). Литература, в которой рассматриваются доводы за [116–122] или против [33, 107–115] модели Уотсона–Крика, весьма поучительна. Хотя во всех альтернативных моделях тоже предполагалось предпочтительное спаривание гуанина с цитозином и аденина с тимином (урацилом), тем не менее рассматривались два типа

Рис. 3.9. *А.* Схема эксперимента по рассеянию рентгеновских лучей на волокнах (съемка на плоскую пленку [165]). Монохроматический пучок проходит через коллиматор диаметром 0,1–0,2 мм; ось волокна и плоскость пленки перпендикулярны направлению падающего рентгеновского луча. Угол рассеяния θ и расстояния между плоскостями определяются по уравнению (3.1). *Б.* Рентгенограмма ДНК из тимуса теленка в В-форме (с любезного разрешения д-ра С. Арнотта и д-ра Р. Чандрасекарана). Крестообразное расположение рефлексов («косой крест») типично для спиральных молекул. Расстояние между слоевыми линиями дает шаг спирали. Сильный меридиональный рефлекс на десятой слоевой линии, соответствующей расстоянию 3,4 Å, указывает на то, что на один виток спирали приходится 10 нуклеотидов, расположенных на расстоянии 3,4 Å друг от друга; плоскости оснований примерно перпендикулярны оси спирали. Если бы при экспозиции волóкна располагались строго перпендикулярно относительно падающего пучка, то рентгенограмма была бы зеркально симметрична относительно экватора. Однако для того, чтобы получить сильный меридиональный рефлекс на десятой слоевой линии, все пары оснований надо вывести в отражающее положение, а для этого приходится слегка наклонять волокна, вследствие чего строгая симметрия пропадает.


Меридиан
Экватор
2θ
Волокно
Рентгеновский пучок

А


Меридиан
10
8
6
4
2
Номер слоевой линии
Экватор
Косой крест

Б

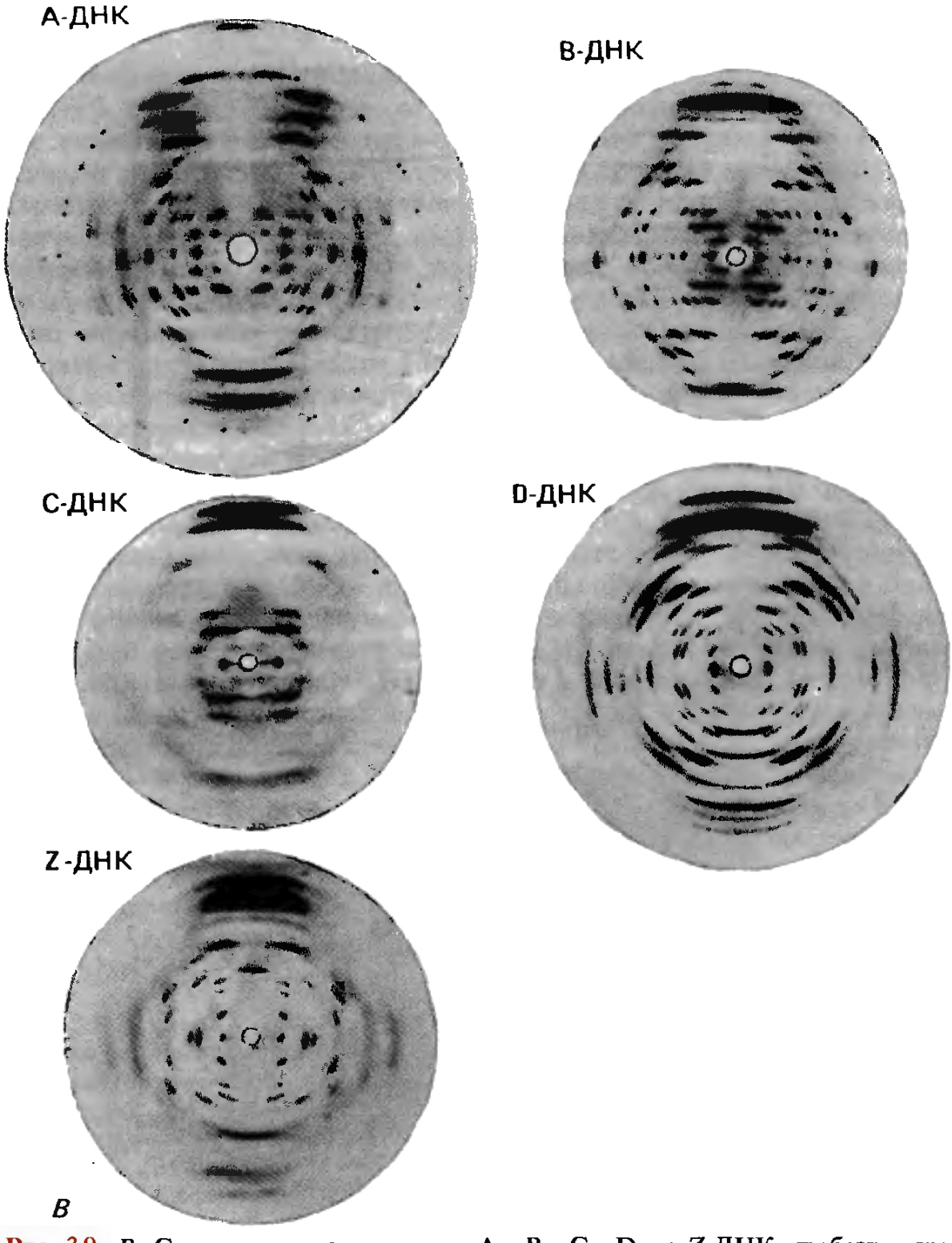


Рис. 3.9. *B.* Сравнение рентгенограмм A-, B-, C-, D- и Z-ДНК, любезно предоставленных д-ром С. Арноттом и д-ром Р. Чандрасекараном. Кольцо точечных рефлексов на рентгенограмме A-ДНК обусловлено присутствием кальпита, который напыляют для калибровки рентгенограммы. Это кольцо соответствует межплоскостному расстоянию 3,03 Å. Все рентгенограммы приведены в одном масштабе. Чтобы получить сильный меридиональный рефлекс, по которому определено число пар оснований на виток (11, 10, 9, 8 и 12 соответственно от A- до Z-ДНК), волокна отклоняли от перпендикулярного рентгеновскому пучку направления. В случае Z-ДНК меридиональный рефлекс появляется в середине «косого креста» на шестой слоевой линии, поскольку повторяющейся единицей здесь является динуклеотид (pCpG), а не мононуклеотид, как у всех других форм ДНК (гл. 12).

геометрии спаривания: по Уотсону–Крику и по Хугстену; кроме того, обсуждалась модель ДНК, в которой цепи не переплетаются, а располагаются бок о бок (гл. 14).

3.5. СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Структуру нуклеиновых кислот в растворе исследуют спектрофотометрически в УФ- и ИК-области, методами кругового дихроизма (КД) и лазерной рамаиовской спектроскопии, с помощью измерения флуоресценции, рассеяния света и методом ЯМР. Все эти методы описаны в обзорах [123–129]. Наиболее информативным среди спектроскопических методов является ЯМР. ЯМР на ядрах ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N и ^{31}P применялся для исследования моно-, олиго- и полинуклеотидов [129–132]. Три параметра спектров ЯМР – химический сдвиг δ, константа спин-спинового взаимодействия (J) и время спин-решеточной релаксации T_1 – зависят от конформационных характеристик и межмолекулярных взаимодействий. В частности, химический сдвиг δ зависит от спаривания оснований и стэкинга и очень чувствителен к химическому окружению оснований в стопке. Кривые изоэкранирования, которые при этом используются, рассчитывают методами квантовой химии, из них получают представление о кольцевых токах в ароматических кольцах [133, 135].

Константа спин-спинового взаимодействия J зависит от торсионного угла θ, который определяется четырьмя атомами X—C—C—Y или, если речь идет об атоме фосфора, X—C—O—P. X и Y – это вицинальные (т.е. связанные с двумя соседними атомами углерода) атомы ^{1}H, ^{13}C, ^{31}P. Угол θ определяется по формуле Карплюса [136]:

$$^{3}J_{\text{виц}} = A\cos^2\theta - B\cos\theta + C(\text{Гц}). \qquad (3.12)$$

Индекс 3 перед $J_{\text{виц}}$ означает, что группа X—C—C—Y содержит три связи; A, B, C – константы, зависящие от природы заместителей при центральных углеродных атомах. Для вицинальных протонов в сахарах в составе нуклеозидов $A = 10{,}2$; $B = 0{,}8$; $C = 0{,}0$ Гц. Эти константы получены по всей совокупности имеющихся данных о ЯМР этих молекул [130].

Константы спин-спинового взаимодействия можно связать с заселенностью C_2'-*эндо* (S)- и C_3'-*эндо* (N)-семейств, применив принцип псевдовращения (разд. 2.5) [130–132, 137]. Как правило, процентное содержание конформеров S и N в растворе определяется как $10\cdot{}^{3}J_{1'2'}$ и $10\cdot{}^{3}J_{3'4'}$, а константа равновесия для перехода N⇄S в хорошем приближении равна

$$K \sim {}^{3}J_{1'2'}/{}^{3}J_{3'4'}. \qquad (3.13)$$

Для более детального анализа используются все три константы – $^{3}J_{1'2'}$, $^{3}J_{2'3'}$ и $^{3}J_{3'4'}$, а также диаграммы, связывающие кон-

станты взаимодействия с конформационными параметрами [130, 138, 139][1].

Конформеры с разным торсионным углом относительно связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ можно разграничить с помощью константы $^3J_{4'5'}$ [130–132]. Взаимное пространственное расположение протонов при атомах $C_{4'}$ и $C_{5'}$ в *–ск-* и *ап*-конформациях одинаково (см. рис. 2.11), поэтому различить эти конформеры с помощью ЯМР не удается, и можно говорить лишь о смеси конформеров *–ск* и *ап*. *+Ск*-конформация, однако, четко выявляется, что позволяет разграничить два основных семейства с разной ориентацией $O_{5'}$-атома – «над» и «от» пятичленного сахарного кольца. Аналогичная ситуация возникает при рассмотрении вращения вокруг связи $C_{5'}$—$O_{5'}$ в 5′-нуклеотидах, когда измеряется константа взаимодействия для атомов ^{1}H и ^{31}P. Определить ориентацию относительно связи $C_{3'}$—$O_{3'}$ в 3′-фосфатах труднее, поскольку в этом случае может быть использован только один протон, связанный с атомом $C_{3'}$ [130–132].

Эту проблему можно решить путем учета вицинального взаимодействия $^3J(^{31}P, ^{13}C)$ между атомами ^{31}P и ^{13}C в группах P—$O_{3'}$—$C_{3'}$—$C_{2'}$ или –$C_{4'}$ и P—$O_{5'}$—$C_{5'}$—$C_{4'}$, дающего информацию об обеих эфирных связях С—О. Кроме того, можно использовать константу $^2J(^{31}P, ^{13}C)$ для геминальных заместителей, т.е. заместителей, связанных с одним и тем же центральным атомом, как это имеет место в группах P—$O_{3'}$—$C_{3'}$ и P—$O_{5'}$—$C_{5'}$ [130–132, 142–144]. Таким образом, методом ЯМР удается определить не только торсионные углы относительно связей С—С и С—О остова, но и конформацию сахара. Однако прямое определение ориентации относительно связи Р—О невозможно, поскольку в данном случае отсутствуют ядра, позволяющие определить подходящую константу взаимодействия [145, 146], и для получения хотя бы качественных результатов применяют другие методы, например метод, основанный на изменении химического сдвига при повышении температуры [147].

Ориентацию основания относительно сахарного кольца определяли несколькими методами. 1. Путем измерения времени спин-решеточной релаксации T_1 [148]. 2. Методами, которые учитывают двойной резонанс между близко расположенными протонами и основаны на эффекте Оверхаузера [149, 150]. 3. С помощью изучения влияния pH. 4. Путем определения изменения химического сдвига протона сахара при связывании последнего с основанием. 5. По псевдоконтактному сдвигу [151–153, 138]. Результаты этих исследований не совсем совпадают. Так, первые два метода дают более высокую долю *син*-конформеров, чем

---

[1] Строго говоря, при значениях угла Н—С—С—Н, близких к таковым для *син-перипланарной* области ($\theta < 90°$), уравнение Карплюса не является единственным, с помощью которого может быть описано взаимодействие вицинальных протонов ^{1}H^{1}H. Более того, некоторые исследователи считают его применение в этой области нерациональным [140, 141].

три других. Более достоверная информация получается при замещении атомов C_2 и C_6 в уридине на изотоп ^{13}C и определении константы взаимодействия $^3J(^{13}C^1H)$ [154].

Если объединить все данные по ЯМР нуклеотидов, то можно получить общее представление о структуре этих молекул. За последние десять лет точность и чувствительность метода ЯМР существенно возросли, что позволяет успешно использовать его для исследования олиго- и полимерных систем [130–132, 145–147, 155, 156].

За структурными изменениями в нуклеотидах можно следить по изменению УФ- и ИК-спектров поглощения, а также спектров кругового дихроизма. Эти спектры очень чувствительны к изменению химического состава или пространственной структуры нуклеотидов и их полимеров. Например, УФ-спектр полинуклеотидов чувствителен к стэкингу между основаниями, и наблюдаемое увеличение поглощения (гиперхромизм) при переходе спираль–клубок с успехом используется для изучения этого процесса (гл. 6). Кроме того, УФ-спектр зависит от электронного состояния гетероциклических оснований и позволяет обнаружить химические модификации или эффекты протонирования/депротонирования оснований.

Спектры дисперсии оптического вращения (ДОВ) или кругового дихроизма (КД) оснований лежат в УФ-области. При связывании хромофора (основания) с какой-нибудь хиральной молекулой (например, фуранозой) вблизи полосы поглощения наблюдается эффект Коттона (АДОВ). Следовательно, КД-спектры могут использоваться для выявления асимметричного окружения хромофора. Особенно ценны они для наблюдения за изменением локального окружения хромофора, например при переходе спираль–клубок.

ИК-спектры отражают колебательные состояния молекул. В области 1500–1700 $см^{-1}$, где основной вклад в поглощение вносят валентные колебания двойных связей, эти спектры оказываются чувствительными к заместителям оснований и поэтому могут использоваться для изучения кето-енольной таутометризации (разд. 5.4), а также процессов ассоциации оснований с помощью водородных связей. Недостатком метода является то, что в этой области поглощает еще и вода, поэтому все измерения необходимо проводить в D_2O. Кроме того, коэффициент молярной экстинкции в ИК-области на порядок ниже, чем в УФ-области. Возможности этого метода существенно расширяет применение лазерной рамановской спектроскопии, которая позволяет получить совершенно новую информацию о колебаниях молекул. Для более глубокого ознакомления с этим вопросом можно обратиться к обзорам [127, 128].

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

При изучении структуры нуклеиновых кислот применяются три разновидности метода рентгеновской кристаллографии. Небольшие моно- и олигонуклеотиды изучают обычными методами рентгеноструктурно-

го анализа монокристаллов. К глобулярным молекулам с четко выраженной пространственной структурой, таким как тРНК, применяют методы белковой кристаллографии. В обоих случаях структурные амплитуды и фазовые углы определяются из экспериментальных данных, и это приводит к однозначным результатам. В случае полимерных ДНК и РНК можно получить только квазикристаллические волокна, которые из-за ориентационной неупорядоченности дают относительно бедную дифракционную картину. Опираясь на данные по стереохимии мономерных и олигомерных частей молекулы, строят ее модель. Фурье-преобразование этой модели сравнивают с экспериментальной дифракционной картиной; при этом не исключено, что неправильная модель тоже хорошо согласуется с экспериментом. Расчет потенциальной энергии системы дает информацию о конформационной подвижности макромолекулы и используется при уточнении ее структуры; он особенно ценен тогда, когда количество рентгеноструктурных данных ограничено.

Из всех спектроскопических методов наиболее эффективным для изучения конформации моно-, олиго- и полинуклеотидов в растворе является ЯМР. Результаты этих исследований совместно с кристаллографическими данными и классическими расчетами потенциальной энергии позволяют получить наиболее полное представление о структурных особенностях молекул.

ГЛАВА 4

Структура и конформационные свойства оснований, фуранозных сахаров и фосфатных групп

Поскольку геометрия оснований, нуклеозидов и нуклеотидов и их конформационные свойства тесно связаны между собой, в этой главе мы будем рассматривать одновременно и те и другие. Мы опишем основные структурные свойства строительных блоков нуклеиновых кислот, знание которых является необходимым условием для интерпретации структуры олиго- и полинуклеотидов. Структуре и конформации нуклеозидов и нуклеотидов посвящено несколько обзорных статей; в них описаны результаты кристаллографических исследований [35, 166–169] и их детальный анализ [170–172], спектроскопические данные [130, 135, 144, 173–178], а также классические и квантовохимические расчеты потенциальной энергии [70, 179–182].

Основные физико-химические и биохимические свойства нуклеозидов и нуклеотидов рассмотрены в нескольких монографиях и книгах [123–125, 183–190].

4.1. ГЕОМЕТРИЯ ОСНОВАНИЙ

Изучена структура не только пиримидиновых и пуриновых оснований как таковых, но и их структура в составе нуклеозидов и нуклеотидов. Замещенные и незамещенные основания имеют сходную структуру; различия касаются лишь деталей, связанных с окружением атома азота гликозидной связи. Основания в составе всех нуклеозидов и нуклеотидов замещены, и на рис. 4.1 [191, 192] они приводятся именно в таком виде. Нужно подчеркнуть, что в *кристаллах* нуклеозидов и нуклеотидов, исследованных к настоящему времени, наблюдались *только те* таутомерные формы оснований, которые указаны на рис. 2.1 и 2.2. Заместители $-NH_2$ и $=O$ всегда находятся в амино- и кетоформах соответственно и никогда не принимают имино- или енольной конфигурации. Расчеты и спектроскопические данные показывают, что *в растворе* в незначительных количествах присутствуют и другие таутомерные формы (гл. 5).

Пиримидиновые и пуриновые гетероциклические основания обычно пла-

иарны[1]. Незначительные отклонения эндоциклических атомов (< 0,1 Å) и более заметные отклонения атомов заместителей (< 0,3 Å) от плоскости кольца (построенной методом наименьших квадратов по атомам кольца) нерегулярны и обусловлены влиянием кристаллической упаковки. В растворе структура оснований и связанных с ними заместителей в среднем также является плоской.

Аминогруппы в пуринах и в цитозине участвуют в образовании резонансной структуры. На это указывает длина экзоциклических C—NH_2-связей, примерно равная 1,34(1) Å (рис. 4.1). Это значительно меньше длины алифатической одинарной связи C—N, равной 1,472(5) Å [196, 197] (табл. 4.1). Кроме того, C—NH_2-связи проявляют свойства двойной связи, что обычно наблюдается у сопряженных гетероциклических систем и у одинарных связей >N—C=O-групп (табл. 4.1). Порядок связи колеблется от 1,41 до 1,47 [70, 109], т.е. связь занимает промежуточное положение между одинарной и двойной.

Это приводит к тому, что экзоциклические аминогруппы и связанные с ними гетероциклы компланарны и вращение вокруг C—NH_2-связи затруднено. Квантовохимические расчеты (ППДП/2) показали, что энергетический барьер при вращении равен 15–25 ккал·моль$^{-1}$ в зависимости от заместителей у атома азота (водород или метильная группа) в производных цитозина [200–202], аденина [203] и гуанина [203]. Согласно данным ЯМР, для пуринов энергетический барьер ниже, чем для цитозина [204], и составляет 15–18 ккал·моль$^{-1}$, что хорошо согласуется с расчетами. Из-за большого энергетического барьера скорость вращения вокруг экзоциклической C—N-связи в N_4-метилцитозине очень мала: она варьирует от 90 до 270 с$^{-1}$ в интервале температур 20–30°C и зависит от растворителя [204–206]. Примечательно, что даже у такого соединения, как 1,5,N_4, N_4-тетраметилцитозин (рис. 4.2), все атомы строго компланарны, хотя наличие большого числа заместителей должно было бы мешать этому. Отталкивание соседних метильных групп – заместителей при атомах C_5 и N_4 – *не* может быть ослаблено вращением диметиламиногруппы вокруг связи C_4—N_4, поэтому в данном случае наблюдается увеличение валентных углов [207, 208].

По сравнению с C—NH_2-связями экзоциклические связи C=O в гуанине и пиримидинах ближе по своим свойствам к двойной связи (1,84–1,89) [70, 199]. Длина связи C—O составляет 1,22(1)–1,24(1) Å (рис. 4.1), т.е. очень близка к стандартной длине двойной связи C=O, равной 1,215(5) Å (табл. 4.1). Это указывает на наличие лактамной таутомерной формы.

---

[1] В кристаллической структуре некоторых пуриновых нуклеозидов двугранный угол между нормалями к плоскостям пиримидиновых и имидазольных колец принимает значения от 0,5 до 1°, т.е. плоскость пурина может перегибаться по связи C_4—C_5 [193–195].

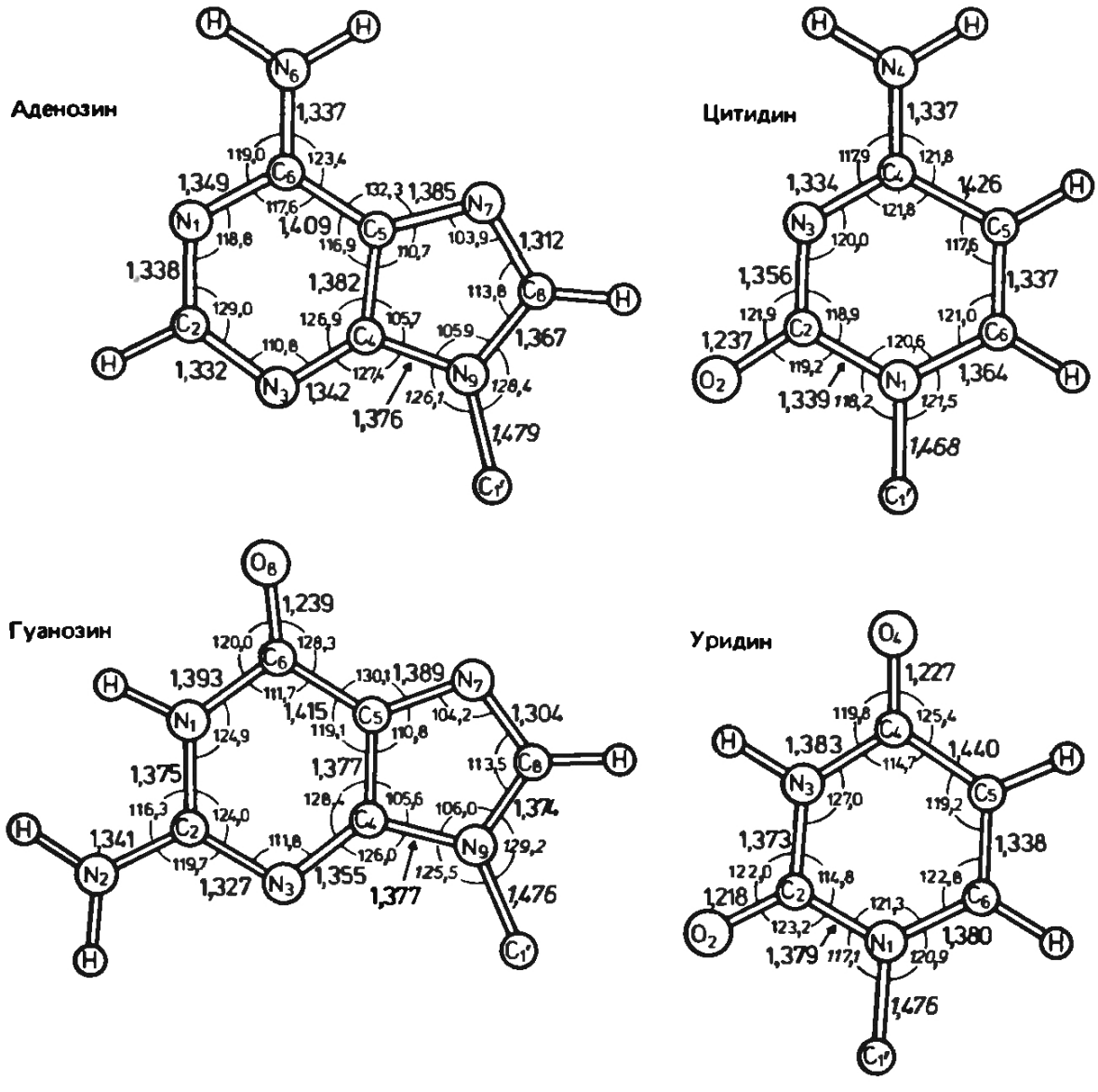
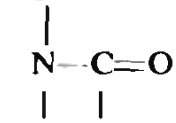
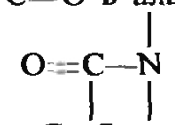


Рис. 4.1. Усредненные значения валентных углов (в градусах) и длин связей (в Å) в 1-замещенных урациле и цитозине и в 9-замещенных аденине и гуанине (по данным работы [191]). Стандартное отклонение вычисляли по формуле $\sigma = [\sum(\bar{X}_i - X)^2/(N-1)]^{1/2}$, где X_i и $\bar{X}$ – текущее и среднее значения, N – число измерений. Значения σ для углов лежат в интервале 0,3–1°, а для длин связей – в интервале от 0,005 до 0,016 Å. N равно: для урацила 32, для цитозина 14, для аденина 21 и для гуанина 7. Значения углов при гликозидных связях взяты из работы [192] и на рисуике даны курсивом. Они определены с меньшей точностью, поскольку зависят от ориентации оснований и от конформации фуранозы.

Длины эндоциклических связей в пуринах и пиримидиинах согласуются со всеми возможнымн резонаисными структурами, которые могут существовать для этих соединений [129], и совпадают с длинами и порядками связей, рассчитанными методами квантовой химии [199]. Так, связь C_2—N_3 в пуринах короче соответствующей связи N_1—C_2 в пиримидинах, а связь C_5—C_6 в пиримидинах короче, чем ее аналог – связь C_4—C_5

Таблица 4.1. Длины некоторых связей, определяющих геометрию нуклеотидов [196, 197]

Связь	Длина, Å
Одинарная связь C—C в парафинах	1,537 ± 0,005
в группе C—C=C	1,510 ± 0,005
в группе C—C=O	1,506 ± 0,005
C—C в ароматическнх соединениях	1,394 ± 0,005
Двойная связь C=C в парафинах	1,335 ± 0,005
в группе C=C—C=O	1,36 ± 0,01
в группе C=C—C=C	1,336 ± 0,005
Одинарная связь C—N в парафинах	1,472 ± 0,005
в группе C—N=	1,475 ± 0,01
в группе 	1,333 ± 0,005
в сопряженных гетероциклах	1,339 ± 0,005
Одинарная связь C—O в парафинах	1,426 ± 0,005
в ароматических соединениях (салициловая кислота)	1,36 ± 0,01
в карбоксильных группах и эфирах	
C—O	1,358 ± 0,005
C=O	1,233 ± 0,005
Двойная связь C=O в альдегидах и кетонах	1,215 ± 0,005
в группе 	1,235 ± 0,005
Одинарная связь C—S в парафинах	1,817 ± 0,005
Двойная связь в группе C=S	1,71 ± 0,01
C—F в парафинах	1,379 ± 0,005
в ароматических соединеннях	1,328 ± 0,005
C—Cl в парафинах	1,767 ± 0,005
в ароматических соединениях	1,70 ± 0,01
C—Br в парафинах	1,938 ± 0,005
в ароматических соединениях	1,85 ± 0,01
C—I в парафинах	2,139 ± 0,005
в ароматических соединениях	2,05 ± 0,01
C—H в парафинах	1,096 ± 0,005
в ароматических соединениях	1,084 ± 0,005
Одинарная связь P—O, расчетная величина	1,71
Эфирная связь P—O—R	1,60 ± 0,01
P—O—H в KH_2PO_4	1,58 ± 0,02
P—$O^{\delta-}$ в KH_2PO_4	1,51 ± 0,02
Двойная связь P=O, расчетная величина	1,40
P—S в $PSCl_3$ и т. д.	1,86 ± 0,02
P—C	1,841 ± 0,005

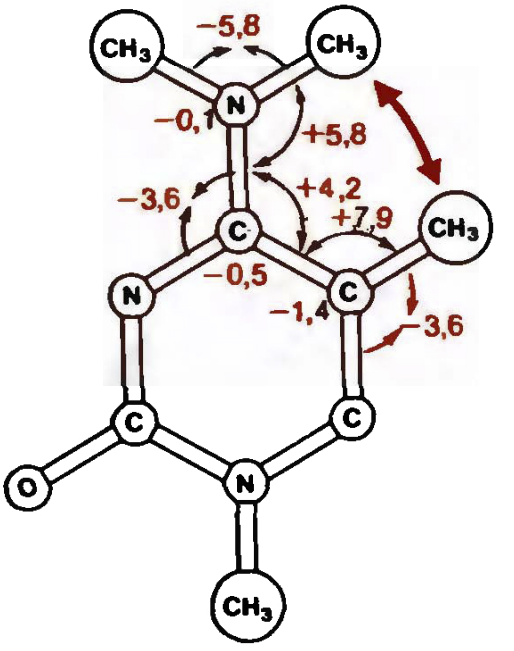


Рис. 4.2. Разность (в градусах) между усредненными значениями валентных углов в 1-замещенном цитозине, изображенном на рис. 4.1, и 1,5,N_4,N_4-тетраметилцитозине [207]. Для того чтобы уменьшить стерически невыгодные контакты между метильными группами при атомах N_4 и C_5 (двойная стрелка), соответствующие углы увеличены. Обе молекулы практически планарны.

в пуринах. У самих пуринов связь C_8—N_9 по своему характеру менее похожа на двойную, чем связь N_7—C_8; соответствующим образом различаются и длины этих связей.

Эндоциклические валентные углы имеют одиу интересиую особенность [209, 210]. В пиримидиновых кольцах внутренний валентный угол при незамещенном атоме азота на 6–8° меньше, чем при замещенном (сравните угол C_6—N_1—C_2 в аденине и гуанине и угол C_2—N_3—C_4 в цитозине и урациле; рис. 4.1). В имидазольных кольцах различие в углах C_5—N_7—C_8 на 2–3° меньше [192]. Увеличение валентных углов при замещенном атоме азота компенсируется уменьшением примыкающих валентных углов N—C—C, и в результате планарность оснований сохраняется. Такая же картина наблюдается и для оснований, в которых протонируются N-атомы либо депротонируются NH-группы. Данные по геометрии протонированных оснований, депротонированного урацила (урацил-анион) и аденина с двумя протонированными атомами азота суммированы в работе [191].

4.2. ОСНОВНЫЕ КОНФОРМАЦИИ САХАРА

В составе рибо- и дезоксирибонуклеозидов пятичленное фуранозное кольцо никогда не бывает плоским. Оно принимает либо конформацию конверта, либо твист-конформацию (конформация полукресла) (рис. 2.6 и 2.7). Номенклатура различных конформаций фуранозного кольца, а также понятие псевдовращения рассмотрены в гл. 2. Как показал конформационный анализ рибозы в составе большого числа нуклеозидов, величина изгиба у них практически постоянна: $\langle \tau_m \rangle = 38{,}6 \pm 3°$. Это оз-

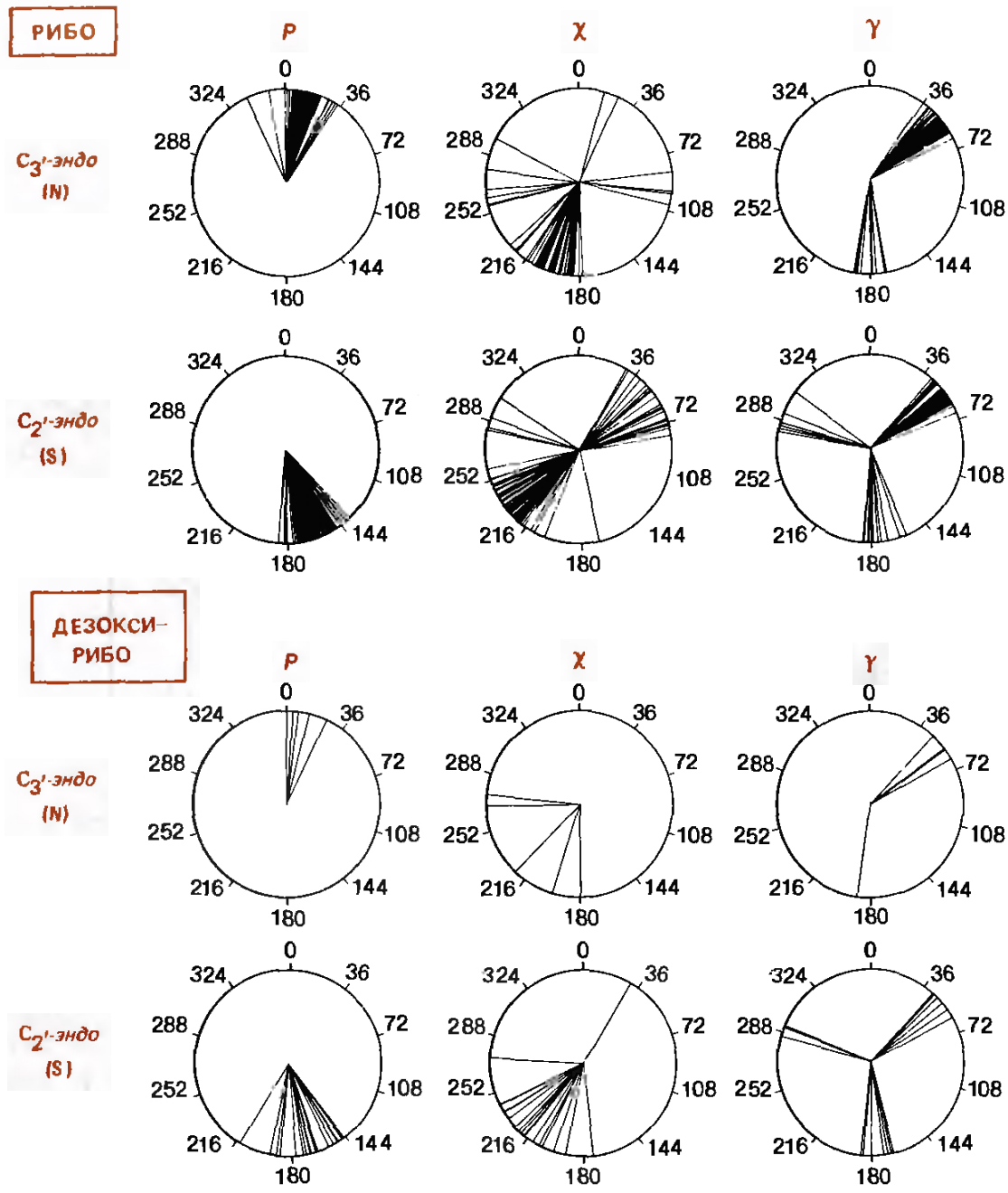


Рис. 4.3. Фазовые углы псевдовращения P и торсионные углы χ и γ относительно гликозидной и $C_{4'}$—$C_{5'}$-связей [170]. Каждая радиальная линия соответствует значению торсионного угла (в градусах), полученному с помощью рентгеноструктурного анализа 178 рибо- и дезоксирибонуклеозидов и их производных. Для рибонуклеозндов области, соответствующие $C_{2'}$-*эндо*(S)- и $C_{3'}$-*эндо*(N)-конформациям сахара, заселены одинаково, тогда как для дезоксирибонуклеотидов $C_{2'}$-*эндо*-область является предпочтнтельной. Вообще говоря, при $C_{2'}$-*эндо*-конформации фуранозы наблюдается большая конформационная свобода по торсионным углам χ и γ, о чем можно судить по заселенности *син*- (χ) и *ск*- (γ) областей, которые при $C_{3'}$-*эндо*-конформации фуранозы либо мало заселены (χ), либо не заселены вообще (γ). В окрестности $P \sim 90°$ ($O_{4'}$-*эндо*-область) опущены пять точек. Они отвечают: производному, представленному на рис. 4.10, $P = 91{,}3°$, $\tau_m = 45{,}8°$; дезоксигуанозин-5′-фосфату, $P = 83{,}3°$, $\tau_m = 40{,}8°$ [300]; дигидротимидину, $P = 84{,}3°$, $\tau_m = 31{,}6°$ [397]; 5-гидрокси-5,6-дигидротнмидину, $P = 95{,}7°$, $\tau_m = 37{,}6°$ [398]; 1-β-D-арабинофуранозилтимину, $P = 105{,}5°$, $\tau_m = 41{,}4°$ [399]. На протнвоположном полюсе цикла псевдовращения ($P \sim 270°$, $O_{4'}$-*экзо*) нн одной экспериментальной точки не обнаружено.

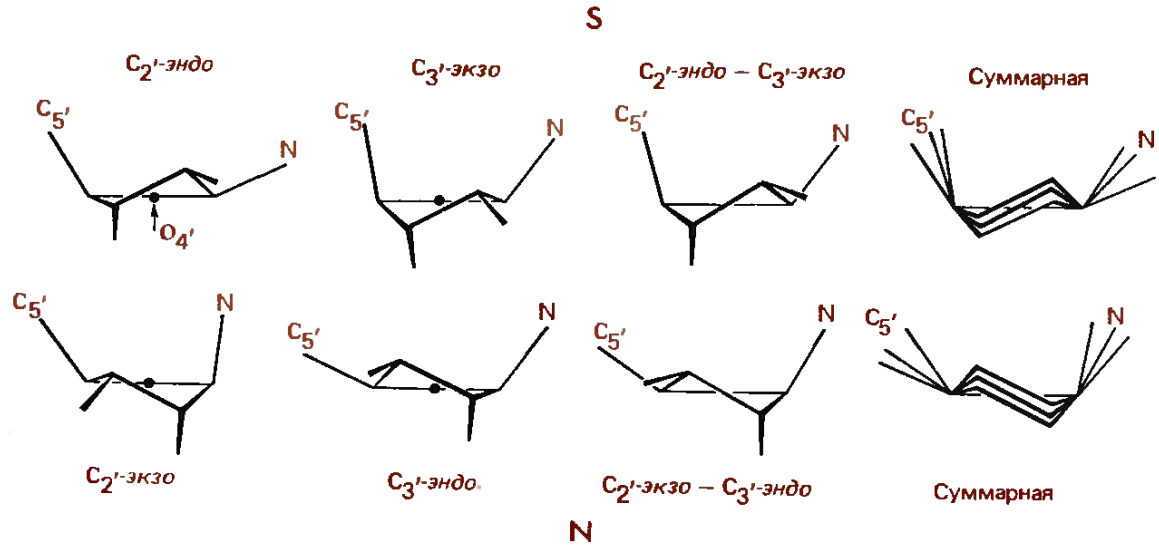


Рис. 4.4. Схематическое изображение наиболее часто встречающихся конформаций сахара [169]. Конформационные переходы по горизонтали происходят практически без преодоления энергетических барьеров, тогда как превращения по вертикали, N⇄S, разделены невысоким энергетическим барьером. Отметим, что направление экзоциклических связей $C_{1'}$—N и $C_{4'}$—$C_{5'}$ и конформация сахара связаны между собой.

начает, что τ_m отражает внутренние свойства самих колец, содержащих атомы С и О, и не зависит от типа сахара, основания, угла псевдовращения *P* или торсионных углов γ и χ [170].

Фуранозное кольцо находится в основном в двух конформациях: C_3'-*эндо*(N) и C_2'-*эндо*(S). Фуранозное кольцо в составе нуклеозидов замещено несимметрично, поэтому в нуклеозидах и нуклеотидах, структура которых определена кристаллографическими методами, фазовые углы псевдовращения *P* распределены по циклу неравномерно (рис. 4.3). Они образуют две группы, концентрируясь в интервалах от −1 до 34° (C_3'-*эндо*) и от 137 до 194° (C_2'-*эндо*) [170]. В соответствии с расположением в цикле псевдовращения эти предпочтительные конформации называют северными (N) и южными (S), понимая под этим семейства сходных конформаций, приведенные на рис. 4.4. Конформационные переходы вдоль горизонтальных рядов на рис. 4.4 соответствуют определенному интервалу в цикле псевдовращения. Потенциальная энергия конверта и твист-конформации примерно одинакова, поэтому указанный переход осуществляется «непрерывно». При переходах по вертикали меняется тип конформации сахарного кольца в соответствии со схемой N ⇄ S в цикле псевдовращения и с изменением ориентации заместителя в сахаре от аксиальной к экваториальной (табл. 4.2).

Данные, полученные кристаллографическими методами (рис. 4.3), указывают на энергетическую неэквивалентность двух возможных путей перехода от N к S. Переход через O_4'-*эндо*-конформацию более «короткий» и характеризуется сравнительно низким энергетическим барьером, поскольку эта область конформаций хотя и слабо, но заселена (см. под-

Таблица 4.2. Ориентация заместителей при различных конформациях сахара[1)]

Конформация рибозы	Атом							
	N	$H_{1'}$	$H_{2'}$	$O_{2'}$	$H_{3'}$	$O_{3'}$	$H_{4'}$	$C_{5'}$
$C_{2'}$-*эндо*	э	а	а	э	э	а	с	с
$C_{3'}$-*эндо*	с	с	э	а	а	э	а	э
$O_{4'}$-*эндо*	э	а	с	с	с	с	а	э
$O_{4'}$-*экзо*	а	э	с	с	с	с	э	а

[1)] Символы «э» и «а» обозначают *квази*экваториальную и *квази*аксиальную ориентации, поскольку точных экваториальных и аксиальных ориентаций, свойственных шестичленным циклогексановым кольцам, в данном случае не существует. Символ «с» означает ориентацию, среднюю между «а» и «э».

пись к рис. 4.3). Напротив, «длинный» переход через O_4'-*экзо* энергетически невыгоден и невозможен [170, 171]. Этот факт имеет чисто геометрическое объяснение: при конформации сахара O_4'-экзо основание и экзоциклические заместители при атоме C_5' располагаются аксиально, что приводит к стерическим ограничениям, тогда как при конформации O_4'-*эндо* они ориентируются экваториально и поэтому удалены друг от друга (рис. 4.5; табл. 4.2).

Энергию C_2'-*эндо* и C_3'-*эндо*-конформаций рассчитывали методами квантовой химии (КВВМО [211], расширенным методом Хюккеля, ППДП [212]), а также классическими методами [213–215]. Эти расчеты показали, что для *незамещенных* рибозы и дезоксирибозы C_2'- и C_3'-*эндо*-конформации с энергетической точки зрения практически эквивалентны. Они разделены энергетическим барьером от 2 до 4 ккал·моль$^{-1}$, практически одинаковым для перехода через неблаго-

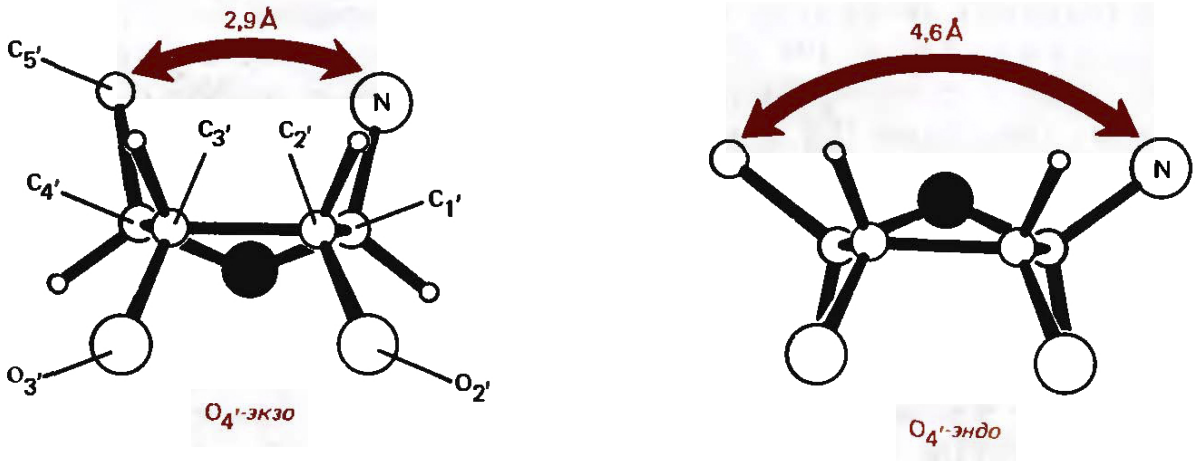


Рис. 4.5. Экваториальное и аксиальное расположение заместителей N (основание) и $C_{5'}$ в сахарах при $O_{4'}$-*экзо*-конформации (*слева*) и $O_{4'}$-*эндо*-конформации (*справа*). Превращение $C_{2'}$-*эндо* ⇄ $C_{3'}$-*эндо* может происходить только с образованием промежуточного продукта O_4'-*эндо*, поскольку в $O_{4'}$-*экзо*-конформации $C_{5'}$ и N располагаются слишком близко друг к другу.

приятные O_4'-*экзо*- и O_4'-*эндо*-конформации сахара [212, 214]. Однако, если к фуранозному кольцу присоединяется основание с помощью C_1'-β-N-гликозидной связи, распределение энергии вдоль цикла псевдовращения становится асимметричным: минимумам энергии соответствуют конформации C_2'-*эндо* и C_3'-*эндо*, а энергетический барьер умеренной высоты 2,5–5 ккал·моль$^{-1}$ – O_4'-*эндо*-конформации. Барьер, отвечающий O_4'-*экзо*-конформации, повышается настолько, что становится практически непреодолимым. Итак, расчеты показывают: для того чтобы перейти от одной основной конформации сахара к другой с минимальными энергетическими затратами, надо следовать циклу псевдовращения; плоские промежуточные конформации рибозы и дезоксирибозы маловероятны.

Во всех описанных выше расчетах валентные углы и длины связей были фиксированы и варьировались только торсионные углы. Несколько позже [32] были проведены расчеты методом самосогласованного поля [74], в которых допускались изменения длин связей и валентных углов, что приводило к лучшему совпадению с экспериментом. Было показано, что вращение вокруг связи C_3'—C_4' (рис. 2.3) (которое прямо связано с конформацией сахарного кольца; рис. 4.6) менее заторможено, чем вращение вокруг обычной одинарной связи С—С. Было показано также, что переход в конформацию O_4'-*эндо* связан с преодолением небольшого энергетического барьера (рис. 4.6), разделяющего два минимума энергии, которые отвечают конформациям $C_{2'}$- и $C_{3'}$-*эндо*. Характер изменения энергии при движении по циклу псевдовращения показывает, что в релаксированных системах, в которых в соответствии с этим циклом меняется лишь один угол ν_3, энергия O_4'-*эндо*-конформации примерно на 0,6 ккал·моль$^{-1}$ выше энергии, рассчитанной для $C_{2'}$- и $C_{3'}$-эндо-конформаций, тогда как разделяющий их энергетический барьер, который отвечает $O_{4'}$-экзо-конформации, равен 2,5 ккал·моль$^{-1}$ (рис. 4.7). Рассчитанные для рибозы и дезоксирибозы значения энергии различаются примерно на 0,1 ккал·моль$^{-1}$.

Полученные результаты неоднократно подвергались критическому анализу [170, 171], поскольку в некоторых случаях наблюдалось резкое нарушение геометрии (угол при атоме O_4' увеличивался на 5–6°). Профиль энергии, приведенный на рис. 4.6, представляется более разумным, хотя значения энергии, отвечающие $O_{4'}$-*эндо*- и $O_{4'}$-*экзо*-конформациям, в этом случае выше: 1,8 и 5,8 ккал·моль$^{-1}$ для дезоксирибозы и 3,8 и 7,5 ккал·моль$^{-1}$ для рибозы [216].

Почему неплоско фуранозное кольцо? Результаты всех приведенных расчетов качественно согласуются между собой и указывают на то, что фуранозное кольцо неплоско. Почему фуранозное кольцо предпочитает находиться в неплоской конформации? Очевидно, плоская конформация энергетически невыгодна; поскольку в этом случае все торсионные углы равны 0°, их конформация по отношению к заместителям по С-атомам является полностью заслоненной. При нарушении планарности энергия системы уменьшается, а так как энергетический барьер

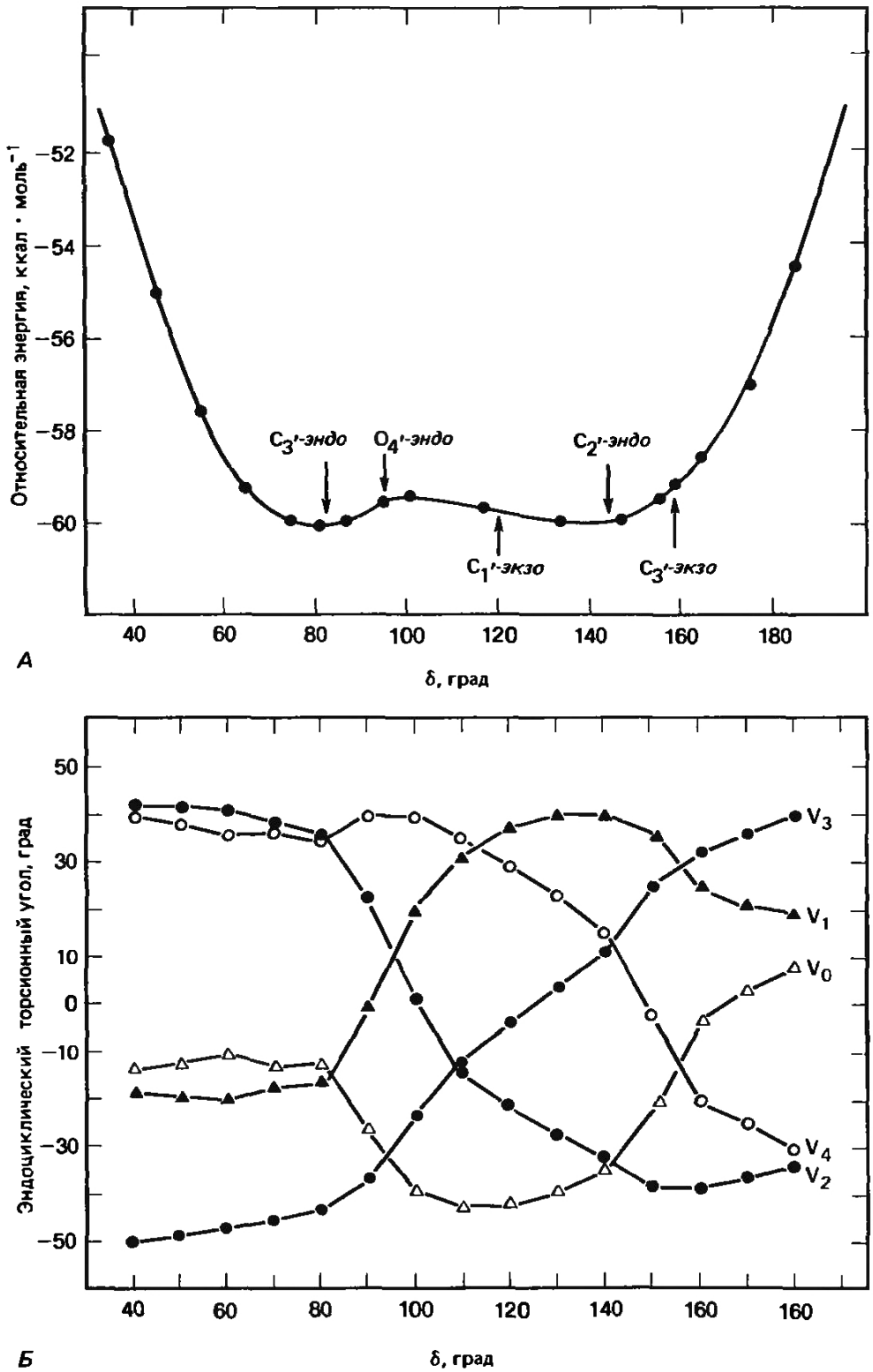


Рис. 4.6. Энергетический профиль для фуранозы в составе нуклеозидов, рассчитанный в интервале $35° \leqslant \delta \leqslant 185°$ методом силового поля (*А*). Отметим, что угол δ прямо связан с углом ν_3 и, таким образом, определяет значения эндоциклических торсионных углов (*Б*), которые в свою очередь задают конформацию сахара. По [32].

при вращении вокруг связи С—О меньше, чем при вращении вокруг связи С—С (табл. 3.3), фуранозное кольцо принимает конформации, в которых значения углов ν_0 и ν_4 (относительно связей С—О) примерно равны 0°, а углы ν_1, ν_2 и ν_3 (относительно связей С—С) максимальны. Это приводит к $C_{2'}$-*эндо*- или $C_{2'}$-*экзо*-конформациям при $\nu_4 = 0°$ и к $C_{3'}$-*эндо*- или $C_{3'}$-*экзо*-конформациям при $\nu_0 = 0°$. Иными словами [217], когда из плоскости выступает атом $C_{1'}$, вращение происходит вокруг связей $C_{4'}$—$O_{4'}$ и $C_{2'}$—$C_{3'}$; это частично устраняет невыгодные контакты между заместителями при атомах $C_{2'}$ и $C_{3'}$, хотя конформация заместителей при атомах $C_{3'}$ и $C_{4'}$ остается заслоненной (рис. 4.8). Энергетическое состояние системы становится еще более выгодным, когда из плоскости выступает атом $C_{2'}$. В этом случае вращение происходит вокруг связей $O_{4'}$—$C_{1'}$ и $C_{3'}$—$C_{4'}$, при этом торсионный угол относительно связи $C_{4'}$—$O_{4'}$ (ν_4) остается равным нулю и ни один из заместителей не остается в заслоненной конформации. Смещения атомов $C_{4'}$ и $C_{3'}$ приводят к таким же последствиям, что и смещения атомов $C_{1'}$ и $C_{2'}$. Углы С—О—С менее вариабельны, чем углы, в вершине которых находится атом углерода [32], а поскольку эндоциклический валентный угол при выступающем атоме меньше, чем тот же угол

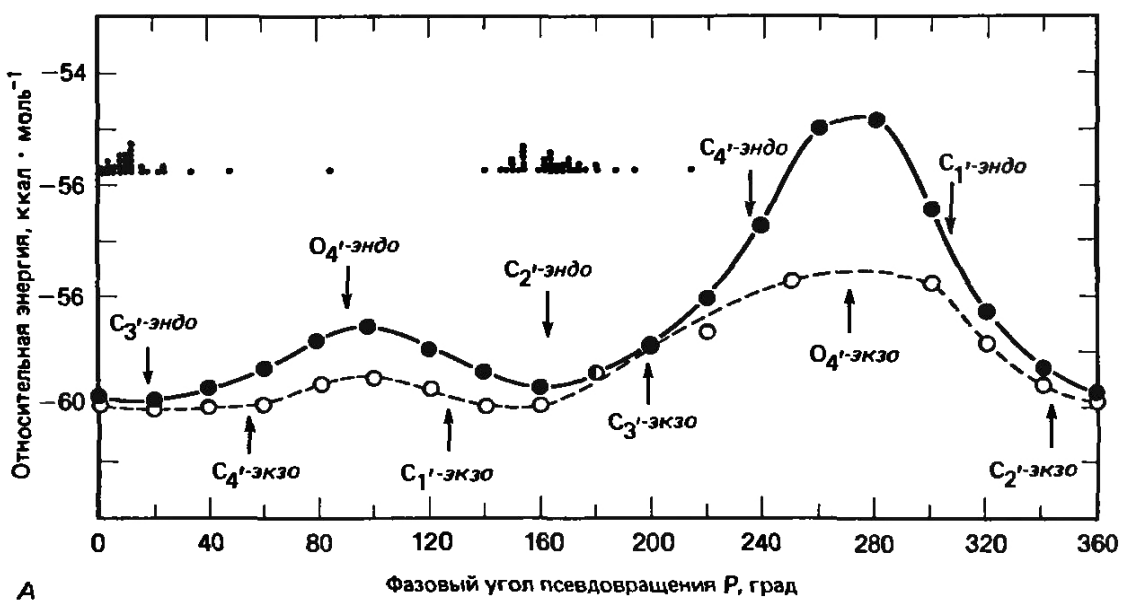


Рис. 4.7. *А*. Изменение полной энергии фуранозы при движении по циклу псевдовращения [32]. Сплошная кривая отвечает случаю, когда все эндоциклические углы ν_n меняются в соответствии с циклом псевдовращения, пунктирная — случаю, когда в соответствии с этим циклом меняется только один угол ν_3, а характер изменения других углов отличается от «идеальных кривых», представленных на рис. 2.9. Гистограмма соответствует значениям фазовых углов *P*, полученным при анализе кристаллов. Более точные значения энергии приведены в работе [216], однако характер энергетического профиля остается прежним.

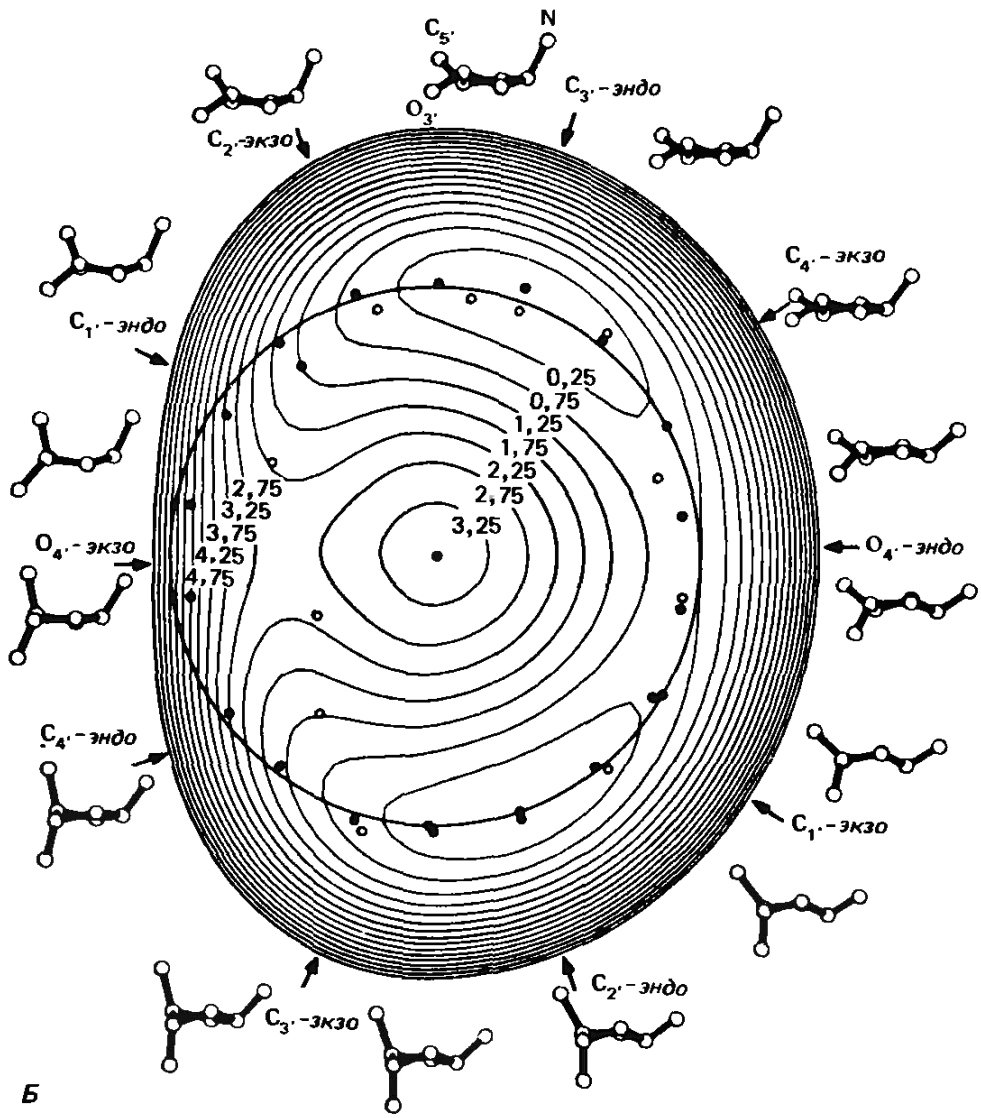


Рис. 4.7. *Б.* Другое, более полное представление энергетической карты конформаций фуранозы [32]. Фазовый угол псевдовращения P отсчитывается по часовой стрелке, при этом значению $P = 0°$ отвечает вертикальное положение стрелки. Степень изгиба ν_{max}, определяемая по формуле (2.3), возрастает в радиальном направлении от центра, которому соответствует планарная конформация фуранозы. Окружность отвечает истинному циклу псевдовращения с $\nu_{max} = 0{,}4$ Å. Черные кружки соответствуют значениям энергии, рассчитанным для случая, когда все пять торсионных углов ν_n меняются в соответствии с циклом псевдовращения, а светлые кружки – значениям, полученным при соответствующем изменении только угла ν_3. Обратите внимание на большие отклонения от истинного цикла в области $P \sim 270°$ ($O_{4'}$-*экзо*-конформация). Изображенные на рисунке конформации отвечают ближайшим светлым кружкам. Числа (в ккал · моль$^{-1}$) равны разности между энергией данной конформации сахара и энергией точки глобального минимума. При более точных значениях энергии, приведенных в работе [216], характер приведенной энергетической карты не меняется.

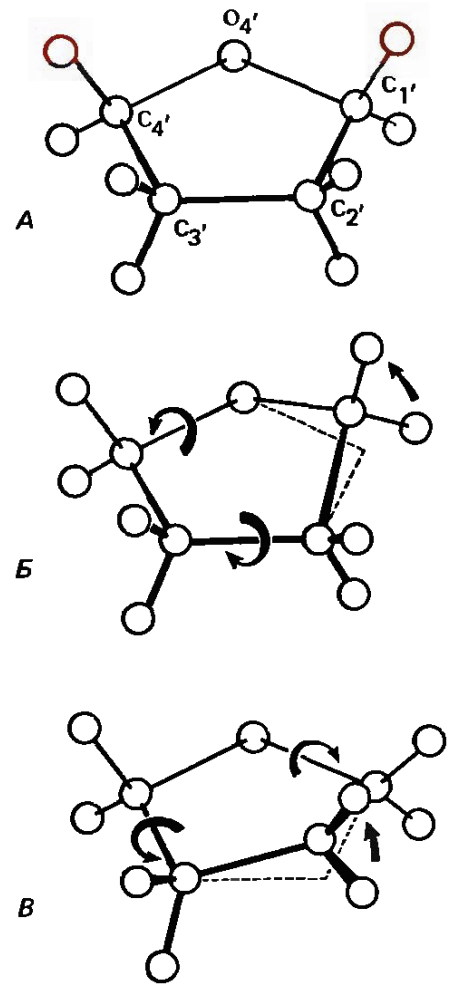


Рис. 4.8. Изгиб фуранозного кольца предотвращает образование заслоненных конформаций [217]. *А.* Фуранозное кольцо планарно, все заместители, изображенные в цвете, расположены так, что создается полностью заслоненная конформация. *Б.* $C_{1'}$-*эндо*-конформация; заместители при атомах $C_{3'}$ и $C_{4'}$ (в цвете) все еще создают заслоненную конформацию. *В.* $C_{2'}$-*эндо*-конформация, заслоненные конформации отсутствуют. Ситуация, изображенная на нижнем рисунке, имеет место и при $C_{2'}$-*экзо*-, $C_{3'}$-*эндо*- и $C_{3'}$-*экзо*-конформациях сахара.

в плоскости кольца (разд. 4.3), этот факт можно считать еще одним аргументом против того, что атом $O_{4'}$ выходит из плоскости кольца. Итак, $C_{2'}$- и $C_{3'}$-*эндо*-конформации являются наиболее предпочтительными, поскольку слабые взаимодействия между заместителями фуранозы в этих случаях минимальны.

Спектроскопические данные свидетельствуют о быстром взаимном превращении $C_{3'}$-*эндо* (N) $\rightleftarrows$ $C_{2'}$-*эндо* (S). Выводы, к которым приводят анализ кристаллических структур и расчеты энергии, подтверждаются спектроскопическими данными. Исследования методом ЯМР в растворе показали, что между $C_{2'}$- и $C_{3'}$-*эндо*-конформациями осуществляется быстрый равновесный переход. Это следует из отношения констант взаимодействия между вицинальными ^{1}H: $^3J_{1'2'}$ и $^3J_{3'4'}$ [уравнение (3.13)]. Иными словами, в пиримидиновых рибонуклеозидах и рибонуклеотидах рибоза предпочитает находиться в $C_{3'}$-*эндо*-(N)-конформации, а в пуриновых – в $C_{2'}$-*эндо*(S)-конформации (термин «предпочитает» означает 60–80%-ную заселенность данной конформации). Дезоксирибоза находится в основном в $C_{2'}$-*эндо*-конформации [31, 126, 130, 138, 173–176, 218–222]. Энергетический барьер этого перехода настолько мал, что его удается измерить только в особых условиях, используя дейтерированный аммиак и работая в интервале температур от -60 до

+40°C. Для пуриновых рибонуклеозидов энергия активации составляет в среднем 4,7 ± 0,5 ккал·моль$^{-1}$. Для пиримидиновых нуклеозидов эта энергия выше, но ее пока не удалось измерить экспериментально [223].

4.3. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА КОНФОРМАЦИЮ ФУРАНОЗЫ

С помощью ЯМР было обнаружено, что равновесие $C_{3'}$-*эндо*(N) ⇄ ⇄ $C_{2'}$-*эндо*(S) зависит от природы заместителей при атомах $C_{2'}$ и $C_{3'}$; более электроотрицательный заместитель предпочитает аксиальную ориентацию относительно кольца [224–228, 228а]. Систематические исследования 2′-замещенных производных аденозина [229] и уридина [230] показали, что число $C_{3'}$-*эндо*(N)-конформеров линейно возрастает с увеличением электроотрицательности заместителей при атоме $C_{2'}$ (рис. 4.9). Исходя из этой закономерности, можно предположить, что дезоксирибонуклеозиды и дезоксирибонуклеотиды, у которых с $C_{2'}$-атомом связан слабоэлектроотрицательный атом водорода, будут предпочтительно находиться в $C_{2'}$-*эндо*-конформации. Именно такая ситуация наблюдается экспериментально, и это дает основания полагать, что конформация фуранозного кольца действительно определяется его дипольным моментом, и чем более электроотрицателен заместитель, тем более охотно он располагается в аксиальной ориентации относительно кольца [1].

Эти результаты были получены на нуклеозидах, когда в качестве растворителя применялись дейтерированный диметилсульфоксид или вода. Если растворителем служит дейтерированный аммиак (ND_3) [231], то для аденозинов, у которых 2′- или 3′-гидроксил замещен аминогруппой, наблюдается обратный эффект. Таким образом, либо конформация сахара существенным образом зависит от растворителя, либо 2′- и 3′-аминозамещенные нуклеозиды не являются типичными представителями этого класса молекул. В пользу последнего предположения говорит тот факт, что в кристаллах β-D-2′-амино-2′-дезоксиаденозина [232] наблюдается образование внутримолекулярных водородных связей $N_{2'}$—H···$O_{3'}$, которые не обнаружены в других производных (за исключением одного модифицированного нуклеозида в необычной $O_{4'}$-*эндо*-конформации; см. рис. 4.10 [233]).

---

[1] В работах [216, 228а] подчеркивается, что тип наиболее предпочтительной конформации сахара определяется описанным в разд. 4.12 *гош-эффектом*. Этот эффект приводит к тому, что группировка X—C—C—Y, где X и Y – электроотрицательные заместители, подобные OH или F, старается сохранить + или – *гош* (+ или – *синклинальную*) конформацию и избежать *антиперипланарной*. В рибозе найдено множество таких группировок, например $O_{4'}C_{1'}C_{2'}O_{2'}$; $O_{4'}C_{4'}C_{3'}O_{3'}$; (основание)–$C_{1'}C_{2'}O_{2'}$.

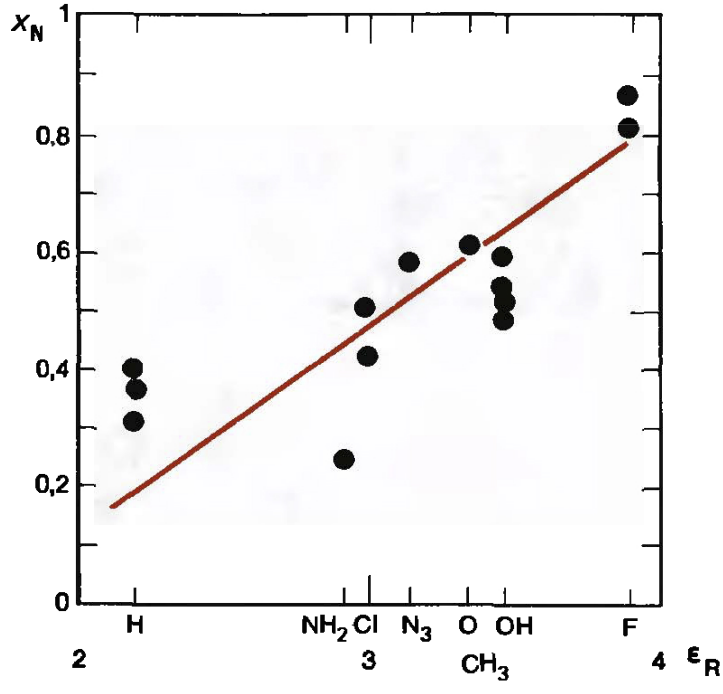


Рис. 4.9. Зависимость мольной доли X_N пиримидиновых нуклеозидов, с сахаром в $C_{3'}$-*эндо*(N)-конформации, от электроотрицательности ε_R заместителей при атоме $C_{2'}$ в интервале от 2,1 (H) до 4,0 (F) [230].

Конформация сахара зависит также от характера модификации оснований [173]. Наиболее наглядно это проявляется в случае присоединения к атому C_8 пурина или к атому C_6 пиримидина какой-нибудь объемной группировки, сдвигающей равновесие *син* ⇄ *анти* в сторону *син* (разд. 4.5). Обычно *син*-конформация коррелирует с $C_{2'}$-*эндо*(S)-конформацией сахара, особенно в пуринах. Диапазон конформаций, которые может принимать фураноза, сужается при образовании циклов между атомами $O_{2'}$ и $O_{3'}$ или между $O_{3'}$ и $O_{5'}$, а также внутримолекулярных связей между сахаром и основанием (как в $O_{2',2}$-циклоуридине) ([126, 170–172]; см. гл. 7). Если основание заменить атомом водорода или группировкой —O—CH_3, то, по данным ЯМР, фураноза будет находиться в основном в $C_{3'}$-*эндо*-конформации.

Полирибо- и полидезоксирибонуклеотиды проявляют интересные конформационные свойства (гл. 11). Нуклеотиды в составе олиго- и полинуклеотидов не являются независимыми единицами; между ними осуществляется стэкинг-взаимодействие, и обычно они образуют структуру, имеющую форму правой спирали. Молекула ДНК – одного из дезоксирибонуклеотидов – ведет себя совершенно иначе, нежели ее рибонуклеотидный аналог – РНК. Эти различия обусловлены отчасти различиями в свойствах составляющих их мономерных единиц. Для ДНК характерны две основные конформации: $C_{3'}$-*эндо* и $C_{3'}$-*экзо* (разновидность $C_{2'}$-*эндо*-конформации), переход между которыми определяется активностью молекул воды окружающей среды, а для РНК всегда на-

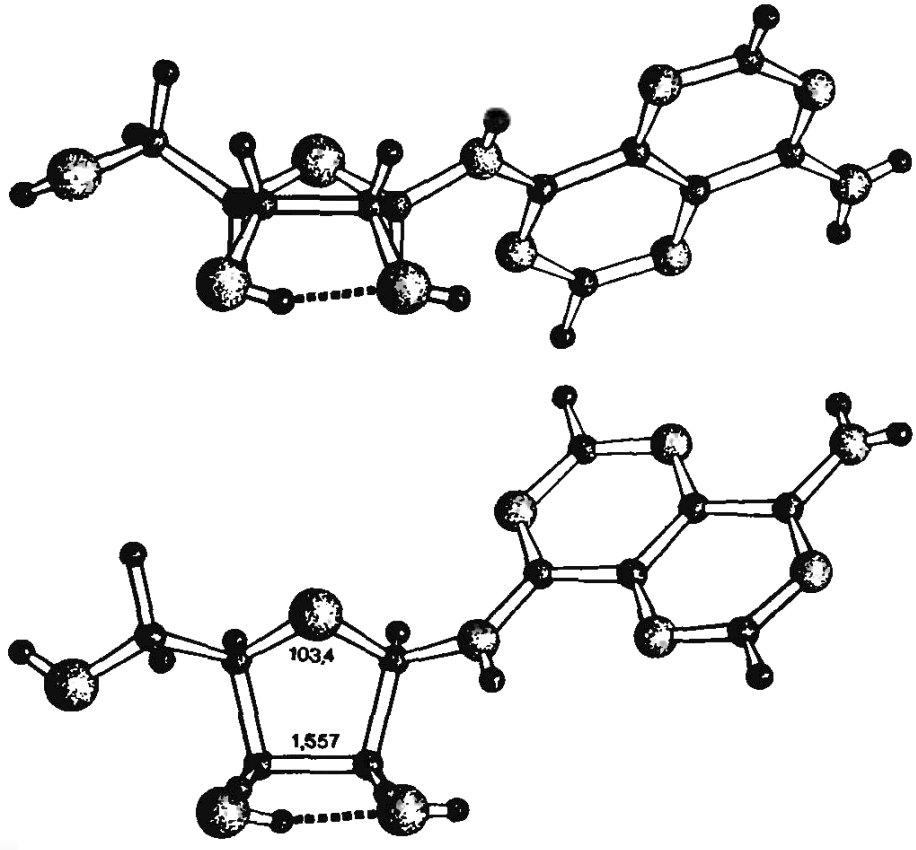


Рис. 4.10. Структура молекулы 6-амино-10-(β-D-рибофуранозиламин-пиримидо[5,4-*d*]пиримидина, производной нуклеозида с обычной $O_{4'}$-*эндо*-конформацией сахара (две проекции) [233]. Поскольку связи $C_{2'}$—$O_{2'}$ и $C_{3'}$—$O_{3'}$ создают заслоненную конформацию, появляется возможность образования внутримолекулярной водородной связи $O_{3'}H\cdots O_{2'}$ (пунктир), не наблюдающейся ни в одной из конформаций сахара, в которых связи $C_{2'}$—$O_{2'}$ и $C_{3'}$—$O_{3'}$ ориентированы по-другому. Кроме того, длина связи $C_{2'}$—$C_{3'}$ больше, чем обычно, и равна 1,557 Å, а валентный угол $C_{1'}$—$O_{4'}$—$C_{4'}$ меньше и составляет 103,4° (сравните с рис. 4.13).

блюдается $C_{3'}$-*эндо*-конформация. Был высказан ряд гипотез, которые объясняют это различие присутствием в молекуле РНК гидроксильной группы $O_{2'}H$. Построение молекулярных моделей РНК [234, 235], данные по ИК- [236] и ЯМР-спектроскопии [237], а также рентгеноструктурный анализ тРНК, который свидетельствует о наличии в этой молекуле по крайней мере слабых водородных связей $O_{2'}$—$H\cdots O_{4'}$ [87] (рис. 4.11, *А*), привели к предположению, что структура РНК стабилизируется водородными связями между гидроксильной $O_{2'}H$-группой (донор) одного нуклеотида и атомом кислорода $O_{4'}$ соседнего нуклеотида (акцептор). Однако метилирование кислорода $O_{2'}$ [238–240] или замена его на Cl [241], F [242–244] или на азидную группу [245] не сопровождается существенным уменьшением конформационной стабильности синтетических РНК, и, следовательно, водородная связь $O_{2'}$—$H\cdots O_{4'}$ не может считаться основным фактором, стабилизирую-

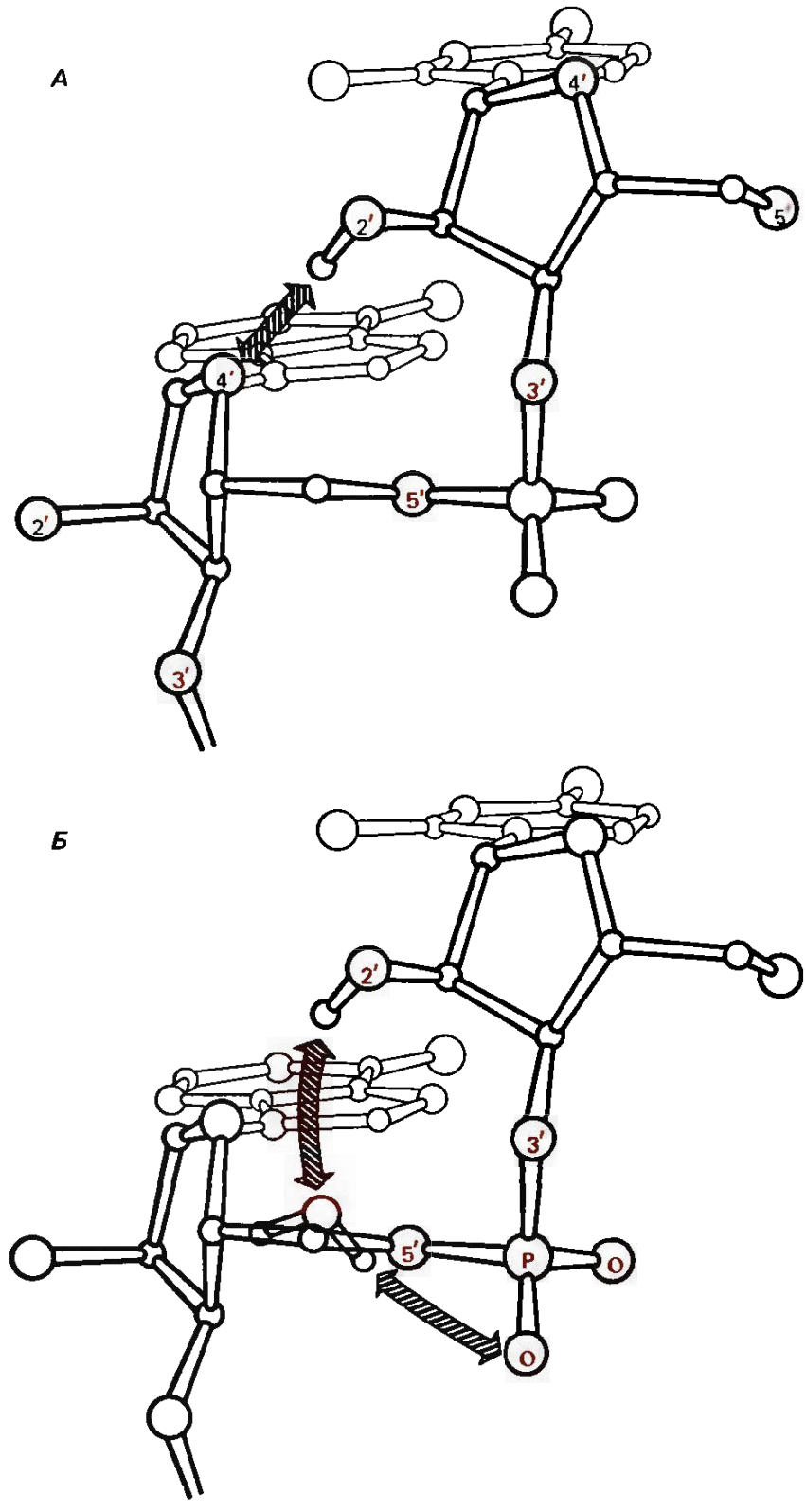


Рис. 4.11. Стабилизация вторичной структуры РНК и C_3,-*эндо*-конформации сахара путем образования (*А*) внутрицепочечной водородной связи O_2,$H\cdots O_4$, и (*Б*) водного мостика O_2,$\cdots$Фосфат. (См. обсуждение в тексте и рис. 4.9.)

щим данную конформацию. Результаты исследований методом ЯМР, проведенные несколько позже, свидетельствуют о возможности образования водного мостика между гидроксилом O_2·H и 3′-фосфатом, чем можно отчасти объяснить конформационную стабильность РНК [246, 247] (рис. 4.11, *Б*). Поскольку 2′-хлор- или 2′-фторзаместители в молекуле РНК не могут образовывать таких водородных связей и в лучшем случае играют роль слабых акцепторов, то C_3·-*эндо*-конформация стабилизируется в данном случае за счет сильной электроотрицательности указанных заместителей [229, 230] (рис. 4.9). Впрочем, не исключено, что все другие конформации РНК запрещены просто из-за стерических препятствий, обусловленных наличием гидроксильной O_2·H-группы [248]. В заключение можно сказать, что мы пока не знаем, какие силы стабилизируют C_3·-*эндо*-конформацию в РНК. Скорее всего, эта стабильность обусловлена не одним, а несколькими факторами.

4.4. ДЛИНЫ СВЯЗЕЙ И ВАЛЕНТНЫЕ УГЛЫ В ФУРАНОЗАХ

Для исследования параметров псевдовращения и геометрии связей для тетрагидрофурана, незамещенного прототипа пятичленного сахарного кольца нуклеозидов, были использованы методы дифракции электронов [249, 250], микроволновой техники [251] и теоретические методы [252]. Длины связей и валентные углы в тетрагидрофуране указаны на рис. 4.12. Длины связей согласуются со значениями стандартных длин связей С—С и С—О (табл. 4.1), однако валентные углы существенно меньше, чем угол 109,5°, который наблюдается при sp^3-гибридизации, а также меньше 108° – величины внутреннего угла плоского фуранозного кольца, сумма углов в котором равна $5 \cdot 108° = 540°$. Сумма углов в тетрагидрофуране составляет 524,9°, т. е. на 15,1° меньше указанной величины. Нетрудно показать, что это обусловлено наличием атомов, выступающих из плоскости кольца [253, 254]. Углы уменьшаются неодинаково, и при этом наблюдается следующая закономерность: С—О—С > > С—С—О > С—С—С [255].

В составе нуклеозидов длины связей С—С в фуранозах уменьшаются лишь на ~0,02 Å, тогда как значения торсионных углов относительно этих связей изменяются от 0 до 40°, в результате чего уменьшается ван-дерваальсово отталкивание. Для длин связей С—О такой закономерности не наблюдается [172]. Наиболее существенное изменение валентных углов, от 3 до 5°, наблюдается в цикле псевдовращения [170–172, 216]. Здесь мы остановимся на двух основных областях цикла псевдовращения: C_2·-*эндо*(S) и C_3·-*эндо*(N); данные по их геометрии представлены на рис. 4.13.

Значения эндоциклических валентных углов в фуранозах и в тетрагидрофуране одинаковы, практически совпадают и суммы углов (523° в фуранозах и 524,9° в тетрагидрофуране). Это означает, что образование кольца и его изгиб сильнее влияют на конформацию данных соедине-

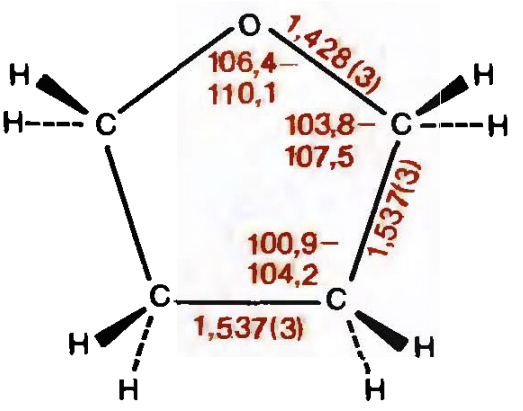


Рис. 4.12. Геометрия незамещенного пятичленного кольца тетрагидрофурана, установленная на основе данных по дифракции электронов. В скобках приведены стандартные отклонения длин связей C—C или C—O. Представлены данные, усредненные по результатам работ [249, 250].

ний, чем природа заместителя при углеродных атомах. Длины всех эндоциклических C—C-связей фуранозы в составе нуклеозидов значительно меньше длины обычной одинарной связи C—C (1,537 Å) (табл. 4.1). По-видимому, это обусловлено наличием заместителей при атоме углерода: основания и атома $O_{4'}$ при атоме $C_{1'}$ и атома(ов) кислорода при атоме(ах) $C_{3'}$ (и $C_{2'}$). Подобное уменьшение длин связей C—C наблюдается и в α-D-глюкозе [256]. В кристаллах всех нуклеозидов связь $C_{1'}$—$O_{4'}$ на 0,03 Å короче, чем связь $C_{4'}$—$O_{4'}$, поскольку атом кислорода $O_{4'}$ сопряжен с основанием, связанным с $C_{1'}$-атомом.

Экзоциклические валентные углы при атомах $C_{1'}$ и $C_{4'}$ близки к тетраэдрическому ($\sim 109°$), однако те углы, в образовании которых участвуют атомы $C_{2'}$ и $C_{3'}$, увеличиваются до 112,6 ÷ 116,8°. Такая же ситуация имеет место и для экзоциклических валентных углов, в вершине которых находятся атомы $C_{2'}$ и $C_{3'}$. В $C_{2'}$-*эндо*-конформации валентный угол C—C—$O_{2'}$ увеличивается, а длина связи $C_{2'}$—$O_{2'}$ уменьшается. Аналогичная картина наблюдается и для $C_{3'}$-*эндо*-конформации; это предполагает, что у атомов, выступающих из плоскости, sp^2-гибридизация проявляется в большей степени, чем у атомов в плоскости [257].

В этом смысле интересна структура 6-амино-10-(β-D-рибофуранозиламино)пиримидо-[5, 4*d*]пиримидина [233] (рис. 4.10). Это единственный рибонуклеозид (с модифицированным основанием), который находится в редкой $O_{4'}$-*эндо*-конформации. Гетероциклическое основание связывается с $C_{1'}$-атомом через экзоциклическую аминогруппу. Валентный угол при выходящем из плоскости атоме $O_{4'}$ равен 103,4(4)°; это на 6° меньше, чем такой же угол в рибозе с конформацией $C_{2'}$- либо $C_{3'}$-*эндо*, т.е. меньше характерного значения для валентных углов C—O—C, равного 109,5°. Более того, поскольку связи $C_{2'}$—$O_{2'}$ и $C_{3'}$—$O_{3'}$ *синперипланарны*, а соответствующий торсионный угол $O_{2'}$—$C_{2'}$—$C_{3'}$—$O_{3'}$ практически равен нулю (3,2°), длина связи $C_{2'}$—$C_{3'}$, 1,557(4) Å, оказывается больше, чем длина одинарной связи C—C (табл. 4.1). Таким образом, $O_{4'}$-*эндо*-конформация, будучи переходной формой между конформациями $C_{2'}$- и $C_{3'}$-*эндо*, соответствует напряженному конформационному состоянию, что и предсказывала теория (разд. 4.2).

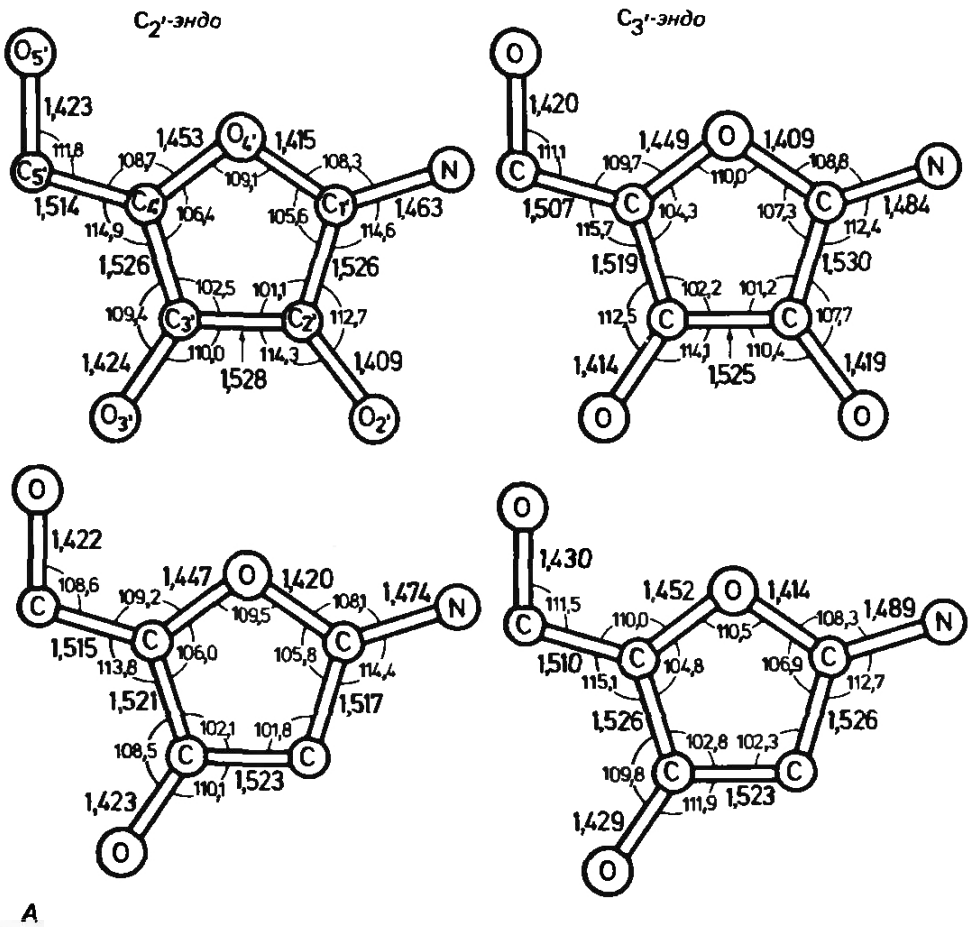
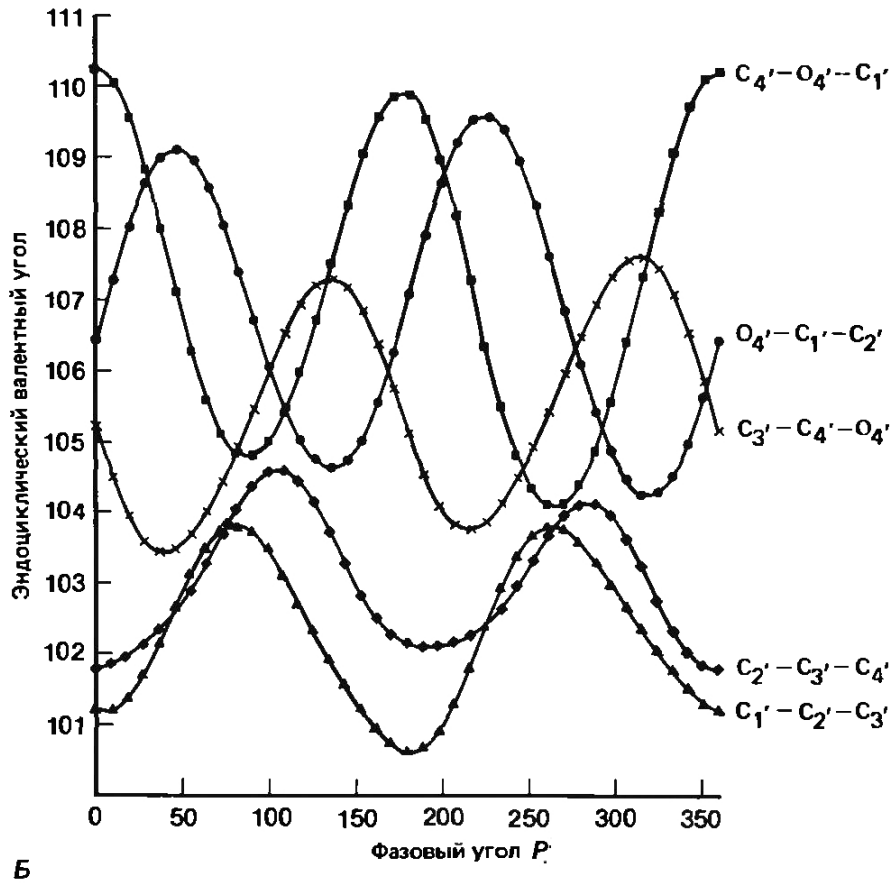


Рис. 4.13. *А*. Геометрия $C_{2'}$-*эндо*- и $C_{3'}$-*эндо*-конформаций рибозы и дезоксирибозы в составе нуклеозидов. Другие усредненные данные приводятся в работе [392]. Указанные на рисунке значения являются результатом усреднения данных, полученных по хорошо уточненным структурам ($R < 0{,}08$); стандартные отклонения σ рассчитывались по формуле, приведенной в подписи к рис. 4.1. В случае $C_{2'}$-*эндо*- и $C_{3'}$-*эндо*-рибоз $N = 25$, $\sigma_{\text{дл.св}} = 0{,}006 \div 0{,}014$ Å, $\sigma_{\text{угл}} = 0{,}6 \div 2{,}3°$; в случае $C_{2'}$-*эндо*-дезоксирибозы $N = 7$, $\sigma_{\text{дл.св}} = 0{,}009 \div 0{,}018$ Å, $\sigma_{\text{угл}} = 0{,}5 \div 3{,}2°$; в случае $C_{3'}$-*эндо*-дезоксирибозы $N = 8$, $\sigma_{\text{дл.св}} = 0{,}007 \div 0{,}024$ Å, $\sigma_{\text{угл}} = 0{,}5 \div 2{,}1°$.

4.5. КОНФОРМАЦИИ *СИН* И *АНТИ*

Стерические препятствия, возникающие при вращении оснований относительно сахара, приводят к появлению двух предпочтительных конформаций, *син* **и** *анти* [33, 34] (см. рис. 2.10). Как отмечалось в гл. 2, в *анти*-конформации нет никаких особых стерических ограничений; в то же время в *син*-конформации основание нависает над сахарным кольцом, что приводит к тесным межатомным взаимодействиям. Эти взаимодействия уменьшаются, когда сахар находится в $C_{2'}$-*эндо*-конформации, а основание и атом $C_{5'}$ располагаются экваториально и удалены друг от друга (рис. 4.4). Как показывает рентгеноструктурный анализ, когда нуклеозид находится в *син*-конформации, сахар чаще принимает $C_{2'}$-*эндо*-конформацию [42, 195]. Анализ всех данных по кристалличе-



Б

Рис. 4.13. *Б.* Зависимость эндоциклических валентных углов фуранозы от фазового угла псевдовращения *P* [170]. Имея в виду наличие такой зависимости, приведенные на рис. 4.13, *А* данные следует рассматривать как идеализированные.

ской структуре нуклеозидов позволяет сделать вывод, что если сахар пребывает в $C_{2'}$-*эндо*-конформации, то пуриновые нуклеозиды с равной вероятностью принимают как *син*-, так и *анти*-конформации, если же конформация сахара $C_{3'}$-*эндо*, это равновесие сдвигается в сторону *анти* [170]. В крайне редко встречающихся пиримидиновых рибонуклеозидах, находящихся в *син*-конформации, сахар принимает как $C_{2'}$-, так и $C_{3'}$-*эндо*-конформации. Преобладающей для пиримидиновых рибонуклеозидов является *анти*-конформация, и ей сопутствует $C_{3'}$-*эндо*-конформация рибозы; в то же время пиримидиновые дезоксирибонуклеотиды предпочитают $C_{2'}$-*эндо*-, а не $C_{3'}$-*эндо*-конформацию [35, 167–169].

Из водного раствора 4-тиоуридин кристаллизуется в *син*-конформации [258], а если растворителем служит масляная кислота, 4-тиоуридин кристаллизуется в обычной *анти*-конформации [259] (рис. 4.14). Основное различие между этими двумя кристаллическими структурами состоит в том, что в кристаллическую решетку нуклеозидов в *син*-конфор-

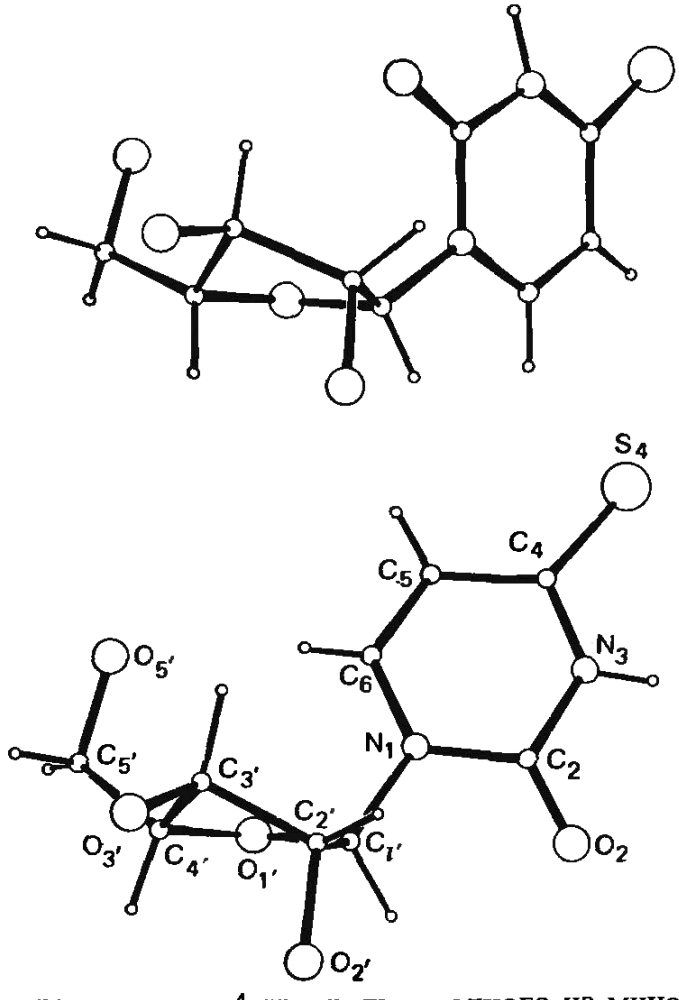


Рис. 4.14. Структура молекулы 4-тиоуридина, одного из минорных нуклеозидов, встречающихся в тРНК [259]. 4-тиоуридин из водного раствора кристаллизуется в *син*-конформации (*вверху*), а из масляной кислоты – в обычной *анти*-конформации (*внизу*). В *анти*-ориентации конформация сахара представляет собой классический $C_{3'}$-*эндо*-конверт ^3E, а в случае *син*-ориентации сахар находится в $C_{3'}$-*эндо*-, $C_{4'}$-*экзо*-твист-конформации $^3T_4$. В *син*-конформации расстояние $O_{5'}\cdots O_2$ слишком велико ($> 3{,}5$ Å), чтобы могла образоваться внутримолекулярная водородная связь. Атомы Н гидроксильных групп на рисунке не изображены.

мации включается гидратационная вода, которая стабилизирует упаковку молекул посредством образования водородных связей. В воде, однако, 4-тиоуридин находится в *анти*-конформации [260–262]. Этот пример показывает, с какой осторожностью следует делать выводы о конформации гибкой молекулы, когда для нее известна лишь одна кристаллическая структура.

В пиримидиновых нуклеозидах *анти*-конформация основания тесно связана с конформацией сахара [263]. Значения торсионного угла χ относительно связи $C_{1'}$—N для $C_{2'}$- и $C_{3'}$-*эндо*-конформаций сахара лежат в следующих интервалах:

$$-180^\circ \leqslant \chi \leqslant -138^\circ \text{ для } C_{3'}\text{-эндо}$$
$$-144^\circ \leqslant \chi \leqslant -115^\circ \text{ для } C_{2'}\text{-эндо}$$

По-видимому, эта закономерность отражает особенности стерических ограничений в двух данных структурах. Так, в $C_{3'}$-*эндо*-конформации атом водорода при $C_{3'}$-атоме ориентирован аксиально (табл. 4.2) и взаимодействует с группой C_6—H основания, поэтому угол χ лежит в окрестности 180°. В $C_{2'}$-*эндо*-конформации атом водорода ориентирован экваториально и основание может поворачиваться в пределах области *-ак* до тех пор, пока кетогруппа O_2 не начнет взаимодействовать с атомом $H_{1'}$. В случае пуринов такие взаимодействия между сахаром и основанием слабее, поскольку геометрия имидазольного кольца не позволяет атомам C_8—H и N_3 вступить в тесный контакт с атомами сахара. В этом случае основание поворачивается в пределах области *-ск*. Такая закономерность в распределении интервалов торсионных углов наблюдается в додекануклеотиде d(CGCGAATTCGCG), что позволило сформулировать антикорреляционный принцип (разд. 11.2).

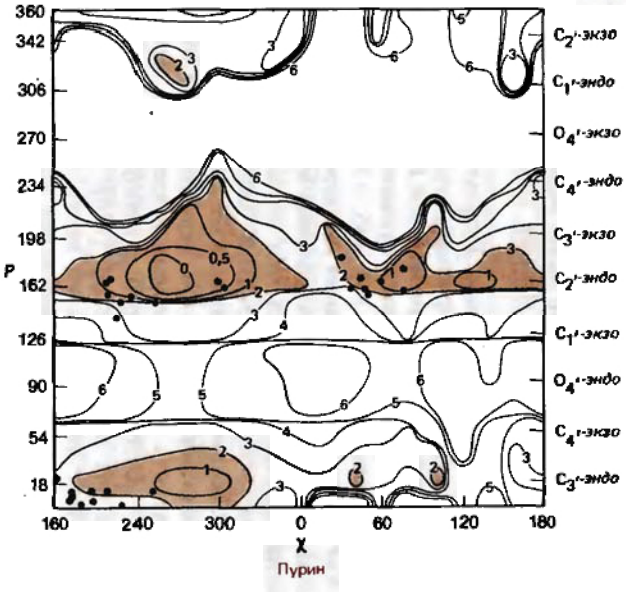
Существует еще одна структурная корреляция: между длиной гликозидной связи $C_{1'}$—N и торсионным углом χ. Для пиримидиновых нуклеозидов [265, 266] длина связи $C_{1'}$—N максимальна (1,52 Å) при угле χ, примерно равном 180°, и по мере его приближения к $-140°$ уменьшается до 1,48 Å практически линейно. Этот факт указывает на то, что (по крайней мере в пиримидиновых нуклеозидах) атомы водорода при $C_{3'}$ и $C_{2'}$ не являются единственной помехой вращению [34]. Определенную роль играет также атом $O_{4'}$; увеличение длины связи $C_{1'}$—N обусловлено взаимодействием $O_{4'}$ с атомом водорода, связанным с C_6.

В пуринах стерические ограничения менее существенны, чем в пиримидинах, длина гликозидной связи менее вариабельна и составляет примерно 1,46 Å. Это значительно меньше средней длины данной связи (1,49 Å) в пиримидинах [256].

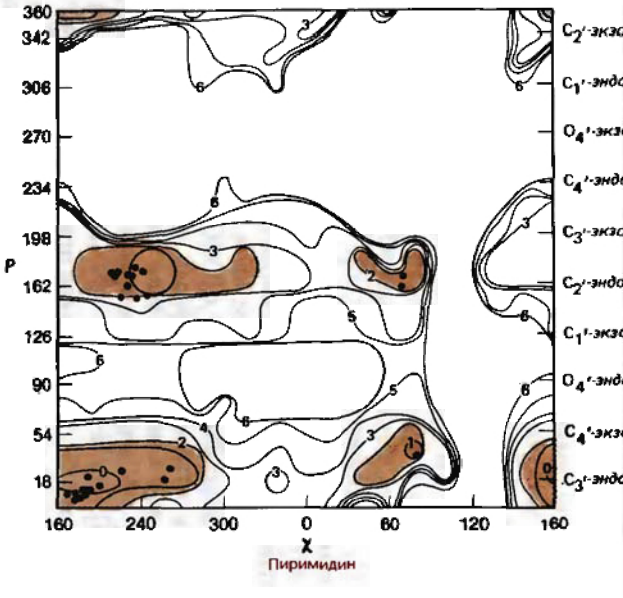
Равновесие *син* ⇄ *анти* в растворе. Результаты кристаллографического исследования *син*/*анти*-конформаций нуклеозидов подтверждаются огромным количеством данных по ЯМР- и КД-спектроскопии. Все эти данные свидетельствуют о наличии в нуклеозидах быстрого взаимопревращения *син* ⇄ *анти* [126, 141, 144, 145, 174, 175, 178, 219, 261, 262, 267–275]. Как показали исследования методом ультразвуковой релаксации, релаксационные процессы в пуриновых нуклеозидах осуществляются за времена порядка наносекунд, что, по-видимому, связано с вращением основания вокруг гликозидной связи [276, 277]. Исследуя зависимость релаксационных процессов от температуры, можно определить термодинамические параметры перехода *син* ⇄ *анти*. Конформационная подвижность пиримидиновых нуклеозидов более ограничена, чем пуриновых, поэтому никакого поглощения в интервале частот 10–250 МГц для них не наблюдается [276].

Данные по ЯМР тоже указывают на то, что между типом основания, конформацией сахара и ориентацией основания относительно сахарного кольца существует корреляция. В случае пуриновых нуклеозидов *син*- и *анти*-конформеры встречаются с одинаковой вероятностью, пиримидиновые же нуклеозиды чаще находятся в *анти*-конформации.

Рибонуклеотиды



Пурин



Пиримидин

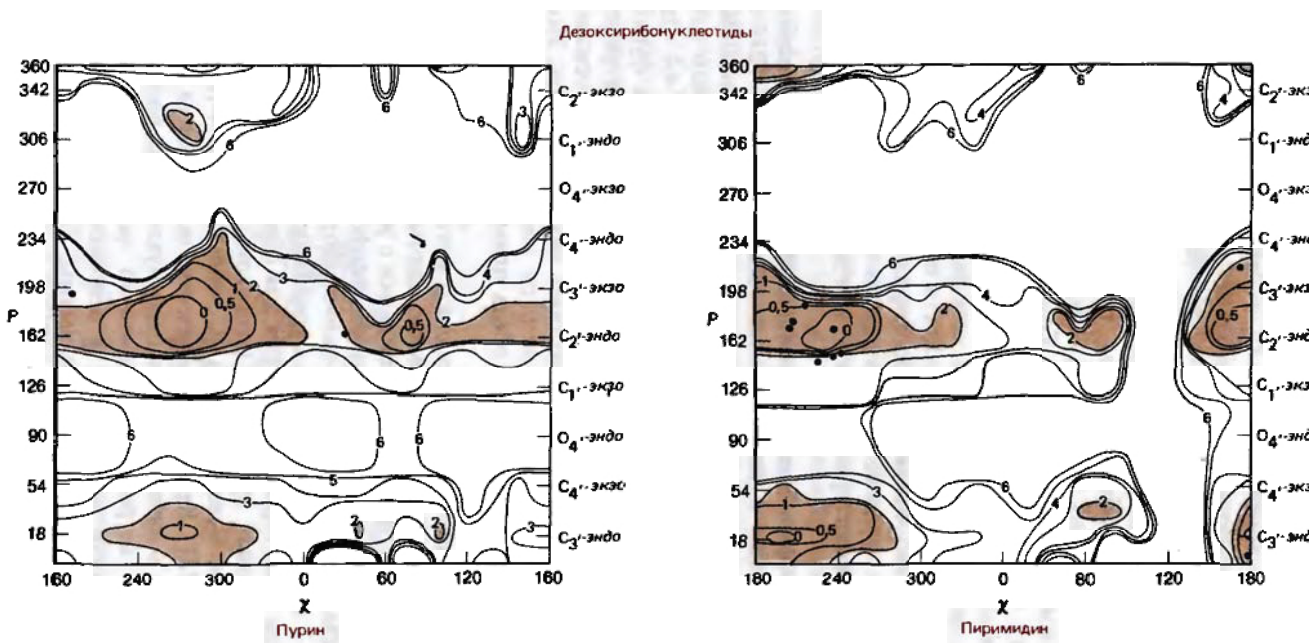


Рис. 4.15. Конформационные энергетические карты, полученные методом КВВМО [211]. Торсионный угол χ относительно гли козидной связи в рибо- и дезоксирибонуклеозидах коррелирует с конформацией сахара, которая связана с величиной фазовог угла псевдовращения *P*. Числа на изолиниях представляют собой разность (в ккал·моль$^{-1}$) между соответствующим значение энергии и глобальным минимумом, принимаемым за нуль. Цветом выделены области разрешенных конформаций, ограниченны изолинией 2. Точки соответствуют значениям энергии, полученным из кристаллографических данных.

Обычно в рибонуклеозидах сахар в $C_{3'}$-*эндо*(N)-конформации связан с основанием в *анти*-ориентации, тогда как дезоксирибонуклеозиды в *анти*-конформации предпочитают $C_{2'}$-*эндо*(S)-конформацию сахара. В пуриновых нуклеозидах *син*-конформация сочетается с $C_{2'}$-*эндо*-конформацией сахара, а если *син*-конформацию пиримидиновых нуклеозидов стабилизировать посредством метилирования C_6-углерода, то для обоих типов сахара будет наблюдаться возвращение к $C_{3'}$-*эндо*-конформации [278–280]. Если нуклеозиды фосфорилированы по атому $O_{5'}$, то, как указывалось в разд. 4.9, существенно возрастает взаимодействие этого атома с основанием и соответственно увеличивается доля нуклеозидов, у которых сахар находится в $C_{3'}$-*эндо*-конформации, а углы χ и γ лежат в областях *анти* и $+sc$ соответственно. Очевидно, однако, что фосфорилирование по атомам $O_{2'}$ и $O_{3'}$ гидроксильных групп не должно сильно влиять на конформацию нуклеотида из-за большого расстояния между этими атомами и основанием [281, 282].

Энергетические профили для *син*- и *анти*-конформеров рассчитывались как классическими, так и квантово-химическими методами [211–215, 283–286]. Согласно результатам большинства этих расчетов, основание вращается вокруг гликозидной связи $C_{1'}$—N, а сахарное кольцо сохраняет при этом одну из конформаций, представленных на рис. 4.4. Однако, как мы видели в разд. 4.2, конформационная подвижность фуранозного кольца довольно велика; и кристаллографические, и спектрофотометрические данные указывают на то, что между вращением основания и конформацией сахарного кольца существует внутренняя связь. Исследованию зависимости торсионного угла γ от конформации сахарного кольца посвящены две работы; в них обеих применялся принцип псевдовращения [211, 212].

В одной из этих работ, где применялись методы квантовой химии (КВВМО), были получены энергетические карты, представленные на рис. 4.15 [211]. Эти карты хорошо согласуются с экспериментом: из них следует, что в пуриновых нуклеозидах *син*-конформация сочетается с $C_{2'}$-*эндо*-конформацией сахара, а $C_{3'}$-*эндо*-конформации соответствует бóльшая (на 1–2 ккал) энергия. В *анти*-пуриновых нуклеозидах обе конформации сахара равновероятны. Энергия для обеих конформаций сахара в *син*-пиримидиновых нуклеозидах одинакова; именно такая ситуация наблюдается для 6-метилуридина ($C_{2'}$-*эндо* [42]) и 4-тиоуридина ($C_{3'}$-*эндо*, $C_{4'}$-*экзо* [258]). Кристаллографические исследования нуклеозидов показывают, что в *анти*-пиримидиновых нуклеозидах конформации $C_{2'}$-*эндо* и $C_{3'}$-*эндо* встречаются одинаково часто, тогда как для дезоксирибонуклеозидов наблюдается в основном $C_{2'}$-*эндо*-конформация. В то же время энергетические минимумы, полученные расчетным путем, одинаковы для этих конформаций.

Интересно, что переход $C_{2'}$-*эндо* $\rightleftarrows$ $C_{3'}$-*эндо* осуществляется через промежуточную конформацию $O_{4'}$-*эндо* (рис. 4.15), причем энергетический барьер составляет примерно 6 ккал·моль$^{-1}$. Эта величина замет-

но выше, чем рассчитанная методом силового поля и с учетом геометрии релаксированного сахара (рис. 4.7). Энергетические карты для пиримидиновых нуклеозидов показывают, что в *анти*-области при $C_{3'}$-*эндо*-конформации сахара угол χ близок к 180°, а при $C_{2'}$-*эндо*-конформации – к $-120°$ ($-ак$); об этом мы уже говорили выше.

4.6. *ВЫСОКАЯ-АНТИ* ($-СК$)-КОНФОРМАЦИЯ

Энергетические карты, приведенные на рис. 4.15, показывают, что диапазон допустимых значений угла χ для пуриновых нуклеозидов в *анти*-конформации простирается от 180 до примерно $-60°$, т. е. от *анти* (*ап*)- до *высокой-анти* ($-ск$)-области. Для пиримидиновых нуклеозидов этот диапазон ограничен «классической» *анти*-областью. Это различие обусловлено стерическими ограничениями, налагаемыми на углы вращения вблизи (или даже ниже) $-120°$ из-за взаимодействия между атомом водорода C_6—H-группы пиримидина или C_8—H-группы пурина с атомами водорода сахара. В синтетических аза-нуклеозидах и в формицине указанные группы заменены азотом, стерические ограничения снимаются и нуклеозиды могут находиться в *высокой-анти*-конформации (рис. 4.16). Подобные конформации, по-видимому, стабилизируются силами электростатического отталкивания между атомом N_6 пиримидина или атомом N_8 пурина и $O_{5'}$-гидроксильной группой [287–289].

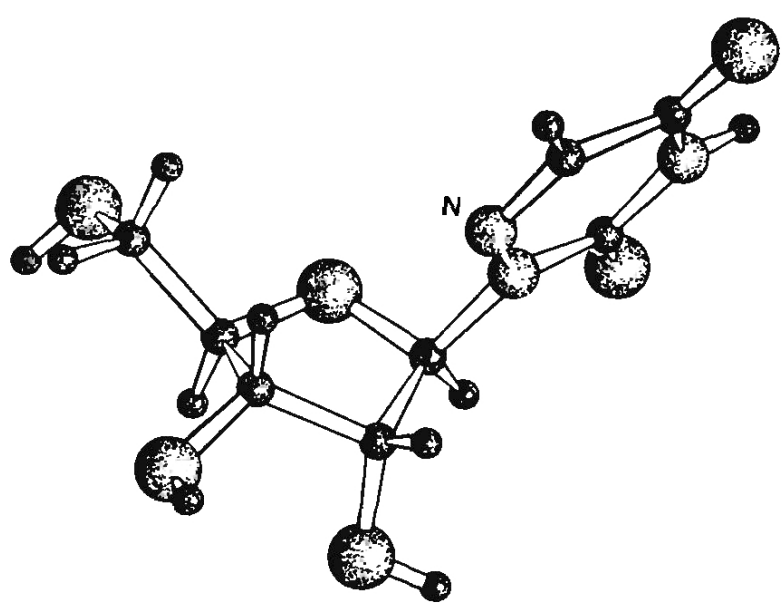


Рис. 4.16. 6-азауридин в *высокой-анти* ($-ск$)-конформации [287]. Обратите внимание на ориентацию связей $C_{1'}$—$C_{2'}$ и N_1—N_6, при которой образуется почти заслоненная конформация. В обычных пиримидиновых нуклеозидах вместо атома N_6 присутствует группа C_6—H, которая контактирует с атомом $H_{2'}$. Из-за электростатического отталкивания $N_6 \cdots O_{5'}$ торсионный угол γ относительно связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ лежит в области *ап* (ср. с рис. 2.10, *А*).

4.7. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ *СИН-* И *АНТИ*-КОНФОРМЕРАМИ. ИСКЛЮЧИТЕЛЬНОЕ ПОЛОЖЕНИЕ ГУАНОЗИНА

Соотношение между *син-* и *анти*-конформерами нуклеозидов и нуклеотидов изменяется в результате химической модификации сахара и основания. Особый интерес в этом отношении представляют нуклеозиды, замещенные по атомам C_6 пиримидина и C_8 пурина: при подходящем выборе заместителей электронная структура нуклеозида изменится незначительно, и в то же время эти заместители смогут прямо взаимодействовать с рибозой и смещать равновесие *син* $\rightleftarrows$ *анти* в сторону *син*.

Кристаллографический и спектроскопический анализы показали, что 6-метилуридин [42, 261, 275, 278–280], 8-метиладенозин-3′-фосфат [290] и галогензамещенные по восьмому положению пуриновые нуклеозиды, такие, как 8-бромаденозин или 8-бромгуанозин [41, 271, 291–294], находятся в основном в *син*-конформации как в кристаллическом состоянии, так и в растворе (рис. 2.10, *А*). Однако, когда 8-бромаденозин присоединяется к алкогольдегидрогеназе из печени лошади по месту связывания NAD^+, он, как и NAD^+, принимает *анти*-конформацию [295]. Таким образом, присоединение галогена или н-бутиламиногруппы к C_8-атому пурина [296] (рис. 4.17) мешает вращению вокруг гликозидной связи.

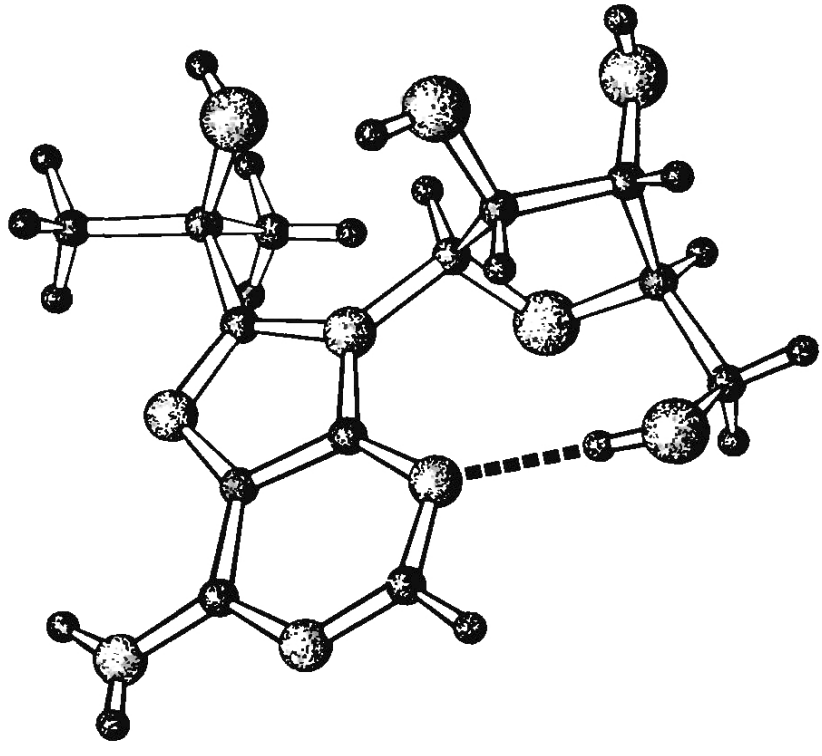


Рис. 4.17. 9-β-D-арабинозил-8-*н*-бутиламиноаденин – нуклеозид с объемным заместителем при атоме C_8; он кристаллизуется в *анти*-конформации [296]. Как показывают исследования методом ЯМР [393] и квантово-химические расчеты [394], *анти*-конформация этой молекулы, а также 8-аминозамещенных аденозинов обычно стабилизируется путем образования внутримолекулярной водородной связи $N_8H\cdots O_{5'}$. 8-замещенные аденозины, в которых такая связь отсутствует, находятся предпочтительно в *син*-конформации (см. рис. 2.10, *А*).

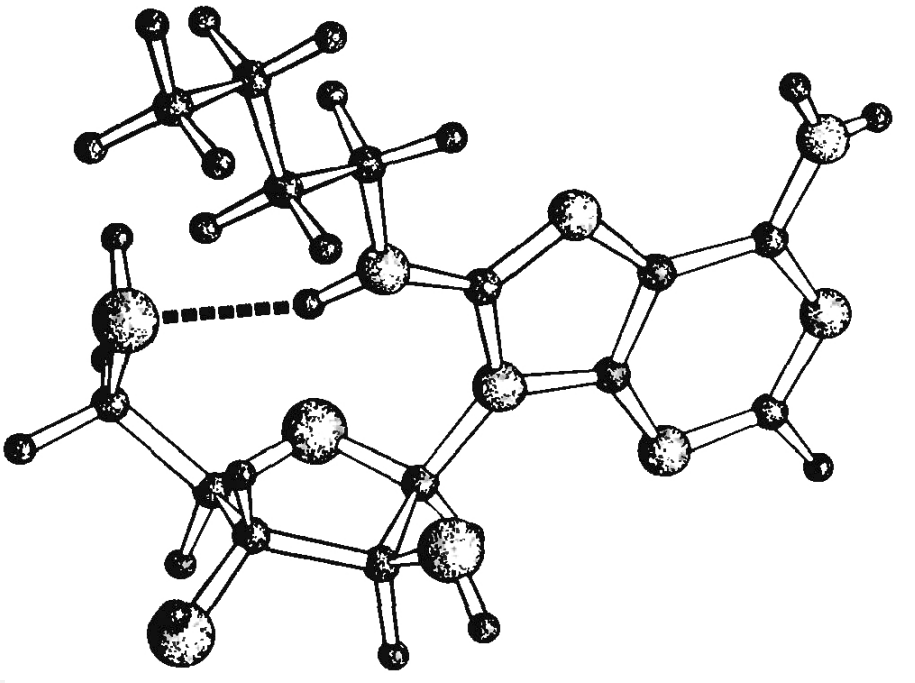


Рис. 4.18. Заместитель при атоме C_8 в 8-гидроксиизопропиладенозине настолько велик, что нуклеозид находится только в *син*-конформации [298]. Пунктиром обозначена внутримолекулярная водородная связь $O_{5'}$—H···N_3.

Для полной фиксации *син*-конформации были использованы более объемные заместители, такие как *трет*-бутил (рис. 4.18) [297, 298].

Еще одним фактором, стабилизирующим *син*-конформеры нуклеозидов, является наличие свободной гидроксильной группы $O_{5'}H$, которая может образовывать водородные связи $O_{5'}H\cdots N_3$ (пурин) и $O_{5'}H\cdots O_2$ (пиримидин) (см. рис. 2.10, *А*). Такие связи были обнаружены во многих кристаллах *син*-конформеров. Есть, однако, и другие данные [42, 258], указывающие на то, что сближение атомов N_3 пурина и O_2 пиримидина с атомом $O_{5'}$ еще недостаточно для образования водородных связей. *Анти*-ориентация основания, в особенности в 5′-нуклеотидах (разд. 4.9), стабилизируется водородной связью другого типа: C—H···$O_{5'}$.

Гуанозиновые нуклеозиды и нуклеотиды предпочитают находиться в *син*-ориентации. Ориентация относительно гликозидной связи зависит не только от стереохимических и энергетических факторов, но и от природы основания. Так, 5′-гуаниловая кислота, по-видимому, отличается от всех других нуклеотидов [299]. Подобно своему дезоксианалогу, она кристаллизуется в *син*-форме не только в виде мономера, но и в составе *тетра-* и *гекса*-нуклеотидов с чередующейся последовательностью: d(CpGpCpG) [302] и d(CpGpCpGpCpG) [303], а также в составе соответствующих полимеров [304], образующих левую спираль (гл. 12). Исследования методом кругового дихроизма (в случае GpU [305]) и ЯМР [306] предполагают, что в растворе гуаниловая кислота также предпочитает *син*-конформацию. К такому же выводу приводят классические расчеты потенциальной энергии [307, 308], расширенный метод Хюккеля [309] и другие методы квантовой химии [310]. Все эти исследования

показывают, что *син*-конформация стабилизируется благодаря ван-дер-ваальсовым взаимодействиям и электростатическому притяжению между аминогруппой во 2-м положении и 5′-фосфатной группой, которое обусловлено делокализацией неподеленной пары электронов $—NH_2$-группы и сопряжением ее с разрыхляющей $\pi^*_{C_2—N_3}$-орбиталью. Такой же эффект, только выраженный в меньшей степени, должен был бы проявиться и в случаях инозин-5′-фосфата, однако изучение кристаллической структуры этого соединения, проведенное независимо тремя группами исследователей, показало, что оно находится только в *анти*-конформации [310–312].

4.8. ОРИЕНТАЦИЯ ОТНОСИТЕЛЬНО СВЯЗИ $C_{4'}—C_{5'}$

Вращение вокруг экзоциклической связи $C_{4'}—C_{5'}$ в нуклеотидах и нуклеиновых кислотах играет решающую роль в расположении 5′-фосфатной группы относительно сахара и основания. Этот вопрос был детально исследован кристаллографическими [35, 166–169], спектроскопическими [130, 144, 173–175, 218–222, 313] и теоретическими методами [212–215, 283–286, 314–316]. В отличие от вращения вокруг гликозидной связи (угол χ), которое дает два семейства конформаций, вращение вокруг связи $C_{4'}—C_{5'}$ (угол γ), как и в случае этана, приводит к появлению трех классических заторможенных конформаций (см. рис. 2.11). Имеется, однако, и сходство между этими двумя типами вращения: и χ, и γ в *син*- и $+$*ск*-областях соответственно таковы, что основание и атом $O_{5'}$ располагаются над рибозой, а в *анти*- и $-$*ск*- или *ап*-областях они направлены от нее.

Распределение конформаций по интервалам $+$*ск*, $-$*ск* и *ап* торсионного угла γ зависит от конформации сахара и от типа основания, поэтому эти области заселены неравномерно. В кристаллах пуриновых нуклеозидов торсионный угол γ с одинаковой вероятностью находится в $+$*ск*- и *ап*-областях, при этом сахар может иметь как $C_{2'}$-, так и $C_{3'}$-*эндо*-конформацию. В $-$*ск*-области γ лежит очень редко, при этом сахар находится только в $C_{2'}$-*эндо*-конформации. В пиримидиновых нуклеозидах γ лежит в основном в $+$*ск*-области независимо от конформации сахара. Описано лишь несколько конформаций, в которых γ лежит в $-$*ск*- и *ап*-областях, при этом сахар всегда находится в $C_{2'}$-*эндо*-конформации (см. рис. 4.3).

С этими данными согласуются результаты исследования ряда замещенных нуклеозидов методом ЯМР; это позволяет предположить, что между конформацией сахара и вращением вокруг связи $C_{4'}—C_{5'}$ существует взаимосвязь. С помощью ЯМР нельзя различить $-$*ск*- и *ап*-конформеры (гл. 3), удается получить лишь суммарную заселенность обеих областей. Имеющиеся данные указывают на то, что преобладающей является $C_{2'}$-*эндо*-конформация, однако в конформерах с $C_{3'}$-*эндо*-конформацией сахара в основном наблюдается $+$*ск*-ориентация относительно связи $C_{4'}—C_{5'}$ [173, 313]. Замена основания группой

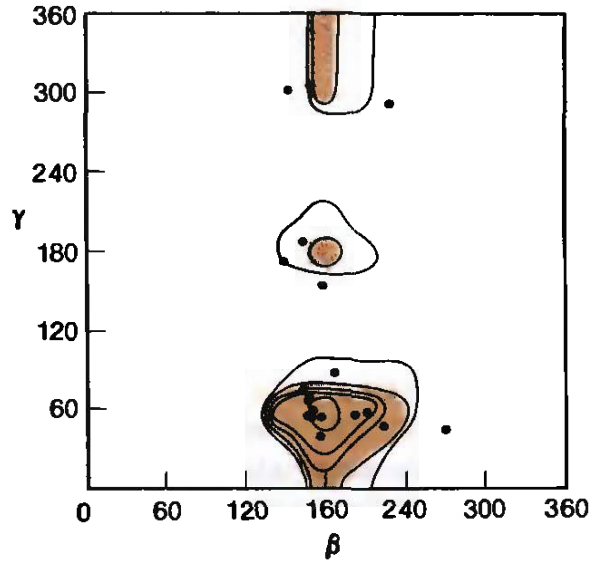


Рис. 4.19. Конформационная энергетическая карта для 5′-рибонуклеотидов, полученная методом КВВМО [315]. Стерически разрешенная область, ограниченная изолинией 2 ккал·моль$^{-1}$, выделена цветом. γ считается функцией торсионного угла β, а торсионные углы α, ε и ζ фиксированы и равны 300, 240 и 300° соответственно. Значения γ лежат в основном в $+$*ск*-области. Энергия конформаций, для которых γ лежат в областях *ап* и $-$*ск*, превышает 2 ккал·моль$^{-1}$. Заметим, что значения β ограничены областью *ап* (см. разд. 4.12). Точки соответствуют данным, полученным кристаллографическими методами.

—O—CH_3 приводит к заселению $+$*ск*- и *ап*-, но не $-$*ск*-области [233а]. Поскольку торсионный угол $O_{4'}$—$C_{4'}$—$C_{5'}$—$O_{5'}$ находится в пределах $+$*ск*- и $-$*ск*-областей, этот факт может служить наглядным примером наличия *гош*-эффекта, который будет описан в разд. 4.12. В модифицированном таким образом нуклеозиде, в отличие от обычных нуклеозидов, $+$*ск*-ориентация не является предпочтительной. Это позволяет предположить, что в последнем случае торсионный угол γ фиксируется в области $+$*ск* благодаря взаимодействию между основанием и атомом $O_{5'}$. Такие взаимодействия действительно наблюдались, были измерены и рассчитаны (разд. 4.9).

Расчеты, выполненные в рамках приближения потенциала жесткой сферы, и классические расчеты дают равномерное распределение всех конформеров, что противоречит эксперименту [283]. Ближе к экспериментальным данным находятся результаты расчетов методами квантовой химии (КВВМО), говорящие о том, что конформация, в которой угол γ лежит в $+$*ск*-области, выгоднее других, причем выигрыш в энергии составляет 1–2 ккал·моль$^{-1}$ (рис. 4.19) [315]. Корреляция между конформацией сахара, типом основания и преобладающим значением угла γ остается очевидной, даже если принять, что энергетический барьер составляет 0,5–1 ккал·моль$^{-1}$. Энергетические карты показывают, что для пиримидиновых нуклеозидов предпочтительными являются $+$*ск*-область и $C_{3'}$-*эндо*-конформация сахара; для пуриновых нуклеозидов $+$*ск*-область тоже предпочтительна, но в меньшей степени и независимо от конформации сахара.

4.9. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ОРИЕНТАЦИЮ ОТНОСИТЕЛЬНО СВЯЗИ $C_{4'}$—$C_{5'}$

Характер распределения по ориентациям относительно $C_{4'}$—$C_{5'}$-связи позволяет предположить, что стабилизация или дестабилизация + *ск*-конформеров зависит от типа основания. Согласно рентгеноструктурным данным, расстояние между C_6-атомом пиримидина и C_8-атомом пурина, с одной стороны, и атомом $O_{5'}$, с другой, обычно равно 3,1–3,3 Å, что существенно меньше значения 3,68 Å, которое получится, если к сумме вандерваальсовых радиусов атомов O и H прибавить длину связи C—H [317–319] (рис. 4.20).

В нуклеозидах, у которых основания находятся в *анти*-ориентации, + *ск*-конформеры частично стабилизируются водородной связью (основание) C—H···$O_{5'}$ и поэтому являются преобладающими [320–322]. Атом H, присоединенный к атому C, обычно не бывает донором при образовании водородной связи, однако именно на такую его роль указывают результаты экспериментов по дейтериевому обмену в пуриновых моно- и олигонуклеотидах, полученные методом ЯМР [268, 323, 324]. Эти результаты свидетельствуют о том, что атом C_8 частично депротониро-

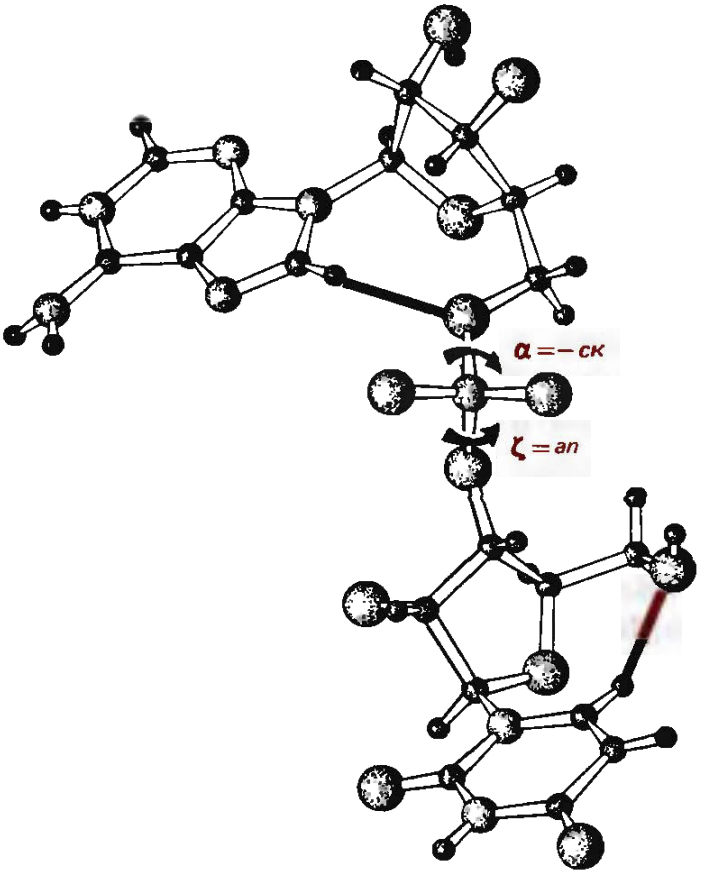


Рис. 4.20. Одновременная стабилизация конформаций относительно гликозидной (χ, *анти*) и $C_{4'}$—$C_{5'}$ (γ, + *ск*)-связей с помощью образования водородной связи (основание) C—H···$O_{5'}$ (цветные линии) в кристаллах UpA [317, 318].

ван и взаимодействует с атомом $O_{5'}$ фосфоэфирной группы. C_5- и C_6-атомы пиримидина тоже в значительной степени депротонированы [325].

Квантово-химический анализ (ППДП/2) взаимодействия $C—H\cdots O_{5'}$ показывает, что энергия стабилизации *+ск-* и *анти*-ориентаций относительно гликозидной и $C_{4'}—C_{5'}$-связей [326] в уридине, тимидине и 5-фторуридине составляет 1,84–2,27 ккал·моль$^{-1}$. Для аденозина энергия стабилизации, полученная расчетным путем, составляет лишь 1,11 ккал·моль$^{-1}$, но это не противоречит тому экспериментальному факту, что пуриновые нуклеозиды предпочитают *+ск*-конформацию в меньшей степени, чем их пиримидиновые аналоги. Анализ сил, стабилизирующих водородную связь $C—H\cdots O$, показывает, что атом $O_{5'}$ притягивается не только водородным атомом. Группы, связанные с атомами C_8 в пурине и C_6 в пиримидине, способны оттягивать электроны; тем самым создается дефицит электронов при атоме углерода, и он тоже приобретает способность притягивать атом $O_{5'}$.

Еще больший вклад вносят межмолекулярные силы во взаимодействие $C—H\cdots O_{5'}$ в случае 5′-нуклеотидов; фосфатная группа, связанная с атомом $O_{5'}$, делает его более электроотрицательным, чем в составе нуклеозида. Именно с этим связано понятие «жесткий нуклеотид», о котором пойдет речь в следующем разделе.

4.10. «ЖЕСТКИЙ НУКЛЕОТИД»

Систематический анализ кристаллических структур 5′-нуклеотидов, проведенный Сандаралингамом, показал, что обычно нуклеотиды менее гибки, чем нуклеозиды. Особенно это относится к вращению вокруг гликозидной и $C_{4'}—C_{5'}$-связей. В нуклеотидах торсионные углы γ и χ лежат в областях *+ск* и *анти* как в случае $C_{2'}$-, так и в случае $C_{3'}$-*эндо*-конформации сахара (S и N) [35, 58]. Концепция «жесткого нуклеотида» справедлива как для изолированных 5′-рибонуклеотидов, так и для олиго- и полинуклеотидов. Известно, однако, несколько исключений; так, аденозин-5′-фосфат в комплексе с терпиридил-платиной кристаллизуется в конформации, в которой угол γ находится в *ап*-области [327], а для ApA в комплексе с профлавином наблюдается *син*-ориентация основания и угол γ тоже лежит в области *ап* [328]. Среди дезоксирибонуклеотидов исключения составляют: мономеры 5′-дезоксирибоуридиловая и 5′-дезоксигуаниловая кислоты, которые кристаллизуются в конформации с углом γ в *ап*-области [301, 329, 330], тетра- и гексануклеотиды d(CpGpCpG) и d(CpGpCpGpCpG), образующие левые двойные спирали, в которых 5′-гуаниловая кислота находится в *син*-конформации с углом γ в *ап*-области [302, 303], а также poly d(GC), структура которого сходна со структурой соответствующего олигомера [304].

Спектроскопические данные не противоречат концепции «жесткого нуклеотида», если иметь в виду, что в растворе под «жестким нуклеотидом» понимается нуклеотид в наиболее предпочтительной конформации, которая тем не менее находится в равновесии с другими конформерами с углом γ, лежащим в областях *+ск* и *ап*, и углом χ, отвечающим *син*-конформации [31, 130, 218, 221, 268, 269, 272, 292, 330].

Сравнение данных, полученных методом ЯМР для аденозина, его 3′- и 5′-моно- и дифосфорилированных производных и для олигомера ApApAp [331], результаты квантово-химических расчетов [310, 332] и данные о кристаллической структуре тРНК [333] не оставляют никаких сомнений в справедливости концепции «жесткого нуклеотида». Однако термин «жесткий» не следует понимать буквально, поскольку существуют и исключения, особенно в случае дезоксирибонуклеотидов. Как мы увидим позже (гл. 18), для нуклеотидов, связанных с белками, эта концепция становится несостоятельной (гл. 18). Результаты исследования кристаллической структуры тРНК также указывают на то, что термин «жесткий» надо употреблять с осторожностью. Однако для изолированных моно-, олиго- и полинуклеотидов эта концепция оказывается очень ценной. Она полностью применима в случае правоспиральных агрегатов [334] и подтверждается результатами последних исследований, показавшими, что между торсионными углами существует корреляция (разд. 4.13).

4.11. ФОСФОМОНО-, ФОСФОДИЭФИРНЫЕ ГРУППЫ И ПИРОФОСФАТНАЯ СВЯЗЬ. ХАРАКТЕР СВЯЗИ И ГЕОМЕТРИЯ

При обсуждении электронной структуры фосфатной группы необходимо учитывать *d*-электроны. В отличие от атома азота и других элементов второго ряда периодической таблицы атом фосфора может использовать свободные *d*-орбитали для образования гибридных связей с лигандами. Четыре атома кислорода фосфатной группы связаны с атомом фосфора с помощью σ-связей, причем каждый из них находится в вершине тетраэдра (sp^3-гибридизация). Кроме того, в связывании участвуют пять *d*-орбиталей атома фосфора (рис. 4.21), из которых $3d_{x^2-y^2}$- и $3d_{z^2}$-орбитали вносят больший вклад в связывание, чем менее вытянутые $3d_{xy}$-, $3d_{yz}$- и $3d_{xz}$-орбитали [335–337].

Из-за наличия этих дополнительных π-связей длина связи P—O, рассчитанная по методу Шомейкера–Стивенсона, линейно уменьшается с увеличением порядка связи от величины 1,71 Å [338], отвечающей идеальной одинарной связи, до предельного значения 1,40 Å, которое соответствует длине «чистой» двойной связи [339] (рис. 4.22). Теоретически порядок каждой π-связи в фосфатной группе должен быть равен 1/2, поскольку вклад в образование π-связей с четырьмя атомами кислорода вносят как $3d_{x^2-y^2}$-, так и $3d_{z^2}$- орбитали:

$$(1/4)(d_{x^2-y^2}) + (1/4)(d_{z^2}) = (1/2)(d).$$

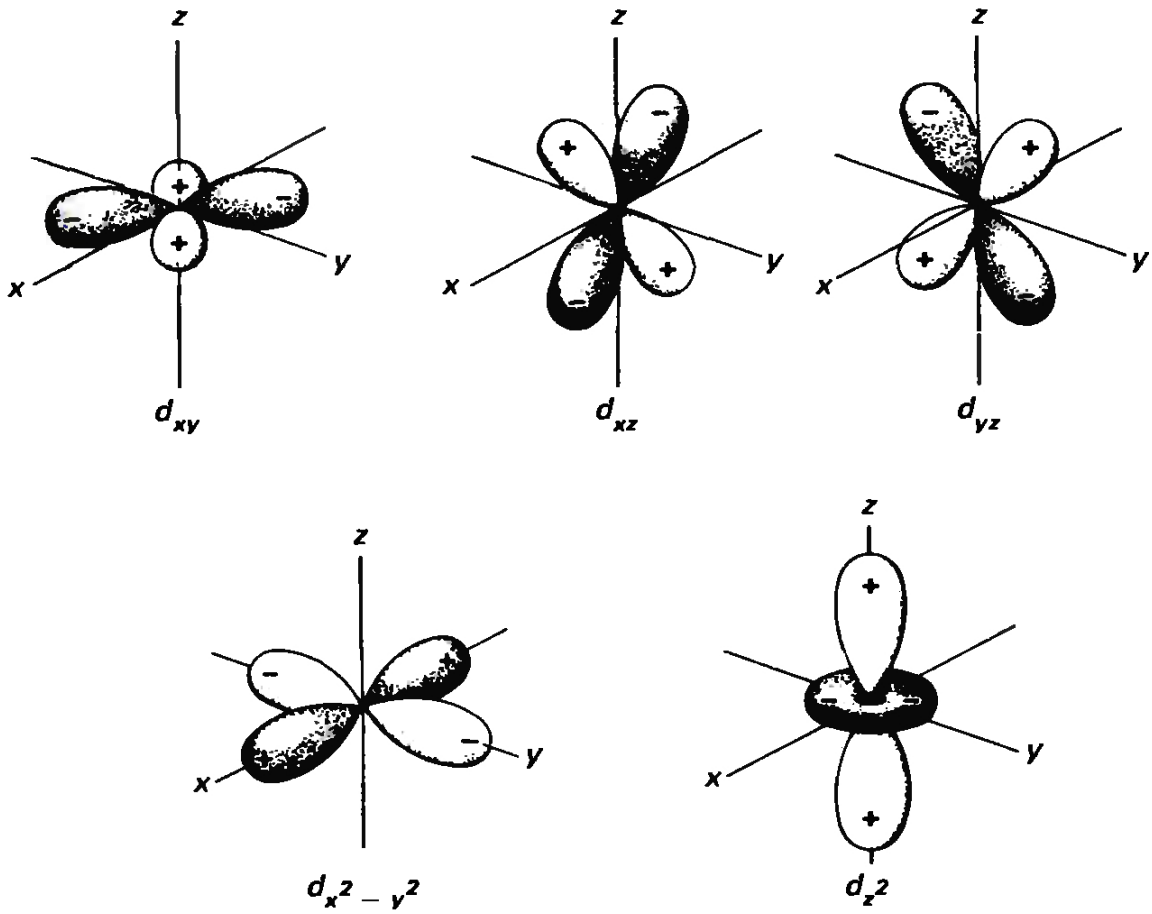


Рис. 4.21. *А.* Форма и пространственная ориентация пяти атомных *d*-орбиталей [400]. Три из них – d_{xy}, d_{xz} и d_{yz} – располагаются вдоль диагоналей между осями *x*, *y*, *z* декартовой системы координат (*вверху*), а орбитали $d_{x^2-y^2}$ и d_{z^2} вдоль самих осей (*внизу*). Вклад в образование связи P—O π-электронной системы имеет место только для орбиталей $3d_{x^2-y^2}$ и $3d_{z^2}$.

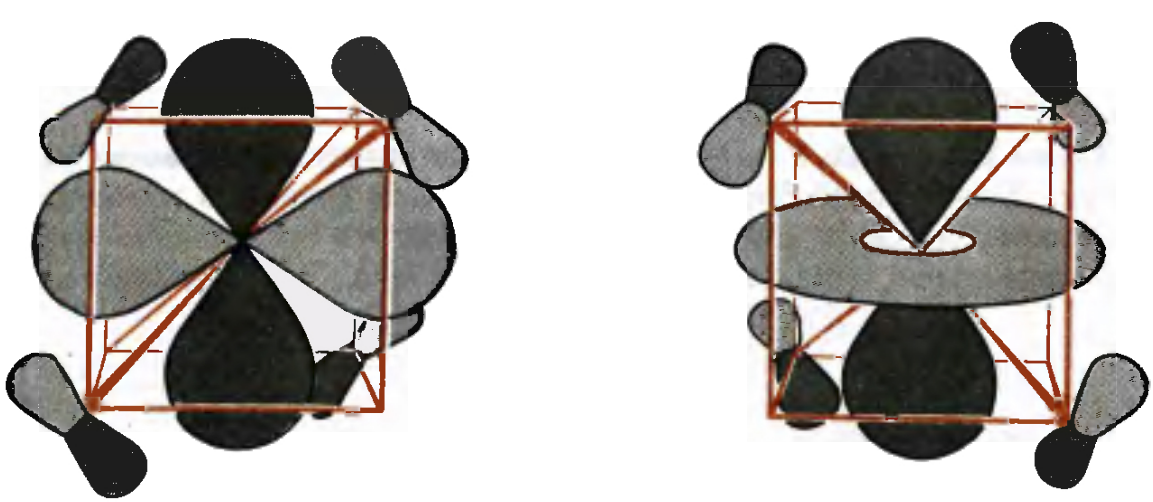


Рис. 4.21. *Б.* Схематическое изображение перекрывания 3*d*-орбиталей атома фосфора с 2*p*-орбиталями атомов кислорода в фосфатной группе [335]. *Слева* – перекрывание $3d_{x^2-y^2}$ и $2p\pi$; *справа* – $3d_{z^2}$ и $2p\pi'$.

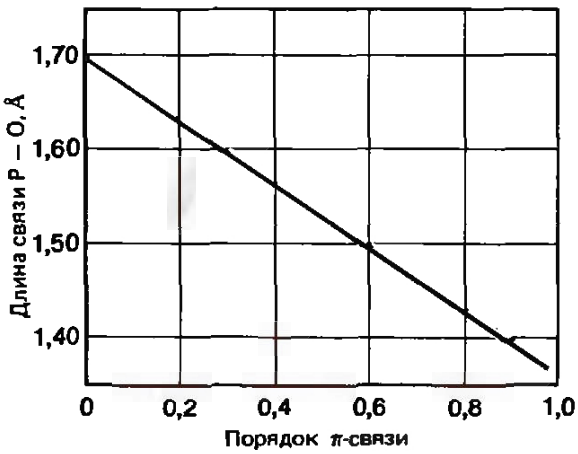


Рис. 4.22. Зависимость между длиной P—O-связи и порядком π-связи [395].

Следовательно, в идеальном случае длина P—O-связи в фосфатной группе будет равна 1,54 Å.

Сумма длин P—O-связей фосфатных групп неорганических солей, полифосфатов или органических моно-, ди- и триэфиров постоянна [335]. Средняя ее величина, полученная по 45 кристаллическим структурам, составляет [337]

$$d_{4\cdot(\mathrm{P—O})} = 6{,}184 \text{ Å},$$

откуда среднее значение длины связи P—O равно

$$d_{\mathrm{P—O}} = 1{,}546 \text{ Å}.$$

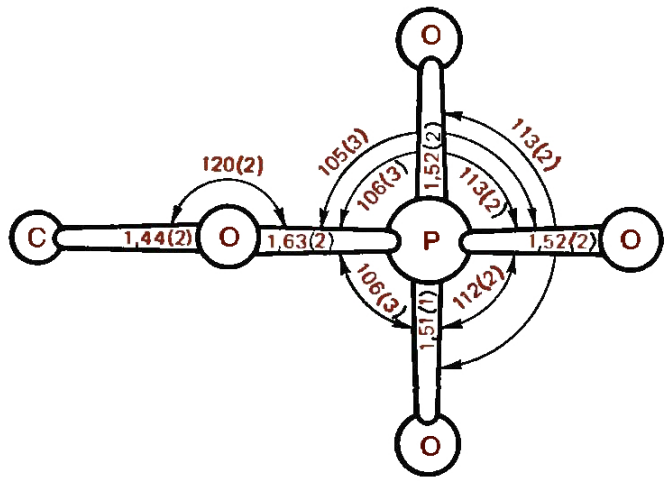
Как мы видим, это значение практически совпадает с длиной идеальной P—O-связи с порядком π-связи 1/2. Все сказанное выше свидетельствует о том, что в фосфатной группе между P—O-связями существует прочная взаимозависимость; это позволяет использовать формулы, описывающие зависимость силы связей от их длины [340–342]. Интересно, что полная энергия связей фосфатной группы равна

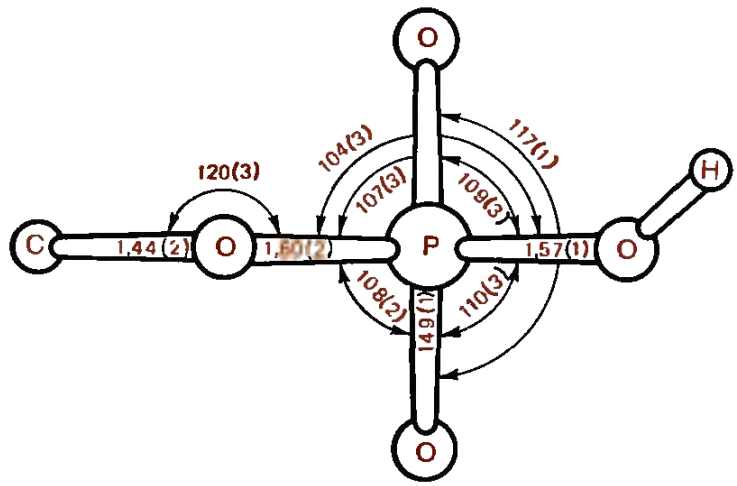
$$E_{\mathrm{PO_4}} = 395{,}8 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$$

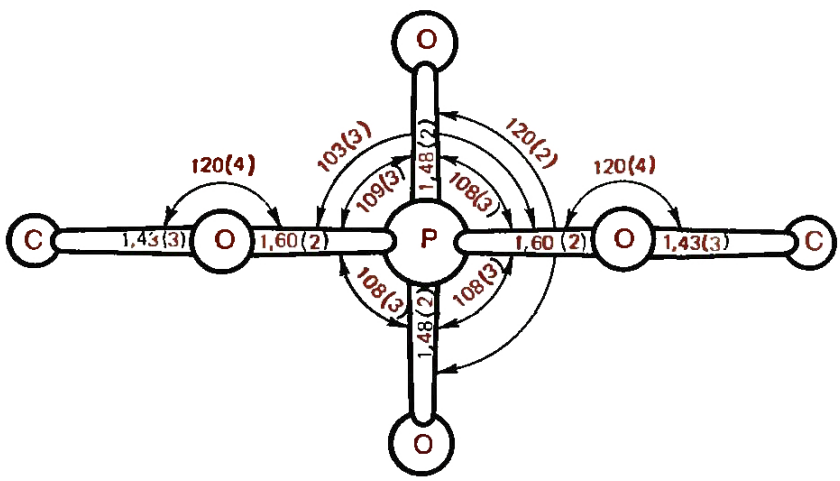
независимо от соединения, в состав которого входит эта фосфатная группа [337].

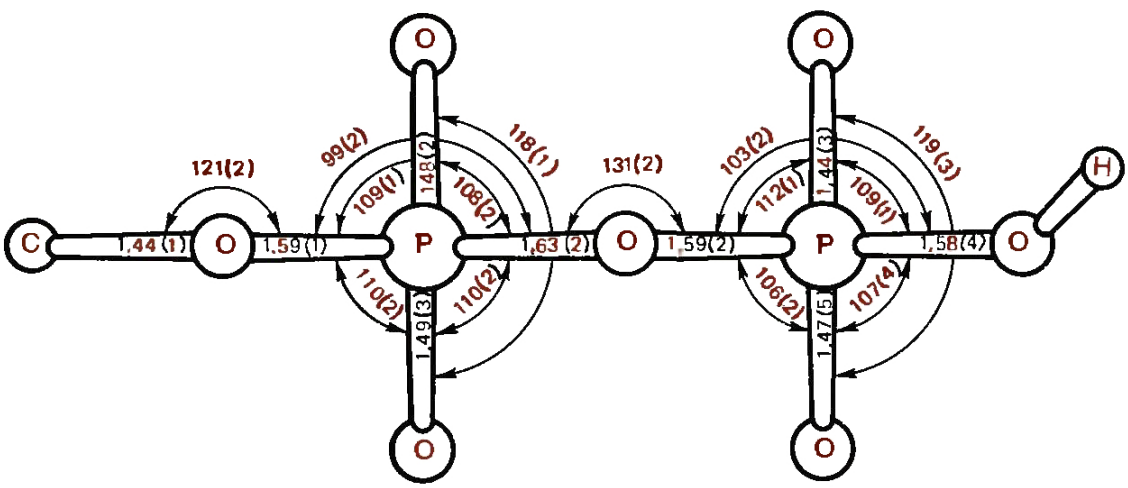
Длины различных P—O-связей в фосфодиэфирах существенно различаются. Длина фосфоэфирной связи фосфатной группы в моно- и диэфирах колеблется от 1,59 до 1,62 Å (рис. 4.23), что существенно меньше длины идеальной одинарной связи, равной 1,71 Å. Это указывает на то,

Рис. 4.23. Геометрия моно- и диэфиров фосфатной и пирофосфатной групп. Данные для моноэфиров взяты из работы [191], а для диэфиров и эфира пирофосфата – из работы [163]. В скобках приведено стандартное отклонение σ, которое рассчитывалось по формуле, приведенной в подписи к рис. 4.1. *N* в случае ди- и моноаниона моноэфира составляло 11 и 15 соответственно, в случае диэфира – 33, а в случае эфира пирофосфата – 4.


O
C
O
P
O
O
1,44(2)
1,63(2)
1,52(2)
1,51(1)
120(2)
105(3)
106(3)
113(2)
113(2)
106(3)
112(2)


O
C
O
P
O
H
O
1,44(2)
1,60(2)
1,57(1)
1,49(1)
120(3)
104(3)
107(3)
117(1)
109(3)
108(2)
110(3)


O
C
O
P
O
C
O
1,43(3)
1,60(2)
1,60(2)
1,43(3)
1,48(2)
1,48(2)
120(4)
103(3)
109(3)
120(2)
108(3)
120(4)
108(3)
108(3)


O
C
O
P
O
P
O
H
O
O
1,44(1)
1,59(1)
1,63(2)
1,59(2)
1,44(3)
1,58(4)
1,49(3)
1,47(5)
121(2)
99(2)
109(1)
118(1)
131(2)
103(2)
112(1)
119(3)
109(1)
110(2)
110(2)
106(2)
107(4)

что вклад π-связи составляет примерно 35%. Вследствие этого валентный угол при атоме кислорода P—O—R увеличивается до 118÷120°, т.е. в данном случае проявляется вклад sp^2-гибридизации. В изолированных протонированных фосфомоноэфирах длина P—OH-связи равна примерно 1,57 Å. Это меньше длины фосфоэфирной связи, но больше длин двух P—O-связей в группировке, несущей отрицательный заряд. Длины последних обычно различаются (1,46–1,56 Å) из-за разного окружения в кристаллах. Они гораздо больше длины двойной связи P=O, которая равна 1,40 Å. Если фосфомоноэфир находится в виде дикатиона, то три неэтерифицированные P—O-связи имеют одинаковую электронную структуру. В кристаллах длины этих связей практически одинаковы и равны 1,51 Å, что совпадает с длиной P—O-связи в фосфодиэфирных группах.

Валентный угол O—P—O зависит от заместителей кислорода. Валентные углы, в образовании которых участвуют фосфоэфирные связи, обычно лежат в диапазоне 105–109°, валентные углы O=P=O$^-$, где атомы кислорода заряжены, – в интервале 115–118°, углы HO—P—O$^-$ – между 105 и 114°, а углы HO—P—OC – между 100 и 108°. Такое распределение значений валентных углов обычно наблюдается в моно-, ди- и триэфирах. Разброс значений угла O—P—O (от 100 до 120°) указывает на то, что основным фактором, влияющим на величину валентного угла, является отталкивание между заряженными атомами кислорода в O=P=O$^-$, однако определенную роль играет и различие длин связей. Такие различия обусловлены в основном поляризацией связей из-за координационного связывания ионов металлов или образования водородных связей. Их существование вряд ли можно предсказать, и они имеют значение только при рассмотрении кристаллического состояния. В растворе различие между атомами кислорода, не принимающими участия в образовании эфирной связи, и протонированными атомами кислорода нивелируется из-за постоянной миграции ионов водорода и металлов, однако различия между атомами кислорода, принимающими участие в образовании эфирной связи, остаются такими же, какими они были в кристаллах.

Чем примечательны «богатые энергией» фосфаты? Структурные, квантово-химические и термодинамические данные. Пирофосфатную группу нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфатов называют «богатая энергией группа» [343]. Со структурной точки зрения, однако, атомное окружение в такой группе самое обычное и соответствует окружению двух связанных фосфатных групп. Длины пирофосфатных связей P—$O_{связ}$ и P—$O_{эфир}$ примерно одинаковы (рис. 4.23), а свободные P—O-связи, где атом кислорода несет отрицательный заряд, имеют ту же длину, что и в моно- и диэфирах, т.е. 1,50–155 Å, и близки к длине двойной связи.

Относительно длинные связи P—$O_{связ}$ образуют тупой угол P—O—P, равный ~130°. Благодаря этим геометрическим особенностям атомы P···P далеко отстоят друг от друга. Это приводит к практически беспрепятственному вращению вокруг пирофосфатной P—O-

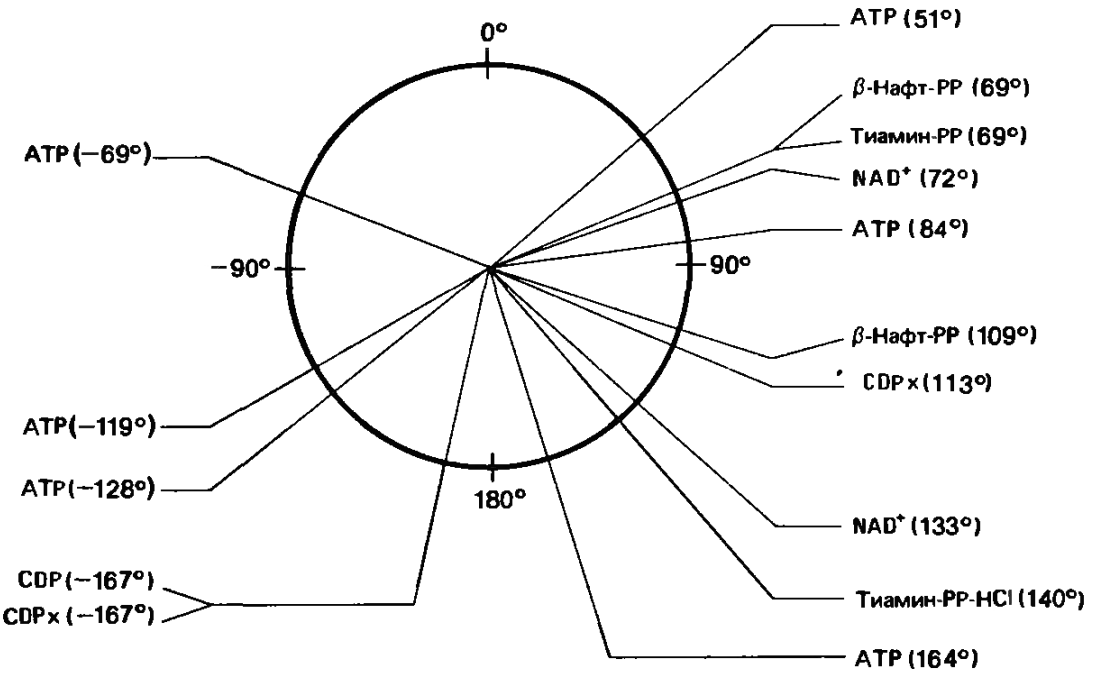


Рис. 4.24. Каждая радиальная линия конформационного круга соответствует значению торсионного угла O—P—O—P, взятому из кристаллографических данных для соединений, содержащих пирофосфатную группу [344]. Почти равномерное распределение торсионных углов по конформационному кругу указывает на то, что вращение вокруг связи P—$O_{связ}$ происходит практически свободно. (CDPx – CDP-холин; β-Нафт-PP – ди-β-нафтилпирофосфат; тиамин-PP – тиаминпирофосфат; тиамин-PP-HCl – тиаминпирофосфатгидрохлорид.)

связи, так что торсионные углы могут принимать такие значения, которые приводят даже к заслоненной конформации группы O—P—O—P (рис. 4.24).

Как показали квантово-химические расчеты с использованием расширенного метода Хюккеля [345], удлинение связи P—$O_{связ}$ и увеличение угла P—O—P обусловлены электростатическим отталкиванием между двумя отрицательно заряженными фосфатными группами и отсутствием резонанса. Вклад π-взаимодействия в образование связи P—$O_{связ}$ равен примерно 35%, что существенно меньше вклада π-взаимодействия в образование связи между атомом кислорода и концевой (заряженной) фосфатной группой, составляющего 42–48%. Эти исследования поставили под сомнение результаты более ранних квантово-химических расчетов (обзор [346]), согласно которым атом $O_{связ}$ в ATP должен быть заряжен положительно. На самом деле атомы фосфора несут небольшой положительный заряд, от $+0{,}17$ до $+0{,}34\,e$, атом $O_{связ}$ – небольшой отрицательный, от $-0{,}12$ до $-0{,}17\,e$, а концевые атомы кислорода – от $-0{,}63$ до $-0{,}70\,e$. Все эти данные, структурные и теоретические, указывают на то, что термин «богатая энергией» относится к характеру изменения свободной энергии при гидролизе вблизи pH 7 и не подразумевает запасания энергии в P—O-связи [345, 347].

При гидролизе ATP высвобождается неорганический фосфат или пирофосфат PP_i:

$$ATP + H_2O \rightleftarrows ADP + P_i + H^+,$$

$$ATP + H_2O \rightleftarrows AMP + PP_i + H^+.$$

Изменение стандартной свободной энергии ΔG° для обоих процессов составляет $-7{,}3$ ккал·моль$^{-1}$. Это значительно больше свободной энергии гидролиза эфирной связи в глицеро-3′-фосфате, которая составляет всего $-2{,}2$ ккал·моль$^{-1}$ [347, 348]:

$$HOCH_2CHOHCH_2OPO_3^- + H_2O \rightleftarrows HOCH_2CHOHCH_2OH + P_i.$$

Эффективность гидролиза ATP в сильной степени зависит от pH и концентрации Mg^{2+} [349, 350]. Все приведенные здесь величины соответствуют физиологическим значениям pH. Чем можно объяснить тот факт, что «потенциал переноса фосфата» в ATP выше, чем в глицеро-3′-фосфате? Во-первых, между фосфатными группами в пирофосфате существует отталкивание; во-вторых, продукты гидролиза ATP (ADP и P_i или AMP и PP_i) обладают более стабильной резонансной структурой, чем ATP, и, в-третьих, при гидролизе ATP уменьшается энергия сольватации.

4.12. ОРИЕНТАЦИЯ ОТНОСИТЕЛЬНО ЭФИРНЫХ СВЯЗЕЙ С—О И Р—О

Продолжая описание конформационных свойств нуклеотидов, остановимся на вращении вокруг эфирных связей С—О и Р—О. Как мы увидим, вращение вокруг связи С—О более заторможено, чем вокруг связи Р—О. Таким образом, вращение вокруг связи Р—О является основным фактором, влияющим на структуру полинуклеотидов.

Вращение вокруг связей С—О и Р—О заторможено. В кристаллах моно-, олиго- и полинуклеотидов угол β, описывающий вращение вокруг связи $C_{5'}$—$O_{5'}$ (см. рис. 2.3), лежит строго в *ап*-области; отклонения в сторону областей $+$*ак* или $-$*ак* наблюдаются очень редко. Такая же тенденция характерна и для угла ε, описывающего вращение вокруг связи $C_{3'}$—$O_{3'}$, однако значения угла концентрируются в этом случае вблизи 220°, т.е. не в *ап*-, а в $-$*ак*-области [166, 169, 351] (рис. 4.25).

Все эти наблюдения согласуются с данными ЯМР, которые были получены с учетом гетероядерных взаимодействий ^{31}P—^{1}H и ^{31}P—^{13}C [130–132, 143–147, 175, 176, 178, 218, 293, 352–354], а также химического сдвига для моно-, олиго- и полинуклеотидов [330, 354, 355]. Независимо от конформации сахарного кольца цепочка H_4'—C_4'—C_5'—O_5'—P находится в основном в вытянутом состоянии, что соответствует $+$*ск*-ориентации по углу γ и *ап*-ориентации по углу β. Это согласуется с результатами теоретических расчетов (рис. 4.19). Поскольку из данных

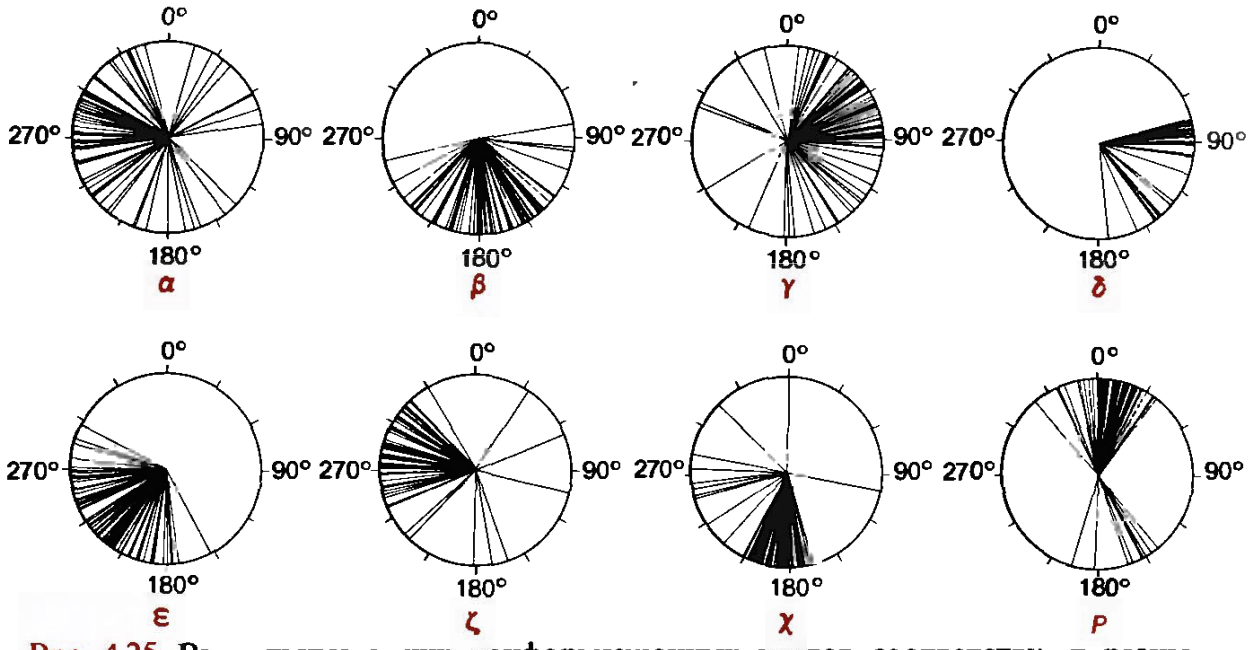


Рис. 4.25. Радиальные линии конформационных кругов соответствуют разным значениям торсионных углов и фазовых углов псевдовращения *P*, определенным по результатам кристаллографических исследований тРНК [396]. Отметим, что распределение по *P* бимодально, причем область $C_{3'}$-*эндо* заселена больше, чем область $C_{2'}$-*эндо*. Такое же распределение наблюдается и для торсионного угла δ относительно связи $C_{3'}$—$C_{4'}$: значения этого угла концентрируются вблизи $\delta \sim 90°$ ($C_{3'}$-*эндо*) и $\delta \sim 140°$ ($C_{2'}$-*эндо*). Торсионный угол α (P—$O_{5'}$) может меняться в более широких пределах, чем угол ζ (P—$O_{3'}$), который лежит в основном в $-$*ск*-области. Соседние торсионные углы β($O_{5'}$—$C_{5'}$) и ε($O_{3'}$—$C_{3'}$) находятся в основном в области *ап*, причем значения последнего немного смещены в сторону $-$*ап*/$-$*ак*. Наконец, угол γ в основном лежит в области $+$*ск*, а χ – в области *анти*; очень редко его можно обнаружить в *высокой-анти*($-$*ск*)-области, и только в одном случае он находился в области *син*.

по ^{31}P—^{1}H-взаимодействию можно оценить только одну константу взаимодействия – с атомом $H_{3'}$, мы не в состоянии однозначно определить торсионный угол ε относительно связи C_3'—O_3' [131]. Из сравнения данных ЯМР для разных динуклеозидфосфатов следует, что угол ε лежит в области *ап* или $-$*ск* в зависимости от того, в какой конформации находится сахар – C_3'-*эндо* или C_3'-*экзо* [353]. Более прямые методы анализа [143] с использованием данных о взаимодействии между атомами ^{31}P и $^{13}C_{2'}$, а также между ^{31}P и $^{13}C_{4'}$ показали, что значения торсионного угла ε лежат в ($-$)-полусфере цикла Клайна–Прелога (рис. 2.5) и что этот угол зависит от температуры и от типа основания. Главным фактором, определяющим структуру динуклеотидов и олигонуклеотидов более высокого порядка, является стэкинг между основаниями. Именно он влияет на величину угла ε.

Теоретические расчеты и согласующиеся с ними экспериментальные данные показывают, что строгие стерические ограничения, налагаемые взаимодействием между фосфатной группой и сахаром, сужают диапа-

Таблица 4.3. Значения торсионных углов для динуклеозидмонофосфатных фрагментов, полученные с помощью рентген структурного анализа кристаллов, и для двухцепочечных полинуклеотидов, полученные методом дифракции на волокна [383]

	δ(5′-конец) C_4·—C_3·	ε C_3·—O_3·	ζ O_3·—P	α P—O_5·	β O_5·—C_5·	γ C_5·—C_4·	δ(3′-конец) C_4·—C_3·
Группа I							
GpC	89	211	292	285	184	50	77
GpC(1)	79	222	294	291	181	47	79
GpC(2)	73	217	291	293	172	57	80
GpC(3)	96	224	290	286	167	63	74
GpC(4)	88	216	288	283	181	52	87
ApU(1)	84	213	293	288	177	57	74
ApU(2)	78	221	284	295	168	58	77
ApA^{+}*	82	223	283	297	160	53	81
ApT** (1)	90	213	294	293	176	68	134
ApT** (2)	83	212	284	302	171	64	139
Группа II							
Upa(2)	77	224	164	271	192	53	93
TpT**	157	252	163	288	187	41	158
TpA**	134	204	168	286	186	49	83

	Группа III							
Группа III	Upa(I)	86	206	81	82	203	55	85
	A^+pA^+*	81	207	76	92	186	56	79
	ApA***	147	219	61	66	186	46	77
	Группа IV							
Группа IV	A-РНК	95	202	294	294	186	49	95
	A-ДНК	83	178	313	285	208	45	83
	B-ДНК	156	155	264	314	214	36	156
	C-ДНК	141	211	212	315	143	48	141
	D-ДНК	156	141	260	298	208	69	156
	B-ДНК (левая)	140	200	212	282	165	40	140

[11] Конформация сахара определяется углом δ; интервал 74–95° соответствует C_3-*эндо*-конформации, а интервал 134–158° – C_2-*эндо*-конфо мации. *Все данные объединены в четыре группы. Торсионные углы α/ζ в группах I–III лежат в областях – ск/– ск, – ск/ап и + ск/+* а в полинуклеотидах, которые составляют группу IV, – в области *– ск/– ск*. Олигомеры, составляющие группы I и II, представляют соб фрагменты правых и левых спиралей, а группу III – фрагменты петель. В группу IV входят правые двойные спирали; параметры B-ДН (левой) получены не экспериментально, а теоретически (см. табл. 4.6). Числа в скобках указывают, что соответствующие данные получены д разных молекул, входящих в кристаллическую ячейку, либо в результате независимого рентгеноструктурного анализа.
* – фрагмент ApA^+pA^+ [160]; ** – сахар в дезоксиформе; *** – в виде Ca^{2+}-соли [383a].

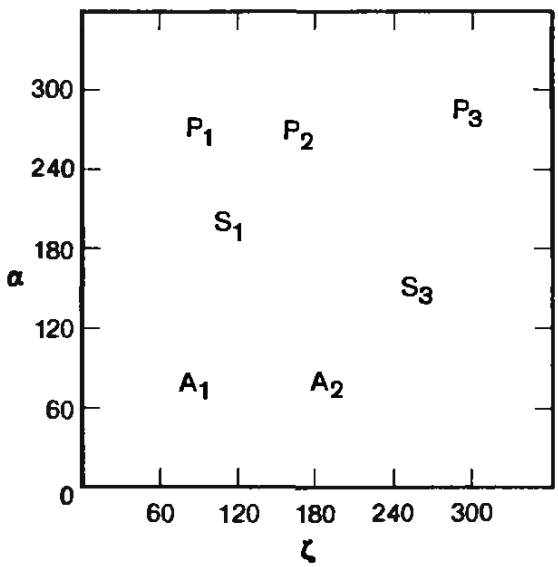


Рис. 4.26. Разрешенные конформации динуклеозидмонофосфатов, полученные классическим методом расчета потенциальной энергии. Символы P, S и A соответствуют параллельной, «скошенной» и антипараллельной ориентации сахарных остатков друг относительно друга; ориентация сахара задается вектором, проходящим через середину связи $C_{2'}$—$C_{3'}$ и атом $O_{4'}$. Для $C_{2'}$-*эндо*- и $C_{3'}$-*эндо*-конформаций сахара карты, по существу, одинаковы.

зон значений торсионных углов относительно связи С—О: β лежит в области *ап*, а ε—в области *ап* и *—ак* [60, 182, 314, 316, 356, 357].

***Гош*-, или аномерный эффект затрудняет вращение вокруг эфирной связи Р—О: значения угла α ограничены областью *—ск*, а угла ζ—областью *—ск* или *—ап*.** В 5′- и 3′-мононуклеотидах все три неэтерифицированные связи Р—О эквивалентны, поэтому характер вращения вокруг них—угол вращения α вокруг связи Р—$O_{5'}$ и угол вращения ζ вокруг связи Р—$O_{3'}$—соответствует классической схеме заторможенных конформаций этана. Однако в динуклеозидмонофосфатах и олигонуклеотидах более высокого порядка начинают сказываться стерические ограничения, которые сужают диапазон значений углов α и ζ.

Рентгеноструктурные исследования олигонуклеотидов и тРНК пока-

Таблица 4.4. Свойства одноцепочечных полинуклеотидов, полученные из данных для семи основных конформаций по углам α и ξ (см. рис. 4.26) [360]

	Ориентация сахаров[1)]	Способность оснований располагаться параллельно	α/ξ	Расположение оснований по отношению к оси полинуклеотида
P_1	Одинаковая	Да	270/90	От оси
P_2	»	»	270/170	»
P_3	»	»	280/290	К оси[2)]
S_1	«Скошенная»	Нет	200/110	От оси
S_3	»	»	160/250	»
A_1	Противоположная	Да	80/80	—
A_2	»	»	80/180	От оси

[1)] Ориентация определяется вектором $C_{3'}$—$C_{2'}$ → $O_{4'}$ (см. подпись к рис. 4.26). Термин «одинаковая» означает, что все сахарные кольца в полинуклеотиде параллельны друг другу.

[2)] Уотсон-криковская двойная спираль с параллельно расположенными основаниями, направленными к оси спирали, может образоваться только для P_3-конформации.

Таблица 4.5. Влияние образования фосфодиэфирной связи на конформацию нуклеотида[1)]

Связь (группа)	Мономер	Димер
$\chi C—N$ (гликозидная связь)	$> 225°$	$\rightarrow 180°$
Кольцо рибозы	C_2'-*эндо*/C_3'-*эндо* (65/35)	$C_{2'}$-*эндо*/$C_{3'}$-*эндо* (40/60)
$\gamma C_{4'}—C_{5'}$	+ *ск* (74%)	+ *ск* (85%)
$\beta C_{5'}—O_{5'}$	*ап* (75%)	*ап* (86%)
$\varepsilon C_{3'}—O_{3'}$	+ *ск* $\rightleftharpoons$ − *ск*	− *ск*
$\alpha P—O_{5'}$	Свободное вращение	(320 и 80°)
$\zeta P—O_{3'}$	+ *ск*, − *ск* и/или свободное вращение	(330 и 50°)

[1)] В таблице представлены те изменения, которые наблюдаются при переходе от pA и Ap к ApA. Заметим, что с образованием олигомера диапазон возможных конформаций сужается [131].

зали, что динуклеозидмонофосфаты могут находиться в двух конформациях: спиральной и неспиральной. Правая спираль образуется только тогда, когда углы α и ζ находятся в области − *ск*, вблизи 270° (группы I и IV в табл. 4.3). Для неспиральных конформаций существует несколько возможностей (рис. 4.26, табл. 4.3 и 4.4), которые соответствуют вытянутой, петлеобразной и левозакрученной конфигурациям. Такие структуры наблюдались в олигонуклеотидах UpA [317, 318], ApApA [160], pTpT [358] и d(pApTpApT) [359] (группы II и III в табл. 4.3). В тРНК (рис. 4.25) на угол ζ налагаются более жесткие ограничения, чем на угол α: последний может принимать значения, лежащие и в − *ап*-области, в то время как значения ζ лежат только в области − *ск*. Кроме того, заселенность областей + *ск* и *ап* для угла α больше, чем для ζ. Различие в свободе вращения вокруг двух эфирных связей P—O обусловлено тем, что группа $P—O_{5'}$ присоединена к первичному $C_{5'}$-атому, перемещение которого в пространстве менее ограничено, чем вторичного $C_{3'}$-атома, с которым связана группа $P—O_{3'}$.

Исследования олигонуклеотидов в растворе методом ЯМР привели, по существу, к тем же диапазонам значений углов α и ζ, что и кристаллографические методы. Поскольку − *ск*-ориентация относительно обеих P—O-связей в «жестком» нуклеотиде обязательно приводит к образованию правой спирали [360], между основаниями наблюдается стэкинг-взаимодействие, что в свою очередь стабилизирует спиральную структуру (гл. 6). Формирование спирали влияет на конформационную гибкость нуклеотидов, наблюдается тенденция к образованию только таких нуклеотидов, у которых сахар находится в $C_{3'}$-*эндо*-конформации, и чем длиннее становится цепь (от мономера к димеру, тримеру и т. д.), тем больше увеличивается «конформационная чистота» [130–132, 138–140, 143–148, 331] (табл. 4.5).

Теоретические расчеты показывают, что *гош*-эффект определяет ориентацию относительно P—O-связи. Установление ориентации относи-

тельно эфирной связи P—O является ключевым моментом в понимании структурной организации полинуклеотидов. Теоретические расчеты обычно начинают с рассмотрения простых модельных соединений, таких, как диметилфосфат [361–363] или этилметилфосфат [364]. На рис. 4.27 приведены энергетические карты, полученные в результате квантово-химических расчетов методами ab initio и расширенным методом Хюккеля. Карта для диметилфосфата (рис. 4.27, *А*) указывает на наличие у этой молекулы симметрии 2-го порядка; минимумы энергии соответствуют углам вращения C—O—P—$O_{эфир}$, лежащим в областях *ск*, *ск* и $-$*ск*, $-$*ск*. На карте нет никаких указаний на наличие третьего минимума в *ап*-области, поскольку «аномерный», или «*гош*»-эффект [365–368] благоприятствует $+$*ск*- либо $-$*ск*-ориентациям. *Гош*-эффект проявляется в системе C—O—P—$O_{эфир}$ с неподеленной парой электро-

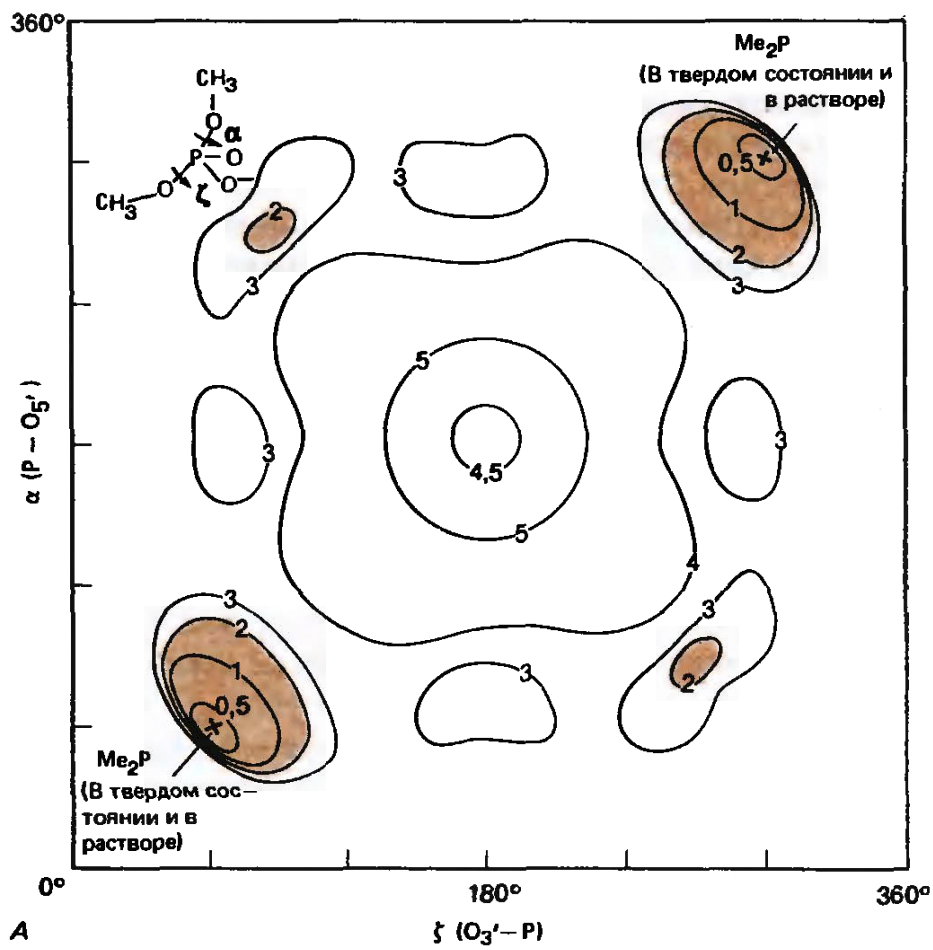
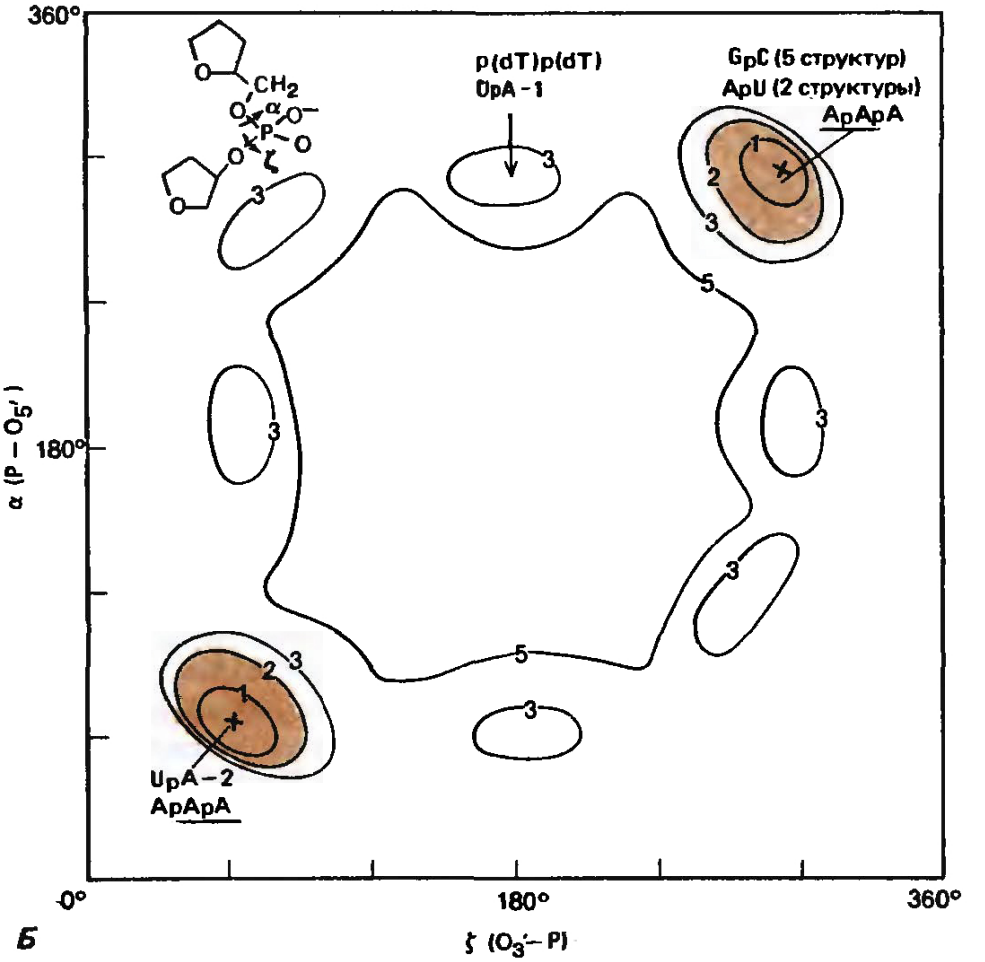
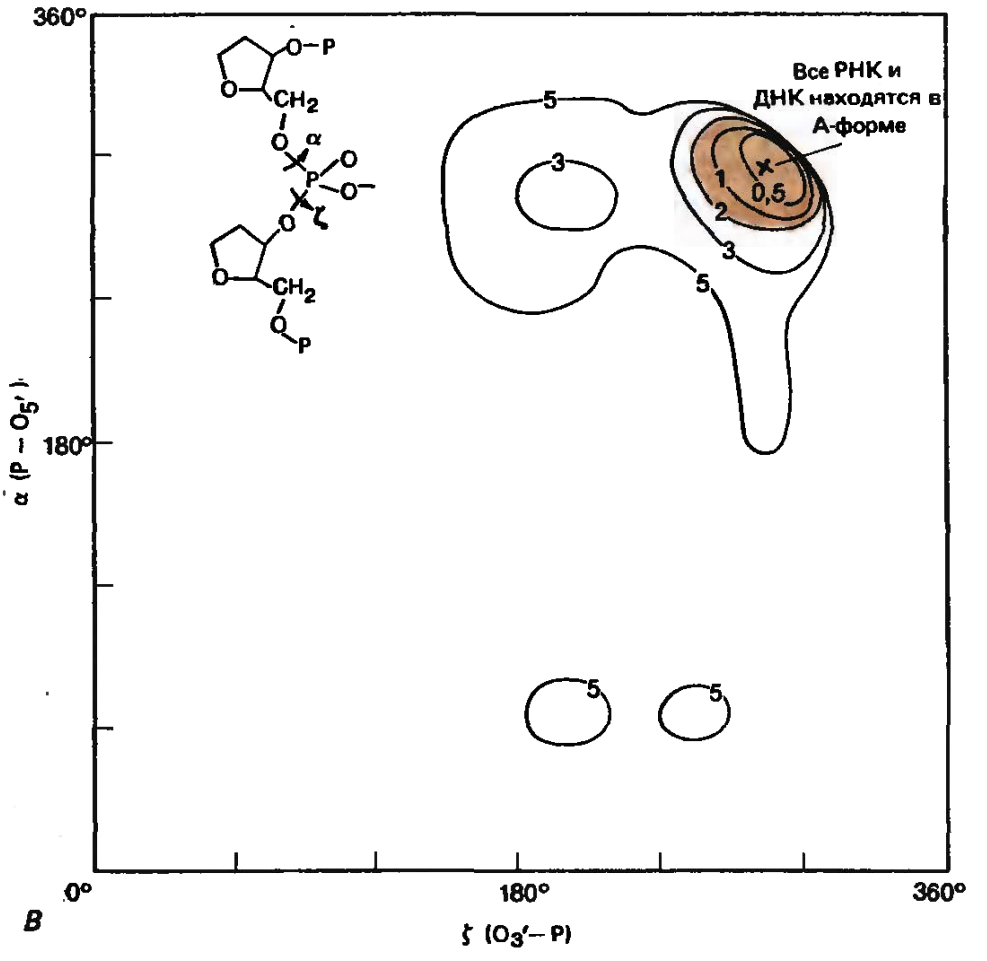


Рис. 4.27. Конформационные карты для вращения вокруг связи P—O, полученные классическими методами расчета потенциальной энергии с введением дополнительного члена, учитывающего *гош*-эффект (рис. 4.28). Приведены карты для диметилфосфата (*А*), дирибозофосфата (*Б*) и дирибозотрифосфата (*В*), в которых рибоза находится в $C_{3'}$-*эндо*-конформации. Область разрешенных конформаций в случае *В* меньше. Это указывает на то, что конформациям, которые могут принимать полинуклеотиды, соответствуют только определенные значения углов α и ζ. (По [375]; см. также работы [361, 369, 373].)


360°
180°
0°
α (P – O5')
ζ (O3'– P)
p(dT)p(dT)
UpA – 1
GpC (5 структур)
ApU (2 структуры)
ApApA
UpA – 2
ApApA
Б


360°
180°
0°
α (P – O5')
ζ (O3'– P)
Все РНК и
ДНК находятся в
А-форме
0,5
В

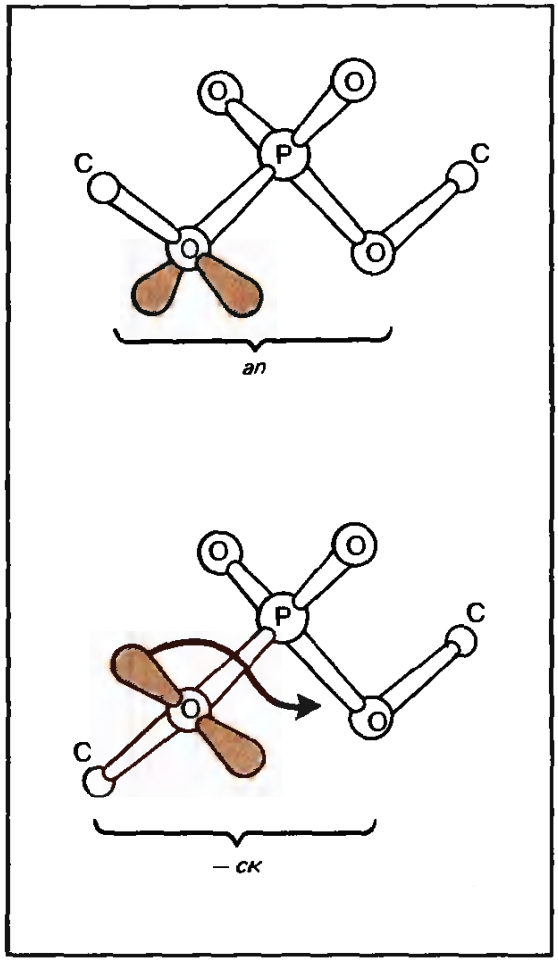


Рис. 4.28. Иллюстрация *гош*-эффекта. *Гош*(+*ск* или –*ск*)-конформация С—О—Р—О-группы является предпочтительной, поскольку орбитали неподеленной пары электронов атома кислорода находятся в *ап*-ориентации относительно соседней поляризованной связи Р—О и кислород может отдавать электроны (*внизу*). При *полностью-транс*(*ап*)-ориентации (*вверху*) орбитали и соседние Р—О-связи находятся в +*ск*- или –*ск*-конформации и вероятность переноса электронов уменьшается.

нов при атоме О и примыкающей к нему полярной связью $P^{\delta+}—O^{\delta-}_{эфир}$. Он обусловлен частичной передачей электронов неподеленной пары на полярную связь в случае, когда орбиталь неподеленной пары и связь $P—O_{эфир}$ антипараллельны, т.е. когда торсионный угол $C—O—P—O_{эфир}$ находится в области +*ск* или –*ск* (рис. 4.28). При полностью нытянутой зигзагообразной *ап*-конформации цепи С—О—Р—О—С орбитали неподеленных пар электронов не могут быть антипараллельны полярным связям $P—O_{эфир}$. Такая ситуация соответствует значению энергии, на 7 ккал·моль$^{-1}$ превышающему глобальный минимум энергии. Следует добавить, что если при расчетах рассматривать *3d*-орбитали атома фосфора, то это существенно не повлияет на распределение энергии по углам α или ζ. Была также отмечена некоторая взаимоснязь между искажением фосфатного тетраэдра и принадлежностью двух эфирных групп к левой или правой структуре [362].

В случае более общей модели, когда к центральной фосфатной группе присоединен сахар или нуклеозид, классический метод расчета потенциальной энергии [58–61, 369–371] и расширенный метод Хюккеля [316, 372] оказываются неприменимыми (см. критические обзоры [182, 370]). Оба они пренебрегают *гош*-эффектом и поэтому неправильно предсказывают значения углов α и ζ, соответствующие минимуму энергии:

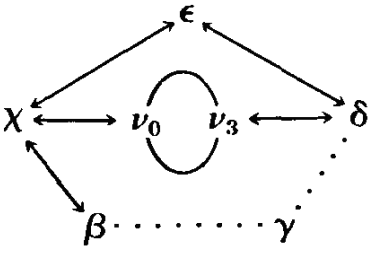
согласно этим расчетам, α и ζ лежат в *an*-области. В таком случае следует применить более точные методы – ППДП [373] или КВВМО [182, 357, 374] – либо ввести дополнительный член при расчете классической потенциальной энергии [375]. Как видно из рис. 4.27, *Б*, расчетный минимум в этом случае соответствует наблюдаемым значениям α и ζ, которые в основном лежат в областях $+ск$, $+ск$ и $-ск$, $-ск$. Значения угла ζ могут лежать и в *an*-области, поскольку, как мы уже говорили, первичный C_5·-атом менее заторможен, чем вторичный C_3·.

Наличие второй фосфатной группы существенно сужает конформационное пространство. Когда вместо динуклеозидмонофосфата в качестве модельного соединения рассматривается динуклеозидди- или динуклеозидтрифосфат [369, 375, 376] (рис. 4.27, *В*), ситуация становится еще более сложной. В этом случае конформационное пространство очень сильно сужается и $+ск$, $+ск$-ориентации по углам α и ζ становятся запрещенными из-за тесного контакта между соседними фосфатными группами. Отсюда следует, что олигонуклеотиды более ограничены по числу конформаций и соответственно конформационно более «чисты», что и подтверждается результатами исследований с помощью ЯМР (табл. 4.5).

4.13. КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ ТОРСИОННЫМИ УГЛАМИ В НУКЛЕОТИДАХ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

Связаны ли друг с другом разные торсионные углы? Как мы уже говорили, вращение вокруг одинарных связей в нуклеозидах и нуклеотидах зависит от структурных особенностей указанных молекул. Это и неудивительно, поскольку нуклеотид представляет собой довольно компактную молекулу и между несвязанными атомами имеется определенное взаимодействие. Возникает вопрос: не существует ли какой-либо корреляции между разными торсионными углами?

Независимым является только угол γ. Детально проанализировав данные по кристаллической структуре 127 нуклеозидов и нуклеотидов с применением методов круговой корреляции торсионных углов и регрессионного анализа, Томита и др. показали, что почти все торсионные углы связаны друг с другом линейной зависимостью с коэффициентами корреляции, значения которых находятся в пределах 0,78–0,89 (полной корреляции соответствует коэффициент 1,0) [377]. Ниже приведена схема, на которой стрелками указана сильная корреляция, а пунктиром – слабая корреляция или ее отсутствие. Угол α на схеме не фигурирует, поскольку для нуклеозидов он не имеет смысла:



Очевидно, что углы δ и ν_3 взаимосвязаны, поскольку они описывают вращение вокруг одной и той же связи ($C_{3'}$—$C_{4'}$) и определяют конформацию сахара, которая в свою очередь зависит и от угла ν_0. Удивительно, что торсионный угол γ не коррелирует ни с одним из других углов и соответствующие ему три заторможенные конформации (разд. 4.8), по-видимому, существуют независимо от общей структуры нуклеозида. Однако для нуклеозида в целом в принципе можно предсказать остальные торсионные углы, так как они взаимосвязаны.

В спиральных полинуклеотидах коррелируют все торсионные углы остова. В спиральных структурах нуклеиновых кислот проявляются новые взаимосвязи между структурными параметрами [378, 379]. Вдоль остова наблюдаются следующие корреляции:

$$\alpha \leftrightarrow \beta,\ \alpha \leftrightarrow \gamma,\ \beta \leftrightarrow \varepsilon,\ \varepsilon \leftrightarrow \zeta.$$

В этом случае угол γ уже не является независимым. Хотя коэффициенты корреляции здесь меньше, чем в мономерах (они варьируют от 0,65 до 0,71), можно утверждать, что торсионные углы сахарофосфатного остова и самого нуклеозида взаимосвязаны. Следовательно, конформационные изменения в спиральных полинуклеотидах сопряжены с согласованными изменениями всех торсионных углов (см. также обзор [894a]).

4.14. СПИРАЛЬ ИЛИ НЕСПИРАЛЬНАЯ СТРУКТУРА, А ЕСЛИ СПИРАЛЬ, ТО КАКАЯ ИМЕННО?

Тестом на спиральность полинуклеотида могут служить результаты расчета потенциальной энергии. Диапазон углов α и ζ для уотсон-криковских двухцепочечных олиго- и полинуклеотидов ограничен рамками — *ск*-области, а нуклеотиды находятся в основном в одной из предпочтительных «жестких» форм: $C_{2'}$-*эндо*- или $C_{3'}$-*эндо*-конформация сахара, *анти*-конформация относительно гликозидной связи (угол χ), + *ск*-область для угла вращения вокруг связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ (угол γ) и область *ап* для углов вращения β и ε относительно связи С—О. Для систематического анализа ограничений, которые налагаются геометрией нуклеотидов на структурную организацию одно- и двухцепочечных олиго- и полинуклеотидов, применяется классический метод расчета потенциальной энергии. Иными словами, исследуется вопрос: каковы возможные значения числа нуклеотидов на виток спирали (n) и расстояния между нуклеотидами вдоль оси спирали (h) [380–387]?

Теоретически могут быть образованы как правые, так и левые, как одинарные, так и двойные спирали. В предположении, что сахар находится в $C_{2'}$-эндо- и $C_{3'}$-*эндо*-конформациях, была рассчитана зависимость n и h от торсионных углов α и ζ относительно связи Р—О для трех диапазонов значений угла γ: $+ск$, $-ск$ и *ап*. Во всех случаях получена только *одна* область, в которой может существовать спираль (рис. 4.29). Расположение этой области на графике зависимости α от ζ указывает

на то, что конформация сахара коррелирует прежде всего с углом вращения ζ вокруг связи $O_{3'}$—P, а ориентация относительно связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ влияет на торсионный угол α относительно P—$O_{5'}$-связи. Наиболее интересным в этих расчетах является то, что изолиния с $h = 0$ Å, отвечающая одинарной (или двойной) распрямленной «спирали-лестнице», проходит через все «спиральные» области и разделяет их на две части, соответствующие левым и правым спиралям. Этот факт демонстрирует то обстоятельство, что даже самые незначительные изменения углов α и ζ, при постоянных значениях других торсионных углов, могут приводить к изменению знака спирали. Для того чтобы правая спираль B-ДНК перешла в стереохимически разрешенную гладкую левоспиральную форму, торсионные углы должны измениться менее чем на 30° (кроме угла χ, который находится в *высокой-анти(− ск)*-области у правоспиральной формы и в *низкой-анти*-области – у левоспиральной) (см. табл. 4.6).

Несмотря на это, стереохимически разрешенные гладкие левые спирали до сегодняшнего дня кристаллографическими методами не обнаружены. Кристаллические структуры олигонуклеотидных фрагментов ДНК и РНК, а также тРНК свидетельствуют о том, что все спирали в них правые. Построение молекулярных моделей показывает, что именно в правой спирали взаимодействие между нуклеотидами разных цепей оптимально. Тем не менее не исключено, что при определенных условиях образуется и левая спираль.

Такие условия могут реализовываться, например, при образовании комплексов с белками. При исследовании кристаллической структуры белка, активирующего катаболизм (БАК), возникло предположение, что он может связываться именно с гладкой левой двойной спиралью ДНК (см., однако, гл. 18). Предположения о существовании левоспирального дуплекса poly[d(I—C)]·poly[d(I—C)] высказывались гораздо раньше; основанием для них послужили данные по дифракции рентгеновских лучей на волокнах и круговому дихроизму с сопутствующим построением молекулярных моделей [388]. Надо особо подчеркнуть, что описанные выше левые двойные спирали и Z-ДНК с зигзагообразным остовом – совершенно разные структуры. В Z-ДНК повторяющейся единицей является динуклеотид d(G—C), в котором dG и dC находятся в разных конформациях, тогда как структурные характеристики нуклеотидов в составе гладкой левой спирали практически идентичны.

Концепция виртуальной связи: нуклеотид как система, состоящая из двух блоков. Если нуклеотид рассматривать как систему, состоящую из двух блоков, т. е. систему, содержащую только две «виртуальные связи», и, таким образом, не рассматривать каждый торсионный угол в отдельности, то расчеты существенно упростятся. Каждый блок состоит из цепочки атомов, $P_{5'}$—$O_{5'}$—$C_{5'}$—$C_{4'}$ и $C_{4'}$—$C_{3'}$—$O_{3'}$—$P_{3'}$, которые у нуклеотидов обычно находятся в *транс*(или *антиперипланарной*)-конфигурации, что позволяет считать каждую из них планарной системой. Виртуальные связи $P_{5'}\cdots C_{4'}$ и $C_{4'}\cdots P_{3'}$, соединяющие атомы фосфора

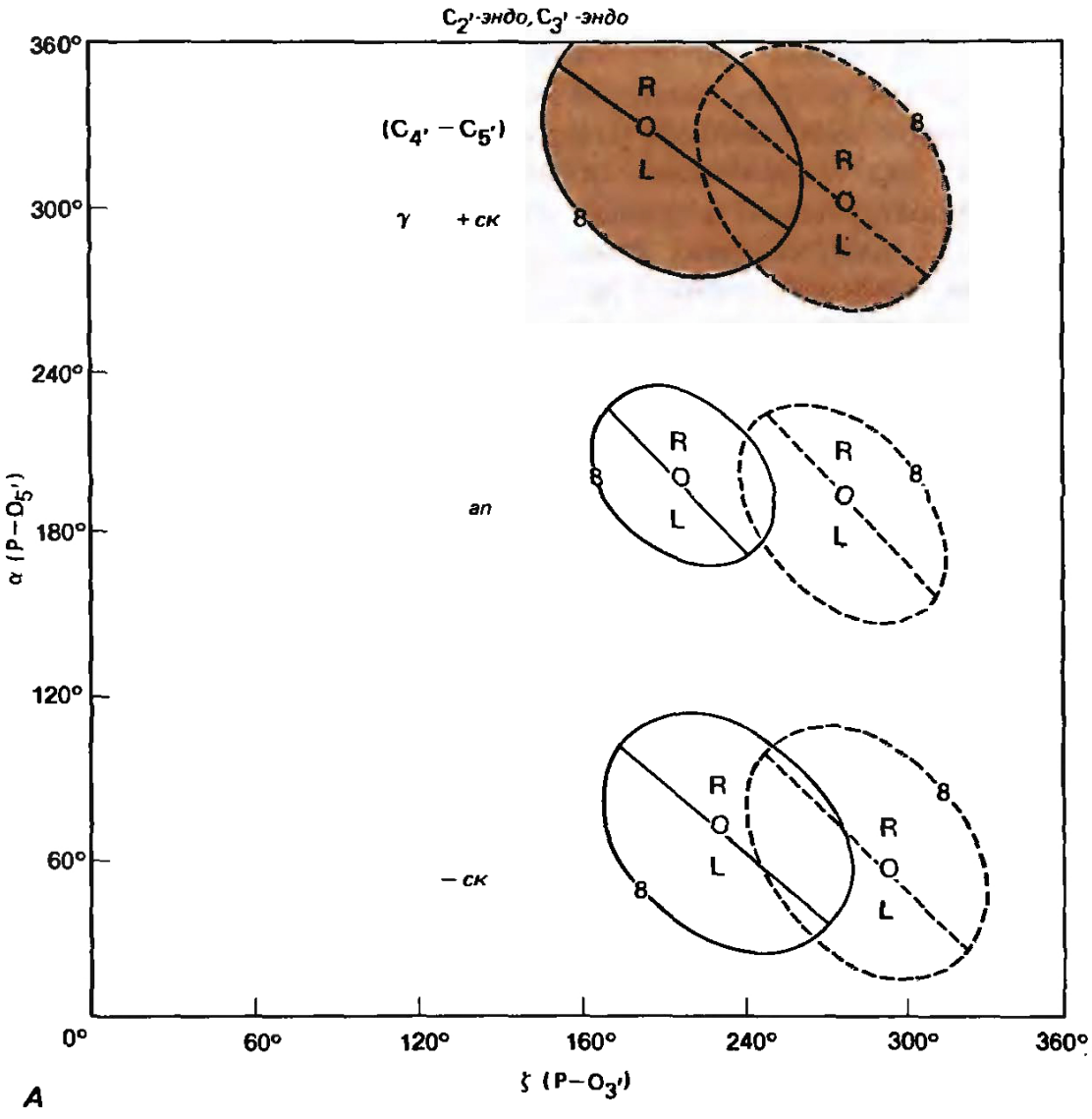


Рис. 4.29. *А.* Схема, иллюстрирующая области стерически разрешенных конформаций для одноцепочечных полинуклеотидов [383]. Сахар принимает одну из двух конформаций – C_2-*эндо* (сплошная линия) и C_3-*эндо* (пунктир); торсионный угол $\gamma(C_4\text{—}C_5)$ соответствует трем заторможенным конформациям в областях $+ск$, $-ск$ и *ап*. α и ζ изменяются от 0 до 360°. Чтобы не загромождать рисунок, приводятся контурные линии, соответствующие только $n = 8$ и $h = 0$, где n – число нуклеотидов на виток, а h – расстояние между остатками вдоль оси спирали. Параметры, отвечающие двойным спиралям уотсон-криковского типа, соответствуют углам α и ζ, равным $-60°$ (300°). Эти области выделены цветом.

с атомом C_4', образуют виртуальные валентные и торсионные углы, что позволяет построить как спиральную полимерную структуру, так и полимерную структуру в состоянии разупорядоченного клубка и сопоставить эти структуры с экспериментальными данными [380, 389].

Необычная Z-ДНК: можно ли предсказать существование такой структуры теоретически? Говоря о левозакрученной двухцепочечной

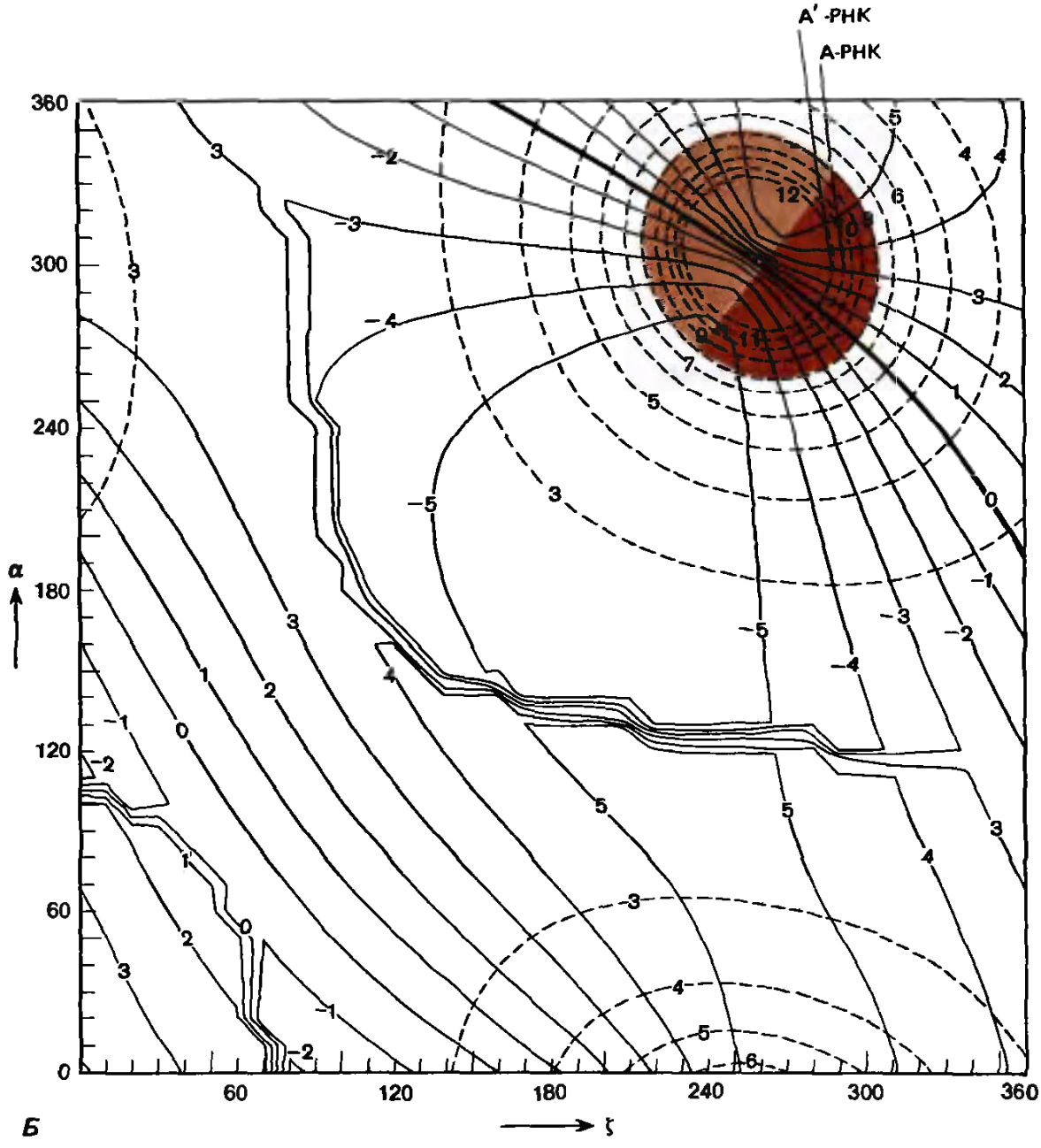


Рис. 4.29. *Б.* Более детальная, чем на рис. 4.29. *А*, схема, на которой представлена зависимость n/h для одноцепочечного полинуклеотида [381]. Сахар в этом полинуклеотиде находится в $C_{3'}$-*эндо*-конформации, γ лежит в + *ск*-области, β и ε – в *ап*-области, χ соответствует *анти*-ориентации. α и ζ изменяются от 0 до 360°. Числа на кривых изо-*n* (пунктирные кривые) и изо-*h* (сплошные кривые) указывают число нуклеотидов на виток спирали и расстояния между остатками вдоль оси соответственно. $h = 0$ Å отвечает спирали, выродившейся в прямую. Для правой спирали h положительно, а для левой отрицательно. Каждая из n-изолиний дважды пересекает каждую из h-изолиний, что дает области R_I, R_{II} и L_I, L_{II} для правых и левых спиралей. Самой предпочтительной среди них является область R_I, где имеют место наиболее благоприятные взаимодействия основание–основание и сахар–основание между соседними нуклеотидами. R_I – темная, а R_{II} – светлая области *над* изолинией $h = 0$. L_I и L_{II} – соответственно темная и светлая области *под* изолинией $h = 0$.

Таблица 4.6. Конформационные параметры правой и левой двойных спиралей В-типа, полученные путем расчета потенциальной энергии[1] [391]

		Правая	Левая
Торсионные углы остова и угол вращения вокруг гликозидной связи	α	302° (314°)	270°
	β	144° (214°)	135°
	γ	41° (36°)	36°
	δ	149° (156°)	137°
	ε	228° (155°)	241°
	ζ	202° (264°)	204°
	χ	− 106° (− 100°)	177°
Эндоциклические торсионные углы фуранозы	ν_0	− 33,7° (− 34,8°)	− 38,6°
	ν_1	18,7° (33,3°)	18,1°
	ν_2	6,3° (− 18,6°)	11,2°
	ν_3	− 30,0° (− 4,0°)	− 36,1°
	ν_4	40,5° (24,7°)	35,2°
Параметры оснований, определение которым дано на рис. 2.14	θ_R	− 4,0° (− 1,0°)	0,0°
	θ_T	− 7,5° (− 6,0°)	− 3,0°
	D	− 0,30(−.0,14) Å	− 1,22 Å

[1] Считается, что сахар находится в C_2-*эндо*-конформации, а угол γ лежит в области + *ск*. Числа в скобках получены из данных по дифракции на волокнах В-ДНК.

Z-форме, которую может образовать полинуклеотид poly[d(G—C)] с чередующейся последовательностью, необходимо отметить следующее. Повторяющейся единицей в такой структуре является динуклеотид (гл. 12), поэтому, беря за основу мононуклеотид, предсказать существование Z-ДНК невозможно. Соответствующий анализ можно провести, однако, увеличив размер повторяющейся единицы до динуклеотида или более [390, 391]. Можно попытаться даже рассмотреть единицы с разной нуклеотидной последовательностью; такая ситуация наблюдается при исследовании тонкой структуры кристаллов додекамерного фрагмента ДНК (разд. 11.2).

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Основные положения гл. 4 можно суммировать следующим образом.

1. Азотистые основания планарны. Они находятся в кето- и амино-таутомерных формах. Из-за резонанса аминогруппы не могут выйти из плоскости гетероциклов, причем энергетический барьер вращения аминогрупп равен ~ 15 ккал·моль$^{-1}$.
2. Сахарный остаток – рибоза либо дезоксирибоза – находится в C_2-*эндо* (S)- или C_3-*эндо* (N)-конформации. В растворе между этими конформациями поддерживается динамическое равновесие. Быстрый переход от одной конформации к другой происходит в соответствии с циклом псевдовращения, с образованием промежуточной

$O_{4'}$-*эндо*-конформации. Разность энергий двух состояний невелика: по теоретическим оценкам она составляет 0,6–3,8 ккал·моль$^{-1}$, а экспериментально наблюдаемая величина равна 4,7 ккал·моль$^{-1}$. Положение равновесия $C_{2'}$-*эндо* $\rightleftarrows$ $C_{3'}$-*эндо* определяется электроотрицательностью заместителей при атомах $C_{2'}$ и $C_{3'}$ (из-за *гош*-эффекта более электроотрицательный заместитель предпочитает аксиальную ориентацию) и ориентацией оснований (*син*-ориентация оснований чаще всего сочетается с $C_{2'}$-*эндо*-конформацией сахара). В составе спиральных полинуклеотидов это равновесие «замораживается»: сахар присутствует либо в $C_{2'}$-*эндо*-, либо в $C_{3'}$-*эндо*-конформации (табл. 4.7).

3. Пиримидиновые нуклеозиды, как правило, находятся в *анти*-ориентации относительно гликозидной связи $C_{1'}$—N, тогда как в случае пуриновых нуклеозидов *анти*- и *син*-конформации встречаются одинаково часто. В растворе между этими двумя конформациями наблюдается быстрый равновесный переход. *Син*-конформация стабилизируется взаимодействием $O_{5'}$—H···N_3 (пурины) и $O_{5'}$—H···O_2 (пиримидины), а также наличием объемных заместителей при атомах C_8 (в пуринах) и C_6 (в пиримидинах). Исследование кристаллов некоторых (модифицированных) нуклеозидов позволило обнаружить *высокую-анти(−ск)*-конформацию с углом χ, лежащим вблизи −100°. 5′-нуклеотиды и полинуклеотиды находятся в *анти*-конформации, однако гуанин столь же часто оказывается в *син*-ориентации.
4. Нуклеозиды предпочитают конформацию с торсионным углом γ, находящимся в области +*ск*. Конформации, в которых этот угол лежит в областях −*ск* и *ап*, встречаются редко. Для 5′-нуклеотидов преобладающей является +*ск*-конформация, которая стабилизируется водородной связью (основание) C—H···$O_{5'}$; эта связь влияет также на соотношения между *син*- и *анти*-ориентациями основания (табл. 4.7).
5. Фосфатная группа имеет тетраэдрическую конфигурацию. Длина связей P—O меняется от 1,5 Å для связи P—O^- до 1,6 Å для связи P—$O_{эфир}$. Это различие обусловлено разным вкладом π-электронов из-за перекрывания $3d_{x^2-y^2}$- и $3d_{z^2}$-орбиталей атома фосфора с $2p$-орбиталями атома кислорода; по этой же причине валентный угол O—P—O увеличивается от 105 до 120°. Длина связей P—O—P в пирофосфатной группе равна 1,6 Å, а валентный угол – ~130°, однако геометрия связи «обычная». Дополнительная энергия «богатых энергией» пирофосфатных групп обусловлена отталкиванием фосфатов и гидратацией фрагментов, образующихся при разрыве связи.
6. Ориентация фосфатных групп относительно связей C—O такова, что для $C_{5'}$—$O_{5'}$-связи угол β лежит в области *ап*, а для связи $C_{3'}$—$O_{3'}$ угол ε немного смещается в сторону бóльших углов (220°), в область −*ак*.
7. В нуклеозидах все торсионные углы, кроме угла γ, связаны между собой. В полинуклеотидах угол γ тоже не является независимым.

Таблица 4.7. Предпочтительные конформации нуклеозидов и нуклеотидов[1)]

Тип нуклеозида или нуклеотида	Конформация сахара (δ)	χ C_1'—N	γ C_4'—C_5'	β C_5'—O_5'	ε C_3'—O_3'	α P—O_5'	ζ P—O_3'
Нуклеозиды							
Пиримидиновые							
Рибо	C_3'-*эндо*/C_2'-*эндо*	*анти*/*син*	*ск*/−*ск*/*ап*				
Дезоксирибо	C_3'-*эндо*/C_2'-*эндо*	*анти*/*син*	*ск*/−*ск*/*ап*				
Пуриновые							
Рибо	C_3'-*эндо*/C_2'-*эндо*	*анти*/*син*	*ск*/−*ск*/*ап*				
Дезоксирибо	C_3'-*эндо*/C_2'-*эндо*	*анти*/*син*	*ск*/−*ск*/*ап*				
5'-нуклеотиды							
Пиримидиновые							
Рибо	C_3'-*эндо*/C_2'-*эндо*	*анти*	*ск*	*ап*(180°)	−*ак*(220°)		
Дезоксирибо	C_3'-*эндо*/C_2'-*эндо*	*анти*	*ск*	*ап*(180°)	−*ак*(220°)		
Пуриновые							
Рибо	C_3'-*эндо*/C_2'-*эндо*	*анти*	*ск*	*ап*(180°)	−*ак*(220°)		
Дезоксирибо	C_3'-*эндо*/C_2'-*эндо*	*анти*	*ск*	*ап*(180°)	−*ак*(220°)		
Спиральные полинуклеотиды							
Рибо	C_3'-*эндо*	*анти*	*ск*	*ап*(180°)	−*ак*(220°)	−*ск*	−*ск*
Дезоксирибо	C_3'-*эндо*/C_2'-*эндо*	*анти*	*ск*	*ап*(180°)	−*ак*(220°)	−*ск*	−*ск*

[1)] Преобладающие конформации подчеркнуты. По номенклатуре *ск*, −*ск* и *ап* – это +*гош*, −*гош* и *транс* соответственно.

Это означает, что структурные изменения происходят согласованно.

8. Из-за *гош*-эффекта торсионные углы α и ζ, определяющие ориентацию относительно эфирных связей Р—$O_{5'}$ и $O_{3'}$—Р, лежат в основном в областях $+ск$ и $-ск$. В одноцепочечных полинуклеотидах ориентация относительно связей Р—О такова, что углы α и ζ лежат строго в областях $-ск$ либо $ап/-ск$ или в области $-ск/ап$, а в спиральных структурах со спаренными основаниями и α, и ζ лежат только в области $-ск$.
9. Для спирали из нуклеотидов в стандартной («жесткой») конформации с углами χ, γ, β, ε в областях *анти*, $+ск$, *ап* (180°), $-ак$ (220°) и с сахаром в $C_{2'}$-*эндо*- или $C_{3'}$-*эндо*-конформации можно рассчитать спиральные параметры: n (число нуклеотидов на виток) и h (расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали) для разных значений углов α и ζ. График зависимости $n-h$ показывает, что имеется только *одна* область, соответствующая спиральному состоянию молекулы. Гладкие лево- и правозакрученные конфигурации разделены прямой $h=0$ Å, которая соответствует структуре типа лестницы. При весьма незначительных вариациях углов α и ζ знак спирали может измениться. Правые спирали встречаются чаще из-за более тесных горизонтальных и вертикальных контактов между соседними нуклеотидами.
10. Для предсказания структуры полимеров, находящихся в спиральном состоянии и в виде статистического клубка, используется понятие «виртуальная связь»; в его основе лежит представление о полинуклеотиде как о последовательности блоков $P_{5'}\cdots C_{4'}$ и $C_{4'}\cdots P_{3'}$.

ГЛАВА 5

Физические свойства нуклеотидов: плотность заряда, pK, спектры и таутомеризация

Физические свойства нуклеотидов, которые будут обсуждаться в этой главе, помогают установить некоторые характерные особенности этих молекул. В частности, с их помощью удается понять механизм узнавания основаниями друг друга при спаривании и принципы их взаимодействия с ионами металлов. Оба этих важнейших для биологических систем процесса зависят от распределения плотности заряда, значений pK и таутомерной формы нуклеотида.

5.1. ПЛОТНОСТЬ ЗАРЯДА

Способность оснований к специфическому спариванию путем образования водородных связей обусловливается распределением плотности заряда. Такое распределение было рассчитано для многих нуклеотидов и их производных; вклад σ- и π-электронов оценивался методами Дель Ре и Хюккеля [72] (рис. 5.1), а общий заряд – методом КВВМО [70, 71, 180].

Из распределения плотности заряда, которое приведено на рис. 5.1, видно, что атомы водорода в аминогруппах аденина, гуанина и цитозина характеризуются примерно одинаковой положительной величиной σ-заряда $+0{,}22e$. Эти атомы обладают слабо выраженными кислотными свойствами и могут выступать в роли доноров при образовании водородной связи:

$$\underset{\text{Донор}}{\overset{\delta-}{\text{N}}\!\!-\overset{\delta+}{\text{H}}} \cdots \underset{\text{Акцептор}}{\overset{\delta-}{\text{O}}}$$

Одинаковый положительный заряд, равный $+0{,}19e$, несут и водородные атомы при N_3 в урациле и при N_1 в гуанине, т.е. водородные атомы амидоподобных групп. Этот заряд несколько меньше заряда водородных атомов аминогрупп. С другой стороны, основания могут выступать и как акцепторы при образовании водородных связей. Роль акцепторов играют атомы N_1, N_3 и N_7 в аденине; N_3, N_7 и O_6 в гуанине; O_2 и O_4 в урациле и тимине, а также N_3 и O_2 в цитозине. Все эти атомы несут отрицательный заряд, величина которого меняется от

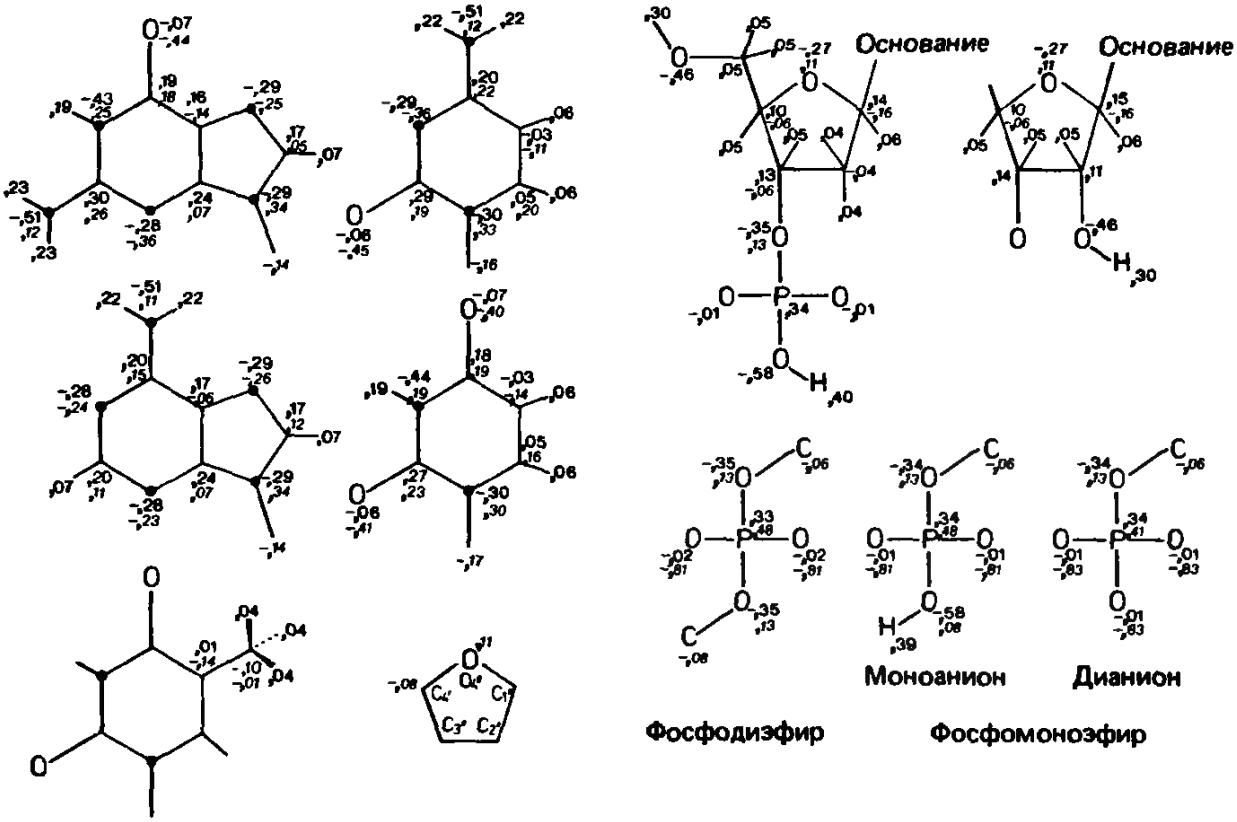


Рис. 5.1. Распределения плотности заряда в нуклеотидах [72]. Заряд σ-электронов Дель Ре обозначен прямым шрифтом, а заряд π-электронов Хюккеля – курсивом.

– 0,47*e* (для атома O_2 тимина) до – 0,65*e* (для атома N_3 цитозина), благодаря чему они являются хорошими акцепторами водородных связей.

Как можно видеть из того же рис. 5.1, влияние общей π-электронной системы гетероцикла распространяется на прилегающие к гетероциклам атомы фуранозы – $C_{1'}$, $O_{4'}$ и $C_{4'}$. Этим влиянием можно отчасти объяснить укорочение связи $C_{1'}$—$O_{4'}$ по сравнению со связью $C_{4'}$—$O_{4'}$, что обусловлено сопряжением неподеленной пары электронов атома $O_{4'}$ с π-электронной системой гетероцикла. Поскольку атом кислорода $O_{4'}$ несет небольшой отрицательный заряд – 0,16*e*, он является слабым акцептором водородной связи. Действительно, образование водородных связей с этим атомом было обнаружено в кристаллических структурах лишь немногих нуклеозидов. Тем не менее при благоприятном стереохимическом расположении атома $O_{4'}$ относительно H—O-групп такие связи, по-видимому, образуются (разд. 4.3; рис. 4.11).

Распределение заряда в фосфатной группе указывает, что этерифицированные атомы кислорода, несущие заряд – 0,22*e*, являются плохими акцепторами при образовании водородной связи, а два других кислородных атома, несущие заряд – 0,83*e*, – хорошими; это находится в соответствии с кристаллографическими данными.

Отрицательно заряженные атомы N и O оснований и атомы кислорода фосфатных групп, способные к образованию водородных связей,

Таблица 5.1. Полученные расчетным путем и измеренные экспериментально дипольные моменты для разных оснований[1)]

Соединение	Теория		Эксперимент
	величина, D	направление, град	величина, D[2)]
Аденин	2,9	64	3,0
Урацил	4,6	36	3,9
Гуанин	7,5	−31	—
Цитозин	7,6	102	—

[1)] Направление вектора дипольного момента отсчитывалось относительно связей N_1—C_4 в пиримидинах и C_4—C_5 в пуринах; если в соответствующих структурных формулах атом C_2 располагался слева от гликозидной связи, угол отсчитывался против часовой стрелки [180].

[2)] Приведены значения для 9-метиладенина и 1,3-диметилурацила.

как правило, могут связывать также ионы разных металлов. Такие комплексы представляют не только биологический, но и стереохимический интерес; мы рассмотрим их более детально в гл. 8.

Неравномерное распределение плотности заряда приводит к появлению дипольного момента. Приведенное на рис. 5.1 распределение плотности заряда может быть представлено для каждого из оснований единственным вектором, направление и величина которого задают дипольный момент μ. Вектор дипольного момента обычно лежит в плоскости основания. Его ориентацию определяют относительно некоего выбранного направления в молекуле (табл. 5.1). Соответствующие теоретические расчеты поддаются экспериментальной проверке лишь в отношении величины дипольного момента, которую можно непосредственно измерить. Ориентация определяется только в том случае, если в распоряжении исследователя имеются данные о величинах дипольных моментов нескольких различным образом замещенных производных исследуемой молекулы.

5.2. pK ОСНОВАНИЙ, САХАРОВ И ФОСФАТНЫХ ГРУПП. МЕСТА НУКЛЕОФИЛЬНОЙ АТАКИ

Протонирование и депротонирование осиоваиий происходит при отклонении pH в обе стороны от нейтрального значения pH на 3,5 единицы, т. е. в интервале pH 3,5 ÷ 10,5 (табл. 5.2). Из данных табл. 5.2 следует, что атомы водорода амидоподобных группировок (при атомах N_3 и N_1 в урациле и гуанине соответственно) проявляют выраженные кислотные свойства, а эндоциклические атомы азота — основные, чего и следовало ожидать, исходя из распределения плотности заряда. Расстояния между основаниями и отрицательно заряженными фосфатными группами в 3′- и 5′-нуклеотидах неодинаковы, поэтому различается и электростатическое притяжение между ними. В результате соответствующие значения

pK оснований при переходе от нуклеозидов к 3′- и 5′-нуклеотидам увеличиваются примерно на 0,5 [404].

При щелочных pH протоны, связанные с атомами N_3 урацила и тимина и с атомом N_1 гуанина, отщепляются. При слабокислых pH (>3) протонируются атомы N_1 аденина и N_3 цитозина, а при более кислых (<2) – также атом N_7 и гуанина и аденина (рис. 5.2) и атом O_4 урацила [401–403, 405–412]. Кристаллографические исследования показали, что при достаточно низких значениях pH (<2) N_9-замещенный гуанин протонируется по азоту N_7 [413, 414], аденин подвергается двойному протонированию по атомам N_1 и N_7 [415], а 1-метилурацил протонируется по атому O_4 [416]; при этом геометрия связей меняется так же, как и в обычных резонансных структурах: если протонируется эндоциклический азот, то соответствующий валентный угол C—N—C увеличивается примерно на 5° [191] (разд. 4.5).

Во всех описанных выше случаях протонируются эндоциклические атомы азота, а не экзоциклические [417]. Это положение согласуется с распределениями зарядов, представленными на рис. 5.1. Более того, оно получило квантово-химическое объяснение. Обычно распределение заряда рассчитывается для изолированной молекулы, находящейся в основном состоянии [418]; в то же время такие химические реакции, как протонирование, зависят от распределения заряда в переходном состоянии, которое сильно отличается от основного. Карты изолиний электростатического потенциала, рассчитанные для четырех оснований при сближении их с протоном или с нуклеофильным алкилирующим агентом, наглядно показывают, что атаке подвергаются в первую очередь эндоциклические атомы азота и атомы кислорода кетогрупп, а не аминогруппы [418].

При сильнощелочных условиях депротонируются вторичные гидроксильные группы рибозы. То обстоятельство, что соответствующие значе-

Таблица 5.2. Значения pK_a оснований в составе нуклеозидов и нуклеотидов, экстраполированные к нулевой ионной силе[1)]

Соединение/место протонирования и депротонирования	Нуклеозид	3′-фосфат	5′-фосфат
Аденозин/N_1	3,52	3,70	3,88
Цитидин/N_3	4,17	4,43	4,54
Гуанозин/N_1	9,42	9,84	10,00
Уридин/N_3	9,38	9,96	10,06
2′-дезокситимидин/N_3	9,93	—	10,47

[1)] Приведенные значения получены при концентрации соединений $5 \cdot 10^{-5}$ М и температуре 20°C. Поскольку 5′-фосфат расположен ближе к основанию, чем 3′-фосфат, его влияние на pK_a оказывается сильнее. (По [401]. Более полную таблицу см. в работах [402, 403].)

Таблица 5.3. Значения pK_a для вторичной ионизации фосфатных групп в составе нуклеозидмоно-, ди- и трифосфатов[1)] [424]

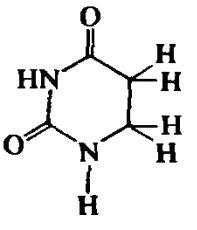
Соединение	Фосфат		
	моно-	ди-	три-
Аденозин	6,67	7,20	7,68
Цитидин	6,62	7,18	7,65
Гуанозин	6,66	7,19	7,65
Уридин	6,63	7,16	7,58

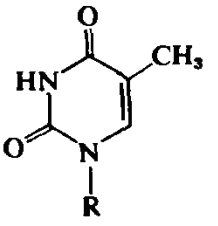
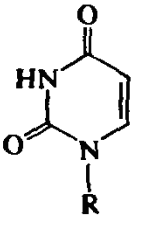
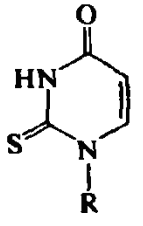
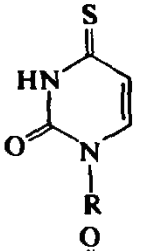
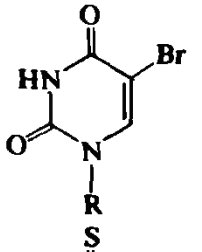
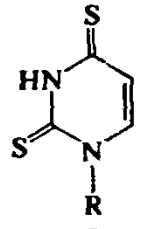
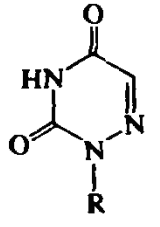
[1)] Первичная ионизация происходит при pH 1–2 (рис. 5.2).

ния $pK_a \sim 12{,}4$ ниже, чем pK_a первичной или изолированной вторичной гидроксильных групп, обусловлено тем, что отрицательно заряженные группы C—O$^-$ стабилизируются наличием вицинальных гидроксилов рибозы, между которыми возникают индуктивные эффекты и образуется водородная связь [420, 421] (рис. 5.2) (аналогичные свойства гидроксилов глюкозы рассмотрены в работах [422, 423].

Фосфатные группы в составе нуклеозидмоно-, ди- и трифосфатов имеют два значения pK [424, 425]. При низких pH, в районе 1–2, в результате протонирования отрицательный заряд фосфатной группы нейтрализуется полностью, а заряд ди- и трифосфатов – частично. В результате среднее значение отношения заряд/фосфат для дифосфатов равно 1/2, а для трифосфатов – 1/3 или 2/3. На стадии первичной ионизации от каждого фосфата отщепляется по одному протону и каждая фосфатная группа приобретает по одному отрицательному заряду (отношение заряд/фосфат = 1,0). Вблизи pH 7 начинается вторая стадия ионизации, при которой от концевого фосфата отщепляется последний протон (табл. 5.3). В диэфирах, подобных ДНК и РНК, или в коферментах NAD$^+$ и CDP-холин при физиологических условиях такого протонирования не происходит, поэтому интерес представляет только первая стадия ионизации.

Таблица 5.4. Некоторые замещеиные производные урацила и соответствующие значения pK

Названия соединения	Структурная формула	pK
5,6-дигидроурацил		> 11

5-метилуридин		9,7
Уридин		9,3
2-тиоуридин		8,8
4-тиоуридин		8,2
1-метил-5-бромурацил		7,8
2,4-дитиоуридин		7,4
1-метил-6-азаурацил		6,9

R – рибоза или метильная группа.

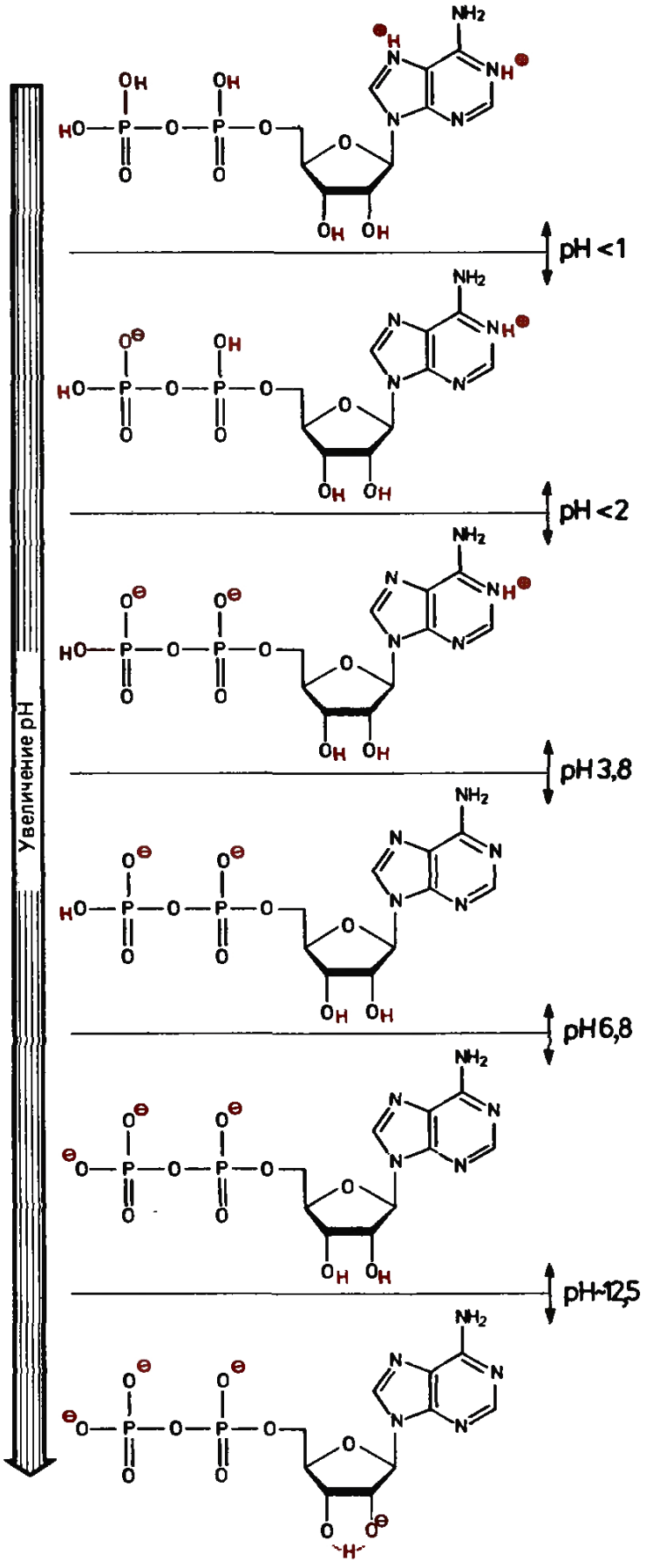


Рис. 5.2. Места протонирования в аденозиндифосфате (ADP). Аминогруппа аденина не протонируется даже при низких pH. Первичная нонизация фосфатных групп завершается в области pH 2, выше pH 3,8 аденин становится нейтральным. При pH 6,8 происходит вторичная ионизация фосфатных групп, и при pH > 12,5 депротонируются вторичные гидроксилы рибозы.

Химическая модификация оснований непосредственно влияет на величину pK_a (см. табл. 5.4 [402, 410, 426]). Так, pK_a 5-метилуридина, равное 9,7, превышает pK_a уридина, которое равно 9,3. При замене кетогруппы на тиокетогруппу в 2,4-дитиоуридине pK_a уменьшается до 7,4. Уменьшение pK_a до 7,8 наблюдается для 5-бромзамещенного производного уридина. Поскольку значения pK_a некоторых модифицированных нуклеозидов близки к физиологическим значениям pH, такие нуклеозиды встречаются и в виде ионов, и в виде различных таутомерных форм (см. следующий раздел).

5.3. ТАУТОМЕРИЯ ОСНОВАНИЙ

Если в гетероциклических молекулах протоны, связанные с атомами азота, способны переходить на другие свободные атомы азота либо на атомы кислорода кетогруппы, то в растворе эти молекулы будут присутствовать в разных таутомерных формах, быстро переходящих одна в другую [198, 427]. Такой тип таутомерии с прототропными переходами, сильно зависящий от диэлектрической постоянной раствора и pK соответствующего гетероатома, был предметом многочисленных исследований [428, 429].

Гетероциклы нуклеозидов также подвержены таутомерным превращениям. В незамещенных основаниях может происходить прототропная миграция от одного эндоциклического азота к другому, типа N_7—H ⇄ N_9—H в пуринах и N_1—H ⇄ N_3—H в пиримидинах (рис. 5.3). Однако такой тип изомеризации, требующий наличия незамещенного атома N_9 в пуринах и N_1 в пиримидинах, мы в дальнейшем рассматривать не будем, поскольку в нуклеозидах это условие не выполняется. В этом последнем случае мы имеем дело с переходами кето ⇄ енол и амино ⇄ имино (рис. 5.4). Поразительно, насколько изменение в положении атома водорода меняет характер образуемых основанием водородных связей: кетогруппа с акцепторными свойствами в енольной форме становится донором, а отдающая водород аминогруппа при переходе в форму замещенного имина – акцептором. Если, однако, в последнем случае связь N—H способна менять ориентацию, то иминогруппа может выступать и в роли донора.

В результате таутомерных превращений урацил и гуанин в енольной форме при спаривании могут имитировать цитозин и аденин, а цитозин и аденин в иминоформе – урацил и гуанин (рис. 5.4). В самореплицирующейся системе по Уотсону и Крику, основанной на принципе специфического спаривания, подобные метаморфозы могут привести к катастрофическим последствиям. Именно поэтому таутомерия оснований была детально изучена методами УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии, кристаллографическими методами (все эти результаты суммированы в работе [429]; более поздние данные описаны в работах [430–433]), а также методами квантовой химии [179, 180].

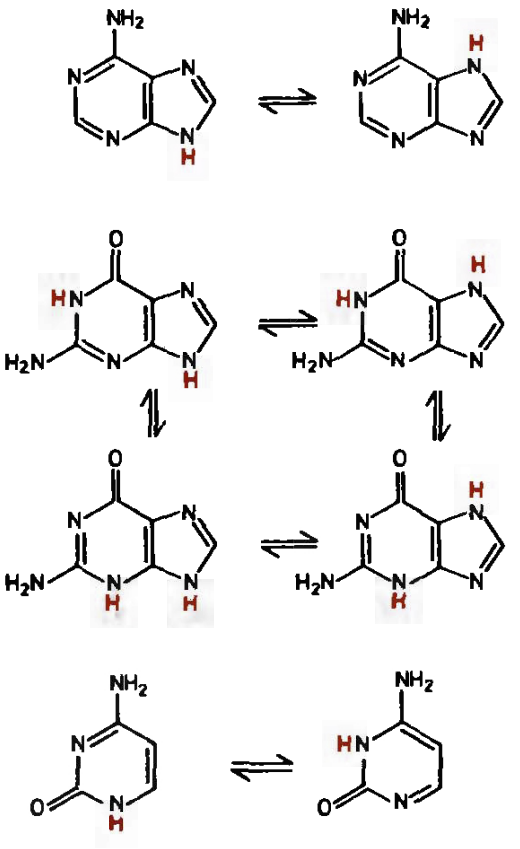


Рис. 5.3. Прототропная таутомеризация незамещенных аденина, гуанина и цитозина.

Наиболее существенные результаты этих исследований таковы. Кето- и амино-формы, представленные на рис. 2.1 и 2.2, являются основными в случае природных оснований. Доля имино- и енольных таутомеров для аденозина [434] и 1-метилурацила [410] составляет менее 0,01%. Такая картина наблюдается во многих растворителях с различными диэлектрическими постоянными и даже в газах [435]. Ранние исследования производных цитозина и гуанина методом ЯМР, согласно которым доля редких имино- и енольных форм составляет 15%, оказались ошибочными [436, 437]. Квантово-химические расчеты слишком чувствительны к длине связей О—Н, и их нельзя использовать для установления деталей таутомерных состояний [438]. К интерпретации кристаллографических данных с позиции таутомерии следует тоже подходить с осторожностью, поскольку различия в длине С—О-связей (в урациле) можно считать значимыми только в том случае, если они превышают 3σ [439]. Кроме того, координационное связывание O_2 кето-группы с катионами, например с K^+, может влиять на длину связи С—О и искусственно индуцировать енолизацию [440].

Можно смело утверждать, что в природных основаниях преобладают кето- и амино-таутомерные формы природных оснований; это соответствует назначению оснований узнавать нужного партнера для спаривания – необходимое условие, налагаемое на самовоспроизводящийся генетический аппарат. Несколько замечаний относительно частоты мутаций, вызванных неправильным спариванием оснований вследствие их таутомеризации, можно найти в гл. 6.

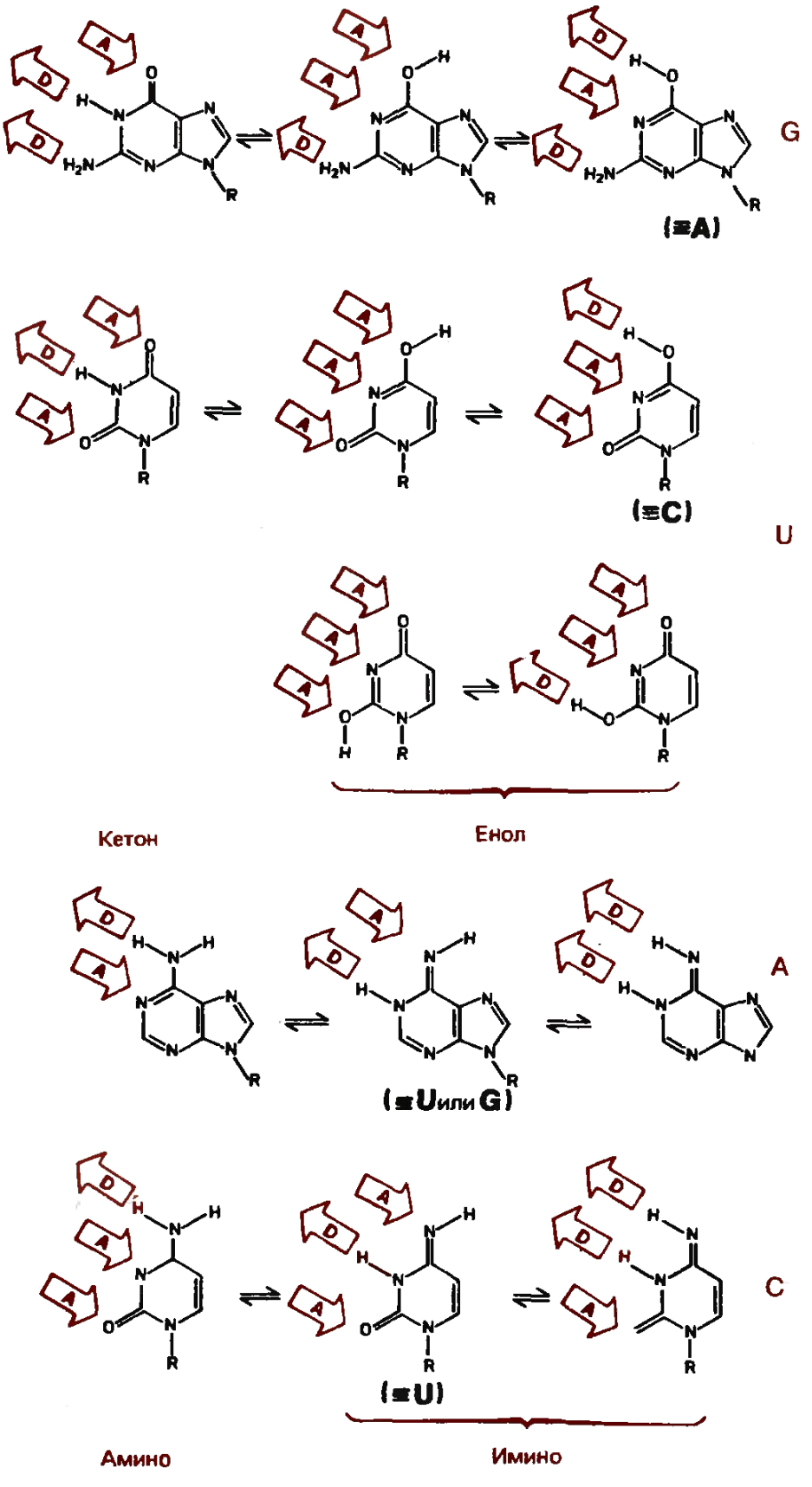
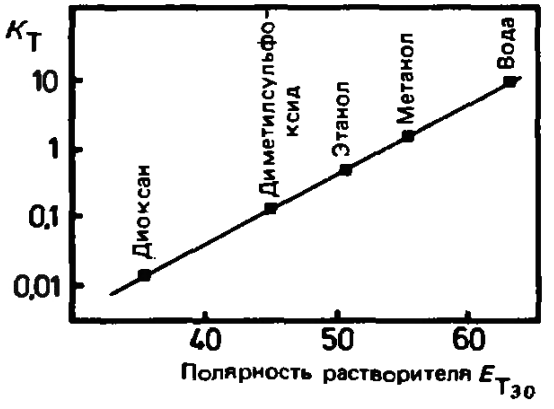


Рис. 5.4. Кето-енольная и амино-иминная таутомеризация оснований в составе нуклеозидов. Стрелки с символами A и D указывают на акцепторные и донорные группы, способные к образованию водородных связей. Обратите внимание, что в енольной форме G становится подобным A, а U–C; в иминоформе A эквивалентно U или G, а C–U. Если иминогруппа (=N—H) и енольная (O—H) группа могут менять ориентацию, то появляются дополнительные возможности для образования водородных связей. К счастью, доля оснований в кето- и аминоформах при физиологических условиях > 99,99% (см. текст).



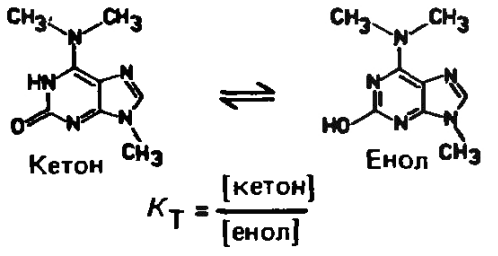


Рис. 5.5. Зависимость константы K_T кето-енольного равновесия для N^6,N^6,N^9-триметилизогуанина от природы растворителя [447]. Полярность растворителя $E_{T_{30}}$ определена в соответствии с работой [447], K_T выражена в логарифмических единицах. Кето-енольное равновесие для изогуанина сильно зависит от растворителя, поэтому данное основание не находит применения в химии нуклеиновых кислот.

В случае модифицированных оснований картина несколько меняется, и становится ясным, почему природа в качестве основного объекта выбрала четыре нормальных основания. Природный изогуанозин, структурный аналог гуанозина (рис. 5.5) [441, 442], не включается в ДНК или РНК, хотя с чисто функциональной и структурной точек зрения он мог бы спариваться с синтетическим изоцитидином и заменять обычный аналог. Причина такой дискриминации заключается в необычной кето-енольной таутомеризации изогуанозина, равно как и соответствующего замещенного изогуанина, которая сильно зависит от полярности растворителя и температуры [443].

Другие химические модификации, такие, как замена кетогруппы в шестом положении пуриновых нуклеозидов на тиокетогруппу, увеличивают долю енольных таутомеров до 7% [444]. В противоположность этому для 4-тиоурацила, замещенного по положению 1, может существовать только кето-таутомерная форма [445]. В ряду галогензамещенных по положению 5 производных уридина введение фтора практически не уменьшает долю преобладающей кетоформы, хотя значение $pK_a = 7{,}4$ близко к физиологическим значениям pH [446]. Подобным же образом можно было бы ожидать, что введение брома, оказывающее сходное влияние на pK_a (7,8), не будет затрагивать кето-енольной таутомеризации, однако на самом деле доля енольных таутомеров возросла при этом в 10 раз, составляя тем не менее лишь 0,1–1% от доли кетоизомеров [410]. Вместе с тем для увеличения доли имино- и енольных таутомерных форм совсем не обязательна модификация оснований. В разд. 6.1 приводятся данные ЯМР, показывающие, что в тРНК из всех оснований, принимающих участие в спаривании, от 5 до 15% находятся в редких таутомерных формах, в которых атомы водорода,

принимающие участие в образовании водородной связи, способны согласованно переходить от донора одного основания к акцептору комплементарного основания.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Особенности взаимодействия нуклеотидов с другими молекулами, как правило, можно объяснить характером распределения в них плотности заряда. Так, аминогруппы оснований, являющиеся хорошими донорами при образовании водородной связи, несут частичный положительный заряд, тогда как атомы кислорода кетогруппы и атомы азота оснований являются хорошими акцепторами, а атомы кислорода сахарного кольца – плохими. Аналогично акцепторные свойства атомов кислорода, принимающих участие в образовании эфирной связи в фосфатных группах, менее выражены и подавляются свободными атомами кислорода, несущими частичный отрицательный заряд. Значения pK оснований и фосфатных групп лишь в некоторых случаях отражают распределение плотности заряда, поскольку на величину pK влияет их основность, а не электроотрицательность. Так, при низких pH протонируются эндоциклические атомы азота, а не аминогруппы, а моноэфиры фосфатных групп имеют два основных значения pK – одно в области 1–2, а другое вблизи 7.

В растворе основания в принципе могут находиться в двух таутомерных формах. Однако обычные кето- и аминоформы всегда превалируют над енольной и имино-формами, доля которых, как правило, не превышает 0,1%. Эта величина, однако, может сильно меняться для модифицированных оснований или для оснований в составе пары.

ГЛАВА 6

Силы, стабилизирующие ассоциаты оснований: водородные связи и стэкинг-взаимодействие

Прежде чем переходить к описанию структуры нуклеотидов и их олиго- и полимерных комплексов, остановимся вкратце на особенностях взаимодействия между основаниями. Эти взаимодействия могут быть двух типов: а) между основаниями, лежащими в одной плоскости,–горизонтальное взаимодействие, реализующееся путем образования водородных связей, и б) между основаниями, уложенными одно над другим,–стэкинг-взаимодействие, которое обусловлено в основном дисперсионными лондоновскими силами и гидрофобными эффектами. Образование водородных связей выражено наиболее сильно в неполярных растворителях, где стэкинг пренебрежимо мал. В водных растворах основной вклад во взаимодействие вносит стэкинг, поскольку с донорами и акцепторами водородных связей между основаниями конкурируют молекулы воды. Оба типа взаимодействий были тщательно исследованы, особенно водородные связи, поскольку они выполняют очень важную функцию в процессах передачи генетической информации (см. обзоры [448, 449]).

6.1. СВОЙСТВА ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ

Водородные связи имеют электростатическую природу. Они играют ключевую роль в стабилизации вторичной структуры белков и нуклеиновых кислот, и им посвящено множество монографий и обзорных статей [192, 198, 450–452, 455, 456]. Мы рассмотрим только некоторые особенности образования водородных связей между основаниями.

Водородная связь X—H···Y образуется в том случае, когда атом водорода H связан с двумя электроотрицательными атомами X и Y. Сила связи (а следовательно, ее длина) зависит от заряда на атомах X, H и Y. О водородных связях, в которых X–это атом углерода, а Y–атом кислорода, мы уже говорили в разд. 4.9 (относительно распределения плотности заряда см. рис. 5.1).

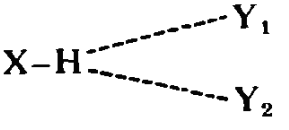
Водородные связи между основаниями могут быть двух типов: N—H···N и N—H···O. В обоих случаях донором является N—H-группа в амино- или иминоформе. В некоторых модифицированных основаниях, содержащих тиокетогруппу, образуется водородная связь типа

Таблица 6.1. Энергия некоторых ковалентных и водородных связей

Тип связи	Длина связи, Å	Энергия связи, ккал·моль$^{-1}$	Энергия, необходимая для удлинения связи на 0,1 Å, ккал·моль$^{-1}$
Ковалентная связь			
C—C	1,54 ± 0,02	83,1	3,25
C—H (в этане)	1,09 ± 0,02 [197]	98,8 [198]	3,60 [455]
Водородная связь			
O—H···O	2,75 ± 0,2 [456] (расстояние O ... O)	3 ÷ 6 [455]	0,1 [198]

N—H···S, однако сера обычно является более слабым акцептором, чем кислород [453, 454].

Водородные связи – это слабые связи с изменяющейся геометрией. Они в 20–30 раз слабее, чем ковалентные, имеющие совершенно определенную длину, силу и ориентацию (табл. 6.1). Водородные связи легче изгибаются и растягиваются, вследствие чего геометрия системы X—H···Y является непостоянной (табл. 6.2). Обычное требование, согласно которому расстояние H···Y должно быть меньше суммы вандерваальсовых радиусов атомов X и Y, в случае предельно длинной связи H···Y может не выполняться. В таких случаях используется менее жесткое требование, основанное на значениях радиусов по Аллингеру (см. табл. 3.1) [158, 451]. Относительно длинные и слабые водородные связи образуются в разветвленных системах типа



в которых два акцептора Y_1 и Y_2 конкурируют за один атом водорода [321, 451].

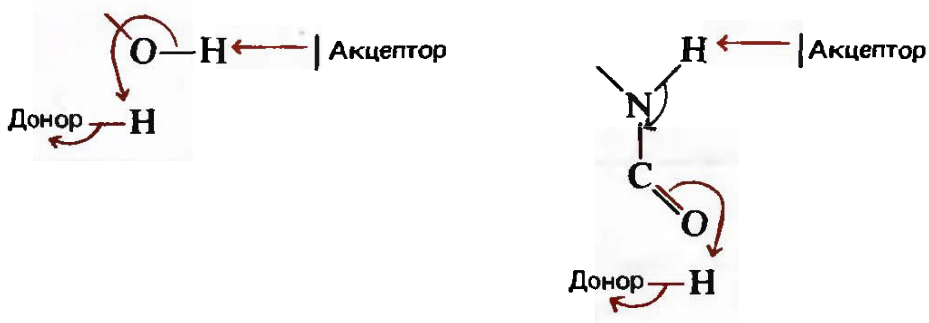
Аддитивность и кооперативность водородных связей. При образовании водородных связей происходит перераспределение зарядов: H становится еще более электроположительным, а X и Y – еще более электроотрицательными. Это способствует тому, что X и Y образуют водородные связи и с другими атомами. Если Y представляет собой атом кислорода гидроксильной группы, то из-за поляризации связанного с ним водорода он становится еще лучшим донором. Подобная кооперативность [451] обычно наблюдается в бифункциональных системах типа X—H···X—H···X—H···, в которых каждый донор одновременно выступает также в роли акцептора и наоборот. Примерами такого рода

Таблица 6.2. Некоторые геометрические параметры водородных связей, образующихся при спаривании оснований [192, 321, 450, 453, 454]

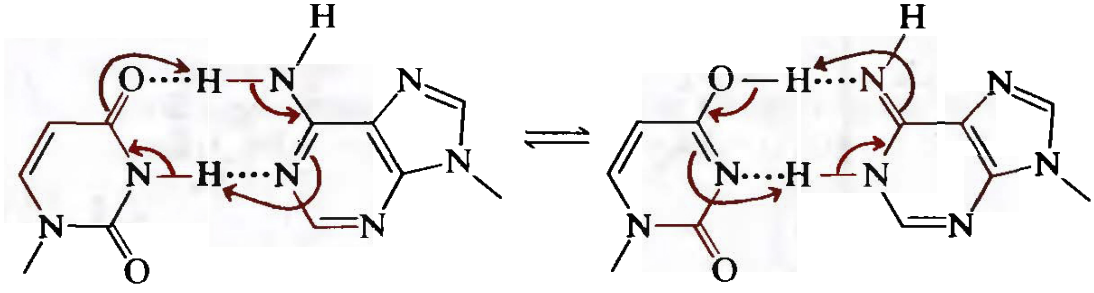
Система	Расстояния или углы		Среднее
	минимум	максимум	
N–H · · · N			
N · · · N	2,75	3,15	2,90
N–H	0,86	1,02	0,95
H · · · N	1,78	2,02	1,99
N–H · · · N	2°	17°	9°
N–H · · · O			
N · · · O	2,74	3,07	2,95
N–H	0,83	1,06	0,95
H · · · O	1,83	2,17	1,95
N–H · · · O	3°	23°	9°
O–H · · · O			
O · · · O	2,60	3,05	2,73
O–H	0,68	1,16	0,86
H · · · O	1,74	2,20	1,95
O–H · · · O	1°	20°	8°
N–N · · · S			
N · · · S	3,25	3,55	3,32
N–H	0,84	1,04	0,95
H · · · S	2,27	2,57	2,40
N–H · · · S	1°	25°	15°

могут служить гидроксилы нуклеозидов и основания, имеющие формально одинаковую электронную структуру:

Здесь Z – это эндоциклический атом азота (незамещенный) или атом кислорода (кетогруппы). Эквивалентность простой X—H-системе становится еще более наглядной, если представить схему делокализации электронов:



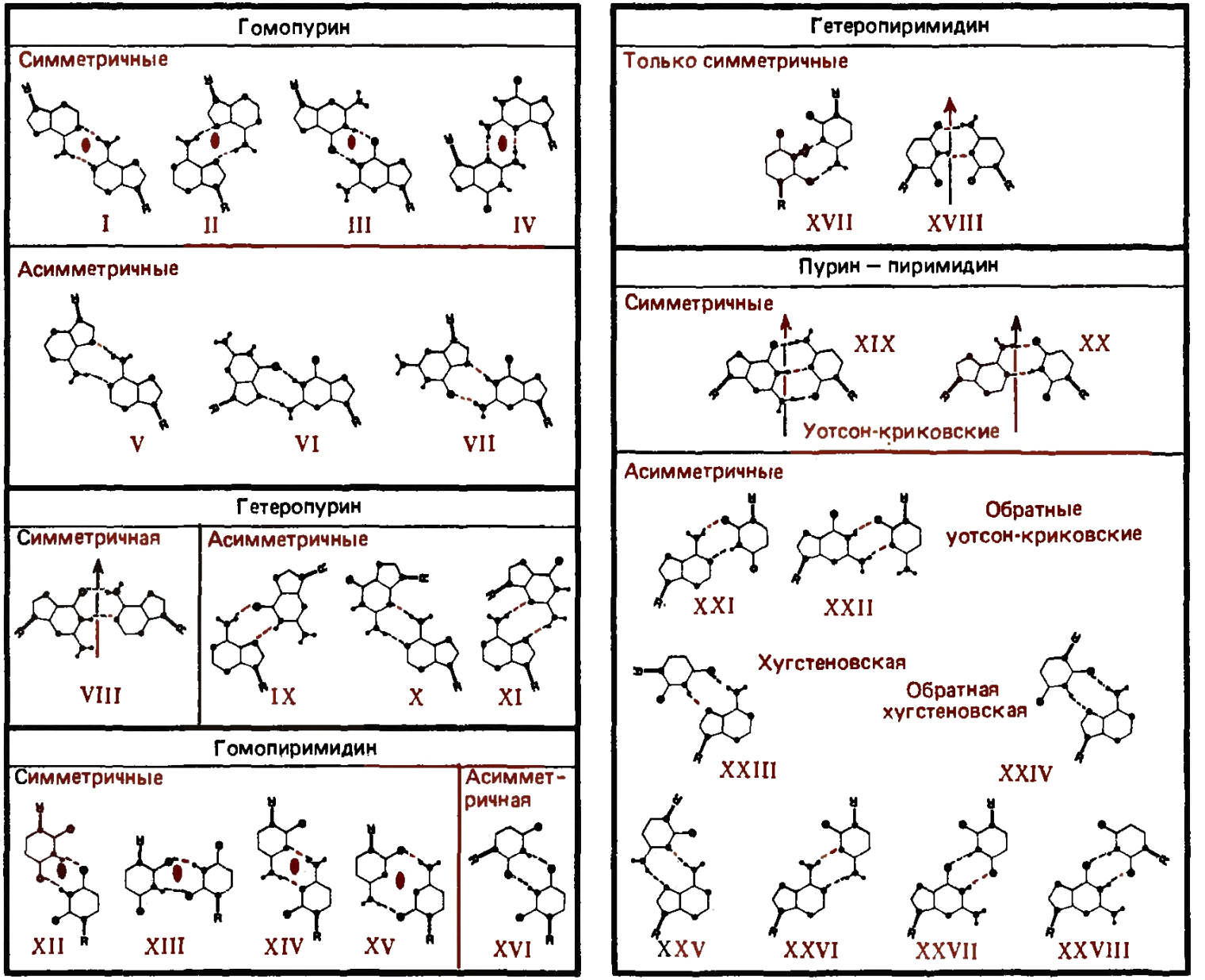
Эта схема иллюстрирует не только геометрию образования водородных связей; она позволяет предположить, что основания преимущественно образуют комплексы, стабилизируемые по крайней мере двумя водородными связями. Более того, можно ожидать, что вследствие описанной кооперативности атомы водорода будут согласованно переходить от донора одного из партнеров к акцептору другого:



Такой переход лишь слабо повлияет на геометрию пары и не скажется на уотсон-криковском спаривании, поскольку комплементарность в пределах пары по-прежнему сохранится. Результаты недавних исследований тРНК методом ЯМР показали, что в водном растворе в любой момент времени от 5 до 15% всех пар находится в имино-енольной форме, правда соответствующая константа скорости невелика: $100 \div 300\ с^{-1}$ [456а]. Однако спектры ЯМР можно объяснить и по-другому, с привлечением анизотропных эффектов, и кажется более правдоподобным, что атомы водорода остаются на амино/кето-группах и не переходят от доноров к акцепторам.

6.2. ТИПЫ ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ОСНОВАНИЯМИ: СИММЕТРИЯ ПОЛИНУКЛЕОТИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Взаимодействия между одинаковыми (гомо) и разными (гетеро) основаниями были выявлены при анализе кристаллических структур как изолированных оснований, нуклеозидов и нуклеотидов, так и комплексов, составленных из двух или более соединений этого типа (см. обзор [192]). Если предположить, что стабильная пара оснований должна содержать как минимум две водородные связи, N—H···O и N—H···N, то четыре основания, замещенные по гликозидному азоту (N_1 в пиримидинах и N_9 в пуринах), могут образовать 28 различных пар (рис. 6.1) [33, 457].


Гомопурин
Симметричные
I
II
III
IV
Асимметричные
V
VI
VII
Гетеропурин
Симметричная
Асимметричные
VIII
IX
X
XI
Гомопиримидин
Симметричные
Асимметричная
XII
XIII
XIV
XV
XVI
Гетеропиримидин
Только симметричные
XVII
XVIII
Пурин — пиримидин
Симметричные
XIX
XX
Уотсон-криковские
Асимметричные
XXI
XXII
Обратные уотсон-криковские
Хугстеновская
Обратная хугстеновская
XXIII
XXIV
XXV
XXVI
XXVII
XXVIII

Среди 28 пар осиований имеются пары с осью симметрии 2-го порядка, с псевдоосью симметрии 2-го порядка и пары, вовсе не обладающие симметрией. На рис. 6.1 представлены 28 пар оснований, разделенных на группы в соответствии с тем, какие основания образуют пару: пурин–пурин, пиримидин–пиримидин или пурин–пиримидин. В каждой группе гликозидные связи $C_{1'}$—N либо не связаны друг с другом никакими элементами симметрии (асимметричны), либо связаны осями симметрии 2-го порядка, которые располагаются в плоскости, перпендикулярной плоскости оснований, или в плоскости оснований. На рис. 6.2 они обозначены символами ● и ↑ соответственно. Обратите внимание, что в гомопуриновых и гомопиримидиновых парах оснований (I–IV и XII–XV) ось симметрии 2-го порядка в точности переводит одно основание в другое. Однако в гетеропуриновых и гетеропиримидиновых парах (VIII и XVII, XVIII), а также в уотсон-криковских пурин-пиримидиновых парах (XIX и XX) ось симметрии связывают только гликозидные связи $C_{1'}$—N, но не основания в целом, и поэтому называется псевдоосью симметрии.

Элементы симметрии присутствуют и в полинуклеотидных комплексах. Элементы симметрии в полинуклеотидных комплексах (гл. 9–13) представляют особый интерес, поскольку они связывают друг с другом не только гликозидные связи, но и сахарофосфатные остовы. Если основания в паре связаны друг с другом осью симметрии 2-го порядка, расположенной в плоскости, *перпендикулярной* плоскости оснований (символ ●), то направления $3' \rightarrow 5'$ обоих остовов совпадают и сами остовы являются идентичными. Если же основания в паре связывает ось симметрии 2-го порядка, лежащая *в плоскости* оснований (символ ↑), то остовы ориентированы антипараллельно (рис. 6.2). Сахарофосфатные остовы параллельны, например, в $[poly(AH^+)]_2$, где основания спариваются по схеме II, представленной на рис. 6.1 [458]. Антипараллельная направленность имеет место в ДНК, РНК и poly(A)·poly(U), в которых спаривание оснований является уотсон-криковским [8]. Особое место занимают poly(U) и его 2-тиокето-производное poly(s^2U), которые образуют антипараллельные двойные спирали с асимметричными парами

Рис. 6.1. 28 возможных пар оснований, при формировании которых образуются как минимум две водородные связи [33, 457]. Атомы водорода и азота изображены маленькими и большими темными кружками соответственно, атомы кислорода – светлыми кружками, а гликозидные связи – жирной линией; R – $C_{1'}$-атом рибозы. Пары оснований разбиты на группы в соответствии с их составом и симметрией. Группы состоят из симметричных или асимметричных пар, содержащих только пурины, только пиримидины, или из пар, представляющих собой смешанные пурин-пиримидиновые ассоциаты. Символами ● и ↑ обозначены оси симметрии 2-го порядка, лежащие в плоскости, перпендикулярной плоскости рисунка, и в плоскости рисунка соответственно (рис. 6.2). Уотсон-криковские пары XIX и XX, а также VIII и XVIII псевдосимметричны: ось симметрии связывает только гликозидные связи, но не атомы самих оснований.

Рис. 6.2. В зависимости от ориентации гликозидной связи $C_{1'}$—N в парах может иметь место симметрия 2-го порядка двух типов. На этом рисунке гликозидные связи обозначены отрезками, отходящими от прямоугольников, которые изображают пары оснований. Оси симметрии 2-го порядка (диады) могут располагаться как в плоскости, перпендикулярной плоскости пары (*слева*), так и в самой плоскости оснований (*справа*); этим задается ориентация связанных с основаниями сахарофосфатных групп, т. е. остовов полинуклеотидных цепей. Если двойная спираль имеет ось симметрии 2-го порядка, которая лежит в плоскости, перпендикулярной плоскости пары (и соответственно совпадает с осью спирали; *слева*), то цепи будут направлены параллельно друг другу. Если же ось симметрии двойной спирали располагается в плоскости пары и соответственно перпендикулярна оси спирали, то направление цепей будет антипараллельным (*справа*). В уотсон-криковских ДНК и РНК цепи направлены именно таким образом (см. также рис. 6.3, *А* и *Б*).

оснований типа XVI. В этом случае два сахарофосфатных остова неидентичны друг другу и имеют разную конформацию [459–461] (гл. 13).

Термин «связанные операцией симметрии», строго говоря, применим только к кристаллическим полинуклеотидным комплексам. В этих комплексах кристаллографические оси совпадают с осями, связывающими гликозидные связи (рис. 6.2). Поэтому вступают в силу все ограничения, налагаемые пространственной группой симметрии, молекулы располагаются в строгом порядке в соответствии с кристаллографическими правилами. Если кристалл растворить, т. е. разрушить кристаллическую решетку, симметрия молекулы в общих чертах сохранится, но строгой кристаллографической симметрии уже может и не быть. Наглядным примером такого рода является кристаллическая структура волокон ДНК. В В-форме ее «пронизывает» кристаллографическая ось симметрии 2-го порядка, и структура в точности повторяется через каждые 10 пар (один виток, или один период по оси *c*). В растворе или в случае, когда ДНК адсорбирована на плоскую поверхность, период равен $10{,}4 \pm 0{,}1$ и $10{,}6 \pm 0{,}1$ парам оснований соответственно [462, 463]. В кри-

сталлическом двухцепочечном ДНК-додекануклеотиде вообще ни одна из кристаллографических осей не совпадает с осью симметрии, связывающей основания в паре; период равен 10,3–10,4 парам оснований [464], а для центральных шести пар – 9,8 (гл. 10).

6.3. ДЕТАЛЬНАЯ ГЕОМЕТРИЯ УОТСОН-КРИКОВСКИХ И ХУГСТЕНОВСКИХ ПАР ОСНОВАНИЙ

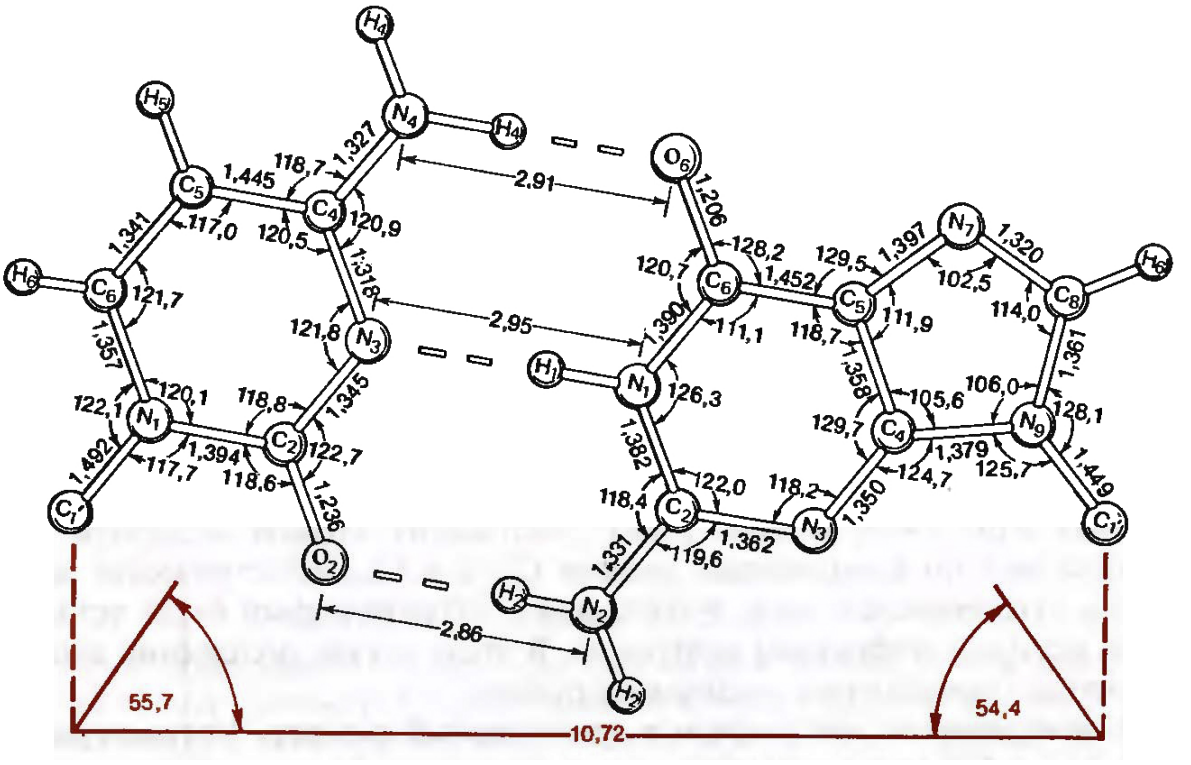
Рассмотрим уотсон-криковские и хугстеновские пары более подробно (рис. 6.3 и 6.4). Все углы и расстояния, приведенные на рис. 6.3, для неводородных атомов получены по результатам рентгеноструктурного анализа ApU [465] и GpC [466]. Положения атомов водорода рассчитывались по координатам атомов C, N и O. Геометрические параметры хугстеновской пары 9-этиладенин—1-метилтимин были установлены методом дифракции нейтронов. В этом случае положения атомов водорода определялись экспериментально.

Геометрический изоморфизм и пропеллерный поворот. Уотсон-криковские AU- и GC-пары изоморфны, т. е. близки по форме и имеют одинаковые размеры. В AU-паре расстояние $C_{1'}\cdots C_{1'}$ примерно на 0,3 Å меньше, чем в паре GC, а углы между прямой, соединяющей эти атомы, и гликозидными связями $C_{1'}$—N лежат в интервале 54,4—57,4°. Если пренебречь этой незначительной разницей в 3°, можно считать, что гликозидные связи связаны друг с другом псевдоосью симметрии 2-го порядка (рис. 6.3, *Б*).

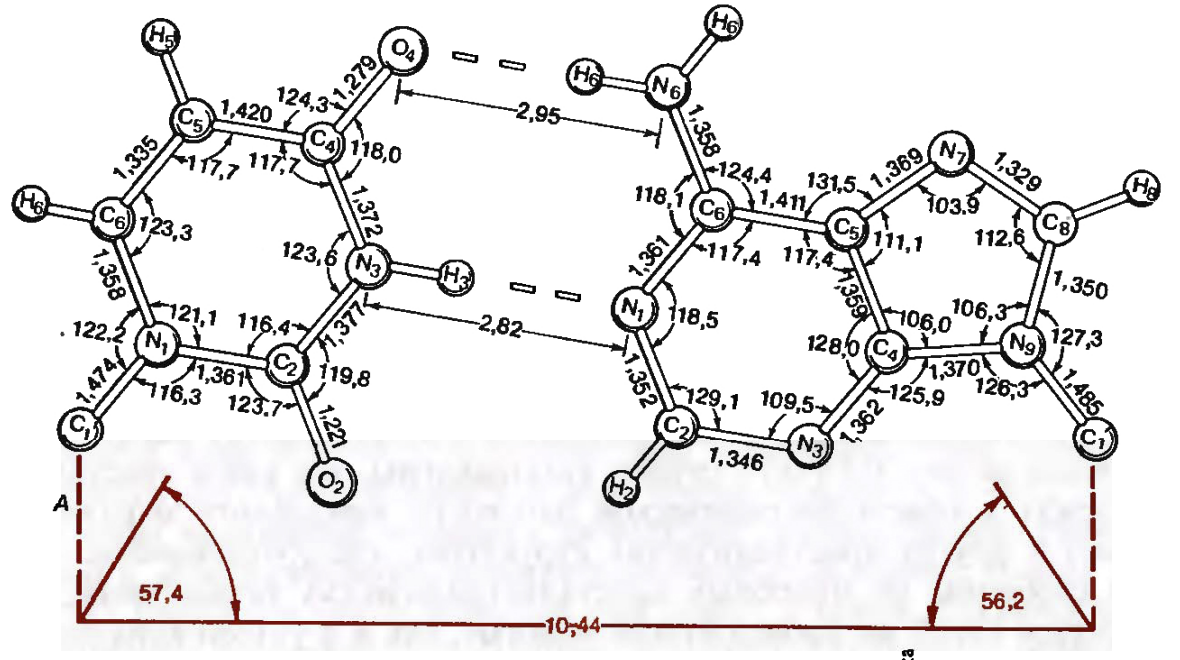
Два основания в парах AU и GC некомпланарны, они повернуты друг относительно друга, подобно лопастям пропеллера. Угол пропеллера в паре AU равен 12°, а в паре GC—7°. Примерно такую же величину имеют углы пропеллера и в других парах оснований [192].

В противоположность этому основания в хугстеновских парах, изображенных на рис. 6.4 [467], строго компланарны, так как в кристаллах они лежат в кристаллографической плоскости зеркального отражения. Однако в других кристаллических структурах, где хугстеновские AU-пары свободны от подобных кристаллографических ограничений, наблюдается такой же пропеллерный поворот, как и в уотсон-криковских. Угол пропеллера в паре 9-метиладенин—1-метил-5-иодурацил составляет 9° [468]. В хугстеновской паре расстояние $C_{1'}\cdots C_{1'}$ на 2 Å меньше, чем в уотсон-криковской, и составляет 8,645 Å, а угол между соответствующей прямой и гликозидной связью $C_{1'}$—N для пуриновых и пиримидиновых оснований различается более чем на 10°; иными словами, псевдоось симметрии 2-го порядка отсутствует.

Структурная неупорядоченность: хугстеновские и обратные хугстеновские пары оснований. Методом дифракции нейтронов в кристаллической структуре комплекса 1-метилтимин—9-метиладенин была выявлена некая неупорядоченность [467], выражающаяся в том, что 10–13% молекул 1-метилтимина повернуты на 180° вокруг оси C_6—N_3. На возможность образования такой структуры указывал в своей оригинальной

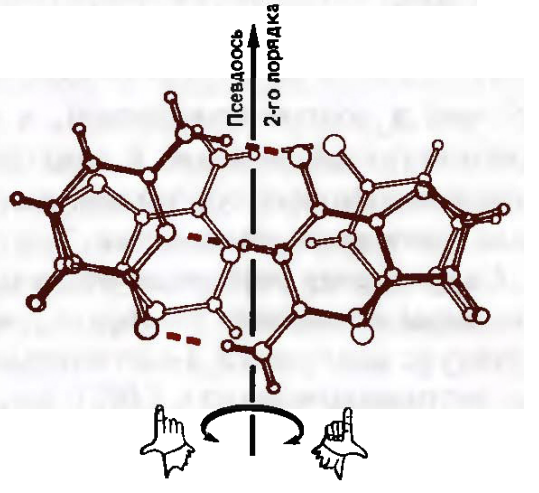


2,91
2,95
2,86
55,7
54,4
10,72



2,95
2,82
57,4
56,2
10,44

А



Псевдоось
2-го порядка

Б

работе сам Хугстен [469]. Одновременное присутствие хугстеновских и обратных хугстеновских пар оснований (структуры XXIII и XXIV на рис. 6.1) можно объяснить симметрией 1-метилтимина: поворот на 180° приводит к тому, что место атома O_4 занимает атом O_2, при этом система водородных связей сохраняется. Картина, обратная только что описанной, наблюдается в комплексе 1-метил-5-бромурацил—9-этиладенин (5-метильную группу тимина замещает атом брома). В этом случае только 6% молекул 1-метил-5-бромурацила принимают участие в хугстеновском спаривании, а остальные 94% спариваются по обратному хугстеновскому типу [470]. Можно было бы предположить, что конфигурацию пары определяет изменение электронной структуры пиримидина, обусловленное заменой тимина на бромурацил. Однако в кристаллах комплекса 1-метил-5-фторурацил—9-этиладенин наблюдается только хугстеновское спаривание, так что определяющим фактором, по-видимому, является кристаллическая упаковка и стэкинг между основаниями [471].

6.4. ОБРАЗОВАНИЕ ПАР ОСНОВАНИЙ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ТЕРМОДИНАМИКИ, КИНЕТИКИ И ЗАКОНОВ КВАНТОВОЙ ХИМИИ: ЭЛЕКТРОННАЯ КОМПЛЕМЕНТАРНОСТЬ

Для определения констант ассоциации оснований, а также энтальпии и энтропии этого процесса использовались термодинамические методы. Спаривание оснований в водной среде представляет собой относительно малоэффективный процесс, поскольку за донорные и акцепторные группы, способные к образованию водородных связей, конкурируют молекулы воды. В результате возможно лишь качественное описание процесса. Слабопольный сдвиг сигналов от аминогрупп в спектрах ЯМР различных 5′-нуклеотидов позволил расположить эти нуклеотиды в порядке уменьшения их способности к ассоциации (образованию пары) [204]:

GMP с CMP > UMP > IMP ≫ AMP,
AMP с UMP ~ CMP ≫ IMP, GMP,
CMP с GMP ~ CMP > UMP > XMP, AMP, IMP

Рис. 6.3, *А*. Уотсон-криковское спаривание в кристаллах GpC (*вверху*) и ApU (*внизу*) [465, 466]. Координаты атомов водорода взяты не из экспериментальных данных, а рассчитаны исходя из расположения других атомов. Различия в длинах водородных связей N—H···O (2,86÷2,95 Å) и N—H···N (2,82÷2,95 Å) находятся в соответствии с данными табл. 6.2 и отражают «гибкость» подобного типа взаимодействий. Расстояние между атомами C_1' (10,4÷10,72 Å) и углы $C_1'\cdots C_1'$—N (примерно 53°) в этих парах практически совпадают и лежат в основе их геометрического изоморфизма. *Б*. Схема, иллюстрирующая изоморфизм и псевдосимметрию уотсон-криковских пар.

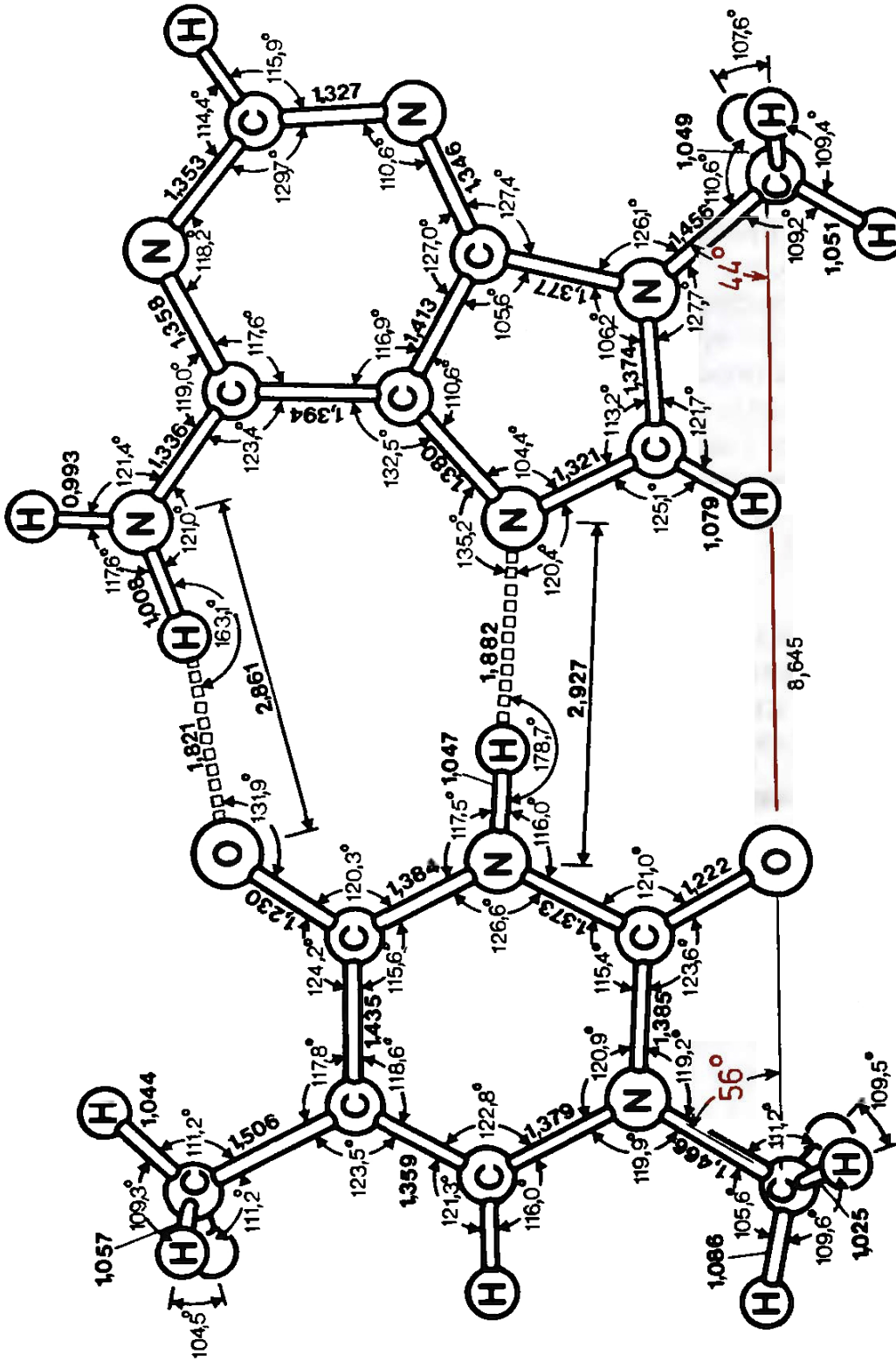


Рис. 6.4. Хугстеновская пара оснований 9-этиладенин—1-метилтимин. Данные получены с помощью метода нейтронного рассеяния, позволяющего локализовать атомы водорода [467]. Обратите внимание на различие в значениях углов $C_1 \cdot \cdots C_1 \cdot$—N (56 и 44°) и относительно небольшое расстояние $C_1 \cdot \cdots C_1 \cdot$ (8,645 Å). Водородные связи NH···O и NH···N обозначены пунктиром.

Для количественного исследования процесса ассоциации оснований необходимо использовать неполярные растворители, в которых роль водородных связей возрастает, а стэкинг между основаниями становится пренебрежимо малым [204]. В ряде работ исследовались основания, содержащие замещенный гликозидный азот, с использованием в качестве растворителей тетрахлорметана, хлороформа и диметилсульфоксида. За ассоциацией оснований следили по изменению сигналов ЯМР аминогрупп и по изменению их ИК-спектра (рис. 6.5) [472, 473]; применялись также калориметрические и осмометрические методы.

В растворе образуется смесь уотсон-криковских и хугстеновских пар оснований, в которых имеются как минимум две водородные связи и используются все потенциальные донорные и акцепторные группы. Как следует из данных, представленных на рис. 6.6, константы ассоциации оснований сильно зависят от химической природы взаимодействующих партнеров. В ряду комплексов типа 9-этиладенин—1-циклогексилурацил 3-метилурацил вообще не образует комплекса с аденином. Это означает, что для образования димера недостаточно одной водородной связи между аминогруппой аденина и карбонильным кислородом урацила; для этого необходимы по крайней мере две водородные связи (циклический димер). Очевидно, что константа ассоциации зависит от кислотности водородных атомов иминогруппы урацила (табл. 5.4): при низкой кислотности (например, в случае 5,6-дигидро-1-циклогексилурацила; $pK = 11$) наблюдается слабая ассоциация оснований, а при высокой (например, в случае 5-бромпроизводного, $pK = 7{,}8$) – сильная. В 4-тиоурациле ($pK = 7{,}4$) эффект высокой кислотности уравновешивается слабой акцепторной способностью атомов серы.

Интересно сравнить константы ассоциации при образовании комплекса между 1-циклогексилурацилом и тремя представителями ряда 9-этиладениновых производных: 9-этил-6-метиламинопурином, 9-этил-2-аминопурином и 9-этиладенином (рис. 6.6). Константа ассоциации с последним соединением (100 л·моль$^{-1}$) вдвое выше, чем с первыми двумя (50 и 45 л·моль$^{-1}$). Это может означать, что аденин связывается с производными урацила и по схеме Уотсона–Крика, и по схеме Хугстена (пары оснований XX и XXIII на рис. 6.1). Статистическое преимущество перед последними двумя соединениями обеспечивается наличием двух способных к образованию водородных связей групп. Разграничить обычные и обратные уотсон-криковские и хугстеновские пары оснований не удается, так что все данные по ассоциатам AU относятся к смеси указанных пар оснований.

Свойства водородных связей с атомами O_2 и O_4 урацила определяются электроотрицательностью последних. Смесь пар оснований AU изучали методом ^{13}C-ЯМР по изменению сигналов от атомов C_2 и C_4 карбонильных групп в производных 1-циклогексилурацила при образовании ими комплекса с 9-этиладенином в хлороформе (система, аналогичная изображенной на рис. 6.6). Оказалось, что частота связывания с атомом O_4 уменьшается, а с атомом O_2 увеличивается в следующем

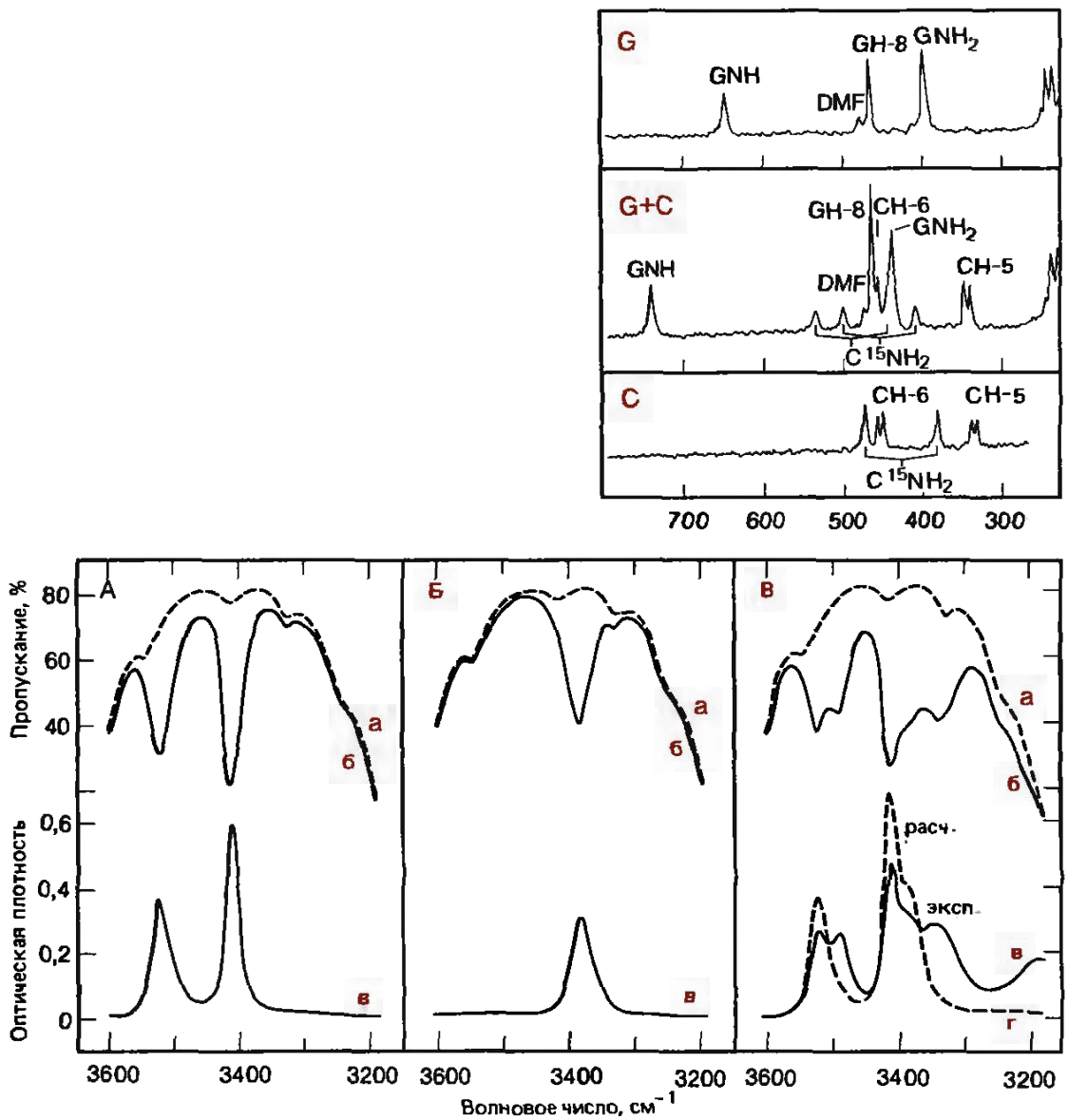


Рис. 6.5. Эффект ассоциации оснований. *Вверху*: спектры ПМР 9-метилгуанина (G), 1-[7-^{15}N]метилцитозина (C) и их эквимолярной смеси (G + C) в растворе дейтерированного диметилсульфоксида/диметилформамида (DMF) [472]. ^{15}N-замещенный цитозин был использован для того, чтобы в спектре выявился дублет C—$^{15}NH_2$, который иначе не был бы виден на фоне сигналов от протонов ароматической группы. Спектры получены на спектрометре Varian A-60; по оси абсцисс отложен химический сдвиг (в Гц) в сторону слабых полей относительно эталонного соединения ТМС (тетраметилсилана). *Внизу*: ИК-спектры 2,6-диамино-9-этилпурина (А), 1-циклогексил-5-бромурацила (Б) и их эквимолярной смеси (В) [473]. Во всех случаях растворителем является 0,002 М дейтерированный хлороформ. В верхней части каждого из рисунков приведены спектры пропускания чистого растворителя (*а*) и исследуемого раствора (*б*). В нижней части приведены разностные спектры поглощения (*в*). Пунктирная кривая *г* является суммой кривых *в*, приведенных на рис. А и Б; разность между ней и экспериментальной кривой *в* прямо указывает на наличие водородных связей в комплексе.

ряду [474]:

тимин, урацил, 5-бромурацил, 4-тиоурацил.

В таком же порядке уменьшается электроотрицательность атома O_4; 5-метильная группа тимина отталкивает электроны, и электроотрицательность атома O_4 увеличивается, тогда как 5-бром притягивает электроны, что приводит к обратному эффекту. Это последнее обстоятельство помогает понять, почему включение 5-бромуридина в ДНК

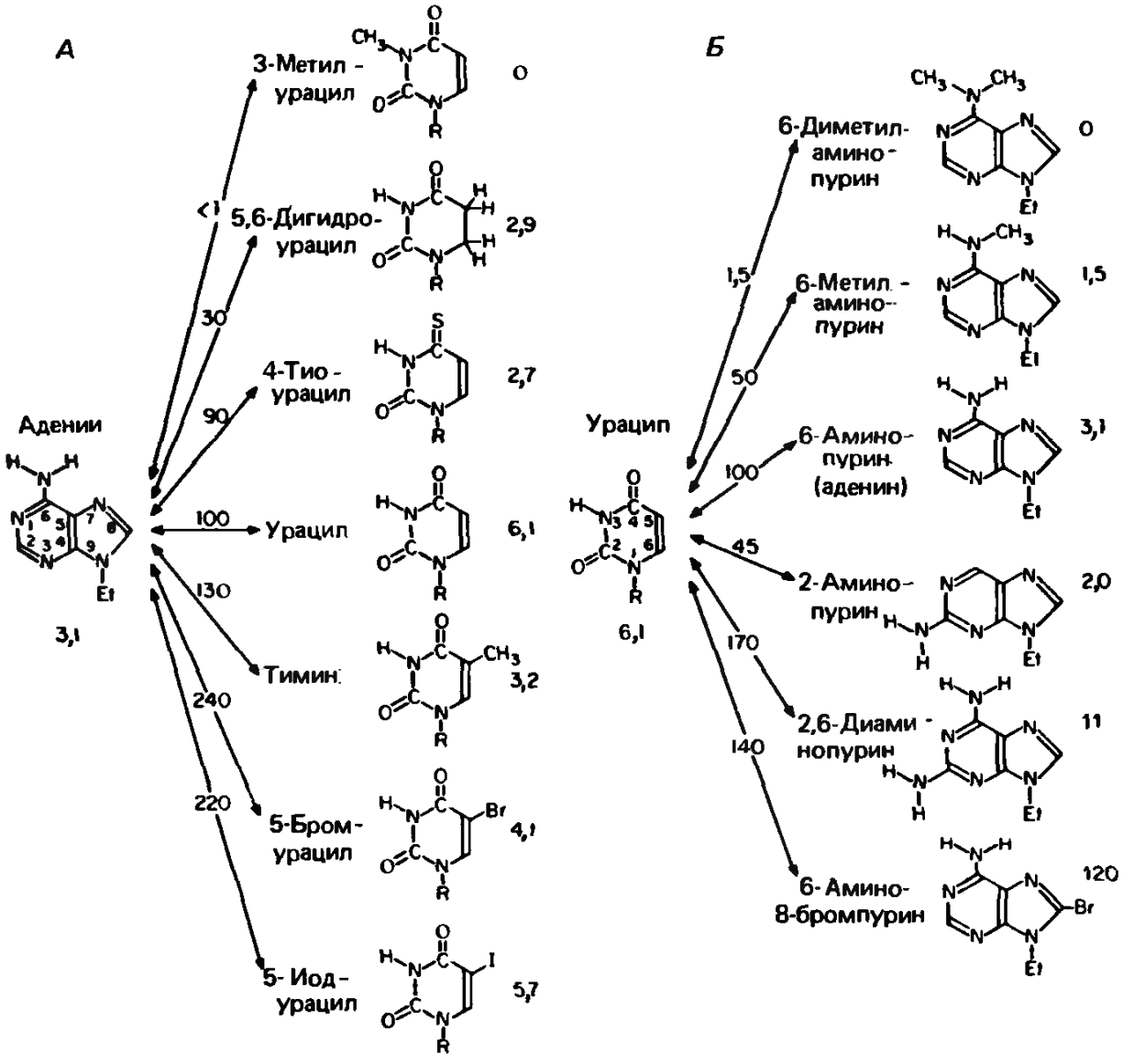


Рис. 6.6. Константы ассоциации (л·моль$^{-1}$) различных производных 1-циклоурацила и 9-этиладенина (в дейтерированном хлороформе при 25°С) [473]. Данные получены с помощью ИК-спектроскопии (см. подпись к рис. 6.5). Числа у стрелок – это константы ассоциации соответствующих производных аденина и урацила, а числа, расположенные справа от структурных формул соединений,– константы самоассоциации. *А*. Ассоциация 9-этиладенина с производными урацила. *Б*. Ассоциация 1-циклогексилурацила с производными аденина.

приводит к мутациям с нарушением спаривания оснований. Если атом O_2 образует водородную связь с большей вероятностью, чем атом O_4 в противоположность тому, что имеет место в тимидине, то совершенно очевидно, что для образования пары G—5-BrU (пара XXVIII на рис. 6.1) 5-бромурацилу совсем не обязательно переходить в редкую таутомерную форму, чтобы геометрия этой пары стала подобна геометрии пары GC [475].

При повышенных концентрациях могут образоваться олигомерные мультиплеты оснований. В обычных условиях комплекс AU представляет собой димер, а не тример или олигомер более высокого порядка. То же самое относится и к самоассоциатам UU и AA. Об этом свидетельствует наличие в ИК-области полосы с $\nu_{max} = 3490$ см$^{-1}$, которая отвечает свободному атому водорода N—H-группы аденина. Если бы и уотсон-криковские, и хугстеновские центры связывания были заняты (рис. 6.7), эта полоса отсутствовала бы. Комплексы из двух, трех и т. д. оснований образуются при повышенных концентрациях [476]. Среди них наибольший интерес представляет тример, состоящий из одной цепи poly(A) и двух цепей poly(U)–poly(A)·2 poly(U) (см. гл. 10).

Данные по термодинамике образования гомо- и гетерокомплексов с участием четырех оснований приводятся в табл. 6.3 [476–480]. Очевидно, что константы связывания и энтальпия сильно зависят от природы растворителя. Ясно также, что самоассоциаты менее стабильны, чем комплементарные AU- и GC-пары. Однако уменьшение энтропии во всех случаях примерно одинаково (от -11 до -16 э.е.), что указывает на сходство общей структуры всех ассоциатов: комплексы стабилизируются по крайней мере двумя водородными связями. Если считать, что вся энтальпия спаривания, составляющая примерно 6 ккал на 1 моль димера обусловлена только образованием водородных связей,

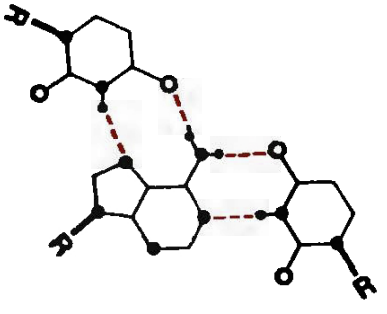


Рис. 6.7. В тримере A·2U основание A образует одновременно и уотсон-криковские, и хугстеновские водородные связи. ●–атомы азота, O–атомы кислорода, жирные линии–гликозидные связи. На этом рисунке изображены только нормальные уотсон-криковские и хугстеновские пары, которые формируются в тройной спирали poly(A)·2poly(U) (разд. 10.2). Если учесть, что существуют еще и обратные пары, можно представить четыре возможные схемы расположения оснований в тримере.

Таблица 6.3. Термодинамические параметры комплементарного спаривания и самоассоциации оснований путем образования водородных связей

Соединения, растворители и методы	Реакция	$K_{асс}$, л·моль$^{-1}$	$-\Delta H$, ккал·моль$^{-1}$	$-\Delta S$, э.е.
Гуанозин, цитидин в диметилсульфоксиде, ЯМР, 32°С [477]	$G + G \rightleftarrows G_2$	0,18	1,0 ± 1	
	$C + C \rightleftarrows C_2$	0,1	1,7 ± 1,5	
	$G + C \rightleftarrows GC$	3,7 ± 0,6	5,8	16
9-этилденин, 1-циклогексилурацил в хлороформе, ИК, 25°С [478]	$A + A \rightleftarrows A_2$	3,1 ± 0,3	4,0 ± 0,8	11,4 ± 2
	$U + U \rightleftarrows U_2$	6,1 ± 0,6	4,3 ± 0,4	11,0 ± 1
	$A + U \rightleftarrows AU$	103 ± 36	6,2 ± 0,6	11,8 ± 1,2
1-метилпиримидин, 9-метилпурин в вакууме, масс-спектрометрия [480][1)]	$A + U \rightleftarrows AU$		14,5	
	$G + C \rightleftarrows GC$		21,0	
	$U + U \rightleftarrows U_2$		9,5	
	$C + C \rightleftarrows C_2$		16,0	

[1)] Более полные данные см. в кн.: Веркин Б.И. и др. Взаимодействия биомолекул: новые экспериментальные подходы и методы.– Киев, «Наукова думка», 1985.

то на каждую водородную связь будет приходиться от 2 до 3 ккал·моль$^{-1}$ – величина, как раз и ожидаемая для такого типа взаимодействий (табл. 6.1). Однако расчет, проведенный для условий in vacuo, дает величину 7 ккал·моль$^{-1}$ [480].

Ассоциация пар лимитируется диффузией. Кинетику ассоциации оснований исследовали путем измерения затухания ультразвука на примере системы 9-этиладенин – 1-циклогексилурацил в хлороформе. Скорость образования дуплекса как в случае гомо-, так и в случае гетерокомплекса, по существу, лимитируется только диффузией и одинакова во всех трех случаях [481] (табл. 6.4). Однако скорость диссоциации для комплекса AU меньше, чем для комплексов AA и UU; это означает, что относительная прочность водородной связи уменьшается в ряду AU, AA, UU. К такому же выводу приводит и сравнение соответствующих констант ассоциации.

Таблица 6.4. Константы скорости ассоциации и диссоциации 9-этиладенина и 1-циклогексилурацила в хлороформе [481]

Реакция	Константа скорости		Температура, °С	
	Ассоциация, моль$^{-1}$·с$^{-1}$	Диссоциация, с$^{-1}$		
$U + U \rightleftarrows U_2$	$1{,}5 \cdot 10^9$	25 ± 10^7	25	
$A + A \rightleftarrows A_2$	$\geqslant 2 \cdot 10^9$	$\geqslant 60 \cdot 10^7$	25	
$A + U \rightleftarrows AU$	$4{,}0 \cdot 10^9$	$3{,}2 \cdot 10^7$	20	$\Delta H = -6{,}1$ ккал·моль$^{-1}$

Квантово-химические расчеты показывают [482–485], что основным фактором при специфическом взаимодействии оснований является электронная комплементарность. Результаты таких расчетов для некоторых комбинаций оснований представлены в табл. 6.5. Сравнение вкладов дисперсионных сил ($E_{дисп}$), поляризации ($E_{пол}$) и электростатических эффектов ($E_{эл}$) в полную энергию водородных связей четко показывает, что наиболее существенный вклад (примерно 80%) вносит $E_{эл}$, т.е. водородные связи в основном имеют электростатическую природу. Анализ зависимости $E_{полн}$ от состава пары свидетельствует о том, что стабильность таких комплексов зависит не только от числа водородных связей, но и в значительной степени от внутренней электронной структуры оснований. Этот факт был установлен ранее на основе измерения констант связывания и назван *электронной комплементарностью* [473].

Сравнение $E_{полн}$ для различных пар приводит к выводу, что комплементарные уотсон-криковские пары более стабильны, чем самоассоциаты индивидуальных компонентов. Все некомплементарные пары типа AG и GU менее стабильны, чем соответствующие самоассоциаты. Этот факт объясняет, почему некомплементарные пары не кристаллизуются. Исключение составляют замещенные основания, например 5-фторурацил, образующий комплекс с цитозином [486, 487]. У таких оснований электронная структура изменена, вследствие чего энергия связывания для них отличается от таковой у соответствующих природных аналогов. Особый интерес представляют так называемые «качающиеся» пары оснований, которые будут обсуждаться в разд. 6.9.

Таблица 6.5. $E_{полн}$ для некоторых пар оснований, полученная методами квантовой химии [484]

Пары оснований[1)]	$E_{эл}$	$E_{пол}$	$E_{дисп}$	$E_{полн}$
Комплементарные уотсон-криковские и хугстеновские пары				
G—C (XIX)	– 14,10	– 1,90	– 0,79	– 16,79
A—T (XX)	– 5,7	– 0,57	– 0,73	– 7,00
A—T (XXI)	– 5,47	– 0,64	– 0,86	– 6,97
A—U (XX)	– 5,68	– 0,66	– 0,87	– 7,21
A—U (XXIII)	– 4,93	– 0,70	– 0,98	– 6,61
A—U (XXIV)	– 5,26	– 0,64	– 0,95	– 6,85
Самокомплементарные пары				
A—A (V)	– 4,40	– 0,49	– 0,71	– 5,60
U—U (XII)	– 4,13	– 0,61	– 0,68	– 5,42
G—G (III)	– 13,71	– 1,72	– 0,61	– 16,04
C—C (XIV)	– 8,61	– 1,41	– 0,71	– 10,73
Некомплементарные пары				
A—G (VIII)	– 7,68	– 1,02	– 0,70	– 9,40
G—U (XXVIII)	– 6,08	– 1,12	– 0,67	– 7,78

[1)] Римские цифры в скобках указывают на тип спаривания оснований в соответствии с рис. 6.1.

6.5. ВЕРТИКАЛЬНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ОСНОВАНИЯМИ

Основания укладываются друг над другом, образуя высокие стопки наподобие стопок монет. «Горизонтальная» ассоциация оснований, обусловленная образованием водородных связей, наблюдается в неводных растворах, а также в газообразном и кристаллическом состояниях. Помимо этого, в твердой фазе основания почти всегда располагаются параллельно одно над другим на расстоянии вандерваальсового радиуса $\sim 3{,}4$ Å. Такое расположение является результатом не горизонтальных, а вертикальных взаимодействий. Стопки образуются и в водных растворах. Поскольку стэкинг играет важную роль в стабилизации спиралей нуклеиновых кислот [488, 489], мы рассмотрим его основные геометрические и термодинамические параметры, а также силы, лежащие в основе подобных взаимодействий (см. обзор [448]).

В двух сравнительных исследованиях [490, 491] упаковка оснований в комплексах с переносом заряда была сопоставлена с упаковкой в неполярных ароматических соединениях, таких, как бензол, нафталин, антрацен и фенантрен. Неполярные ароматические соединения не обладают дипольным моментом и в кристаллической решетке располагаются в виде «елочки», в которой соседние молекулы не параллельны, а перпендикулярны друг другу. Если, однако, в молекулу антрацена или фенантрена ввести атом азота, как это имеет место в молекулах акридина и этидия, то у нее появится дипольный момент; в результате молекулы в кристалле будут располагаться параллельно, образуя стопки.

Специфичность стэкинг-взаимодействия. Расположение оснований в виде стопок преобладает и в кристаллических структурах [490, 491]. При этом оказывается, что стэкинг-взаимодействие между основаниями довольно специфично: полярные заместители одного основания, $-NH_2$, $=N-$, $=O$ или галогены, нависают над ароматическим кольцом соседнего основания (рис. 6.8). Такого рода специфичность стэкинга даже более выражена, чем специфичность при образовании водородных связей. Рассмотрим, например, кристаллы дезоксиаденозинмоногидрата [492], аденозин-5′-фосфата [493], аденозин-5′-бромурацила [494] и дезоксигуанозин-5′-бромдезоксиуридина [398]. Во всех случаях пространственная группа кристаллов, размеры элементарной ячейки, молекулярная упаковка и система водородных связей различаются; и тем не менее пурины вступают в стэкинг-взаимодействие по одной и той же схеме, представленной на рис. 6.8, *А*. Специфичность стэкинга проявляется и в галогензамещенных основаниях. Атомы галогенов располагаются над примыкающими ароматическими гетероциклами на расстоянии, даже меньшем чем сумма вандерваальсовых радиусов для атомов галогена и атомов гетероцикла (рис. 6.8, *И*).

Анализ кристаллических структур некоторых нуклеозидов и нуклеотидов указывает на наличие тесного межмолекулярного контакта между атомом $O_{4'}$ сахара и примыкающим гетероциклом (рис. 6.8, *А*, *К*). Ве-

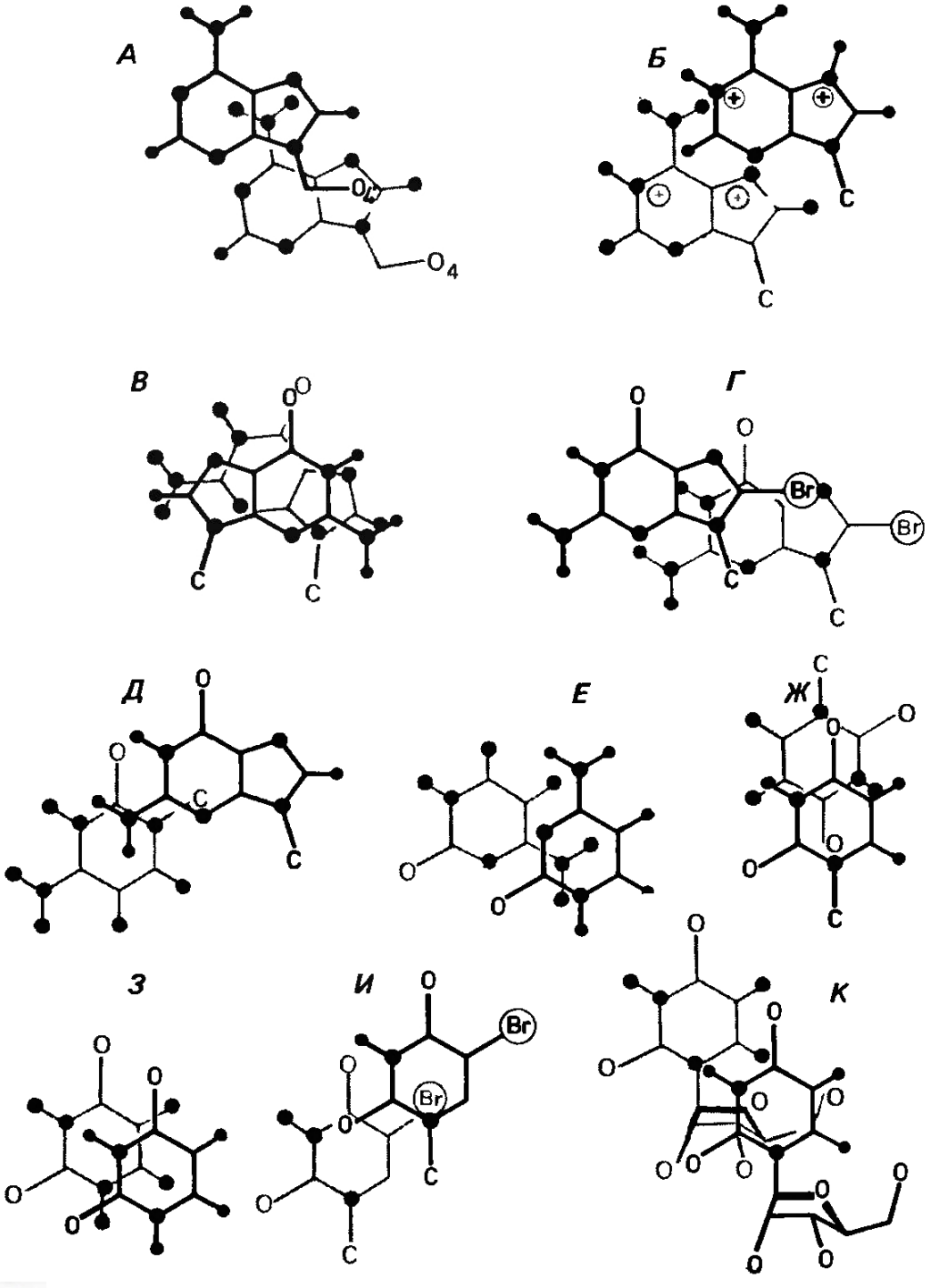


Рис. 6.8. Схемы стэкинг-взаимодействия между основаниями в кристаллах различных соединений (рисунок заимствован из статьи [491]). *А.* Стэкинг, наблюдающийся в кристаллах дезоксиаденозинмоногидрата [492], аденозин-5′-фосфата [493] и в комплексе аденозин—5-бромуридин [494]. *Б.* Стэкинг между протонированными пуринами (9-метиладениндигидробромид) [415]. *В.* Стэкинг в кристаллах гуанозина и инозина [495]. *Г.* Влияние галогенового заместителя на стэкинг в случае 8-бромгуанозина [496]; сравните со схемой *В*. *Д*–*Ж.* Взаимодействие между амино- или кетогруппами и пуриновыми или пиримидиновыми основаниями: *Д*–9-этилгуанин–1-метил-5-фторцитозин [497]; *Е*–цитозин-моногидрат [498]; *Ж*–9-этиладенин–1-метилурацил [499]. *З.* Перекрывание пиримидинов с участием эндоциклического атома азота урацила [500]. *И.* Влияние галогенового заместителя на стэкинг между пиримидиновыми основаниями в кристаллах 5-бромуридина [501] и 5-фтор-2′-дезоксиуридина [502]. *К.* Взаимодействие рибозного кольца с пиримидином (цитидин) [503].

роятно, в основе взаимодействий такого рода лежит низкая электроотрицательность атома $O_{4'}$ (разд. 5.1), что приводит к тесному сопряжению с π-электронной системой гетероцикла.

В кристаллах некоторых протонированных пиримидиновых оснований и нуклеотидов стэкинг не наблюдается вообще. Это позволяет думать, что заряженные пиримидины не вступают в стэкинг-взаимодействие. В случае протонированных пуринов стэкинг тем не менее имеет место, но носит другой характер, чем у незаряженных пуринов: атом N нависает над атомом N_7 примыкающего основания (рис. 6.8,*Б*).

Анализ типов стэкинга в кристаллах оснований, нуклеозидов и нуклеотидов показывает, что главную роль в стабилизации стэкинга играет, по-видимому, взаимодействие между постоянными и индуцированными диполями; в роли постоянного диполя, влияющего на π-электронную систему соседнего основания, выступают группы C=O и $C—NH_2$ [491].

6.6. ТЕРМОДИНАМИКА СТЭКИНГ-ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Процесс образования стопок аддитивен и лимитируется диффузией; в его основе лежат слабые взаимодействия. Осмометрическими методами [448, 504] было показано, что в водных растворах основания и нуклеозиды образуют ассоциаты при помощи вертикальных взаимодействий, причем помимо димеров образуются ассоциаты более высокого порядка (рис. 6.9). Как показали седиментационные измерения, этот процесс обратим. Увеличение свободной энергии на всех этапах одинаково, откуда следует, что присоединение основания к другому основанию или к стопке оснований носит аддитивный, некооперативный характер, так что процесс можно считать *изодесмическим* [505]. Приведенные в табл. 6.6 данные для пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов в водном растворе указывают, что 1) значения констант ассоциации K характерны для слабых взаимодействий; 2) энтальпия ΔH и энтропия ΔS отрицательны; 3) изменение стандартной свободной энергии ΔG по порядку величины не превышает энергию теплового движения kT (0,6 ккал·моль$^{-1}$); 4) метилирование оснований обычно приводит к небольшому увеличению стэкинг-взаимодействия.

Структуру стопок в водном растворе исследовали также методом ЯМР [506, 507]. При образовании стопки из двух гетероциклов протоны каждого основания подвергаются разэкранирующему эффекту за счет магнитной анизотропии, обусловленной кольцевыми токами соседнего основания. Вследствие этого с увеличением концентрации гетероциклов наблюдается сдвиг линий резонанского поглощения для протонов в сторону сильных полей (рис. 6.10). Относительный сдвиг для протонов оснований и сахаров в пуриновых нуклеозидах показывает, что в стэкинге принимает участие шестичленное пиримидиновое, а не пятичленное имидазольное кольцо и что ориентация гетероцикла в стопке зависит от типа основания, т.е. от его амино- и кето-замести-

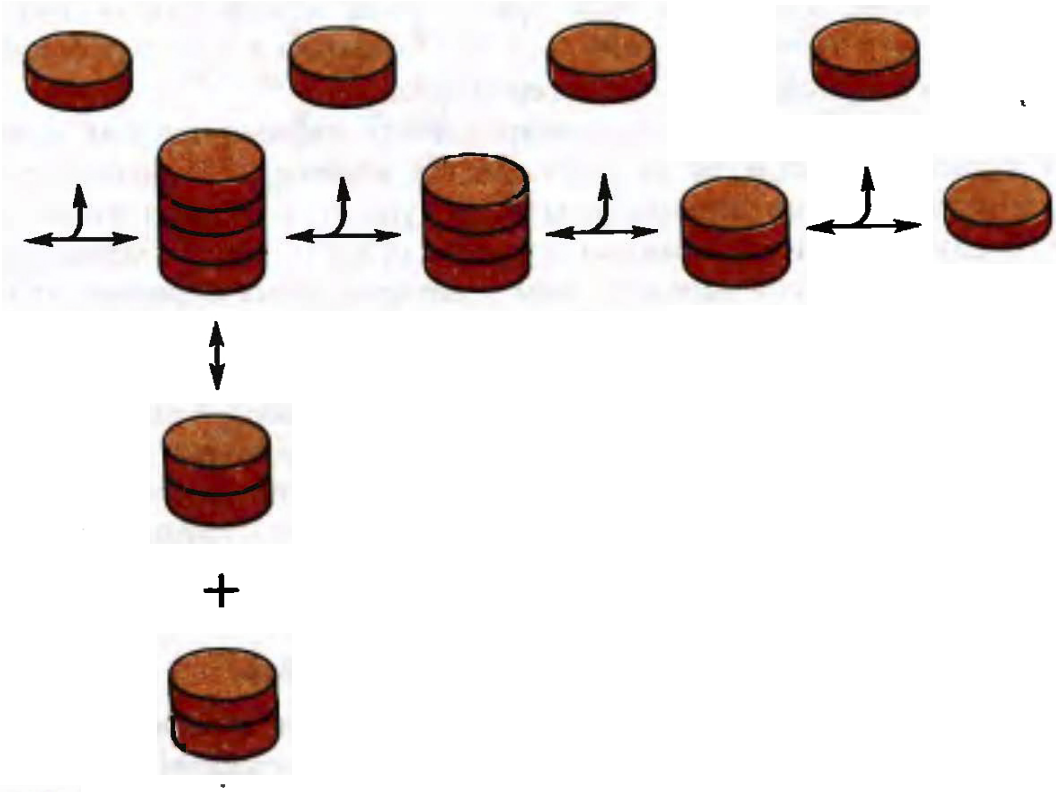


Рис. 6.9. Формирование стопок оснований в водной среде начинается с образования димера [544]. Дальнейшую ассоциацию можно рассматривать как *изодесмический* процесс, т.е. каждый следующий шаг не зависит от предыдущего и все они характеризуются одинаковыми кинетическими и термодинамическими параметрами.

телей [448]. Заметного уширения линий при ассоциации не наблюдается, откуда следует, что образование и разрушение агрегатов происходят слишком быстро по временным масштабам, характерным для ЯМР. Как показывают измерения поглощения звука, процесс агрегации, изображенный на рис. 6.9, лимитируется только диффузией [508].

Пурин-пуриновые стопки наиболее стабильны. Исследование растворимости в двухфазных системах и данные ЯМР показывают, что интенсивность стэкинг-взаимодействия между пуриновыми и пиримидиновыми основаниями уменьшается в следующем порядке [509–513]:

Пурин—Пурин > Пиримидин—Пурин > Пиримидин—Пиримидин.

В олиго- и полинуклеотидах стэкинг между соседними основаниями приводит к формированию стабильной одноцепочечной спиральной структуры [514]. Стабильность таких спиральных структур подчиняется таким же закономерностям, что и указанные выше: при комнатной температуре poly(A) представляет собой в основном спиральную структуру, а poly(U) находится преимущественно в состоянии разупорядоченного клубка.

Образование спиральной структуры одноцепочечными олигомерами

Таблица 6.6. Термодинамические параметры самоассоциации (стэкинга) нуклеозидов и оснований в водном растворе [448]

Соединение	K, л·моль$^{-1}$	ΔH, ккал·моль$^{-1}$	ΔS, э.е.	ΔG, ккал·моль$^{-1}$
6-метилпурин	6,7	$-6{,}0 \pm 0{,}4$	-16	$-1{,}12$
Пурин	2,1	$-4{,}2 \pm 0{,}2$	-13	$-0{,}44$
Рибозилпурин	1,9	$-2{,}5 \pm 0{,}1$	-7	$-0{,}38$
Дезоксиаденозин	от 4,7 до 7,5	$-6{,}5 \pm 1{,}0$	-18	$-1{,}00$
Цитидин	0,87	$-2{,}8 \pm 0{,}1$	-10	0,08
Уридин	0,61	$-2{,}7 \pm 0{,}1$	-10	0,29
Тимидин	0,91	$-2{,}4 \pm 0{,}3$	-9	0,06

можно представить как простой переход между двумя состояниями [514–522]:

Спираль (стэкинг-взаимодействие)$\rightleftarrows$Разупорядоченный клубок (стэкинг отсутствует)

Термодинамические параметры этого процесса для некоторых олигонуклеотидов приведены в табл. 6.7. ΔH, ΔS и T_m для ApU и ApA практически одинаковы; по-видимому, указанные выше правила, определяющие зависимость стэкинга от последовательности оснований, для таких коротких олигонуклеотидов не выполняются. Вместе с тем для димера CpC в соответствии с этими правилами стэкинг существенно меньше. Как отмечалось ранее (табл. 6.6), при алкилировании оснований стэкинг увеличивается; об этом свидетельствует повышение T_m с увеличением степени метилирования (табл. 6.7).

Предложенный ранее более сложный механизм образования структуры ApA, основанный на данных ЯМР [516] и результатах кинетических экспериментов [517], в дальнейшем подвергся серьезной критике [520]. Полученные недавно данные по круговому дихроизму и ЯМР вновь подтвердили, что модель двух состояний вполне адекватна. Эти же данные показали, что в спиральных олигорибонуклеотидах сахар находится в C_3,-*эндо*-конформации. В спиральных олигодезоксирибонуклеотидах преобладает C_2,-*эндо*-конформация, причем для концевого

Таблица 6.7. Термодинамические параметры стэкинга в некоторых динуклеозидфосфатах XpY

Соединение	ΔH, ккал·моль$^{-1}$	ΔS, кал·К$^{-1}$·моль$^{-1}$	T_m, °C
ApA [522]	$-8{,}5 \pm 0{,}5$	$-28{,}5 \pm 1{,}5$	$26{,}2 \pm 3$
CpC	$-8{,}5 \pm 0{,}5$	$-30{,}0 \pm 1{,}5$	$13{,}3 \pm 5$
ApU	$-7{,}3 \pm 0{,}5$	$-24{,}7 \pm 1{,}7$	$22{,}0 \pm 1{,}1$
m^6ApU	$-7{,}4 \pm 0{,}3$	$-24{,}8 \pm 0{,}9$	$26{,}9 \pm 0{,}9$
m_2^6ApU [518]	$-6{,}5 \pm 0{,}2$	$-20{,}9 \pm 0{,}7$	$36{,}7 \pm 0{,}8$
ApA	$-7{,}2 \pm 0{,}3$	$-24{,}5 \pm 0{,}9$	$21{,}9 \pm 0{,}9$
m_2^6Apm_2^6A	$-6{,}7 \pm 0{,}2$	$-21{,}1 \pm 0{,}7$	$44{,}5 \pm 0{,}8$

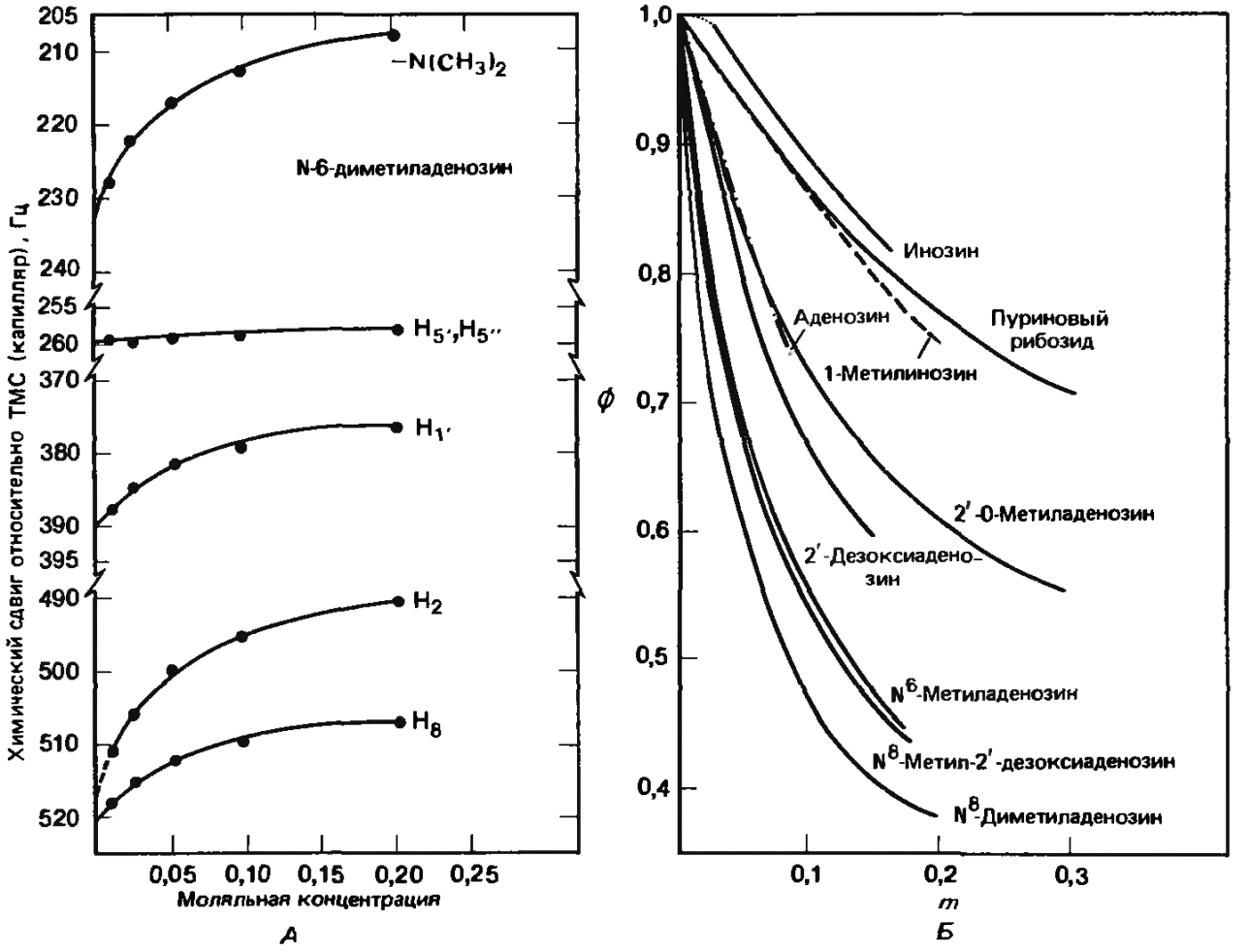


Рис. 6.10. Стэкинг оснований можно наглядно продемонстрировать с помощью ЯМР и путем измерения давления паров над разбавленным раствором [506]. *А.* Из зависимости химического сдвига протонов оснований от концентрации оснований можно оценить константу ассоциации образующихся стопок. Все спектры N_6-диметиладенозина в D_2O были получены при температуре 10°С. *Б.* Зависимость осмотического коэффициента ϕ для разных нуклеозидов в водном растворе от моляльной концентрации *m*. По таким кривым можно вычислить константы ассоциации и рассчитать свободную энергию образования соответствующих комплексов. Обратите внимание на сильную зависимость ϕ от метилирования оснований.

3'-нуклеотида наблюдается быстрый равновесный переход $C_{2'}$-*эндо* ⇄ $C_{3'}$-*эндо* [519]. Этот эффект должен приводить к расширению спектра конформационных состояний, и в свете этих новых данных следовало бы пересмотреть кинетические данные и данные ЯМР [516, 617].

6.7. СИЛЫ, СТАБИЛИЗИРУЮЩИЕ СТЭКИНГ ОСНОВАНИЙ: ГИДРОФОБНЫЕ СВЯЗИ И ЛОНДОНОВСКИЕ ДИСПЕРСИОННЫЕ СИЛЫ

В формировании стэкинга участвуют диполь-дипольные взаимодействия и π-электронные системы. Кроме того, имеются данные, что определенный вклад в стэкинг вносят лондоновские дисперсионные силы

[488, 489], а в водных растворах еще и гидрофобные силы [523, 524]. Как эти силы действуют?

Стэкинг оснований стабилизируется энтропийными факторами; льдоподобная вода и водные полости. В водном растворе основания стремятся объединиться в агрегаты и тем самым уменьшить контакты с растворителем. В предельном случае это приводит к образованию двухфазных систем. Для биологических макромолекул гидрофобные силы особенно важны: способствуя взаимодействию между неполярными боковыми группами аминокислот в белках и между основаниями в нуклеиновых кислотах, они вносят существенный вклад в стабилизацию вторичной и третичной структуры этих молекул [525–528]. Хотя значимость гидрофобных сил несомненна, их природа до сих пор остается предметом споров [529].

Агрегация молекул в водных растворах может происходить по двум причинам.

1. Если молекулы воды группируются у поверхности (гидрофобной) неполярной молекулы, образуя структуру, похожую на структуру льда [530], то энтропия системы при этом уменьшается, и с этой точки зрения такая ситуация является невыгодной. Если же растворенные молекулы агрегируют друг с другом, то суммарная поверхность, контактирующая с водой, уменьшается. Это приводит к высвобождению молекул структурированной воды, к увеличению ее энтропии и к стабилизации агрегатов [531–533].

2. Чтобы противодействовать силам поверхностного натяжения воды, растворенной молекуле выгодно образовать в воде полость. Если агрегируют две (или больше) растворенные молекулы, размеры полости увеличиваются. Это приводит к уменьшению площади поверхности, контактирующей с водой, и, следовательно, к уменьшению поверхностного натяжения, что в свою очередь ускоряет процесс агрегации [534, 535].

Какой из этих двух механизмов лежит в основе стэкинга? Как видно из табл. 6.6, образование стэкинга оснований в водном растворе является процессом экзотермическим и сопровождается отрицательным изменением энтропии, что вроде бы свидетельствует против механизма 1. Однако исследование системы актиномицин–дезоксигуанозин в водном растворе в присутствии метанола, а также изучение процесса тепловой денатурации динуклеозидфосфатов выявили «скрытое» положительное изменение энтропии, замаскированное общим отрицательным изменением энтропии [507, 536, 537]. По всей видимости, механизм 1 вносит более существенный вклад в стэкинг, чем механизм 2, и многочисленные эксперименты показывают, что гидрофобные силы играют здесь очень важную роль [512, 538, 539].

Специфичность стэкинга определяется диполь-дипольными взаимодействиями и лондоновскими дисперсионными силами. С помощью гидрофобных сил нельзя объяснить некоторые аспекты специфичности взаимодействия оснований: почему, например, пурины образуют более

стабильные стопки, чем пиримидины, или почему метилирование усиливает стэкинг-взаимодействие? Все эти особенности связаны с электронной структурой оснований и определяются главным образом лондоновскими дисперсионными силами и диполь-дипольными взаимодействиями.

Как было показано Лондоном [540], вандерваальсовы силы притяжения между атомами при их сближении в основном определяются электрокинетическими взаимодействиями между системами. Распределение заряда в группах атомов всегда асимметрично. Диполь, образовавшийся в одной группе атомов, приводит к поляризации электронной системы соседних атомов или молекул, индуцируя тем самым образование параллельно ориентированных диполей, которые притягиваются друг к другу. Эти силы аддитивны и обратно пропорциональны шестой степени расстояния между диполями. Они не зависят от температуры и пропорциональны произведению поляризуемостей взаимодействующих молекул [541]. Поскольку основания обладают еще и собственным дипольным моментом, два типа электронных эффектов – лондоновские дисперсионные силы и взаимодействие между постоянными диполями – дают весьма заметный эффект, который в пуринах проявляется сильнее, чем в пиримидинах.

Спаривание оснований путем образования водородных связей зависит от состава пары оснований, тогда как стэкинг зависит как от состава, так и от последовательности; результаты квантово-химических расчетов. Электростатические силы, действующие между основаниями в стопке и в паре, по самой своей природе связаны с распределением заряда, и их можно изучать квантово-химическими методами. Первые грубые оценки, полученные в рамках диполь-дипольного приближения, были затем уточнены с учетом монополь-монопольных, поляризационных и дисперсионных взаимодействий, а также отталкивания, представленного членом $1/r^{12}$ в уравнении (3.5) Леннард-Джонса [483, 484, 489, 537, 542, 543].

Данные, которые приводятся в табл. 6.8 для десяти возможных комбинаций пар оснований GC и AT в стопках, были получены в рамках геометрии B-формы ДНК (гл. 11). Если разложить полную энергию стабилизации димеров, образованных из разных пар оснований, на горизонтальную (спаривание) и вертикальную (стэкинг) составляющие [484, 542], то мы увидим, что горизонтальное комплементарное спаривание оснований путем образования водородных связей, зависящее только от состава пары, является более важным, чем вертикальный стэкинг, который зависит как от состава, так и от последовательности оснований.

Поскольку GC-пары более стабильны, чем AT (табл. 6.5), стопки из димеров с высоким GC-содержанием энергетически более выгодны, чем AT-богатые стопки. Так, энергия стэкинга для стопок $\begin{vmatrix} C\cdot G \\ G\cdot C \end{vmatrix}$ и $\begin{vmatrix} T\cdot A \\ A\cdot T \end{vmatrix}$

Таблица 6.8. Полная энергия стэкинга (ккал на моль димера) в десяти возможных димерах с геометрией В-ДНК, полученная в результате квантово-химических расчетов[1] [542]

Димер, образовавшийся в результате стэкинга пар оснований	Энергия стэкинга, ккал на моль димера
$\uparrow\begin{matrix}C\cdot G\\G\cdot C\end{matrix}\downarrow$	−14,59
$\uparrow\begin{matrix}C\cdot G\\A\cdot T\end{matrix}\downarrow\quad\uparrow\begin{matrix}T\cdot A\\G\cdot C\end{matrix}\downarrow$	−10,51
$\uparrow\begin{matrix}C\cdot G\\T\cdot A\end{matrix}\downarrow\quad\uparrow\begin{matrix}A\cdot T\\G\cdot C\end{matrix}\downarrow$	− 9,81
$\uparrow\begin{matrix}G\cdot C\\C\cdot G\end{matrix}\downarrow$	− 9,69
$\uparrow\begin{matrix}G\cdot C\\G\cdot C\end{matrix}\downarrow\quad\uparrow\begin{matrix}C\cdot G\\C\cdot G\end{matrix}\downarrow$	− 8,26
$\uparrow\begin{matrix}T\cdot A\\A\cdot T\end{matrix}\downarrow$	− 6,57
$\uparrow\begin{matrix}G\cdot C\\T\cdot A\end{matrix}\downarrow\quad\uparrow\begin{matrix}A\cdot T\\C\cdot G\end{matrix}\downarrow$	− 6,57
$\uparrow\begin{matrix}G\cdot C\\T\cdot A\end{matrix}\downarrow\quad\uparrow\begin{matrix}T\cdot A\\C\cdot G\end{matrix}\downarrow$	− 6,78
$\uparrow\begin{matrix}A\cdot T\\A\cdot T\end{matrix}\downarrow\quad\uparrow\begin{matrix}T\cdot A\\T\cdot A\end{matrix}\downarrow$	− 5,37
$\uparrow\begin{matrix}A\cdot T\\T\cdot A\end{matrix}\downarrow$	− 3,82

[1] Стрелки указывают направление сахарофосфатного остова (5′ → 3′) от $C_{3'}$-атома одного сахарного остатка к $C_{5'}$-атому следующего. Эти атомы углерода связаны друг с другом фосфодиэфирной связью.

различается на 8 ккал·(моль димера)$^{-1}$. Влияние последовательности оснований на энергию стэкинг-взаимодействия подчиняется следующей общей закономерности:

$$\uparrow\begin{matrix}5'\text{пиримидин}\cdot\text{пурин}_{3'}\\3'\text{пурин}\cdot\text{пиримидин}_{5'}\end{matrix}\downarrow \text{ более стабилен, чем } \uparrow\begin{matrix}5'\text{пурин}\cdot\text{пиримидин}_{3'}\\3'\text{пиримидин}\cdot\text{пурин}_{5'}\end{matrix}\downarrow$$

Например, энергия комплексов

$$\uparrow\begin{matrix}C\cdot G\\G\cdot C\end{matrix}\downarrow \text{ и } \uparrow\begin{matrix}G\cdot C\\C\cdot G\end{matrix}\downarrow$$

различается на 5 ккал на моль димера (табл. 6.8). Природа корреляции между энергией и нуклеотидной последовательностью становится по-

нятной, если рассмотреть геометрию перекрывания оснований при стэкинге (рис. 9.6). В чередующихся пурин-пиримидиновых последовательностях перекрывание между соседними основаниями в стопке определяется двумя типами последовательностей:

$$\left.\begin{matrix}5'\text{пиримидин}\\3'\text{пурин}\end{matrix}\right. \quad \text{или} \quad \left.\begin{matrix}3'\text{пурин}\\3'\text{пиримидин}\end{matrix}\right.$$

Перекрывание в таких димерах сильно отличается по геометрии от перекрывания в тех случаях, когда соседними основаниями в цепи являются только пурины или только пиримидины.

Следует подчеркнуть, что данные, представленные в табл. 6.8, получены для условий in vacuo и не учитывают гидрофобных взаимодействий, которые, однако, существенным образом влияют на стэкинг. По результатам экспериментов, которые обсуждаются в следующем разделе, был определен суммарный вклад спаривания оснований и стэкинга в стабильность спиральных олиго- и полинуклеотидов в водных растворах.

6.8. ОБРАЗОВАНИЕ И РАЗРУШЕНИЕ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ПРОИСХОДЯТ КООПЕРАТИВНО

Спираль, в которой основным повторяющимся мотивом является один виток, можно считать одномерной кристаллической решеткой. Формальная аналогия между спиралью и кристаллом проявляется и в их физических свойствах: разрушение обеих структур происходит кооперативно, при строго определенной температуре (плавление), а рост начинается после образования зародыша (нуклеации).

Кооперативный механизм образования спирали (механизм «застежка-молния») требует наличия зародыша, состоящего из трех пар оснований. На рис. 6.11 показана схема образования двойной спирали между poly(A) и poly(U). Первым шагом этого процесса является образование единственной пары AU с константой ассоциации, равной произведению параметра нуклеации β (10^{-3} л·моль$^{-1}$) на параметр роста цепи s (равный примерно 10 при 0°C и 1 при температуре плавления); оба параметра определяются по данным релаксационной кинетики. Поскольку образование первой пары зависит от параметра β, эта пара довольно нестабильна; образование же второй пары, вступающей в стэкинг-взаимодействие с первой, зависит только от константы s и поэтому протекает легче. Третья пара, укладываясь в стопку над первыми двумя, формирует зародыш, из которого путем добавления новых пар шаг за шагом создается спираль, аналогично тому, как застегивается «молния» [544].

Энергетический профиль этого процесса схематически изображен на рис. 6.12. Образование первой изолированной пары невыгодно и сопровождается увеличением свободной энергии системы. После формирова-

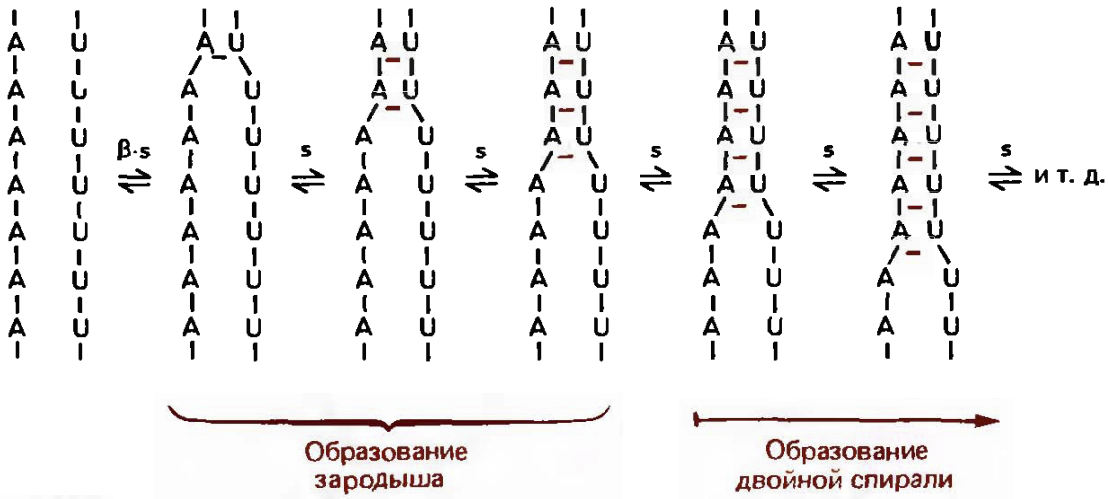


Рис. 6.11. Схематическое изображение процесса образования двойной спирали oligo(A)·oligo(U) [544]. В этой системе параметр роста спирали s равен примерно 10 при 0°C и 1 при температуре плавления. Константа ассоциации K первой пары равна βs, и, поскольку параметр нуклеации β равен 10^{-3} л·моль$^{-1}$, эта константа очень мала. Однако образование следующей пары происходит с константой $K = s$ в соответствии с *линейной моделью Изинга*. В противоположность изодесмической модели процесса образования стопок оснований (рис. 6.9), согласно которой каждый шаг не зависит от предыдущего, в *кооперативной модели Изинга* образование пар и стэкинг очень сильно зависят от ближайшего соседа. Исключение составляет только самый первый шаг – образование первой пары.

ния зародыша (стопки из трех последовательных пар оснований), который, однако, все еще легко разрушается, добавление новой пары становится выгодным и сопровождается уменьшением свободной энергии. С этого момента рост двойной спирали проходит самопроизвольно и определяется в основном геометрическими ограничениями, налагаемыми на сахарофосфатный остов стереохимией нуклеотидного звена: наиболее предпочтительной оказывается как раз та конформация, которая соответствует спиральной структуре. Этому же процессу способствуют образование водородных связей и стэкинг, и все указанные факторы совместно обусловливают кооперативность образования спирали и ее разрушения (плавления).

Одним из параметров, характеризующих двойную спираль, является ее температура плавления T_m. Образование стэкинга сопровождается уменьшением поглощения УФ-света (гипохромизм; рис. 6.13); поэтому, наблюдая за спектром поглощения в этой области, удобно следить за образованием и разрушением двойной спирали. Если медленно повышать температуру раствора двухцепочечной ДНК (или РНК), то при определенной температуре будет наблюдаться резкое увеличение поглощения, обусловленное разрушением спиральной структуры. Среднюю точку такого перехода называют температурой плавления (T_m). На рис. 6.14 приведены кривые плавления двухцепочечных молекул oligo(A)·oligo(U) разной длины. Видно, что с увеличением длины цепи

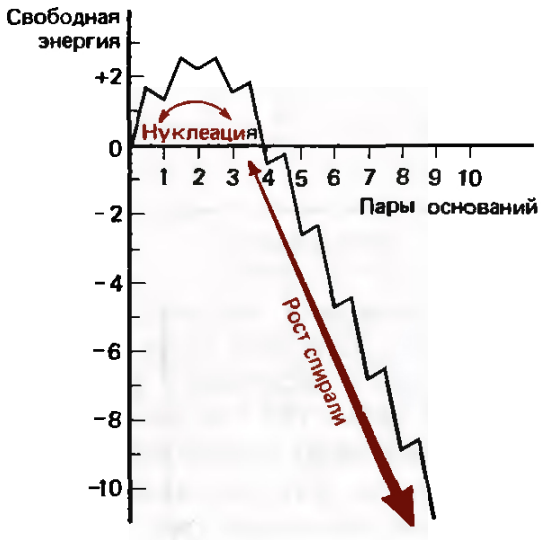


Рис. 6.12. Зависимость полной свободной энергии системы (в произвольных единицах) от числа пар, участвующих в стэкинг-взаимодействии и включившихся в спираль [544]. После преодоления энергетического барьера нуклеации последующий рост спирали сопровождается уменьшением свободной энергии и процесс протекает самопроизвольно.

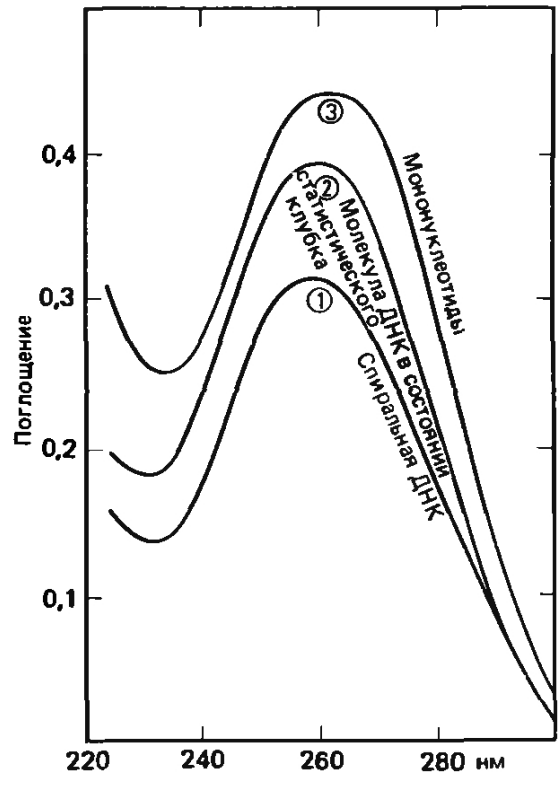


Рис. 6.13. Спектры поглощения нативной двухцепочечной ДНК (1), денатурированной ДНК (2) и мономерных нуклеотидов (3), стэкинг между которыми отсутствует (концентрация мономеров такая же, как в нативной ДНК). В денатурированной ДНК все еще сохраняется значительный стэкинг [185].

T_m растет и кривая становится более крутой, указывая на увеличение кооперативности [545–547].

Переход спираль–клубок в двухцепочечных структурах осуществляется по принципу «все или ничего». Анализ системы $A(pA)_{17} \cdot U(pU)_{17}$ при разных температурах (рис. 6.15) показывает, что она либо полностью диссоциирована и представляет собой смесь мономеров, либо имеет форму непрерывной двойной спирали, в которой процесс быстрой диссоциации–ассоциации затрагивает лишь пары, расположенные у концов.

T_m двухцепочечных нуклеиновых кислот растет не только с увеличением их длины, но и с повышением ионной силы раствора и *GC*-содержания полинуклеотида (рис. 6.16, 6.17). Поскольку в первом приближении нуклеотидный состав связан с температурой плавления линейной зависимостью, его можно оценить по величине T_m. Из характера указанной зависимости следует, что AT(U)-богатые участки двухцепочечных ДНК или РНК со случайной последовательностью плавятся при более низких

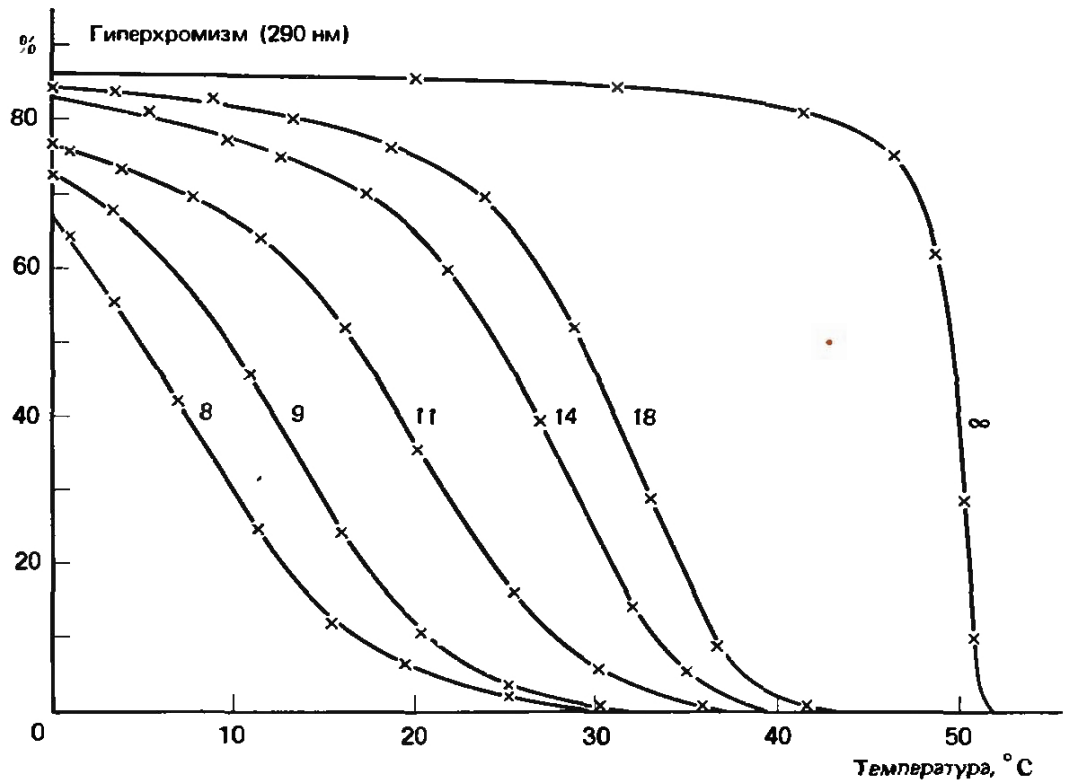


Рис. 6.14. Кривые плавления двойных спиралей oligo(A)·oligo(U) разной длины – от 8 пар оснований до ∞ [545]. T_m бесконечно длинного дуплекса poly(A)·poly(U) равна примерно 49°. По оси ординат отложена величина $100 \cdot (E_T - E_к)/E_к$, где E_T – поглощение при данной температуре, $E_к$ – поглощение полностью денатурированной ДНК. Измерения проводились при длине волны 290 нм. Концентрация олигонуклеотидов составляла 5÷11,3 мМ; плавление проводили в 50 мМ Na-какодилатном буфере, pH 6,9.

температурах, чем GC-богатые (рис. 6.18), т.е. в двойной спирали при повышении температуры образуются локально денатурированные участки [550]. Все это приводит к тому, что спектр времен релаксации для процессов плавления оказывается чрезвычайно широким [544, 550]. Профиль дифференциальной кривой плавления (т.е. зависимость величины $\Delta A/\Delta T$ от температуры) не является гладким, а содержит множество пиков, каждый из которых отвечает выплавлению конкретного участка двойной спирали с определенным GC-содержанием [551–554] (рис. 6.19).

В результате анализа множества профилей подобных кривых была получена «матрица стабильности» для спаренных динуклеотидов с геометрией B-ДНК, позволяющая оценить значения T_m каждого из спаренных динуклеотидов при определенных условиях (табл. 6.9, *А*). По данным табл. 6.9 можно рассчитать температуру плавления T_m двухцепочечной ДНК с любой последовательностью оснований. Некоторые примеры такого рода приведены в табл. 6.9, *Б*. Если построить график

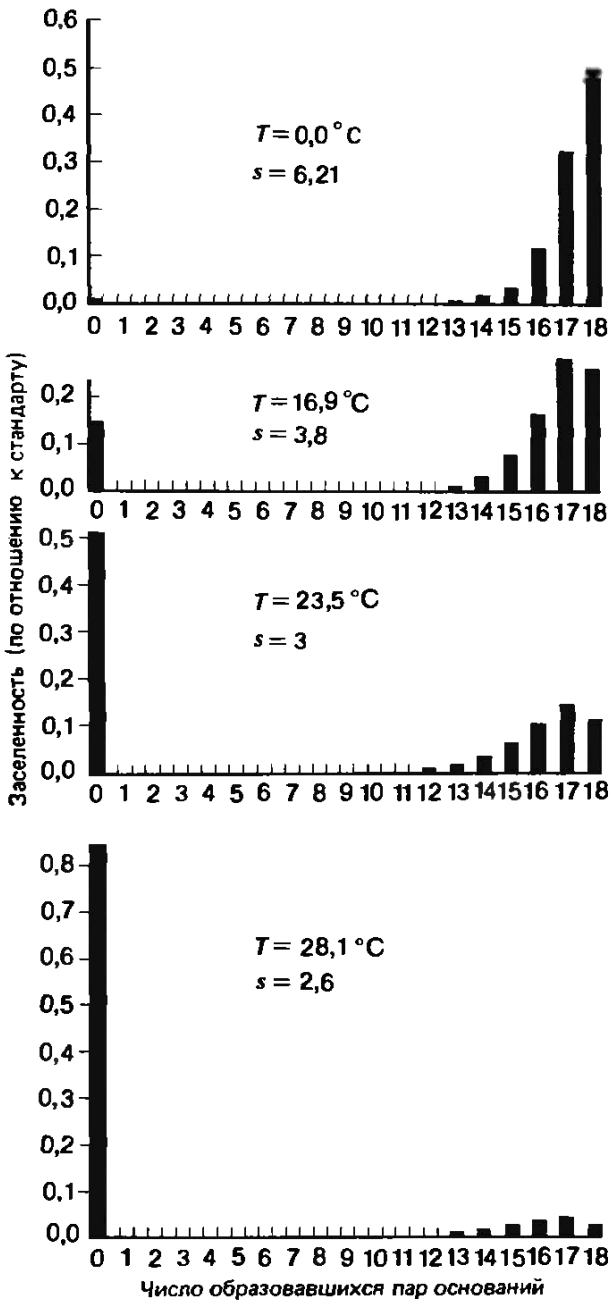


Рис. 6.15. Анализ поведения системы $A(pA)_{17} \cdot U(pU)_{17}$ при разных температурах [548]. Произведение (Параметр нуклеации β)·(концентрация *c*), которое использовалось в этом анализе, равно 10^{-7}. Заметим, что концевые пары легко раскрываются и схлопываются, в результате чего наблюдается распределение спиралей по длинам лишь в интервале от 13 до 18 пар оснований. Спирали длиной от 1 до 12 пар практически отсутствуют; они либо диссоциируют, либо переходят в класс спиралей с длиной цепи от 13 до 18 пар.

зависимости температуры плавления дуплекса, рассчитанной по данным табл. 6.9, от энергии стэкинга, полученной квантово-химическими методами (табл. 6.8), то мы с удивлением обнаружим, что он является линейным (рис. 6.20). Экспериментальные и теоретические данные согласуются между собой, хотя при теоретических расчетах не учитываются гидрофобные эффекты, стерические ограничения, наличие положительных ионов вокруг фосфатных групп, гидратация и т. д. По-видимому, все эти эффекты взаимно компенсируются.

Используя олигорибонуклеотиды с заданной нуклеотидной последовательностью в качестве модельных соединений, удалось установить, как меняются термодинамические параметры при присоединении или отщеплении одной пары оснований от предсуществующей спирали [554–557]. Ис-

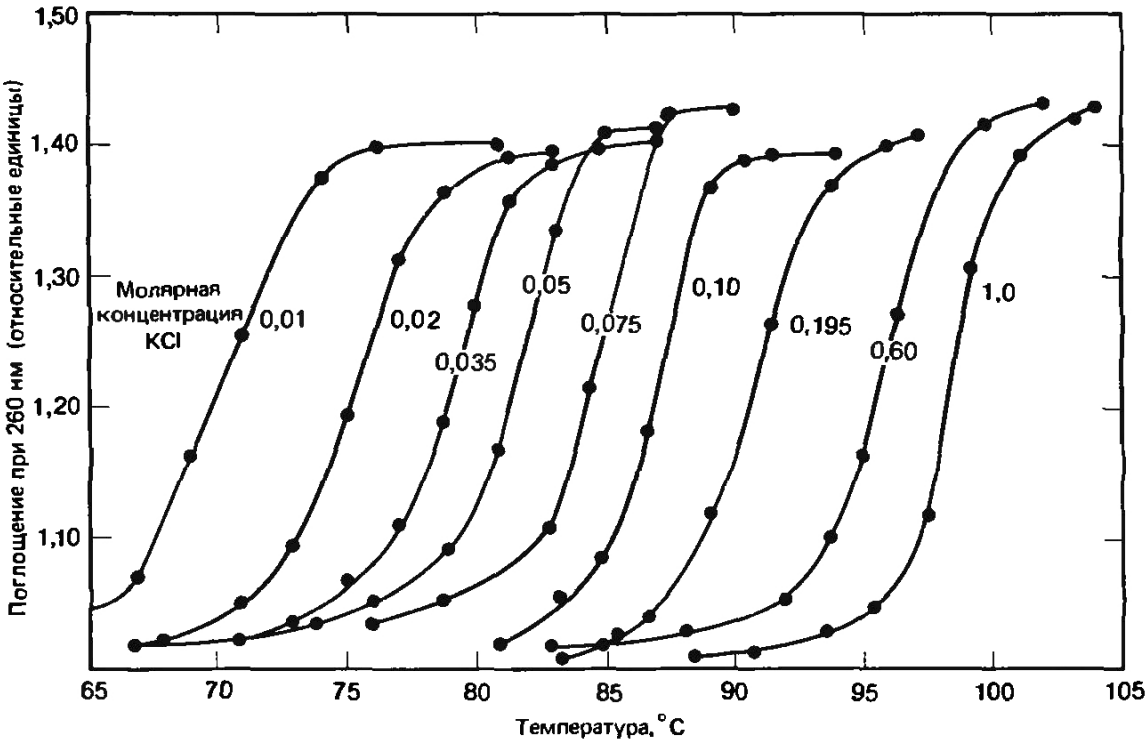


Рис. 6.16. Плавление ДНК из *D. pneumoniae* (R-36A) при разной ионной силе [549]. Ионную силу варьировали путем изменения концентрации KCl в цитратном буфере, pH 7,0.

ходя из данных табл. 6.10, можно сделать вывод, что зависящая от нуклеотидного состава и последовательности оснований стабильность РНК-дуплексов уменьшается в следующем порядке: poly(G)·poly(C) > > poly(G—C)·poly(G—C) > двойная спираль со случайной последовательностью > poly(A—U)·poly(A—U) > poly(A)·poly(U). Такой порядок для (A/U)-полимеров является несколько неожиданным, поскольку для аналогичных дезоксиполинуклеотидов наблюдается обратная ситуация: комплекс poly(dA)·poly(dT) более стабилен, чем чередующийся сополимер poly(dA—dT)·poly(dA—dT) [558]. Низкая T_m последнего объясняется образованием коротких шпилек с пониженной термостабильностью. Поскольку РНК-аналоги также способны образовывать шпильки (это известно из данных по тРНК), то, по-видимому, различие в стабильности коррелирует с типом спиральной структуры, а не с нуклеотидным составом: для дезоксианалогов предпочтительными являются B- и D-типы спирали, тогда как рибополинуклеотиды могут существовать только в A-форме (гл. 9).

Шпильки, малые и боковые петли. При оценке стабильности двухцепочечных РНК необходимо учитывать не только взаимодействие между соседними нуклеотидами, но и эффект образования разнообразных петель: шпилечных, малых и боковых [557–561] (табл. 6.10; рис. 6.21). Согласно имеющимся данным, боковые и малые петли более стабильны,

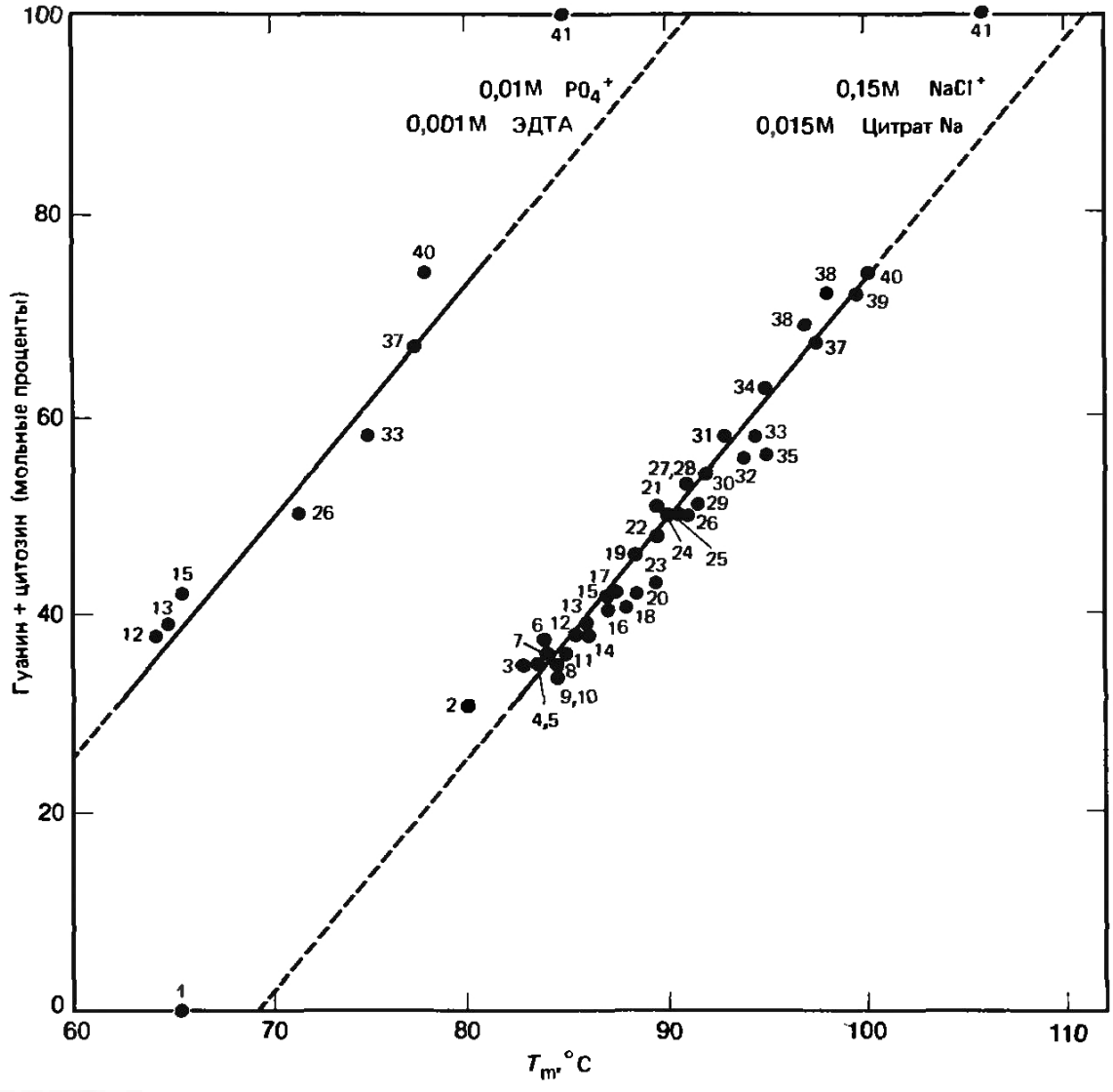


Рис. 6.17. Зависимость температуры плавления T_m ДНК от GC-содержания [549]. Препараты ДНК готовили в буфере 0,15 М NaCl + 0,015 М цитрат Na, pH 7,0. Точки 1 и 41, соответствующие poly(dA – dT) и poly(dG – dC), не ложатся на прямую $T_m = 69{,}3 + 0{,}41$ (%GC), проведенную через экспериментальные точки методом наименьших квадратов.

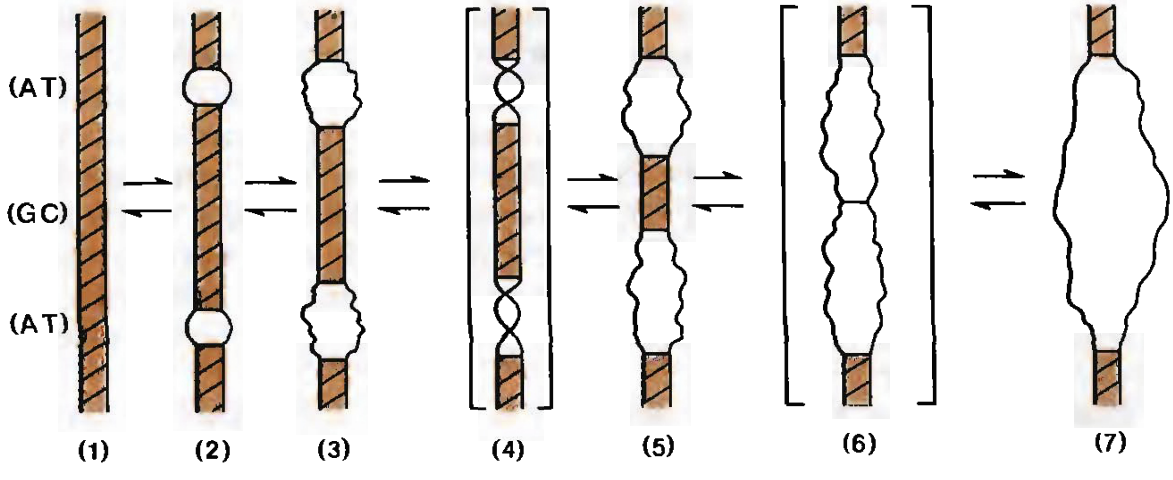


Рис. 6.18. Схематическое изображение процессов денатурации и ренатурации двухцепочечных ДНК и РНК [550]. В первую очередь плавятся АТ-богатые участки.

Таблица 6.9. Оценка стабильности двойной спирали ДНК [555]

(А) Матрица стабильности для спаренных динуклеотидов с геометрией В-ДНК[1)]

5′	3′			
	A	T	G	C
T	36,73	54,50	54,71	86,44
A	54,50	57,02	58,42	97,73
C	54,71	58,42	72,55	85,97
G	86,44	97,73	85,97	136,12

[1)] Значения T_m (в °С) приведены для 19,5 мМ Na^+.

(*Б*) Значения T_m, полученные исходя из данных табл. А, для ряда синтетических дезоксирибополинуклеотидов с заданной последовательностью

Полинуклеотид	T_m, °С		
	эксперимент[1)]	теория[2)]	разность[3)]
Poly(dA—dT)·poly(dA—dT)	45,0	46,9	− 1,9
Poly(dA—dA—dT)·poly(dA—dT—dT)	49,2	49,4	− 0,2
Poly(dA)·poly(dT)	53,0	54,5	− 1,5
Poly(dG—dA—dA)·poly(dT—dT—dC)	64,5	66,5	− 2,0
Poly(dG—dT—dA)·poly(dT—dA—dC)	66,8	64,3	2,5
Poly(dA—dA—dC)·poly(dG—dT—dT)	70,2	69,0	1,2
Poly(dG—dA)·poly(dT—dC)	71,3	72,4	− 1,1
Poly(dG—dA—dT)·poly(dA—dT—dC)	72,0	66,1	5,9
Poly(dG—dG—dA)·poly(dT—dC—dC)	76,3	76,9	− 0,6
Poly(dG—dT)·poly(dA—dC)	77,4	76,2	1,2
Poly(dG)·poly(dC)	87,8	86,0	1,8
Poly(dG—dC)·poly(dG—dC)	99,2	104,3	− 5,1

[1)] Приведенные значения являются результатом интерполяции экспериментальных значений, полученных при разных ионных силах, к точке 19,5 мМ Na^+.

[2)] Рассчитаны по данным табл. 6.9 (*А*) с учетом частоты встречаемости ближайших соседей в каждом полимере.

[3)] T_m(эксп.) − T_m(теор.).

чем шпилечные; оптимальный размер последних соответствует шести неспаренным основаниям.

Следует подчеркнуть, что в двухцепочечных ДНК и РНК могут раскрываться как концевые пары, так и пары, расположенные внутри спи-

Таблица 6.10. Экспериментально полученные значения свободной энергии двухцепочечных участков и петель в РНК при 25°C[1] [557]

Участки со спаренными основаниями	ΔG (ккал) ± 10%
$\overrightarrow{-A-A-}$ / $\underleftarrow{-U-U-}$	−1,2
$\overrightarrow{-A-U-}$ / $\underleftarrow{-U-A-}$; $\overrightarrow{-U-A-}$ / $\underleftarrow{-A-U-}$	−1,8
$\overrightarrow{-A-C-}$ / $\underleftarrow{-U-G-}$; $\overrightarrow{-C-A-}$ / $\underleftarrow{-G-U-}$; $\overrightarrow{-A-G-}$ / $\underleftarrow{-U-C-}$; $\overrightarrow{-G-A-}$ / $\underleftarrow{-C-U-}$	−2,2
$\overrightarrow{-C-G-}$ / $\underleftarrow{-G-C-}$	−3,2
$\overrightarrow{-G-C}$ / $\underleftarrow{-C-G-}$; $\overrightarrow{G-G-}$ / $\underleftarrow{C\ C-}$	−5,0
$\overrightarrow{-G-U-}$ / $\underleftarrow{-U-G-}$	−0,3
$\overrightarrow{-G-X-}$ / $\underleftarrow{-U-Y-}$; $\overrightarrow{-X-G-}$ / $\underleftarrow{-U-Y-}$	0

Участки с неспаренными основаниями	ΔG (ккал) ± 1 ккал	
Число неспаренных оснований	Боковые петли	
2–6	+ 2	
7–20	+ 3	
$m(>20)$	$1 + 2\log m$	
	Внутренние петли	
1	+ 3	
2–3	+ 4	
4–7	+ 5	
8–20	+ 6	
$m(>20)$	$4 + 2\log m$	
	Шпилечные петли	
	оканчивающиеся парой GC	оканчивающиеся парой AU
3	+ 8	> 8
4–5	+ 5	+ 7
6–7	+ 4	+ 6
8–9	+ 5	+ 7
10–30	+ 6	+ 8
$m(>30)$	$3{,}5 + 2\log m$	$5{,}5 + 2\log m$

[1] Приведенные значения свободной энергии ΔG для участков со спаренными основаниями представляют собой изменение свободной энергии при присоединении одной пары к уже существующей спирали и поэтому определяются последовательностью только двух пар.

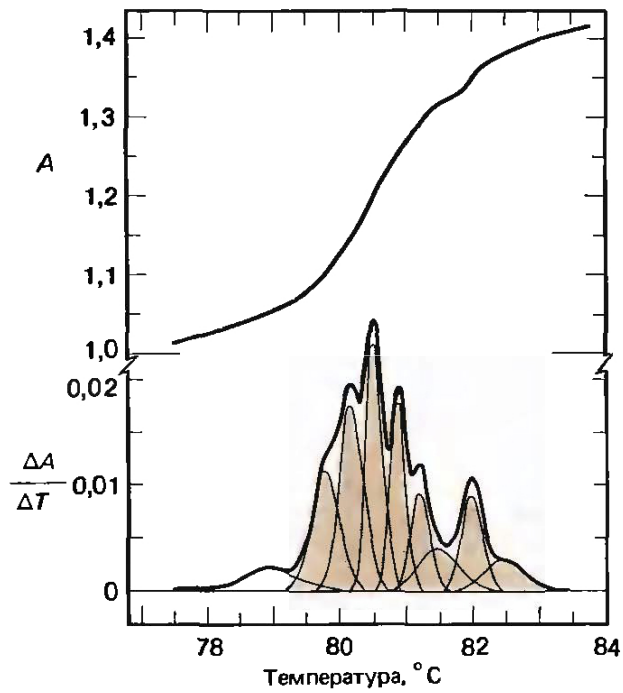


Рис. 6.19. Кривая плавления ДНК (*вверху*) и ее первая производная dA/dT (*внизу*). Четко видны 9 пиков, каждый со своей собственной температурой, высотой и шириной. Представлены расчетные кривые; экспериментальные кривые приведены в работе [557].

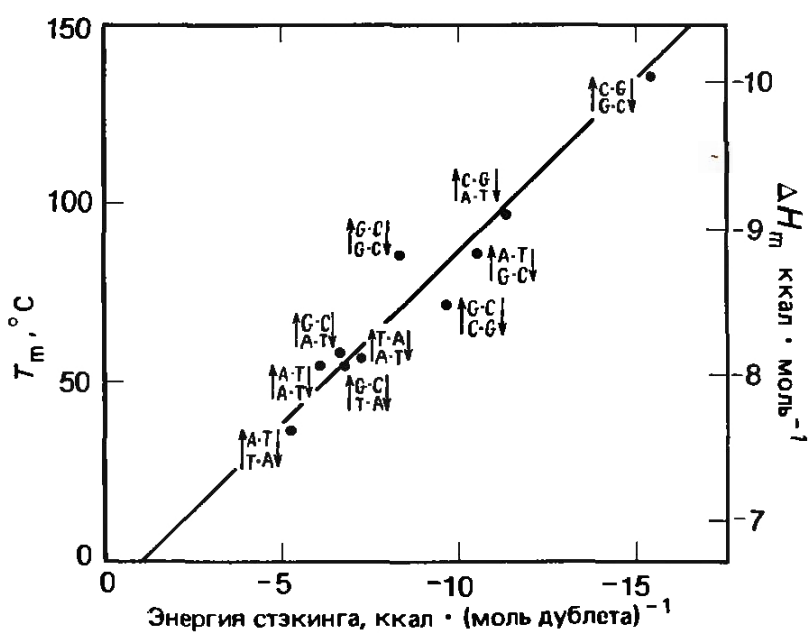


Рис. 6.20. Корреляция между температурой плавления T_m, определенной экспериментально (табл. 6.9), и энергией стэкинга, полученной расчетным путем (табл. 6.8), для спаренных динуклеотидов с геометрией В-ДНК. Примечательно, что два разных подхода к одной и той же проблеме дают согласующиеся результаты, коэффициент корреляции между которыми составляет 0,97. Значения энергии, приведенные на графике, взяты из работы [536] и мало отличаются от тех, которые указаны в табл. 6.8 [555].

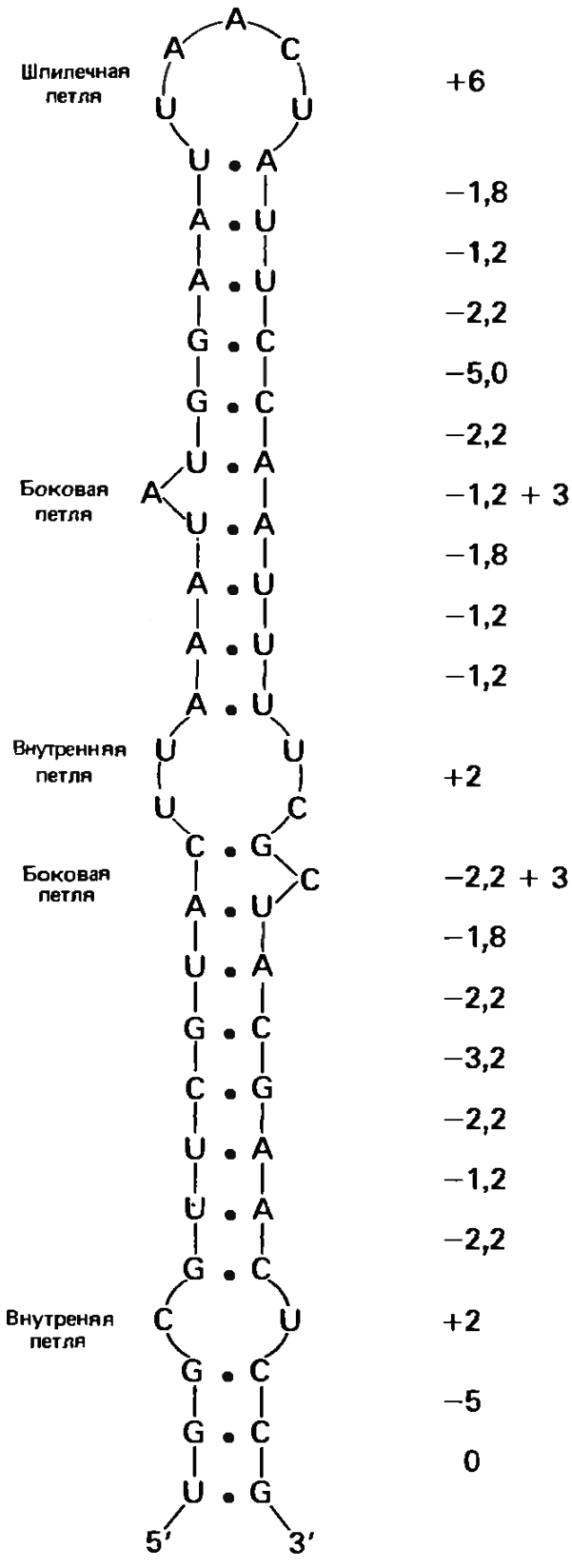


Рис. 6.21. Возможная вторичная структура фрагмента РНК вируса R17 длиной 55 нуклеотидов, построенная по данным табл. 6.10 и 6.11 [557]. $\Delta G_{полн}$ при 25°C равна −21,8 ккал·моль$^{-1}$. Уточненные и незначительно отличающиеся от приведенных данные представлены в работе [556].

ральных участков. Однако частота раскрытия в последнем случае (по данным для двухцепочечных олигорибонуклеотидов) довольно низка [563, 566] (табл. 6.11). Обычно GC-пара примерно в 100 раз более стабильна, чем пара AU; при этом важную роль играют и фланкирующие

Таблица 6.11. Вероятность раскрытия AU- и GC-пар в двухцепочечной РНК [561]

Пара и ее окружение	ΔG раскрытия центральной пары при 25°C, ккал·моль$^{-1}$	Вероятность раскрытия
G—G—G Ċ—Ċ—Ċ	7,5	$0{,}3 \cdot 10^{-5}$
G—G—A Ċ—Ċ—U̇	6,75	$1{,}2 \cdot 10^{-5}$
A—G—G U̇—Ċ—Ċ	6,75	$1{,}2 \cdot 10^{-5}$
A—G—A U̇—Ċ—U̇	6,0	$4{,}2 \cdot 10^{-5}$
A—A—A U̇—U̇—U̇	4,0	$120 \cdot 10^{-5}$
A—A—G U̇—U̇—Ċ	4,15	$100 \cdot 10^{-5}$
G—A—A Ċ—U̇—U̇	4,15	$100 \cdot 10^{-5}$
G—A—G Ċ—U̇—Ċ	4,3	$70 \cdot 10^{-5}$

пары оснований. В молекуле РНК со случайной последовательностью длиной в 10^6 нуклеотидов при 25°C примерно 10 GC-пар и 500 AU-пар не будут связаны водородными связями и не будут участвовать в стэкинг-взаимодействии с соседними парами. Из всего этого следует, что двухцепочечные нуклеиновые кислоты представляют собой не статичные цилиндрические структуры, а конформационно подвижные, «дышащие» объекты, реагирующие на любые химические модификации [563].

6.9. ТАУТОМЕРИЯ ПАР ОСНОВАНИЙ И «КАЧАНИЕ»: СТРУКТУРНЫЕ АСПЕКТЫ СПОНТАННЫХ МУТАЦИЙ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД

Если бы в живых организмах не происходило мутаций и спаривание оснований осуществлялось строго в соответствии с принципом Уотсона–Крика, то флора и фауна нашей планеты не были бы столь разнообразны. Модифицированная генетическая информация передается в ходе репликации последующим поколениям, затем подвергается транскрипции и трансляции, в результате чего синтезируются видоизмененные белки (рис. 6.22).

Репликация, транскрипция, трансляция и генетический код. Наиболее важным моментом во всех трех процессах является узнавание основаниями друг друга в соответствии с принципом Уотсона–Крика, в ре-

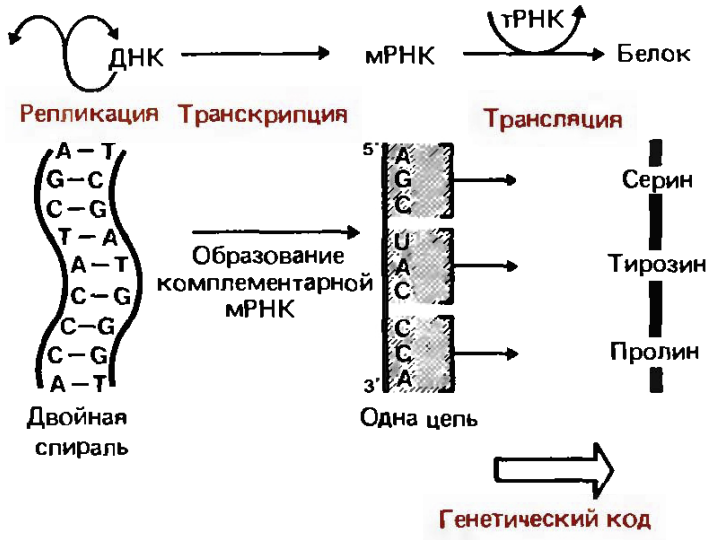


Рис. 6.22. Схематическое представление центральной догмы молекулярной генетики [584]. Двухцепочечная ДНК реплицируется и передается от одного поколения другому. Последовательность нуклеотидов в ДНК несет информацию о последовательности аминокислот в белке. Для того чтобы мог синтезироваться белок, ДНК транскрибируется с образованием информационной, или матричной, РНК (мРНК). Последовательность нуклеотидов в этой мРНК переводится на язык последовательности аминокислот (трансляция). Нуклеотидный триплет кодирует одну аминокислоту в соответствии с генетическим кодом (рис. 6.23). Трансляция осуществляется при участии транспортной РНК – молекулы-адаптора, которая содержит антикодон, комплементарный кодону в мРНК, и связывается с аминокислотой, специфичной данному антикодону.

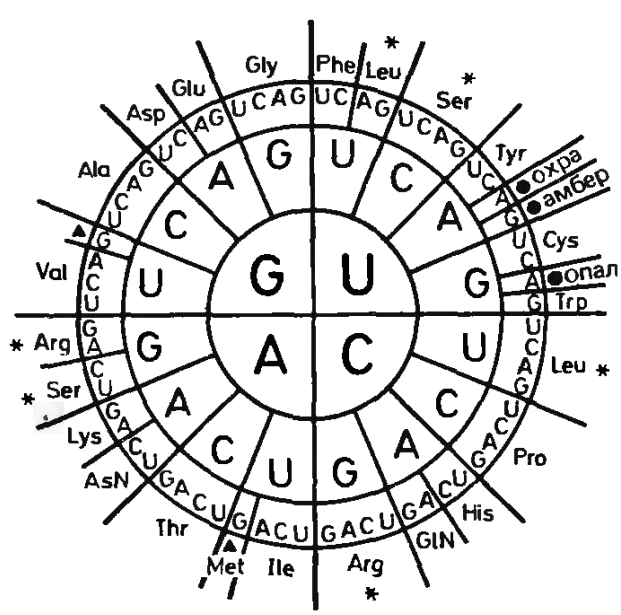


Рис. 6.23. Генетический код, представленный в радиальной форме [585]. Триплеты, кодирующие разные аминокислоты (их обозначения располагаются по периферии окружности), читаются от центра (5′) к периферии (3′). Во всех триплетах первые два основания строго фиксированы, а последнее может различаться (вырожденность). Исключение составляют триплеты, кодирующие аминокислоты Trp и Met. Аминокислоты, отмеченные звездочкой, встречаются дважды; точками и треугольниками указаны терминальные и инициирующие кодоны соответственно.

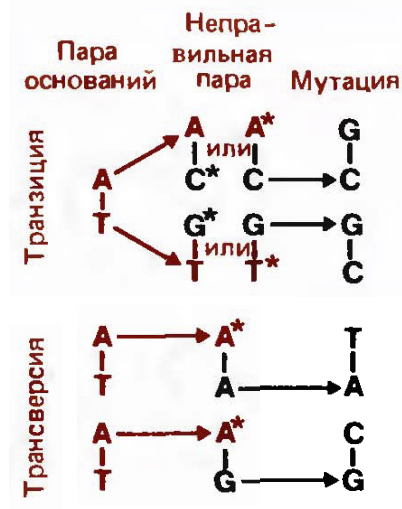


Рис. 6.24. Возможные механизмы возникновения случайных мутаций в АТ-паре при транзиции и трансверсии [566]. Аналогичную схему можно нарисовать и для GC-пары. Оба мутационных процесса проходят через образование редких таутомерных имино- и енольных форм оснований, которые на схеме обозначены звездочкой. В результате трансверсии образуется пурин-пуриновая пара, в которой одно основание находится в *син*-конформации, как это показано на рис. 6.25. Размеры пиримидин-пиримидиновой пары слишком малы, чтобы она осталась незамеченной при коррекции. (По [570].)

зультате которого осуществляются прямое копирование ДНК (*репликация*) и преобразование последовательности нуклеотидов в ДНК в соответствующую последовательность информационной РНК (*транскрипция*). В процессе *трансляции* информация, содержащаяся в мРНК (матричная, или информационная РНК) в виде последовательности нуклеотидов, транслируется на рибосомах в последовательность аминокислот. Аминокислоты поставляются на рибосому молекулами тРНК, выступающими в роли посредников [564]. Каждая специфическая тРНК содержит антикодон – определенную последовательность из трех нуклеотидов (триплет), которая узнает комплементарный ему кодон в молекуле мРНК, в результате чего к растущей полипептидной цепи присоединяется следующая аминокислота в соответствии с генетическим кодом (рис. 6.23). Последовательность аминокислот в полипептидной цепи полностью определяется последовательностью триплетов в мРНК, которая читается от 5′- к 3′-концу.

Образование пары, отличной от уотсон-криковской, может привести к мутации. Рассмотрим сначала процесс репликации ДНК. Случайные замены нуклеотидов, которые могут произойти в ходе этого процесса, бывают двух типов: 1) *транзиции*, когда пурин заменяется другим пурином или пиримидин – другим пиримидином; 2) *трансверсии*, когда пурин заменяется пиримидином и наоборот [565] (рис. 6.24). Экспериментально наблюдаемая частота мутаций колеблется от 10^{-8} до 10^{-11} на одну синтезированную пару [566]. Эти цифры указывают, как часто ускользает из-под двойного контроля со стороны ДНК-полимеразы синтез неправильных, отличных от уотсон-криковских пар. Фермент ДНК-полимераза перемещается вдоль молекулы ДНК в направлении 5′ → 3′, присоединяя нуклеозидтрифосфаты к растущей новосинтезированной цепи ДНК, комплементарной цепи-матрице [567]. Правильность каждого шага синтеза проверяется и подвергается последующей коррекции. Если присоединенный нуклеотид будет признан неправильным, его вырежет из цепи смещающаяся в обратном направлении (3′ → 5′) экзонуклеаза [568, 569].

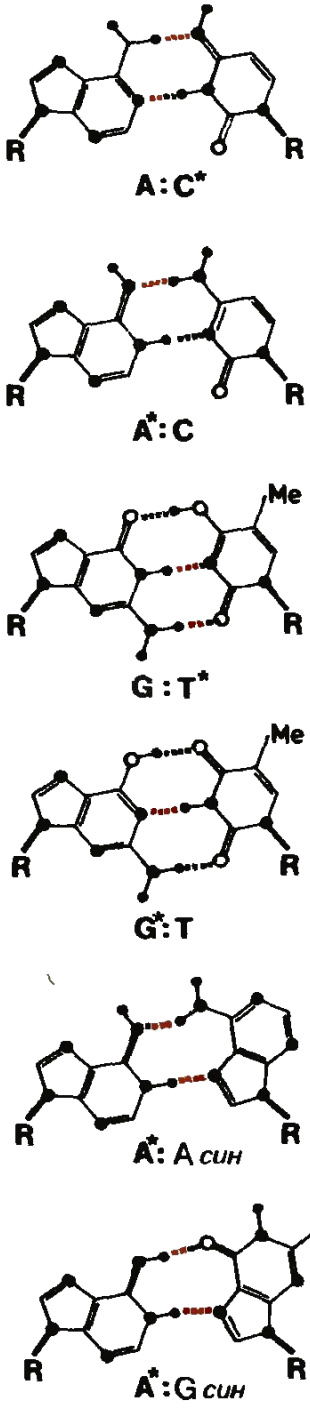


Рис. 6.25. Некоторые таутомерные неуотсон-криковские пары, которые могут встречаться в схемах, изображенных на рис. 6.24. Подобные пары приводятся и в работе [570]. Редкие таутомерные формы оснований обозначены звездочкой.

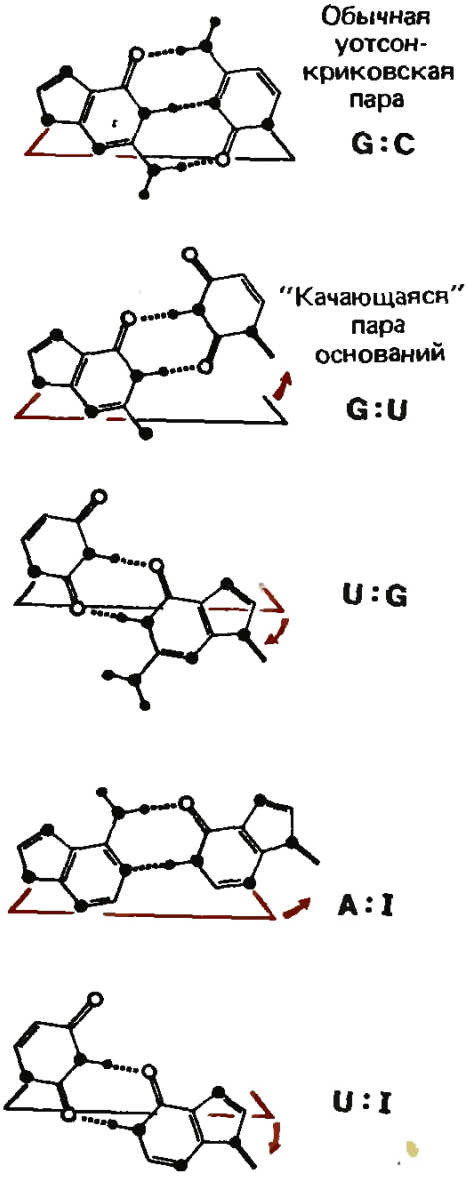


Рис. 6.26. Сравнение структуры уотсон-криковской и «качающихся» пар. Отклонение от стандартной геометрии показано цветной стрелкой. Пары, состоящие из оснований в енольной или имино-формах, описаны в работе [580].

Как отмечалось в разд. 5.3, примерно одно из каждых $10^4 \div 10^5$ оснований находится в редкой таутомерной енольной или иминоформе, и это может приводить к образованию пар, отличных от уотсон-криковских (рис. 6.25). Если геометрия таких пар и уотсон-криковских пар одинакова, то при дупликации и коррекции эта пара может быть и не выявлена.

Общую частоту мутаций можно оценить, перемножив концентрации редких таутомерных форм, присутствующих в исследуемой системе. Это дает величину $10^{-4} \cdot 10^{-4} \div 10^{-5} \cdot 10^{-5}$, т.е. $10^{-8} \div 10^{-10}$ мутаций на синтезированную пару, что соответствует экспериментальным данным [570].

Механизм транзиции и трансверсии различается. Для объяснения трансверсий был предложен несколько иной механизм (рис. 6.24). Он предполагает, что в результате трансверсии образуется не пурин-пиримидиновая неправильная пара, а пурин-пуриновая. «Стандартная» пурин-пуриновая пара длиннее, чем пурин-пиримидиновая, и не может остаться незамеченной аппаратом репликации и коррекции. Поэтому предполагается, что в ней при присоединении к растущей цепи происходит *анти* → *син*-переход и она приобретает «нормальные» размеры. Это требует одновременного образования редких таутомерных форм указанных оснований (рис. 6.25). *Анти* → *син*-переход уменьшает вероятность мутаций еще на 1–2 порядка, и суммарная частота мутаций становится равной $10^{-10} \div 10^{-12}$ трансверсий на один присоединенный нуклеотид, что опять-таки согласуется с экспериментом [570, 571].

«Качание» оснований: мутации и узнавание тРНК-мРНК. Образование редких таутомерных форм оснований хорошо объясняет природу мутаций в ДНК, связанных не только со случайной заменой нуклеотидов, но и с включением, например, 5-бромурацила и 2-аминопурина (т.е. природу химических мутаций). С другой стороны, в некоторых случаях, по крайней мере при образовании неправильных GT-пар, возникновение мутации можно объяснить простым несоответствием партнеров, без привлечения редких таутомерных форм. Эта так называемая гипотеза «качания» оснований была предложена Криком [572] и в дальнейшем подтверждена экспериментально [573–576].

Гипотеза «качания» была выдвинута для объяснения вырожденности генетического кода, который переводит информацию с языка нуклеотидной последовательности мРНК на язык аминокислотной последовательности синтезируемого полипептида. Многочисленные эксперименты [577] показали, что определенный нуклеотидный триплет в мРНК (кодон) узнается комплементарным триплетом тРНК (антикодон), с 3′-концом которой связана специфичная для данного антикодона аминокислота, которая включается затем в растущую полипептидную цепь. Триплеты из четырех нуклеотидов A, U, G и C, которые должны кодировать 20 аминокислот, на самом деле могут образовать $4^3 = 64$ слова, т.е. вырожденность кода заранее предопределена. Первые две «буквы» кодона в направлении 5′ → 3′ прочитываются однозначно. Вся выро-

жденность заложена в третьей «букве», которой могут соответствовать от одного до четырех разных оснований (рис. 6.23).

Отвечает ли каждому из 64 кодонов своя тРНК или же одна тРНК узнает несколько кодонов с одинаковыми первыми двумя буквами и разными третьими? Верным оказалось второе из двух предположений, т.е. предположение в пользу гипотезы «качания».

Между кодоном в мРНК и антикодоном в тРНК образуются три пары оснований. Согласно гипотезе «качания», первые две из них являются обычными уотсон-криковскими парами, а в третьем положении допускается отклонение от этого принципа и образуются следующие пары:

Основания в третьем положении антикодона	Основания в третьем положении кодона мРНК	
	уотсон-криковские	«качающиеся»
U	A	G
C	G	
G	C	U
I	C	U, A

Обращает на себя внимание тот факт, что ни в одной из тРНК в третьем («качающемся») положении антикодона не обнаружено основания A [578]. Вероятно, после синтеза происходит его дезаминирование.

Разные «качающиеся» пары образуются с разной вероятностью. Согласно гипотезе «качания», образование пар между пиримидинами типа UU или UC (пары XVI и XVIII на рис. 6.1) крайне маловероятно, поскольку расстояние между гликозидными связями в этих парах составляет ~8,5 Å, что на 2 Å меньше соответствующего расстояния (10,6 Å) в стандартной уотсон-криковской паре. По-видимому, сохранение уотсон-криковской геометрии весьма существенно; в спаренных триплетах кодон–антикодон основания образуют стопки со спиральной конфигурацией и сильное отклонение от уотсон-криковской геометрии не допускается [579] (разд. 15.7). С этой точки зрения непонятно, как может происходить образование «качающейся» пары A—I, в которой гликозидные атомы $C_{1'}$ находятся друг от друга на расстоянии 12,8 Å. Возможно, имеет место спаривание A—$I_{син}$ [580], аналогичное тому, которое наблюдалось в паре 9-этил-8-бромаденин—9-этил-8-бромгипоксантин [581], размеры которой близки к уотсон-криковским.

«Качающиеся» пары, постулированные в работе [572], изображены на рис. 6.26, на котором для сравнения показана также обычная уотсон-криковская GC-пара. Все они образованы с помощью двух водородных связей, однако по своей геометрии отличаются от стандартных пар. Гликозидные связи $C_{1'}$—N не связаны осью симметрии 2-го порядка, и, таким образом, изоморфизм между AU- и GC-парами исчезает.

Об образовании «качающихся» пар свидетельствуют не только ре-

зультаты исследования процесса трансляции: GU-пара непосредственно обнаружена в акцепторном стебле дрожжевой тРНК^{Phe} (гл. 15). Такие же пары, по-видимому, ответственны за стабилизацию двойной спирали poly(G)·poly(U) [582], а в комплементарных двухцепочечных олигонуклеотидах по своей стабильности они приближаются к AU-паре [583]. Что касается возможностей образования длинной пары A—I, то такого типа пары можно выявить, рассмотрев пуриновую двойную спираль poly(*A*)·poly(*I*) (гл. 13).

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В этой главе рассмотрены силы, стабилизирующие комплексы оснований, в основном ответственные за стабильность двойных спиралей. Наиболее важны водородные связи, образующиеся между одинаковыми (гомо) и разными (гетеро) основаниями. Спаривание оснований может осуществляться 28 разными способами. Из гетеропар регулярные двойные спирали образуются только в том случае, когда геометрия этих пар является уотсон-криковской; они изоморфны друг другу. AT(U)- и GC-пары псевдосимметричны: ось 2-го порядка связывает только гликозидные связи (и сахарофосфатные остовы), но не отдельные атомы пары. Образование водородных связей между основаниями специфично, в его основе лежит электронная комплементарность оснований; при этом GC-пара более стабильна, чем AU, а гомо- и все остальные гетеропары менее выгодны. В кристаллах компонентов нуклеиновых кислот и в двухцепочечных молекулах основания уложены в стопки, так что экзоциклические группы (C=O и C—NH_2) или эндоциклический атом азота располагаются над гетероциклом соседнего основания. Стэкинг-взаимодействие в стопках осуществляется в основном за счет дисперсионных сил, взаимодействий между постоянным и индуцированным диполями и гидрофобных сил. Образование и разрушение двойных спиралей происходят кооперативно; это обусловлено геометрическими ограничениями, налагаемыми строением сахарофосфатного остова, а также особенностями горизонтальных и вертикальных взаимодействий между основаниями.

Уотсон-криковское спаривание систематически нарушается в процессе трансляции, при связывании антикодона тРНК с кодоном мРНК, когда образуются «качающиеся» пары. Нарушение уотсон-криковского спаривания наблюдается не только в процессе трансляции; такое нарушение в процессе репликации ДНК приводит к мутациям, частота которых определяется присутствием таутомерных имино- и енольных форм, а также наличием *син-* и *анти*-конформеров пуриновых нуклеотидов.

ГЛАВА 7

Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды; нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфаты; коферменты и антибиотики

Модифицированные основания, нуклеозиды и нуклеотиды, о которых в основном пойдет речь в данной главе, представляют собой как природные соединения, так и продукты химического синтеза. Они играют важную роль в процессах биохимической регуляции и широко используются в химии, биохимии и фармакологии как модельные соединения для изучения механизмов различных биологических процессов. Они успешно применяются также как антибиотики и противоопухолевые препараты. Полное описание структуры и функций модифицированных нуклеозидов и нуклеотидов выходит далеко за рамки нашей книги, поэтому в данной главе мы коснемся только наиболее широко распространенных и наиболее важных со структурной точки зрения молекул. Детальную информацию по этим вопросам можно найти в работах [21, 586–590].

7.1. КОВАЛЕНТНЫЕ СВЯЗИ МЕЖДУ ОСНОВАНИЕМ И САХАРОМ, ФИКСИРУЮЩИЕ ИХ В ОПРЕДЕЛЕННОЙ КОНФОРМАЦИИ: ЭТАЛОНЫ ДЛЯ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Образование дополнительной ковалентной связи между основанием и сахаром или между гидроксильными группами сахара фиксирует конформацию нуклеозида. Используя это обстоятельство, нуклеозиды можно зафиксировать в *син-* или *анти*-конформации в зависимости от того, по каким атомам оснований происходит сшивание: C_8 (пурин) или N_3 (пурин), C_6 (пиримидин) или C_2 (пиримидин). Дальнейшая «подстройка» угла χ определяется тем, какой из атомов сахара – $C_{2'}$, $C_{3'}$ или $C_{5'}$ – будет выбран для связывания (табл. 7.1).

Мостик между основанием и сахаром типа $C_{2'}$—X—C(основание). Если основание и сахар фиксированы друг относительно друга мостиком типа $C_{2'}$—X—C(основание), то образовавшееся пятичленное кольцо, которое содержит атомы $C_{1'}$—$C_{2'}$—X, и гетероцикл будут компланарны и жестко связаны между собой. Это приведет к фиксации нуклеозида в одной из двух конформаций: *высокой-анти* (– *ск*) или *син* в зависимости от того, какой из атомов основания принимает участие в связыва-

Таблица 7.1. Структурные характеристики ряда нуклеозидов, конформация которых фиксирована дополнительной связью между основанием и сахаром

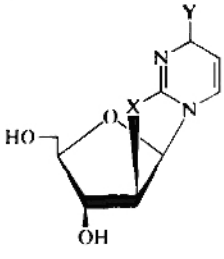
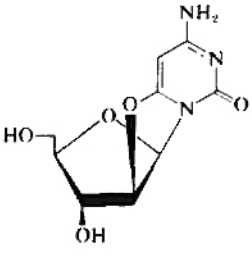
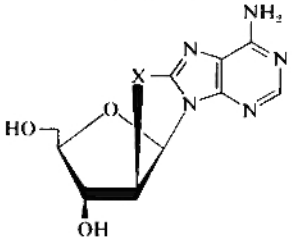
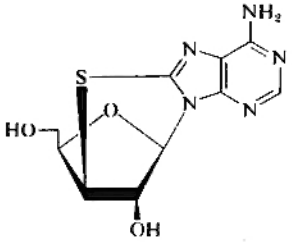
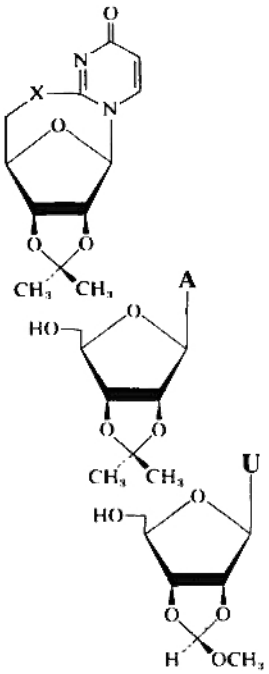
Химическая структура	Название соединения[1]	Конформация сахара	Параметры псевдовращения		Ориентация относительно гликозидной связи (χ)[4]		Ориентация относительно связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ (γ)		Ссылка
			P, град	ν_{max}, град	область	град	область	град	
	2,2′-ангидро-1-β-D-арабинофуранозил-урацил (X = Y = O)								
	А	$C_{4'}$-*эндо*—$C_{3'}$-*экзо*, $^4T_3$	227	29	*син*	115	*ап*	175	[591]
	Б	$C_{4'}$-*эндо*–$C_{3'}$-*экзо*, ^3_4T	214	34	*син*	110	*ап*	174	[592]
	–2-тиоурацил (X = = S, Y = O)	$C_{4'}$-*эндо*, ^4E	232	34	*син*	116	*ап*	187	[593]
	–цитозин (X = O, Y = NH_2)[2]	$C_{4'}$-*эндо*–$O_{4'}$-*экзо*, $^4T_0$	247	22	*син*	119	*ск*	49	[594]
	6,2′-ангидро-1-β-D-арабинофуранозил-6-гидроксицитозин	$C_{4'}$-*экзо*–$O_{4'}$-*эндо*, $_4T^0$	63	44	*высокая анти*	291	*ск*	57	[595]

Таблица 7.1 (продолжение)

Химическая структура	Название соединения[1]	Конформация сахара	Параметры псевдовращения		Ориентация относительно гликозидной связи (χ)[4]		Ориентация относительно связи $C_{4'}—C_{5'}$ (γ)		Ссылка
			P, град	ν_{max}, град	область	град	область	град	
	8,2′-ангидро-9-β-D-арабинофуранозил–аденин (X = O)	$C_{4'}$-*эндо*–$C_{3'}$-*экзо*, $^4_3$T	218	19	*высокая-анти*	287	*ск*	59	[596]
	–8-меркаптоаденин (X = S)[3]	$C_{4'}$-*эндо*, ^{4}E	232	34	*высокая-анти*	299	*ап*	163	[597]
	8,3′-ангидро-8-меркапто-9-β-D-фуранозил–аденин	$C_{2'}$-*экзо*, $_2$E	345	45	*высокая-анти*	256	*ск*	74	[598]



2,5′-ангидро-1-(2′,3′-O-изопропилидин-β-D-урацил (X = O)	$C_{4'}$-*эндо*–$O_{4'}$-*экзо*, $^{4}_{0}T$	254	42	*син*	71	*ск*	42	[599, 600]
2-тиоурацил (X = S)	$C_{4'}$-*эндо*–$O_{4'}$-*экзо*, $^{4}_{0}T$	250	35	*син*	64	*ск*	45	[601]
2′,3′-O-изопропилидин–аденозин								
А	Плоская	—	—	*анти*	–170	*ск*	54	[602]
Б	$C_{4'}$-*эндо*–$C_{3'}$-*экзо*, $^{4}_{3}T$	215	32	*анти*	–164	*ап*	175	
2′,3′-O-метоксиметилен–уридин	$C_{2'}$-*эндо*, ^{2}E	163	23	*анти*	–124	*ск*	53	[603]

[1] Символы А и Б относятся к двум независимым молекулам в асимметричной части элементарной ячейки.
[2] В форме 3′,5′-дифосфата.
[3] В форме 5′-монофосфата.
[4] В оригинальных работах торсионный угол χ определялся как угол $O_{4'}$—$C_{1'}$—N_9—C_8 (пурины) и $O_{4'}$—$C_{1'}$—N_1—C_6 (пиримидины). Для перехода к новой номенклатуре (гл. 2) к ним прибавляли или вычитали 180°. Приведенные значения χ следует считать приблизительными ($\pm 3°$).

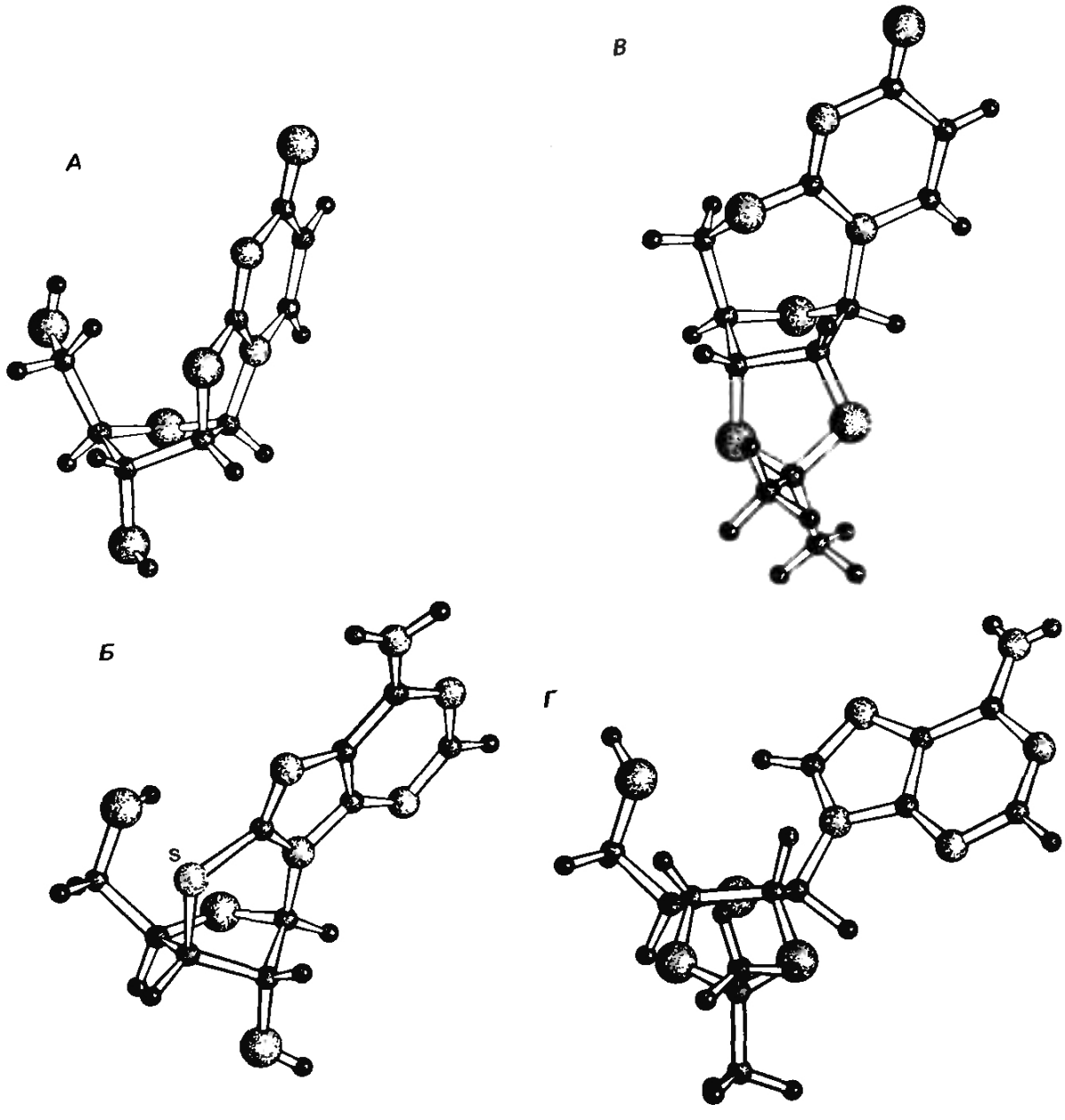


Рис. 7.1. Молекулярная структура некоторых нуклеозидов с фиксированной конформацией, представленных в табл. 7.1. *А*. 2,2′-ангидро-1-β-D-арабинофуранозилурацил [591, 592]; конформация сахара $C_{4'}$-*эндо*, ориентация основания соответствует *высокой-анти*(– *ск*)-области. *Б*. 8,3′-ангидро-8-меркапто-β-D-ксилофуранозиладенин [598], в котором сахар фиксирован в $C_{2'}$-*экзо*-конформации $_2$E, а ориентация основания соответствует *высокой-анти*-(– *ск*)-области. *В*. 2,5′-ангидро-1-(2′,3′-О-изопропилидин)-β-D-рибофуранозилурацил [599, 600]; основание находится в *син*-ориентации, а сахар – в $O_{4'}$-*экзо*-конформации $_0$E, которая во всех других случаях запрещена. *Г*. 2′,3′-О-изопропилидинаденозин [602] – нуклеозид с планарной рибозой, которая в немодифицированных нуклеозидах не обнаружена.

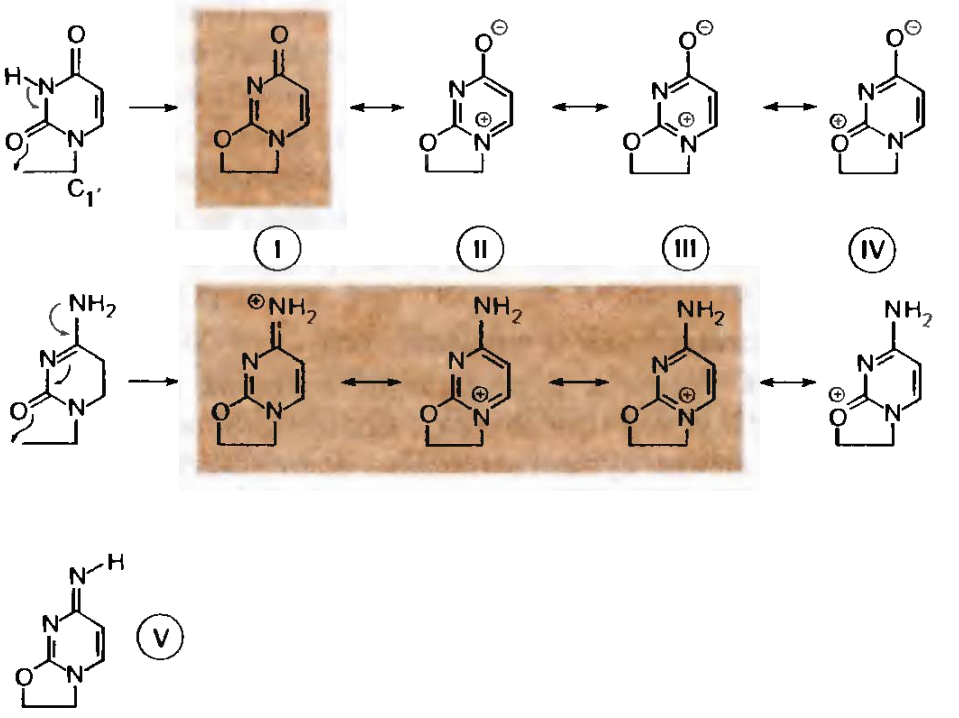


Рис. 7.2. Связывание основания с сахаром через атом O_2 пиримидина изменяет электронную структуру гетероцикла и приводит к появлению положительного заряда у производных цитозина. Иминоформа (V) при кристаллографических исследованиях не обнаружена; преобладающие мезомерные структуры заключены в цветные прямоугольники.

нии (рис. 7.1, *А*). Поскольку подобная связь замораживает вращение вокруг гликозидной связи $C_{1'}$—N, а также вокруг связи $C_{1'}$—$C_{2'}$ и жестко фиксирует эндоциклический торсионный угол $\nu_1(O_{4'}—C_{1'}—C_{2'}—C_{3'})$ вблизи 0°, из плоскости сахарного кольца может выступать только атом $C_{4'}$. В результате сахар принимает конформацию конверта–$C_{4'}$-*экзо* или $C_{4'}$-*эндо*, которой соответствует фазовый угол псевдовращения *P*, равный 240 или 60° (табл. 7.1).

Само собой разумеется, что циклизация основание–сахар по атому $C_{2'}$ приводит к существенному изменению геометрии соединения. Особенно это касается валентных углов, в образовании которых принимает участие гликозидная связь, и валентных углов при атоме $C_{2'}$. Если в сшивании принимает участие атом O_2 пиримидинового нуклеотида, меняется вся электронная система (а вместе с ней и свойства донорных и акцепторных групп, участвующих в образовании водородных связей), поскольку связанный двойной связью кето-кислород O_2 заменяется кислородом, образующим две одинарные связи.

Среди возможных канонических электронных структур производных цитозина преобладает структура I, изображенная на рис. 7.2 [594]. Примечательно, что ни в одной из кристаллических структур, включая циклические производные цитозина, не удалось обнаружить основание в иминоформе типа V. Наблюдаются в основном мезомерные формы II

и III с положительно заряженным атомом N_1. Именно поэтому в циклических производных цитозина ориентация относительно связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ чаще всего соответствует области $+ск$, так что гидроксильная группа $O_{5'}$—H получает возможность вступить в выгодный контакт с положительно заряженным атомом N_1. Совершенно иная картина наблюдается для производных урацила: гетероцикл не несет на себе никакого заряда и атом $O_{5'}$ чаще всего направлен в сторону от него, в область *ап* [604].

Мостик между основанием и сахаром типа $C_{3'}$—X—C(основание). Искажения валентных углов, в образовании которых принимает участие гликозидная связь, и углов при атомах, принимающих участие в сшивании, оказываются менее существенными, если циклизация происходит не по $C_{2'}$-, а по $C_{3'}$-атому. Вследствие стерических ограничений сахар в образовавшемся циклонуклеозиде будет находиться преимущественно в $C_{2'}$-*экзо*- (или эквивалентной ей $C_{3'}$-*эндо*-) конформации. Гликозидный торсионный угол χ лежит в той же *высокой-анти* ($-ск$)- или *син*-области (в зависимости от того, с каким из атомов основания происходит сшивание), но отличается приблизительно на 40° от угла в соответствующем циклонуклеозиде, образованном по атому $C_{2'}$. Примечательно, что в единственной известной на сегодняшний день кристаллической структуре соединения подобного типа – 8,3′-ангидро-8-меркапто-9-β-D-ксилофуранозил–аденине [598] (рис. 7.1, *Б*) – атом $O_{5'}$ все-таки находится над плоскостью рибозы, хотя участвующий в циклизации атом серы отталкивает его по направлению к атому $O_{4'}$; об этом свидетельствует увеличение угла γ до предельного в области *ск* значения 74,3° (табл. 7.1).

Мостик между основанием и сахаром типа $C_{5'}$—X—C(основание). Этот мостик является последним из всех возможных, обеспечивающих циклизацию основания и сахара. Кристаллографические исследования были проведены для двух соединений такого рода: 2′,-3′-O-изопропилидиновых производных 5′,2-O-циклоуридина, в которых циклизация происходит по атомам кислорода и серы (табл. 7.1; рис. 7.1, *В*). В подобных соединениях атом $C_{5'}$ подходит к основанию ближе, чем в немодифицированных нуклеозидах, поэтому свободно реализуется обычно запрещенная $O_{4'}$-*экзо*-конформация сахара.

Анализ молекулярных моделей показывает, что при образовании мостика типа $C_{5'}$—X—C(основание) торсионный угол χ может принимать два значения: в окрестности 0° (*сп*) и 60° (*ск*). Вследствие этого атом X располагается над атомом $O_{4'}$ или над фуранозным кольцом. Первая ориентация приводит к неблагоприятному тесному контакту между атомами X и $O_{4'}$, поэтому единственно возможной конформацией остается такая, при которой атом X располагается над фуранозным кольцом.

Мостик между вицинальными атомами кислорода $O_{2'}$ и $O_{3'}$ гидроксильных групп рибозы. Нередко для предотвращения химической модификации рибонуклеозидов по атомам $O_{2'}$ и $O_{3'}$ гидроксилов, находя-

щихся в *цис*-ориентации, осуществляют их блокирование или сшивание с помощью изопропила или другой, менее объемной группировки. Циклизованные таким путем нуклеозиды сохраняют прежнюю гибкость относительно связи $C_{4'}$—$C_{5'}$, однако, как видно из табл. 7.1, амплитуда изгиба сахарного кольца ν_m может уменьшиться до такой степени, что рибоза становится плоской – ситуация, которая никогда на наблюдалась в кристаллических структурах немодифицированных нуклеозидов (рис. 7.1, *Г*) [172]. Отметим, что такая же плоская рибоза была обнаружена в случае цитидин-2′,3′-О-циклофосфата (табл. 7.2). Это позволяет предположить, что циклизация типа 2′,3′-О, как правило, стабилизирует планарную форму, являющуюся промежуточной между относительно плоскими конформациями $C_{2'}$-*эндо* и $C_{3'}$-*эндо*, быстро переходящими одна в другую (что характерно и для немодифицированных нуклеотидов). По данным ЯМР, равновесие *син* ⇄ *анти* смещено в сторону *син* [603, 605].

Нуклеозиды с фиксированной конформацией представляют собой уникальную систему для калибровки спектроскопических данных и проверки специфичности биологических систем. Из-за присущей нуклеозидам гибкости бывает очень трудно разграничить их структурные формы, опираясь на спектроскопические данные. Помимо равновесного перехода между разными конформациями сахара одновременно происходит вращение вокруг экзоциклической $C_{4'}$—$C_{5'}$- и гликозидной $C_{1'}$—N-связей (разд. 4.13). Если все или одну из этих конформационных степеней свободы заморозить, то интерпретация данных ДОВ, КД и ЯМР станет более надежной [599, 603, 606–610]. Нужно, однако, иметь в виду, что химическая модификация, приводящая к образованию мостика между сахаром и основанием, может существенно изменить спектральные свойства системы.

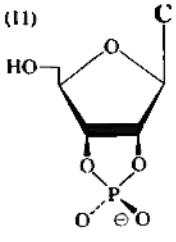
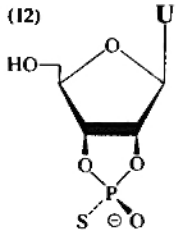
Нуклеозиды с фиксированной конформацией – прекрасный инструмент для изучения специфичности ферментов, для которых нуклеозиды и нуклеотиды выступают в роли субстратов, ингибиторов или коферментов. Циклические нуклеозиды находят применение и в фармакологии [21, 588]. Было показано, что они обладают сильной противоопухолевой и противолейкозной активностью [611].

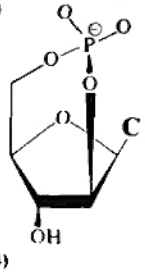
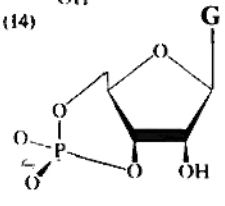
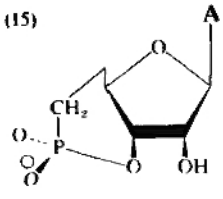
7.2. ЦИКЛИЧЕСКИЕ НУКЛЕОТИДЫ

Из природных циклических нуклеотидов наиболее важны те, в которых фосфодиэфирные группы образуют мостики между 2′- и 3′- или между 3′- и 5′-атомами кислорода (рис. 2.2 и 7.3).

Нуклеозид-2′,3′-О-циклофосфаты являются промежуточными продуктами гидролиза РНК рибонуклеазами (РНКазами). Ферментативный гидролиз РНК осуществляется в два этапа. На первом происходит расщепление связи между атомами Р и О по механизму трансэтерификации, с образованием фрагментов РНК с 2′,3′-О-циклофосфатом на конце. На втором этапе циклический фосфодиэфир гидролизуется с образованием

Таблица 7.2. Структурные характеристики некоторых циклических нуклеотидов

Химическая структура	Название соединения[1]	Конформация сахара	Параметры псевдовращения		Ориентация относительно гликозидной связи (χ)		Ориентация относительно связи C_4·—C_5· (γ)		Ссылка
			P, град	ν_{max}, град	область	град[2]	область	град	
(11) 	Цитидин-2′,3′-О-циклофосфат, натриевая соль								
	А	O_4·-*эндо*—C_4·-*экзо*, $^0T_4$	82	36	*син*	63	*ск*	56	[618]
	Б	Плоская	—	—	*син*	75	*ап*	162	[618]
	—, в виде свободной кислоты	C_2·-*эндо*—C_3·-*экзо*, $^2T_3$	174	29	*анти*	−118	*ск*	69	[619]
(12) 	Уридин-2′,3′-О-циклофосфотиоат, триэтиламмонийная соль	O_4·-*экзо*—C_4·-*эндо*, $_0T^4$	262	23	*анти*	−167	*ск*	74	[620]

(13) 	1-β-D-арабинозил-цитидин-2′,5′-О-циклофосфат, в виде свободной кислоты	*$C_{2'}$-эндо—$C_{3'}$-экзо*, $^{2}T_{3}$	171	42	*анти*	−154	*ск*	65	[621]
(14) 	Гуанозин-3′,5′-О-циклофосфат, натриевая соль (циклический GMP)	*$C_{4'}$-экзо–$C_{3'}$-эндо*, $_{4}T^{3}$	43	44	*син*	78	*ск*	61	[622]
	Уридин-3′,5′-О-циклофосфат, натриевая соль								
	А	*$C_{4'}$-экзо–$C_{3'}$-эндо*, $_{4}T^{3}$	42	48	*анти*	−103	*ск*	−61	[623]
	Б	*$C_{4'}$-экзо–$C_{3'}$-эндо*, $_{4}T^{3}$	48	47	*анти*	−122	*ск*	−60	[623]
(15) 	5′-метиленаденозин-3′,5′-циклофосфат	*$C_{3'}$-эндо–$C_{4'}$-экзо*, $^{3}_{4}T$	37		*син*	54	*ск*	−64	[624]

[1] А и Б – две независимые молекулы в асимметричной части элементарной ячейки.

[2] В оригинальных работах, которые использовались при составлении этой таблицы, были даны значения углов $O_{4'}$—$C_{1'}$—N_1—C_6(N_9—C_8). Исключение составляет работа [619] (третья строчка). Чтобы получить из них значения углов $O_{4'}$—$C_{1'}$—N_1—C_2(N_9—C_4), которые используются теперь, к старым значениям прибавлялись или вычитались 180°. Приведенные значения χ следует рассматривать как приблизительные (± 3°).

концевого 3′-О-фосфата [612]. Этот механизм хорошо изучен на примере панкреатической РНКазы и будет описан в разд. 7.5.

Нуклеозид-3′,5′-циклофосфаты, в частности пуриновые производные, выполняют разнообразные биологические функции. Аденозин-3′,5′-циклофосфат (циклический AMP, cAMP) играет роль посредника между большой группой гормонов и регуляторными ферментами (протеинкиназами) [613–615]. В бактериях cAMP участвует в регуляции экспрессии генов [616]. Как мы увидим в гл. 18, он образует комплекс с белком, активирующим катаболизм (БАК), и осуществляет аллостерическую регуляцию. Соответствующий гуанозиновый аналог отличается от cAMP по своей биологической специфичности и, по-видимому, оказывает противоположное действие на пролиферацию клеток и на другие клеточные процессы [617].

Геометрические характеристики природных нуклеотидов с 2′,3′- и 3′,5′-циклическими фосфодиэфирными группами, а также синтетического 2′,5′-аналога приведены в табл. 7.2 (см. рис. 7.3). Как правило, эти молекулярные системы имеют ограниченные конформационные возможности и подобны циклическим нуклеозидам, описанным выше.

Нуклеозид-2′,3′-О-циклофосфаты имеют уплощенную рибозу и преимущественно находятся в *син*-конформации. Все кристаллографические данные о нуклеотидах, в которых вицинальные атомы $O_{2'}$ и $O_{3'}$ находящихся в *цис*-ориентации гидроксилов образуют кольцо с помощью фосфодиэфирной связи, приведены в табл. 7.2 и на рис. 7.3, *А*. Поскольку в пятичленном кольце циклофосфата группа $O_{2'}$—$C_{2'}$—$C_{3'}$—$O_{3'}$ практически планарна, «слитая» с этим кольцом рибоза в значительной мере теряет свою конформационную гибкость. Амплитуда изгиба сахарного кольца уменьшается, о чем свидетельствует планарность рибозы в производных цитидина (табл. 7.2) и низкие значения ν_{max} (22–36°), существенно меньшие среднего значения (39°) для немодифицированных фуранозных колец [172]. Только в одном из 2′,3′-О-циклических фосфатов, приведенных в табл. 7.2, сахар находится в $C_{2'}$-*эндо*-конформации; во всех других случаях он имеет $O_{4'}$-*эндо*- и даже во всех отношениях невыгодную $O_{4'}$-*экзо*-конформацию конверта. Обе конформации уплощенные и близки к конформации сахара в 2′,3′-О-изопропилидинаденозине (табл. 7.1). Как мы упоминали в разд. 4.2, плоская и $O_{4'}$-*экзо*-конформации стерически запрещены, поэтому очевидно, что циклические нуклеотиды представляют собой напряженные системы.

Данные ЯМР для уридин- и цитидин-2′,3′-О-циклофосфатов. В отличие от цитидин-3′-фосфата химический сдвиг H_6 для указанных соединений не изменяется с увеличением температуры, что можно объяснить фиксацией пиримидин-2′,3′-О-циклофосфатов в *син*-конформации, которой соответствует энергетический барьер, равный примерно 25 ккал·моль$^{-1}$ [625–627]. Этот факт, согласующийся с результатами кристаллографических исследований (табл. 7.2), можно объяснить, допустив, что поворот оснований при переходе из *син*- в *анти*-конформацию сопровождается изгибанием группы $C_{2'}$—$H_{2'}$ вниз, что совершенно запрещено

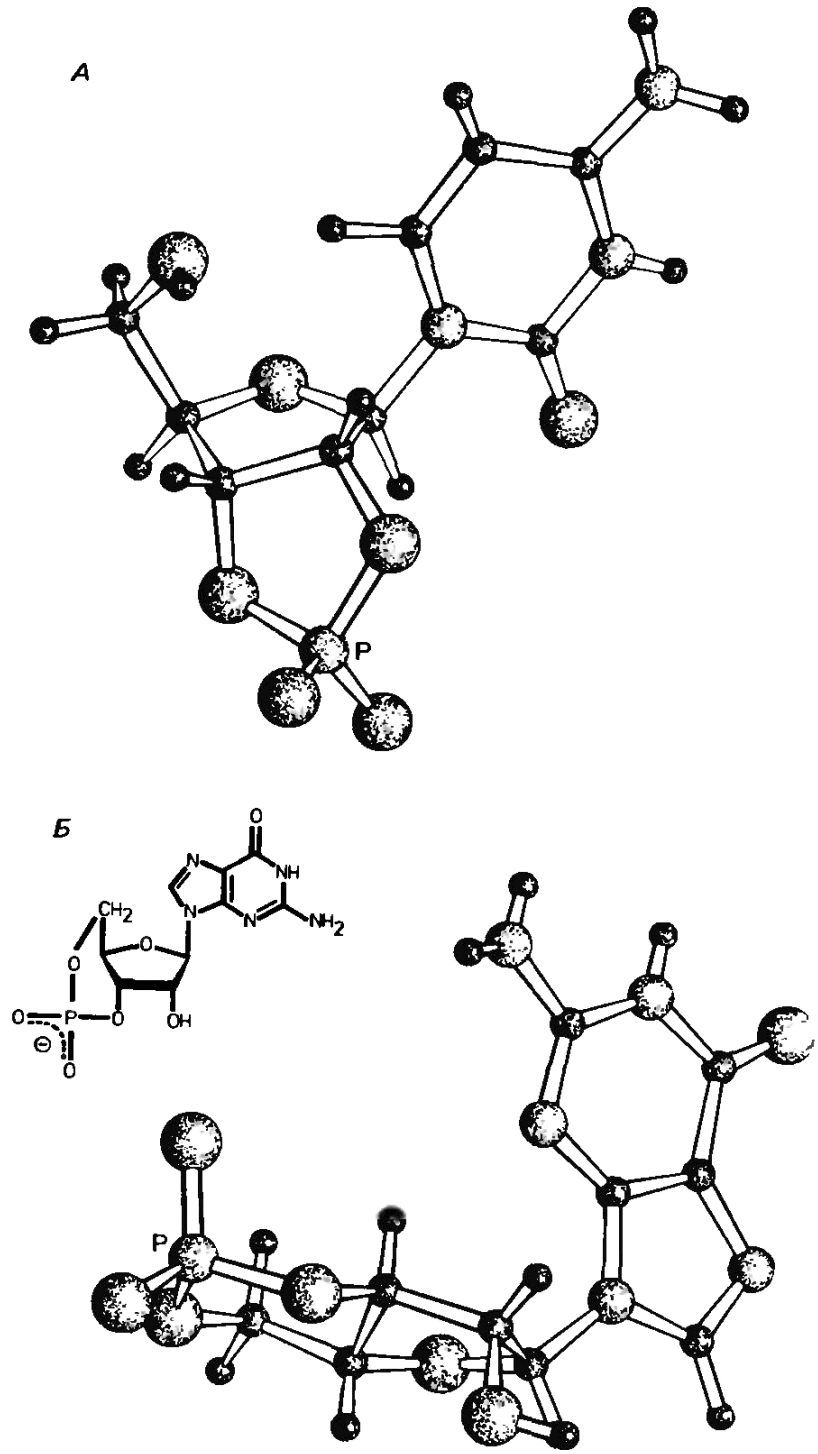


Рис. 7.3. Молекулярная структура двух природных циклических фосфатов, конформационные параметры которых указаны в табл. 7.2. *А.* Цитидин-2′,3′-О-циклофосфат в виде свободной кислоты [619]. Протонированное по атому N_3 основание находится в *анти*-ориентации; из-за 2′,3′-циклизации изгиб сахарного кольца незначителен и оно находится в $C_{2'}$-*эндо*-$C_{3'}$-*экзо*-конформации $^{2}T_{3}$. *Б.* Гуанозин-3′,5′-О-циклофосфат – нуклеозид, в котором рибоза жестко фиксирована в $C_{4'}$-*экзо*-$C_{3'}$-*эндо*-конформации $_{4}T^{3}$. Основание находится в *син*-ориентации [622].

при наличии связи между вицинальными атомами $O_{2'}$ и $O_{3'}$ гидроксильных групп. Однако для пуриновых производных это положение не выполняется: основания у них более подвижны и постоянно переходят из *син-* в *анти*-конформацию и обратно [605, 627, 628].

Конформация относительно гликозидной связи влияет на ориентацию относительно экзоциклической связи $C_{4'}$—$C_{5'}$. По данным ЯМР, в пиримидиновых нуклеозид-2′,3′-О-циклофосфатах, предпочтительно находящихся в *син*-конформации, торсионный угол γ относительно связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ находится в области *ап* или *-ск*, а атом $O_{5'}$ направлен в сторону от наиболее близко расположенного атома основания O_2. Для пуриновых производных предпочтительной является *+ск*-область; *син*-конформация стабилизируется с помощью водородной связи $O_{5'}$—$H\cdots N_3$ [627, 628].

Данные ЯМР указывают на то, что в циклических нуклеотидах осуществляется равновесный переход между конформациями сахара $C_{2'}$-*эндо* и $C_{3'}$-*эндо*. В свете результатов кристаллографических исследований, согласно которым в нуклеозид-2′,3′-О-циклофосфатах наблюдаются планарные и $C_{2'}$-*эндо*-конформации, наличие такого перехода представляется вполне логичным: амплитуда изгиба сахарного кольца ν_{max} в циклических нуклеозидах меньше, чем в нециклических, а $O_{4'}$-*эндо*, $O_{4'}$-*экзо* и плоская конформации, являясь промежуточными формами перехода $C_{2'}$-*эндо* $\rightleftarrows$ $C_{3'}$-*эндо*, стабилизируются при циклизации.

Теоретический анализ структуры нуклеозид-2′,3′-О-циклофосфатов методом КВВМО [629] и полуэмпирическими методами расчета потенциальной энергии [630, 631] согласуется с экспериментальными данными и показывает, что, когда фуранозное кольцо находится в $O_{4'}$-*эндо*-конформации, пиримидины предпочитают *син*-конформацию. В пуриновых нуклеозидах *син-* и *анти*-конформации встречаются одинаково часто, а ориентация относительно связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ соответствует *+ск* или *ап*-области. Однако в нуклеозид-2′,3′-О-циклофосфатах, в которых сахар находится в $O_{4'}$-*экзо*-конформации, основания находятся только в *анти*-ориентации относительно сахарного кольца. При этом поворот вокруг связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ с переходом в *−ск-* или *ап*-область перемещает атом $O_{5'}$ в сторону и от сахара, и от основания, с которыми из-за сближения экзоциклических заместителей в $O_{4'}$-*экзо*-конформации сахара может возникнуть стерически неблагоприятный контакт.

В нуклеозид-3′,5′-циклофосфатах фураноза фиксирована в высокоэнергетической конформации. Стереохимия этого класса нуклеотидов существенно отличается от стереохимии их 2′,3′-циклических аналогов. В последних образование пятичленного фосфодиэфирного кольца заставляет располагаться атомы $O_{2'}$—$C_{2'}$—$C_{3'}$—$O_{3'}$ практически в одной плоскости и приводит к уменьшению амплитуды изгиба фуранозного кольца и даже к планарности рибозы, связанной с фосфатным циклом. В циклических 3′,5′-нуклеотидах фосфодиэфирная группа является частью

шестичленного кольца с фиксированной конформацией кресла. Это кольцо слито с рибозой через связь $C_{3'}$—$C_{4'}$, так что единственной возможной конформацией для рибозы остается $C_{4'}$-*экзо*—$C_{3'}$-*эндо* ($_4T^3$) (рис. 7.3, *Б*).

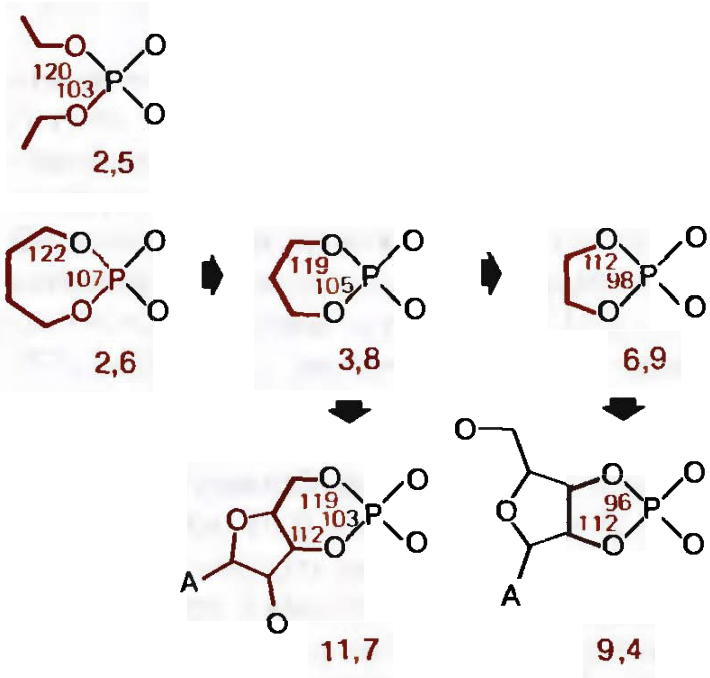
Значения эндо- и экзоциклических торсионных углов для шестичленного кольца в конформации кресла лежат в областях $+ск$ и $-ск$, т. е. вблизи $\pm 60°$. Следовательно, поворот вокруг общей для обоих колец связи $C_{3'}$—$C_{4'}$ должен приводить именно к этому значению. Препятствием служит то обстоятельство, что эндоциклический торсионный угол ν_3 ($C_{2'}$—$C_{3'}$—$C_{4'}$—$O_{4'}$), который в незамещенных нуклеозидах принимает значения от $+33$ до $-41°$, может увеличиться только до 50°, и это соответствует максимальному изгибу рибозы с ν_{max} 45° [172].

В кристаллических структурах циклических нуклеозид-3′,5′-фосфатов [622, 623, 632, 633], включая и модифицированный аналог с 8-замещенным аденином [634], диметилфосфоамидат и бензилтриэфирные производные тимидин- и уридин-3′,5′-циклофосфатов [635, 636], наблюдались как *син*-, так и *анти*-конформации. В одном случае – в кристаллах cAMP обе конформации реализуются в рамках одной кристаллической структуры [632]. Эти наблюдения согласуются с данными ЯМР, которые указывают на наличие быстрого равновесного перехода *син* ⇄ *анти*; в данном случае этот переход, по-видимому, облегчается тем, что атом $O_{5'}$ фиксирован в положении «от рибозы» в *ап*-области, а сахар находится только в $C_{4'}$-*экзо*- или $C_{3'}$-*эндо*-конформации [153, 637–642]. К таким же результатам приводят и теоретические расчеты [629, 630].

Циклический нуклеотид – это напряженная структура, о чем свидетельствуют его геометрия и энтальпия гидролиза. Длины связей в фосфатных группах нециклических диэфиров и циклических, с разным размером кольца, практически одинаковы и примерно равны значениям, приведенным на рис. 4.23; небольшие отклонения обусловлены различиями в окружении в кристаллической решетке. С другой стороны, валентные углы, особенно эндоциклические углы P—O—C и O—P—O, сильно зависят от размеров кольца. Как видно из табл. 7.3, эти углы в нециклических фосфодиэфирах и шестичленных циклических диэфирах очень близки. В пятичленных кольцах они меньше, а в семичленных системах больше, что свидетельствует о наличии механического напряжения. Судя по распределению энергии гидролиза фосфодиэфирных групп, циклические нуклеозид-3′,5′-фосфаты менее напряжены, чем их 2′,3′- и 2′,5′-аналоги. Однако энтальпия гидролиза 2′,3′- и 3′,5′-нуклеотидов дает обратную картину (табл. 7.3).

Это кажущееся несоответствие можно объяснить, если рассматривать не только валентные углы фосфатных групп, но также и конформацию слитых с ними фуранозных колец. Как видно из табл. 7.3, энтальпия гидролиза при переходе от циклического тетраметиленфосфата к его диметиленовому гомологу увеличивается; это увеличение связано с разной степенью стерического напряжения пятичленных колец. Слия-

Таблица 7.3. Энтальпия гидролиза $-\Delta H$ (ккал·моль$^{-1}$) циклических и нециклических фосфодиэфиров[1)] [643, 645]



[1)] Большими цифрами обозначена энергия, маленькими – значения валентных углов O—P—O и P—O—C. Если указан только один угол P—O—C, то это означает, что другой имеет близкое значение. Заметим, что значения энтальпии гидролиза диэтилфосфата с открытой цепью и циклического тетраметиленфосфата практически одинаковы (2,5 и 2,6 ккал·моль$^{-1}$); с уменьшением размеров циклическая структура становится более напряженной и параллельно этому увеличивается энтальпия. В циклических 2′, 3′-O- и 3′, 5′-O-нуклеотидах дополнительное напряжение вносит фуранозное кольцо.

ние кольца с рибозой, происходящее в циклических нуклеозид-2′,3′-фосфатах, увеличивает энтальпию гидролиза на 2,5 ккал·моль$^{-1}$; это указывает на дополнительное напряжение, вносимое фуранозной системой, которая, как отмечалось выше, принимает более уплощенную (и поэтому более напряженную) конформацию, чем в нециклических нуклеотидах. С другой стороны, шестичленный циклический триметиленфосфат с относительно низкой энтальпией гидролиза, 3,8 ккал·моль$^{-1}$, присоединяясь к рибозе с образованием циклического 3′,5′-нуклеотида, сохраняет свою геометрию. Однако при этом изменяется конформация рибозы: угол $C_{2'}$—$C_{3'}$—$C_{4'}$—$O_{4'}$ становится равным $\sim 50°$, т.е. на 15° превышает значение соответствующего угла в нормальной рибозе. Это снова приводит к напряжению системы, энтальпия которой увеличивается на 7,9 ккал·моль$^{-1}$.

Итак, оценка энергии связывания циклических фосфодиэфиров с рибозой показывает, что увеличение энтальпии гидролиза пятичленных 2′,3′-нуклеотидов обусловлено напряжением в двух слившихся друг

с другом пятичленных системах. В циклических 3′,5′-нуклеотидах в основном напряжена только рибоза; конфигурация фосфатной группы в составе шестичленного кольца почти не изменяется [644–646].

7.3. НУКЛЕОЗИДЫ С МОДИФИЦИРОВАННЫМ САХАРОМ: ГАЛОГЕНЗАМЕЩЕННЫЕ, АРАБИНО- И α-НУКЛЕОЗИДЫ

Из множества синтетических нуклеозидов с модифицированным сахаром особый интерес представляют те, в которых вторичные гидроксилы $O_{2'}H$ и $O_{3'}H$ замещены галогеном, амино- или азидной группами. Как отмечалось в разд. 4.3, электроотрицательность этих заместителей непосредственно влияет на конформацию сахара. Более того, если в состав полимерной РНК входят 2′-дезокси-2′-галогензамещенные нуклеозиды, то стабильность молекулы in vivo существенно изменяется: РНК, модифицированную таким образом, РНКаза не в состоянии гидролизовать по механизму, описанному в дополнении 7.1.

В этом разделе галогензамещенные нуклеозиды, не отличающиеся по структуре от нормальных нуклеозидов, мы рассматривать не будем, а обратимся к арабино- и α-нуклеозидам; первые интересны с биологической точки зрения, а вторые – со структурной.

Арабинонуклеозиды привлекли к себе особое внимание в связи с тем, что они обладают широким спектром действия в отношении ДНК-содержащих вирусов и РНК-содержащих онкогенных вирусов (онкорнавирусы), как *in vivo*, так и *in vitro*. Их можно получать из природных источников; особенно широкое применение в химиотерапии нашел 9-β-D-арабинофуранозиладенин (арабинозид аденина, видарабин, ara-A) [647, 648]. Арабинонуклеозиды отличаются от своих рибоаналогов прежде всего конфигурацией при атоме $C_{2'}$: $O_{2'}$-гидроксил находится в *цис*-ориентации относительно связи $C_{1'}$—N (рис. 7.4). Это приводит к незначительным изменениям длин связей и валентных углов фуранозного кольца [167], что, однако, не влияет ни на конформацию сахара (она по-прежнему остается $C_{2'}$-*эндо* или $C_{3'}$-*эндо*), ни на ориентацию относительно экзоциклической $C_{4'}$—$C_{5'}$- и гликозидной $C_{1'}$—N-связей (они, как и обычно, соответствуют областям *ск* и *анти*). *Высокая-анти* (– *ск*)-конформация в арабинонуклеозидах запрещена, и эта особенность позволяет объяснить некоторые их свойства [649].

В кристаллических структурах ряда арабинофуранозильных нуклеозидов обнаружена внутримолекулярная водородная связь, соединяющая атомы $O_{2'}$ и $O_{5'}$ (рис. 7.4). Однако, согласно спектроскопическим данным, полученным для раствора, в нейтральной среде эти связи почти не обнаруживаются [650]. Вместе с тем в щелочной среде, когда гидроксильная группа $O_{2'}H$ депротонируется, или в условиях *in vacuo*, принимаемых в теоретических расчетах [652, 653], образование внутримолекулярных водородных связей $O_{2'}H\cdots O_{5'}$ становится существенным [651]. Гидроксильная группа $O_{2'}H$ находится в *цис*-ориентации относительно гликозидной связи $C_{1'}$—N, и это должно препятствовать враще-

Дополнение 7.1.

О механизме действия панкреатической рибонуклеазы (РНКазы А)

РНКаза А расщепляет одноцепочечные РНК с 3′-конца пиримидиновых нуклеотидов. Сначала образуется промежуточный фрагмент с концевым 2′,3′-О-циклофосфатом (схема 1), который затем гидролизуется с образованием 3′-фосфата. В этом каталитическом процессе участвуют два гистидиновых остатка (His 12 и His 119), расположенные в активном центре фермента:

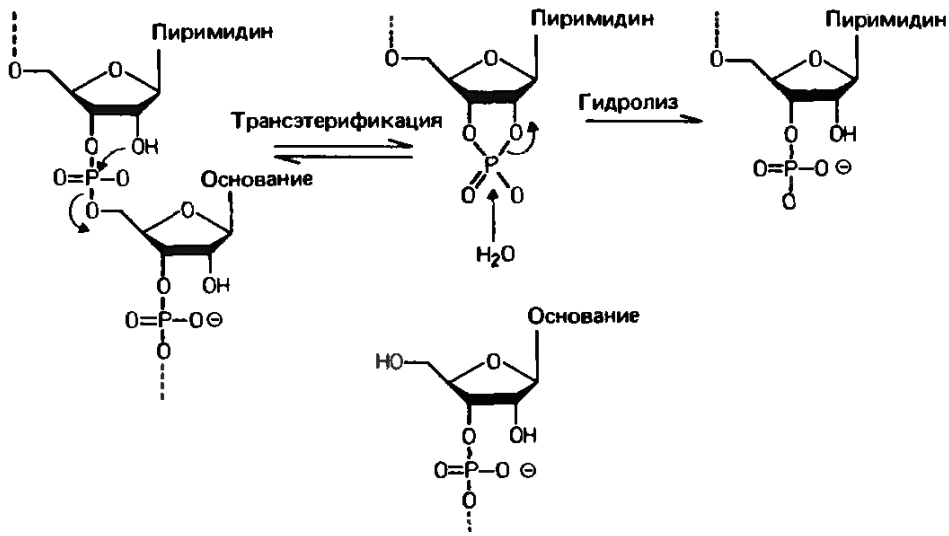


Схема 1

Возникает следующий вопрос: по какому механизму идет реакция – по линейному (S_N2) или по смежному, при котором в реакции принимает участие атом O_2 пиримидина? В обоих случаях образуется промежуточное пентаковалентное соединение фосфора, которое в смежном механизме подвергается псевдовращению, чтобы перевести уходящую группу ($O_{2'}$) в апикальное положение [722].

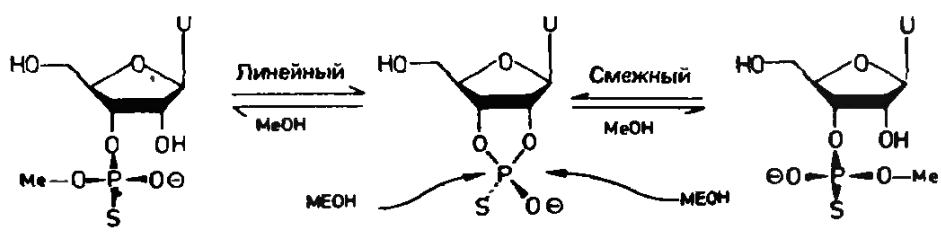


Схема 2

Поскольку (циклическая) фосфодиэфирная группа не является хиральной, анализ продуктов обычного гидролиза не дает никакой информации о механизме реакции. Если, однако, в фосфатную группу включить атом серы, после чего эта группа станет хиральной, а гидролиз проводить в присутствии метанола, то один из продуктов реакции также будет хиральным.

Как видно из схемы 3, стереохимия этого продукта свидетельствует о том, что катализируемая РНКазой реакция идет по линейному механизму, поскольку в случае смежного механизма должен был бы образовываться его диастереизомер [699]. По такому же принципу был установлен механизм многих других ферментативных реакций, идущих с участием нуклеозидмоно-, ди- и трифосфатов [698].

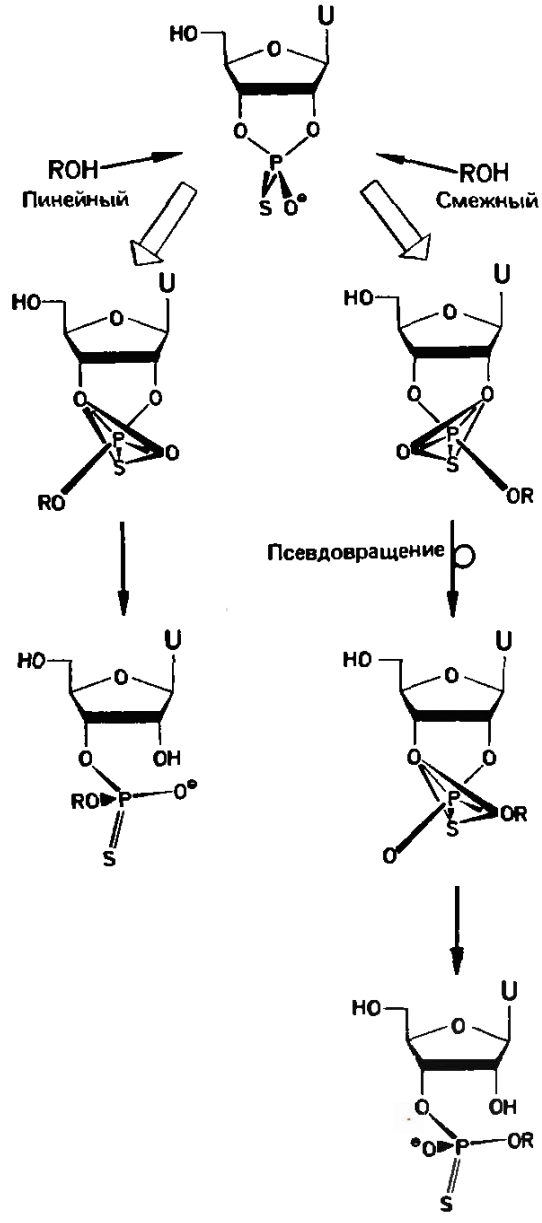


Схема 3

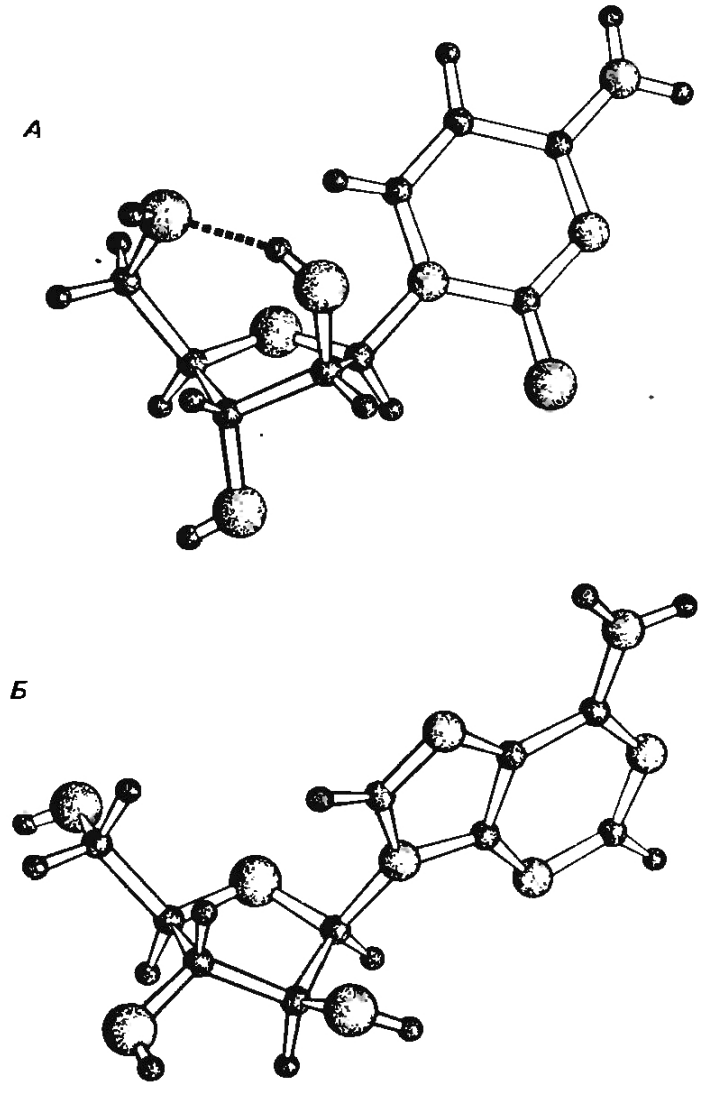


Рис. 7.4. Два арабинонуклеозида. *А.* 1-β-D-арабинозилцитозин, в котором имеется водородная связь $O_{2'}H\cdots O_{5'}$ [714]. *Б.* 9-β-D-арабинозиладенин (видарабин, ara-A)—противовирусный препарат с широким спектром действия [715]. Внутримолекулярные водородные связи между атомами $O_{2'}$ и $O_{5'}$ образуются только в условиях, когда гидроксильная группа рибозы депротонирована (pH > > 12,5). При физиологических условиях число таких связей невелико [651].

нию основания. Действительно, из девяти изученных на сегодняшний день кристаллографическими методами арабинофуранозильных нуклеозидов ни один не был обнаружен в *син*-конформации. Однако в растворе взаимопревращение *син* ⇄ *анти* все же имеет место (правда, с меньшей скоростью из-за более высокого энергетического барьера, препятствующего вращению).

α-Нуклеозиды представляют собой конформационные энантиомеры обычных рибонуклеозидов. Если в арабинофуранозильных нуклеозидах центром конформационной инверсии был атом $C_{2'}$, то в α-нуклеозидах таким центром служит аномерный углерод $C_{1'}$ (рис. 7.5). В природных полимерных нуклеиновых кислотах α-нуклеозиды не обнаружены, одна-

ко в живых организмах они присутствуют либо в виде мононуклеозидов, либо в составе малых молекул [654–656]. Особенно важен α-нуклеозидный компонент витамина B-12 [657, 658]. α-Нуклеозиды могут служить субстратом 5′-нуклеотидаз [659, 660]; кроме того, они обладают значительной антиметаболитной активностью в различных системах [661, 662].

Гетероцикл присоединяется к атому $C_{1'}$, находящемуся в α-конфигурации, и занимает *цис*-положение относительно связи $C_{2'}$—$O_{2'}$. Это оказывает определенное влияние на конформацию сахарного кольца. Конформации сахарных остатков в составе α-нуклеозидов можно рассматривать как энантиомерные формы сахаров в β-нуклеозидах; в таком случае наиболее предпочтительными окажутся конформации $C_{2'}$-*экзо* и $C_{3'}$-*экзо* (или $C_{4'}$-*эндо*) [663]. Такое обращение конформации указывает на то, что тип гликозидной связи (α или β) непосредственно влияет на конформацию сахарного кольца.

Как и в β-нуклеозидах, преимущественной ориентацией относительно гликозидной связи в случае α-нуклеозидов является *анти*. Однако, судя по кристаллографическим данным [664] и по данным ЯМР в растворе [638, 665, 666], преобладание *ск*-ориентации относительно связи

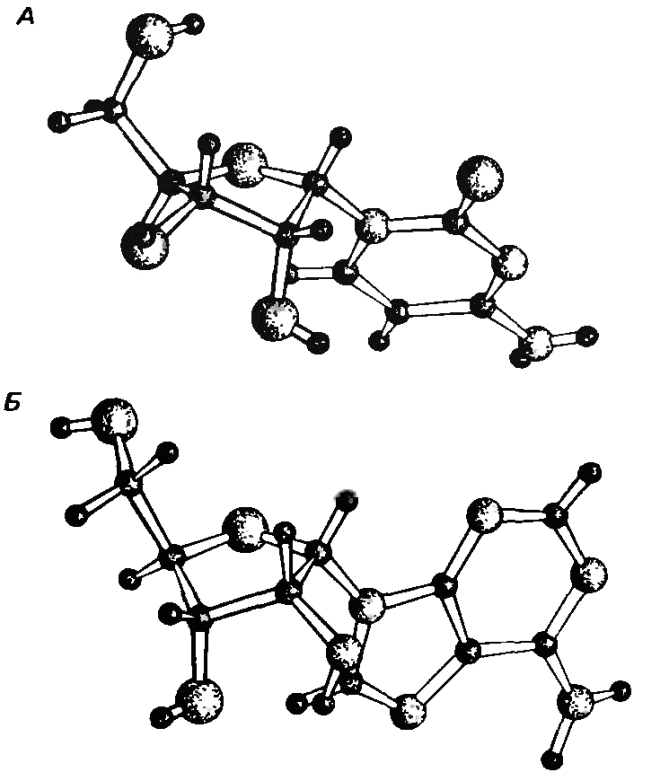


Рис. 7.5. Молекулярная структура двух α-нуклеозидов. *А*. 1-α-D-рибофуранозилцитозин [716]. *Б*. α-D-2′-амино-2′-дезоксигуанозинмоногидрат [717а]. В обоих нуклеозидах основание находится в *анти*-ориентации. В производном цитозина сахар находится в $C_{3'}$-*эндо*(^{3}E)-конформации, а в производном аденина – в $C_{2'}$-*эндо*(^{2}E).

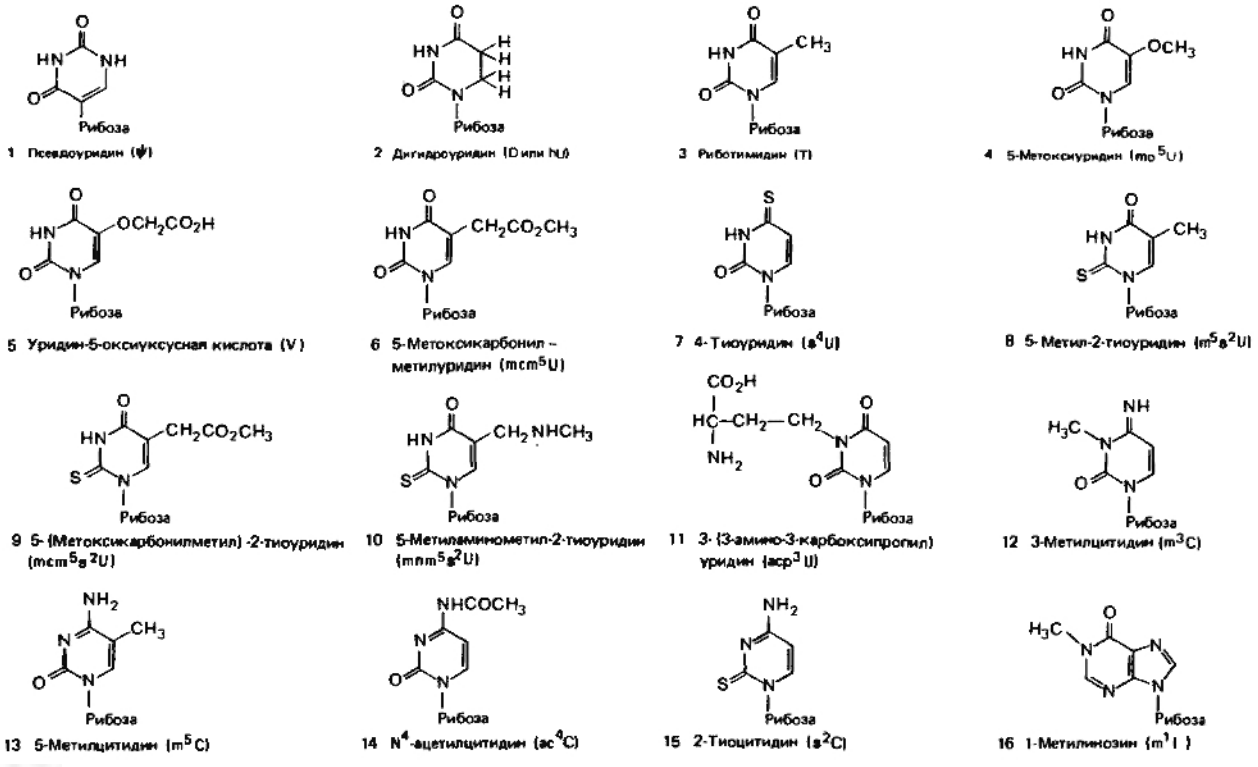
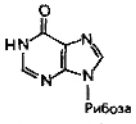
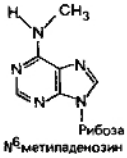


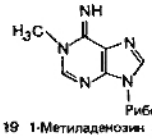
Рис. 7.6. Структурные формулы минорных нуклеозидов и оснований, обнаруженных в тРНК [667]. У оснований «Y», «Yt» и «пероксиY» остаток рибозы присоединяется в основном по положению N_9.



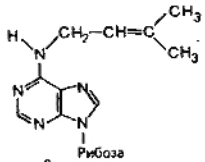
17 Инозин (I)



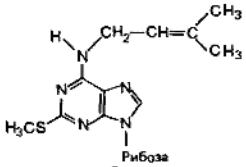
18 N^6-метиладенозин (m^6A)



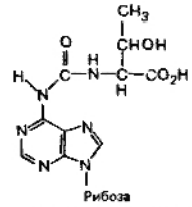
19 1-Метиладенозин (m^1A)



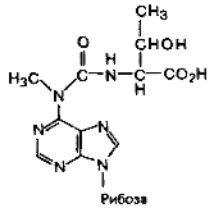
20 N^6-изопентениладенозин (i^6A)



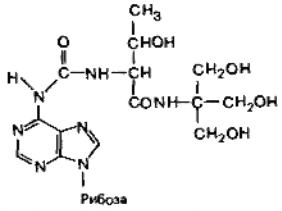
21 2-Метилтио-N^6-изопентенил-аденозин (ms^2i^6A)



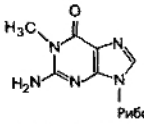
22 N-[N-(9-β-D-рибофуранозил-пурин-6-ил) карбамоил] треонин (t^6A)



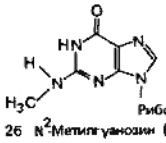
23 N-[N-(9-β-D-рибофуранозил-пурин-6-ил) N-метилкарбамоил] треонин (mt^6A)



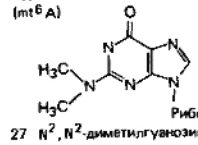
24 N-[N-(9-β-D-рибофуранозил-6-ил)-карбамоил] треонил) 2-амидо-2-гидроксиметилпропан-1,3-диол



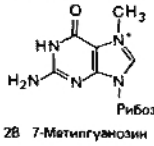
25 1-Метилгуанозин (m^1G)



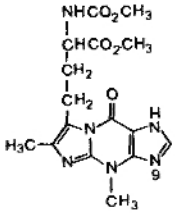
26 N^2-Метилгуанозин (m^2G)



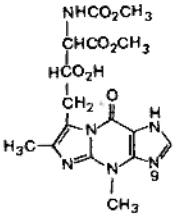
27 N^2,N^2-диметилгуанозин (m^2_2G)



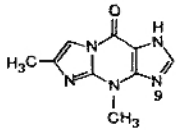
28 7-Метилгуанозин (m^7G)



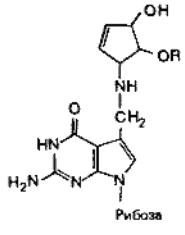
29 Основание "Y" (yW)



30 Основание "пароксн Y" (oyW)



31 Основание "Yt" (W)



32 R – H0[кьюозин,или Que][46]
R – β-D-маннозил (ман D)[35]
R – β-D-галактозил (гал D)[35]

$C_{4'}$—$C_{5'}$ оказывается менее выраженным, чем в β-нуклеозидах. С точки зрения межмолекулярных взаимодействий это означает, что основным фактором, удерживающим гидроксильную группу в *ск*-ориентации, является взаимодействие $O_{5'}\cdots$H—C(основание), о котором мы уже говорили в разд. 4.9. С другой стороны, спектроскопические данные для α-нуклеозидов свидетельствуют о наличии небольшого *гош*-эффекта (разд. 4.12): заселенность трех заторможенных конформационных областей для связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ такова, что торсионный угол $O_{4'}$—$C_{4'}$—$C_{5'}$—$O_{5'}$ несколько чаще оказывается в $\pm$ *ск*-области, чем в *ап*. Такая же картина наблюдается при замене основания атомом H или O—CH_3-группировкой [233а].

7.4. МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОСНОВАНИЯ: АЛКИЛИРОВАНИЕ АМИНОГРУПП (ЦИТОКИНИНЫ) И ЭНДОЦИКЛИЧЕСКИХ АТОМОВ АЗОТА, ТИОКЕТОЗАМЕЩЕНИЕ, ДИГИДРОУРИДИН, ТИМИНОВЫЕ ДИМЕРЫ, АЗАНУКЛЕОЗИДЫ

Модифицированные основания встречаются чаще, чем модифицированные сахара. Возможно, это связано с тем, что сахарофосфатный остов в составе полинуклеотидов играет роль стержня, на который в строго определенных местах насажены функциональные основания, и потому любая его модификация будет нарушать эту схему.

Много модифицированных оснований обнаружено в тРНК (рис. 7.6) [589, 590, 667–669]. Чаще всего происходит алкилирование аминогрупп аденина, гуанина и цитозина; алкилирование эндоциклических атомов азота N_1 аденина, N_7 гуанина и N_3 цитозина; замена кетогрупп тиокетогруппами; насыщение двойной связи C=C в 5,6-дигидроурациле и образование C-гликозидной связи в псевдоуридине.

Особый интерес представляют продукты алкилирования аденина, известные под названием цитокининов; они являются гормонами растений и играют важную роль в регуляции их роста и развития [670, 671]. Во всех активных цитокининах с аминогруппой аденина связан алифатический или ароматический заместитель с двойной связью между β- и γ-атомами боковой цепи (рис. 7.7). Кристаллографическое исследование цитокининов и сходных с ними минорных нуклеотидов тРНК показало, что во всех случаях заместитель при атоме N_6 располагается дистально по отношению к имидазольному кольцу, вероятно, из-за того, что при проксимальной ориентации будет происходить перекрывание с атомом N_7 [672–677]. Такая конформация, однако, не позволяет атому N_1 выступать в качестве акцептора, а атому N_6 в качестве донора водородной связи при уотсон-криковском спаривании, и основания образуют хугстеновские пары. Еще одной особенностью цитокининов является то, что плоскость пятичленного кольца почти перпендикулярна плоскости основания (рис. 7.7). Если такая геометрия блокируется введением какого-

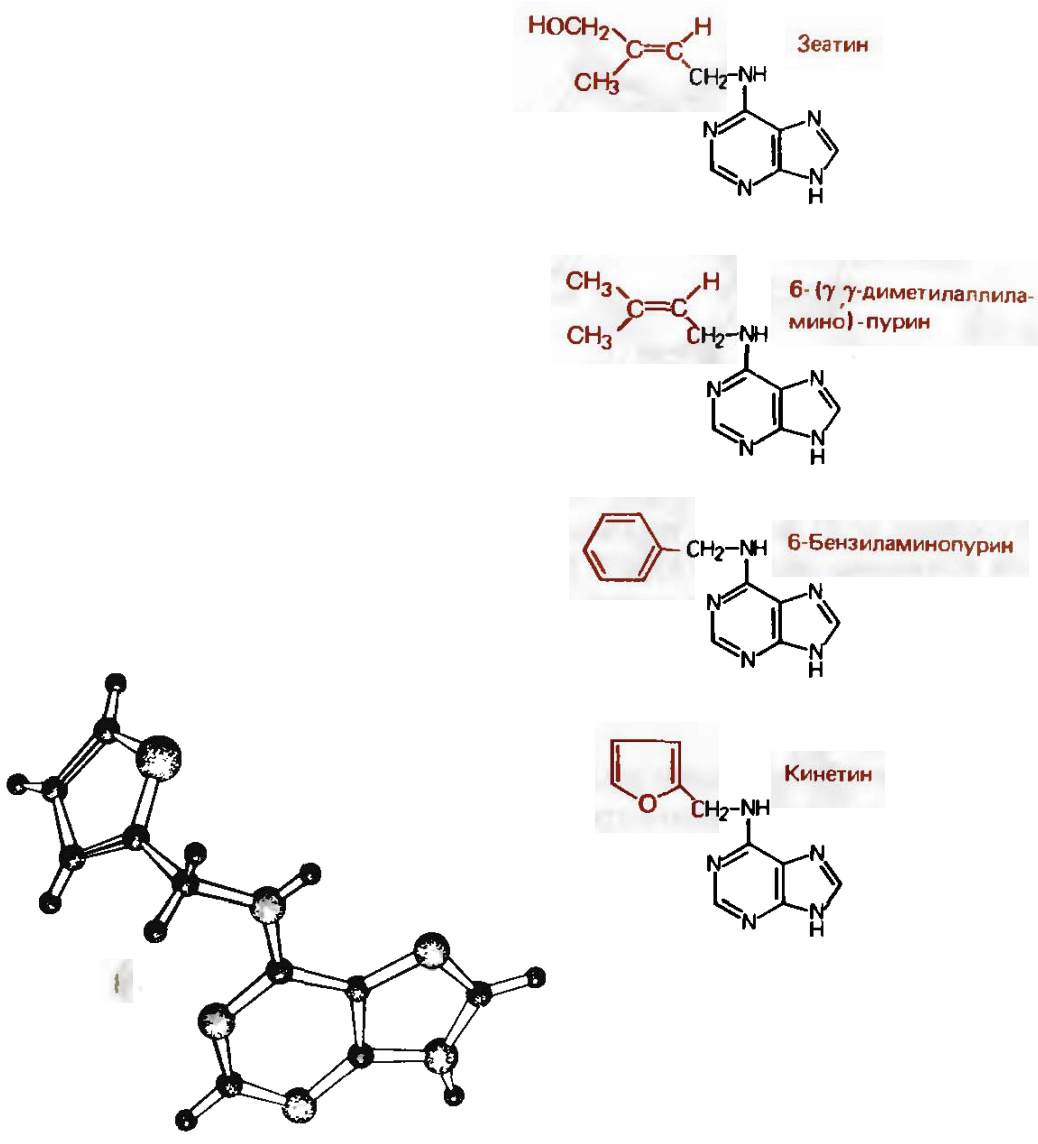


Рис. 7.7. *Вверху*: структурные формулы некоторых цитокининов. У всех цитокининов имеется двойная связь между β- и γ-атомами боковой группы, связанной с аминогруппой аденина. Зеатин и 6-(γ,γ-диметилаллиламино)-пурин (2iP) содержатся в растениях, кинетин и 6-бензиламинопурин (БАП) – это синтетические цитокинины [670]. *Внизу*: молекулярная структура кинетина. Плоскость пятичленного кольца практически перпендикулярна плоскости адениновой части молекулы. Обратите внимание, что атом N_1 не может участвовать в уотсон-криковском спаривании, однако «хугстеновские группы» свободны. Двойные связи β—γ и δ—ε обозначены тройными линиями [673].

либо объемного заместителя, то активность цитокининов резко падает [673].

Несколько иная ситуация наблюдается в минорном нуклеотиде тРНК с гипермодифицированным аденином, *N*- [*N*-(9-β-*D*-рибофуранозилпурин-6-ил)карбамоил]треонином, (t^6A). Согласно кристаллографическим данным, боковая цепь в этом соединении тоже располагается дистально по отношению к атому азота N_7 аденина, а амидная NH-группа прини-

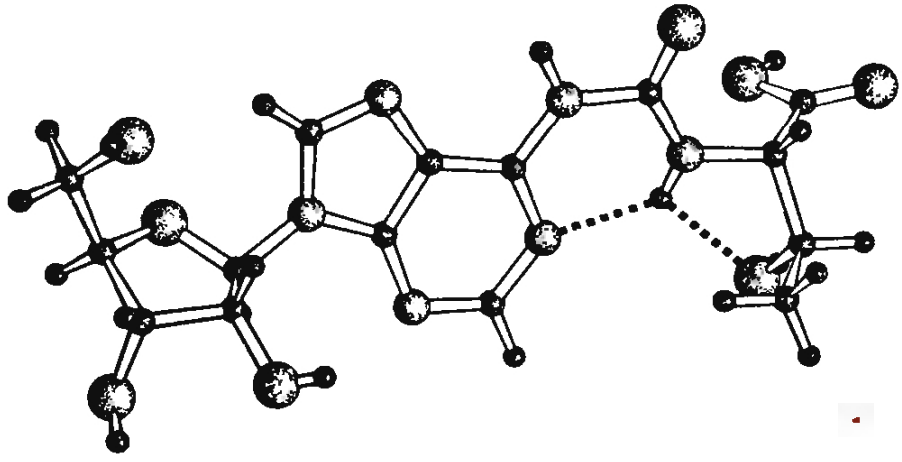


Рис. 7.8. Молекулярная структура N-[N-(9-β-D-рибофуранозилпурин-6-ил)карбамоил]треонина (t^6A), одного из минорных нуклеозидов тРНК (его структурная формула приведена на рис. 7.6) [674]. Разветвленная водородная связь (пунктир) фиксирует боковую группу в одной плоскости с кольцом аденина. Уотсон-криковское спаривание исключается, могут образовываться лишь хугстеновские пары.

мает участие в образовании разветвленной водородной связи с атомом N_1 аденина и с гидроксилом треонина, выступающим в роли акцептора [674] (рис. 7.8). Такое взаимодействие приводит к компланарности аденина и атомов боковых групп, и только концевые карбоксильная и метильная группы выступают из этой плоскости.

Экстраполяция этих данных на случай N_4-ацетилцитидина, входящего в состав тРНК, позволяет предположить, что ацетильная группа располагается проксимально по отношению к атому N_3 и блокирует группы, участвующие в уотсон-криковском спаривании. Такое предположение согласуется с данными ЯМР для производных N_4-метилцитозина [205, 678]. Однако результаты кристаллографических исследований говорят об обратном: ацетильная группа располагается дистально, не мешая уотсон-криковскому спариванию с гуанином. Такая структура стабилизируется тем, что ацетильный заместитель оттягивает электроны от гетероцикла и активирует водород при атоме C_5. Об этом свидетельствует слабопольный сдвиг сигнала ЯМР для атома H_5 на 1,21 м.д. В свою очередь атом кислорода карбонильной группы вовлекается во взаимодействие H···O; длина образующейся связи равна всего 2,15 Å (рис. 7.9). Если повернуть ацетильную группу так, что она будет располагаться проксимально по отношению к N_3, то можно ожидать, что отталкивание между N_3 и O_7 будет дестабилизировать эту конформацию.

В других модифицированных основаниях, также встречающихся в тРНК, группы, участвующие в уотсон-криковском спаривании, свободны, а хугстеновские блокированы. Такие модификации были обнаружены в кьюозине (Q) [680] и 7-метилгуанозине (m^7G). Что касается m^7G, то его гетероцикл несет избыточный положительный заряд (рис. 7.6). В тРНК обнаружено множество 5-замещенных пиримидинов.

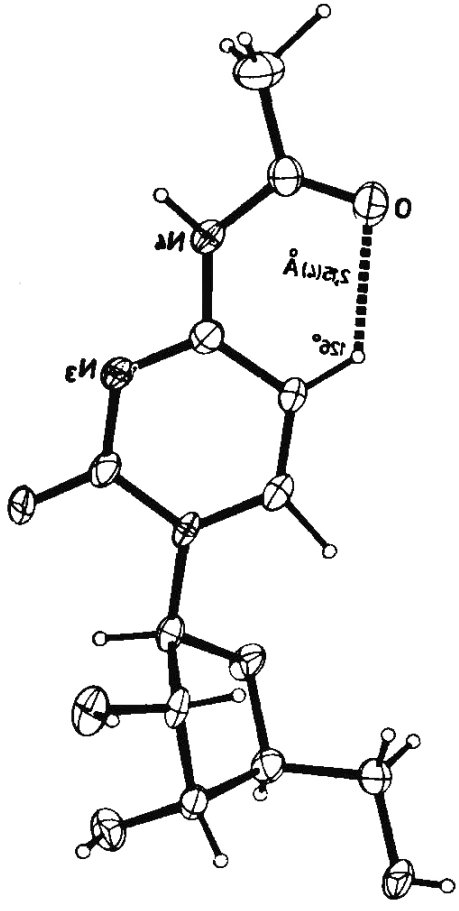


Рис. 7.9. Молекулярная структура N_4-ацетилцитидина [679]. Водородная связь C_5—H···O (пунктир) фиксирует ацетильную группу в дистальном положении относительно атома N_3, поэтому может происходить уотсон-криковское спаривание. Атомы C, N, O изображены в виде эллипсоидов (дополнение 3.1).

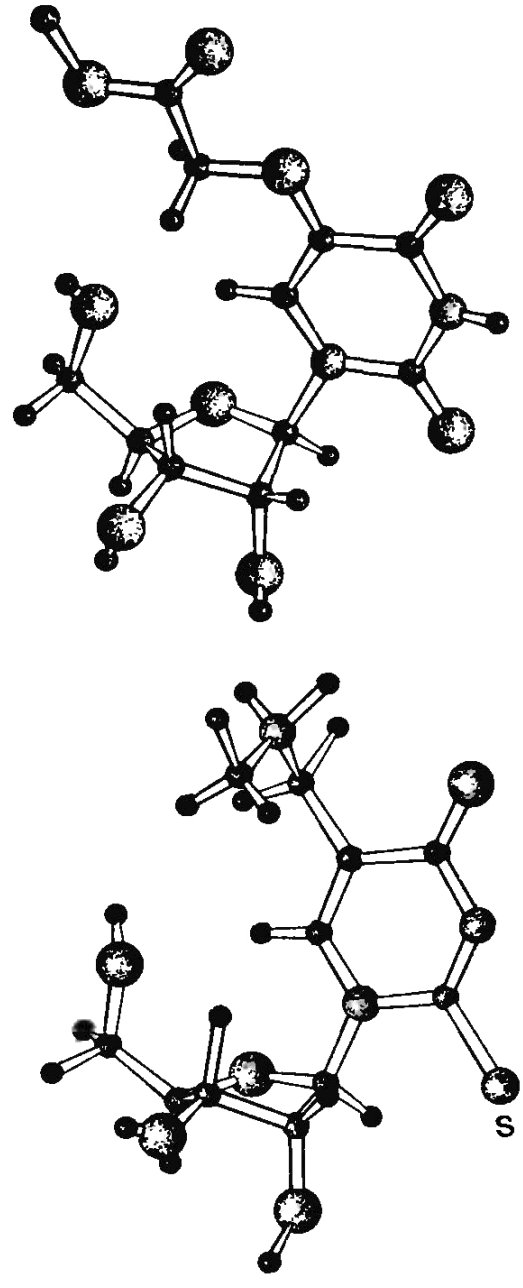


Рис. 7.10. *Вверху*: молекулярная структура минорного нуклеозида тРНК – уридин-5-оксиуксусной кислоты (его структурная формула приведена на рис. 7.6) [681]. Основание и боковая группа компланарны. *Внизу*: если атом кислорода, через который присоединена боковая группа, заменить на метильную группу (как это имеет место в 2-тио-5-метиламинометилуридине), то планарность нарушится и боковая цепь окажется расположенной перпендикулярно плоскости основания [683].

Таблица 7.4. Длина связей C—S и геометрические характеристики водородных связей с участием серы [685, 686]

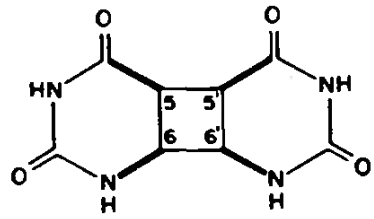
Длина связи C—S в пуриновых и пиримидиновых нуклеозидах			1,645–1,690 Å
Длина «идеальной» одинарной связи C—S			1,812 Å
Длина «идеальной» двойной связи C=S			1,607 Å
Геометрия водородных связей			
	Длина, Å Донор···акцептор	Длина, Å H···S	Угол, град Донор–H···S
Для O—H···S	от 3,13 до 3,47	от 2,27 до 2,74	от 120 до 173
Для N—H···S	от 3,27 до 3,55	от 2,27 до 2,78	от 139 до 176

Если заместитель присоединяется через 5-оксигруппу, то он, как правило, бывает компланарен с гетероциклом (рис. 7.10) [681]. При связывании через метиленовую группу боковая цепь располагается перпендикулярно плоскости гетероцикла и препятствует стэкингу между соседними основаниями [682, 683].

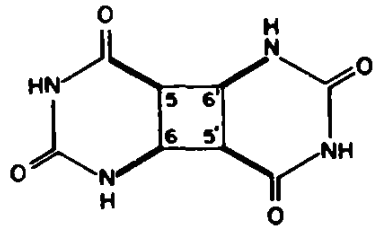
Тиокетопроизводные нуклеозидов представляют интерес как противоопухолевые препараты, как минорные составляющие тРНК и как спектроскопические зонды. Производные пиримидинов с тиокетогруппами во 2-м, в 4-м или в обоих этих положениях одновременно могут быть выделены из тРНК (см. две модификации 4-тиоуридина на рис. 4.14). Тиокетопроизводные 6-меркаптопурин и 6-меркаптогуанин применяются при лечении раковых заболеваний [21, 684].

Во всех изученных структурах тиокетозамещенных оснований и нуклеозидов связь C—S проявляет свойства двойной связи. Длина ее несколько больше, чем для «идеальной» связи C=S, и заметно меньше, чем длина одинарной связи (табл. 7.4). В кристаллических структурах тиокетогруппа в енольной форме не обнаружена, хотя при замещении кето-кислорода на атом серы p*K* амидоподобных оснований уменьшается (см. рис. 5.4).

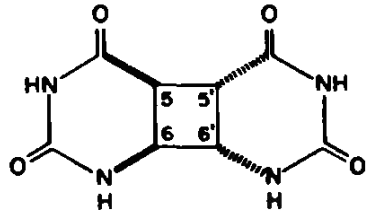
Атомы серы в тиокетогруппах оснований могут служить акцепторами при образовании водородных связей и замещать в этом смысле кето-кислород [686] (разд. 6.1). Однако геометрия системы в таком случае немного меняется. Во-первых, связь C—S становится на 0,4 Å длиннее, чем C—O-связь; во-вторых, вандерваальсов радиус атома серы, 1,85 Å, больше, чем у атома кислорода, 1,4 Å (рис. 3.1). Поэтому, когда в роли акцептора выступает атом серы, водородная связь становится длинее на 0,4–0,8 Å (табл. 7.4); этого вполне достаточно, чтобы изменить биологические свойства соединения. В уотсон-криковской паре A—s^4U геометрия комплекса искажена. В парах типа s^6G—C или G—s^2C картина еще более усложняется, поскольку одна из водородных связей удлиняется примерно на 0,6 Å, что приводит либо к ослаблению остальных водородных связей (N—H···O и N—H···N), либо к отчетливо выражен-



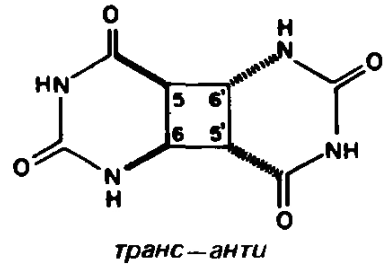
цис – син



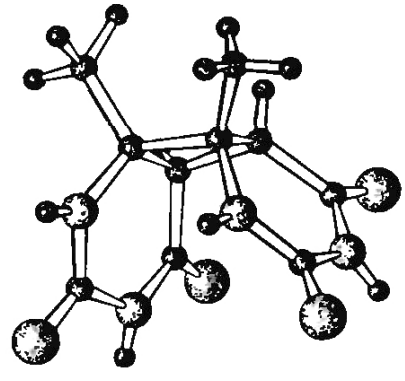
цис – анти



транс – син



транс – анти



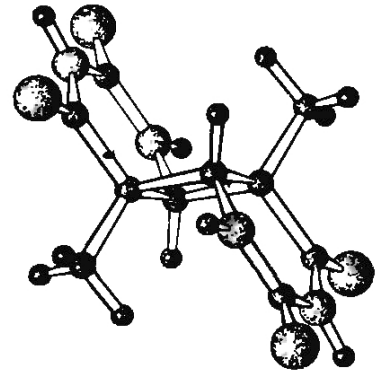


Рис. 7.11. Структурные формулы четырех урациловых (или тиминовых) циклобутановых димеров [689].

Рис. 7.12. Молекулярная структура двух циклобутановых тиминовых димеров, показанных на рис. 7.11. *Вверху – цис – син* [718], внизу – *транс – анти* [718].

ному повороту плоскостей оснований друг относительно друга (пропеллер) [687].

Высокая поляризуемость атомов серы приводит к стабилизации стэкинга, поскольку поляризационные эффекты вносят большой вклад в дисперсионные силы (разд. 6.7). В кристаллических структурах пуринов и пиримидинов, содержащих тиокетогруппы, наблюдается регулярный стэкинг, при котором атом серы располагается над пиримиди-

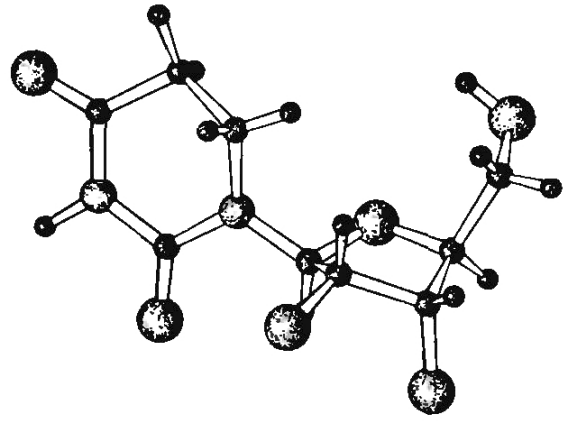


Рис. 7.13. Молекулярная структура минорного нуклеозида тРНК – дигидроуридина [720]. Обратите внимание на изгиб пиримидинового кольца с насыщенной связью C_5—C_6. Если атом водорода при C_6 замещен более объемной метильной группой, то атом O_5 смещается от рибозы. Кроме того, sp^3-CH менее кислотна, чем sp^2-CH, поэтому связь C—H···O_5, в дигидроурациле слабее.

новым гетероциклом [686], чаще всего вблизи экзоциклических атомов азота [453]. Как будет показано в гл. 13, такое стэкинг-взаимодействие, когда 2-тиокето-сера располагается над атомом N_1 соседнего основания, существенно повышает стабильность двухцепочечных нуклеиновых кислот.

И наконец, немаловажной особенностью тиокетопроизводных нуклеозидов является то, что полоса поглощения тиокетогруппы находится в видимой области (λ_{max} для 4-тиоуридина равна 330 нм). Они охотно присоединяют амино-, кето- и другие группы и, являясь «мягкими» основаниями, охотно взаимодействуют с «мягкими» металлами, например с платиной. К этому вопросу мы вернемся в гл. 8.

Еще одним важным нуклеозидом, входящим в состав тРНК, является дигидроуридин – производное уридина с насыщенной C_5—C_6-связью [589, 590, 667, 668]. Сходные соединения могут быть получены при облучении УФ-светом ДНК или замороженных растворов тимина или урацила [688, 689]. В этих случаях молекулы тимина, находящиеся рядом друг с другом, вступают в реакцию с образованием тиминовых димеров (иногда образуются также тримеры и тетрамеры). Наиболее интересным со структурной точки зрения моментом является то, что мономеры, объединяясь в димер, образуют циклобутановое кольцо, замыкающееся двумя C_5—C_6-связями. Остатки тимина могут ассоциироваться друг с другом по-разному: возможны четыре структурные формы димера – с *цис/транс-* и *син/анти*-ориентацией гетероциклов (рис. 7.11 и 7.12).

Основной структурной особенностью насыщенных пиримидиновых оснований является увеличение длины связи C_5—C_6 от 1,50 до 1,55 Å [689]. Заместители при атомах C_5 и C_6, для которых характерна теперь sp^3-гибридизация, перекрываются и, чтобы избежать этого, выходят из

плоскости остальных четырех атомов кольца примерно на 0,3–0,7 Å (рис. 7.13). Из-за сравнительно большого объема C_6-метиленовой группировки в дигидроуридине изменяется конформация сахара: он практически фиксируется в $C_{2'}$-*эндо*-конформации и немного дестабилизирует + *ск*-ориентацию относительно $C_{4'}$—$C_{5'}$-связи как в кристаллическом состоянии, так и в растворе [351, 690].

Непланарность основания в производных дигидроуридина препятствует стэкингу параллельно ориентированных оснований, необходимому для образования двойной спирали. Создается впечатление, что подобные молекулы специально созданы природой для нарушения спирального порядка. Такой вывод согласуется с результатом кристаллографических исследований тРНК. В этих молекулах имеются так называемые дигидроуридиловые петли, в состав которых обязательно входят два примыкающих друг к другу остатка дигидроуридина.

Азануклеотиды находятся только в *высокой-анти*(– ск)-конформации и являются эффективными химиотерапевтическими препаратами. С чисто химической точки зрения замещение С—Н-группы основания азагруппой не должно приводить к большим структурным и функциональным изменениям, поскольку модификация идет по изоэлектронному типу и не влияет на π-электронную систему. Такая точка зрения подтверждается экспериментально в том смысле, что все валентные углы и длины связей в азануклеооснованиях сохраняются, за исключением того, что замена С—Н-группы на менее объемный атом N приводит к уменьшению длин соответствующих связей [289]. В то же время в пуриновых и пиримидиновых гетероциклах распределение заряда меняется довольно существенно, причем в свободных пуринах наблюдается даже переход к другим таутомерным формам [691]. Благодаря этому азазамещенные основания и их нуклеозиды становятся весьма эффективными канцеростатическими агентами [586–588, 692].

В азануклеотидах, содержащих *аза*-азот в *орто*-положении относительно гликозидной связи (как это имеет место в 6-азапиримидинах и 8-азапуринах), наблюдаются характерные конформационные изменения, которые приводят к появлению у них особых биохимических свойств. В таких системах можно было бы a priori ожидать образования довольно прочной водородной связи $O_{5'}$—H···N. Однако реально ее никто не наблюдал, поскольку, как это следует из квантово-химических расчетов, аза-азот практически не несет никакого остаточного заряда [289, 691, 693, 694]. Согласно результатам кристаллографических исследований [289, 691, 695] и исследований в растворе [173], + *ск*-ориентация относительно связи $C_{4'}$—$C_{5'}$, обычно являющаяся предпочтительной, дестабилизируется в результате отталкивания или по крайней мере отсутствия притяжения между аза-группой и атомом $O_{5'}$. Из-за отсутствия C_6—Н-группы в пиримидинах и C_8—Н-группы в пуринах основания могут поворачиваться вокруг гликозидной связи и принимать *высокую-анти*(– *ск*)-конформацию, которая в природных нуклеозидах не наблюдается (рис. 4.16). Аналогичные структурные

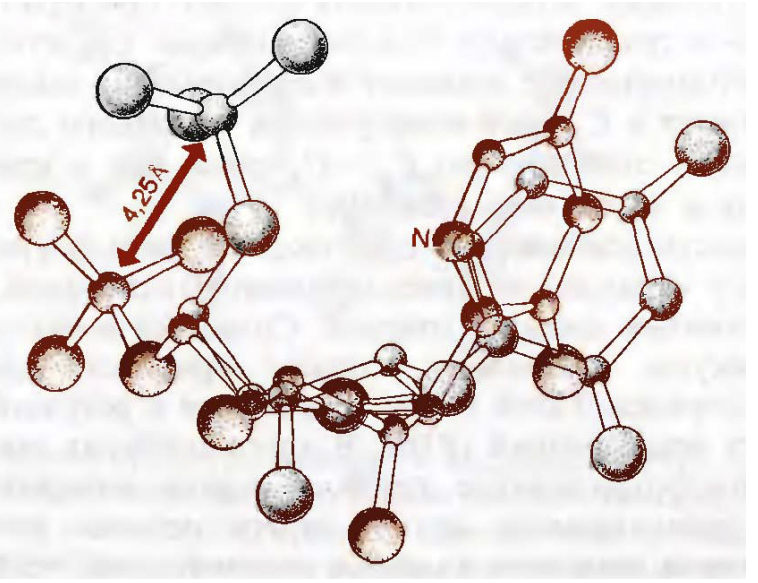


Рис. 7.14. Сравнение молекулярной структуры уридин-5′-фосфата и 6-азауридин-5′-фосфата (изображена в цвете) [288]. Молекулы расположены таким образом, что атомы рибозы $C_{1'}$—$O_{4'}$—$C_{4'}$ налагаются друг на друга. Уридин-5′-фосфат находится в стандартной конформации: сахар $C_{3'}$-*эндо* и торсионные углы χ и γ лежат в областях *анти* и $+sc$ соответственно. В 6-азааналоге конформация сахара становится $C_{2'}$-*эндо*, торсионный угол χ располагается в *высокой-анти*($-sc$)-области, а угол γ – в необычной *ап*-области. Такое значение угла γ не наблюдалось ни в одной из кристаллических структур 5′-рибонуклеотидов, кроме тех случаев, когда их кристаллизацию проводили совместно с антибиотиками, металлами или белками.

характеристики – *высокая-анти*($-sc$)-конформация относительно гликозидной связи и *ап*-ориентация относительно $C_{4'}$—$C_{5'}$-связи – были обнаружены у 6-азауридин-5′-фосфата и никогда не наблюдались в немодифицированных рибонуклеотидах [за исключением комплексов аденозин-5′-фосфата с переходными металлами (гл. 8)]. Конформационные различия между 6-азауридин-5′-фосфатом и его природными аналогами наглядно демонстрирует рис. 7.14. На основании этих различий были высказаны некоторые предположения относительно механизма фармакологической активности 6-азауридина (дополнение 7.2 [288, 696]).

7.5. ХИРАЛЬНЫЙ АТОМ ФОСФОРА В НУКЛЕОЗИДФОСФОТИОАТАХ

Использование фосфотиоаналогов нуклеотидов, в которых один из неэтерифицированных атомов кислорода замещен на серу, является мощным орудием для изучения механизма ферментативных реакций, протекающих с участием фосфора [697, 698]. В отличие от имидодифосфатных аналогов нуклеотидов с нереакционноспособными концевыми группами, являющихся ингибиторами различных киназ, фосфотиоатные аналоги представляют собой субстраты этих ферментов и взаимодей-

ствуют с ними (правда, в большинстве случаев с меньшей эффективностью, чем их природные аналоги).

Наиболее важной особенностью нуклеозидфосфотиоатов является хиральность атома фосфора. В обычных фосфомоно- и фосфодиэфирах атом фосфора прохирален, поэтому по стереохимии субстрата и продуктов реакции нельзя судить о том, как протекала реакция: с сохранением или с инверсией конфигурации окружения фосфора.

Дополнение 7.2

Механизм действия цитостатика 6-азауридина объясняется его необычной конформацией

Цитостатик 6-азауридин успешно используется для лечения лейкозов. В организме под действием уридинкиназы он превращается в 6-азауридин-5′-фосфат, который ингибирует фермент декарбоксилазу оротидиловой кислоты, блокируя тем самым синтез de novo уридин-5′-фосфата из оротидиловой кислоты (схема 4). Чем объясняется такое поведение 6-азауридин-5′-фосфата?

Схема 4. Механизм ингибирования декарбоксилазы оротидиловой кислоты 6-азауридином [696].

Оротидиловая кислота должна находиться в *син*-конформации, поскольку карбоксильная группа, связанная с атомом C_6 урацила, слишком объемна, чтобы располагаться над рибозой в стандартной *анти*-ориентации. В *син*-конформации, однако, ориентация относительно связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ не может соответствовать обычной $+sc$-области из-за стерически неблагоприятных контактов между атомами $O_{5'}$ и O_2. Вследствие этого угол γ может находиться либо в *ап*-либо в $-sc$-области. В кристаллах 6-азауридин-5′-фосфата угол γ лежит в *ап*-области, а все нормальные 5′-рибонуклеотиды находятся в стандартной $+sc$-ориентации (рис. 7.14).

Итак, 6-азауридин-5′-фосфат имитирует оротидиловую кислоту и связывается с активным центром декарбоксилазы. Это позволяет думать, что сходным образом будут вести себя и все 5′-нуклеотиды с *син*-ориентированными основаниями и с основаниями, в которых *аза*-группа находится в *орто*-положении относительно гликозидной связи. Такая ситуация действительно наблюдается в серии нуклеотидных аналогов, в которых 6-азаурацил заменен на оксипуринол, ксантин и аллопуринол; все они ингибируют декарбоксилазу оротидиловой кислоты (схема 5).

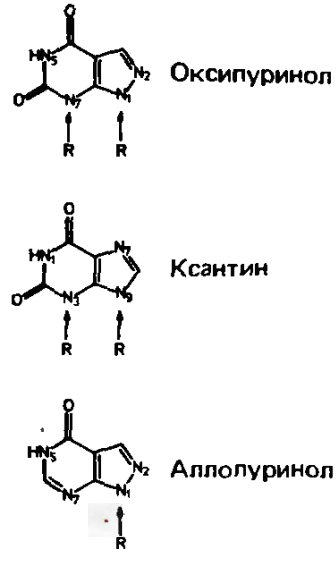


Схема 5. Ингибиторы декарбоксилазы оротидиловой кислоты. Символом R обозначены атомы, к которым могут присоединяться рибозил-5′-фосфатные остатки. Наиболее эффективным ингибитором является 1-рибозилоксипуринол-5′-фосфат (N в орто-положении). За ним в порядке убывания эффективности ингибирования следуют: 7-рибозилоксипуринол-5′-фосфат (*син*-форма), 3-рибозилксантин-5′-фосфат (*син*-форма), 1-рибозилаллопуринол-5′-фосфат (N в *орто*-положении). 9-рибозилксантин-5′-фосфат практически неактивен: в нем и атом N не находится в *орто*-положении, и основание не фиксировано в *син*-ориентации (см. [288]).

Чтобы ответить на этот вопрос, нужно сделать атом фосфора хиральным. Наиболее изящный способ состоит в замещении одного из двух неэтерифицированных атомов кислорода фосфатной группы в составе фосфодиэфира или пирофосфатного эфира атомом серы [698] или другим изотопом кислорода [697]. Если замещения одного типа оказывается недостаточно, используют оба. Поскольку нуклеозид, связанный с модифицированной таким образом фосфатной группой, тоже становится хиральным, две стереохимически различные формы фосфотиоатов будут не энантиомерами, а диастереоизомерами.

В процессе химического синтеза образуются оба изомера, которые затем можно разделить хроматографическими методами или с по-

мощью частичной деградации соответствующими ферментами. В качестве иллюстрации применения нуклеозидфосфотиоатов в дополнении 7.1 прослежен весь ход исследования механизма действия панкреатической РНКазы.

Основные структурные характеристики тиофосфатных групп связаны с некоторыми особенностями замещения кислорода серой. Длина связи P—S, равная 1,8 Å, примерно на 0,3 Å превышает длину связи P—O, а вандерваальсов радиус атома серы, равный 1,85 Å, на 0,45 Å больше вандерваальсового радиуса кислорода [699] (см. табл. 3.1). В результате сера находится на 0,8 Å дальше от атома фосфора, чем кислород. Поскольку электроотрицательность кислорода (3,5) и серы (2,5) существенно различается, отрицательный заряд в тиофосфатной группе распределен неравномерно: он локализован в основном на атоме кислорода, а сера при этом остается практически нейтральной, вследствие чего связь P—S приобретает характер двойной связи. Кроме того, сера легче поляризуется и является более гидрофобной, чем кислород. Поэтому в целом тиокетофосфатная группа существенным образом отличается от фосфатной группы и по характеру, и по структуре, и это отличие распознается ферментами, которые хоть и воспринимают нуклеотиды с серозамещенным фосфатом как субстраты, но работают гораздо менее эффективно, чем в случае обычных нуклеотидов. Тем не менее оба субстрата связываются с активным центром по одному механизму, что позволяет применять нуклеозидфосфотиоаты для исследования механизма действия ферментов.

7.6. ПИРОФОСФАТНАЯ ГРУППА В СОСТАВЕ НУКЛЕОЗИДДИ- И НУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТОВ, А ТАКЖЕ НУКЛЕОТИДНЫХ КОФЕРМЕНТОВ

Важную роль играет пирофосфатная группа, входящая в состав богатых энергией нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфатов (например, в состав ADP и ATP), а также нуклеотидных коферментов, таких, как NAD^+, цитидилфосфохолин и кофермент А. Длины связей и валентные углы в пирофосфатной группе рассматривались нами в разд. 4.11; здесь речь пойдет о ее конформационных свойствах. К этой теме мы вернемся в разд. 8.4, где пойдет речь о Δ- и Λ-стереоизомерах, образуемых хелатами полифосфатов с металлами.

В упомянутых выше нуклеотидах пирофосфатная или трифосфатная группа связывается только с 5′-гидроксильной группой сахара; не обнаружено ни одного нуклеотида, в котором пирофосфат присоединялся бы к $O_{3'}$- или $O_{2'}$-гидроксилу (исключение – ppGpp). Конформация самого нуклеотида при такой модификации не изменяется. Сахар остается в $C_{2'}$- или $C_{3'}$-*эндо*-конформации, а его ориентация относительно гликозидной и $C_{4'}$—$C_{5'}$-связей – *анти*- и + *ск* в соответствии с концепцией жесткого нуклеотида. Несмотря на то что результаты квантово-химических расчетов, проведенных для условий in vacuo, указывают на суще-

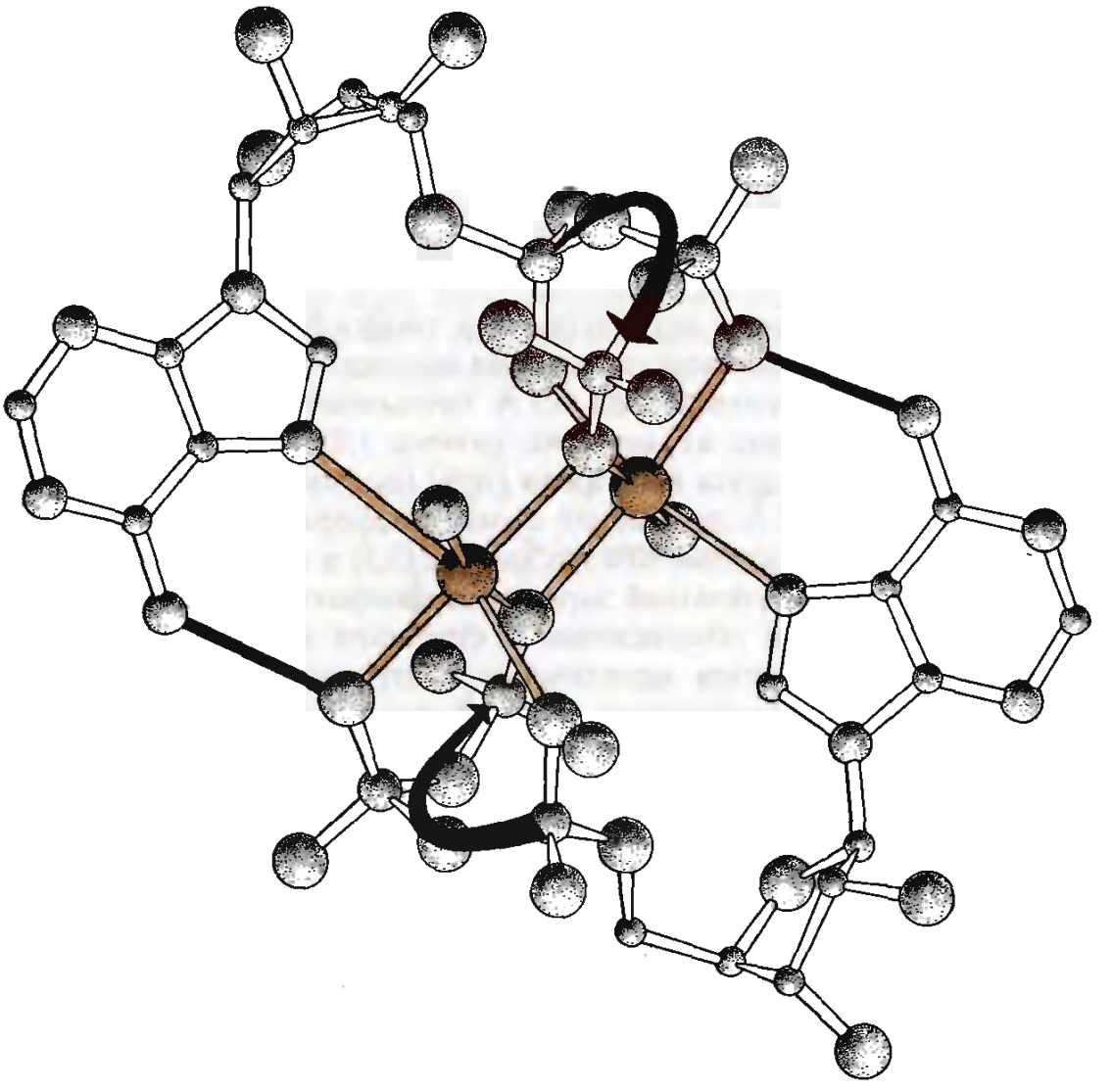
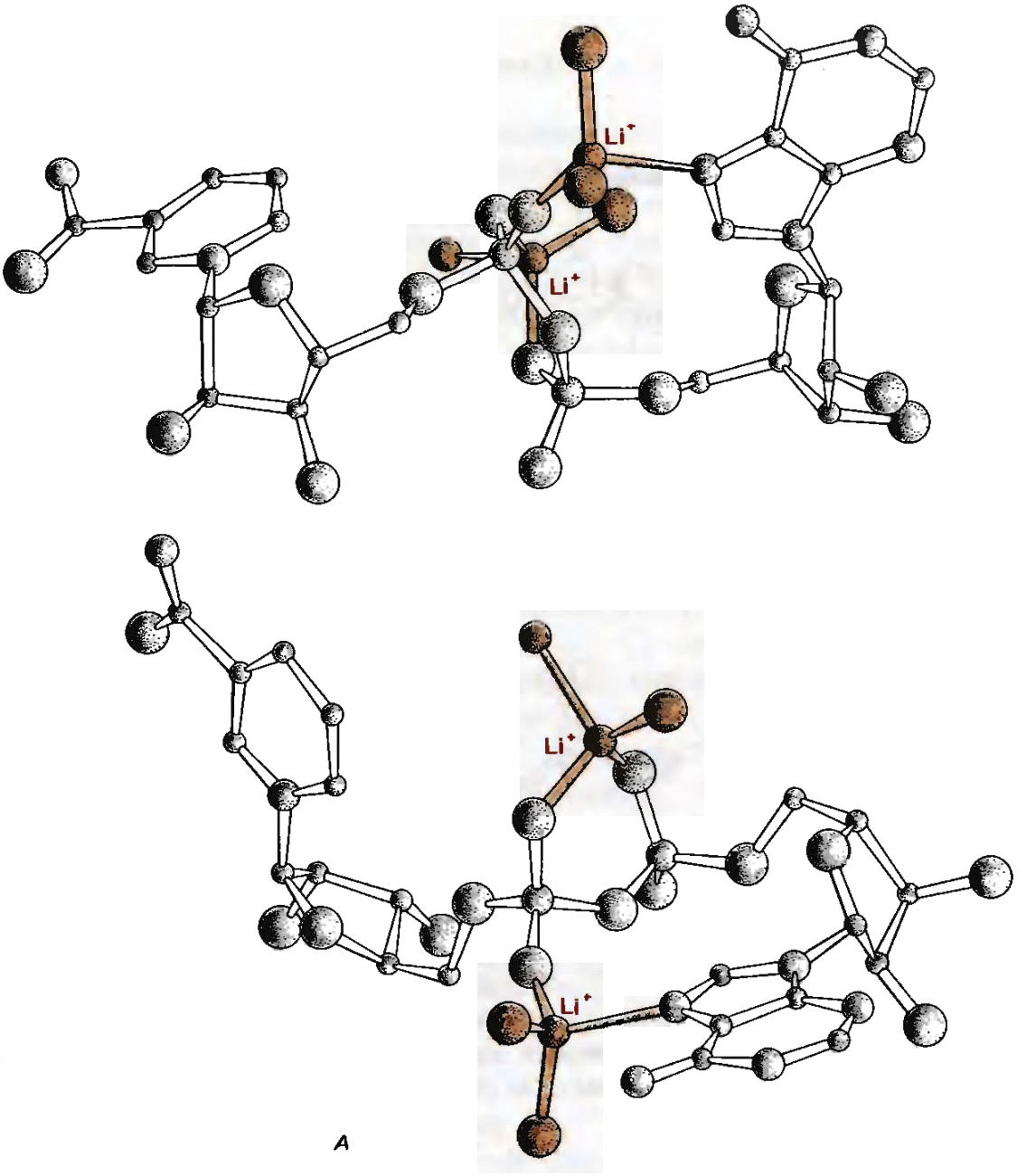
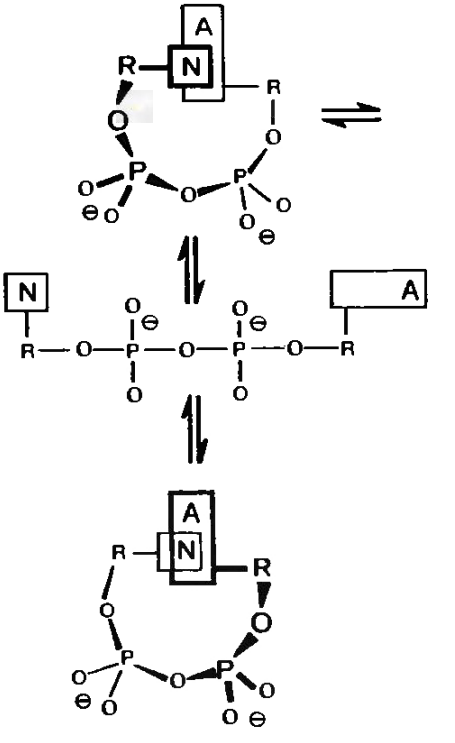


Рис. 7.15. Структура комплекса $Na_2H_2ATP \cdot 3H_2O$ [721]. Два иона натрия образуют координационные связи с атомами N_7 и с двумя концевыми γ-фосфатами обеих молекул ATP; остальные положения октаэдрической координационной оболочки ионов Na^+ заняты молекулами воды. Обратите внимание на различие конформаций молекул ATP: конформации сахара – $C_{2'}$-*эндо* и $C_{3'}$-*эндо* – $C_{2'}$-*экзо*, а трифосфатные цепи создают левую и правую спиральные формы соответственно (см. цветные стрелки).

Рис. 7.16. *А.* Кристаллическая структура комплекса NAD^+ с Li^+. Структурная формула NAD^+ приведена на рис. 2.2. Молекула NAD^+ образует координационные связи с двумя симметрично расположенными катионами Li^+, которые изображены в цвете вместе с их тетраэдрическими координационными связями и атомами N и O, которые принадлежат соседним молекулам NAD^+. Оба нуклеотида в молекуле NAD^+ находятся в стандартной конформации: сахар $C_{2'}$-*эндо* (аденозин) и $C_{3'}$-*эндо* (никотинамидрибозид), торсионные углы χ и γ лежат в областях *анти* и $+$*ск* соответственно. Торсионный угол β ($P—O_{5'}—C_{5'}—C_{4'}$) в аденозин-5′-фосфате лежит не в обычной *ап* (180°)-области, а в области $+$*ак* (120°). Возможно, это обусловлено одновременным образованием координационных связей между Li^+, с одной стороны, и атомом N_7 и пирофосфатом – с другой, что должно приводить к напряжению в молекуле. *Б.* В растворе NAD^+ может находиться в двух конформациях: в вытянутой или в спиральной. В спиральной конформации никотинамид и аденин располагаются на расстоянии 3,4 Å друг от друга и вступают в стэкинг-взаимодействие [704, 709].



А



Б

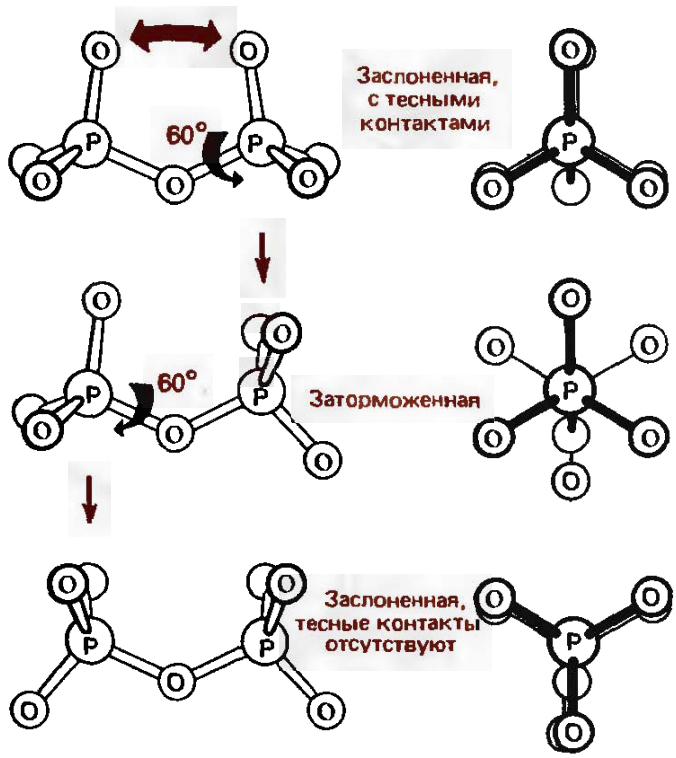


Рис. 7.17. Три конформации пирофосфатной группы. *Цис*-планарная (заслоненная) конформация невыгодна (*вверху*), поскольку из-за слишком сильного сближения атомов кислорода в молекуле возникает напряжение. Поворот одной (или обеих) фосфатной группы Р—$O_{связ}$-мостика приводит либо к заторможенной, либо к заслоненной полностью *транс*-конформации (*в середине и внизу*), которые не запрещены энергетически. Последняя наиболее выгодна при образовании бидентатного комплекса с металлом; см. трифосфатную цепь на рис. 7.16. *А.*

ствование внутримолекулярной водородной связи между концевым фосфатом и основанием [700], экспериментально такие взаимодействия не наблюдались. Однако, как видно из рис. 7.15 и 7.16 и будет подробно обсуждаться в гл. 8, и в растворе, и в кристаллах между концевым фосфатом и атомом N_7 пурина может образоваться мостик через ион металла [701–703].

Конформационные свойства пирофосфата определяются вращением фосфатной группы вокруг Р—О-мостика пирофосфатной связи [59]. Одно из трех представленных на рис. 7.17 конформационных состояний, с *цис*-планарной организацией цепи О—Р—О—Р—О, практически не может реализоваться из-за пространственного наложения концевых атомов кислорода. Поворот на 60° вокруг Р—О-мостика приводит к более благоприятной (заторможенной) конформации, при которой атомы кислорода фосфатных групп располагаются зигзагообразно. Еще один поворот на 60° вокруг другого Р—О-мостика приводит к заслоненной конформации, т. е. к полному наложению двух фосфатных групп. Эти две промежуточные конформации, а также ряд других форм наблюда-

лись в кристаллах соединений, содержащих пирофосфатные группы. Поскольку в заторможенной конформации атомы кислорода двух фосфатных групп отстоят друг от друга дальше, чем в заслоненной, последняя конформация оказывается более благоприятной для образования бидентатных комплексов с металлами (разд. 8.4).

Пирофосфатная группа обычно является конформационно подвижной [59, 704], и взаимный переход между двумя указанными выше формами осуществляется довольно легко. В зависимости от углов вращения вокруг связи P—O цепочка атомов от $C_{4'}$ до концевого фосфата может принимать линейную, вытянутую или левовинтовую (правовинтовую) конформацию. Кристаллографические исследования выявили пока только винтовую структуру. Примером такого рода служит комплекс $Na_2H_2ATP \cdot 3H_2O$. В независимой части элементарной ячейки кристаллов этого комплекса содержатся две молекулы ATP (рис. 7.15). Ориентация их относительно гликозидной и $C_{4'}$—$C_{5'}$-связей одинакова: *анти* и + *ск* соответственно, однако конформация сахарных колец различается: в одной молекуле она $C_{2'}$-*эндо*, а в другой – $C_{3'}$-*эндо* – $C_{2'}$-*экзо*. Знак винта у трифосфатных цепей разный: у нуклеотида с $C_{2'}$-*эндо*-конформацией сахара винт левый, а у нуклеотидов с $C_{3'}$-*эндо* – правый. Картина еще более усложняется тем, что три фосфата каждого из ATP образуют координационные связи с ионами натрия, в результате чего формируются тридентатные хелаты с противоположными хиральностями (разд. 8.4). Остальные положения октаэдрической координационной системы иона натрия заняты атомом N_7, молекулой воды и атомом кислорода соседней молекулы ATP. Может возникнуть вполне резонный вопрос: почему стереохимия столь важной молекулы так сложна? В ответ на это можно только заметить, что ионы некоторых металлов, например Mg^{2+}, связываются, по-видимому, только с атомами кислорода β- и γ-фосфатных групп и не связываются с атомом N_7 аденина и что недавно получены новые данные о стабильных комплексах ADP и ATP с кобальтом и хромом, которые, возможно, несколько прояснят этот вопрос (разд. 8.4).

Внутренняя гибкость пирофосфатной группы детально изучена в случае кофермента NAD^+. Это соединение является кофактором некоторых ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции. Оно состоит из двух нуклеотидов – AMP и никотинамидрибозо-5′-фосфата, связанных между собой пирофосфатным мостиком (рис. 2.2 и 7.16). В растворе эта молекула, как и ее восстановленный аналог NADH, существует в двух основных структурных формах: вытянутой, в которой основания аденина и никотинамида удалены друг от друга примерно на 12 Å, и компактной, в которой два гетероцикла располагаются параллельно друг над другом на расстоянии 3,4 Å (рис. 7.16, *Б*). Далее, в зависимости от того, находится ли аденин над никотинамидом или под ним, компактная форма дает два конформационных изомера: право- или левозакрученные спиральные структуры. Все эти конформации переходят одна в другую. В растворе преобладает вытянутая фор-

ма; количество NAD^+, находящегося в компактной форме, зависит от свойств раствора, таких, как pH, содержание спирта, и от температуры.

Спектроскопические данные [175, 705–707], результаты расчетов потенциальной энергии [708] и анализ кристаллической структуры [704, 709] показывают, что структурные параметры двух нуклеотидов, составляющих молекулу NAD^+, соответствуют обычным стандартам, а именно: остатки рибозы находятся в $C_{2'}$- или $C_{3'}$-*эндо*-конформации, ориентация относительно $C_{4'}$—$C_{5'}$-связи соответствует $+$*ск*-области, а ориентация гетероциклов – *анти*-конформации. В никотинамиде переход *син* ⇄ *анти* происходит практически свободно, поскольку заместитель в *орто*-положении, мешающий указанному переходу в пиримидиновых нуклеотидах, отсутствует. Это создает необходимую основу для взаимодействия с дегидрогеназами А- и Б-типа, которые присоединяют гидрид-ион с разных концов никотинамидного гетероцикла (см. также гл. 18). В остальном два нуклеотида ведут себя как жесткие структурные единицы, а конформационная гибкость NAD^+ определяется пирофосфатной связью.

7.7. НУКЛЕОЗИДНЫЕ АНТИБИОТИКИ: ПУРОМИЦИН

В разд. 7.3 мы уже упоминали о важном классе нуклеозидных антибиотиков – арабинонуклеозидах. В разд. 4.2 обсуждались структурные аспекты других антибиотиков, химические свойства которых рассматриваются в работе [587]. В данном разделе речь пойдет о пуромицине – представителе этого важного для фармакологии класса соединений, для которого структурно-функциональная корреляция наиболее очевидна.

Пуромицин – антибиотик широкого спектра действия, продуцируемый *Streptomyces alboniger*. Он состоит из нуклеозидного и аминокислотного фрагментов, а именно из 3′-дезокси-3′-амино-N_6-диметиладенозина и *п*-метокси-L-фенилаланина, соединенных пептидной связью (рис. 7.18).

Пуромицин является структурным аналогом 3′-конца аминоацил-тРНК. Кристаллографические исследования были проведены для дигидрохлоридной формы пуромицина, в которой протонированы атом N_1 аденина и аминогруппа фенилаланина [710, 711]. Было показано, что нуклеозидная часть находится в стандартной конформации, при которой ориентация относительно $C_{4'}$—$C_{5'}$- и гликозидной связей отвечает областям $+$*ск* и *анти* соответственно, а сахар находится в $C_{3'}$-*эндо* ($^3T_2$)-конформации. Пептидная группа $C_{3'}$—$N_{3'}$—C—C_α *анти*-перипланарна, а торсионный угол $H_{3'}$—$C_{3'}$—$N_{3'}$—C находится в *син*-перипланарной области, причем пептидная группа направлена от сахарного кольца. Эта особенность расположения атомов, по-видимому, характерна для всех (плоских) карбоксильных или пептидильных групп, связанных с $C_{3'}$-атомом фураноз: аналогичная картина наблюдается и в 3′-О-ацетилнуклеозидах [195, 712, 713]. Остаток *п*-метоксифенилаланина находится в обычной конформации, значения торсионных углов

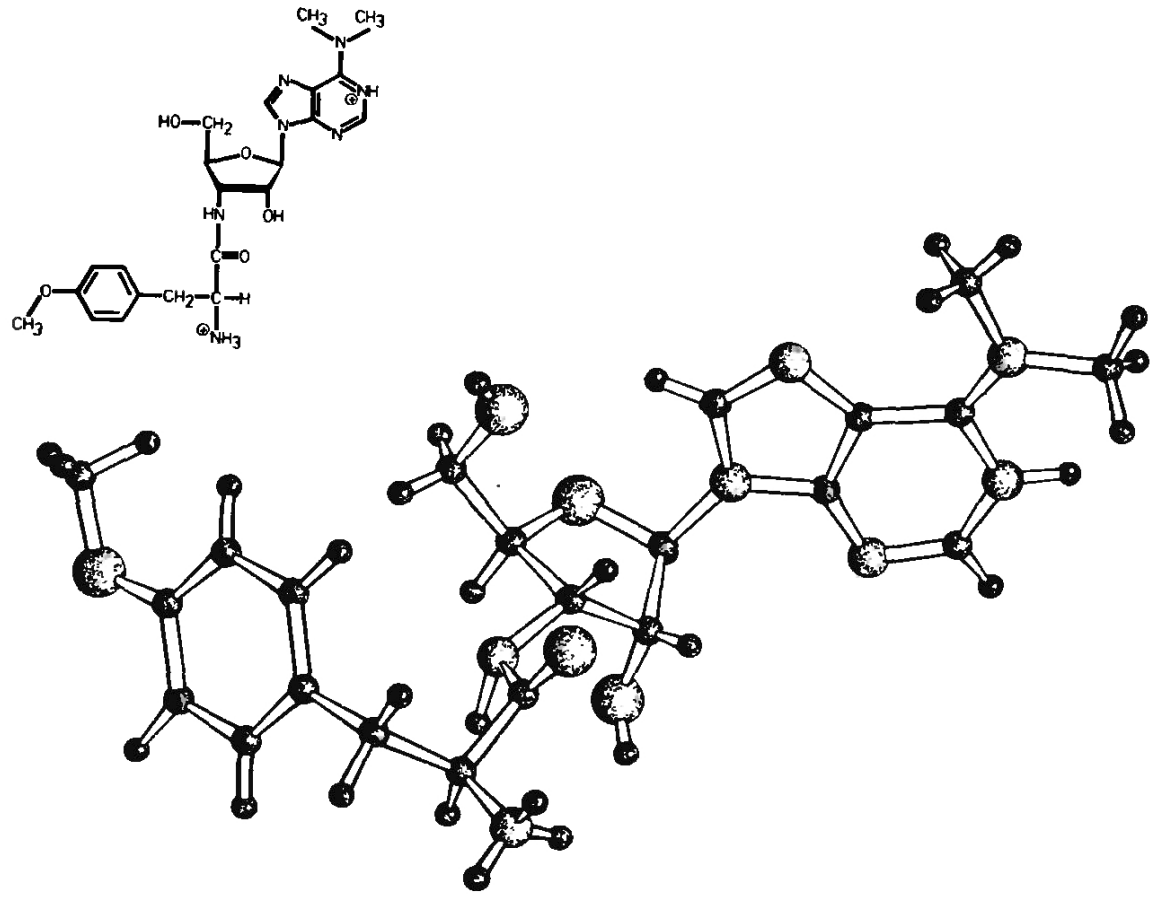


Рис. 7.18. Химическая и молекулярная структуры антибиотика пуромицина (в виде дигидрохлорида) [711]. Обратите внимание на то, что аденозиновая часть находится в стандартной конформации, с сахаром $C_{3'}$-*эндо* и с торсионными углами χ и γ в *анти-* и $+$*ск*-областях соответственно. Отличительной структурной особенностью этого соединения является *син-перипланарная* ориентация цепи $H_{3'}$—$C_{3'}$—$N_{3'}$—C и вытянутая форма цепи $N_{3'}$—C—C_α—N. Вероятно, такие же структурные особенности характерны для ССА-конца тРНК, нагруженной аминокислотой (с заменой $N_{3'}$ на $O_{3'}$).

N—C_α—C_β—C_γ и $N_{3'}$—C—C_α—C_β соответствуют стандартным вытянутой (*ап*) и заторможенной ($-$*ск*) конформациям.

Пуромицин имитирует ССА-конец нагруженной аминокислотой молекулы тРНК. Поскольку образование пептидной или эфирной связи с фуранозным кольцом существенно ограничивает структурные возможности образующегося соединения, независимо от того, какая аминокислота присоединяется к 3′-гидроксилу рибозы нуклеозида, предпочтительной является вытянутая конформация, подобная той, которая наблюдается в случае пуромицина. В структурном отношении молекула пуромицина аналогична 3′-концу (ССА-концу) тРНК, нагруженной аминокислотой. ССА-конец играет ключевую роль в биосинтезе белка. Именно к нему присоединяется аминокислота, которая переносится к рибосоме и включается в растущую полипептидную цепь. Следующий шаг состоит в переносе пептидильной цепи на аминокислоту, присоеди-

ненную к ССА-концу тРНК. Если цепь свяжется не с тРНК, а с пуромицином, то ее рост остановится и будут синтезироваться незаконченные полипептидные фрагменты.

Кристаллическая структура пуромицина может служить моделью для изучения взаимодействия нуклеиновых кислот с аминокислотами. Упаковка молекул пуромицина в кристаллической решетке оказалась на удивление удачной: молекулы уложены стопками из чередующихся остатков N_6-диметиладенина и *п*-метоксифенила, которые располагаются на расстояния 3,4 Å друг от друга; иными словами, *п*-метоксифенильные группы интеркалируют между аденинами. Существуют два типа стэкинга, в которых принимает участие шестичленное кольцо аденина. В первом оно взаимодействует с метокси-кислородом, а во втором – с бензольным кольцом аминокислоты. Последний случай является хорошей моделью интеркаляции ароматической боковой цепи аминокислоты в спираль нуклеиновой кислоты. Этот вопрос детально обсуждается в гл. 18.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды широко используются для изучения механизма ферментативных реакций и как химиотерапевтические прапараты. В этой главе рассмотрены только некоторые соединения, представляющие наибольший интерес со структурной точки зрения. Так, нуклеозиды, в которых образуются дополнительные ковалентные связи между основанием и сахаром, имеют жесткую конформацию и могут использоваться в качестве эталонов в спектроскопии. Важную биологическую роль играют циклические нуклеотиды с 2′,3′- и 3′,5′-диэфирными связями. Первые являются промежуточным соединением, образующимся при ферментативном гидролизе РНК, а вторые, в виде cAMP и cGMP, служат гормональным посредником. Скорость гидролиза циклических фосфатов коррелирует с их внутренней напряженностью. Из всех нуклеозидов с замещенным сахаром рассмотрены лишь галогензамещенные, арабино- и α-нуклеозиды, причем последние являются энантиомерами β-нуклеозидов. Примерами нуклеозидов с модифицированными основаниями служат цитокинины и минорные составляющие тРНК. Довольно хорошо изучены химические аспекты тиокетозамещения, алкилирования эндоциклического атома азота и насыщения двойной связи $C_5{=}C_6$ в пиримидинах. В нуклеозидах, у которых C_8—H (пурин) или C_6—H (пиримидин) замещен на аза-N, наблюдается необычная *высокая-анти*-конформация относительно гликозидной связи, что частично объясняет их биохимические свойства. Если атом кислорода фосфатной группы заменить на серу, то фосфодиэфирная группа станет хиральной и может использоваться при изучении механизма взаимодействия ферментов с нуклеотидами. Замена P—O на P—S приводит к существенным стереохимическим изменениям, что сказывается на работе фермента. Пирофосфатные группы, входящие в состав высокоэнер-

гетических ди- и трифосфатов, а также некоторых коферментов, обладают значительной гибкостью; они являются ненапряженными структурами и, следовательно, в структурном плане не могут играть роль энергетических депо (гл. 4). Из всех нуклеозидных антибиотиков рассмотрен только пуромицин. В структурном отношении он аналогичен ССА-концу тРНК, нагруженной аминокислотой, и ингибирует синтез белка.

ГЛАВА 8

Связывание ионов металлов с нуклеиновыми кислотами

Нуклеиновые кислоты содержат четыре функциональные группы, с которыми могут связываться ионы металлов: отрицательно заряженные атомы кислорода фосфатных групп, гидроксильные группы сахаров, эндоциклические атомы азота и экзоциклические кетогруппы оснований (рис. 8.1). Ионы таких металлов, как Mg(II), Ca(II), Na(I), K(I), содержатся в клетке в миллимолярных концентрациях (табл. 8.1), поэтому нуклеиновые кислоты и нуклеотиды обычно присутствуют в виде комплексов с ионами металлов. Эти комплексы, которым и посвящена данная глава, играют важную роль в функционировании нуклеиновых кислот, нуклеотидов, коферментов, а также нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфатов.

8.1. ВЛИЯНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Насколько велика роль связывания ионов металлов с нуклеиновыми кислотами и с ферментами, участвующими в процессах репликации, транскрипции и трансляции, стало ясно уже давно [723–726]. Однако вопрос о том, как именно ионы металлов осуществляют свою функцию во всех этих процессах, до конца не выяснен. Известно, что Mg(II) играет важную роль в стабилизации третичной структуры тРНК, сшивая друг с другом фосфатные группы разных сахарофосфатных цепей молекулы. Как видно из рис. 6.17, при увеличении концентрации щелочных металлов температура перехода спираль–клубок повышается. Возможно, это связано с частичной нейтрализацией заряда фосфатных групп и, следовательно, с уменьшением их взаимного отталкивания.

Однако ионы металлов могут приводить и к дестабилизации двухцепочечной структуры ДНК, если они связываются не с фосфатными группами, а с основаниями. Способность ионов к образованию комплексов с основаниями возрастает в следующем порядке: Mg(II), Co(II), Ni(II), Mn(II), Zn(II), Cd(II), Cu(II). При добавлении Mg(II) T_m ДНК повышается, т.е. двухцепочечная структура стабилизируется. В присутствии Cu(II), напротив, T_m значительно уменьшается, т.е. облегчается переход в состояние разупорядоченного клубка. С другой стороны,

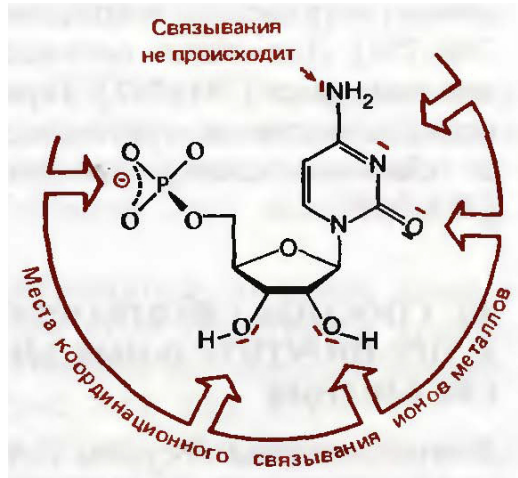


Рис. 8.1. Схема расположения мест координационного связывания с ионами металлов в нуклеотиде.

Cu(II) способствует ренатурации [729]. Аналогичным образом ведут себя Hg(II) и Ag(I) [724, 730–734]. Связывание двухвалентных катионов, таких, как Cu(II), Zn(II), Pb(II), с РНК сопровождается еще большими структурными изменениями, поскольку они катализируют неферментативное расщепление фосфодиэфирных связей [735, 736, 736а].

Обнаружение противоопухолевых свойств у *цис*-дихлордиамин–платины (II) еще более активизировало исследования комплексов ДНК с ионами металлов [737–739]. Опыты in vitro четко показывали, что этот реагент атакует гуанин по атому N_7, а кроме того, взаимодействует с атомом O_6 [740–742]. Относительно механизма связывания его in vivo пока нет единого мнения [743], однако можно с достаточным основанием утверждать, что при этом подавляются матричные функции ДНК и, следовательно, ингибируется синтез ДНК. Благодаря этим свойствам соединения платины (II) нашли применение при лечении некоторых форм рака [744, 745].

Комплексам ионов металлов с нуклеиновыми кислотами посвящен ряд обзорных статей; в них рассматривается стереохимия связывания

Таблица 8.1. Концентрация ионов металлов в организме человека в целом, *в плазме крови и внутриклеточной жидкости*

Катион	Концентрация в организме в целом, г/70 кг	Концентрация в плазме крови, ммоль·л$^{-1}$	Концентрация во внутриклеточной жидкости, ммоль·л$^{-1}$
Na	100	142	10
K	140	4	160
Ca	1100	3	1
Mg	35	1	13
Fe	4	0,018	
Cu	0,15	0,016	
Zn	3	0,018	
Mn	0,02		
Co	0,001		
Mo	< 0,001		

ионов металлов с основаниями, нуклеозидами и нуклеотидами [725, 746–750]. Две статьи посвящены связыванию платины с моно- и полинуклеотидами [751, 752]. Термодинамические и кинетические характеристики комплексов нуклеотидов с ионами металлов были установлены в основном спектроскопическими методами и описаны в обзорах [753–759].

8.2. СПОСОБЫ СВЯЗЫВАНИЯ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ С НУКЛЕОТИДАМИ И ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫЕ МЕСТА КООРДИНАЦИОННОГО СВЯЗЫВАНИЯ

В этой главе мы обсудим только те стереохимические аспекты связывания ионов металлов с нуклеиновыми кислотами, которые основаны на кристаллографических данных. Хотя методы спектроскопии в растворе в ряде случаев являются более чувствительными и с их помощью можно обнаружить относительно непрочные комплексы, для однозначного определения координационного числа, установления места координационного связывания и расположения лигандов вокруг иона металла этих методов, как правило, бывает недостаточно.

Ионы металлов связываются с природными нуклеотидами по атомам кислорода и азота. Оба атома относятся к классу *а*, т.е. представляют собой «жесткие» лиганды [760, 761] (рис. 8.1). Поэтому с ними могут связываться только определенные типы катионов, а именно: ионы щелочных, щелочноземельных и переходных металлов. Они перечислены в табл. 8.2, где для каждого типа катионов указаны места

Таблица 8.2. Ионы металлов, взаимодействующие и сокристаллизующиеся с компонентами нуклеиновых кислот, и места их предпочтительного связывания

Щелочные металлы	Li, Na, K, Rb, Cs
Щелочноземельные металлы	Mg, Ca, Sr, Ba
Переходные металлы	Mn(II), Ru(III), Os[1](VI, в виде осмата), Co(III), Co(II), Ni(II), Pd(II), Pt(II), Cu(II), Ag(I), Au(III), Zn(II), Cd(II), Hg(II)

Места предпочтительного связывания:

Атомы кислорода кетогрупп оснований и экзоциклические атомы азота — Кислород фосфатной группы — Гидроксил сахара

Переходные металлы

Щелочные и щелочноземельные металлы

[1] Os в виде осмата (VI) присоединяется по двойной связи $C_5{=}C_6$ пиримидинов и связывается с *цис*-гидроксилами рибозы, образуя циклический эфир. Классификация ионов металлов по типу участков связывания их с ДНК приводится в работе [724].

предпочтительного связывания, выявленные при изучении кристаллических комплексов.

Места координационного связывания, расстояния между атомами металлов и лигандами и конформация нуклеозидов и нуклеотидов для ряда типичных комплексов с ионами металлов указаны в табл. 8.3. Наиболее интересные структурные особенности этих соединений таковы:

А. Фосфатные группы. Эти группы связываются со всеми ионами металлов, перечисленными в табл. 8.2, при этом образуются ионные связи между отрицательно заряженными атомами кислорода и положительно заряженными ионами металлов (рис. 7.15, 7.16, 8.2).

Б. Гидроксильные группы сахаров. Эти группы образуют комплексы со щелочными и щелочноземельными катионами, но не с переходными металлами. Известное на сегодняшний день исключение – Cd(II) (см. работу [762]). Во всех этих комплексах в координационную сферу иона металла входит неподеленная пара электронов атома кислорода гидроксильной группы. Такая же картина наблюдается при взаимодействии гидроксильных групп сахаров со щелочными и щелочноземельными катионами в составе других соединений ([763, 764], рис. 8.2).

В. Эндоциклические атомы азота. Эти атомы несут неподеленную пару электронов и поэтому являются хорошими лигандами для щелочных металлов, металлов переходной группы и щелочноземельных катионов [764]. Как видно из табл. 8.4, при создании координационных связей с пурином, в котором атом N_9 не замещен, ионы металлов в первую очередь связываются именно с этим атомом (либо создают мостик между атомами N_9 и N_3), затем с атомом N_7 и, наконец, с атомом N_1, т. е. связывание с имидазольным кольцом является более предпочтительным, чем с пиримидиновой частью индольного кольца. В случае N_1-незамещенных пиримидинов в тимине и урациле сначала происходит связывание с атомом N_1, а затем с атомом N_3; в цитозине наблюдается обратный порядок связывания. Связывание с ионом металла приводит к сдвигу таутомерного равновесия в пуринах в сторону N_7—H, а в пиримидинах (в тимине и урациле) – в сторону N_3–H.

Когда между сахаром и основанием образуется гликозидная связь, атомы N_9 пурина и N_1 пиримидина оказываются блокированными. Поэтому в пуриновых нуклеозидах катионы в первую очередь присоединяются к атому N_7, затем к N_1 и, наконец, к N_3. Из пиримидиновых нуклеозидов у одного лишь цитидина в образовании комплекса может участвовать гетероциклический атом азота N_3 (рис. 7.15, 7.16, 8.2–8.4).

Г. Кетогруппы оснований также способны образовывать комплексы с ионами металлов. В пиримидиновых нуклеотидах происходит прямое связывание иона металла с атомом O_2 цитидина и с атомами O_2 и O_4 тимидина и уридина. В пуриновых основаниях – гуанине и гипоксантине – прямого связывания O_6 с ионом металла не происходит, вероятно, из-за того, что атом N_7 является более предпочтительным лигандом для катиона. Одновременное связывание с атомами N_7 и O_6 приводит

Таблица 8.3. Некоторые данные о комплексах между ионами металлов и нуклеозидами и нуклеотидами, полученные в результате кристаллографических исследований [749]

Комплекс[1)]	Геометрия окружения металла M[2)]	Место связывания лиганда L	Расстояние M–L[3)], Å	Конформация сахара	Область конформаций γ χ	pH кристаллизации
Пуриновые нуклеозиды						
$[Os(Ado\text{-}2H)(пиридин)_2O_2]$	окт.	$O^{2'}$	1,91	$C_{2'}$-*эндо*	+*ск син*	> 7
		$O_{3'}$	1,99			
$[Co(dAdo)(acac)_2(NO_2)]$	окт.	N_7	1,99	$C_{2'}$-*эндо*	+*ск анти*	~ 7
				$C_{3'}$-*эндо*	+*ск анти*	
$[Pt(Guo)_2(en)]^{2+}$	пл., кв.	N_7	1,97	$C_{3'}$-*эндо*	+*ск анти*	< 7
цис-$[Pt(Guo)_2(NH_3)_2]^{2+}$	пл., кв.	N_7	2,01	$C_{3'}$-*эндо*	+*ск анти*	~ 7
$[Hg(Guo)(\mu\text{-хлор})Cl]_n$	иск., пл., кв.	N_7	2,16	$C_{2'}$-*эндо*	−*ск анти*	~ 3
Пиримидиновые нуклеозиды						
$[Cu(Cyd)(glygly)]$	кв., пир.	N_3	2,01	$C_{3'}$-*эндо*	+*ск анти*	< 7
		O_2	2,76			
транс-$[Pt(Cyd)(Me_2SO)Cl_2]$	пл., кв.	N_3	2,03			~ 7
Пуриновые нуклеотиды						
$[Cd(5'\text{-}GMP)(H_2O)_5]$	окт.	N_7	2,37	$C_{3'}$-*эндо*	+*ск анти*	4,5
$[Co(5'\text{-}IMP)(H_2O)_5]$	окт.	N_7	2,16	$C_{3'}$-*эндо*	+*ск анти*	4,5
$[Ni(5'\text{-}IMP)(H_2O)_5]$	окт.	N_7	2,11	$C_{3'}$-*эндо*	+*ск анти*	4,5
$[Ni(5'\text{-}AMP)(H_2O)_5]$	окт.	N_7	2,08		+*ск анти*	5,0
цис-$[Pt(5'\text{-}IMP)_2(NH_3)_2]^{2-}$	пл., кв.	N_7	2,02	$C_{2'}$-*эндо*	+*ск анти*	6,85
$[Pt(5'\text{-}IMP)_2(en)]^{2-}$	пл., кв.	N_7	2,07	$C_{2'}$-*эндо*	+*ск анти*	~ 7
$[Cu(5'\text{-}IMP)_2(dien)]^{2-}$	окт.	N_7	1,92	$C_{2'}$-*эндо*	−*ск анти*	> 7
$[Cu(3'\text{-}GMP)(o\text{-phen})(H_2O)]_2$	кв., пир.	O (фосф.)	1,93	$C_{2'}$-*эндо*	+*ск анти*	6,8

Таблица 8.3. (продолжение)

Комплекс[1]	Геометрия окружения металла M[2]	Место связывания лиганда L	Расстояние M – L[3], Å	Конформация сахара	Область конформаций γ	Область конформаций χ	pH кристаллизации
$[Cu(5'\text{-IMPH})(bipy)(H_2O)_2]^+$	кв., пир.	N_7	1,99	$C_{3'}$-*эндо*	+*ск*	*анти*	6
$[Zn(5'\text{-IMP})]_n$	тет.	N_7	1,99				
		O (фосф.)	1,95				
$[Cu(5'\text{-GMP})_3(H_2O)_8]_n$	кв., пир.	N_7	2,24	$C_{3'}$-*эндо*	+*ск*	*анти*	~ 7
		O (фосф.)	1,95	$C_{3'}$-*эндо*	+*ск*	*анти*	
				$C_{2'}$-*эндо*	+*ск*	*анти*	
$[Cd(5'\text{-IMP})(5'\text{-IMPH})_2(H_2O)_6]_n$	окт.	N_7	2,36	$C_{2'}$-*эндо*	+*ск*	*анти*	3,88
		O (фосф.)	2,23	$C_{2'}$-*эндо*	+ *ск*	*анти*	
		$O_{2'}$	2,42				
		$O_{3'}$	2,32				
Пиримидиновые нуклеотиды							
$[Cu(5'\text{-UMPH})(dpa)(H_2O)]_2$	кв., пир.	O (фосф.)	1,93	$O_{4'}$-*эндо*	−*ск*	*анти*	7
				$C_{2'}$-*экзо*	−*ск*	*син*	
$[Co_2(5'\text{-UMP})_2(H_2O)_4]_n$	окт.	O (фосф.)	2,12	—	—		6,8
$[Cd(5'\text{-CMP})(H_2O)]_n$	иск., кв., пир.	N_3	2,33	$C_{3'}$-*эндо*	+*ск*	*анти*	4,6
		O (фосф.)	2,25				
$[Co(5'\text{-CMP})(H_2O)]_n$	тет.	N_3	1,96	$C_{2'}$-*эндо*	+*ск*	*анти*	5,4
		O (фосф.)	1,95				
$[Zn(5'\text{-CMP})(H_2O)]_n$	тет.	N_3	2,04	$C_{2'}$-*эндо*	+*ск*	*анти*	3,5
		O (фосф.)	1,90				
$[Pt(5'\text{-CMP})(en)]_2$	пл., кв.	N_3	2,06	$C_{2'}$-*эндо*	−*ск*	*анти*	6–7
		O (фосф.)	1,97	$C_{2'}$-*эндо*	+*ск*	*анти*	

Таблица 8.3 (продолжение)

Комплекс[1]	Геометрия окружения металла M[2]	Место связывания лиганда L	Расстояние M–L[3], Å	Конформация сахара	Область конформаций γ	Область конформаций χ	pH кристаллизации
$[Mn(5'\text{-CMP})(H_2O)]_n$	иск., окт.	O_2	2,08	$C_{3'}$-*эндо*	+ *ск*	*анти*	5,2
		O (фосф.)	2,21				

Источник. По работе [749]. Литературу см. там же.

[1] acac – ацетилацетонат; bipy – 2,2′-бипиридил; dien – диэтилентриамин; dpa – 2,2′-дипиридиламин; en – этилендиамин; glygly – глицилглицинат; *o*-phen – *орто*-фенантролин.

[2] иск. – искаженная; окт. – октаэдрическая; пл. – плоская; пир. – пирамидальная; кв. – квадратная; тет. – тетраэдрическая.

[3] Расстояния между ионом металла и эквивалентными лигандами усреднены.

к неблагоприятной геометрии комплекса [765, 766]. Однако кислород O_6, входящий в состав кетогруппы, может образовывать водородные связи с другими лигандами координационной сферы иона металла. Такие взаимодействия между лигандами косвенно способствуют комплексообразованию (рис. 8.5) [767].

Д. Аминогруппы оснований никогда не принимают участия в прямом связывании ионов металлов. Как уже говорилось в разд. 4.1, атом азота экзоциклической аминогруппы вносит в π-электронную систему связанного с ней гетероцикла два электрона, поэтому эти группы не способны к связыванию с ионами металлов. Однако аминогруппы, как указывалось в п. Г, могут выступать в роли доноров при образовании водородных связей с другими лигандами ионов металлов, косвенным образом способствуя комплексообразованию. В сильнощелочных условиях аминогруппы депротонированы и становятся хорошими лигандами для ионов переходных металлов (рис. 8.3).

Е. Тиокетозаместители в составе 6-меркаптопурина, 2-тиоцитозина и 2- и 4-тиоурацила являются «мягкими» группами и поэтому хорошими лигандами для ионов переходных металлов [760, 761] – гораздо лучшими, чем атомы азота и кислорода пуринов и пиримидинов. В пользу этого говорит исключительно высокое сродство ртутных и платиновых реагентов к 4-тиоуридину в составе $тРНК^{val}_{E.coli}$ [751].

Ж. Осмий(IV) образует координационные связи в форме циклического диэфира. В комплексе $OsO_3(пиридин)_2$ – $тРНК^{Phe}_{дрожжи}$ осмий образует координационную связь с атомом N_7 гуанина. Кроме того, в виде осма-

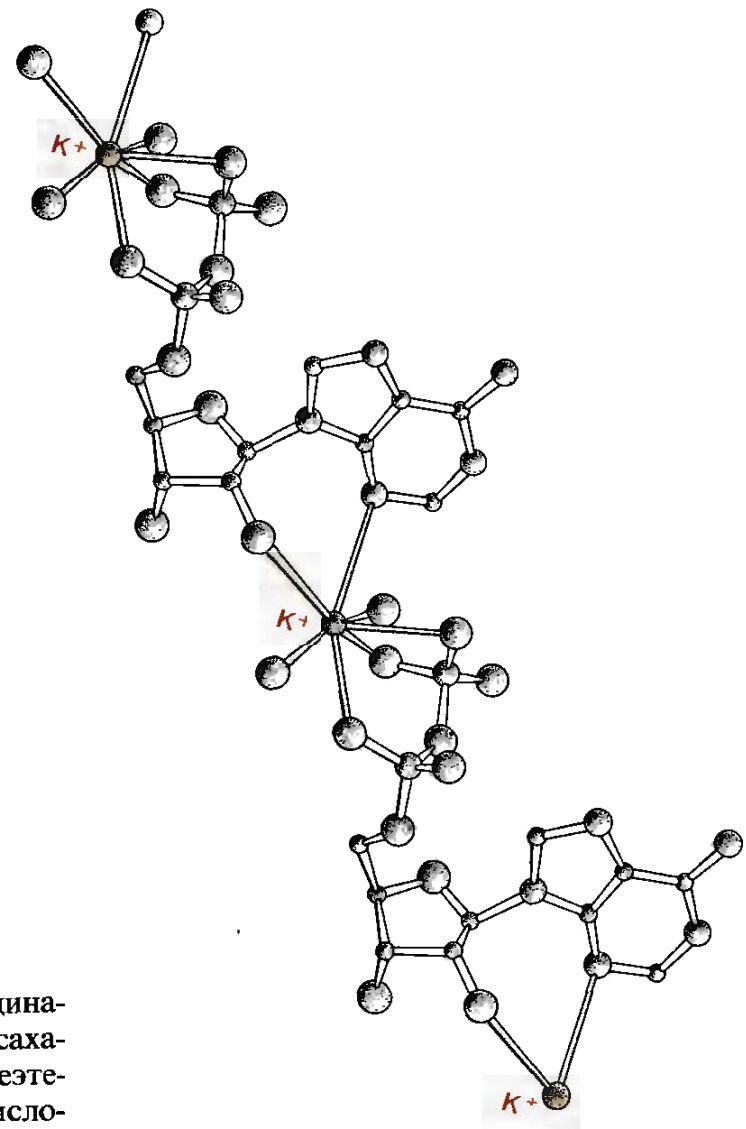


Рис. 8.2. Образование координационных связей иона калия с сахаром (O_2·), основанием (N_3), неэтерифицированными атомами кислорода фосфатных групп и молекулами воды в аденозиндифосфатном комплексе [787]. Хелатная группа, состоящая из калия и пирофосфатной группы, имеет Δ-конфигурацию (см. с. 236).

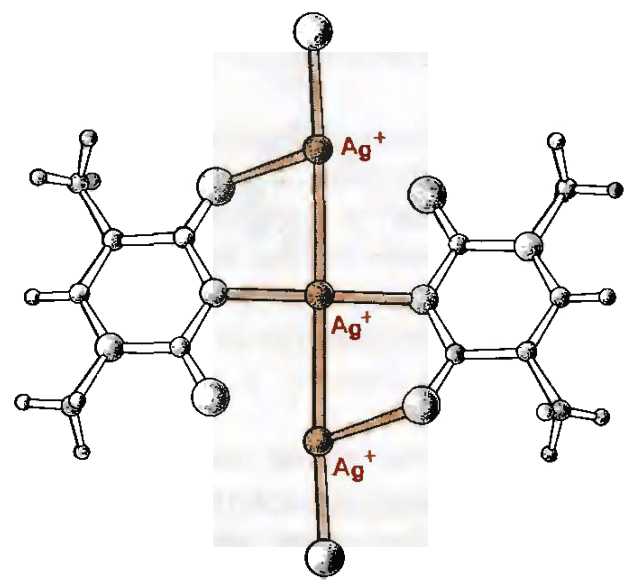


Рис. 8.3. Образование координационных связей Ag(I) с 1-метилтимином [788]. Соединение было получено в сильнощелочных условиях, когда группа N_3—H депротонируется. Ag(I) связывается со всеми тремя электроотрицательными группами: N_3, O_4 и (слабо и не обозначено на рисунке) O_2.

Таблица 8.4. Предпочтительные места связывания ионов металлов в основаниях нуклеиновых кислот

Свободное основание		Основание в составе нуклеозида
Пурины	N_9 or N_9 N_3 $> N_7 \gg N_1, N_3$	$N_7 \gg N_1, N_3$
Тимин, урацил	$N_1 \gg N_3 > O_2$ или O_4	$N_3 > O_2$ or N_3 O_2 Цитидин
Цитозин	$N_3 \gg N_1 > O_2$ или O_4	$O_2 > O_4$ Урацил, Тимин

Примечание. Знак ⌒ означает, что ион металла образует мостик между соответствующими атомами.

та циклического диэфира он связывается с *цис*-гидроксильной группой концевой рибозы [768] и присоединяется по двойной связи $C_5{=}C_6$ к цитидину [769]. Это последнее взаимодействие, по-видимому, типично для пиримидиновых оснований, поскольку оно наблюдалось и в случае тимина [770–772].

3. Корреляция между координационным числом и местом связывания ионов металлов в комплексах с пуринами и пиримидинами [748]. В пуринах атом N_7 располагается на поверхности молекулы, поэтому координационное число связанного с ним иона металла может быть равно

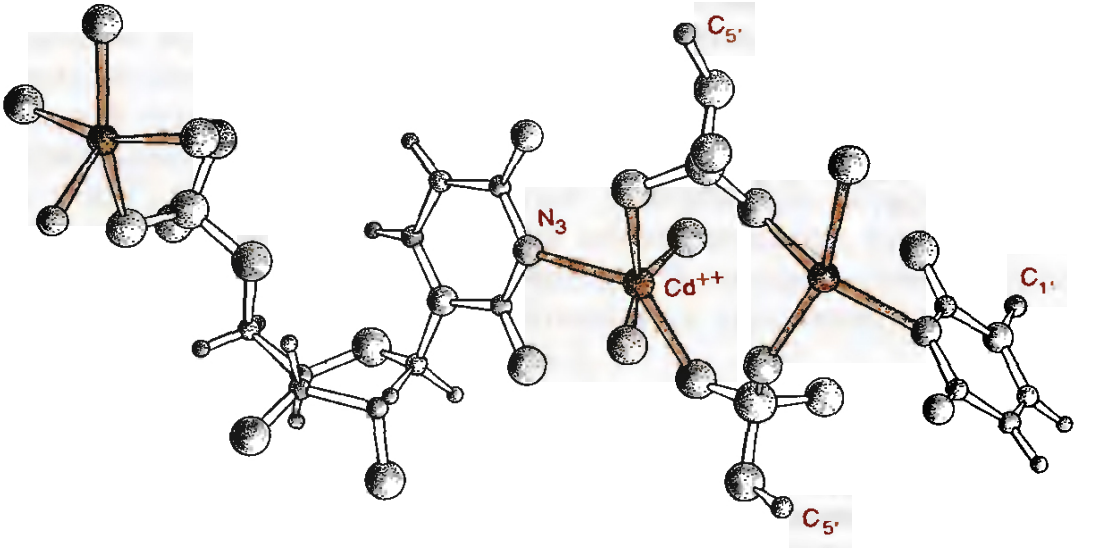


Рис. 8.4. Лигандами Cd(II) в комплексе с цитидин-5′-фосфатом являются атом N_3, свободные атомы кислорода фосфатной группы и молекулы воды [789].

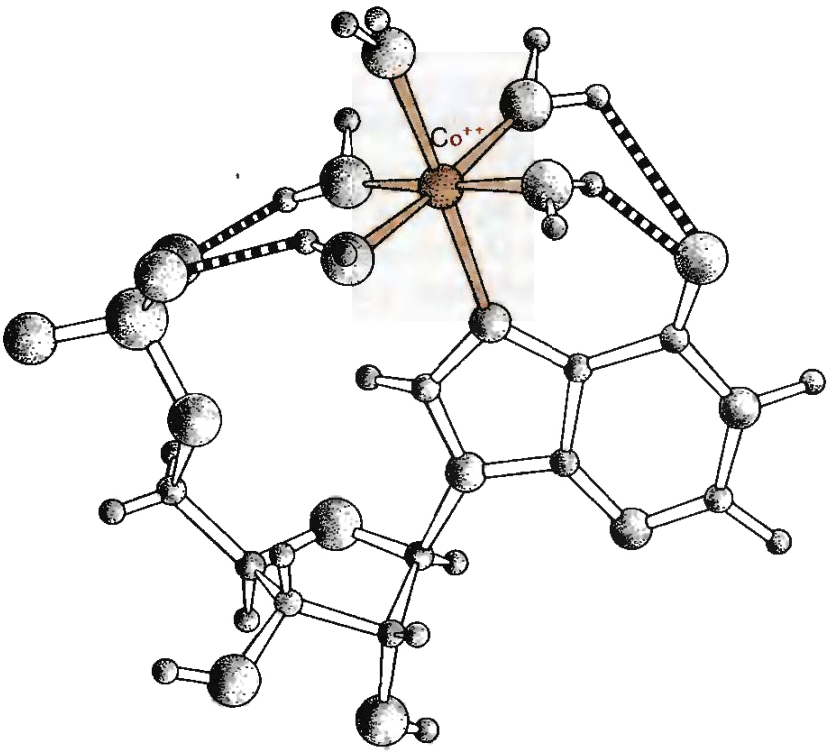


Рис. 8.5. В комплексе Co(II) с инозин-5′-фосфатом и водой катион образует координационные связи непосредственно с атомом азота N_7 основания и через молекулы воды создает водородные связи с фосфатной группой и атомом O_6 гуанина [767]. В данной кристаллической структуре атомы водорода водных лигандов не были локализованы; они приводятся здесь для большей наглядности схемы координационных связей. Следует отметить, что реально наблюдается лишь одна водородная связь – с O_6-атомом гуанина; для реализации картины, показанной на рисунке, необходим несколько иной разворот одной из молекул воды.

6 (октаэдрическая координация) и даже больше. Связывание же с атомом N_3 цитозина стерически затруднено присутствием фланкирующих кето- и аминогрупп, которые ограничивают доступное для иона металла пространство, что приводит к уменьшению координационного числа до 4 или 5.

И. Координационное связывание ионов металлов и протонирование. Для гуанина и цитозина места протонирования и координационного связывания с ионами металлов совпадают, а в аденине и урациле (тимине) нет (табл. 8.5). Другое различие между этими двумя процессами состоит в том, что при протонировании атома азота, находящегося в вершине валентного угла C—N—C, этот угол увеличивается (разд. 4.1), тогда как при координационном связывании с ионом металла он остается неизменным [747].

К. Избирательное координационное связывание ионов металлов с основаниями. Подводя итог, мы можем сказать, что координационное связывание ионов металлов с основаниями является избирательным

Таблица 8.5. Сопоставление мест протонирования и мест координационного связывания с ионами металлов в нуклеозидах

	Координационное связывание	Протонирование
Аденин	$N_7 > N_1$	$N_1 > N_7$
Тимин	$O_2 > O_4$	$O_4 > O_2$
Гуанин	$N_7 > N_3$	$N_7 > N_3$
Цитозин	N_3	N_3

процессом. Будучи «мягкими» лигандами, тиокетозаместители (п. Е) великолепно подходят для координационного связывания с ионами переходных металлов; в этом они заведомо превосходят жесткие лиганды — атомы азота и кислорода. При связывании с эндоциклическими атомами азота оснований наблюдается некоторая избирательность: атом N_3 цитозина пространственно защищен соседними кето- и аминогруппами, поэтому координационное число иона металла, образующего с ним координационную связь, меньше 6; в то же время с атомом N_7 в пуриновых основаниях могут связываться ионы и щелочных, и щелочноземельных, и переходных металлов (п. Ж). Наконец, еще один элемент избирательности вносит водородная связь между атомом N_6 аминогруппы аденина или атомом O_6 кетогруппы гуанина и другими лигандами ионов металлов (пп. Б и В) [748].

Л. Влияние связывания ионов металлов с нуклеотидом на его конформацию. Даже при беглом просмотре табл. 8.3 становится ясно, что сахарное кольцо находится в основном в $C_{2'}$-*эндо*- или $C_{3'}$-*эндо*-конформации, а ориентация относительно гликозидной связи (описываемая торсионным углом χ) почти всегда соответствует *анти*-конформации; *син*-конформация структуры $[Cu(5'\text{-UMP})(dpa)(H_2O)]_2$ является редким исключением [773]. Как отмечалось в гл. 4, в нуклеотидах ориентация относительно связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ такова, что атом $O_{5'}$ располагается над рибозным кольцом, а соответствующий торсионный угол γ находится в области $+sc$. В комплексах с ионами металлов это строгое правило (жесткий нуклеотид) уже не соблюдается. Хотя $+sc$-область по-прежнему является предпочтительной, в некоторых случаях, в частности когда ион металла одновременно связывается с атомом кислорода фосфатной группы и громоздким лигандом, например с *орто*-фенантролином или 2,2′-дипиридиламином, угол γ и в пуринах, и в пиримидинах переходит в $-sc$-область. По-видимому, изменение геометрии нуклеотида при подобном координационном связывании следует отнести на счет объемной группировки, связанной с ионом металла. Влияние ионов металлов, образующих координационные связи только с основанием или только с рибозой, менее выражено, и за недостатком данных мы на нем останавливаться не будем.

8.3. КООРДИНАЦИОННОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ПЛАТИНЫ

Связывание платины с ДНК имеет огромное биохимическое и фармакологическое значение. По характеру взаимодействия с ДНК соединения, представленные в табл. 8.6, можно разбить на две группы. В первую группу входят платиновые комплексы, содержащие плоский терпиридиновый лиганд с расположенными в центре платиной (II) или палладием (II). Они не образуют координационных связей с ДНК, а интеркалируют между уложенными в стопку парами оснований (гл. 16). Ко второй группе относятся платиновые комплексы *цис-* и *транс*-дихлордиаминового типа, которые образуют координационные связи с мономерными составляющими нуклеиновых кислот, присоединяясь в основном к атомам N_7 (и одновременно O_6) гуанина [741, 752]. Они реагируют также с урацилом и тимином, образуя соединение «платиновый синий»—олигомер, способный к дальнейшему взаимодействию с ДНК. Структура «платинового синего» неизвестна; предположительно она аналогична структуре комплекса *цис*-диаминоплатина—α-пиридон синий [751].

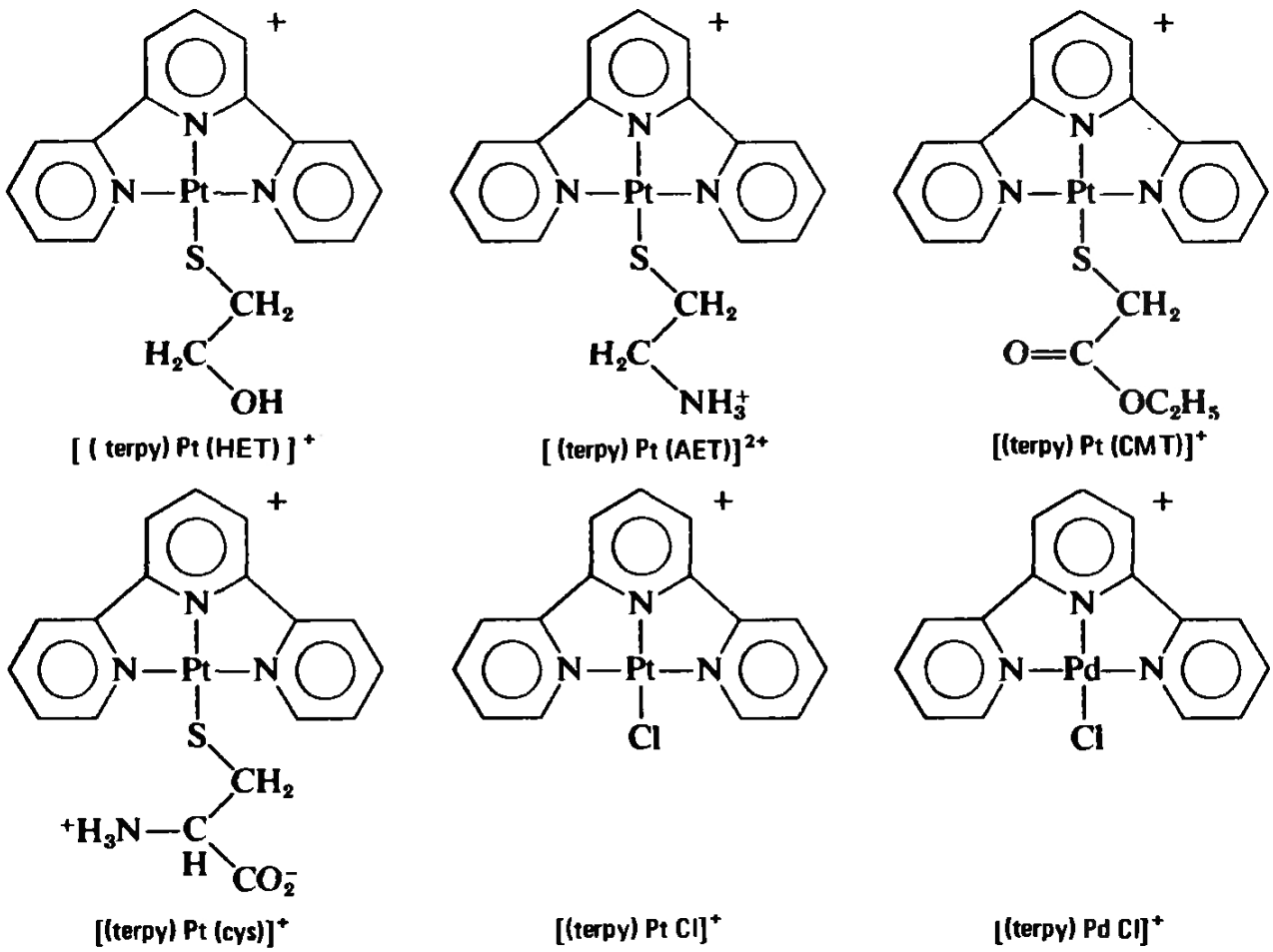
В табл. 8.7 представлен возможный механизм действия *цис*-дихлордиаминоплатины (II). Подавление опухолевого роста при относительно низких дозах платины указывает на то, что препарат активен в растворенном состоянии. В межклеточной жидкости эффективность препарата существенно уменьшается из-за ингибирующего действия хлорид-ионов, концентрация которых здесь очень высока (~ 100 мМ). Однако после проникновения в клетку, где концентрация хлорид-ионов значительно меньше (всего 4 мМ), препарат гидролизуется с образованием продукта *цис*-$[(NH_3)_2Pt(H_2O)(OH)]^+$ [774], который связывается с ДНК более эффективно, поскольку молекула воды является хорошей уходящей группой [751]. Не исключено также, что вначале образуется комплекс с урацилом или тимином, который затем вступает в реакцию с ДНК.

Почему противоопухолевой активностью обладает только *цис*-, а не *транс*-дихлордиаминоплатина, пока неясно. Возможно, замена иона хлора на эндоциклический азот основания в *цис*-изомере дестабилизирует и активирует *транс*-аминогруппу. Это может привести к образованию новых координационных связей Pt-ДНК, так что в конечном счете ион платины может оказаться связанным с четырьмя группами ДНК. Однако при исследовании комплексов *цис*-дихлордиаминоплатины (II) с poly (I) и poly(I)·poly(C) методом ЯМР подобный комплекс обнаружен не был.

Судя по этим данным, наблюдается только однократное или двукратное замещение платины атомом N_7 инозина [775]. Это вполне согласуется с результатами кристаллографических исследований комплексов между указанным соединением платины(II) и ДНК-додекамером (рис. 8.6).

Таблица 8.6. Химические формулы некоторых соединений платины, способных интеркалировать между парами оснований в ДНК и связываться с атомом N_7 гуанина [751].

Интеркалирующие между парами оснований ДНК



8.4. КООРДИНАЦИОННОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ С НУКЛЕОЗИДДИ- И НУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТАМИ: НОМЕНКЛАТУРА ГЕОМЕТРИИ БИДЕНТАТНЫХ Λ/Δ И ТРИДЕНТАТНЫХ Λ/Δ/*эндо*/*экзо* ХЕЛАТОВ

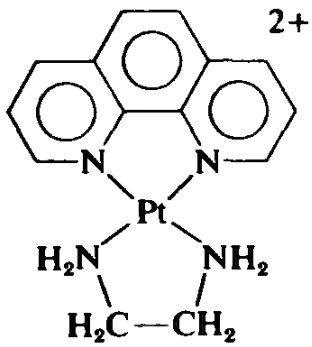
Концентрация свободного Mg(II) в клетке составляет примерно 20 мМ. В этих условиях равновесие в реакциях

$$ADP^{3-} + Mg^{2+} \rightleftarrows [MgADP]^{-},\ \log K = 3{,}21,$$

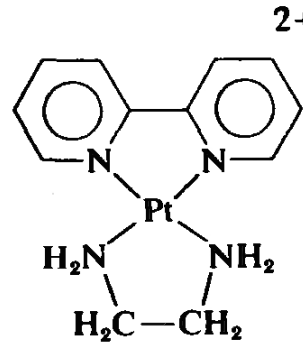
$$ATP^{4-} + Mg^{2+} \rightleftarrows [MgATP]^{2-},\ \log K = 4{,}05$$

должно быть сдвинуто в сторону образования комплекса. Поэтому ADP, ATP и их нуклеотидные аналоги представлены в основном в виде хелатов Mg(II) [776]. В этой форме они играют главенствующую роль как субстраты и как источники энергии во многих ферментативных реакциях.

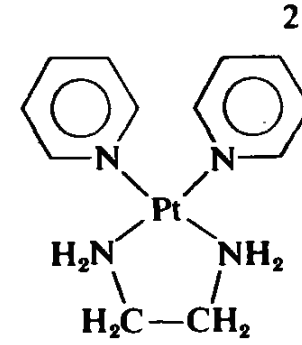
Таблица 8.6 (продолжение)



[(o-phen) Pt (en)]$^{2+}$

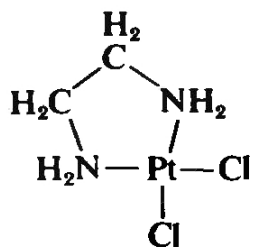


[(bipy) Pt (en)]$^{2+}$

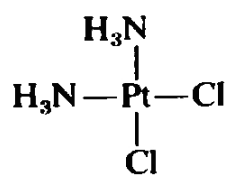


[(py)$_2$ Pt (en)]$^{2+}$

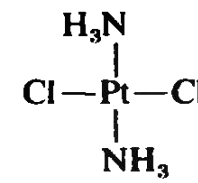
Связывающиеся с гуанином



[(en) Pt Cl_2]



цис-[(NH_3)$_2$Pt Cl_2]



транс-[(NH_3)$_2$Pt Cl_2]

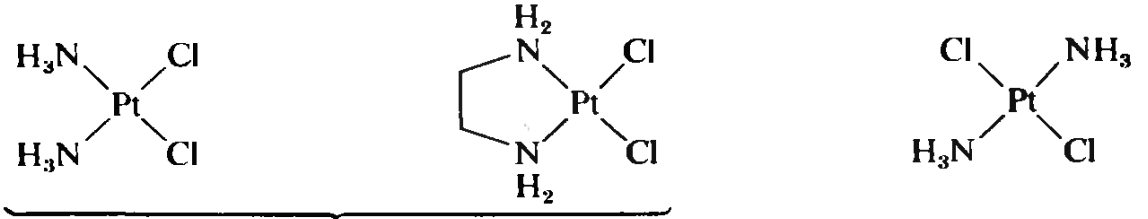
Примечание. Платиновые комплексы с большими плоскими органическими лигандами, такими, как терпиридин (terpy), *орто*-фенантролин (*o*-phen) или бипиридил (bipy), способны интеркалировать между парами оснований в двойной спирали ДНК. Если в комплекс входят небольшие лиганды, подобные Cl или NH_3, то происходит непосредственное связывание с атомом N_7 гуанина. Структурные формулы других комплексов приведены в работах [738, 739, 752].

Много лет назад Сент-Дьердьи высказал предположение, что в составе комплекса $[MgATP]^{2-}$ ион металла образует координационные связи с атомом N_7 аденина и с атомом кислорода фосфатной группы [777]. Эта весьма привлекательная гипотеза была подкреплена результатами иммунохимических исследований, из которых следовало, что в присутствии Mg(II) конформации ADP и ATP отличаются от конформации AMP [778]. Однако выполненные недавно спектроскопические исследования показали, что Mg(II) и другие двухвалентные катионы не связываются с основанием и фосфатной группой одновременно, а предпочтительно связываются только с фосфатом [779–782].

В растворе комплексов нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфатов с Mg(II) содержится большое количество координационных изомеров, которые быстро переходят друг в друга (10^3–10^5 $с^{-1}$). Спектры ЯМР дают некую усредненную по времени картину и поэтому не позволяют

Таблица 8.7. Механизм действия *цис*-дихлорплатиновых (II) комплексов [751]

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПЛАТИНОСОДЕРЖАЩИЕ АНТИБИОТИКИ



Активные

Неактивный

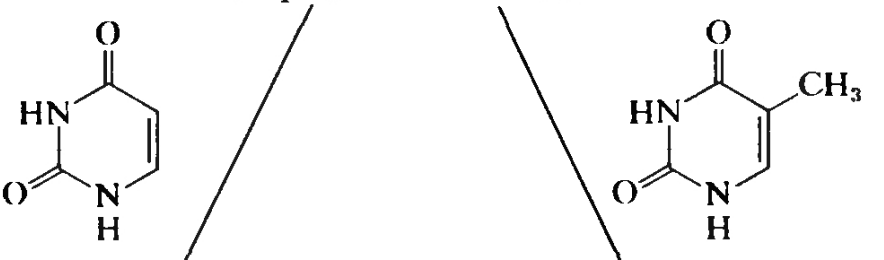
цис-$[(NH_3)_2PtCl_2]$ → *цис*-$[(NH_3)_2Pt(H_2O)(OH)]^+$ → Связывание с ДНК

Высокая концентрация хлорид-ионов в межклеточной жидкости

$pK_1 = 5{,}6$, $pK_2 = 7{,}3$ при 20°C

Подавляется активность ДНК как матрицы

Низкая концентрация хлорид-ионов в клетке



Комплекс платины с урацилом ("платиновый синий") $(NH_3)_2Pt(U)(OH)$

Активные антибиотики с пониженной токсичностью для почек

Комплекс платины с тимином ("платиновый синий") $(NH_3)_2Pt(T)(OH)$

Примечание. При высокой концентрации хлорид-ионов (~ 100 мМ) эффективность антибиотика уменьшается. В цитоплазме, где концентрация этих ионов намного меньше (~ 4 мМ), антибиотик частично гидролизуется и становится активным. Активированный комплекс либо непосредственно реагирует с ДНК, либо вначале образует комплекс с урацилом или тимином и лишь затем связывается с ДНК.

разрешить отдельные изомеры и соответственно получить какие-либо данные о структуре отдельных хелатов [783].

Если используются такие ионы, как Cr(III) и Co(III), то ситуация меняется. С нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфатами они образуют стабильные комплексы. Если ионы других металлов образуют связи солевого типа, то координационные связи между атомами кислорода фосфатной группы и Cr(III) и Co(III) по характеру ковалентны. Об этом свидетельствует существенное уменьшение p*K* вторичной фосфатной группы от 7 в нормальных условиях (см. рис. 5.2) до 3–4 в присутствии

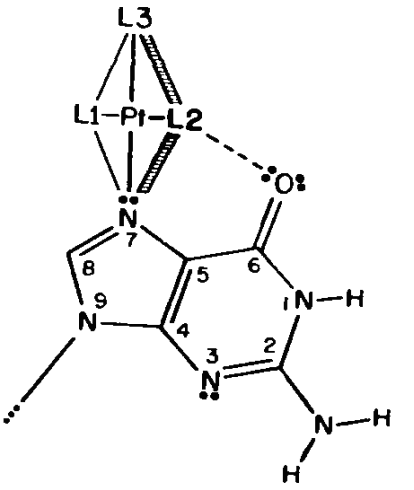


Рис. 8.6. Координационные связи, образуемые *цис*-дихлордиаминоплатиной (II) с гуанином, входящим в состав додекамера CGCGAATTCGCG [742]. Комплекс напоминает структуру, изображенную на рис. 8.5; лиганды L1, L2 и L3 представляют собой H_2O или NH_3.

ионов этих металлов [783]. Стабильность Cr(III)- и Co(III)-полифосфатных комплексов становится особенно высокой при заполнении координационной сферы не водными, а аминными лигандами. Такие комплексы удается выделить и разделить с помощью хроматографии на колонке [783].

Методами ЯМР, по сигналам от протонов и ядер ^{31}P, можно идентифицировать структурные изомеры комплексов кобальт–амин с общей формулой $[Co(NH_3)_nHATP]$ ($n = 2,3$ или 4) и $[Co(NH_3)_nADP]$ ($n = 4$ или 5). Комплексы с ATP существуют в виде семи разных стереохимических вариантов: четыре тридентатных комплекса, в которых лигандами одного иона металла служат три атома кислорода, по одному на каждый из α-, β- и γ-фосфатов; два бидентатных, в которых координационные связи образуют β- и γ-фосфаты; один монодентатный, в котором с ионом металла связывается только γ-фосфат. Для ADP удалось обнаружить только три стереохимически различные формы, а именно два бидентатных комплекса, в которых Co(III) образует координационные связи с атомами кислорода α- и β-фосфатных групп, и один монодентатный, в котором координационную связь образует только одна, β-фосфатная группа (табл. 8.8) [784].

Что же представляют собой эти координационные соединения ADP и ATP? В монодентатных комплексах в связывании участвует только концевая фосфатная группа, и поэтому со стереохимической точки зрения они не представляют интереса. Однако в бидентатных комплексах обнаружены два конформационных изомера, которые отличаются друг от друга окружением иона металла. Стереохимию этих комплексов в принципе можно описать, используя хорошо известную *R,S*-номенклатуру. Однако это неудобно с практической точки зрения, поскольку у Mg(II), например, атомный номер меньше, чем у P, тогда как у Co(III) и подобных ему металлов он больше; в результате хелатные кольца одинаковой хиральности будут восприниматься как разные с точки зрения *R,S*-системы. Во избежание этого был предложен новый подход. Хиральности соответствующих изомеров обозначают символами Δ и Λ по

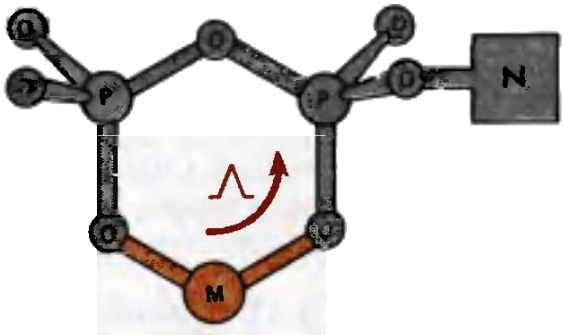
Таблица 8.8. Координационные комплексы ADP и ATP с Co(III)

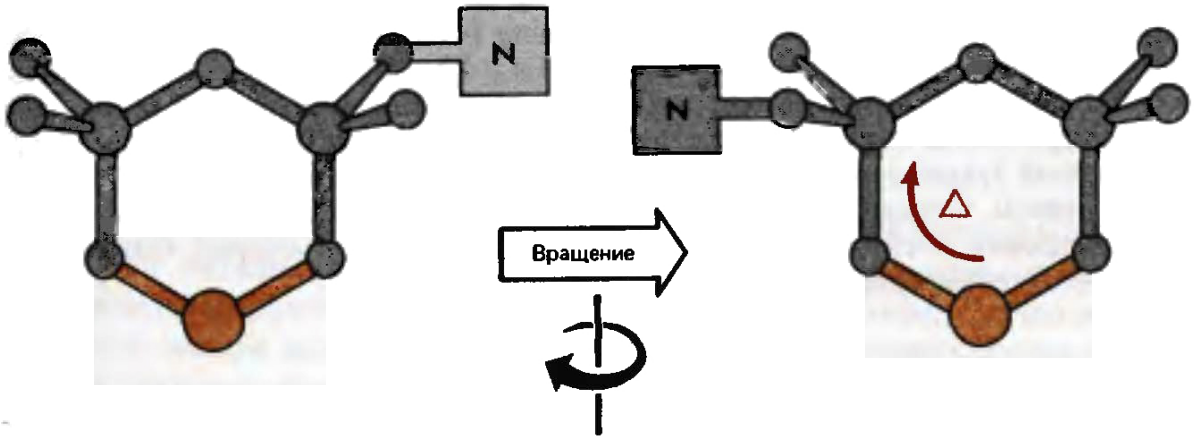
Соединение	Дентатность	Образование координационных связей с фосфатными группами	Число конфигурационных изомеров
$[Co(NH_3)_4ADP]$	Бидентатный	α и β	2
$[Co(NH_3)_5ADP]$	Монодентатный	β	1
$[Co(NH_3)_2HATP]$	Тридентатный	α, β и γ	4
$[Co(NH_3)_3HATP]$	Бидентатный	β и γ	2
$[Co(NH_3)_4HATP]$	Монодентатный	γ	1

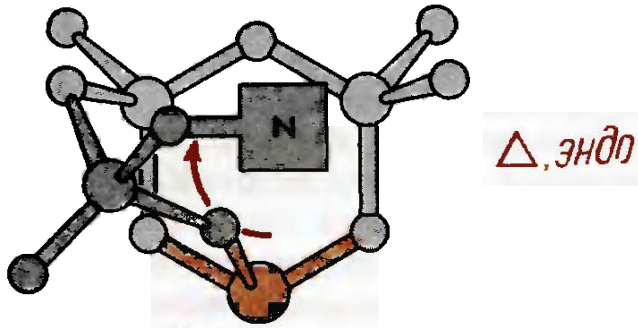
следующему правилу [784, 785]: если (шестичленное) хелатное кольцо расположить таким образом, чтобы связь, соединяющая его с лигандом, была направлена к наблюдателю, как это показано на рис. 8.7, и если при этом кратчайший путь вдоль кольца от металла до этой связи будет соответствовать вращению по часовой стрелке, то изомер называют правым (Δ, dexter – правый). Если же кратчайший путь соответствует вращению против часовой стрелки, изомер называют левым (Λ, laevus – левый).

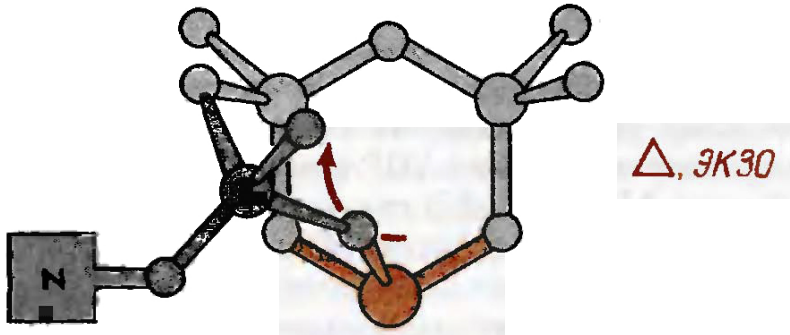
Если в составе нуклеозидтрифосфата β,γ-бидентатный хелат образует еще одну координационную связь с неэтерифицированным атомом кислорода α-фосфатной группы, то позиция атома кислорода в координационной сфере иона металла будет определяться хиральностью существующего бидентатного хелата. В результате образуется дополнительное шестичленное хелатное кольцо, слитое с первым по связи между центральным β-фосфатом и ионом металла. Нуклеозидную часть можно расположить двумя способами: непосредственно над бициклическим хелатом (*эндо*) и в удаленном от него положении (*экзо*). Поскольку обе эти стереохимически различающиеся структуры могут содержать как Δ-, так и Λ-бидентатные хелаты, возможно существование четырех тридентатных изомеров; все они были экспериментально обнаружены в комплексах $[Co(NH_3)_4ATP]$ (рис. 8.7; дополнение 8.1).

Рис. 8.7. *Вверху.* Определение Λ-, Δ-, *эндо-* и *экзо*-конфигураций комплексов ион металла – пирофосфат. Шестичленное хелатное пирофосфатное кольцо располагается таким образом, чтобы нуклеотид был направлен к наблюдателю. Если в комплексе кратчайший путь вдоль кольца от металла до связи P—$O_{5'}$ в нуклеотиде направлен по часовой стрелке, то его называют Δ-комплексом; направлению против часовой стрелки соответствует Λ-комплекс. *Внизу.* Дополнительная пирофосфатная группа в трифосфатах создает новые конформационные возможности: если атом $O_{5'}$ нуклеотида оказывается над хелатным кольцом, образованным β- и γ-фосфатами, то это соответствует конфигурации *эндо*, если же он повернут в сторону от хелатного кольца, конфигурация называется *экзо*. Ион металла изображен в виде цветной сферы, буква N внутри квадрата – это 5′-связанный нуклеозид.


N
M


N
Вращение
N


N
Δ, эндо


N
Δ, экзо

Дополнение 8.1

Выделение Λ-стереоизомера $[Co(NH_3)_4ATP]$ и установление его структуры

Комплексы нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфатов с Co(III) и Cr(III) очень стабильны, поэтому их используют для изучения стереохимии активных центров тех ферментов, для которых эти соединения являются субстратами или кофакторами.

Δ- и Λ-бидентатные диастереомеры комплекса $[Co(NH_3)_4ATP]$ связываются с дрожжевой гексокиназой (или с другими гексокиназами и полимеразами [783, 786]) в присутствии глюкозы. Фермент специфически взаимодействует только с одним из изомеров и переносит его γ-фосфат на глюкозу, образуя глюкозо-6-фосфат. Сформировавшийся при этом комплекс $[Co(NH_3)_4ADP]$ легко отделяется от непрореагировавшего изомера $[Co(NH_3)_4ATP]$. Если комплекс ADP вновь обработать гексокиназой, то при добавлении глюкозо-6-фосфата его фосфатная группа перенесется обратно, с образованием активного изомера $[Co(NH_3)_4ATP]$. Полученный таким путем гомогенный изомер был обработан периодатом, а затем анилином. Образовавшийся в результате комплекс $[Co(NH_3)_4PPP]$ был закристаллизован, после чего методом рентгеноструктурного анализа была определена его конфигурация [785].

$$[Co(NH_3)_4ATP]_{\Delta+\Lambda} + \text{Глюкоза}$$

$$\Big\Updownarrow \text{(дрожжевая гексокиназа)}$$

$$[Co(NH_3)_4ADP]_{\Lambda} + \text{Глюкозо-6-фосфат}$$

$$\Big\Updownarrow \text{(дрожжевая гексокиназа)}$$

$$[Co(NH_3)_4ATP]_{\Lambda}$$

$$\Big\downarrow \text{(периодат, анилин)}$$

$$[Co(NH_3)_4PPP]_{\Lambda}$$

По аналогичной схеме может быть изучена стереоспецифичность и других ферментов, использующих комплексы ADP и ATP с металлами.

Номенклатура *Λ/Δ/эндо/экзо* **может быть использована для описания известных кристаллических структур** ADP, ATP **и кофермента** NAD^+, **содержащего фрагмент** ADP (рис. 7.15, 7.16, 8.2). Калий в составе калиевой соли ADP (рис. 8.2) связан координационными связями с атомами кислорода α- и β-фосфатов, образуя шестичленное хелатное кольцо, которое соответствует Δ-диастереомеру. В литиевой соли NAD^+ (рис. 7.16) ADP и никотинамидрибозодифосфатная часть имеют одинаковую хиральность (Δ). В комплексе ATP с двумя ионами натрия оба иона образуют координационные связи с одной и той же молекулой

АТР (рис. 7.15). Один ион Na^+ связывается одновременно с атомом N_7 основания и с концевым γ-фосфатом, а другой образует тридентатный комплекс с α-, β- и γ-фосфатами. Шестичленное хелатное кольцо, образованное β- и γ-фосфатами, имеет хиральность Λ, и α-фосфат связывается таким образом, что аденозин располагается в ориентации *эндо* относительно хелата. Иными словами, АТР имеет конфигурацию Λ,*эндо*, которая изображена в правой нижней части рис. 7.15. В то же время другая молекула АТР в этом комплексе имеет иную конфигурацию, Δ, *эндо*. Это является прямым следствием того, что конформации трифосфатных цепей энантиморфны (могут быть описаны в терминах левого и правого винта) (разд. 7.6). В других комплексах АТР, Zn(II)—АТР—2,2′-бипиридил и Cu(II)—АТР—фенантролин, как цинк, так и медь принимают участие в образовании тридентатного комплекса с АТР. Оба комплекса имеют конфигурацию Λ,*экзо* [786a, 786b].

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Ионы металлов при образовании комплексов с нуклеотидами связываются с четырьмя разными функциональными группами: с атомами кислорода фосфатной группы, с гидроксилами рибозы, с эндоциклическими атомами азота и кетогруппами оснований. Аминогруппы оснований в координационном связывании с ионами металлов не участвуют. Атомы металлов переходной группы связываются с атомами кислорода фосфатных групп и с эндоциклическими атомами азота оснований, тогда как щелочноземельные катионы предпочтительно связываются с атомами кислорода фосфатных групп и с гидроксилами сахара. Ионы щелочных металлов при образовании комплексов одинаково легко взаимодействуют со всеми тремя типами лигандов. Сродство ионов металлов к функциональным группам нуклеотидов довольно специфично: связывание с атомом N_7 в пуринах приводит к образованию шестикоординационного комплекса, тогда как связывание с атомом N_3 в пиримидинах характеризуется более низкими значениями координационного числа. Эту специфичность усиливает межлигандная водородная связь между кето- и аминогруппами пуринов. При связывании с ионами металлов геометрия нуклеотида (ориентация относительно связи $C_{4'}-C_{5'}$) искажается в том случае, если в связывании принимают участие атомы кислорода фосфатной группы и объемный тройной лиганд; в других случаях геометрия нуклеотида не изменяется.

Для образования координационных связей с ионами металлов нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфаты используют в основном фосфатные группы, но не основания. В трифосфатах лигандные комплексы с ионами металлов могут быть моно-, би- или тридентатными в одной из двух (Λ, Δ) или четырех (Λ, Δ, *эндо*, *экзо*) стереохимически различающихся конфигураций. Это было установлено экспериментально при исследовании комплексов с Cr(III) и Co(III) и, по-видимому, справедливо также для комплексов с другими металлами, в частности с Mg(II).

ГЛАВА 9

Полиморфизм ДНК и структурный консерватизм РНК. Классификация A-, B- и Z-типов двойных спиралей

Молекулярные структуры олиго- и полинуклеотидов тесно связаны между собой, поэтому в гл. 10–15 мы будем рассматривать одновременно и те и другие. Большинство известных кристаллических структур олигонуклеотидов – это двойные спирали, образованные самокомплементарными цепями. Хотя длина олигонуклеотидов ограничена (от 2 до 12 пар оснований), изучение их структуры позволяет понять тонкие детали самоорганизации полинуклеотидов, их гидратации и связывания с ионами металлов. Иногда олигонуклеотиды кристаллизуются в неспиральном виде, принимая вытянутую конфигурацию или образуя петли. Это показывает, как гибок нуклеотидный блок в цепи или, точнее, насколько подвижна шарнирная фосфодиэфирная связь между отдельными нуклеотидами.

Богатейшую структурную информацию о двойных спиралях и неспиральных участках полинуклеотидов дает анализ кристаллической структуры тРНК, описанной в гл. 15.

Напомним, что характер результатов рентгеноструктурного анализа полинуклеотидных волокон и олигонуклеотидных монокристаллов существенно различается (гл. 3). В последующих шести главах наряду с точной структурной информацией, полученной на монокристаллах олигонуклеотидов, представлены и менее точные данные о структуре полинуклеотидов, полученные при изучении волокон. Мы увидим, что наши представления о спиральной структуре полимеров ДНК и РНК и о многообразии форм существующих двойных спиралей в целом подтверждаются, хотя какие-то детали, возможно, и придется пересмотреть в ближайшие несколько лет.

Обзоры по рассматриваемым здесь вопросам приведены в работах [38, 790–793]. Кроме того, хотелось бы привлечь внимание читателей к некоторым последним публикациям, отобранным из обширного списка литературы, которые касаются конформационного анализа полинуклеотидов [794–808], гибкости двойных спиралей [809–817] и спектроскопических структурных исследований полинуклеотидов [818–824]. Биохимические данные о структурно-функциональных корреляциях в ДНК и РНК приведены в обзорах [792, 793].

9.1. ПОЛИМОРФИЗМ ДВОЙНЫХ СПИРАЛЕЙ

В табл. 9.1. перечислены основные спиральные формы, обнаруженные у природных и синтетических ДНК и РНК. Образцы волокон для рентгеноструктурного анализа готовят в виде литиевой или натриевой соли, избыточную концентрацию которой регулируют путем изменения относительной влажности [165]. При различных экспериментальных условиях были обнаружены разнообразные формы двойных спиралей: A, A′, B, α-B′, β-B′, C, C′, C″, D, E и Z [824]. Буквами от A до Z обозначены различные структурные полиморфные модификации, приставки α и β относятся к чисто упаковочным отличиям, обусловленным симметрией кристаллической решетки, а штрихи указывают на незначительные вариации структуры внутри одного семейства. Так, если природная ДНК со случайной последовательностью при определенных условиях находится в C-форме, у которой число нуклеотидов на виток равно 9,33 (см. ниже), то для синтетического полинуклеотида poly (dA—dG—dC)·poly(dG—dC—dT) с повторяющимся тринуклеотидным мотивом в тех же условиях наблюдается C″-форма с девятью нуклеотидами на виток, а структура poly(dA—dG)·poly(dC—dT) повторяется лишь через два витка (9·2 нуклеотидов) и представляет собой C′-ДНК.

Симметрию двойных спиралей описывают с помощью символа N_m. Согласно этой номенклатуре, заимствованной из кристаллографии (дополнение 9.1), при движении вдоль оси спирали структурный мотив точно повторяется через каждые m витков (m шагов), состоящих из N нуклеотидов. В большинстве случаев $m = 1$, т.е. мотив повторяется через виток, но, например, у C-ДНК с симметрией $9{,}33_1$ структурный мотив воспроизводится лишь через три витка, или через $9{,}33 \cdot 3 = 28$ нуклеотидов, что можно описать также символом 28_3. Следует подчеркнуть, что в строгом смысле точное повторение мотива возможно только для синтетических полинуклеотидов с определенной последовательностью. В случае природных ДНК и РНК со случайной нуклеотидной последовательностью термин *точное повторение* относится к сахарофосфатному остову, а каждая отдельная пара оснований в данном случае рассматривается как некий усредненный элемент уотсон-криковских AT(U)- и GC-пар (гл. 6).

Полиморфизм ДНК и структурный консерватизм РНК. Из табл. 9.1 видно, что двухцепочечная РНК независимо от того, природная она или синтетическая, при различных экспериментальных условиях имеет структуру, относящуюся к одной из двух близких друг другу форм двойных спиралей: A или A′. Структурные возможности ДНК гораздо богаче (табл. 9.1 и 9.2). ДНК со случайными последовательностями могут находиться в A-, B- и C-формах (см. обобщенную схему на рис. 9.1). К этому списку следует добавить D-, E- и Z-формы – полинуклеотиды, у которых повторяется определенный олигонуклеотидный мотив; при этом Z-форма представляет собой левую двойную спираль.

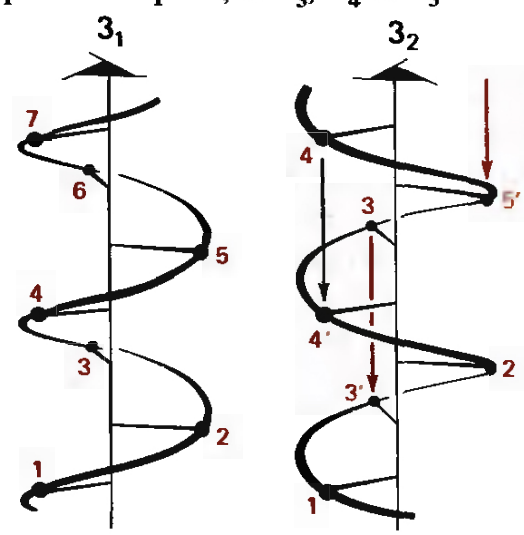
Дополнение 9.1

Симметрия спирали и кристаллографические винтовые оси

Для описания симметрии спиралей в табл. 9.1 используется кристаллографический символ N_m, которым обозначают винтовую ось. Если в случае простой поворотной оси порядка N структурный мотив повторяется при повороте вокруг этой оси на угол $2\pi/N$, то для винтовой оси этот поворот сочетается с переносом параллельно оси на расстояние, равное (m/N)-й доле размера ячейки вдоль винтовой оси. В кристаллографии встречаются винтовые оси 2, 3, 4 и 6-го порядков, обозначаемые символами

$$2_1 \quad 3_1 3_2 \quad 4_1 4_2 4_3 \quad 6_1 6_2 6_3 6_4 6_5.$$

Операция 3_1 поворачивает объект на угол $2\pi/3 = 120^\circ$ и смещает его на 1/3 ребра ячейки, параллельного оси, причем направление поворота и смещения связано правилом правого винта. В случае оси 3_2 происходит поворот на тот же угол $2\pi/3$, но объект смещается на 2/3 ребра ячейки, т.е. элемент 1 повторяется в положениях 2, 3, 4 и т.д. (см. рисунок). Отсутствующий в этом списке элемент 3′, который находится на высоте 1/3, получается при трансляции на единицу (3/3) элемента 3, расположенного на высоте $2 \cdot 2/3$ $(4/3 - 3/3 = 1/3)$. Если соединить различные элементы непрерывной линией, как это показано на рисунке, то в случае операции 3_1 мы получим правую спираль, а в случае 3_2 – левую. Аналогично 4_1, 6_1 и 6_2 отвечают правой спирали, а 4_3, 6_4 и 6_5 – левой.



При описании спиральной симметрии нуклеиновых кислот символ N_m имеет тот же смысл, что и в кристаллографии. В данном случае повторяющимся элементом является нуклеотид или пара оснований, и спиральная симметрия А-ДНК, 11_1, указывает, что любой нуклеотид связан с последующим сочетанием поворота вокруг оси спирали на угол $2\pi/11$ $(= 32{,}7^\circ)$ и смещения вдоль оси на 1/11 периода (шага спирали). Другими словами, А-ДНК представляет собой спираль 11-го порядка с 11 нуклеотидами на виток. С-ДНК с симметрией $9{,}33_1$ – пример нецелочисленной спирали. Здесь структура в точности повторяется лишь через 3 витка, или через $3 \cdot 9{,}33 = 28$ нуклеотидов, что часто описывают символом 28_3; эта номенклатура не вполне соответствует кристаллографической, зато она удобна при описании нецелочисленных спиралей.

В случае полинуклеотидов с чередующимися последовательностями, таких, как poly(dA—dT)·poly(dA—dT) или poly(dG—dC)·poly(dG—dC), повторяющимся структурным элементом при данном способе описания будет динуклеотид. Следовательно, симметрия 8_1, указанная в табл. 9.1, для D-ДНК в случае сополимера с чередующейся последовательностью в действительности должна быть заменена на 4_1, а Z-ДНК с двенадцатью парами оснований на виток имеет симметрию 6_5. Однако, чтобы представить все данные табл. 9.1 в едином виде, символы пониженной симметрии в этой таблице не используются (исключение сделано для Z-ДНК); в качестве повторяющегося структурного элемента везде рассматривается один нуклеотид или одна пара оснований.

Структура синтетических полинуклеотидов с блочным строением зависит от последовательности блока. Из табл. 9.1 следует, что ДНК, имеющие один и тот же нуклеотидный состав, но разные последовательности, проявляют различные структурные свойства. Например, полинуклеотид poly(dA—dC)·poly(dG—dT) может находиться в A-, B- и Z-формах, а его аналог poly(dA—dG)·poly(dC—dT), у которого одна цепь состоит только из пуринов, а другая – только из пиримидинов, существует в виде B- и C″-форм и в A-форму переходить не может.

Еще более поразительный пример – это poly(dA)·poly(dT) и два других полинуклеотида с тем же составом, poly(dA—dT)·poly(dA—dT), poly(dA—dA—dT)·poly(dA—dT—dT). Первый при относительной влажности 70% и выше находится в B-форме; при уменьшении влажности он сначала переходит в метастабильную A-форму, а затем образует трехцепочечный комплекс poly(dA)·2poly(dT), имеющий конформацию A-типа (разд. 11.4). Напротив, полинуклеотид poly(dA—dA—dT)·poly(dA—dT—dT) в виде натриевой соли может находиться только в B- и D-формах, а полинуклеотид poly(dA—dT)·poly(dA—dT) может существовать также в метастабильной A-форме.

Нуклеотидный состав тоже влияет на структурные свойства синтетических ДНК. Рассмотрим два полинуклеотида, poly(dA—dT)·poly(dA—dT) и poly(dG—dC)·poly(dG—dC) (табл. 9.1). В обоих полимерах имеет место чередование пуринов и пиримидинов, но нуклеотидный состав полинуклеотидов различается. Натриевая соль poly(dA—dT)·poly(dA—dT) может находиться в метастабильной A-форме или в стабильной D-форме, но poly(dG—dC)·poly(dG—dC) существует исключительно в A-форме вплоть до относительной влажности 92%. Если теперь рассмотреть полинуклеотид, в котором гуанозин заменен на инозин, то мы с удивлением обнаружим, что он ни при каких условиях не переходит в A-форму. Этот факт объясняется в гл. 17, где обсуждаются вопросы, связанные с гидратацией ДНК. Еще одно отличие рассматриваемых полинуклеотидов друг от друга состоит в том, что в случае poly(dG—dC)·poly(dG—dC) *может* происходить весьма эффектный переход из правоспиральной B-ДНК в левоспиральную Z-ДНК, а в случае poly(dA—dT)·poly(dA—dT) – *нет*.

Структура природных ДНК в целом, по-видимому, не зависит от последовательности и нуклеотидного состава. На основании целого ряда

Таблица 9.1. Основные кристаллические формы ДНК и РНК в волокнах: зависимость формы и симметрии спирали от природы противоиона и относительной влажности (эквивалент концентрации соли)[1)]

Полинуклеотид	Противоион	Относительная влажность, %	Форма	Симметрия спирали	Ссылка
Нативная ДНК	Na	75	A	11_1	[842]
	Na	92	B	10_1	[101]
	Li	57–66	C	$9,33_1(28_3)$	[94]
	Li	44	C	$9,33_1(28_3)$	[94]
	Li	66	B	10_1	[824]
Poly(dA)·poly(dT)	Na	70	β-B′	10_1	[843]
	Na	92	α-B′	10_1	[843]
Poly(dG)·poly(dC)	Na	75	A	11_1	[844]
	Na	92	B	10_1	[844]
Poly(dA—dT)·poly(dA—dT)	Na	75	D	8_1	[845]
	Na	до 98	A	11_1	[846]
	Li	66	B	10_1	[846]
Poly(dA—dC)·poly(dG—dT)	Na	66	A	11_1	[824]
	Na	66–92	B	10_1	[824]
	Na	66	Z	6_5	[304]
Poly(dA—dG)·poly(dC—dT)	Na	66	C″	9_1	[824]
	Na	95	B	10_1	[824]
Poly(dG—dC)·poly(dG—dC)	Na	43	Z	6_5	[304]
	Na	до 92	A	11_1	[824]
	Li	81	B	10_1	[824]
Poly(dA—dA—dT)·poly(dA—dT—dT)	Na	66	D	8_1	[847]
	Na	92	B	10_1	[847]
Poly(dA—dG—dT)·poly(dA—dC—dT)	Na	до 98	A	11_1	[824]
	Li	98	B	10_1	[824]
	Li	66	C	9_1	[824]
Poly(dA—dI—dT)·poly(dA—dC—dT)	Na	66	D	8_1	[824]
	Na	81	C	$9,33_1(28_3)$	[824]
	Na	92	B	10_1	[824]
Poly(dI—dC)·poly(dI—dC)	Na	66	B	10_1	[388]
	Na	75	D	8_1	[388]
Нативная РНК (реовируса)	Na	до 92	A	11_1	[848]
Poly(A)·poly(U)	Na	до 92	A	11_1	[848]
Poly(I)·poly(C)	Na	до 92	A′	12_1	[848]
Гибрид poly(rI)·poly(dC)[2)]	Na	75	A′	12_1	[849]
Гибрид ДНК—РНК	Na	33–92	A	11_1	[850]
ДНК фага T2	Na	60	T	8_1	[858]

[1)] Вначале в литературе (см. работы [824, 304]) вместо обозначения Z-ДНК использовалось S-ДНК.

[2)] В работе [849] не указаны параметры спирали: см. работу [851].

Таблица 9.2. Типы структур и параметры спиралей, полученные из данных по рентгеновской дифракции на волокнах природных ДНК со «случайной» последовательностью и на волокнах синтетических гомополимеров и полинуклеотидов с повторяющейся нуклеотидной последовательностью

Тип структуры	Шаг, Å	Симметрия спирали[1]	Расстояние между остатками (h) и угол спирального вращения (t)		Ширина желобков[7], Å		Глубина желобков[7], Å	
			h(Å)	t, град	минорного	главного	минорного	главного
Природные и синтетические ДНК								
A	28,2	11_1	2,56	32,7	11,0	2,7	2,8	13,5
B	33,8	10_1	3,38	36,0	5,7	11,7	7,5	8,5
C	31,0	$9{,}33_1(28_3)$[2]	3,32	38,6	4,8	10,5	7,9	7,5
Синтетические ДНК с неслучайной последовательностью								
B′	32,9	10_1	3,29	36,0				
C′	29,5	9_1	3,28	40,0				
C″	29,1	$9_1(18_2)$[3]	3,23	40,0				
D	24,3	8_1	3,04	45,0	1,3	8,9	6,7	5,8
E	24,35	$7{,}5_1(15_2)$[4]	3,25	48,0				
S	43,4	6_5[5]	3,65	$-30{,}0$[8]				
Z[6]	45	6_5[5]	3,7	$-30{,}0$[8]	2,7[9]		9,0[9]	

[1] Приведено число остатков на виток; в скобках указано число остатков, после которого структура в точности повторяется. Некоторые данные отличаются от тех, что приведены в работе [824].

[2] На виток спирали приходится 9,33 остатка; структура повторяется через три витка, или $9{,}33 \cdot 3 = 28$ остатков.

[3] Динуклеотидная последовательность; повторяется через каждые два витка, или 18 остатков.

[4] Тринуклеотидная последовательность; повторяется через каждые два витка, или 15 остатков.

[5] Повторяющимся элементом считается динуклеотид.

[6] Получено путем экстраполяции структуры гексануклеотида (dC—dG) [917].

[7] Из работы [893]. Ширина желобка – это расстояние между двумя линиями, проведенными через фосфаты каждой цепи, минус вандерваальсов радиус фосфатной группы, равный 5,8 Å; глубина желобка также вычисляется с учетом вандерваальсовых радиусов.

[8] Приведен *средний* угол спирального вращения. Угол вращения между динуклеотидными единицами равен $-60°$, но в самой единице углы вращения неодинаковы, они различаются в GpC и CpG (см. гл. 12).

[9] Из работы [303]; см. также сноску [7].

исследований, проведенных методами рассеяния рентгеновских лучей [825], рентгеновской дифракции на волокнах [826], методами линейного дихроизма в ИК-свете [827] и кругового дихроизма в УФ-свете [828] на образцах ДНК с различным АТ-содержанием, в том числе на сателлитных ДНК (дополнение 9.2), содержащих большое число повторов, был сделан вывод о том, что, помимо традиционных A-, B- и C-форм, существуют и иные структурные модификации ДНК. Другие исследователи, также использующие методы кругового дихроизма в УФ-свете

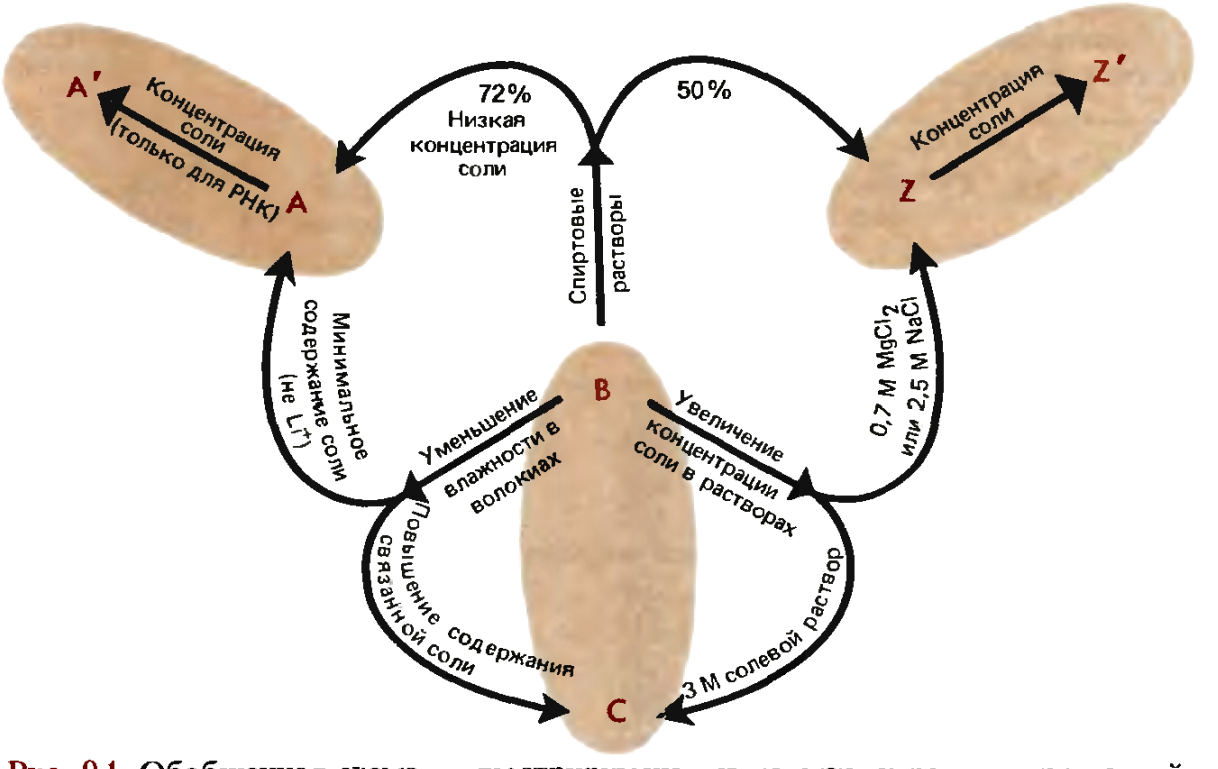


Рис. 9.1. Обобщенная схема, иллюстрирующая связь между различными семействами природных ДНК и РНК [302]. Внутрисемейственные переходы (цветные овалы) происходят при изменении концентрации соли. Межсемейственные переходы индуцируются изменением относительной влажности и концентрации соли в волокнах или пленках и изменением ионной силы или полярности растворителя в растворе. Критические значения концентраций соли и этанола, приведенные в работах [914, 915, 839], дают среднюю точку, а не границу перехода. Заметим, что РНК-область на схеме ограничивается A-семейством, а Z-семейство, включающее левые спирали, возможно, состоит только из чередующихся последовательностей пурин–пиримидин.

[829] и дифракции рентгеновских лучей на волокнах [824, 830–832], подвергают этот вывод серьезным сомнениям. По существу, для природных молекул–сателлитных ДНК с повторами или ДНК без повторов–подтверждено наличие только A-, B- и C-форм. Но так как результаты перечисленных методов ограничиваются описанием лишь *общей* структуры молекулы и ни один из них не выявляет тонких структурных деталей, мы не можем исключить, что имеют место незначительные локальные структурные вариации, как, например, в случае «B-ДНК с чередованием конформаций» (разд. 11.3).

Конечно, не следует думать, что ДНК с разным AT-содержанием будут обладать одинаковыми термодинамическими свойствами. На самом деле было показано [833], что при GC-содержании ниже 30% B → → A-переход затруднен, но облегчается по мере роста доли GC-пар в молекуле, как это видно из фазовой диаграммы, приведенной на рис. 9.2.

Дополнение 9.2

Что такое сателлитные ДНК?

Если фрагментировать ДНК эукариот, а затем провести ее центрифугирование в градиенте плотности CsCl, то помимо основного пика на седиментограмме будут наблюдаться «сателлитные», что указывает на наличие в препарате молекул ДНК разной плотности, а следовательно, и разного нуклеотидного состава. Анализ сателлитных ДНК показал, что они содержат серии повторов, длина и сложность которых характерны для исследуемого вида. Так, было обнаружено, что у крабов сателлитная ДНК на 93% состоит из чередующихся AT-пар и лишь на 2,7% из GC-пар, т.е. практически представляет собой poly(dA—dT) [860]. Из *Drosophila virilis* было выделено три различных вида сателлитных ДНК с повторяющимися гептануклеотидными мотивами, такими, как poly(d—A—dC—dA—dA—dA—dC—dT)·poly(dA—dG—dT—dT—dT—dG—dT) [861].

Сателлитные ДНК локализованы в центромере. Возможно, они выполняют роль спейсеров, но так ли это на самом деле – пока неизвестно [862]. Очевидно, что они не кодируют никакие белки и, по-видимому, не транскрибируются [349].

Структура ДНК зависит от природы присутствующих катионов и от температуры. В табл. 9.1 можно найти множество примеров того, что структура спирали натриевой и литиевой солей природных или синтетических ДНК в волокнах различается. Сходная ситуация наблюдается в растворе, где на поведение ДНК влияют тип и концентрация катионов и температура. При этом наличие разных анионов почти никак не сказывается на поведении ДНК [834, 835]. Вообще говоря, появление структурных перестроек, связанных с изменением окружения, характерно только для B-ДНК; A-ДНК, очевидно, имеет более «жесткую» молекулярную конформацию, точно так же как и РНК, которая существует только в виде A- и A′-форм независимо от последовательности, нуклеотидного состава и окружения.

9.2. ДВА СЕМЕЙСТВА ПРАВЫХ ПОЛИНУКЛЕОТИДНЫХ СПИРАЛЕЙ: A И B

Внимательно изучив табл. 9.3 и 9.4 и исключив на некоторое время из рассмотрения левоспиральные Z- (или S-)ДНК, которым посвящена гл. 12, мы обнаружим, что полинуклеотиды рибо- и дезоксириборяда имеют общие структурные особенности. Правоспиральные ДНК и РНК, будь то одно-, двух-, трех- или четырехцепочечные структуры, можно грубо разбить на две категории, которые мы называем A- и B-семействами.

Главное различие между спиралями A- и B-типа состоит в неодинаковой конформации сахара. Для A-семейства характерна C_3′-*эндо*- конформация, а для B-семейства – C_2′-*эндо* (или, что почти то же самое, C_3′-*экзо*). Различием в конформации сахара обусловлены вариации

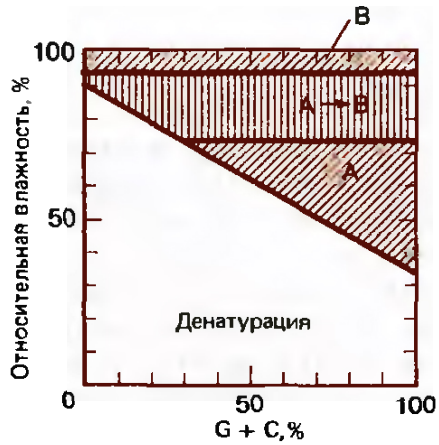


Рис. 9.2. «Фазовая диаграмма», связывающая конформациоиные изменения природных ДНК с различным GC-содержанием при варьировании относительной влажности [833]. При высокой относительной влажности (95%) существует только B-форма, в диапазоне 95–73% относительной влажности она переходит в A-форму. Ниже 73% можно наблюдать только A-форму, причем для этого должно выполняться дополнительное условие – GC-содержание должно быть выше 30%, чтобы не произошла денатурация. Диаграмма получена с помощью инфракрасной спектроскопии на пленках ДНК, содержащих NaCl в концентрации 3–4%.

в расстоянии между соседними фосфатами в одной полинуклеотидной цепи: оно колеблется от 5,9 Å при конформации сахара C_3-*эндо* до 7,0 Å при C_2-*эндо*-конформации (рис. 9.3). Вследствие этого спирали выглядят совершенно по-разному (см. ниже).

Знак угла наклона пары θ_T (tilt) связан с конформацией сахара. В двухцепочечных полинуклеотидах нормаль к плоскости пары не параллельна оси спирали, а наклонена к ней под некоторым углом, значение которого может достигать величины 20°. Характерно, что этот угол наклона θ_T, знак которого определен на рис. 2.14, *положителен* для спиралей *A-типа* и *отрицателен* для спиралей *B-типа*, т.е. коррелирует с конформацией сахара. Как мы увидим далее, это изменение в знаке угла наклона пар в правой спирали приводит к перестройке стэкинга оснований.

Угол наклона оснований γ_T коррелирует с расстоянием h между нуклеотидами вдоль оси спирали. Если бы пары были компланарны, а плоскость пары в точности перпендикулярна оси спирали, то расстояние h между нуклеотидами вдоль оси спирали соответствовало бы вандерваальсову радиусу 3,4 Å. Однако из табл. 9.2 и 9.3 видно, что в двухцепочечных уотсон-криковских спиралях пары не перпендикулярны оси и расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали всегда меньше, чем 3,4 Å. Из чисто геометрических соображений ясно [8], что должна существовать линейная зависимость расстояния h между нуклеотидами вдоль оси спирали от γ_T, т.е. от угла между нормалью к плоскости *индивидуального* основания и осью спирали (рис. 9.4). Этот угол, вообще говоря, немного отличается от угла наклона пары θ_T, так как ориента-

цию пары задает плоскость, проведенная наилучшим образом через оба основания (рис. 2.14). Любопытно, что экстраполяция прямой на рис. 9.4 к нулевому значению угла наклона γ_T приводит к значению $h = 3{,}7$ Å, т.е. к величине, заметно отличающейся от ожидаемой (3,4 Å). Дело в том, что основания в паре всегда повернуты одно относительно другого. Этот пропеллерный поворот оптимизирует межплоскостное взаимодействие оснований в спиральных полинуклеотидах [836] и нарушает компланарность пары. Таким образом, если для одного из оснований пары $\gamma_T = 0$, то для его партнера $\gamma_T \neq 0$, а значит, расстояние до соседней пары будет больше, чем 3,4 Å.

Расстояние h между остатками вдоль оси спирали сильнее варьирует у А-ДНК, а угол спирального вращения – у В-ДНК. Расстояние между нуклеотидными остатками h в уотсон-криковских двойных спиралях А-типа колеблется от 2,56 до 3,29 Å и сопровождается относительно малыми вариациями в значении угла спирального вращения: $30{,}0 \div 32{,}7°$ (см. табл. 9.4 и 9.5). В двойных спиралях В-типа h, напротив, меняется незначительно, от 3,03 Å у D-ДНК до 3,37 Å у В-ДНК, а диапазон значений угла спирального вращения шире, чем в А-семействе, и составляет 36–45°. В результате двойные спирали А-типа больше походят друг на друга, чем спирали В-типа. Обусловлено это тем, что при изменении угла спирального вращения от 36 до 45° число остатков на виток уменьшается от 10 до 8, что существенно меняет вид спирали.

Для полинуклеотидов А-семейства характерен структурный консерватизм. Из табл. 9.3 и 9.4 следует, что двойные спирали А-семейства, у которых сахарные остатки имеют конформацию C_3'-*эндо*, представлены только структурно близкими формами А- и А′-РНК, а также А-ДНК. Из-за C_3'-*эндо*-конформации сахара расстояние между фосфатами уменьшается до 5,9 Å (рис. 9.3), поэтому полинуклеотидная цепь закручена в меньшей степени, чем в двойных спиралях В-типа: на виток приходится 11–12 нуклеотидов (или пар оснований), что соответствует углу спирального вращения $30 \div 32{,}7°$. Пары наклонены к оси спирали на 8–20°; это приводит к расстоянию между нуклеотидами вдоль оси спирали 3,29–2,56 Å.

Для полинуклеотидов В-семейства характерно структурное многообразие. Спиральные структуры, принадлежащие В-семейству, образуют только молекулы ДНК; у РНК ни одна из этих структур не обнаружена. В случае C_2'-*эндо*- или эквивалентной ей C_3'-*экзо*-конформации сахарных остатков в В-семействе соседние фосфаты в полинуклеотидной цепи расходятся на расстояние ~ 7 Å (рис. 9.3), и это приводит к более сильному закручиванию спирали по сравнению со спиралями А-семейства. Вследствие этого угол спирального вращения увеличивается до 36–45°, а расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали – до 3,03–3,37 Å, т.е. в целом становится больше, чем в спиралях А-типа. С этими характеристиками связан угол наклона пары. В данном случае он меньше, а кроме того, *отрицателен*: $-16{,}4 \div -5{,}9$ Å (табл. 9.5).

Следует подчеркнуть, что по сравнению с двойными спиралями А-

Таблица 9.3. Конформационные параметры полинуклеотидов, принадлежащих A- и B-семействам

Полинуклеотид		Тип спирали	α ($P-O_{5'}$)	β ($O_{5'}-C_{5'}$)	γ ($C_{5'}-C_{4'}$)	δ ($C_{4'}-C_{3'}$)	ε ($C_{3'}-O_{3'}$)	ζ ($O_{3'}-P$)	χ	Ссылка
					A-семейство					
Двойные спирали гетерополимеров										
α-A-РНК } реовируса		A	−88	−155	54	83	−179	−52	−155	[852]
β-A-РНК } реовируса		A	−92	−151	52	83	174	−46	−146	[852]
Poly(A)·poly(U)		A	−62	180	48	83	−151	−74	−166	[848]
Poly(I)·poly(C)		A′	−65	−167	44	83	−168	−60	−161	
A-РНК[1)]		A	−68	178	54	82	−153	−71	−158	
A-ДНК[1)]		A	−50	172	41	79	−146	−78	−154	
A-ДНК		A	−90	−149	47	83	−175	−45	−154	[304]
A-ДНК		A	−75	−179	59	79	−155	−67	−158	
Poly(2-метилтио-A)·poly(U)			−102							
с хугстеновскими парами	Poly(ms^2A)	A	−93	153	100	79	−132	−72	4	[887]
	Poly(U)	A		−177	76	85	−149	−72	8	
Тройные спирали гетерополимеров										
Poly(U)·poly(A)·poly(U)										
Относительная влажность 92%	U	A′	−28	171	24	83	−156	−75	−154	
	A	A′	−66	−179	53	83	−163	−67	−150	
	U	A′	−40	167	37	83	−149	−83	−156	
Относительная влажность 72%	U	A	−55	173	47	83	−152	−74	−158	[853]
	A	A	−76	176	64	83	−156	−69	−152	
	U	A	−63	174	53	83	−149	−76	−158	
Гибриды ДНК–РНК										
Poly(I)·poly(dC)		A′	−71	−176	56	80	−159	−64	−165	[849]
Poly(U)·poly(dA)·poly(U)										
	U	A	−57	172	49	83	−152	−74	−158	
	dA	A	−71	178	58	83	−160	−67	−149	[853]
	U	A	−62	174	53	83	−149	−76	−157	
Комплексы гомополимеров										
Poly(AH^+)·poly(AH^+)		A	−75	168	69	82	−144	−67	−176	[458]

Poly(s^2U)·poly(s^2U)									
α-Цепь	A	−43	172	37	77	−146	−77	−160	[461]
β-Цепь	A	−43	163	41	81	−148	−80	−150	
Poly(X)·poly(X)									
pH 5,7	A	−75	171	63	87	−142	−80	−156	[854]
pH 8,0	A	−66	−179	51	81	−153	−71	−162	
$[poly(I)]_4$, $[poly(G)]_4$	A	−103	176	92	83	−156	−69	−169	[855]
Одноцепочечные спиральные гомополимеры									
Poly(C)	A	−57	173	47	83	−129	−65	−159	[947]
Poly(O'_2-метил-C)	A	−88	−175	66	83	−138	−58	−154	
Poly(A)									
Спираль 2-го порядка	—	99	183	46	154	−88	39	−110	[963]
Спираль 9-го порадка	A	−64	154	53	83	−145	−70	−160	[957]
				B-семейство					
B-ДНК	B	−46	−147	36	157	155	−96	−98	[856]
B-ДНК	B	−41	136	38	139	−133	−157	−102	[304]
C-ДНК	C	−39	−160	37	157	161	−106	−97	[857]
Poly(dA−dT)·poly(dA−dT)	D	−62	−152	69	157	141	−101	−97	[845]
ДНК T2	D	−73	−137	89	146	136	−85	−110	[858]
Poly(dA)·poly(dT)	B′	−52	−136	39	157	145	−87	−96	[859]
«B-ДНК с чередованием конформаций»									
Фрагмент A—T		−60			110° (A)		−60		[900]
Фрагмент T—A		−50			155° (T)		−120		
Одноцепочечный спиральный гомополимер									
Poly(dT)		−72	179	43	151	−105	164	−148	[358]
Гибриды ДНК–РНК при высокой относительной влажности									
Poly(A)·poly(dT)									
Poly(A)	A	−88	174	75	97	−146	−77	−175	[912]
Poly(dT)	B	180	96	166	152	−178	−36	−152	

[1] Новые данные, полученные на волокнах; личное сообщение Арнотта и Чандрасекарана (1982).

Таблица 9.4. Параметры спиралей полинуклеотидов, имеющих конформацию сахара $C_{3'}$-*эндо* и, следовательно, принадлежащих А-семейству

Полинуклеотид	Тип спирали	Симметрия спирали[1]	Шаг спирали, Å	Расстояние между остатками вдоль оси спирали, Å	Угол спирального вращения, град	Смещение пары от оси спирали[2], Å	Угол наклона пары[3], град	Ссылка
Двойные спирали гетерополимеров								
α-А-РНК } реовируса	A	11_1	30,0	2,73	32,7	4,4	17,0	[852]
β-А-РНК } реовируса	A	11_1	30,0	2,73	32,7	4,4	19,2	[852]
Poly(A)·poly(U)	A	11_1	30,9	2,81	32,7	4,4	16,0	[848]
Poly(I)·poly(C)	A′	12_1	36,0	3,00	30,0	4,4	10,0	[848]
А-ДНК	A	11_1	28,2	2,56	32,7	4,7	20,0	[843]
Poly(2-метилтио-А)·poly(U) с хугстеновскими парами { Poly(ms^2A)	A						13	
Poly(U)	A	10_1	31,6	3,16	36,0	—	10	[887]
Тройные спирали гетерополимеров								
Poly(dT)·poly(dA)·poly(dT) с уотсон-криковскими и хугстеновскими парами	A′	12_1	39,1	3,26	30,0	2,80 для уотсон-криковских пар	8,5	
Poly(U)·poly(A)·poly(U)								
Относительная влажность 92%	A′	12_1	36,5	3,04	30,0		12,0	[853]
Относительная влажность 72%	A	11_1	33,4	3,04	32,7		12,0	[853]
Poly(I)·poly(A)·poly(I)	A	11_1	36,2	3,29	32,7	2,8	8,0	
Гибриды ДНК–РНК								
Poly(rI)·poly(dC)	A′	12_1	35,6	2,97	30	4,9	5,68	[849]
Poly(U)·poly(dA)·poly(U)	A	11_1	33,6	3,06	32,7		12,0	[853]
Poly(dC)·poly(I)·poly(dC)	A	11_1	34,8	3,16	32,7		10,0	

Комплексы гомополимеров								
Poly(AH^+)·poly(AH^+)	A	8_1	30,4	3,8	45		10	[458]
Poly(s^2U)·poly(s^2U)	A	11_1	28,8	2,62	32,7		18	[461]
Poly(X)·poly(X)								
pH 5,7	A	10_1	30,1	3,01	36		21	[854]
pH 8,0		11_1	27,7	2,52	32,7		11	
$[Poly(I)]_4 \cdot [poly(G)]_4$[4]	A	23_2	39,2	3,41	31,3		11	[855]
Одноцепочечные спирали гомополимеров								
Poly(C)	A	6_1	18,6	3,1	60		21	[947]
Poly(O_2-метил-C)	A	6_1	18,9	3,2	60		28	
Poly(A)								
Спираль 2-го порядка	—	2_1	5,8	2,9	180		36	[963]
Спираль 9-го порядка	A	9_1	25,4	2,82	40		24	[957]
B-ДНК	B	10_1	33,7	3,37	36	−0,14	−5,9/−2,1	[843, 856]
C-ДНК	C	28_3	30,9	3,31	38,6	−1,0	−8,0/1,0	[842, 857]
Poly(dA−dT)·poly(dA−dT)	D	8_1	24,2	3,03	45	−1,8	−16,4	[845]
ДНК T2	D	8_1	27,2	3,40	45	−1,43	−6/4	[858]
Poly(dA)·poly(dT)	B′	10_1	32,9	3,29	36	−0,02	−7,9/−1,0	[859]
Одноцепочечный спиральный гомополимер								
Poly(dT)	—	$7,2_1$	25,2	3,5	50		132	[358]
Гибриды ДНК–РНК при высокой относительной влажности								
Poly(A)·poly(dT)								
Poly(A)(C_3-эндо)	B	$9,7_1$	33,7	3,46	37,0	—	—	[912]
Poly(dT)	B							

[1] См. дополнение 9.1.

[2] Определение этой величины дано на рис. 2.14.

[3] Это есть угол между нормалью к плоскости осиований и осью спирали. Если приведены два числа, первое отвечает углу наклона пары θ_T, а второе – углу пропеллера оснований θ_P (см. рис. 2.14).

[4] Первоначальное предположение о том, что сахар находится в конформации C_2-эндо [993], оказалось ошибочным [855].

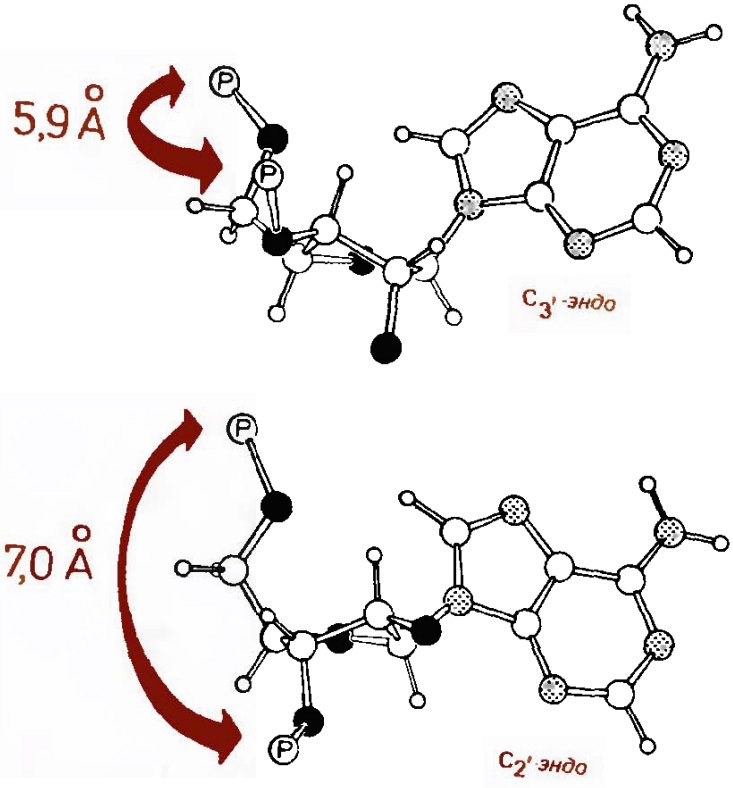


Рис. 9.3. Нуклеотиды в $C_{3'}$-*эндо*- (*вверху*) и $C_{2'}$-*эндо*-конформациях (*внизу*); эти конформации отвечают полинуклеотидным спиралям А- и В-типов [863].

семейства полинуклеотиды В-семейства, состоящего из В-, С- и D-форм, проявляют большее структурное разнообразие. Обусловлено это в основном особенностями макроскопической организации двойных спиралей А- и В-типа. Она остается практически неизменной при плавном раскручивании А-формы, приводящем к увеличению порядка спирали от 11 до 12, но заметно меняется при закручивании В-формы, уменьшающем порядок от 10 до 8. Это не означает, что закручивание или

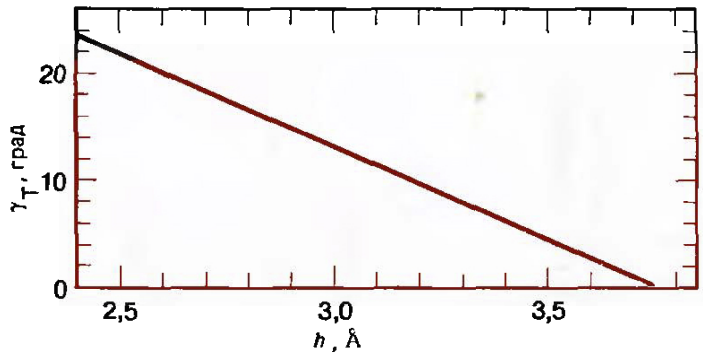


Рис. 9.4. Линейная зависимость расстояния h между нуклеотидами вдоль оси полинуклеотидной двойной спирали от угла γ_T между нормалью к плоскости данного основания и осью спирали [791].

Таблица 9.5. Сравнение структурных характеристик полинуклеотидных двойных спиралей А- и В-типов

Тип семейства	A	B
Конформация сахара	C_3-*эндо*	C_2-*эндо*
Расстояние между соседними фосфатами одной цепи	5,9 Å	7,0 Å
Смещение пары от оси спирали	4,4 ÷ 4,9 Å в сторону минорного желобка	− 0,2 ÷ − 1,8 Å в сторону главного желобка
Угол спирального вращения	30 ÷ 32,7°	36 ÷ 45°
Расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали	2,56 ÷ 3,29 Å	3,03 ÷ 3,37 Å
Угол наклона пары	Положительный, от 10 до 20,2°	Отрицательный, от − 5,9 до − 16,4°

раскручивание связано с определенной затратой энергии деформации. Речь идет о доминантном структурном признаке, которым, как мы сейчас увидим, являются боковое смещение пар относительно оси спирали и форма желобков на поверхности спирали.

Наличие глубокого и мелкого желобков и смещение пар от оси – макроскопические особенности, отличающие спирали А-типа от спиралей В-типа. Кроме конформации сахара и знака угла наклона пары спирали А- и В-типа различаются по величине параметра D, описывающего смещение пары от оси спирали (рис. 9.5). В В-ДНК ось спирали проходит через пару оснований ($D \sim -0{,}2$ Å), тогда как в D-ДНК она проходит вблизи минорного желобка ($D \sim -1{,}8$ Å). В А-ДНК ось попадает в главный желобок, и $D = 4{,}4–4{,}9$ Å. Из-за большого смещения пар от оси в двойных спиралях А-типа полинуклеотидные цепи обвивают ось, подобно ленте, оставляя внутри полый цилиндр с вандерваальсовым диаметром ~3,5 Å. Пары расположены по периферии спирали. Это приводит к образованию очень глубокого и узкого главного желобка и мелкого широкого минорного желобка (разд. 2.8, рис. 2.13 и табл. 9.2). В В- и С-ДНК ось спирали проходит через пары, поэтому желобки здесь менее выражены. Их глубина примерно одинакова, но ширина различается; главный желобок шире минорного. В D-ДНК, где ось спирали лежит в минорном желобке, желобки по глубине также почти не различаются и, поскольку спираль 8-го порядка закручена сильнее, чем В-ДНК, минорный желобок становится совсем узким, а главный – еще более широким и открытым.

С различными размерами желобков связана специфическая способность к комплексообразованию. Геометрия главного желобка в двойных спиралях А-типа зависит от угла наклона пар, а следовательно, и от расстояния h между остатками вдоль оси. Если это расстояние мало и составляет величину порядка 2,6 Å, спирали (А-ДНК и А-РНК) имеют глубокий и узкий главный желобок, доступный только молекулам воды и ионам металлов. При увеличении h до 3,29 Å главный желобок, оста-

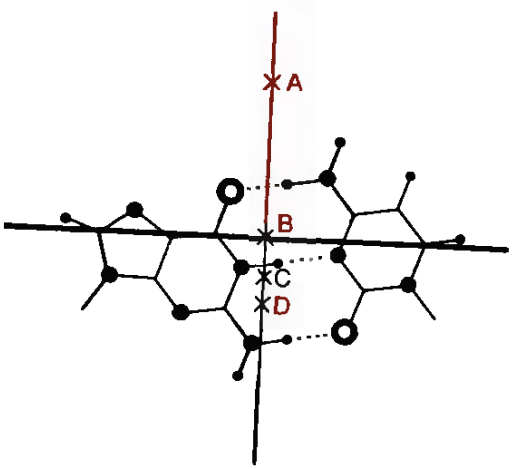


Рис. 9.5. Смещение оси спирали относительно пары оснований в A-, B-, C- и D-ДНК. Крестиками отмечены точки, в которых ось спирали данного типа пересекает плоскость пары.

ваясь таким же глубоким, раскрывается до такой степени, что в нем умещается еще одна полинуклеотидная цепь: мы встретимся с этим в разд. 10.2 при рассмотрении комплекса poly(U)·poly(A)·poly(U) и в разд. 11.3 при рассмотрении poly(dT)·poly(dA)·poly(dT). Что касается мелкого минорного желобка A-РНК, то для него была предложена модель связывания с полипептидным антипараллельным β-слоем: комплекс стабилизируется водородными связями между O_2'-H-гидроксильными группами остатков рибоз и атомами кислорода карбонильных групп полипептидной цепи [837]. Аналогичным образом для узкого минорного желобка B-ДНК была построена модель связывания с гистоном H2A; в этом случае комплекс стабилизируется водородными связями между пептидными NH-группами и O_3'-атомами полинуклеотида [838] (разд. 18.3).

Образование комплекса с ионом натрия в кристаллической структуре ApU, которая будет обсуждаться в разд. 10.4, свидетельствует о наличии специфического координационного связывания катиона в минорном желобке с атомами O_2 урацилов. В полимерных двухцепочечных нуклеиновых кислотах такого рода взаимодействия могли бы привести к зависимости структуры молекулы от вида катиона. По-видимому, именно по этой причине некоторые структурные модификации ДНК, приведенные в табл. 9.1, наблюдаются только в присутствии определенных катионов. С другой стороны, катионы взаимодействуют с фосфатными группами, и имеются данные, указывающие на определенную степень специфичности этого взаимодействия [839]. Например, в ряду щелочных металлов радиус катиона от Li^+ к Cs^+ увеличивается. Однако радиус *гидратированных* ионов уменьшается от 7,4 Å для Li^+ до 3,6 Å для Cs^+. Это означает, что Li^+ по своим размерам должен хорошо встраиваться в широкий минорный желобок B-ДНК, а Cs^+, расположенный на другом конце ряда,—в узкий минорный желобок D-ДНК; этот вывод согласуется с экспериментальными данными о «закручивающей» способности упомянутых ионов.

Распределение электростатического потенциала у поверхности молекул нуклеиновых кислот обеспечивает специфичность связывания. Во взаимо-

действии ДНК и РНК с другими молекулами важную роль играет не только стерическая комплементарность, но и комплементарность зарядов. Когда было рассчитано распределение электростатического потенциала для ряда олигомеров и полимеров ДНК в предположении, что противоионы Na^+ располагаются на биссектрисах PO_2^--групп, оказалось, что оно сильно зависит от нуклеотидной последовательности [839a]. В минорном желобке потенциал в местах расположения AT-пар отрицателен, так как и N_3-атомы аденина, и O_2-атомы тимидина несут частичный отрицательный заряд. У GC-пар потенциал близок к нулю, поскольку в данном случае отрицательный заряд атомов N_3 гуанина и O_2 цитозина уравновешен положительным зарядом N_2-аминогруппы гуанина. В области главного желобка потенциалы AT- и GC-пар также различаются. Для пары G—C схема расположения зарядов $+ - -$ у $N_7O_6\cdots HN_4$, а для пары C—G ($N_4H\cdots O_6N_7$) схема инвертирована: $- - +$. В то же время для A—T- и T—A-пар и для $N_7N_6H\cdots O_4$, и для $O_4\cdots HN_6N_7$ имеет место схема $- + -$. Это означает, что электростатический потенциал пар G—C и C—G различается, а для A—T и T—A он одинаков. Попытки рассчитать электростатический потенциал вблизи поверхности макромолекул были предприняты лишь недавно, и со временем такие расчеты послужат основой для выяснения природы межмолекулярных взаимодействий. Мы остановимся на вопросе об электростатическом потенциале позже, при обсуждении нуклеиново-белковых комплексов и гидратации нуклеиновых кислот (см. также [839b, c]).

Стэкинг в двойных спиралях A- и B-типа различается (рис. 9.6). В двойных спиралях B-типа стэкинг ограничен в основном взаимодействием между основаниями одной полинуклеотидной цепи (одноцепочечный стэкинг). В A-спиралях в стэкинге участвуют и основания, принадлежащие разным цепям (т.е. имеет место как *одно-*, так и *двух*цепочечный стэкинг). Это обусловлено двумя причинами. Во-первых, угол между соседними нуклеотидами в спиралях A-типа меньше ($30 \div 32{,}7°$), чем в спиралях B-типа ($36 \div 45°$), что благоприятствует образованию и одно-, и двухцепочечного стэкинга. Во-вторых, наклон пар, положительный в спиралях A-типа и отрицательный в спиралях B-типа, увеличивает перекрывание пар в первом случае и уменьшает во втором из-за того, что спирали правые. Все сказанное выше иллюстрирует рис. 9.6.

Нативная ДНК находится в B-форме. Порядок спирали B-ДНК равен в точности 10 только для кристаллического состояния и в растворе не сохраняется. В кристаллических волокнах на один виток молекулы ДНК, находящейся в B-форме, приходится 10 пар оснований, т.е. это целочисленная двойная спираль с симметрией 10_1 (табл. 9.1). Такая молекулярная структура связана с наличием кристаллической решетки [840] и практически не меняется даже в случае очень влажных волокон [841]. Однако, как только кристаллическая решетка разрушается и прямой контакт между спиралями исчезает, структурные ограничения, обусло-

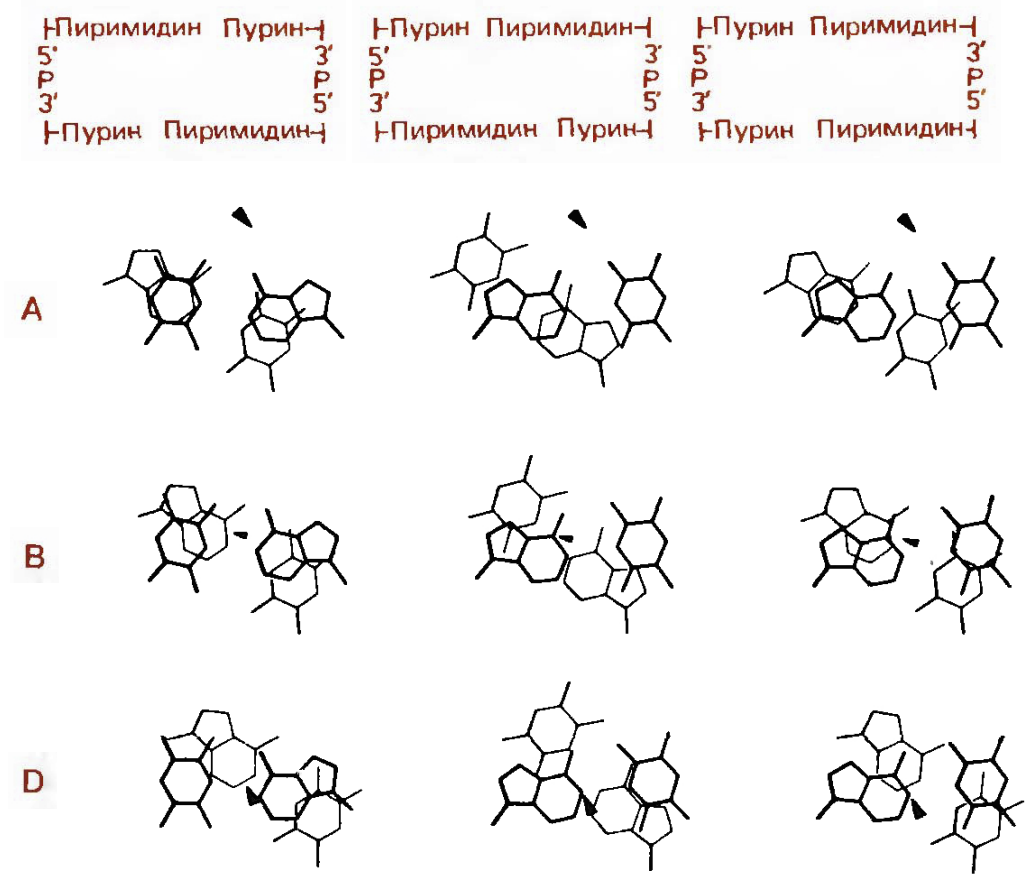


Рис. 9.6. Стэкинг оснований в двойных спиралях A- и B-типа [845]. *Сверху вниз*: A-, B- и D-ДНК. Показаны AT-пары в последовательностях: T—A над A—T, A—T над T—A и A—T над A—T. T—A над T—A – это то же самое, что A—T над A—T, если поменять местами верх и низ. Пары лежат в плоскости рисунка. Поскольку ось спирали не перпендикулярна плоскости пар, она проецируется на плоскость не в виде точки, а в виде стрелки, направленной от верхней пары оснований к нижней. Обратите внимание, что в A- и D-ДНК стрелки направлены в противоположные стороны, поскольку в первом случае угол наклона пары θ_T положителен, а во втором отрицателен. Оси B-ДНК отвечает самая маленькая стрелка, потому что у этой ДНК угол наклона пар мал. Стэкинг оснований в C-ДНК занимает промежуточное положение между стэкингом в B- и D-ДНК.

вленные кристаллической упаковкой, устраняются, и молекула ДНК немного раскручивается, что приводит к увеличению числа пар оснований на виток до 10,3 ÷ 10.6. О справедливости такой оценки свидетельствуют результаты рентгеноструктурного анализа додекануклеотида (разд. 11.2), который кристаллизуется так, что в независимой части ячейки присутствует полный виток ДНК B-типа [464]. На это же указывают данные по рассеянию рентгеновских лучей под большими углами [462], по ферментативному гидролизу [463], круговому дихроизму [835], а также теоретические расчеты [836].

Поскольку в волокнах при высокой влажности и в водных растворах ДНК находится в B-форме, принято считать, что именно эта форма отвечает состоянию нативной ДНК в клетке. Как будет показано в гл. 19,

ДНК имеет такую же молекулярную структуру и тогда, когда она намотана на гистоновый кор нуклеосом.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В этой главе описаны основные структурные свойства двухцепочечных спиралей нуклеиновых кислот. Показано, что конформационные возможности двойных спиралей РНК ограничены образованием двух близких форм, A и A′, тогда как двойная спираль ДНК подвергается различным структурным перестройкам, приводящим к появлению целого ряда форм: правых спиралей A, B, C и D и левой Z (гл. 12). Структура молекулы ДНК определяется в основном окружением (присутствием солей, спирта), но определенную роль играют также последовательность оснований и нуклеотидный состав. Правые спирали образуют два семейства: A (конформация сахарных остатков C_3,-*эндо*) и B (конформация сахарных остатков C_2,-*эндо*); B-семейство включает также C- и D-ДНК. Различие в конформации сахарных остатков приводит к неодинаковым геометрическим характеристикам двойных спиралей: разному смещению пар относительно оси спирали, углу наклона пар и размерам минорного и главного желобков.

ГЛАВА **10**

Структура РНК

В зависимости от биологической функции природные РНК либо представляют собой протяженную двойную спираль, либо имеют глобулярную структуру, в которой короткие двухцепочечные фрагменты образуются при сворачивании в глобулу одной цепи. Во многих случаях образование двухцепочечных участков можно предсказать, исходя из нуклеотидной последовательности молекулы; для этого были разработаны специальные компьютерные алгоритмы [864].

Короткие двойные спирали обнаружены в тРНК (гл. 15), в рибосомных РНК [865–868], в генах, кодирующих белки оболочки бактериофагов MS2 [869] и R17 [870], в глобиновой мРНК, а также в других мРНК [872].

Четкую спиральную структуру имеют РНК вируса карликовости риса [873], реовирусная РНК [874–877], РНК вируса раневых опухолей [878] и биосинтетические полинуклеотидные комплексы [852, 853, 878]. В волокнах реовирусная РНК может находиться в двух структурных формах, α и β, основное различие между которыми касается не молекулярной структуры, а кристаллической упаковки [874–877]. Синтетические гомополимеры poly(A)·poly(U) и poly(I)·poly(C) кристаллизуются так же, как β-РНК реовируса, т.е. по своей структуре они похожи на природную РНК [852, 853]. Как описано в разд. 10.2, гомополимер poly(A)·poly(U) и его аналог poly(A)·poly(I), содержащий одни только пурины, с повышением концентрации соли перегруппировываются и образуют трехцепочечные спирали, в которых наряду с уотсон-криковским осуществляется и хугстеновское спаривание оснований [853, 880–881]. Если в этих гомополимерных комплексах в положение 2 аденина ввести в качестве заместителя более объемную группировку, то будут образовываться двойные спирали, в которых наблюдается только хугстеновское спаривание оснований. Тем не менее во всех перечисленных примерах мы имеем дело только с полинуклеотидными цепями А-семейства.

В этом проявляется удивительный структурный консерватизм молекул РНК.

10.1. ДВОЙНЫЕ СПИРАЛИ А-РНК И А′-РНК СХОДНЫ МЕЖДУ СОБОЙ

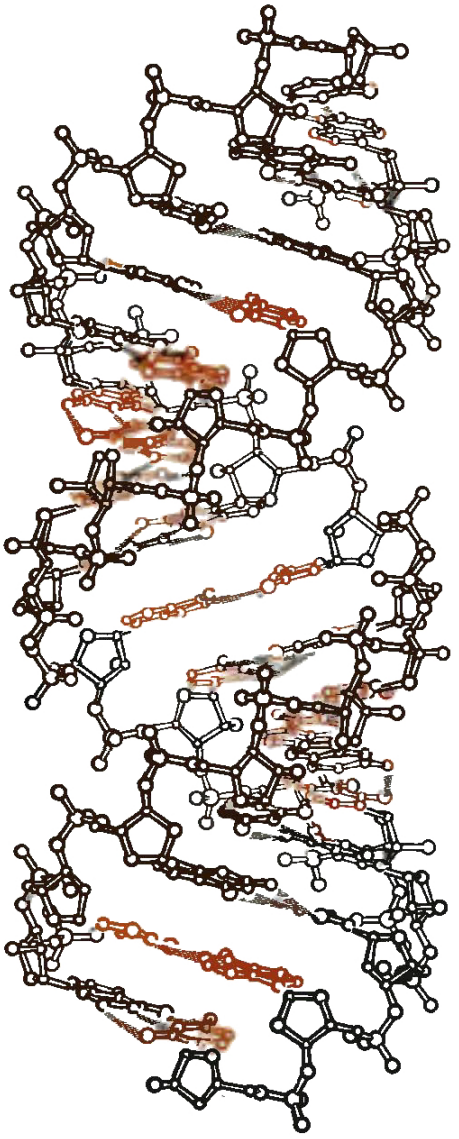
В зависимости от концентрации соли в среде двойные спирали РНК находятся в одной из двух структурно близких форм. При низкой ионной силе преобладает двойная спираль А-РНК с 11 парами оснований на виток. Если концентрацию соли увеличить до 20%-ного избытка, то А-РНК перейдет в А′-РНК, у которой на виток приходится 12 пар оснований. Кроме того, высказывались предположения о наличии третьего типа конформации – нецелочисленной двойной спирали с числом пар на виток $11{,}3 \pm 0{,}5$; однако этот вопрос пока детально не исследован [879].

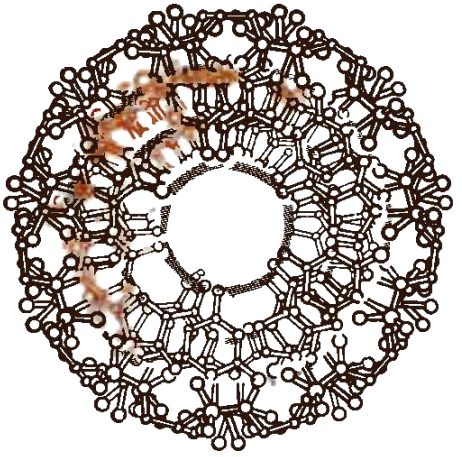
В 60-х годах считалось, что А-РНК – это двойная спираль 10-го порядка [92, 876]. Впоследствии более тщательные исследования показали, что на самом деле она представляет собой спираль 11-го порядка. Это подтвердили и последние рентгеноструктурные исследования волокон А-РНК. Геометрические детали структуры А-РНК были установлены при изучении синтетических полинуклеотидов poly(A)·poly(U) и poly(I)·poly(C), а параметры структуры А′-РНК – при изучении комплекса poly(I)·poly(C) в присутствии более высокой концентрации соли (табл. 9.3) [851, 852].

А- и А′-РНК обладают особенностями, характерными для структур с уотсон-криковским спариванием оснований. Полинуклеотидные цепи антипараллельны и образуют правую двойную спираль. Пары оснований смещены относительно оси спирали на 4,4 Å, поэтому главный желобок получается очень глубоким, а минорный – мелким (гл. 9). Основное различие между А- и А′-РНК заключается в неодинаковом шаге спирали: для А-РНК он равен 30 Å, для А′-РНК – 36 Å. Шаг спирали коррелирует с числом нуклеотидов на виток: 11 у А-РНК и 12 у А′-РНК. У А-РНК расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали меньше ($2{,}73 \div 2{,}81$ Å), чем у А′-РНК (3 Å). Это различие отражается на величине угла наклона пары, который равен $16 \div 19°$ для А-РНК и 10° для А′-РНК. В остальном конформация нуклеотидов в составе А- и А′-РНК одинакова, что видно из величин торсионных углов (табл. 9.3) и из рис. 10.1 и 10.2.

10.2. В ТРОЙНЫХ СПИРАЛЯХ РНК ОДНОВРЕМЕННО ОБРАЗУЮТСЯ УОТСОН-КРИКОВСКИЕ И ХУГСТЕНОВСКИЕ ПАРЫ

Перегруппировка цепей гомополимерных гетеродуплексов приводит к образованию трехцепочечных спиралей. При увеличении концентрации соли в комплексах poly(A)·poly(U) и poly(I)·poly(C) происходит структурный переход А-РНК $\rightleftarrows$ А′-РНК [848]. При этом poly(I)·poly(C) сохраняет конфигурацию А′-РНК, а цепи poly(A)·poly(U) перегруппировываются, образуя тройную спираль poly(U)·poly(A)·poly(U) и одиночную цепь poly(A) [880, 881]. Это происходит из-за того, что гетероцикл аденина способен образовывать одновременно уотсон-криковскую





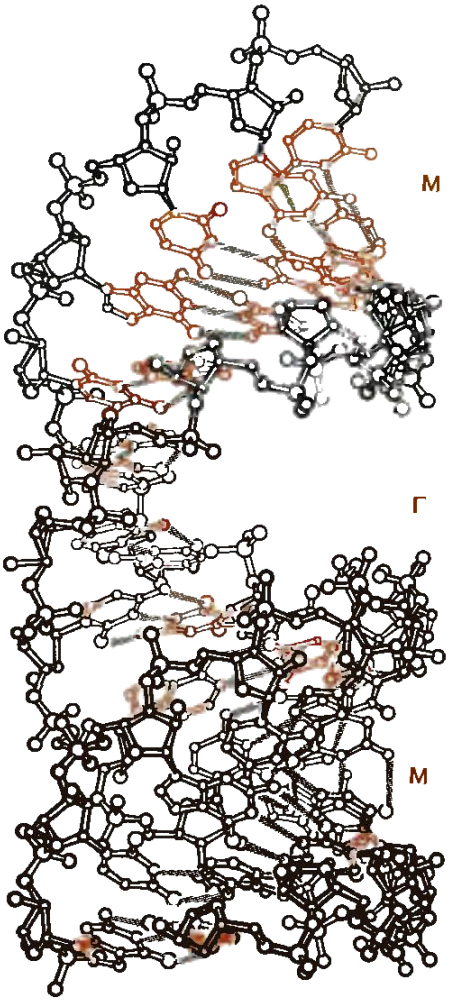
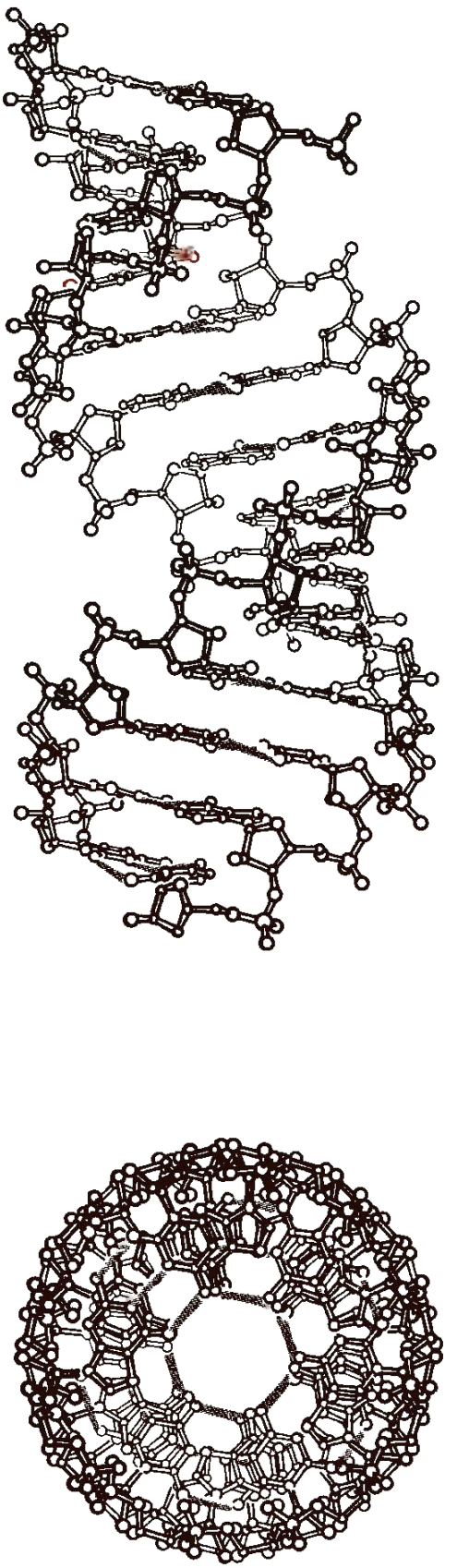
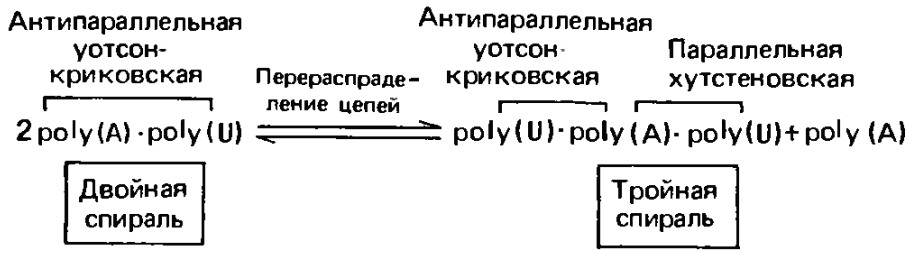


Рис. 10.1. Молекулярная структура А-РНК, построенная с помощью компьютерной программы SCHAKAL [1376] по координатам атомов, приведенным в работе [848]. Размеры кружков отражают радиус соответствующих атомов и увеличиваются в ряду C, N, O; атомы водорода не указаны. Сахарофосфатный остов изображен черным цветом, основания – коричневым, водородные связи в спаренных основаниях – серым. Масштаб: 1 см = 5 Å. Части молекулы, расположенные ближе к наблюдателю, изображены жирными линиями. *Слева*: вид сбоку и вдоль оси спирали. *Справа*: двойная спираль наклонена на угол 32°, чтобы показать, насколько главный желобок (Г) глубже минорного (М).

Рис. 10.2. Структура A′-РНК, построенная по координатам атомов, приведенным в работе [848] (подробности см. в подписи к рис. 10.1).



и хугстеновскую пары (рис. 6.7):



Тройной комплекс включает в себя антипараллельную двойную спираль poly(A)·poly(U) с уотсон-криковскими парами оснований, которая аналогична A′-РНК при относительной влажности 92% и переходит в А-форму при относительной влажности 75%. Еще одна цепь poly(U) встраивается в глубокий главный желобок двойной спирали и образует хугстеновские пары с N_7 и N_6H цепи poly(A). При этом цепи хугстеновской двойной спирали poly(A)·poly(U) параллельны друг другу (рис. 11.8).

У гипоксантина положение функциональных карбонильных и иминогрупп такое же, как и у урацила, поэтому нет ничего удивительного в том, что у тройного комплекса poly(U)·poly(A)·poly(U) имеется полностью пуриновый аналог – poly(I)·poly(A)·poly(I) [853], в котором также представлены и хугстеновские, и уотсон-криковские «качающиеся» пары (рис. 6.7). Продольный размер пары AI уотсон-криковского типа с расстоянием $C_{1'}\cdots C_{1'}$, равным 13 Å, существенно больше, чем у хугстеновской; у последней это расстояние равно 10,8 Å, что сравнимо с характерной для обычной уотсон-криковской пары величиной.

Все цепи в тройных спиралях имеют почти одинаковую конформацию. Во всех трехцепочечных спиралях наклон уотсон-криковских и хугстеновских пар оснований примерно одинаков и значительно меньше ($7 \div 13°$), чем наклон пар в двойных спиралях А-РНК ($16 \div 19°$). Вследствие этого расстояние *h* между нуклеотидами вдоль оси спирали увеличивается до ~ 3 Å (рис. 9.4), глубокий главный желобок становится более открытым, и в нем может поместиться еще одна полинуклеотидная цепь. Одновременно с этим смещение пар от оси спирали уменьшается от 4,4 Å (для двойной спирали А-РНК) до 2,8 Å [для трехцепочечной спирали poly(U)·poly(A)·poly(U)]. Это обусловлено присутствием третьей цепи – ее можно подогнать под уотсон-криковскую двойную спираль с разумной геометрией только в том случае, если ось спирали будет проходить через «центр» триплета оснований, располагаясь одинаковым образом по отношению ко всем трем гликозидным связям $C_{1'}$—N. Это в свою очередь приводит к тому, что все нуклеотиды имеют одинаковую конформацию, о чем свидетельствуют значения торсионных углов (табл. 9.3).

Poly(I)·poly(C) – сильнодействующий агент, который индуцирует образование интерферона. Именно в таком качестве его использовали при ле-

чении инфекционных заболеваний, вызванных вирусом простого герпеса [882]. Структурно изоморфный полинуклеотидный комплекс poly(A)·poly(U) значительно менее эффективен в этом отношении [883], по-видимому, из-за того, что в ионных условиях, характерных для тканей живых организмов, происходит перегруппировка цепей и комплекс находится не в виде двойной спирали.

10.3. ДВОЙНАЯ СПИРАЛЬ С ПАРАЛЛЕЛЬНЫМИ ЦЕПЯМИ И ХУГСТЕНОВСКИМИ ПАРАМИ, ОБРАЗОВАННАЯ POLY(U) И 2-ЗАМЕЩЕННЫМ POLY(A)

Если уотсон-криковское спаривание стерически затруднено, может образоваться хугстеновский комплекс poly(A)·2poly(U). При рассмотрении тройных спиралей типа poly(A)·2poly(U) возникает вопрос, нельзя ли отделить цепь poly(U), образующую уотсон-криковские пары с poly(A), сохранив при этом двойную спираль с хугстеновскими парами и параллельной ориентацией цепей? Действительно, такие двойные спирали были обнаружены, но не в случае обычных poly(A) и poly(U), а тогда, когда в положение 2 остатков аденина в poly(A) введены метил-, метилтио-, этилтио- или диметиламиногруппы, т. е. объемные группировки, затрудняющие уотсон-криковское спаривание оснований.

Двойные спирали хугстеновского типа с неэквивалентными параллельными цепями. Физические свойства и структурные характеристики двойных спиралей с 2-замещенной цепью poly(A) исследовались спектроскопическими методами [884–886] и методом рентгеновской дифракции на волокнах [887]. Такие спирали термодинамически менее устойчивы, чем их аналоги с обычной цепью poly(A). «Размытая» рентгенограмма волокна poly(2-метилтио-A)·poly(U) была проинтерпретирована как результат дифракции на двойной спирали хугстеновского типа с высотой витка 31,6 Å, 10 парами оснований на виток и углом наклона пар $\sim 10°$. Интересно, что две полинуклеотидные цепи этой спирали конформационно неэквивалентны: сахарные остатки poly(ms^2A) имеют конформацию $C_{3'}$-*эндо*, а у poly(U) они находятся в $C_{3'}$-*эндо*—$C_{2'}$-*экзо*-конформации. Однако обе конформации относятся к одному классу $C_{3'}$-*эндо*, поэтому данная спираль принадлежит A-семейству (табл. 9.2 и 9.3).

Описанная спиральная структура стабилизируется главным образом благодаря стэкингу оснований (рис. 10.3), при этом 2-метилтиогруппа «верхней» пары располагается над атомом N_3 аденина «нижней» пары. Такие взаимодействия S···N, по-видимому, существенно увеличивают термостабильность спирали: ее температура плавления T_m выше, чем у тех полинуклеотидных аналогов, которые не содержат атомов серы в положении 2. Как отмечается в разд. 13.5, аномальная термостабильность двойной спирали poly(s^2U), у которой T_m на 57° выше, чем у спирали poly(U) с незамещенными урацилами, также обусловлена взаимодействием S···N.

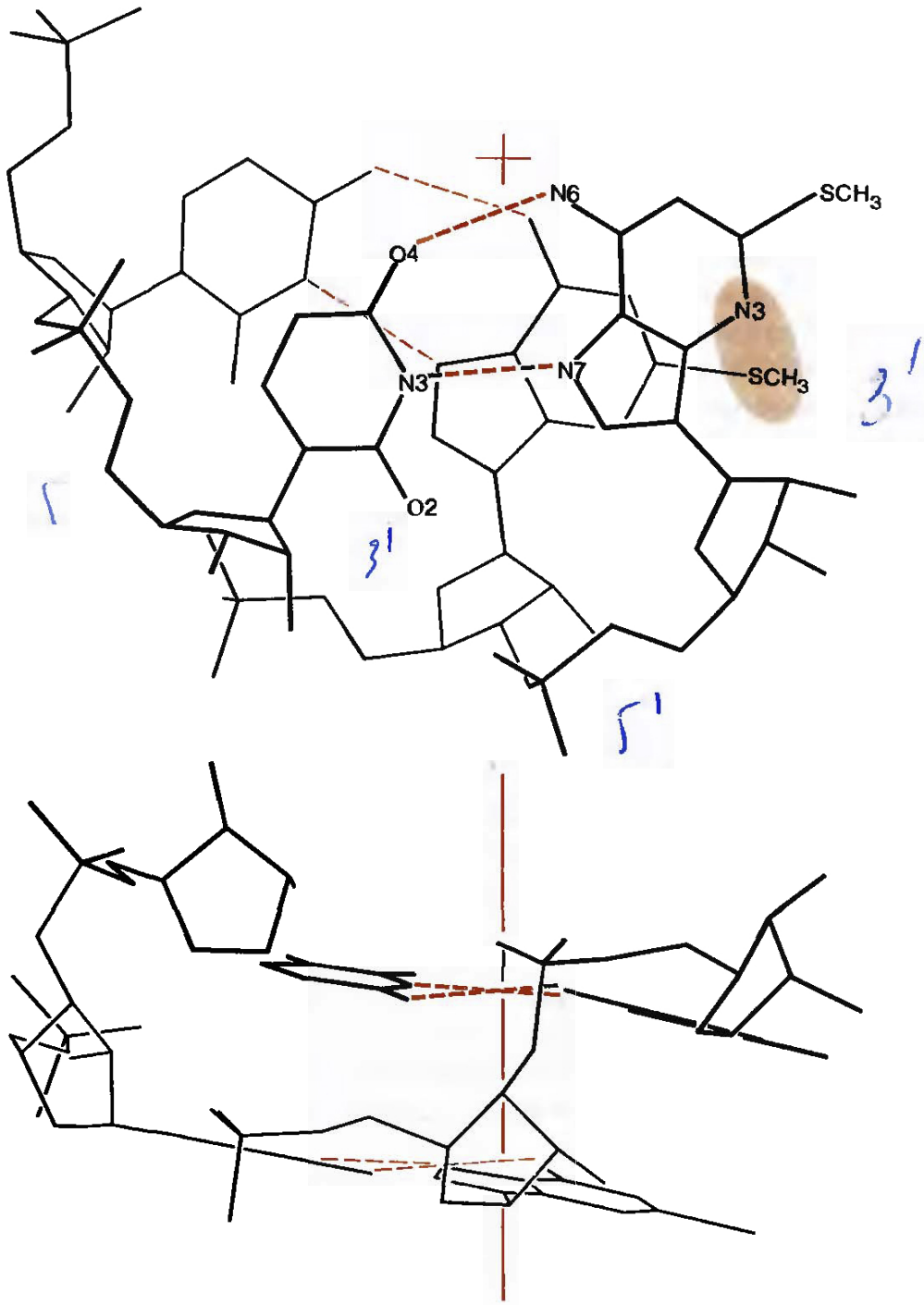


Рис. 10.3. Проекции хугстеновской двойной спирали poly(2-метилтио-A)·poly(U) на плоскости, параллельные и перпендикулярные оси спирали [887]. Части молекулы, расположенные ближе к наблюдателю, изображены жирными линиями. Обратите внимание на стэкинг-взаимодействие $S\cdots N_3$ между соседними остатками аденина (цветной овал); это взаимодействие, по-видимому, стабилизирует структуру данного комплекса.

10.4. ДВОЙНЫЕ МИНИ-СПИРАЛИ, ОБРАЗОВАННЫЕ ApU И GpC

Самокомплементарные динуклеозидмонофосфаты ApU и GpC кристаллизуются из водных растворов в виде натриевой соли [465, 466]. Кроме того, ApU можно получить в виде аммонийной соли [888], а GpC – в виде кальциевой [889]. Во всех случаях образуются мини-дуплексы со структурными параметрами, характерными для А-РНК (рис. 10.4).

Дуплексы ApU и GpC проявляют все основные структурные свойства двойной спирали А-РНК. Как в кристаллах ApU, так и в кристаллах GpC образуются пары оснований уотсон-криковского типа. В случае GpC это не удивительно: с аналогичной ситуацией мы встречались в кристаллах мономерных GC-пар. Но, как мы видели в гл. 6, при сокристаллизации мономерных производных аденина и урацила происходит только хугстеновское спаривание (структуры XXIII или XXIV на рис. 6.1). Однако в случае ApU конформация сахарофосфатного остова и в особенности стэкинг-взаимодействие налагают определенные ограничения на структуру молекулы, и это приводит к образованию исключительно уотсон-криковских пар.

Общие конформационные характеристики обоих динуклеозидмонофосфатов сходны с таковыми для А- и А′-РНК (табл. 9.3). Оба дуплекса, ApU и GpC, представляют собой лишь две «ступеньки» двойной спирали РНК, а «бесконечные» спирали, структура которых описана в табл. 10.1, были получены путем математической экстраполяции [890]. Структурные параметры синтетических ApU- и GpC-спиралей характерны для двойных спиралей А-, но не В-семейства. Это означает, что архитектура двойных спиралей полинуклеотидов определяется микроскопическими конформационными свойствами отдельных моно- и динуклеозидфосфатов и их взаимодействием, а не общими свойствами всей системы.

Молекулы ApU и GpC в кристаллах сильно гидратированы, так что кристаллы напоминают концентрированные водные растворы. Это позволяет предположить, что обнаруженные структурные свойства не являются следствием «упаковочных» эффектов и сохраняются также в случае водных растворов. В связи с этим интересно отметить, что в натриевой соли GpC через димер проходит кристаллографическая ось 2-го порядка, которая связывает между собой две молекулы GpC одного и того же дуплекса (рис. 10.4), точно так же, как, согласно рентгеновской дифракции на волокнах, ось симметрии в двойных спиралях ДНК и РНК связывает разные цепи одной молекулы. В других кристаллических структурах GpC и ApU кристаллографическая ось 2-го порядка отсутствует, однако имеется псевдоось, которая точно так же связывает две молекулы одного дуплекса, и отклонение от идеальной (кристаллографической) симметрии весьма незначительно.

Схема координационных связей иона натрия с ApU свидетельствует о специфичности связывания натрия. В натриевой соли ApU один из двух присутствующих в структуре ионов натрия находится на псевдооси 2-го

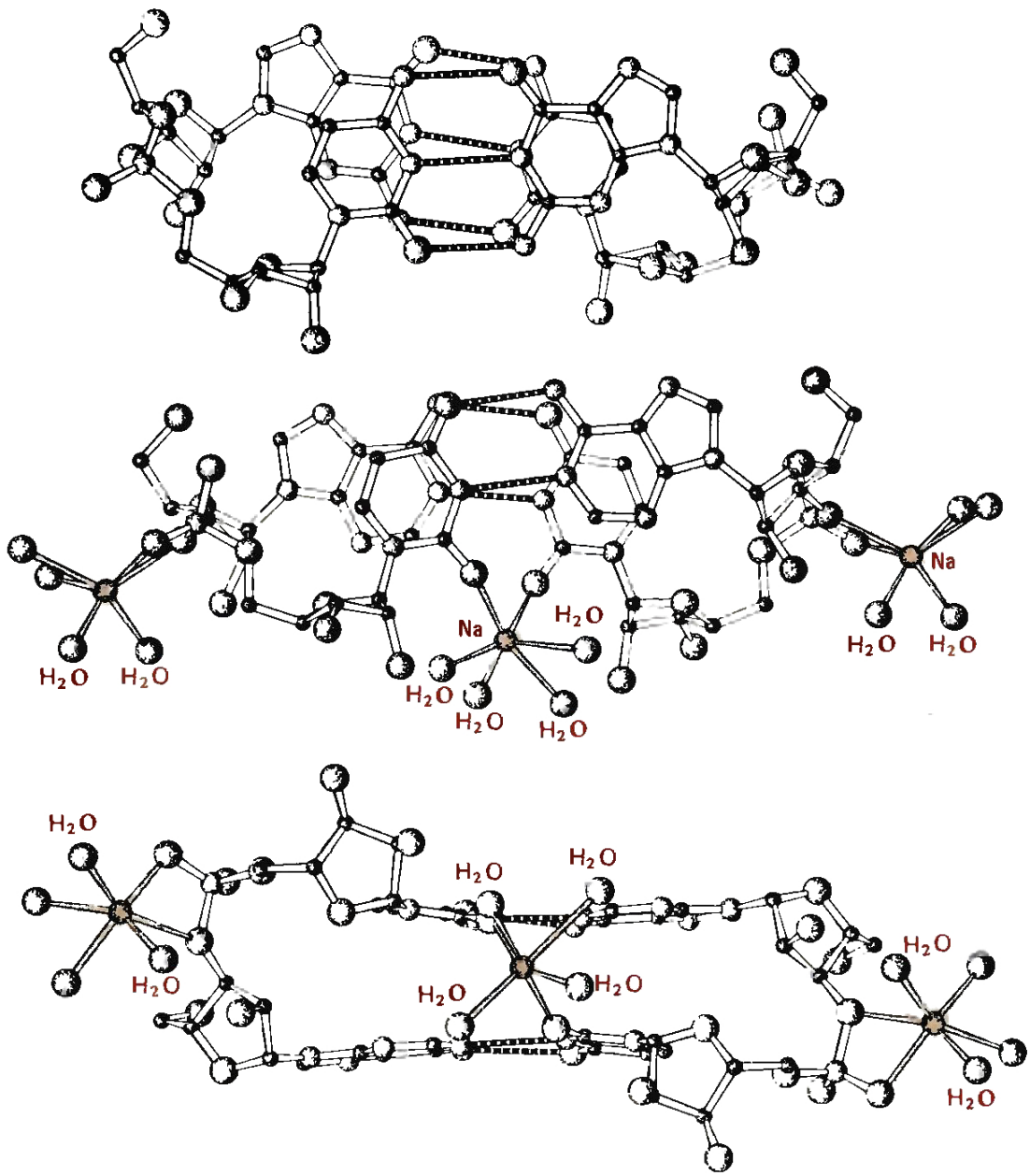


Рис. 10.4. Молекулярная структура динуклеозидфосфатов GpC и ApU, полученная методом рентгеноструктурного анализа монокристаллов. В комплексе GpC (*вверху*) две молекулы связаны кристаллографической осью 2-го порядка, в ApU (*в середине и внизу*, две разные проекции) – псевдоосью 2-го порядка. Цветом выделены ионы натрия и координационные связи Na^+ с атомами O_2 кетогрупп, атомами кислорода фосфатов и молекулами воды. Один из двух ионов натрия в ApU образует координационные связи с атомами кислорода двух остатков урацила и иллюстрирует специфическое связывание катиона с нуклеиновой кислотой. Структуры построены по координатам атомов, взятым из работ [465, 466]; атомы водорода и молекулы свободной воды не изображены, чтобы не загромождать рисунок.

Таблица 10.1. Сравнение параметров двойных спиралей А- и В-типа с параметрами, рассчитанными для «бесконечных» ApU- и GpC-спиралей [890]

	ApU	GpC	А-РНК	А′-РНК	А-ДНК	В-ДНК
Трансляция, Å	2,36	2,59	2,81	3,0	2,59	3,38
Вращение, град	30,2	34,7	32,7	30,0	32,7	36,0
Шаг, А	28,1	26,9	30,9	36,0	28,5	33,8
Число остатков на виток	11,9	10,4	11,0	12,0	11,0	10,0
Наклон оснований, град	23	28	13	14	19	– 6

порядка и образует координационные связи с атомами O_2 кетогрупп обоих остатков урацила, расположенными в минорном желобке. Остальные положения в октаэдрической координационной системе натрия заняты четырьмя молекулами воды (рис. 10.4). Лигандами другого иона натрия являются молекулы воды и атомы кислорода фосфатных групп, причем, когда в кристаллической структуре GpC этот ион заменен на ион кальция, лиганды не меняются.

Специфичность координационного связывания иона натрия с остатками урацила в ApU-дуплексе обусловлена тем, что в данном случае расстояние между атомами O_2 составляет всего 4 Å, т.е. является идеальным для образования системы двух связей $Na^+ \cdots -O$ с симметрией 2-го порядка. Для сравнения укажем, что в изоморфном дуплексе UpA расстояние $O_2 \cdots O_2$ было бы равно ~ 8 Å, а что касается последовательностей GpC и CpG, то у них связыванию катиона с атомами O_2 цитозинов мешала бы аминогруппа гуанина [465].

Специфические взаимодействия катионов с основаниями, подобные тем, которые обнаружены в натриевой соли ApU, потенциально важны для нуклеиново-белкового узнавания. Можно предположить, что они изменяют локальную структуру двойной спирали и влияют на общую конфигурацию молекулы, особенно в случае ДНК (табл. 9.1).

10.5. ПОВОРОТЫ И ИЗГИБЫ В СТРУКТУРЕ UpAH$^+$

UpA, как и ApU, представляет собой самокомплементарный динуклеозидфосфат, который в принципе мог бы образовывать мини-спираль уотсон-криковского типа. Однако при кристаллизации из кислых растворов (10^{-3} М HCl) происходит протонирование аденина в положении N_1, что приводит к появлению цвиттериона $Up^- AH^+$, который не может образовывать уотсон-криковские пары. Вместо мини-спирали элементарная ячейка содержит две кристаллографически независимые и различные молекулы динуклеозидфосфата А и В, причем обе они имеют неспиральную конфигурацию [317, 318, 891].

Стандартная геометрия нуклеозидов и неспиральные углы вращения вокруг связей Р—О. В обеих молекулах UpAH$^+$ (рис. 10.5) нуклеозиды

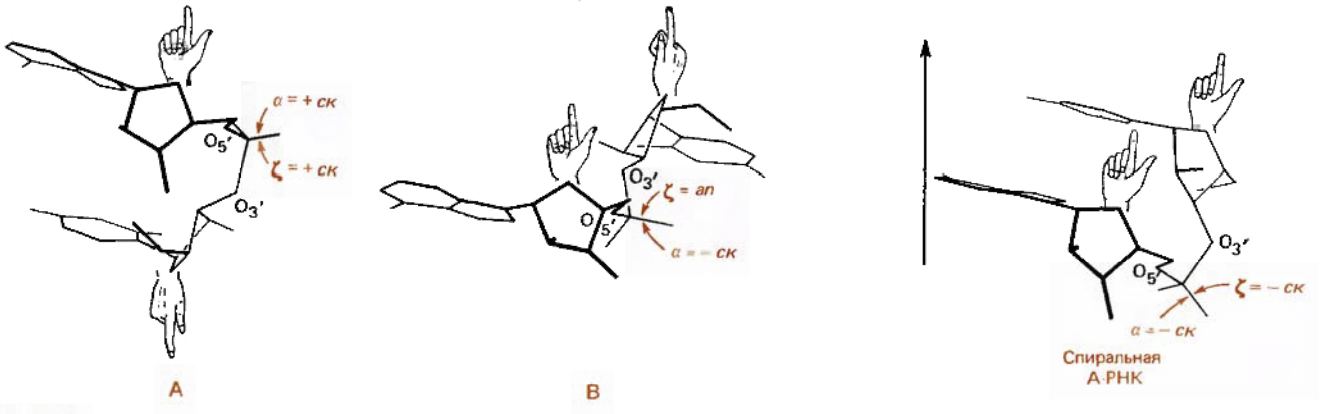


Рис. 10.5. Относительная ориентация нуклеозидов в молекулах A и B $UpAH^+$ (*слева*) и в A-РНК (*справа*; стрелкой показана ось спирали) [891]. Чтобы указать ориентацию рибозы, вместо атома кислорода O_4' нарисованы руки. Обратите внимание на противоположное направление рук (резкий поворот) в молекуле A и параллельные, но по-разному повернутые относительно вертикальной оси руки в молекуле B. Поворот уридина в соответствующем направлении (см. рис.) на угол 110° переводит молекулу B в спиральную форму. Молекула B $UpAH^+$ изображена на рис. 4.20.

имеют стандартную конформацию: основания находятся в *анти*-ориентации, сахара – в $C_{3'}$-*эндо*-конформации и угол γ относительно связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ лежит в области $+ск$, т.е. нуклеозиды имеют такую геометрию, которая стабилизируется короткими водородными связями типа $C—H\cdots O_{5'}$ (рис. 4.20). Однако значения торсионных углов α и ζ относительно связей P—O у молекул A и B различаются. У молекулы A оба угла находятся в области $+ск$, поэтому два сахарных остатка смотрят в противоположные стороны (рис. 10.5). В молекуле B угол α лежит в типичной для спиральной конформации области $-ск$, а угол ζ – в области *ап*, т.е. отличается от «спирального» на 110°. Как показано в разд. 15.4, первая структура представляет собой π_1-поворот, обнаруженный в некоторых петлях тРНК, для которых характерны резкие изменения в направлении полинуклеотидной цепи. Вторую структуру правильнее назвать неспиральным изгибом.

Межмолекулярные контакты «основание – основание» и «основание — сахар». В молекулах $UpAH^+$ угы вращения вокруг связей P—O таковы, что не позволяют основаниям сблизиться на расстояния, достаточные для образования *внутри*молекулярного стэкинга, поэтому появляется *меж*молекулярный стэкинг между аденином и урацилом. Кроме того, каждое основание взаимодействует с атомом $O_{4'}$ ближайшей рибозы. Это характерное взаимодействие было ранее обнаружено в кристаллических структурах некоторых нуклеозидов (рис. 6.8). Оно реализуется также в левых двойных спиралях (гл. 12). Дополнительно к этим «вертикальным» взаимодействиям основания образуют «горизонтальные» связи в парах $AH^+ \cdot AH^+$ и $U \cdot U$ (структуры II и XVI на рис. 6.1).

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В синтетических комплементарных дуплексах РНК и в различных природных РНК, таких, как тРНК, рибосомные РНК, РНК некоторых вирусов и мРНК, образуются структурно близкие уотсон-криковские двойные спирали A- и A′-РНК. A-РНК – это двойная спираль 11-го порядка, тогда как A′-РНК – форма, наблюдающаяся при высоких концентрациях соли, – спираль 12-го порядка. В обоих случаях сахарные остатки в цепи имеют конформацию $C_{3'}$-*эндо*, следовательно, обе спирали принадлежат A-семейству. В случае poly(A)·poly(U) может происходить перегруппировка цепей, приводящая к образованию тройной спирали poly(A)·2poly(U), в которой одновременно с уотсон-криковскими присутствуют хугстеновские пары. Хугстеновские пары оснований обнаружены также в комплексе poly(U)·poly(2-метилтио-A). Самокомплементарные динуклеозидмонофосфаты ApU и GpC образуют двойные мини-спирали, тогда как динуклеозидфосфат $UpAH^+$ не может образовывать уотсон-криковского дуплекса. В необычной изогнутой структуре $UpAH^+$ индивидуальные нуклеотиды находятся в «стандартной» конформации, но торсионные углы α и ζ относительно связей P—O отличаются от спиральных.

ГЛАВА **11**

Структура ДНК

РНК может находиться только в двух близких конформациях: A и A′, причем обе они принадлежат A-семейству двойных спиралей (гл. 10). Напротив, ДНК в зависимости от окружающих условий (природы противоиона и относительной влажности), а также в зависимости от нуклеотидной последовательности и нуклеотидного состава в случае синтетических полинуклеотидов из повторяющихся блоков может принимать и другие конформации (гл. 9). Двойные спирали ДНК относятся либо к A-типу, где единственной представительницей является A-ДНК, либо к B-типу, который включает B-, B′-, C-, C′-, C″-, D-, E- и T-ДНК. Все перечисленные спирали являются правыми. Кроме того, было открыто семейство левых спиралей (Z-ДНК), и это еще раз подчеркивает «хамелеоновскую» природу ДНК, ее способность к адаптации.

A, B, C и D – традиционные полиморфные модификации ДНК. Как следует из гл. 9 (табл. 9.1 и 9.2), методом дифракции рентгеновских лучей на волокнах обнаруживаются и другие формы, но все они представляют собой незначительные модификации четырех основных структур.

Интересно поведение ДНК, выделенной из фага T2, в которой цитозин замещен на 5-гидроксиметилцитозин, на 70% гликозилированный и еще на 5% дигликозилированный (схема 11.1). При высокой относительной влажности эта ДНК находится в B-форме. При понижении влажности она, минуя стадию образования A-формы, непосредственно переходит в T-форму [858] – D-подобную двойную спираль с симметрией 8_1. Это напоминает поведение синтетических ДНК, у которых гуанозин замещен на инозин [824]. Если удалить гликозидные остатки, ДНК фага T2 становится похожей на обычную ДНК и в зависимости от окружающих условий находится в A-, B- или C-форме (ниже мы остановимся на этих формах подробнее).

Для структуры двойных спиралей ДНК характерны систематические, зависящие от последовательности модуляции; правила Калладина. В олиго- и полинуклеотидных двойных спиралях угол пропеллера пар положителен, т. е. если смотреть вдоль длинной оси пары, ближнее основание повернуто по часовой стрелке относительно дальнего (рис. 2.14, *A*). Теоретические расчеты [836] показывают, что наличие пропеллера облегчает стэкинг-взаимодействие оснований вдоль оси двойной спира-

ли. Однако, как показал Калладин [892а], это приводит также к столкновению соседних пуринов в противоположных полинуклеотидных цепях. Под столкновением в данном случае подразумевается возникновение стерически недопустимых контактов между атомами O_6 гуанина и N_6 аденина в главном желобке, если речь идет о последовательности пурин—(3′, 5′)—пиримидин, и между атомами N_3, N_2 гуанина и N_3 аденина в минорном желобке для последовательности пиримидин—(3′, 5′)—пурин (рис. 11.1); при этом контакты в минорном желобке почти вдвое более невыгодны, чем контакты в главном желобке. Стерически невыгодные контакты возникают главным образом в смешанных пурин-пиримидиновых последовательностях, тогда как в гомопуриновых или гомопиримидиновых последовательностях они практически отсутствуют.

Указанных столкновений можно избежать, если осуществить любую комбинацию из четырех перечисленных ниже операций.

1. Локально уменьшить угол пропеллера пар оснований.
2. Изменить углы крена пар θ_R так, чтобы уменьшить невыгодный контакт, т. е. сильнее «открыть» пары (рис. 11.1, *А*).
3. Сдвинуть пару оснований параллельно ее длинной оси и «вытянуть» пурин из спиральной стопки (рис. 11.1, *Б*).
4. Уменьшить угол спирального вращения, чтобы минимизировать невыгодные взаимодействия (рис. 11.1, *В*).

Эти правила были сформулированы в результате анализа кристаллической структуры В-додекамера, описанной в разд. 11.2. Операции 1, 2 и 4 приводят к изменениям углов спирального вращения (t), пропеллера (θ_P) и крена (θ_R) пары (см. рис. 2.14). Стратегия операции 3 связана с изменением торсионного угла δ, описывающего конформацию сахара (см. также разд. 11.2, где рассматривается антикорреляционный принцип).

В случае А-ДНК возникает иная ситуация. Здесь, в отличие от В-ДНК, ось спирали не проходит через пару оснований, а располагается в главном желобке. Кроме того, пары наклонены примерно на 20°. Следовательно, стерически недопустимые контакты между соседними пуринами противоположных цепей будут возникать только в минорном желобке для последовательностей пиримидин—(3′, 5′)—пурин (рис. 9.6); в области главного желобка таких контактов, очевидно, не будет.

11.1. А-ДНК, ЕДИНСТВЕННАЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЬНИЦА А-СЕМЕЙСТВА. ТРИ КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДА А-ТИПА: *d*(*CCGG*), *d*(*GGTATACC*) И *d*(*GGCCGGCC*)

Конформация А-ДНК близка к конформации А-РНК (табл. 9.3) [892]. И в том и в другом случае на виток спирали приходится 11 пар оснований. Однако расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали А-ДНК меньше (2,56 Å), чем у А-РНК (2,81 Å). Пары наклонены на 20° относительно перпендикуляра к оси спирали и смещены относительно

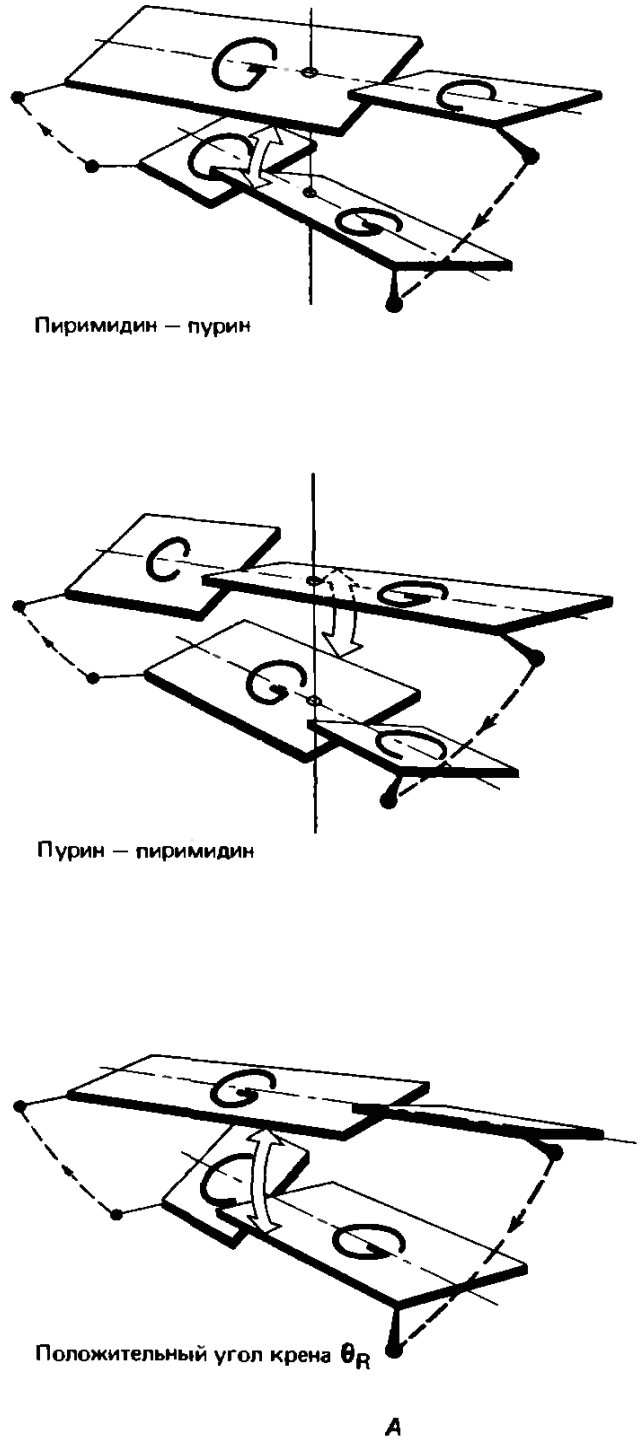
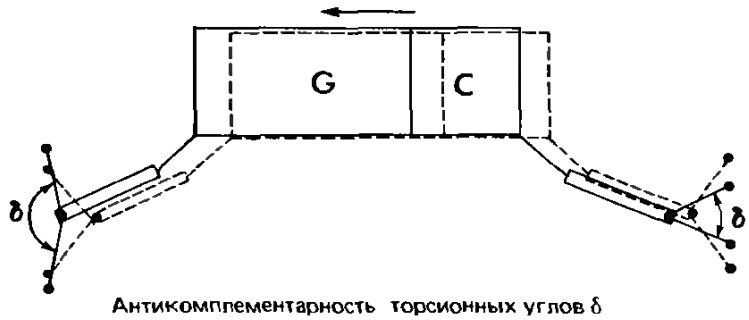
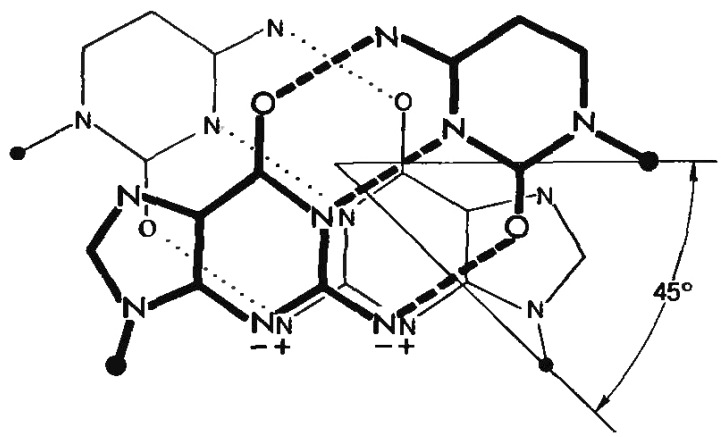


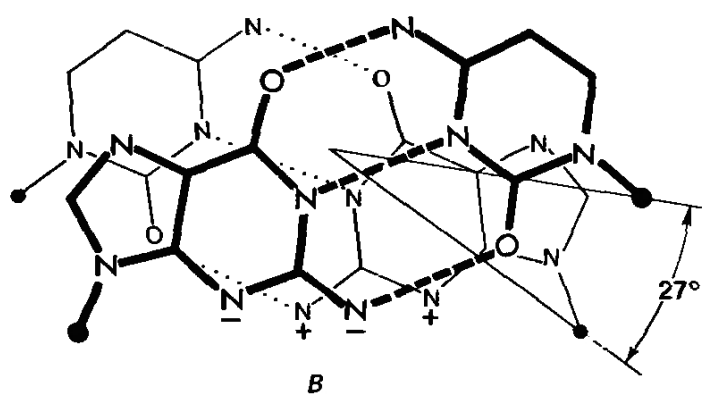
Рис. 11.1. Иллюстрация правил Калладина [892a], заимствованная из работы [892b]. *А*. Положительный угол пропеллера в двух соседних GC-парах двойной спирали ДНК приводит к появлению зависящих от последовательности тесных контактов между остатками гуанина противоположных цепей. В последовательности пиримидин—3′,5′—пурин (*вверху*) гуанины контактируют в минорном желобке (светлая широкая стрелка), в последовательности пурин—3′,5′—пиримидин (*в середине*)–в главном. Нежелательного контакта можно избежать, уменьшив угол пропеллера пар, изменив угол крена θ_R (*внизу*), уменьшив угол спирального вращения *t* (рис. *В*) или вытянув пурин (гуанин) из стопки оснований (рис. *Б*). *Б*. Невыгодные контакты между пуринами, показанные на рис. *А*, можно уменьшить, немного выдвинув GC-пары из стопки оснований (направле-



Антикомплементарность торсионных углов δ

Б





В

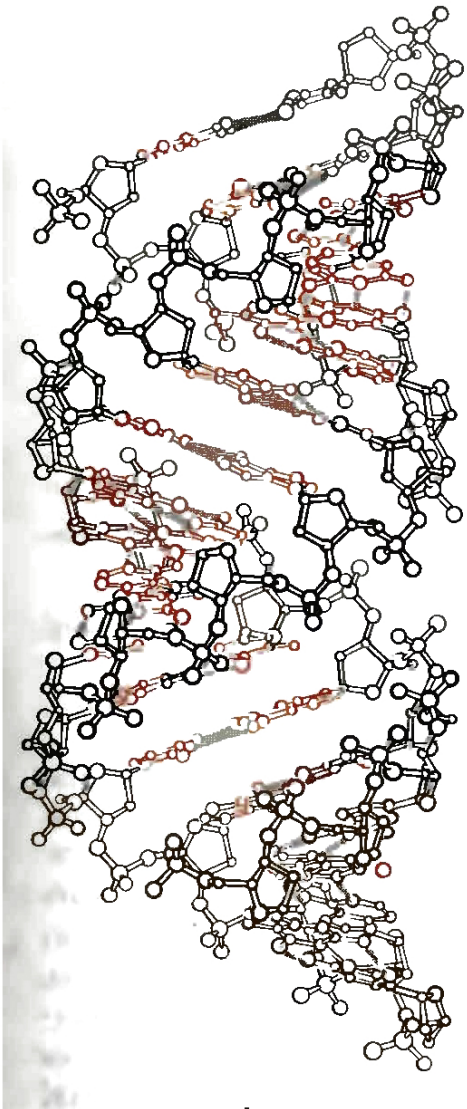
ние сдвига показано стрелкой). Чтобы расстояние P···P при этом осталось прежним, должна несколько измениться конформация сахара: у пуриновых нуклеозидов угол δ увеличивается, у пиримидиновых уменьшается. Согласно антикорреляционному принципу (разд. 11.2), с изменением δ изменяется и угол χ. *В.* Увеличение угла спирального вращения от 36 до 45° (*вверху*) укорачивает расстояние между атомами N_3 в минорном желобке, уменьшение этого угла до 27° (*внизу*) удлиняет. Появление положительного угла пропеллера (см. определение на рис. 2.14) приводит к тому, что атом N_3 верхней пары (жирные линии) перемещается вниз (знак « – »), а атом N_3 нижней (тонкие линии) – вверх, что приводит к невыгодному взаимодействию $N_3 \cdots N_3$. При раскручивании спирали до угла спирального вращения 27° (*внизу*) эти контакты уменьшаются.

оси на 4,7 Å, так что ось попадает в главный желобок. Это приводит к появлению полости в центре структуры; кроме того, главный желобок становится глубоким, а минорный – мелким (см. гл. 9 и разд. 10.1, а также рис. 11.2). Самое удивительное, что сахар у А-ДНК находится в $C_{3'}$-*эндо*-, а не в $C_{2'}$-*эндо*-конформации, как в случае всех других модификаций ДНК. Отличается также ориентация сахара и основания относительно гликозидной связи $C_{1'}$—N: у двойных спиралей А-типа угол χ лежит в области $-an$ ($-160°$), а у двойных спиралей В-типа – в области $-ak$ ($-100°$).

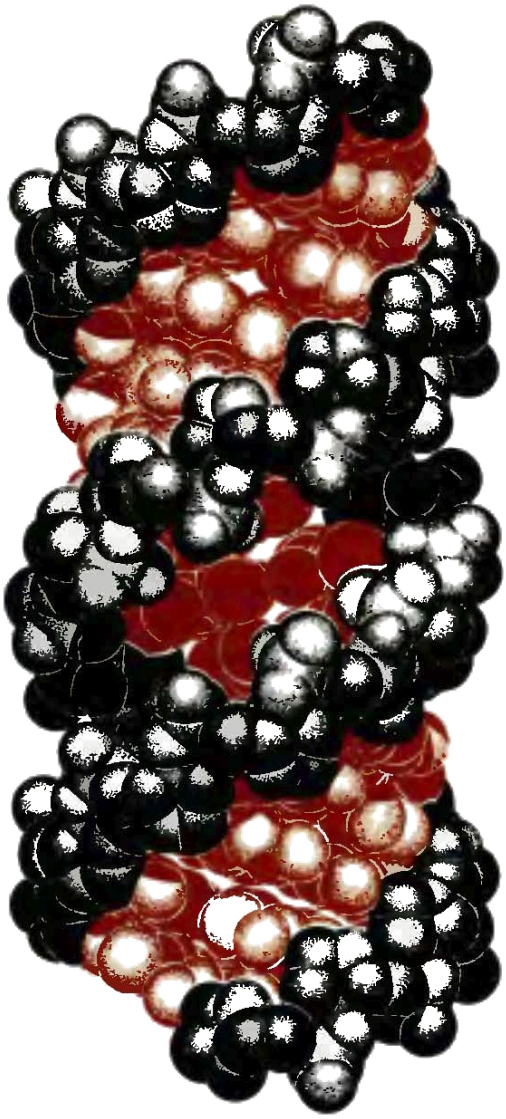
Рентгеноструктурный анализ кристаллов трех олигонуклеотидных дуплексов, принадлежащих А-семейству. А-форма обнаружена также при кристаллографических исследованиях трех самокомплементарных олигонуклеотидов: d(CCGG), d(GGCCGGCC) и d(GGTATACC) [893, 893a, 894, 894a]. Олигомеры были закристаллизованы в присутствии спирта, т.е. в условиях, которые способствуют дегидратации ДНК и облегчают B → A-переход [895]. Очевидно, однако, что стабилизации А-формы способствовало главным образом наличие GG-последовательности, присутствующей во всех трех олигомерах [893a]. Такой вывод можно сделать потому, что в случае других олигонуклеотидов при кристаллизации из растворов, тоже содержащих спирт, были получены дуплексы, находящиеся в В-форме (разд. 11.2).

Как видно из табл. 11.1, средние параметры спиралей олигонуклеотидов близки к таковым для А-формы, полученным при дифракционных исследованиях волокон ДНК. Тем не менее имеются локальные вариации в значениях этих параметров, а также в значениях углов пропеллера и крена пар, зависящие от последовательности и хорошо согласующиеся с правилами Калладина. Так, в последовательности пиримидин—(3′, 5′)—пурин атомы пуринов в минорном желобке вступают в невыгодное взаимодействие и угол крена пар θ_R уменьшается на 10–15°. Во всех остальных динуклеотидных звеньях никаких тенденций в отклонениях локальных параметров от средних значений не наблюдается, что соответствует предсказаниям и отличает А-олигомеры от додекамера В-типа (разд. 11.2).

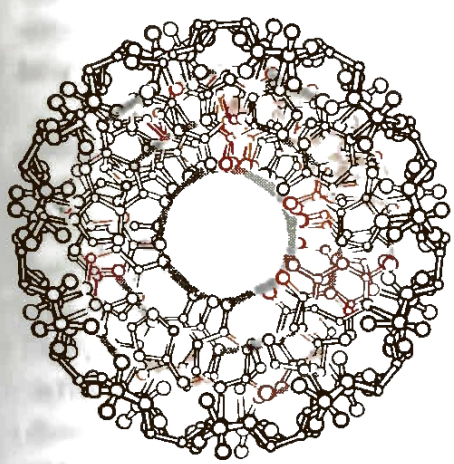
Рис. 11.2. Структура А-ДНК, построенная по координатам, взятым из работы [843]. Приведены вид сбоку и сверху. Рисунки выполнены с помощью ЭВМ. *А.* Скелетная модель. *Б.* Объемная модель. Если наклонить спираль на ~30°, чтобы была видна форма минорного и главного желобков, получится почти такая же картинка, как на рис. 10.1, *справа.* Описание деталей графического представления и масштаб даны в подписи к рис. 10.1. При построении объемной модели использовались те же входные данные, что и при построении скелетной модели. Радиусы атомов C, N и O равны соответственно 1,6, 1,5 и 1,4 Å. Атомы водорода не указаны. Свет падает на молекулу сверху под углом 45°. Заметим, что глубокий и узкий главный желобок выглядит темным, потому что он находится в тени.



А



Б



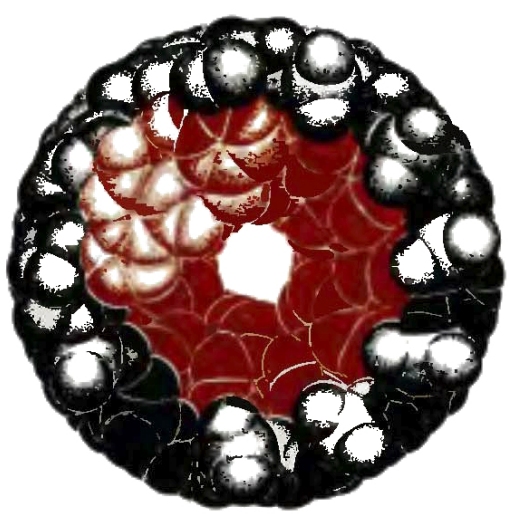


Таблица 11.1. Средние параметры олигонуклеотидных спиралей А-типа и спирали А-ДНК [894а]

Олигонуклеотид	Угол спирального вращения, град	Расстояние между парами вдоль оси спирали, Å	Угол наклона оснований, град	Смещение D, Å	Ширина желобков[1]	
					минорного	главного
d(GGTATACC)	32,2(1)	2,87(1)	13,5	4,0	10,2	6,3
d(^{I}CCGG)[2]	33,9(2)	2,85(3)	14,0	3,7	10,6	4,8
d(GGCCGGCC)	32,6(3)	3,03(4)	12,0	3,6	9,6	7,9
А-ДНК[3]	32,7	2,56	20	4,5	10,9	3,7

[1] Вандерваальсова ширина желобков равна расстоянию между фосфатами минус 5,8 Å.

[2] 5′-Концевой цитозин ^{I}C иодирован в положении 5.

[3] Неопубликованные данные Арнотта и Чандрасекарана (1982); эти данные отличаются от приведенных в табл. 9.3.

$C_{3'}$-*эндо*-конформация сахара и корреляция торсионных углов α и γ. Во всех трех упомянутых выше олигонуклеотидах А-типа среднее расстояние P···P равно ~6 Å. Это значение характерно для конформации сахара $C_{3'}$-*эндо* (рис. 9.3), которой также соответствуют значения торсионного угла δ, лежащие в узком интервале 80–91° [894а] (табл. 11.2).

Для того чтобы устранить невыгодные пурин-пуриновые контакты, пары оснований сдвигаются от своих средних положений в соответствии с правилами Калладина. Однако в данном случае это достигается не благодаря изменению конформации сахара, как в случае В-ДНК (разд. 11.2), а вследствие вариации торсионных углов α, γ и χ, причем наблюдается заметная корреляция между значениями α и γ [894а] (табл. 11.2). Как видно из табл. 11.2, другие торсионные углы сохраняют примерно постоянное значение вдоль цепи. В этом отношении спираль А-типа существенно отличается от В-ДНК, у которой 3′-концы нуклеотидов более подвижны (т.е. углы δ, ε, ζ более вариабельны), чем 5′-концы.

В отличие от олигонуклеотидов В-типа фрагменты ДНК А-типа однородны в отношении структурных свойств отдельных остатков. Все сахарные остатки d(CCGG) и d(GGTATACC) имеют стандартную конформацию $C_{3'}$-*эндо*. Зависящие от последовательности модуляции спиральной структуры, столь очевидные для олигомеров В-типа (см. ниже), в данном случае не проявляются. Исключение составляет структура d(GGCCGGCC), в которой наблюдаются некоторые отклонения в конформации четырех центральных нуклеотидов. Создается впечатление, что для двойных спиралей А-ДНК характерен более ограниченный диапазон возможных конформаций нуклеотидов (см. табл. 9.3). То же самое справедливо по отношению к А-РНК: в спиральных участках мо-

Таблица 11.2. Средние значения торсионных углов у олигонуклеотидных спиралей А-типа [894а]. В скобках указано стандартное отклонение

Олигонуклеотид	α (P—$O_{5'}$)	β ($O_{5'}$—$C_{5'}$)	γ ($C_{5'}$—$C_{4'}$)	δ ($C_{4'}$—$C_{3'}$)	ε ($C_{3'}$—$O_{3'}$)	ζ ($O_{5'}$—P)	χ ($C_{1'}$—N)
d(GGTATACC)	−62(12)	173(8)	52(14)	88(3)	−152(8)	−78(7)	−160(8)
d(^{I}CCGG)[1]	−73(4)	180(8)	64(10)	80(6)	−161(7)	−67(4)	−161(7)
d(GGCCGGCC)[2]	−75(36)	185(13)	56(22)	91(18)	−166(19)	−75(19)	−149(10)
r(GCG)d(TATACGC)	−69(31)	175(14)	55(22)	82(9)	−151(15)	−75(16)	−162(10)
А-ДНК[3]	−50	172	41	79	−146	−78	−154
А-РНК[3]	−68	178	54	82	−153	−71	−158

[1] 5'-концевой цитозин ^{I}C иодирован в положении 5.

[2] При усреднении не учитывались значения углов δ разупорядоченных сахарных остатков G1 и G2 в кристаллической структуре, определенной при −8°C.

[3] Неопубликованные данные Ариотта и Чандрасекарана (1982); эти данные отличаются от приведенных в табл. 9.3.

лекулы тРНК (гл. 15) нет явных систематических, зависящих от последовательности вариаций конформаций или вторичной структуры.

Гибрид ДНК—РНК находится в А-форме, свойственной обоим типам нукленновых кислот. Так как двойные спирали А-ДНК и А-РНК конформационно изоморфны, не удивительно, что у гибридов ДНК—РНК полинуклеотидные цепи находятся именно в А-форме. При этом, за исключением особых случаев синтетических полимеров (разд. 11.7), ДНК В-типа должна перейти в А-форму *до того*, как она образует гибрид с РНК во время транскрипции.

11.2. В-ФОРМА ПОЛИМЕРНЫХ МОЛЕКУЛ ДНК И ДОДЕКАНУКЛЕОТИДА *d(CGCGAATTCGCG)*. ЗНАКОМСТВО С ДВОЙНЫМИ СПИРАЛЯМИ В-СЕМЕЙСТВА

Если А-ДНК обладает рядом характерных особеиностей, присущих семейству двойных спиралей А-РНК, то В-ДНК и родственные ей С- и *D*-ДНК принадлежат совсем другому классу – В-семейству двойных спиралей. У этого семейства фуранозные кольца имеют конформацию $C_{2'}$-*эндо* (или близкую ей $C_{3'}$-*экзо*), расстояние между соседними фосфатами увеличивается до 7 Å (рис. 9.3), а угол χ, описывающий вращение вокруг гликозидной связи $C_{1'}$—N, оказывается в области *– ак*, в диапазоне $-90 \div -120°$. В В-ДНК на виток спирали приходится 10 пар оснований и расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали составляет $3{,}3 \div 3{,}4$ Å. В результате у оснований наблюдается лишь небольшой отрицательный наклон $-6°$. Эти характеристики и определяют макроскопическую структуру В-ДНК, подробно описанную в гл. 9 и представленную на рис. 11.3: пары оснований расположены на оси спирали, размер главного и минорного желобков примерно одинаков, в стэкинге участвуют лишь основания, принадлежащие одной и той же цепи, а перекрывание соседних оснований противоположных цепей отсутствует (рис. 9.6).

Структурный анализ кристаллов додекамера *d(CGCGAATTCGCG)* подтверждает, что В-ДНК в целом такова, какой ее представляли по результатам рентгеновской дифракции на волокнах. Кристаллы додекамера [центральная часть которого, d(GAATTC), представляет собой участок узнавания для рестриктазы] были выращены при pH 7,5 в водном растворе, содержащем Mg^{2+}, спермин и 2-метил-2,4-пентандиол (от 20 до 30%)–спирт, который часто используют при кристаллизации белков. Самокомплементарная молекула в кристалле образует уотсон-криковский дуплекс, или, точнее, двойную спираль В-типа длиной чуть более одного витка. При подробном рассмотрении этой спиральной структуры были обнаружены новые важные факты.

1. Спираль оказалась не прямой, а с изгибом в 19°, что отвечает радиусу кривизны 112 Å (рис. 11.4). Этот изгиб обусловлен особенностями кристаллической упаковки, а не собственно структурными свойствами данного дуплекса [464]. Рассматривая двойную спираль ДНК как упру-

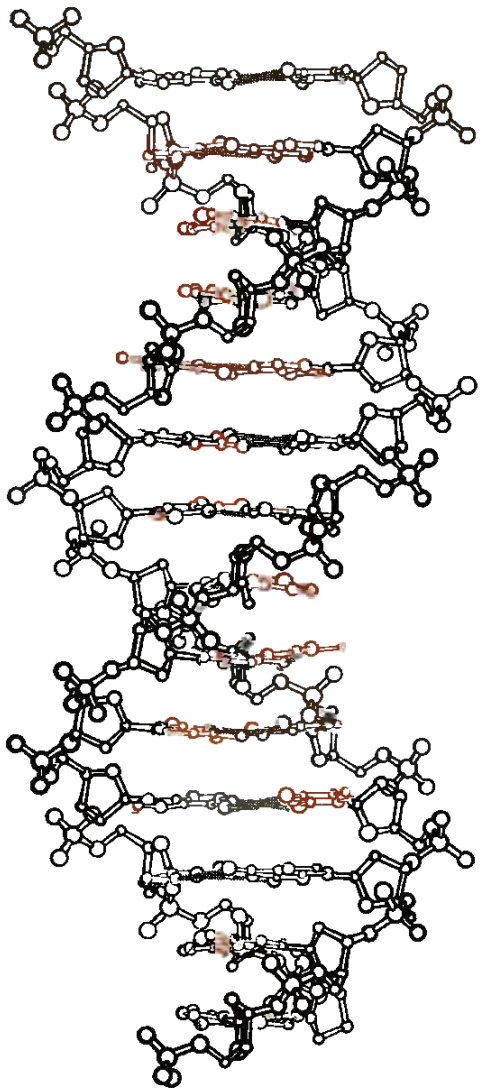
гий деформируемый стержень и зная персистентную длину ДНК в растворе [815, 816, 897, 898], можно оценить, что для создания наблюдаемой кривизны достаточно энергии 0,25–0,5 ккал на моль додекамера. Как будет видно из гл. 12, изгибание ДНК имеет большое значение для ее упаковки в хроматине и при образовании сверхспиральных молекул ДНК.

2. Центральный фрагмент додекамера, включающий участок узнавания рестриктазы *EcoRI* *d*(*GAATTC*), имеет структурные особенности, характерные для ДНК B-типа, с 9,8 парами на виток. Однако концевые нуклеотидные триплеты, ограничивающие центральный фрагмент с двух сторон, имеют более сложную структуру. Примыкающие непосредственно к центральному гексамеру пары смещены от локальной оси спирали в сторону минорного желобка, как в A-ДНК (рис. 11.5). Угол спирального вращения для двух последующих пар относительно локальной оси равен $\sim 45°$; это напоминает структуру D-ДНК. Однако, несмотря на эти нарушения регулярности, неизменное вдоль всей цепи расстояние P—P, равное 6,68 Å, указывает на то, что мы имеем дело с B-ДНК (для идеальной спирали A-ДНК это расстояние было бы равно 5,62 Å) [895, 899] (табл. 11.3).

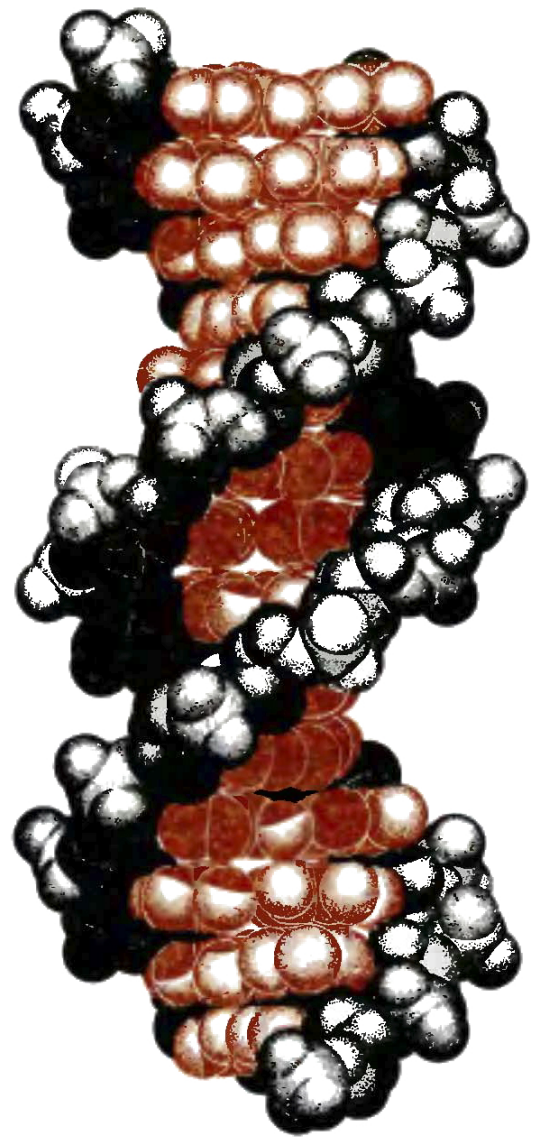
3. Конформация сахара вдоль двойной спирали додекануклеотида непостоянна: она меняется от $C_{3'}$-*экзо*- до $O_{4'}$-*эндо*-формы (табл. 11.3). Если описывать конформацию сахара с помощью торсионного угла δ, то мы получим гауссово распределение с максимумом в области $C_{1'}$-*экзо*-конформации ($\delta \simeq 123°$). Как показывает рис. 11.6, конформация сахара четко коррелирует с величиной гликозидного торсионного угла χ, а кроме того, для пиримидиновых нуклеозидов характерны более низкие значения угла δ ($O_{4'}$-эндо), а для пуриновых – более высокие ($C_{2'}$-эндо). При этом наблюдается поразительная *антикорреляция*: точки (χ, δ), отвечающие двум разным нуклеотидам пары, располагаются на рис. 11.6 симметрично по отношению к средней точке (χ, δ).

4. Правила Калладина и принцип антикорреляции эквивалентны. Как мы уже говорили в начале этой главы, модуляции структуры двухцепочечной ДНК можно объяснить на основе чисто механических соображений. Для последовательностей пиримидин—(3′, 5′)—пурин изменение углов крена θ_R сопровождается «раскрытием» пар в минорный желобок, а для последовательностей пурин—(3′, 5′)—пиримидин – в главный; в случае гомопоследовательности θ_R не меняется в соответствии с правилом 2 на с. 273. Правило 3 устанавливает прямую связь между горизонтальным сдвигом пары и торсионным углом δ. Так как этот сдвиг «вытягивает» пурины из стопки оснований в спирали, торсионный угол δ для пуринов увеличивается до $\sim 135°$ (рис. 11.6), а для пиримидинов уменьшается до $\sim 110°$, и в результате расстояние между фосфатами остается неизменным, равным $\sim 6{,}8$ Å (см. также рис. 11.1, *Б*).

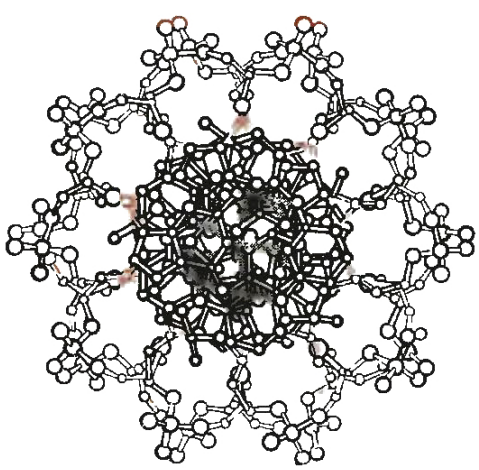
5. Угол пропеллера пары равен 11° для *dG—dC* и 17° для *dA—dT*, что существенно больше среднего значения 2,1°, полученного на основании

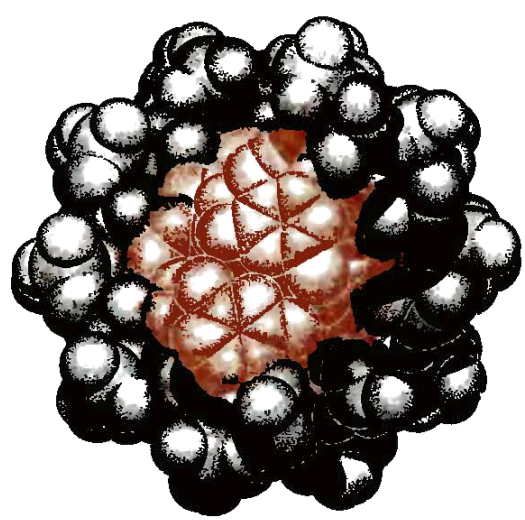


А



Б





рентгеновских данных на волокнах [843]. Из кристаллической структуры додекамера следует, что наблюдающаяся для GC-пары тенденция к уменьшению угла пропеллера по сравнению с AT-парой обусловлена не наличием дополнительной водородной связи, а тем, что, если бы этот угол был больше, происходило бы столкновение аминогруппы гуанина с соседними основаниями «сверху» и «снизу».

6. В последовательности *dT—dC—dG* основание *dC* выдвигается «из-под» *dT* и сильнее перекрывается с dG (рис. 11.5). Отметим, что сходные тенденции наблюдаются при образовании стопок оснований в водном растворе (гл. 6).

Итак, анализ кристаллической структуры упомянутого выше B-доде-

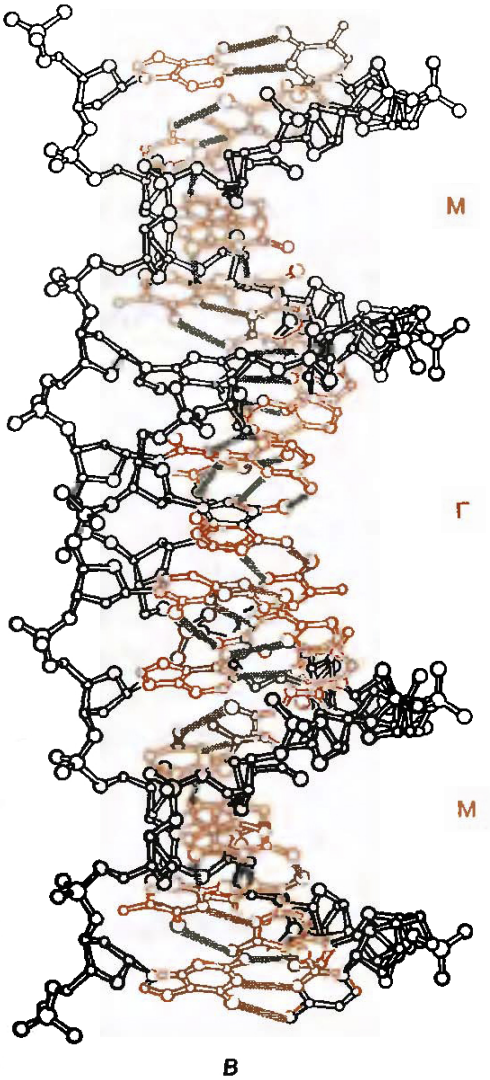


Рис. 11.3. Структура B-ДНК, построенная по координатам, указанным С. Арноттом и Р. Чандрасекараном (1981). Описание деталей графического представления и масштаб даны в подписи к рис. 10.1. Приведены вид сбоку и сверху. *А*. Скелетная модель. *Б*. Объемная модель. *В*. Спираль наклонена под углом 32° в направлении от наблюдателя; при таком наклоне хорошо видны минорный (М) и главный (Г) желобки.

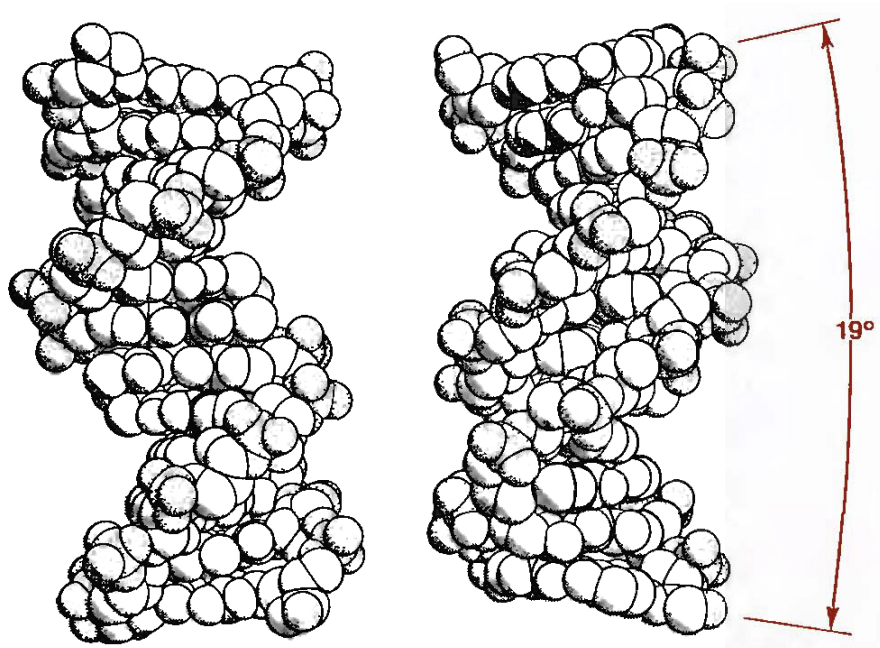


Рис. 11.4. Две проекции молекулярной структуры двойной спирали d(CGCGAATTCGCG), построенные по результатам рентгеноструктурного анализа монокристаллов [464]. Приведены две взаимно перпендикулярные проекции, поэтому можно рассмотреть оба желобка – главный (*слева*) и минорный (*справа*). На рисунке справа отчетливо видно, что двойная спираль искривлена. Фосфатные группы затемнены, атомы водорода не указаны.

камера показал, что *двойную спираль ДНК не следует рассматривать как однородный стержень, каким она казалась на основании рентгеновских дифракционных данных на волокнах. В структуре ДНК наблюдаются систематические, зависящие от нуклеотидной последовательности модуляции, которые, вероятно, важны при нуклеиново-белковом узнавании. С другой стороны, двойные спирали РНК и ДНК А-типа более однородные по структурным свойствам и не проявляют обнаруженного у В-ДНК полиморфизма, к подробному рассмотрению которого мы сейчас перейдем.*

11.3. «В-ДНК С ЧЕРЕДОВАНИЕМ КОНФОРМАЦИЙ» И ТЕТРАНУКЛЕОТИД *d(pATAT)*; *d(TpA)* – ДИНУКЛЕОЗИДФОСФАТ, ОБРАЗУЮЩИЙ СПИРАЛЕПОДОБНУЮ СТРУКТУРУ

Олигодезоксинуклеотид с чередующейся последовательностью d(pATAT) был закристаллизован в виде аммонийной соли при добавлении ацетона в водный раствор олигонуклеотида [359]. Можно было бы ожидать, что этот самокомплементарный тетрамер образует антипараллельную двойную спираль уотсон-криковского типа, аналогичную тем, которые мы только что рассматривали, или аналогичную дуплексам ApU и GpC [465, 466]. Однако такая структура реализовалась лишь частично: каждый тетрамер d(pATAT) оказался связан уотсон-криковски-

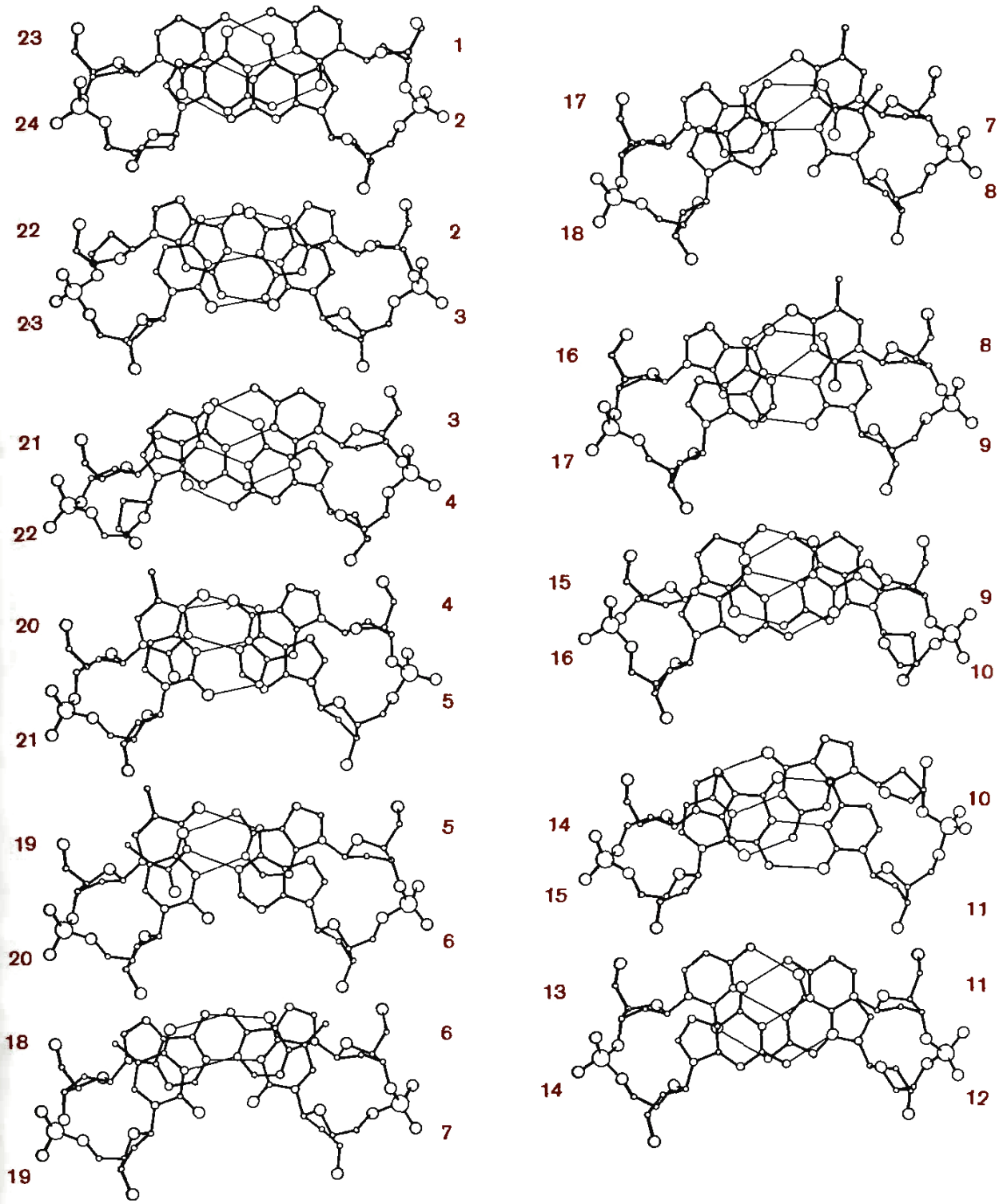


Рис. 11.5. Перекрывание 11 пар оснований в додекамере d(CGCGAATTCGCG) [895]. Последовательность оснований отвечает указанным сбоку номерам: от 1 до 12 в одной цепи и от 13 до 24 в другой. Заметим, что стэкинг оснований и конформация сахарных остатков в центральном гексамере d(GAATTC) (ступени 4–8) отличаются большей регулярностью, чем в случае «внешних» участков; сравните ступени 9 (подобна A-ДНК) и 10 (подобна D-ДНК). Все пары, за исключением концевых, представлены на рисунке дважды и показаны в одной и той же ориентации относительно наблюдателя.

Таблица 11.3А. Конформационные параметры В-спирали додекамера d(CGCGAATTCGCG) [899, 899a]

Остаток	Углы в град							Конформация сахара	Расстояние между соседними атомами Р одной цепи, Å
	χ	α	β	γ	δ	ε	ζ		
C1	– 105	—	—	174	157	– 141	– 144	$C_{2'}$-*эндо*	
G2	– 111	– 66	170	40	128	– 186	– 98	$C_{1'}$-*экзо*	6,64
C3	– 135	– 63	172	59	98	– 177	– 88	$O_{4'}$-*экзо*	6,47
G4	– 93	– 63	180	57	156	– 155	– 153	$C_{2'}$-*эндо*	6,83
A5	– 126	– 43	143	52	120	– 180	– 92	$C_{1'}$-*экзо*	6,88
A6	– 122	– 73	180	66	121	– 186	– 89	$C_{1'}$-*экзо*	6,90
T7	– 127	– 57	181	52	99	– 186	– 86	$O_{4'}$-*эндо*	6,29
T8	– 126	– 59	173	64	109	– 189	– 89	$C_{1'}$-*экзо*	6,87
C9	– 120	– 58	180	60	129	– 157	– 94	$C_{1'}$-*экзо*	6,70
G10	– 90	– 67	169	47	143	– 103	– 210	$C_{2'}$-*эндо*	6,55
C11	– 125	– 74	139	56	136	– 162	– 90	$C_{2'}$-*эндо*	7,05
G12	– 112	– 82	176	57	111	—	—	$C_{1'}$-*экзо*	
C13	– 128	—	—	56	137	– 159	– 125	$C_{2'}$-*эндо*	
G14	– 116	– 51	164	49	122	– 182	– 93	$C_{1'}$-*экзо*	6,62
C15	– 134	– 63	169	60	86	– 185	– 86	$O_{4'}$-*эндо*	6,45
G16	– 115	– 69	171	73	136	– 186	– 98	$C_{2'}$-*эндо*	7,12
A17	– 106	– 57	190	54	147	– 183	– 97	$C_{2'}$-*эндо*	6,77
A18	– 108	– 57	186	48	130	– 186	– 101	$C_{2'}$-*эндо*	6,71
T19	– 131	– 58	174	60	109	– 181	– 88	$C_{1'}$-*экзо*	6,70
T20	– 120	– 59	179	55	122	– 181	– 94	$C_{1'}$-*экзо*	6,70
C21	– 114	– 59	185	45	110	– 177	– 86	$C_{1'}$-*экзо*	6,17
G22	– 88	– 67	179	50	150	– 100	– 188	$C_{2'}$-*эндо*	6,60
C23	– 125	– 72	139	45	113	– 174	– 97	$C_{1'}$-*экзо*	6,68
G24	– 135	– 65	171	47	79	—	—	$C_{3'}$-*эндо*	
Среднее	– 177	– 63	171	54[1)]	123	– 169	– 108		
± SD	14	8	14	8	21	25	34		
B-ДНК[2)]	– 119	– 61	180	57	122	– 187	– 91		
B_F-ДНК[3)]	– 102	– 41	136	38	139	– 133	– 157		
A_F-ДНК[3)]	– 154	– 90	– 149	47	83	– 175	– 45		

[1)] При усреднении величина γ для C1 не учитывалась, поскольку в данном случае она отражает концевые эффекты.

[2)] По данным для энергетически уточненной структуры В-ДНК [836].

[3)] По дифракционным данным на волокнах [304].

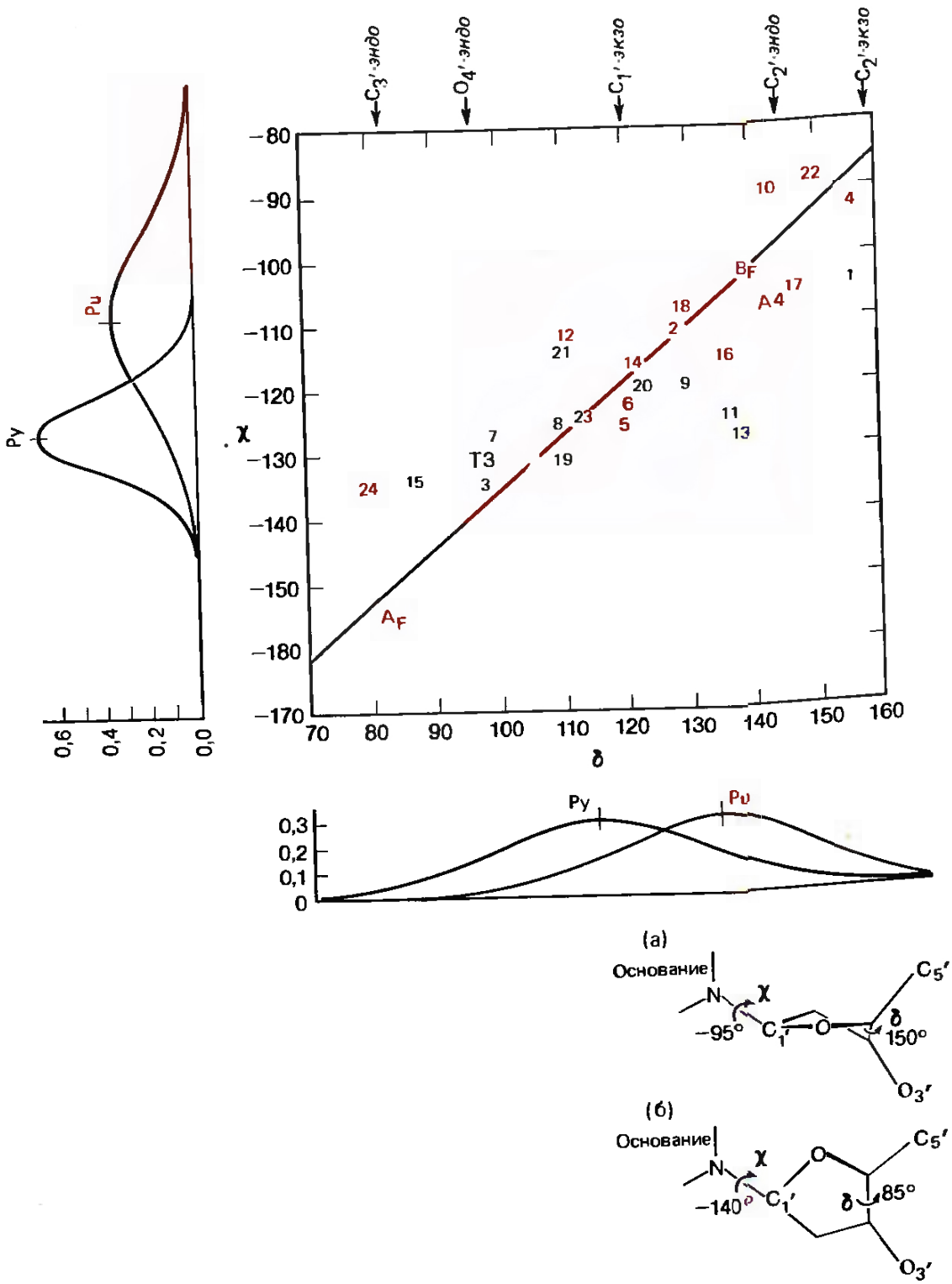
Таблица 11.3Б. Локальные параметры B-спирали додекамера d(CGCGAATTCGCG) [899, 899a]

Пара оснований	Угол пропеллера θ_P, град	Угол спирального вращения[1] t, град	Число пар оснований n на виток	Расстояние между парами вдоль оси спирали h, Å
C1/G24	13,2 ± 2,0			
		38,3 ± 1,1	9,40 ± 0,27	3,36 ± 0,01
G2/C23	11,7 ± 2,1			
		39,6 ± 6,1	9,09 ± 1,40	3,38 ± 0,08
C3/G22	7,2 ± 2,1			
		33,5 ± 2,1	10,75 ± 0,67	3,26 ± 0,05
G4/C21	13,2 ± 1,9			
		37,4 ± 1,7	9,63 ± 0,44	3,30 ± 0,10
A5/T20	17,1 ± 2,1			
		37,5 ± 0,9	9,60 ± 0,23	3,27 ± 0,02
A6/T19	17,8 ± 2,1			
		32,2 ± 2,1	11,18 ± 0,73	3,31 ± 0,03
T7/A18	17,1 ± 1,9			
		36,0 ± 2,8	10,00 ± 0,78	3,29 ± 0,01
T8/A17	17,1 ± 2,0			
		41,4 ± 2,1	8,70 ± 0,42	3,14 ± 0,02
C9/G16	18,6 ± 1,9			
		32,3 ± 1,3	11,11 ± 0,45	3,56 ± 0,07
G10/C15	4,9 ± 1,9			
		44,7 ± 5,4	8,05 ± 0,97	3,21 ± 0,18
C11/G14	17,2 ± 1,9			
		37,0 ± 1,9	9,73 ± 0,50	3,54 ± 0,19
G12/C13	6,2 ± 2,3			
Среднее	13,4 ± 4,9	37,3 ± 3,8	9,75 ± 0,98	3,33 ± 0,13
A-ДНК		32,7	11,0	2,56
B-ДНК		36,0	10,0	3,38
C-ДНК		38,6	9,33	3,31
D-ДНК		45,0	8,0	3,03

[1] Эти параметры получены как углы между вектором, соединяющим атомы C_1· и N одного нуклеотида и вектором, соединяющим такие же атомы следующего по цепи нуклеотида (см. гл. 2).

ми парами с *двумя* партнерами, симметрично сдвинутыми в обе стороны на два нуклеотида относительно исходного тетрамера. В результате получились две короткие двойные спирали d(pApT) и неспиральный центральный фрагмент d(pTpA) (рис. 11.7).

Коиформация фосфодиэфирных связей непостоянна. Торсионные углы α и ζ, описывающие ориентацию относительно связей P—O_5· и P—O_3·, для двух спиральных фрагментов d(pApT) каждой молекулы тетрамера лежат в области $-sc$, как того требует спиральная геометрия. Однако



C3'·эндо
O4'·эндо
C1'·экзо
C2'·эндо
C2'·экзо
Py
Pu
χ
δ
AF
BF
A4
T3
(а)
Основание
−95°
150°
(б)
Основание
−140°
85°

у центральной фосфодиэфирной связи угол ζ находится в области *ап*, а α – в области – *ск*, что характерно для структуры P_2, представленной на рис. 4.26. В результате остов в этом месте вытягивается и спиральная структура нарушается (рис. 11.7). Чтобы восстановить конформацию двойной спирали, нужно изменить величину угла ζ от 168 до – 100° (см. об этом более подробно ниже).

Фуранозные кольца, связанные с пуринами, имеют конформацию $C_{3'}$-*эндо*, а связанные с пиримидинами – $C_{2'}$-*эндо*. Наиболее удивительная структурная особенность молекулярного комплекса d(pATAT) состоит в том, что конформация сахарных остатков чередуется. Вследствие этого заметно различаются торсионные углы относительно гликозидной связи: для аденозинов угол χ равен ~ – 160°, для тимидинов ~ – 110°.

Почему *d(pATAT)* не образует непрерывной тетрануклеотидной двойной спирали? Сравнение с *d(TpA)*. Неспособность тетрануклеотида d(pATAT) к образованию непрерывной спирали, по-видимому, обусловлена слабым перекрыванием оснований d(TpA) в спиральной структуре. Это в корне отличается от сильного перекрывания в двух фрагментах d(ApT): сравните последовательности пиримидин–3′, 5′–пурин и пурин–3′, 5′–пиримидин для B-ДНК на рис. 9.6. В гипотетической двойной спирали d(pATAT) с чередующейся конформацией сахара перекрывание оснований в последовательности пиримидин–3′, 5′–пурин оказалось бы еще хуже [900]. Данные по динуклеотидам d(pTpA) и d(pApT) в водном растворе, полученные методом ядерного магнитного резонанса, подтверждают такую интерпретацию. Они четко указывают на то,

Рис. 11.6. Иллюстрация антикорреляционного принципа [895]. *Вверху*: линейная зависимость гликозидного угла χ от конформации сахара, определяемой торсионным углом δ ($C_{5'}$—$C_{4'}$—$C_{3'}$—$O_{3'}$). Точки для нуклеотидов додекамера d(CGCGAATTCGCG) указаны с помощью последовательных номеров, точки для центрального участка комплекса d(CGTACG) с дауномицином (разд. 16.3) – символами A4, T3; точки для классических A-ДНК и B-ДНК по дифракционным данным на волокнах – символами A_F и B_F соответственно. Цветные символы отвечают пуринам, черные – пиримидинам. Нормированные гауссовы распределения (*слева* и *внизу*) показывают, что для пуринов характерны более высокие значения χ и δ, чем для пиримидинов. Точки для двух оснований одной пары расположены почти симметрично относительно δ = 123° (ср. точки для партнеров разных пар: 1 и 24, 2 и 23, 3 и 22 и т. д.). Вдоль верхней горизонтальной оси указаны отвечающие данному значению δ конформации сахара. *Внизу*: объяснение корреляции χ/δ. Чтобы расстояние $O_{3'}\cdots C_{5'}$ оставалось неизменным, а расстояние P···P по всей длине додекамера было равно 6,68 Å, при повороте сахара из положения (а) в положение (б) должно происходить уменьшение δ и переход этого угла из области *ак* в область *ск* (от 150 до 85°). Как отмечалось в разд. 4.5 и как видно из представленного на рисунке распределения величин χ, для пуринов характерны меньшие по абсолютной величине отрицательные значения χ, чем для пиримидинов.

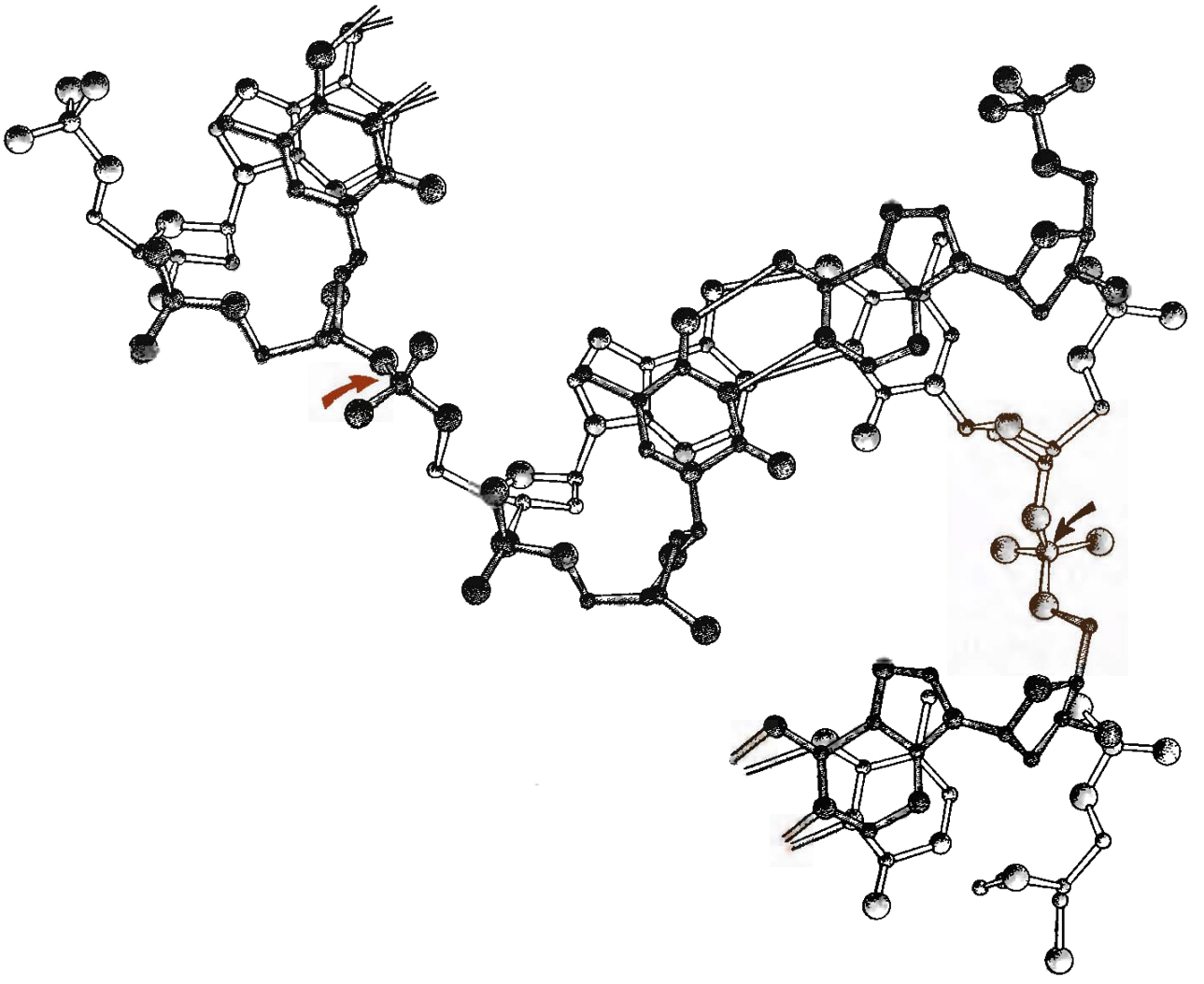


Рис. 11.7. Кристаллическая структура олигонуклеотида d(pATAT) [359]. Чем ближе к наблюдателю расположены нуклеотиды, тем сильнее они затемнены; цветные линии – это водородные связи. Стрелками отмечены те связи $P—O_{3'}$, углы вращения ζ вокруг которых лежат в области *an*; при этом спиральная структура разрушается.

что для второго типа молекул существенной структурной особенностью является наличие стэкинга, тогда как в молекулах d(pTpA) стэкинг практически отсутствует [901].

Для того чтобы объяснить, как выглядит «полимерная» структура, которую образует динуклеозидфосфат *d(TpA)*, пришлось предположить, что стэкинг в молекуле *d(TpA)* отсутствует [902, 902а]. При выпаривании водного раствора аммонийной соли d(TpA) образуются пленки, рентгенограммы которых напоминают рентгенограммы волокон А-ДНК. Предполагается, однако, что из димеров d(TpA) формируется двойная спираль не с уотсон-криковскими, а с хугстеновскими парами оснований. При этом каждая молекула d(TpA) образует пары с *двумя* партнерами. В результате из элементов d(TpA) формируется спиралеобразная структура. Весь полимерный комплекс стабилизируется главным обра-

зом благодаря стэкинг-взаимодействиям dA—dA, значительно более сильным, чем стэкинг «dT-*на*-dA», который имел бы место в уотсон-криковской структуре (см. обсуждение иерархии стэкинг-взаимодействий в разд. 6.6).

«В-ДНК с чередованием конформаций» – это гипотетическая модель «В-ДНК-образной» двойной спирали, в которой, как и в тетрануклеотиде d(pATAT), соблюдается принцип чередования определенных конформаций [900, 900а]. Чтобы сконструировать такую модель исходя из структуры d(pATAT), потребовалось перевести угол вращения вокруг связи $P—O_3$· у центрального фрагмента d(TpA) из области *ап* в область $-$ *ск.* Это позволило получить двойную спираль В-типа, структуру которой затем уточняли путем минимизации энергии. Полученная модель существенно отличалась по своим структурным характеристикам от «классической» В-ДНК. Конформации сахаров, как и в тетрануклеотиде, чередовались: у аденозинов C_3·-*эндо*, у тимидинов C_2·-*эндо*. Соответственно менялась ориентация сахара и основания относительно гликозидной связи. Для всех нуклеотидов В-ДНК углы вращения α и ζ относительно связей Р—О были равны -60 и $-90°$ соответственно, а у «В-ДНК с чередованием конформаций» $\alpha = \zeta = -60°$ для фрагментов d(ApT) и $\alpha = -50°$, $\zeta = -120°$ для фрагментов d(TpA).

Существование «В-ДНК с чередованием конформаций» подтверждается экспериментально и имеет биологический смысл. О том, что «В-ДНК с чередованием конформаций» действительно существует, свидетельствует ряд экспериментальных данных. В спектрах ЯМР растворов и волокон поли- и олигонуклеотидов с чередующимися последовательностями пик резонансного поглощения ^{31}P имеет вид дублета, что указывает на наличие двух типов фосфатов с разным химическим окружением; этот факт согласуется с гипотезой о чередовании значений углов вращения вокруг связей Р—О [903–905]. Кроме того, в случае двойной спирали poly(dA—dT)·poly(dA—dT) гипотеза о чередовании конформаций подтверждается двумя типами биохимических данных. Во-первых, при ферментативном расщеплении комплекса ДНКазой I образуются только фрагменты, несущие на 5′-конце нуклеотид dT [906], хотя двойную спираль природной ДНК этот фермент расщепляет в любом месте [907]. Во-вторых, константа связывания *lac*-репрессора с poly(dA—dT)·poly(dA—dT) почти в 1000 раз больше, чем в случае ДНК тимуса теленка [908]. Это различие в константах связывания можно было бы считать следствием узнавания белком специфической нуклеотидной последовательности. Однако *lac*-репрессор так же охотно образует комплексы с рядом химически модифицированных аналогов poly(dA—dT), у которых метильная группа остатков тимина замещена на галогены или гидрофобные группы. На основании этого результата был сделан вывод о том, что взаимодействие между упомянутыми заместителями и соседними остатками аденина индуцирует образование «В-ДНК с чередованием конформаций» и стабилизирует ее структуру [900].

11.4. УНИКАЛЬНАЯ КОНФОРМАЦИОННО ЖЕСТКАЯ ДВОЙНАЯ СПИРАЛЬ *POLY(dA)·POLY(dT)* И ЕЕ ПЕРЕХОД В ТРОЙНУЮ СПИРАЛЬ

Спираль *poly(dA)·poly(dT)*–это единственная двойная спираль, у которой в водном растворе на виток приходится 10,0 пар оснований. Гомополимеры poly(dA) и poly(dT) могут образовывать комплекс уотсон-криковского типа с соотношением цепей 1 : 1. Этот комплекс при низкой концентрации соли и высокой относительной влажности волокон имеет структуру типичной B-ДНК. В случае водных растворов в спиралях природных ДНК и у аналога с чередующейся последовательностью, poly(dA—dT), на виток приходится $10{,}5 \pm 0{,}1$ пар оснований, а у двойной спирали poly(dA)·poly(dT)–$10{,}1 \pm 0{,}1$ [909, 910, 910a]. Это единственный случай, когда структурные характеристики B-ДНК в волокнах и в растворе полностью совпадают. Тот факт, что спираль poly(dA)·poly(dT) не переходит в другие структурные формы, а также наличие у нее особого спектра КД и ее неспособность образовывать нуклеосомы при взаимодействии с гистоновыми октамерами [910] свидетельствуют о том, что этот полинуклеотид действительно отличается от молекул ДНК с чередующимися или случайными последовательностями.

Перегруппировка в трехцепочечную спираль *poly(dA)·2poly(dT)*. Так как кристаллическая упаковка в волокнах poly(dA)·poly(dT) отличается от упаковки обычной B-ДНК, а шаг спирали меньше на 0,8 Å (табл. 9.4), спираль poly(dA)·poly(dT) была названа B′-ДНК [843]. Если в случае волокон poly(dA)·poly(dT) повысить концентрацию соли (или понизить относительную влажность), нормального B → A-перехода не происходит. Вместо этого цепи перегруппировываются, двухцепочечная спираль превращается в трехцепочечную и появляется одноцепочечный полинуклеотид, как в системе poly(A)·poly(U), (разд. 10.2). В обоих случаях в глубоком главном желобке уотсон-криковской двойной спирали A-типа (A-ДНК) размещается еще одна полинуклеотидная цепь–poly(Py), которая образует хугстеновские пары с poly(Pu). Эти две цепи параллельны, тогда как в уотсон-криковском дуплексе цепи антипараллельны. Общая конформация тройных спиралей рибо- и дезоксириборядов одинакова (рис. 11.8, табл. 9.4).

11.5. ДВОЙНАЯ СПИРАЛЬ C-ТИПА У ПРИРОДНЫХ ДНК И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

При исследовании волокон ДНК методом рентгеновской дифракции было показано, что если литиевую соль природной ДНК поместить в условия с достаточно низкой относительной влажностью (44–66%), то образуется новая форма, C-ДНК (рис. 11.9; табл. 9.1). Такую же форму ДНК можно получить при высокой концентрации соли и значениях влажности, промежуточных между теми, при которых образуются A- и B-ДНК [857], используя в качестве противоиона натрий. Аналогичные

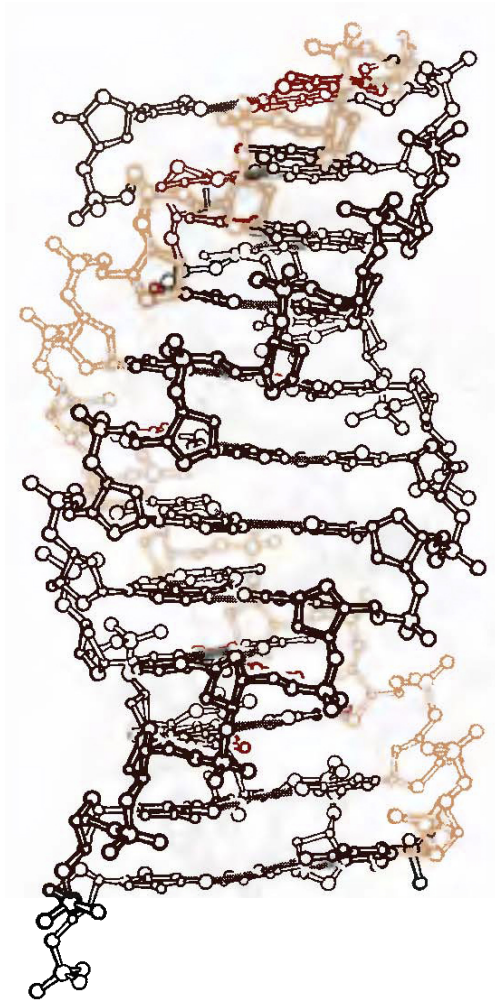
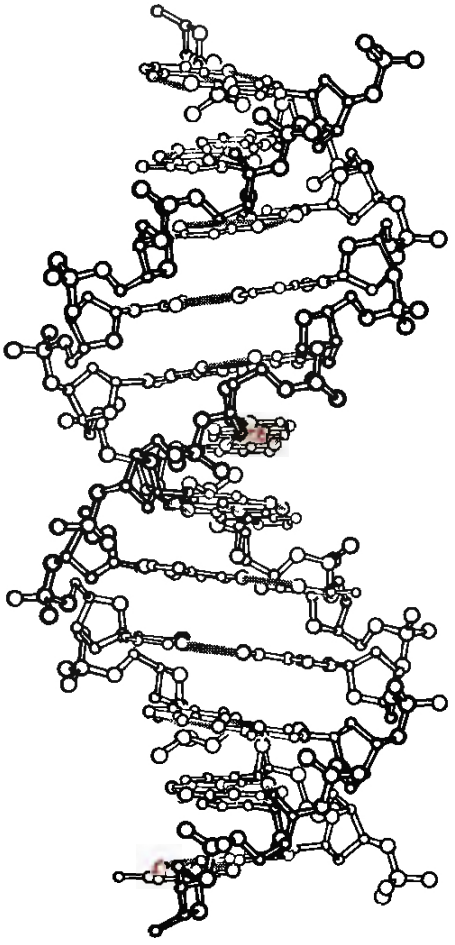
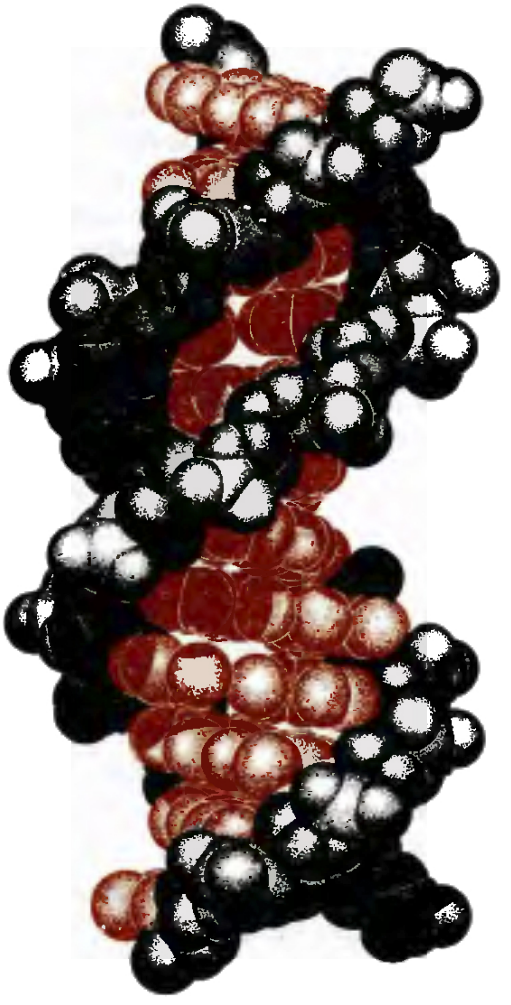


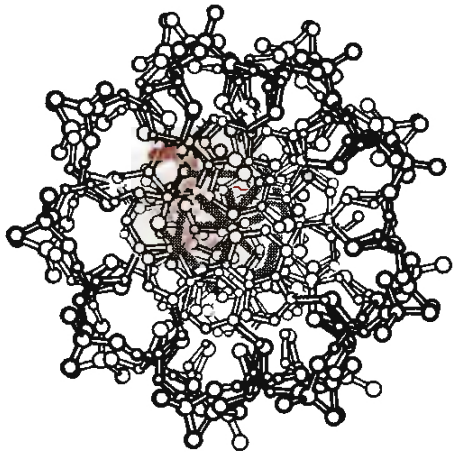
Рис. 11.8. Тройная спираль poly(dT)·poly(dA)·poly(dT). Дополнительная цепь poly(dT) (на рисунке слабо окрашена) размещается в главном желобке двойной спирали poly(dT)·poly(dA) A-типа с уотсон-криковскими парами и антипараллельными цепями. Эта цепь идет параллельно poly(dA) и образует с ней хугстеновские пары. Описание деталей графического представления и масштаб даны в подписи к рис. 10.1. Спираль построена по атомным координатам, приведенным в работе [859].

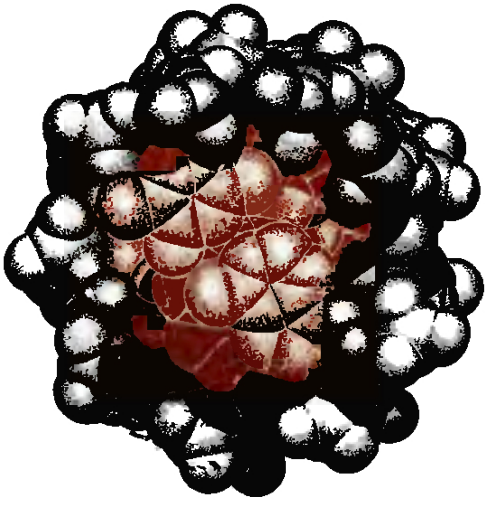


А



Б





данные были получены методом инфракрасного линейного дихроизма на ориентированных пленках ДНК, выделенной из различных вирусов и сильно различающейся по нуклеотидному составу. В этих исследованиях, кроме того, было выявлено наличие еще одного фактора, способствующего B → C-переходу, – низкое GC-содержание образца [911] (рис. 9.1).

До недавнего времени C-ДНК рассматривали как промежуточную форму между A- и B-ДНК, которая образуется при особых сочетаниях солевых условий и влажности, пока не были получены данные, показавшие, что C-ДНК так же важна, как A- и B-ДНК [911a]. Оказалось, что, если уменьшать концентрацию Na^+ и влажность, можно перевести в C-

Рис. 11.9. Структура C-ДНК, построенная по атомным координатам, приведенным в работе [94]. Описание деталей графического изображения и масштаб даны в подписи к рис. 10.1. Приведены вид сбоку и сверху. *А*. Скелетная модель. *Б*. Объемная модель. *В*. Спираль наклонена на угол 32° в сторону от наблюдателя; при таком наклоне хорошо видны минорный (М) и главный (Г) желобки.

форму природные ДНК с GC-содержанием от 31 до 72% и даже гликозилированную ДНК фага T2. Если затем опять медленно добавлять воду, происходит обратимый C → A → B-переход.

C- и B-ДНК имеют сходную структуру. У нецелочисленной двойной спирали C-ДНК, шаг которой равен 30,9 Å и число пар оснований на виток составляет 9,33, структурный мотив повторяется через каждые три витка, или через 28 пар оснований, т.е. спираль обладает симметрией 28_3 (табл. 9.1, дополнение 9.1). Дезоксирибоза имеет конформацию C_3'-*экзо* (или практически эквивалентную ей C_2'-*эндо*), как в B-ДНК. Пары оснований наклонены на угол $-8°$ относительно перпендикулярного к оси положения, поэтому расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали несколько меньше (3,31 Å), чем в B-ДНК. Ось C-ДНК располагается в минорном желобке двойной спирали, $D = -1{,}0$ Å, т.е. в A-ДНК ось спирали находится в главном желобке, в B-ДНК она проходит через пару, а в C-ДНК смещена в сторону минорного желобка (рис. 9.5). Желобки близки по размерам к желобкам B-ДНК; при этом главный желобок несколько мельче, а минорный глубже. В целом по конформационным параметрам C-ДНК похожа на слегка измененную B-ДНК (табл. 9.3).

В C-форму могут переходить не только природные ДНК, но и синтетические полинуклеотиды с определенной последовательностью. Методом рентгеновской дифракции на волокнах была обнаружена не только двойная спираль $9{,}33_1$ с симметрией 28_3, но и две целочисленные спирали с симметрией 9_1 и 18_2 у полинуклеотидов с повторяющимся три- и динуклеотидным мотивами соответственно [824] (табл. 9.1). В случае синтетических полинуклеотидов из повторяющихся блоков, в которых гуанозин замещен на инозин, конформация A-типа заменяется на конформации C- и D-типов. A-ДНК не образуется даже при сильном изменении условий. По-видимому, такое поведение связано с гидратацией ДНК (см. гл. 17).

11.6. *D*-ФОРМУ ОБРАЗУЮТ ТОЛЬКО ДНК, СОДЕРЖАЩИЕ УЧАСТКИ С ЧЕРЕДУЮЩЕЙСЯ A,T-ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ, И ДНК ФАГА T2

Природные ДНК не образуют двойных спиралей *D*-типа. Исключение составляют AT-богатые участки в ДНК с чередующимися последовательностями и ДНК фага T2, которую отличает высокая степень модификации. В этой ДНК вместо цитозина содержится 5-гидроксиметилцитозин, а кроме того, она гликозилирована более чем на 70% (схема 11.1). Конформационные параметры ДНК фага T2 (T-ДНК) близки к таковым для D-ДНК (табл. 9.3 и 9.4).

Синтетические полинуклеотиды, у которых отсутствуют остатки гуанозина, находятся не в A-, а в *D*-форме. Если полинуклеотид poly(dG—dC) находится в основном в A-конформации вплоть до относительной влажности 92% (табл. 9.1), то для poly(dA—dT)·poly(dA—dT)

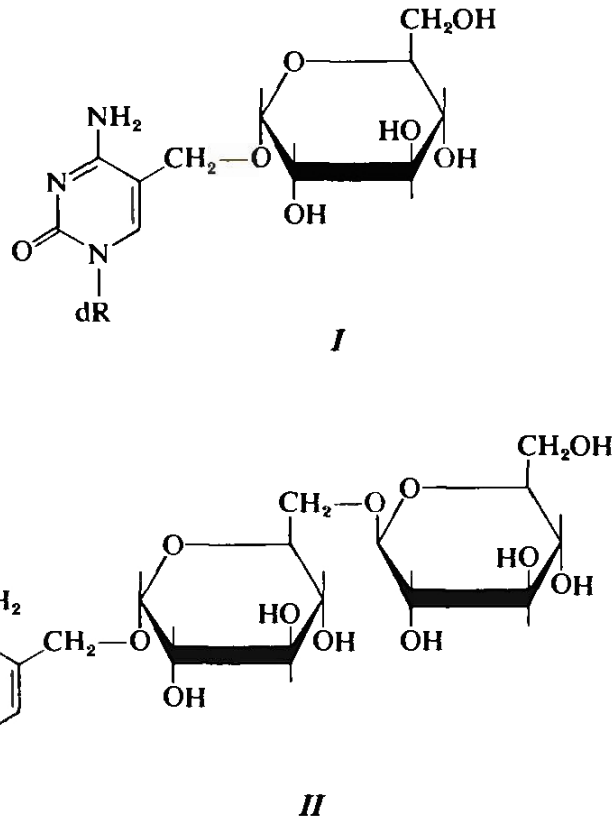
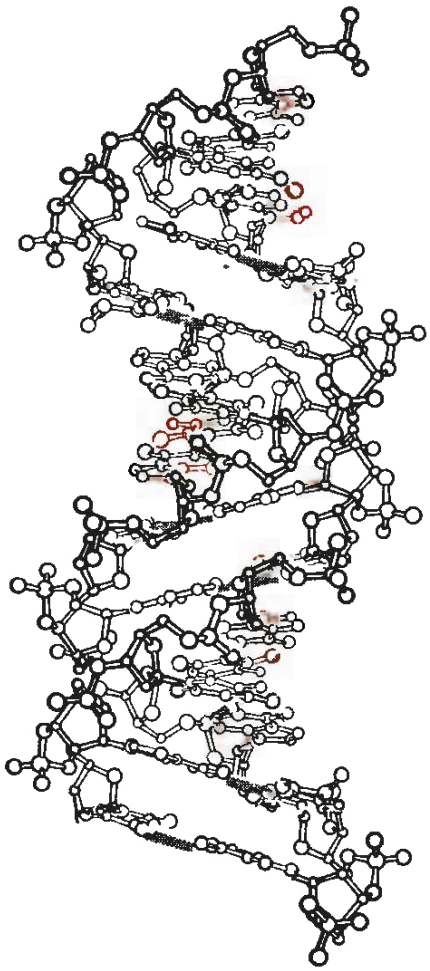


Схема 11.1. Структурные формулы однократно (*I*) и двукратно (*II*) гликозилированного 5-гидроксиметилцитидина, который содержится в ДНК некоторых фагов. dR – дезоксирибоза.

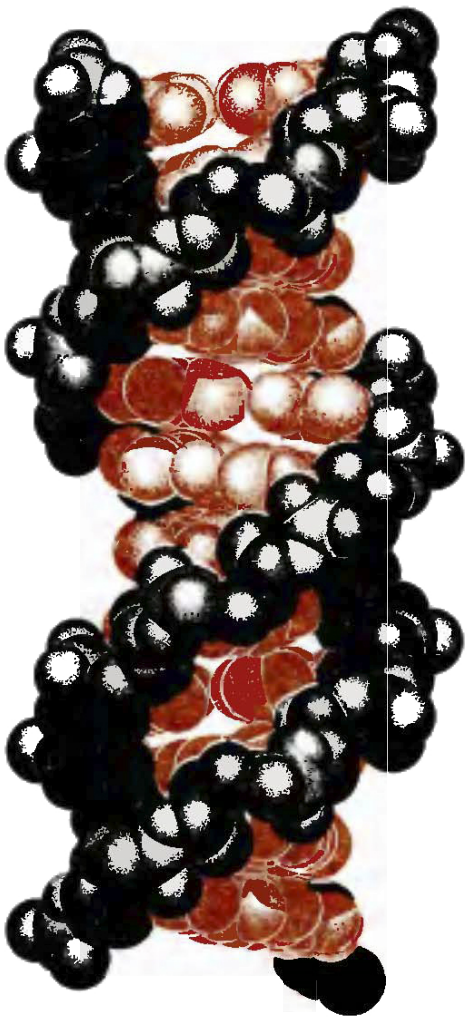
эта конформация представляет собой метастабильное структурное состояние [845, 845a]. Полинуклеотид poly(dA—dA—dT)·poly(dA—dT—dT) образует только структуры B- и D-типов; A-форма не обнаружена также в случае комплементарных полидезоксинуклеотидов, у которых гуанозин замещен на инозин (разд. 11.5).

Двойная спираль *D*-ДНК закручена сильнее, чем B-ДНК, и имеет очень глубокий, узкий минорный желобок – удобную полость для размещения молекул воды и катионов. В D-ДНК, как и в других двойных спиралях B-семейства, фуранозные кольца находятся в конформации $C_{3'}$-*экзо*. По сравнению с B-ДНК эта спираль закручена значительно сильнее: на виток приходится всего восемь пар оснований, высота витка равна 24,3 Å. Отсюда следует, что угол спирального вращения в D-ДНК равен 45°, а расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали составляет 3,03 Å.

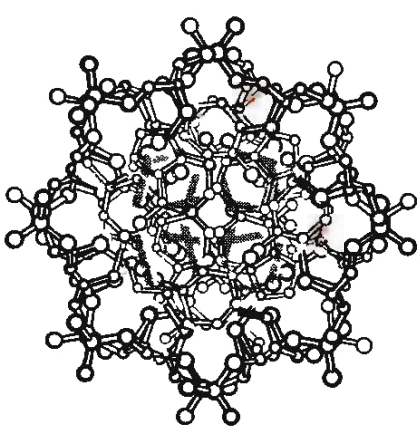
Ось проходит через минорный желобок двойной спирали, $D = -1{,}8$ Å (рис. 9.5); поэтому вандерваальсов диаметр спирали равен 21 Å, а угол наклона пары относительно перпендикулярной к оси плоскости составляет $-16°$ в отличие от угла $+20°$ для A-ДНК (рис. 11.10, табл. 9.4). Поскольку ось спирали проходит через минорный желобок, главный желобок становится более мелким, чем у B- и C-ДНК, а минорный – очень глубоким и узким. Из-за этого в свою очередь фос-

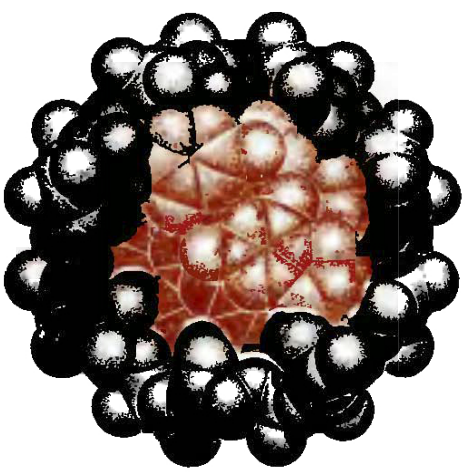


А



Б





фатные и кетогруппы (O_2) противоположных цепей подходят друг к другу настолько близко, что у молекул воды и катионов появляется возможность образовывать поперечные сшивки и тем самым стабилизировать конформацию D-ДНК. В недавно опубликованной работе по poly(dA—dT) предполагается, что этот полинуклеотид образует левую спираль [845а].

ДНК фага Т2 – единственная из известных природных ДНК, находящаяся в *D*-форме. В волокнах при относительной влажности выше 95% эта ДНК находится в В-форме, число нуклеотидов на виток равно 10. По мере уменьшения влажности число пар оснований на виток *постепенно* уменьшается, и при относительной влажности 60% образуется спираль с восемью парами оснований на виток. Из того факта, что В → → Т-переход осуществляется постепенно, можно заключить, что закручивание спирали не сопряжено с преодолением какого бы то ни было энергетического барьера, и параметры спирали ДНК фага Т2 плавно меняются в широком диапазоне значений относительной влажности.

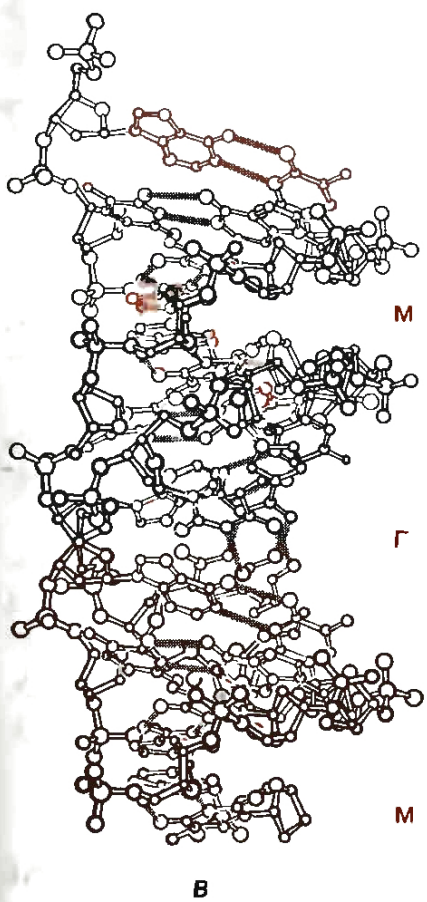


Рис. 11.10. Структура D-ДНК, построенная по атомным координатам для poly(dA—dT), представленным в работе [845]. Описание деталей изображения и масштаб даны в подписи к рис. 10.1. Приведен вид сбоку и сверху. *А*. Скелетная модель. *Б*. Объемная модель. *В*. Спираль наклонена под углом 32° в сторону от наблюдателя; при таком наклоне хорошо просматривается геометрия минорного (М) и главного (Г) желобков.

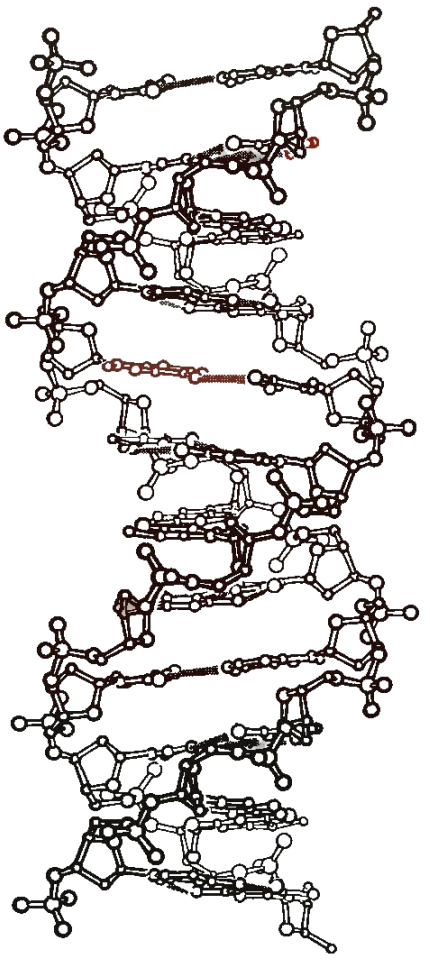
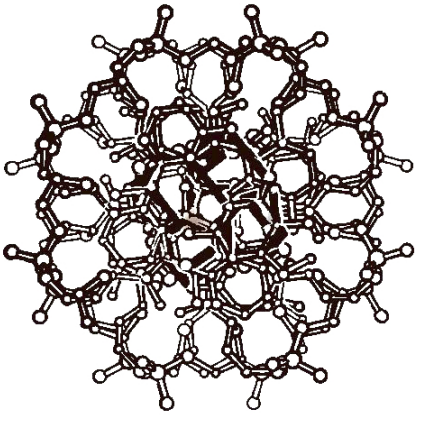


Рис. 11.11. Структура Т-ДНК – геометрического аналога D-ДНК; в этой форме находится ДНК фага Т2 с 5-гликозилированными цитозиновыми остатками. Приведены вид сбоку и сверху двойной спирали 8-го порядка; проекции построены по координатам, приведенным в работе [858]. 5-заместители в остатках цитозина на рисунке не указаны. Описание деталей изображения и масштаб даны в подписи к рис. 10.1.

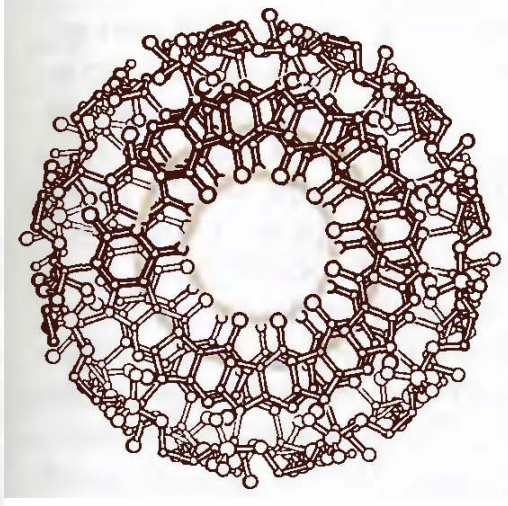


Напротив, у обычных ДНК B → A-переход осуществляется скачкообразно. Это указывает на наличие энергетического барьера между состояниями с конформациями сахара $C_{3'}$-*экзо* и $C_{3'}$-*эндо* [858].

В ДНК фага Т2 на виток спирали высотой 27,2 Å приходится восемь нуклеотидов и, таким образом, расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали равно 3,4 Å. Поэтому для Т-ДНК характерен лишь небольшой отрицательный наклон пар $-6°$, что существенно меньше величины $-16°$, свойственной D-ДНК (рис. 11.11). Сахар находится в $C_{2'}$-*эндо* (или $C_{3'}$-*экзо*)-конформации, что приводит к смещению оси спирали от центра пары на $-1{,}43$ Å, т.е. в сторону минорного желобка. В результате у спирали ДНК Т2 минорный желобок глубокий и узкий, а главный – мелкий и широкий.

11.7. ГИБРИДЫ ДНК–РНК ОБРАЗУЮТ ТОЛЬКО ДВОЙНЫЕ СПИРАЛИ ТИПА A- И A′-РНК. ПОЛИМЕРЫ И ОЛИГОМЕР *r(GCG)d(TATACGC)*. B-СПИРАЛЬ POLY*(A)*·POLY*(dT)*

Гибриды ДНК–РНК имеют большое биологическое значение. Они образуются при транскрипции последовательности оснований ДНК в комплементарную ей последовательность информационной РНК. Процесс



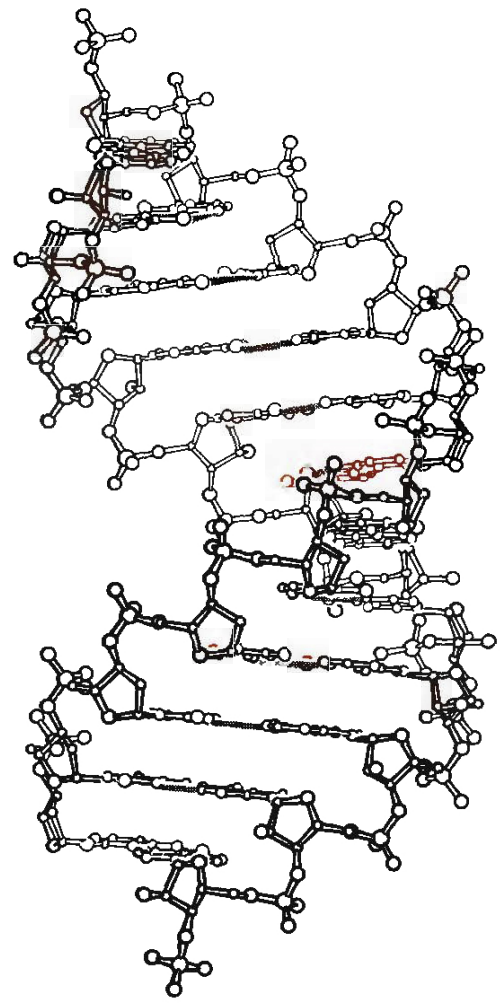


Рис. 11.12. Структура ДНК–РНК-гибрида, poly(I)·poly(dC), в A′-форме. Приведен вид сбоку и сверху. Проекции построены по координатам, приведенным в работе [849]. Описание деталей изображения и масштаб даны в подписи к рис. 10.1.

транскрипции катализирует РНК-полимераза – фермент, который, связываясь с двойной спиралью ДНК, разделяет две ее цепи и синтезирует по одной из них цепь РНК. Следовательно, по крайней мере в области активного центра полимеразы, размер которого эквивалентен длине участка примерно в 40 нуклеотидов, действительно образуется гибрид ДНК–РНК [1017] (разд. 14.4). Гибриды формируются и тогда, когда под действием обратной транскриптазы осуществляется синтез ДНК с использованием РНК (фаговой) как матрицы, а также в ходе репликации ДНК, при образовании коротких молекул РНК-праймеров. Рентгеноструктурные исследования волокон ДНК–РНК и волокон трех синтетических гибридов – poly(A)·poly(dT), poly(dI)·poly(C) и poly(I)·poly(dC) – были проведены в работах [850], [912], [851] и [849] соответственно. Две первые структуры представляют собой спираль 11-го порядка A-типа, а две последние по своим структурным свойствам ближе к спирали 12-го порядка A′-типа.

Структура комплекса *poly(I)·poly(dC)* была изучена детально [849]. Исследование показало, что в этом случае образуется двойная спираль 12-го порядка типа A′-РНК с шагом 35,6 Å; пары оснований смещены от оси спирали на расстояние $D = 4{,}9$ Å и наклонены относительно перпендикулярного к оси положения на угол $+5{,}7°$ (табл. 9.4 и рис. 11.12).

Обе цепи полинуклеотидного комплекса – и цепь ДНК, и цепь РНК – имеют идентичные конформационные углы и построены из нуклеотидов с конформацией сахара C_3-*эндо*.

Гибриды ДНК–РНК, вообще говоря, не способны переходить в спиральные формы В-семейства. Это означает, что структурный консерватизм РНК затрагивает не только дуплексы РНК, но сохраняется даже тогда, когда хотя бы одна из цепей двойной спирали является цепью РНК.

В случае таких гибридов, как poly(dA)·poly(U), изменение окружающих условий может индуцировать образование других структур, в частности трехцепочечных спиралей, обсуждавшихся в разд. 10.2 и 11.4. Но и у них сохраняются конформационные особенности структур А-семейства [913].

Кристаллическая структура *r*(*GCG*)*d*(*TA TACGC*), самокомплементарного декамерного гибрида ДНК–РНК [913а]. Этот декамер представляет собой антипараллельную двойную спираль с уотсон-криковскими парами и со структурными параметрами, характерными для А-РНК. Средний угол спирального вращения равен 33°, расстояние между парами вдоль оси спирали составляет 2,6 Å. На виток спирали приходится 10,9 пары, угол наклона равен $\sim 20°$. Угол пропеллера оснований в паре составляет 14° и имеет тот же знак, что и в додекамере, рассмотренном в разд. 11.2. А-конформацию цепи РНК стабилизируют внутримолекулярные водные мостики $O_2'H\cdots$вода$\cdots O_2$ (цитозин); никаких явных нарушений структурной непрерывности между рибо- и дезоксирибоучастками дуплекса не отмечается. Конформационные параметры указаны в табл. 11.2.

Гибрид *poly*(*A*)·*poly*(*dT*) представляет собой исключение и может переходить в В-форму. Рентгеновская дифракция на волокнах гибридного комплекса poly(A)·poly(dT) показала, что при высокой относительной влажности двойная спираль переходит из А-формы в форму, напоминающую В-ДНК [912]. Это открытие, казалось бы, противоречит утверждению о том, что гибриды существуют только в А-конформации. Но, возможно, исключение, которое составляют гомополимеры poly(A) и poly(dT), неслучайно. Во-первых, как отмечалось в разд. 11.4, дезоксирибоаналог, poly(dA)·poly(dT), является единственным представителем В-спиралей, у которого число пар на виток равно 10,0 (и в волокнах, и в растворе) и который не переходит в другие формы. Такое поведение дезоксирибоаналога частично объясняет, почему переходит в В-форму гибрид poly(A)·poly(dT), состоящий из двух аналогичных гомополимеров. Во-вторых, наличие исключительно АТ-пар обусловливает появление определенной схемы гидратации молекулы, которая, как будет показано в гл. 17, должна способствовать образованию В-формы. Таким образом, повышенная способность гибрида poly(A)·poly(dT) к А → → В-переходу определяется особенностью его нуклеотидного состава. В гибридах ДНК–РНК, содержащих GC-пары, и гибридах со случайными последовательностями такой переход не происходит.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В этой главе мы рассмотрели структуру правых спиралей двухцепочечных ДНК, находящихся в A-, B-, C-, D- и T-формах, и структуру гибридов ДНК–РНК. В случае A-семейства, единственной представительницей которого является A-ДНК (гл. 9), кроме полимерных нуклеиновых кислот природного и искусственного происхождения изучены самокомплементарные тетра- и октамерные олигонуклеотиды. Аналогично в B-семействе, представляемом B-, C-, D- и T-ДНК, изучен додекамерный олигонуклеотид. Рентгеноструктурный анализ монокристаллов додекамера выявил ряд новых деталей спиральной структуры, которые нельзя обнаружить методом дифракции на волокнах, будь то волокна природных ДНК или синтетических полинуклеотидов. Судя по кристаллическим структурам олигодезоксинуклеотидов, конформация всех нуклеотидов в двойных спиралях A-типа одинакова. Совсем по-другому устроены двойные спирали B-типа. Здесь имеют место зависящие от последовательности структурные модуляции, происходящие в соответствии с правилами Калладина. Исходя из данных о кристаллической структуре тетрамера d(pATAT) была построена спираль «B-ДНК с чередованием конформаций», у которой конформации нуклеотидов не эквивалентны друг другу, и предложено объяснение самоорганизации динуклеозидфосфатов d(TpA) в спиралеобразные структуры без соответствующего уотсон-криковского спаривания, но с ярко выраженным стэкингом оснований. Poly(dA)·poly(dT)–конформационно «жесткий» полинуклеотидный дуплекс, который предпочитает находиться в B-форме и может перестраиваться в тройную спираль poly(dA)·2poly(dT), но не переходит в двойную спираль A-формы. C- и D-формы ДНК принадлежат B-семейству. Это двойные спирали соответственно 9-го и 8-го порядков с конформацией сахарных остатков C_2-*эндо*. Гибриды ДНК–РНК образуют спирали A-семейства и не переходят в B-форму. Исключение составляет двойная спираль poly(A)·poly(dT), поведение которой можно объяснить особым нуклеотидным составом, придающим спирали сходство с «жестким» дуплексом poly(dA)·poly(dT).

ГЛАВА **12**

Левые комплементарные двойные спирали — абсурд? Нет, это семейство Z-ДНК

Модели молекул ДНК и РНК — правые двойные спирали — были построены в результате анализа рентгенограмм волокон ДНК и РНК. Так как рентгенограмма сама по себе не позволяет отличить образ от его зеркального изображения или левую спираль от правой, время от времени высказывались серьезные сомнения относительно адекватности предложенной модели ДНК [107–114]. Более того, теоретические расчеты показывают, что из нуклеотидов, имеющих стандартную конформацию, можно построить левую двойную спираль с уотсон-криковскими парами оснований [380, 383]. Лишь совсем недавно результаты рентгеноструктурного анализа монокристаллов олигонуклеотидов (разд. 10.4 и 11.2) и тРНК (гл. 15) полностью подтвердили адекватность правоспиральной структуры.

Имеются ли экспериментальные данные в пользу существования левой двойной спирали? При изучении синтетического полинуклеотида poly (dG—dC) с чередующейся последовательностью была выявлена особая, ранее неизвестная структурная форма. В водном растворе с низким содержанием соли этот полинуклеотид обладает такими же свойствами, что и другие правые спирали, т. е. имеет аналогичный спектр кругового дихроизма и единственный пик резонансного поглощения ^{31}P в спектре ЯМР [905, 914]. Однако при повышении концентрации соли (до 0,7 М $MgCl_2$ или 2,5 М NaCl [914]) или добавлении спирта [915] наблюдается кооперативный переход в другую форму, сопровождающийся инверсией спектра кругового дихроизма (рис. 12.1) и расщеплением пика резонансного поглощения ^{31}P на две линии [905, 914, 915]. Таким образом, данные ЯМР предполагают, что вторая форма — это двойная спираль с двумя типами фосфатных групп, неэквивалентными друг другу. Что касается изменения КД-спектра, то его трудно было объяснить однозначно, так как ни у одной из известных структурных форм спектры такого типа не наблюдались. Следует подчеркнуть, что конформационный переход, о котором идет речь, проявляется только у полинуклеотидов с чередующейся последовательностью: poly (dG—dC), poly (dG—dm^5C), poly (dA—dC), poly (dG—dT), poly (dA—ds^4T) и у галогензамещенного полинуклеотида poly (dI—dBr^5U). Гомополимер с тем же нуклеотидным составом, что и poly (dG—dC), poly (dG)·poly (dC), или рибоаналог poly (rG—rC) ведет себя обычным образом, как и другие поли-

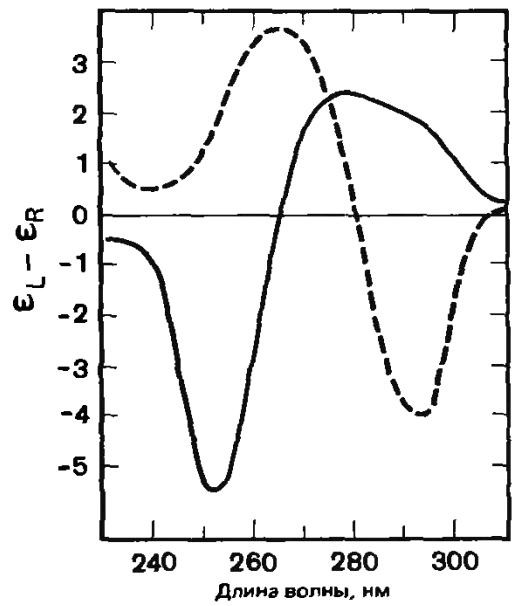


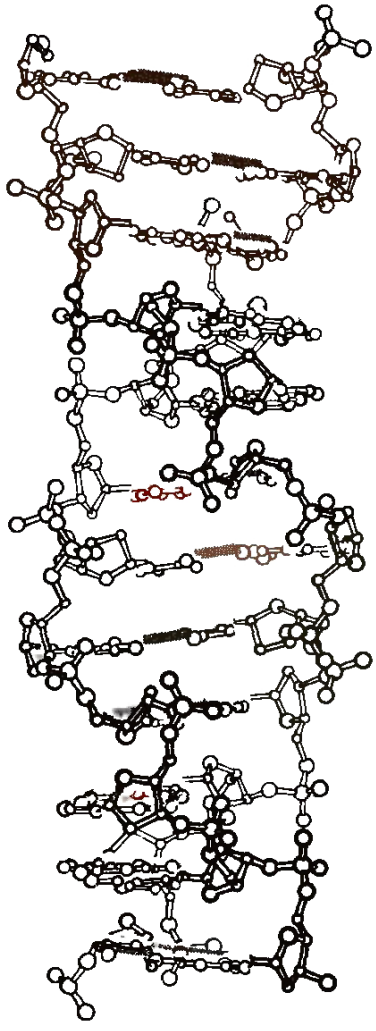
Рис. 12.1. Спектры КД poly(dG—dC) при 0,2 мМ NaCl, pH 7, 25° (——) и после добавления NaCl (— — —) [914].

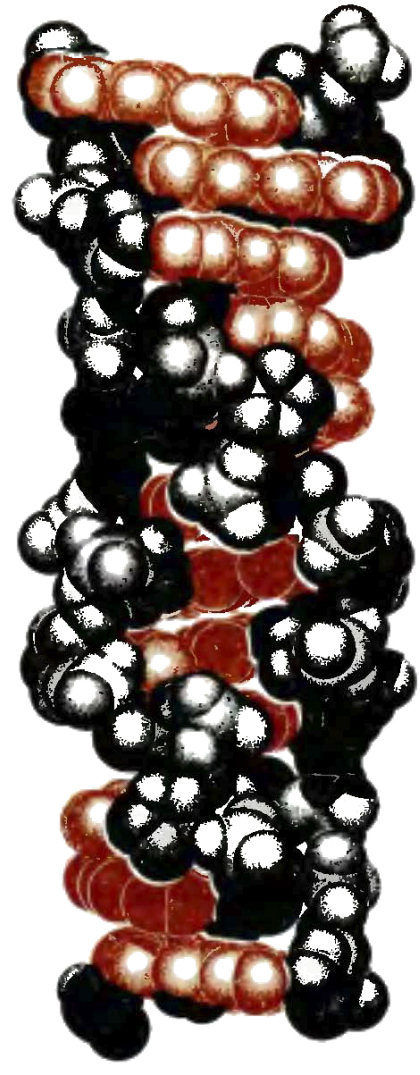
меры с чередующимися последовательностями – poly (dA—dT), poly (dA—dBr^{5}U), poly (dA—dI^{5}U) и poly (dI—dC), в которых гуанин замещен на другие пурины.

12.1. КРИСТАЛЛИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ oligo (dC—dG)– ЛЕВЫЕ ДВОЙНЫЕ СПИРАЛИ

Спор о существовании *левой двойной спирали* был окончательно разрешен после того, как были опубликованы результаты двух рентгеноструктурных работ [302, 303], выполненных на монокристаллах тетрамера d(CpGpCpG) [или d(CGCG)] и гексамера d(CpGpCpGpCpG) [или d(CGCGCG)], т. е. олигонуклеотидов с такой же чередующейся последовательностью, что и у poly (dG—dC). Эти работы однозначно показали, что левая двойная спираль существует [916]. Конформации тетрамера и гексамера оказались почти одинаковыми, хотя условия кристаллизации заметно различались: кристаллизацию гексамера проводили в слабом солевом растворе (15 мМ $MgCl_2$, 10 мМ спермин·4HCl, 5%-ный изопропанол), а тетрамера – при высокой концентрации соли (0,2 М $MgCl_2$, 10%-ный МПД) [917, 918]. Однако и при низкой концентрации соли тетрамер также кристаллизуется в виде левоспирального дуплекса [917, 919]. Эти условия далеки от точки перехода для poly (dG—dC) в растворе, поэтому повышенную стабильность левой спирали в кристаллах приписали влиянию кристаллической упаковки [919].

***Син*-конформация пуринов и *анти*-конформация пиримидинов в левой спирали ДНК.** В кристаллах тетрамера и гексамера oligo(dC—dG) самокомплементарные олигонуклеотиды образуют антипараллельные дуплексы с высотой витка 44,6 ÷ 45,7 Å и с двенадцатью уотсон-криковскими парами на виток (рис. 12.2). В противоположность правым спира-





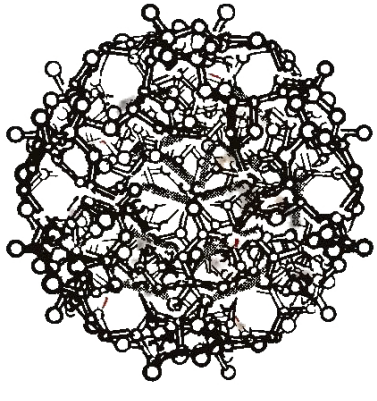


Рис. 12.2. Молекулярная структура левой двойной спирали poly(dG—dC)·poly(dG—dC). Построена по координатам Z_I-ДНК, полученным при изучении структуры гексануклеотида d(CGCGCG). Приведены вид сбоку и сверху. Описание деталей графического представления и масштаб даны в подписи к рис. 10.1.

лям ДНК, у которых все нуклеотиды находятся в одной и той же конформации (исключением является «В-ДНК с чередованием конформаций»), в левой спирали, как видно из рис. 12.3 и табл. 12.1, конформации нуклеотидов dG и dC существенно различаются. Дезоксицитидин имеет стандартную конформацию, т. е. сахар C_2-*эндо*, основание *анти*, угол вращения γ вокруг связи C_4—C_5 + *ск*. У дезоксигуанозина сахар находится в C_3-*эндо*-конформации и, что самое удивительное, основание имеет *син*-конформацию, а γ попадает в область *ап*.

У Z-ДНК торсионные углы δ и χ, определяющие конформацию сахара и вращение вокруг гликозидной связи, не коррелируют друг с другом [920]. В отличие от В-ДНК, для которой наблюдается линейная зависимость δ от χ (как мы видели на примере додекамера, рис. 11.6), для Z-ДНК такой корреляции не обнаруживается (рис. 12.4). Если нанести на график точки (δ, χ) для известных кристаллических структур Z-ДНК, то для пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов они образуют две

Таблица 12.1. Структурные параметры Z-ДНК

	Тип спирали		
	Z_I	Z_{II}	Z_F
Число оснований на виток	12	12	12
Шаг спирали, Å	44,6	44,6	43,5
Угол спирального вращения, град	− 60	− 60	− 60
Расстояние между динуклеотидами вдоль оси спирали, Å	7,43	7,43	7,25
Наклон оснований, град	− 7	− 7	− 5
Расстояние фосфатов от оси спирали, Å			
d(CpG)	6,3	6,1	
d(GpC)	7,3	8,0	

Торсионные углы, град

	Z_I		Z_{II}		Z_F		Z′		Z	
	pG	pC	pG	pC	pG	pC	pG	pC	pG	pC
α	47	− 137	92	146	52	− 110	75	177	70	− 175
β	179	− 139	− 167	164	− 153	− 168	175	− 166	− 174	− 168
γ	− 165	56	157	66	178	54	− 178	51	176	61
δ	99	138	94	147	76	147	122	141	97	143
ε	− 104	− 94	− 179	− 100	− 72	− 103	− 150	− 85	− 142	− 97
ζ	− 69	80	55	74	102	− 91	− 17	71	− 7	77
χ	68	− 159	62	− 148	89	− 159	70	− 160	65	− 154

Примечание. Значения для Z_I- и Z_{II}-форм получены исходя из данных для кристаллической структуры d(CpGpCpGpCpG), для Z- и Z′-ДНК исходя из данных для структуры тетрамера с той же последовательностью [302, 303, 917, 918]; данные для Z_F являются результатом рентгеноструктурного анализа волокон [304].

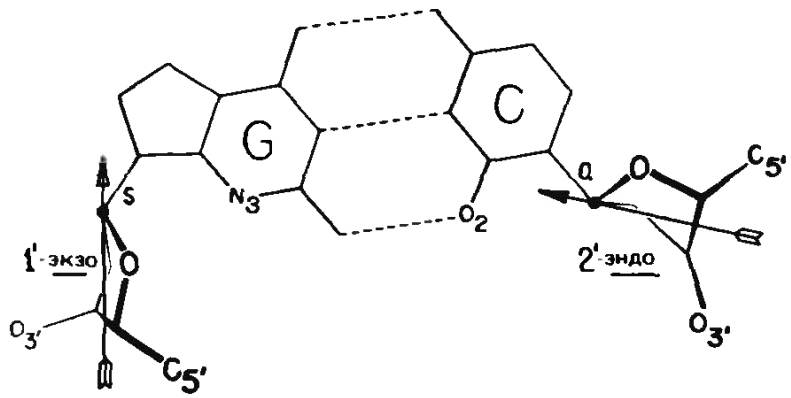


Рис. 12.3. Структура GC-пары в Z-ДНК [895]. Стрелки указывают ориентацию сахарных остатков в дезоксигуанозине, имеющем *син*-конформацию, и в дезоксицитидине, имеющем *анти*-конформацию. Ось 2-го порядка, проходящая через уотсон-криковскую пару, в данном случае отсутствует.

четко разделенные области. У пуриновых нуклеотидов $\chi \sim 70°$ (*син*-конформация), а у пиримидиновых $\sim -160°$ (*анти*-конформация). Каждая область характеризуется своим распределением величин χ и δ: как оказалось, у цитидинов сахар находится в конформации $C_{2'}$-*эндо* ($\delta \sim 140°$), а у гуанозинов конформация сахара может быть разной, от $C_{2'}$-*эндо* до $C_{2'}$-*экзо* (δ варьирует от 100 до 150°). Для угла вращения χ наблюдается обратная тенденция, т.е. гуанозины имеют *син*-конформацию, которая характеризуется узким диапазоном значений χ ($62 \div 78°$), тогда как для цитидинов, находящихся в *анти*-конформации, χ меняется в более широком интервале (от -145 до $-180°$). Такое поведение можно объяснить чисто стерическими причинами. Самое удивительное, что связь между χ и δ, которая так четко прослеживается у B-ДНК (см. рис. 11.6), в случае Z-ДНК не очевидна: если меняется δ, то χ остается неизменным, и наоборот.

Геометрия левой двойной спирали определяется чередованием *син*- и *анти*-конформаций нуклеотидов. В правых двойных спиралях, где все основания образуют уотсон-криковские пары, а все нуклеотиды находятся в *анти*-конформации, через каждую пару и между парами проходят оси 2-го порядка, которые связывают две антипараллельные полинуклеотидные цепи друг с другом. В левых двойных спиралях присутствуют такие же уотсон-криковские пары и такие же антипараллельные цепи, что и в правых, но нуклеотиды находятся то в *син*-, то в *анти*-конформации. Поэтому ось 2-го порядка, проходящая через пару, отсутствует, и остается только ось между парами. Кроме того, из-за чередования *син*- и *анти*-конформаций сахарные остатки в каждой полинуклеотидной цепи ориентированы попеременно то вверх, то вниз в отличие от правых спиралей, в которых все они направлены в одну сторону.

Стэкинг оснований в левой двойной спирали обладает новыми, характерными лишь для этой спирали свойствами (рис. 12.5). Обычная про-

странственная связь между расположением двух соседних пар – спиральное вращение – сохраняется лишь для участков d(GpC), для которых характерно также наличие «нормального» одноцепочечного стэкинга между основаниями G и C. На участках d(CpG) вместо поворота происходит сдвиг пар относительно друг друга. В этом случае наблюдается стэкинг между остатками цитозина противоположных цепей, а остатки гуанина вообще не взаимодействуют друг с другом, но контактируют с атомами $O_{4'}$ соседних дезоксицитидинов. Это взаимодействие было ранее обнаружено в кристаллических структурах некоторых нуклеози-

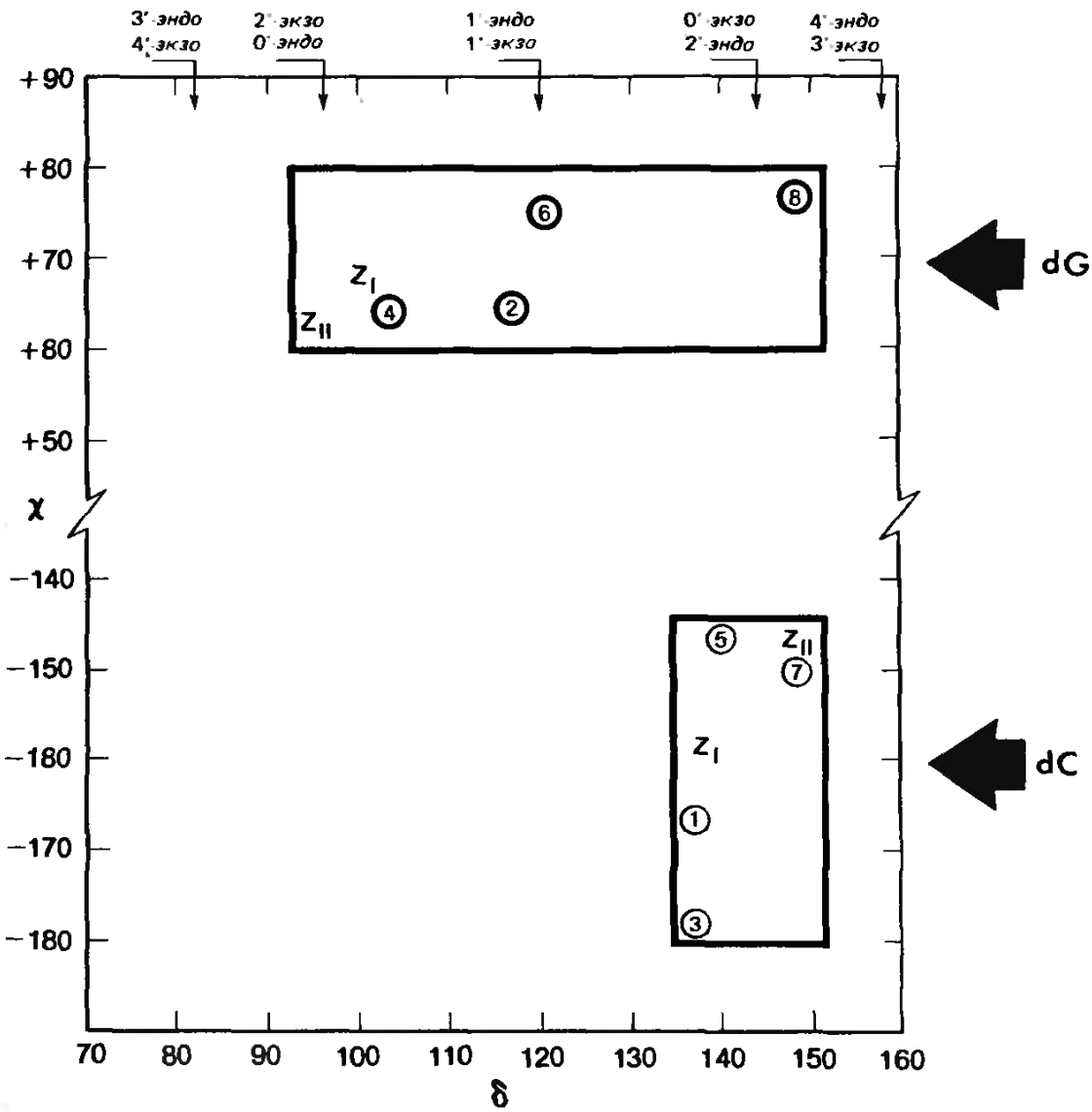


Рис. 12.4. Диаграмма χ/δ для Z-ДНК [895]. Точки от 1 до 8 отвечают нуклеотидам в d(CGCG), точки Z_I и Z_{II} – соответствующим типам структур Z-семейства. В отличие от ситуации, представленной на рис. 11.6, в данном случае линейная корреляция между χ и δ отсутствует, поскольку d(G) находится в *син*-конформации, а d(C) – в *анти*-конформации. Вдоль верхней горизонтальной оси указаны конформации сахара.

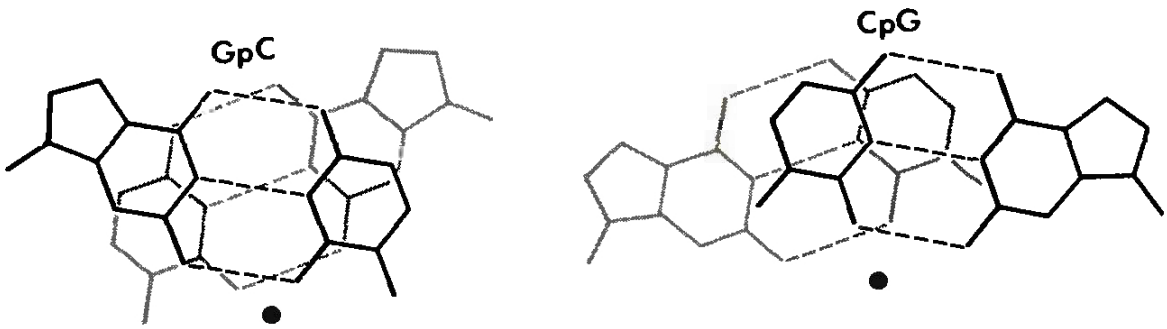


Рис. 12.5. Стэкинг в левоспиральной poly(dG—dC)·poly(dG—dC) для участков d(GpC) (*слева*) и d(CpG) (*справа*). Обратите внимание, что у d(GpC) имеется внутрицепочечный стэкинг между гуанином и цитозином одной цепи, при этом последовательные пары связаны друг с другом винтовой осью. У d(CpG), напротив, имеет место только межцепочечный стэкинг—между цитозинами разных цепей, при этом гуанины взаимодействуют с атомами O_4' соседних дезоксицитидинов. Точки в минорном желобке указывают положение оси спирали. Рисунок выполнен по координатам атомов для Z_I-ДНК, приведенным в работе [917].

дов и нуклеотидов (см. рис. 6.8), но не в полинуклеотидных спиралях. Различие в схеме стэкинга пар отражается на значениях локального угла спирального вращения: он равен $-45°$ для участков d(GpC) и $-15°$ для участков d(CpG), где происходит сдвиг пары. Сумма этих величин, $-60°$, указана в табл. 12.1 как величина угла спирального вращения на один динуклеотид.

Фосфаты в последовательностях d(GpC) и d(CpG) не эквивалентны друг другу. Во всех правых комплементарных двойных спиралях ДНК и РНК (за исключением «В-ДНК с чередованием конформаций») все фосфаты полинуклеотидной цепи эквивалентны, т.е. расположены на одном и том же расстоянии от оси спирали и имеют одинаковое химическое окружение. В противоположность этому левая закрученность полинуклеотида poly (dG—dC) с чередующейся последовательностью приводит к тому, что расстояние фосфата у d(CpG) до оси спирали («фосфатный» радиус спирали) оказывается меньше ($\sim 6{,}2$ Å), чем у фосфата d(GpC) ($\sim 7{,}6$ Å) (табл. 12.1). Поэтому два указанных фосфата становятся химически неэквивалентными, что согласуется с упоминавшимся ранее фактом расщепления пика резонансного поглощения ^{31}P в спектре ЯМР [905].

Почему левую спираль ДНК называют Z-ДНК? Поскольку «фосфатный» радиус спирали меняется, принимая попеременно два разных значения, а соседние сахара «смотрят» в противоположные стороны, линия, последовательно соединяющая атомы фосфора в цепи, перестает быть гладкой, как в двойных спиралях с эквивалентными нуклеотидами, и приобретает зигзагообразный вид. Отсюда и название—Z-ДНК [303] (рис. 12.6).

У левых двойных спиралей есть только минорный желобок, область главного желобка заполнена атомами C_5 цитозина и N_7, C_8 гуанина. Как видно из рис. 12.2, GC-пары расположены не симметрично относитель-

но оси спирали, а немного сдвинуты к периферии. При этом атомы C_5 цитозинов и N_7, C_8 гуанинов располагаются там, где обычно проходит главный желобок, и вместо впадины в этом месте образуется выпуклость. Что касается минорного желобка, через который теперь проходит ось спирали, то здесь ситуация напоминает таковую для C- и D-ДНК: желобок глубокий и узкий и с двух сторон ограничен фосфатными группами.

Имеет ли Z-ДНК в растворе такую же структуру, что и в кристаллах? Распространено мнение, что кристаллическая структура данного соединения обусловлена особенностями его строения в твердом состоянии, а в растворе ситуация может быть иной. Однако на существование новой, фундаментально отличающейся от всех известных ранее Z-формы ДНК указывали спектры КД и ЯМР именно *водных* растворов poly (dG—dC). Позднее для расчета точного спектра ЯМР с учетом вклада кольцевых токов и влияния диа- и парамагнитных составляющих атомной анизотропии были использованы кристаллографические атомные координаты. Поскольку экспериментально полученный спектр poly (dG—dC) в 4 M NaCl совпадает с теоретическим, можно заключить, что, по-видимому, структура Z-ДНК в растворе и в кристаллах одинакова, а если и различается, то очень незначительно. Напротив, экспериментальный спектр B-ДНК сильно отличается от спектра Z-ДНК и согласуется с расчетным спектром, полученным по координатам B-ДНК [921].

Если полинуклеотиды poly (dG—dC) или poly (dG—dm^5C), абсорбированные фосфатом кальция, обработать микрококковой нуклеазой, то

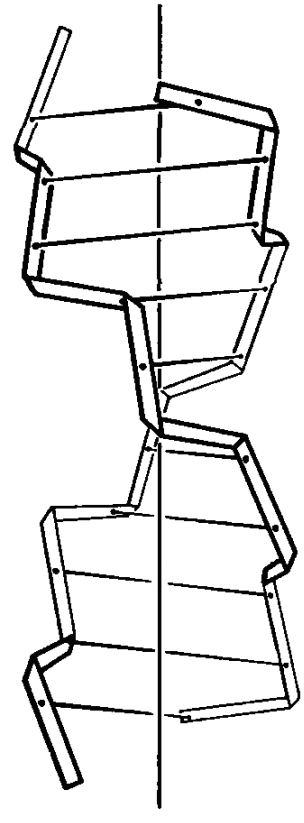


Рис. 12.6. Зигзагообразная линия, соединяющая фосфатные группы в Z-ДНК [895]. Вертикальная прямая – ось спирали, горизонтальные отрезки – пары оснований и сахара'. После остатков гуанина зигзагообразная линия идет вертикально, после остатков цитозинов – горизонтально.

места «предпочтительного» разрезания будут находиться на расстоянии 13,5 пар друг от друга. Это заметно отличается от значения 12,0 пар на виток, полученного на волокнах [922]. Однако такое различие в средней длине витка не должно приводить к заметным изменениям в спектре ЯМР Z-ДНК в области пика резонансного поглощения ^{31}P. В целом, по-видимому, и B-ДНК, и Z-ДНК в растворе слегка раскручиваются из-за гибкости и подвижности ДНК, приводящих к «разрыхлению» структуры и, следовательно, к увеличению шага спирали.

12.2. ЭКСТРАПОЛЯЦИЯ СТРУКТУРНЫХ ДАННЫХ ПО ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМ НА СЛУЧАЙ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ. Z-СЕМЕЙСТВО ДНК: Z-, Z_I, Z_{II}- И Z′-ДНК

На основе данных по кристаллической структуре тетрамера d(CGCG) и соответствующего гексануклеотида была сконструирована структура полинуклеотидных аналогов. Полученные молекулярные модели оказались весьма близки друг к другу, но все же не идентичны: они соотносились между собой как A- и A′-РНК или B- и C-ДНК [303, 917].

Общие для всех двойных спиралей Z-типа особенности описаны выше и суммированы в табл. 12.1. Это двойные спирали 12-го порядка с шагом 44,6 ÷ 45,7 Å, средним расстоянием между динуклеотидными единицами вдоль оси спирали ~7,4 Å и углом спирального вращения −60°. Имеется небольшой отрицательный угол наклона оснований, −7°, относительно перпендикулярного к оси положения. Наконец, левая спираль «тоньше» правых спиралей: ее вандерваальсов диаметр равен 18,1–18,4 Å (ср. с величинами 23 Å у A-РНК и 19,3 Å у B-ДНК).

Различия в молекулярных структурах Z-, Z′-, Z_I- и Z_{II}-ДНК. В кристаллах гексануклеотида с различными катионами структуры участков d(CpG) оказываются почти идентичными. Что же касается участков d(GpC), то они могут находиться в одной из двух форм – Z_I и Z_{II} в зависимости от того, с чем образует координационную связь фосфатная группа – с молекулой воды или с гидратированным ионом магния. Различие в типе координационного связывания приводит к повороту, а следовательно, к смещению фосфата d(GpC) примерно на 1 Å. Именно этим обусловлены различия в углах вращения α и ζ вокруг связей P—O, отмеченные в табл. 12.1. Обе ориентации фосфатной группы стабилизируются внутримолекулярными водными мостиками между атомом N_2 аминогруппы гуанина и атомом кислорода дезоксигуанозин-3′-фосфата d(GpC). Чтобы обеспечить такое взаимодействие, в случае Z_I-формы достаточно одной молекулы воды, а в случае Z_{II}-формы, где фосфат смещен на 1 Å «наружу», нужны уже две молекулы.

При сравнении Z- и Z′-ДНК наблюдается совершенно иная ситуация. Эти формы Z-семейства воссозданы по структуре тетрамера d(CGCG) при низкой и высокой концентрациях соли. В двойной спирали Z′-ДНК у дезоксигуанозинов сахар находится в конформации $C_{1'}$-экзо (разновидность конформации $C_{2'}$-*эндо*), в то же время у Z-, Z_I- и Z_{II}-ДНК кон-

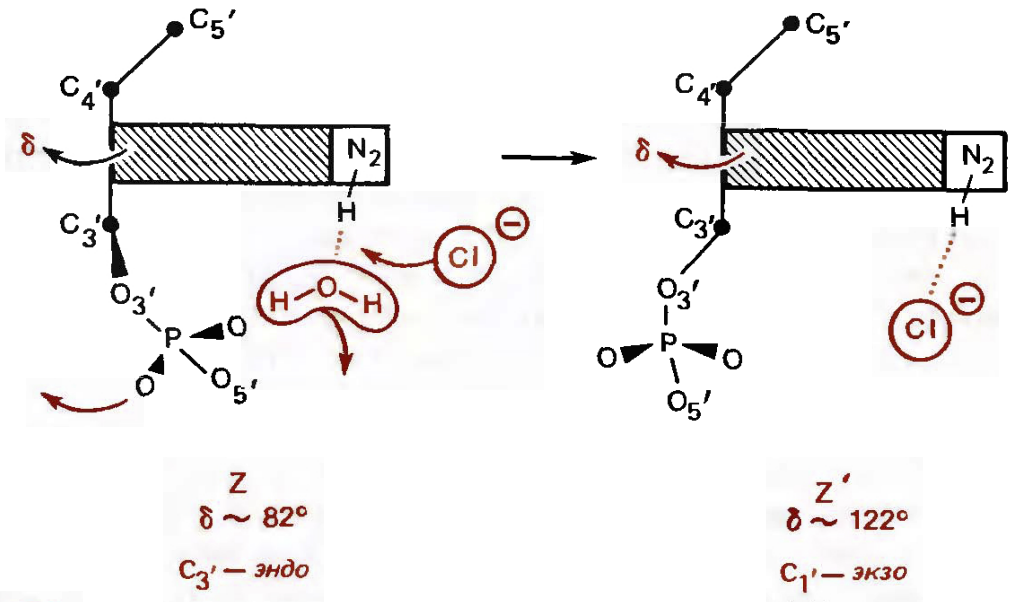


Рис. 12.7. Взаимодействие с растворителем в Z-ДНК [302]. *Слева*: внутринуклеотидный водный мостик между атомом N_2 и 3′-фосфатной группой *син*-дезоксигуанозина. *Справа*: молекула воды замещена на ион хлора, отталкивающий фосфат. Из-за этого торсионный угол δ увеличивается от 82° (конформация сахара $C_{3'}$-*эндо*) до 122° (конформация сахара $C_{1'}$-*экзо*).

формация сахара — $C_{3'}$-*эндо*. Такое изменение формы сахара можно объяснить, если принять во внимание наличие относительно тесных внутримолекулярных контактов $C_{2'} \cdots N_3$ в *син*-дезоксигуанозине Z′-ДНК. При конформации $C_{2'}$-*эндо* эти контакты стали бы еще более тесными, и, следовательно, конформация сахара $C_{2'}$-*эндо* в данном случае стерически запрещена. Благодаря небольшому повороту, приводящему к конформации $C_{1'}$-*экзо*, а в гексануклеотиде (Z_I- и Z_{II}-формах) к $C_{3'}$-*эндо*, невыгодные контакты в системе устраняются.

Специфические взаимодействия с растворителем. Различие в конформации сахара у Z- и Z′-ДНК можно также объяснить разным окружением атома N_2 аминогруппы гуанина. Как показано на рис. 12.7, в дезоксигуанозине между атомом N_2 аминогруппы и 3′-фосфатной группой образуется внутримолекулярный водный мостик. Однако в структуре d(CGCG) с высоким содержанием соли молекула воды, контактирующая с аминогруппой, замещена на ион хлора (Cl^-), который отталкивает фосфат. Это приводит к изменению δ от 82 до 122°, т.е. к изменению конформации сахара от $C_{3'}$-эндо (Z-ДНК) до $C_{1'}$-*экзо* (Z′-ДНК). В данном случае мы являемся свидетелями специфического взаимодействия растворителя с молекулой нуклеиновой кислоты, стабилизирующего определенный тип конформации спирали.

Судя по спектрам КД, poly (dI—dBr^5C) также переходит в Z-форму, хотя и при более высоких концентрациях соли (3,3 M NaCl), чем олигомер $(dG—dC)_8$ (2,5 M NaCl). Таким образом, присоединение Br по положению 5 пиримидина способствует стабилизации Z-ДНК. Другие си-

стемы, не содержащие аминогрупп гуанина, например poly (dI—dC), poly (dA—dT), poly (dA—dBr^{5}U), poly (dA—dI^{5}U) и полирибонуклеотид poly (G—C), вообще не переходят в левоспиральные формы. Исключением в этом ряду является полинуклеотид poly (dA—ds^{4}T) с тиозамещенными в положении 4 тимидинами, который может находиться в Z-конформации. Вообще же наличие аминогруппы гуанина и чередующейся пурин-пиримидиновой последовательности, как оказалось, является важным условием для образования Z-ДНК. Первый фактор обеспечивает благоприятное взаимодействие с растворителем, а второй способствует образованию Z-формы, поскольку пурины легче перевести в *син*-конформацию, чем пиримидины [923].

Формы Z-семейства имеют разную структуру остова, но одинаковый стэкинг. Если сравнить стэкинг соседних пар в четырех типах Z-ДНК, то мы не увидим никаких систематических различий (за исключением описанных выше различий между последовательностями d(GpC) и d(CpG) в пределах каждой формы [920]). Однако в структуре сахарофосфатного остова наблюдаются некоторые модификации. Например, неодинаковы конформации сахаров у дезоксигуанозинов Z-ДНК (C_3'-*эндо*) и Z'-ДНК (C_1'-*экзо*) и ориентация фосфатов в d(GpC) (см. соответствующие значения углов δ, ε и ζ в табл. 12.1).

В этом Z-ДНК в корне отличается от правых спиралей, B-, C- и D-ДНК. У этих форм двойных спиралей, напротив, сахарофосфатный остов, по существу, одинаков, тогда как стэкинг оснований при переходе от B- к D-ДНК заметно меняется, поскольку увеличиваются смещение пар и угол наклона.

Для осуществления B → Z-перехода не требуется расхождения цепей. Процесс превращения правой спирали B-ДНК в левую спираль Z-ДНК протекает, по-видимому, с сохранением общей спиральной структуры и не связан с расхождением цепей. Переход инициируется разрывом нескольких пар оснований, после чего гуанин «закрепляется» в *син*-конформации, а дезоксицитидин поворачивается как целое (при таком повороте *анти*-конформация сохраняется). Затем водородные связи восстанавливаются, и основания вновь образуют уотсон-криковские пары [303]. Это означает, что полного расхождения цепей не требуется, и область B → Z-перехода перемещается вдоль спирали в виде небольшой петли.

Если в спирали B-ДНК осуществляется переход в Z-форму, можно ожидать, что этот процесс будет зависеть от нуклеотидной последовательности. Так как расстояние между фосфатами нуклеотидной пары в B-ДНК, равное ~ 17,5 Å, ближе к значению ~ 15 Å, характерному для участков Z-ДНК d(GpC), чем к ~ 12,5 Å для d(CpG), то B → Z-переход, вероятно, в первую очередь будет происходить на участках d(GpC). В любом случае в месте стыка B- и Z-форм стэкинг оснований нарушится и на границе раздела будет присутствовать по крайней мере одна пара оснований с разорванными водородными связями. Эта модель экспериментально подтверждается: процесс превращения правой спирали

в левую характеризуется большой величиной энергии активации, 21 ккал·моль$^{-1}$ [914].

Термодинамические исследования показали, что переход B ⇄ Z кооперативен [914]. Это означает, что, если в двойной спирали B-ДНК образуется зародыш Z-формы, он индуцирует B ⇄ Z-переход в соседних парах и, таким образом, разрастается по полинуклеотидной цепи. B ⇄ Z-переход, как и переход B ⇄ A, практически не зависит от температуры ($\Delta H \sim 0$ ккал·моль$^{-1}$) и этим отличается от B⇄C-перехода ($\Delta H = -10$ ккал·моль$^{-1}$), у которого равновесие сдвигается в сторону образования C-формы при понижении температуры.

12.3. ЛЕВАЯ СПИРАЛЬ Z-ДНК В ВОЛОКНАХ ТРЕХ ПОЛИДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ С ЧЕРЕДУЮЩЕЙСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ

После того как расшифровка кристаллической структуры oligo (dC—dG) подтвердила факт существования левоспиральной Z-ДНК, стала возможной интерпретация рентгенограмм волокон poly (dG—dC), полученных при относительной влажности 44% и концентрации соли 3–6%, которые ранее не находили объяснения [304]. Оказалось, что шаг спирали poly (dG—dC) (43,5 Å) немного меньше, чем у oligo (dG—dC), но остальные конформационные параметры очень близки. Аналогичная рентгенограмма была получена также от волокон другого полинуклеотида с чередующейся последовательностью – poly(dG—dT)·poly (dA—dC). Следовательно, несмотря на то что спираль poly (dA—dT)·poly (dA—dT) не только не переходит в Z-форму, но даже не может находиться в D-форме, замена A на G вносит настолько сильные изменения в структурные свойства, что образуется уже не D-, а Z-форма. Маловыразительная рентгенограмма волокна poly (dA—ds^{4}T)·poly (dA—ds^{4}T), которую сначала рассматривали как результат дифракции на правой двойной спирали с симметрией 14_2 и повторяющимся структурным элементом – динуклеотидом, теперь получила другое объяснение – в терминах левоспиральной структуры [304]. Следует отметить, однако, что для этого пришлось привлечь дополнительную информацию, поскольку не очень хорошую рентгенограмму всегда можно проинтерпретировать разными способами.

12.4. ФАКТОРЫ, СТАБИЛИЗИРУЮЩИЕ Z-ДНК

Спермин в концентрации 2 мкМ стабилизирует Z-ДНК. Существует ли Z-ДНК только при высоких концентрациях соли и спирта (разд. 12.1) или B ⇄ Z-переход может происходить и в условиях, близких к физиологическим? Этот вопрос особенно важен при планировании биологических экспериментов с Z-ДНК. B ⇄ Z-переход можно индуцировать при существенно более низкой концентрации соли, если добавить в систему

Таблица 12.2. Концентрация катионов или этанола в средней точке B ⇄ Z-перехода для полинуклеотида poly(dG—dC)·poly(dG—dC) и его аналога, содержащего метилированный цитозин

Ион	poly(dG—dC)· ·poly(dG—dC)	poly(dG—dm^5C)· ·poly(dG—dm^5C)
Na^+ [927]	2500 мМ	700 мМ
Mg^{2+}	700 мМ	0,6 мМ
Ca^{2+}	100 мМ	0,6 мМ
Ba^{2+}	40 мМ	0,6 мМ
$Co(NH_3)_6^{3+}$	0,02 мМ	0,005 мМ
Спермидин$^{3+}$	Агрегация	0,05 мМ
Спермин$^{4+}$	»	0,005 мМ
Этанол	60% (объемн.)	20% (объемн.)
Mg^{2+} + 20%-ный этанол [924a]	0,4 мМ	
Mg^{2+} + 10%-ный этанол	4 мМ	

спирт, двухвалентные ионы или спермин в концентрации до 2 мкМ (табл. 12.2).

Z-форму ДНК можно также получить при помощи химических модификаций. Если в остатки гуанина poly (dG—dC) в положение 8 ввести в качестве заместителя N-2-ацетиламинофтор или бром, это приведет к стерическим последствиям, которые обсуждались в разд. 4.7. Как видно из рис. 2.10, *А*, в данном случае более выгодной становится *син*-конформация гуанина, а следовательно, и образование Z-формы ДНК [925, 926]. Метилирование цитозина по положению 5 также приводит к стабилизации Z-ДНК [926]. Точка перехода сдвигается в область более низких, чем у неметилированного полимера, концентраций соли (табл. 12.2). В обоих случаях B→Z-переход происходит почти при физиологических условиях, и такие полимеры можно использовать для экспериментов с Z-ДНК in vivo.

12.5. ИМЕЕТ ЛИ Z-ДНК БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ?

Существует ли Z-ДНК in vivo или это экспериментальный артефакт? Если Z-ДНК действительно существует, то какова ее роль в функционировании ДНК? Хотя этот вопрос возник совсем недавно и потому на него трудно дать полный ответ, все же полученные данные свидетельствуют о том, что Z-ДНК имеет биологический смысл.

Переходу B→Z способствует наличие последовательности (dm^5C—dG). В ДНК эукариот последовательность (dm^5C—dG) встречается довольно часто (главным образом из-за метилирования ДНК), что сопряжено с работой аппарата регуляции транскрипции генов [928]. Как видно из табл. 12.2, полинуклеотид poly(dG—dm^5C)·poly (dG—dm^5C) при физиологических условиях образует Z-форму. Следовательно, вполне возможно, что наиболее длинные участки последова-

тельности (dG—dm^5C) в молекуле ДНК находятся в Z-форме. К какому же результату может привести появление Z-ДНК в геноме?

Включение в плазмиду участка, находящегося в Z-форме, меняет топологию этой молекулы. Плазмиды – замкнутые кольцевые молекулы двухцепочечных ДНК – разрезали, встраивали в них участки с последовательностью poly (dG—dC) и вновь замыкали в кольцо [929, 929а]. Как мы увидим в гл. 19, кольцевые замкнутые ДНК могут образовывать сверхспирали (т. е. спирали из замкнутой двухцепочечной ДНК). При высокой плотности сверхвитков в $(dG—dC)_n$-блоках таких плазмид даже при физиологических условиях (200 мМ NaCl) происходит B→ →Z-переход. Более того, в соответствии со сказанным выше, замена dC на dm^5C во фрагментах (dG—dC) способствует переходу и, что самое удивительное, если уменьшать концентрацию NaCl, можно получить Z-форму даже при меньшей плотности сверхвитков. Как отмечается в работе [929], в данном случае B→Z-переход является неполным: в месте перехода от B- к Z-форме имеется участок длиной в 11 пар оснований, который находится в состоянии, промежуточном между левой и правой спиральными формами.

Примечательно, что даже если длина фрагментов (dG—dC) составляет всего лишь 1,3% от полной длины плазмидной ДНК, параметры сверхспирализации плазмиды уже радикально изменяются. Как показано в гл. 19, чередование B- и Z-форм в плазмиде меняет райзинг и кручение, т. е. параметры, описывающие общую топологию кольцевой замкнутой ДНК. Таким образом, B→Z-переход модифицирует общую структуру ДНК, а следовательно, может оказаться важным для регуляции экспрессии генов.

И последний вопрос, на который осталось ответить: существует ли Z-ДНК in vivo?

Z-ДНК обнаружена в политенных хромосомах. При инъекции кроликам модифицированных poly (dG—dC), которые при физиологических условиях находятся в Z-форме (разд. 12.4), удается вызвать образование у них антител к Z-ДНК. Такие антитела были выделены, в них ввели флуоресцентную метку, а затем инкубировали с политенными хромосомами *Drosophila melanogaster* [925]. Это особая форма хромосом, которая состоит из тысячи и более хроматид, уложенных бок о бок без какого-либо сдвига, что позволяет усилить любой сигнал, который с помощью обычных хромосом обнаружить невозможно. В результате эксперимента были зафиксированы яркие флуоресцирующие полосы, которые однозначно указывали на наличие Z-ДНК в междисковых областях политенных хромосом.

Этот эксперимент доказывает, что Z-ДНК в хромосомах действительно существует. Хотя описанные исследования проведены in vitro, тем не менее есть основания полагать, что in vivo в хромосомах также содержатся участки Z-ДНК. В этой связи интересен следующий факт. Полинуклеотид poly (dG—dm^5C) при низкой концентрации соли, т. е. в условиях, когда он находится в B-форме, связывается с гистоновыми

октамерами и образует нуклеосомы [925а]. Однако при высокой концентрации соли, когда полинуклеотид имеет конформацию левоспиральной Z-ДНК, он хотя и связывается с гистонами, но характерных нуклеосомных частиц уже не образует (гл. 19). Следовательно, нуклеосомные частицы может образовывать только В-ДНК; переход в Z-форму разрушает структуру нуклеосомы, а значит, и структуру состоящего из нуклеосом хроматина.

Тем не менее биологическая роль Z-ДНК еще не вполне ясна. Возможно, она выполняет какую-то регуляторную функцию, тем более что В→Z-переход обратим. Регуляция экспрессии может включать и сверхспирализацию [925], и связывание с белками, специфичными к Z-ДНК, и связывание с определенными катионами типа спермидина (табл. 12.2), и метилирование d(C).

Левая спираль Z-ДНК транскрибируется и взаимодействует с лекарственными препаратами. Было показано, что $MgCl_2$ и этанол действуют синергично и переводят poly (dG—dC) в Z-форму даже тогда, когда их концентрация очень мала (табл. 12.2) [924а]. Z-ДНК, которая при этом продуцируется, седиментирует быстрее, чем такая же Z-ДНК, образующаяся при высокой концентрации соли, поэтому ее назвали Z*-ДНК. Z*-ДНК служит матрицей для РНК-полимеразы *E. coli*, причем скорость транскрипции примерно вдвое меньше, чем в случае правой спирали poly (dG—dC). Неясно, однако, действительно ли РНК-полимераза транскрибирует Z*-ДНК или левая спираль в ходе транскрипции преобразуется в правую. Z*-ДНК, кроме того, связывается с интеркалирующими соединениями – этидием и актиномицином D, а также образует комплекс с неинтеркалирующим антибиотиком – митрамицином.

Итак, обнаружение Z-ДНК – это еще одна веха в истории структурных исследований ДНК. Изучение биологической роли Z-ДНК уже началось, и есть основания надеяться, что оно поможет понять механизм экспрессии генов, пока до конца не установленный.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Если полинуклеотид poly (dG—dC) поместить в водный раствор с высокой концентрацией $MgCl_2$, NaCl или спирта, то образуется левая двойная спираль – Z-ДНК. У этой спирали сохраняется уотсон-криковское спаривание оснований, однако у гуанозина сахар находится теперь в $C_{3'}$-*эндо*-конформации, основание – в *син*-ориентации и угол γ лежит в области *ап*, тогда как для цитидина соответствующие параметры – это $C_{2'}$-*эндо*, *анти* и + *ск*. В зависимости от условий среды образуются Z-, Z_I-, Z_{II}- и Z′-ДНК, которые составляют Z-семейство. Z-форму стабилизируют спермин, двухвалентные катионы и введение определенных химических модификаций. Z-ДНК, по-видимому, имеет определенное биологическое значение. Она обнаружена в хромосомах дрозофилы и, вероятно, участвует в регуляции сверхспирализации ДНК (гл. 19).

ГЛАВА 13

Структура синтетических гомополимеров

Обратимся к рис. 6.1, из которого видно, что спаривание оснований путем образования водородных связей не ограничивается взаимодействиями между комплементарными партнерами. Однотипные основания тоже могут ассоциировать, и, хотя эти ассоциаты менее стабильны, чем комплементарные пары, тем не менее результаты рентгеновской дифракции на монокристаллах подтверждают, что во многих случаях подобные ассоциаты образуются [192].

Антипараллельная и параллельная ориентация цепей в двойных спиралях гомополимеров. Если принять во внимание возможность спаривания однотипных оснований, то образование ассоциатов однотипных гомополимеров перестает вызывать удивление. Пары оснований в таких двухцепочечных структурах могут и не быть симметричными; так, например, в случае poly(s^2U)·poly(s^2U) ось 2-го порядка, расположенная в плоскости пары, связывает между собой гликозидные связи C_1·—N не точно, а лишь приблизительно (рис. 13.1), и полинуклеотидные цепи, как и в уотсон-криковских двойных спиралях, антипараллельны. В случае дуплексов с симметричными парами, например в двойной спирали poly(AH^+)·poly(AH^+), которая образуется в кислых растворах, наблюдается совершенно иная ситуация. Здесь ось 2-го порядка, связывающая гликозидные связи, *перпендикулярна* плоскости пары и совпадает с осью спирали (рис. 13.1). В результате два сахарофосфатных остова переходят друг в друга при повороте вокруг оси спирали на 180° и ориентированы параллельно, а на периферии двойной спирали образуются два совершенно одинаковых желобка, т.е. на самом деле имеется только один тип желобка.

Параллельные цепи в четырехцепочечных спиралях. С другим удивительным свойством гомополимеров мы сталкиваемся при рассмотрении полинуклеотидов poly(G) и poly(I) [2-дезаминированного аналога poly(G)], каждый из которых образует четырехцепочечную спираль. В этих спиралях поворотная ось 4-го порядка совпадает с осью спирали, в результате образуется жгут из четырех идентичных полинуклеотидных цепей и опять имеется только один тип желобка.

Одноцепочечные спирали. Картина еще более усложняется тем, что гомополимеры могут также существовать в виде одноцепочечных спи-

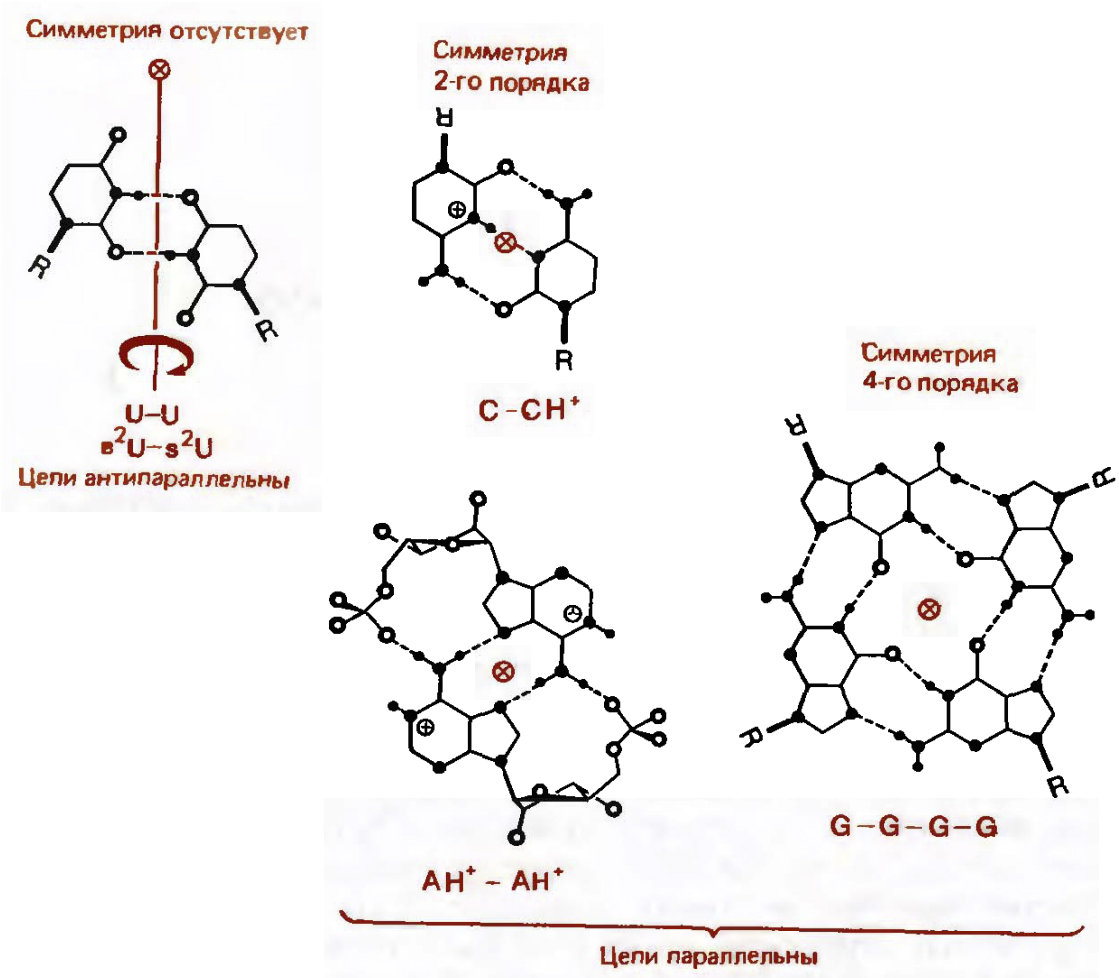


Рис. 13.1. Схемы спаривания оснований, обнаруженные у самоассоциатов гомополимеров. Образование несимметричных пар U—U и s^2U—s^2U приводит к *антипараллельной* (как у двойных спиралей А-РНК) ориентации полинуклеотидных цепей. У симметричной пары AH^+—AH^+ и у наполовину протонированной пары C—CH^+ ось симметрии 2-го порядка совпадает с осью спирали, поэтому имеет место *параллельная* ориентация цепей. Тетрамер G—G—G—G образуется в гелях гуанозина и гуаниловой кислоты, а также в спирали $[poly(G)]_4$. Поворотная ось 4-го порядка совпадает с осью спирали, что приводит к параллельной ориентации заместителей при N_9, т.е. сахаров в гелях и сахарофосфатных цепей в полинуклеотидах.

ралей. В растворе гомополинуклеотиды имеют по крайней мере частично упорядоченную структуру, которая не могла бы сформироваться, если бы нуклеотидам в цепи не удавалось поддерживать стандартную конформацию [818, 930–932]. Упорядоченность сохраняется и в том случае, если разрушить возможный стэкинг, нагрев раствор, и, по существу, не меняется даже при апуринизации, приводящей к отщеплению почти половины оснований полидезоксинуклеотида [933]. Это предполагает, что упорядоченность структуры обусловлена не стэкингом оснований, а заторможенностью вращения вокруг связей в сахарофосфатном остове.

Гомополимеры – это не только синтетические модельные системы. Они обнаружены и в природных соединениях в виде участков poly(A) длиной ~200 нуклеотидов, которые ковалентно связаны с 3′-концом молекул полидисперсной ядерной РНК и информационной РНК в клетках животных и во многих вирусах [934, 935].

Как мы вскоре убедимся, структура гомополимеров гораздо более разнообразна, чем структура уотсон-криковских РНК и ДНК. Следовательно, образование комплементарных пар налагает на молекулу стереохимические ограничения, которые в конечном счете и определяют границы структурного многообразия двойных спиралей.

13.1. ПРАВЫЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ СПИРАЛИ СО СТЭКИНГ-ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ ОСНОВАНИЙ, ОБНАРУЖЕННЫЕ У ПОЛИНУКЛЕОТИДА POLY(C) И У ЕГО O_2-МЕТИЛИРОВАННОГО АНАЛОГА

Давно известно, что гомополимер poly(C) находится в водном растворе в спиральном состоянии [930, 936–942]. Он образует две разные высокоупорядоченные формы: одну при pH 7,0, другую при pH 4,5, вблизи p*K* цитидина. Было высказано предположение, что при низком pH образуется двойная спираль с параллельными цепями и наполовину протонированными парами CH^+—C, показанными на рис. 13.1. По данным ИК-спектроскопии, такие пары действительно присутствуют как в растворе, так и в кристаллах [943]; об этом же свидетельствуют и результаты рентгеноструктурного анализа монокристаллов цитозинуксусной кислоты [944] и 1-метилцитозингидроиодида [945]. Результаты первых работ по рентгеновской дифракции на волокнах poly(C), полученных при pH 5 [103], тоже указывали на образование такого комплекса, но более поздние рентгенограммы рассматривались как результат дифракции на одноцепочечной спирали [104]. Следует подчеркнуть, однако, что результаты этого более позднего исследования [104] не исключали возможности образования двойной спирали poly(CH^+)·poly(C). Такую спираль можно было бы идентифицировать по рентгенограмме волокна аммонийной соли poly(C), которая существенно отличалась от рентгенограммы одноцепочечной спирали poly(C). Однако рефлексы на такой рентгенограмме были слишком размытыми, чтобы можно было интерпретировать ее однозначно [104].

Одноцепочечная спираль *poly(C)* принадлежит A-семейству. Как видно из рис. 13.2, шесть нуклеотидов poly(C) образуют виток правой спирали. Расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали составляет 3,11 Å. Сахара находятся в стандартной конформации $C_{3'}$-*эндо*, значения торсионных углов указаны в табл. 9.3. Все эти параметры близки к таковым для A-РНК, за исключением угла вращения ε вокруг связи $C_{3'}$—$O_{3'}$, который у poly(C) равен $-129°$. Эта величина ближе к значениям ε для мононуклеотидов, чем для двойных спиралей A-типа. Следовательно, в одноцепочечных спиралях стандартная конформация

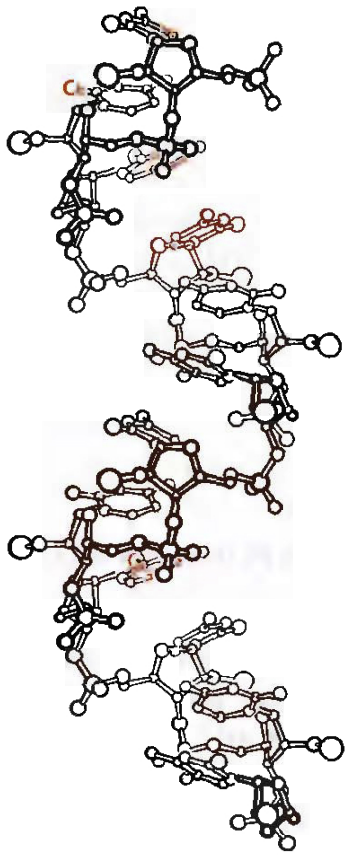
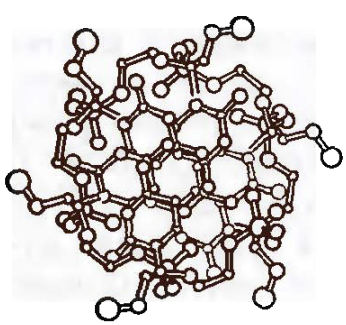


Рис. 13.2. Структура одноцепочечной спирали poly(2′-O-метил-C), построенная по координатам, которые приведены в работе [947]. Кружки наибольшего диаметра отвечают метильным группам. Незамещенный полинуклеотид poly(C) имеет фактически такую же структуру. Описание деталей изображения и масштаб даны в подписи к рис. 10.1.



нуклеотидов сохраняется лучше, чем в стереохимически более жестких двойных спиралях. Угол наклона оснований в poly(C) довольно велик ($\gamma_T = 21°$, табл. 9.4) и не ложится на прямую, приведенную на рис. 9.4, откуда следует, что линейная зависимость между h и γ_T выполняется только для дуплексов с комплементарными парами оснований.

В одноцепочечной спирали poly(C) нет никаких других явных стабилизирующих факторов, кроме стэкинга оснований и стерических ограни-

чений, которые налагает стандартная геометрия нуклеотидов на геометрию сахарофосфатного остова. Неоднократно обсуждалась возможность образования водородной связи $O_2'—H\cdots O_4'$ между соседними нуклеотидами. Как показано в разд. 13.5, такая связь могла бы образовываться только при помощи водного мостика, поскольку расстояние $O_2'H\cdots O_4'$ много больше, чем 3 Å.

Этот вывод подтверждают физические и структурные свойства полинуклеотида poly(2′-O-метил-C) – аналога poly(C) с метилированными атомами O_2' гидроксилов. Оба полимера имеют почти идентичные термодинамические и спектроскопические свойства [239, 946]. Как показывает рентгеноструктурный анализ волокон, структура poly(2′-O-метил-C), по существу, повторяет структуру poly(C), только в данном случае на периферии одноцепочечной спирали располагаются метильные группировки [947] (рис. 13.2). Сахарные остатки находятся в конформации C_3'-*эндо*, о чем свидетельствует величина угла δ (табл. 9.3). Такой же результат был получен путем классических расчетов потенциальной энергии, выполненных для динуклеотидфосфата GpC [948].

Однако в случае мономерного 2′-O-метилцитидина и теория [949], и кристаллографический эксперимент [950] приводят к другому результату – C_2'-*эндо*-конформации. Таким образом, фосфорилирование атома O_3' и образование полимера могут менять конформацию сахарных остатков.

Обсуждение структуры одноцепочечной спирали poly(C) было бы неполным, если бы мы не упомянули об одном недавнем исследовании. Методом ЯМР было показано, что в нейтральном водном растворе poly(C), вероятно, существует в виде левой одноцепочечной спирали, у которой виток состоит из восьми нуклеотидов [950а]. Расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали составляет 2,9 Å, и, следовательно, шаг спирали равен 23,2 Å. По-видимому, здесь мы имеем дело с совершенно новым видом спиральной структуры, геометрические характеристики которой очень сильно отличаются от характеристик, полученных с помощью рентгеновской дифракции на волокнах poly(C). Это следует и из общего вида левой спирали – рибозофосфатный остов находится внутри структуры, а основания снаружи, как у правой спирали poly(dT) (разд. 13.4). Следовательно, стэкинг между остатками цитозина в данном случае отсутствует, и два соседних остатка цитозина взаимодействуют друг с другом путем образования водородной связи $N_4H\cdots O_2$. Предложенную (гипотетическую) спиральную структуру стабилизирует еще одна водородная связь: между группой $O_2'H$ и фосфатом, расположенным на 3′-конце того же нуклеотида. Сахара имеют конформацию C_3'-*эндо*, основания – *анти*. Необычен угол вращения γ вокруг связи $C_4'—C_5'$ – он лежит в области *си*; углы вращения α и ζ вокруг связей P—O находятся в области – *ск*.

13.2. ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ СПИРАЛИ POLY(A) 9-го И 2-го ПОРЯДКОВ С ОСНОВАНИЯМИ «ВНУТРИ» И «СНАРУЖИ»

В зависимости от *pH poly(A)* существует либо в виде одноцепочечной, либо в виде двухцепочечной спирали. Подобно poly(C), poly(A) также образует упорядоченные структуры двух типов: при нейтральных и щелочных pH преобладает одноцепочечная спираль, которая превращается в двухцепочечную, если остатки аденина (в положении N_1) протонируются, т.е. при pH ниже ~ 4. Эти две модификации poly(A) стали объектом целого ряда термодинамических исследований, опирающихся на спектроскопические [331, 930–932, 951, 952] и теоретические методы [955, 956]. Переход «одноцепочечная спираль $\rightleftarrows$ двойная спираль» зависит от температуры, pH и концентрации соли [954]. Переход спираль–клубок кооперативен для двойной спирали и некооперативен в случае одноцепочечной спирали [952].

Структурные особенности одноцепочечной спирали *poly(A)* 9-го порядка. Согласно спектроскопическим данным, одноцепочечная спираль poly(A) является правой спиралью и принадлежит A-семейству, поскольку сахарные остатки находятся в C_3'-*эндо*-конформации. Основания находятся в *анти*-конформации и уложены параллельно друг над другом. Отвечающая этим характеристикам структурная модель, приведенная на рис. 13.3, построена по результатам рентгеноструктурного анализа монокристаллов тринуклеозиддифосфата $ApAH^+pAH^+$. Этот олигоцвиттерион, подробно описанный в разд. 13.3, имеет спиральный участок $ApAH^+$, структура которого была математически размножена до структуры спирали [957]. Полученная таким образом одноцепочечная спираль poly(A) содержит девять нуклеотидов на виток, высота которого равна 25,4 Å. Соответствующие значения расстояния между нуклеотидами вдоль оси спирали (2,82 Å) и наклона оснований (24°) вновь не согласуются с линейной зависимостью между h и γ_T (см. рис. 9.4). Фосфаты расположены на расстоянии 8,07 Å от оси спирали, что несколько меньше «фосфатного» радиуса двойной спирали A-РНК, равного 8,89 Å. Как и в poly(C), торсионный угол ε, составляющий $-145°$, ближе к значениям для мононуклеотидов, чем для двойных спиралей A-РНК (табл. 9.3).

В дезоксирибоаналоге–*poly(dA)*–сахар находится в другой конформации. C_3'-*эндо*-конформация сахара и такой же стэкинг, как у спирали poly(A), характерны и для структуры oligo(A) в водном растворе [331]. По данным ЯМР, в случае дезоксианалога предпочтительной становится C_2'-*эндо*-конформация и появляется четко выраженный стэкинг [958]. По мере увеличения длины олигомера число C_2'-*эндо*-конформеров растет и соответственно увеличивается конформационная чистота, о которой говорилось в табл. 4.5. Структурные различия между poly(A) и poly(dA) выявляются также с помощью иммунологических тестов [959].

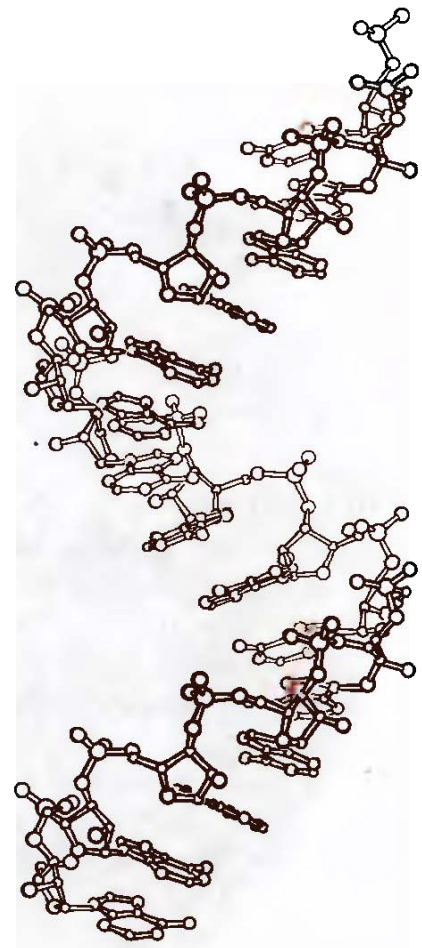
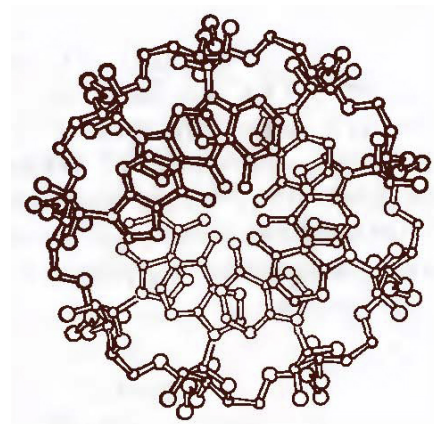


Рис. 13.3. Модель одноцепочечной спирали poly(A), построенная на основании кристаллической структуры $ApAH^+pAH^+$. Использованы координаты, приведенные в работе [957]. Описание деталей изображения и масштаб даны в подписи к рис. 10.1.



Поведение одноцепочечной спирали *poly*(*A*) 2-го порядка в денатурирующих растворителях. Картина резко меняется, если в качестве растворителя использовать не воду, а денатурирующий агент, например формамид, диметилсульфоксид или этанол. Известно, что эти соединения разрушают стэкинг и, следовательно, изменяют термодинамические и спектроскопические свойства нуклеиновых кислот [960, 961] (см. рабо-

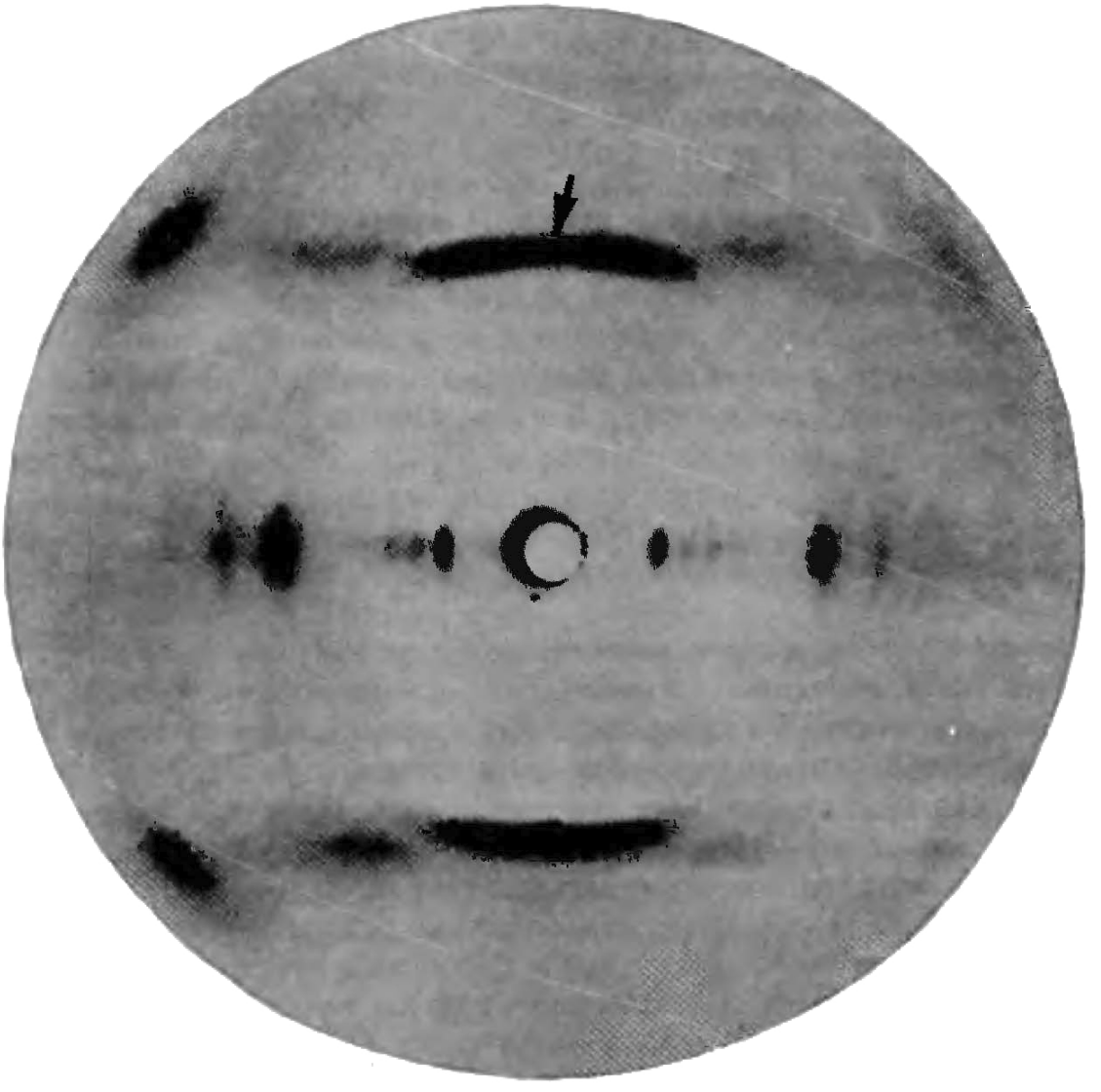


Рис. 13.4. Рентгенограмма волокна poly(A), полученного из раствора формамида [963]. Ось волокна наклонена к плоскости, перпендикулярной направлению рентгеновского пучка, на угол 8°. Расстояние между остатками вдоль оси спирали равно 2,9 Å (на это указывает меридиональный рефлекс, отсутствующий на рисунке). Расстояние между слоевыми линиями равно 5,8 Å и дает шаг спирали. Стрелкой отмечен меридиональный минимум на первой слоевой линии; наличие этого минимума означает, что 5,8 Å не есть расстояние между остатками вдоль оси спирали.

ту [962], в которой использовался 80%-ный этанол). Удивительно, что даже при таких условиях удается получить упорядоченные волокна poly(A), которые дают почти идентичные рентгенограммы в случае всех перечисленных растворителей. Следовательно, полимер в денатурирующих растворителях имеет совершенно определенную упорядоченную вторичную структуру [963]. Как же выглядит такая «денатурированная» структура, в которой нет стэкинга оснований?

Рентгенограмма волокон poly(A), полученных из раствора формамида, очень сильно отличается от рентгенограммы уотсон-криковской

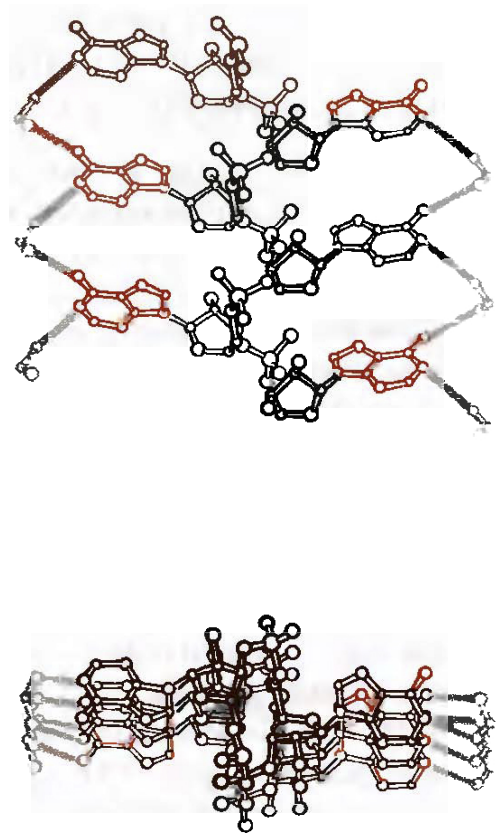


Рис. 13.5. Структура полученной в денатурирующих условиях одноцепочечной спирали poly(A) 2-го порядка, построенная на основании рентгенограммы, приведенной на рис. 13.4. *Вверху*: ось спирали лежит в плоскости рисунка. *Внизу*: ось спирали расположена почти вертикально. Молекулы растворителя (формамида), изображенные серым цветом, образуют водородные связи с аденинами. Структура построена по координатам, приведенным в работе [963]. Описание деталей изображения и масштаб даны в подписи к рис. 10.1.

двойной спирали (рис. 13.4 и 3.9, *В*). Видно тем не менее, что исследуемая молекулярная структура представляет собой спираль с шагом 5,8 Å и с двумя нуклеотидами на виток. Характер кристаллической упаковки молекул и данные по двойному лучепреломлению указывают на значительный наклон оснований ($\sim 36°$), полное отсутствие взаимодействия между основаниями и сильную сольватацию (3,5 молекулы формамида на нуклеотид) (рис. 13.5).

Последовательность π-поворотов (реверсивных поворотов). Значения торсионных углов для спирали poly(A) 2-го порядка приведены в табл. 9.3. Обращает на себя внимание тот факт, что сахар находится в C_3-*экзо*-конформации, а два угла вращения вокруг фосфоэфирных связей лежат в области $+$ *ск*, что радикально отличается от ситуации для спиральных полинуклеотидов, у которых эти углы находятся в области $-$ *ск*.

Эта особая относительно вращений вокруг P—O-связей конформация была ранее обнаружена у неспиральных олигонуклеотидов $UpAH^+$, $ApAH^+pAH^+$, а также у тРНК. Поскольку при этом подразумевается, что направление цепи изменяется на противоположное, т. е. происходит поворот полинуклеотидной цепи на угол π, ее назвали π-поворотом [964] (разд. 15.4). Здесь уместно заметить, что одноцепочечную спираль poly(A), которая образуется в денатурирующих условиях, можно рассматривать как структуру, состоящую из последовательных π-поворотов.

13.3. ДВОЙНАЯ СПИРАЛЬ *POLY(AH$^+$)·POLY(AH$^+$)* С ПАРАЛЛЕЛЬНЫМИ ЦЕПЯМИ, ОБРАЗУЮЩАЯСЯ ПРИ КИСЛЫХ *pH*. СПИРАЛЬ, ПОВОРОТ И СТЭКИНГ ПАР В ДИМЕРЕ *ApAH$^+$ pAH$^+$*

При pH < 4 остатки аденина в poly(A) (в положении N_1) протонируются. Цепи полимера агрегируют и образуют двойную спираль, которая сохраняет свою структуру в водном растворе [965]; агрегаты можно осадить на холоде [966] и вытянуть в волокна [458, 967].

Поворотная симметрия пар и взаимодействие «основание–фосфат» в полицвиттерионе. Из рентгенограммы волокон poly(AH$^+$)·poly(AH$^+$) следует, что данная структура представляет собой спираль 8-го порядка (угол спирального вращения равен 45°) с высотой витка 30,4 Å, значит, расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали равно 3,8 Å [458] (рис. 13.6). Поворотная ось 2-го порядка совпадает с осью спирали, в результате чего появляется поворотная симметрия внутри пары, показанная на рис. 13.1. Наличие той же оси 2-го порядка обусловливает параллельную ориентацию полинуклеотидных цепей друг относительно друга (см. начало главы). Особенно интересно взаимодействие N_6—H···O$^-$—P между атомом N_6 аминогруппы и свободным кислородом фосфата (рис. 13.6). Эту водородную связь, по-видимому, стабилизирует протонирование аденина в положении N_1, при котором дуплекс poly(AH$^+$)·poly(AH$^+$) превращается в полицвиттерион. С такой моделью согласуются также данные ЯМР, полученные для водных растворов poly(AH$^+$)·poly(AH$^+$) [967a].

ApAH$^+$pAH$^+$·ApAH$^+$pAH$^+$–дуплексный олигоцвиттерион, в котором представлены спиральная структура, поворот и стэкинг. Фрагмент poly(A), ApApA, кристаллизуется в слабом кислом растворе в виде дуплекса из олигоцвиттерионов –Ap$^-$AH$^+$p$^-$AH$^+$·Ap$^-$AH$^+$p$^-$AH$^+$, в котором два отрицательных заряда фосфатных групп нейтрализуются положительными зарядами протонов второго и третьего остатков аденина в положении N_1 [986] (другую схему протонирования см. в работе [191]). Можно было бы думать, что димер образует двойную спираль, аналогичную спирали poly(AH$^+$)·poly(AH$^+$) (рис. 13.7). Однако в действительности конфигурация отдельной молекулы оказывается более сложной и включает элементы как спиральной, так и неспиральной структуры. Это согласуется с результатами исследования олигомеров Ap(Ap)$_n$A с помощью кругового дихроизма, которые показывают, что в кислых растворах двойная спираль образуется только тогда, когда длина цепи превышает критическую величину $n = 6$. При $n < 6$ образуются неспиральные дуплексы с неустановленной пока структурой. Это означает, что инициация образования двойной спирали poly(AH$^+$)·poly(AH$^+$) с параллельными цепями подразумевает наличие устойчивого зародыша спирали большей длины, чем в случае уотсон-криковской двойной спирали, где размер зародыша равен трем парам (рис. 6.12).

В димере ApAH$^+$pAH$^+$ молекулы располагаются *антипараллельно*

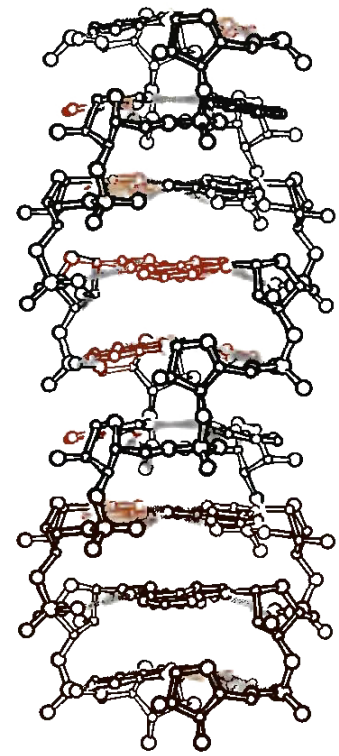
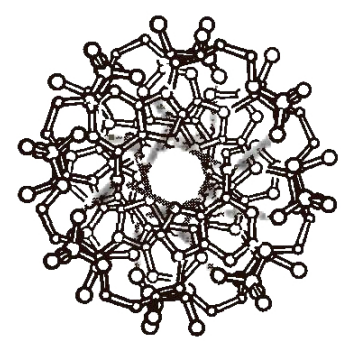


Рис. 13.6. Структура двойной спирали poly(АН$^+$)·poly(АН$^+$), которая образуется в кислом растворе. Ось 2-го порядка совпадает с осью спирали, поэтому полинуклеотидные цепи параллельны. Обратите внимание, что имеется только один тип желобка, поскольку пара обладает осевой симметрией (рис. 13.1). Водородные связи между основаниями и связи $N_6H\cdots O^-$—Р изображены серыми линиями. Описание деталей изображения и масштаб даны в подписи к рис. 10.1. Структура построена по координатам, приведенным в работе [458].



(рис. 13.7, *В*). Однако при формировании дуплекса образуются пары АН$^+$—АН$^+$, для чего необходима *параллельная* ориентация цепей (рис. 13.1). Это несоответствие приводит к тому, что спиральную конфигурацию принимает только часть молекулы, а именно сегмент АрАН$^+$; второй сегмент, АН$^+$рАН$^+$, образует поворот.

Несмотря на общую сложную структуру молекулы, отдельные нуклеотиды сохраняют стандартную конформацию: сахар находится в $C_{3'}$-*эндо*-конформации, основания – в *анти*, γ лежит в области + *ск*, т.е.

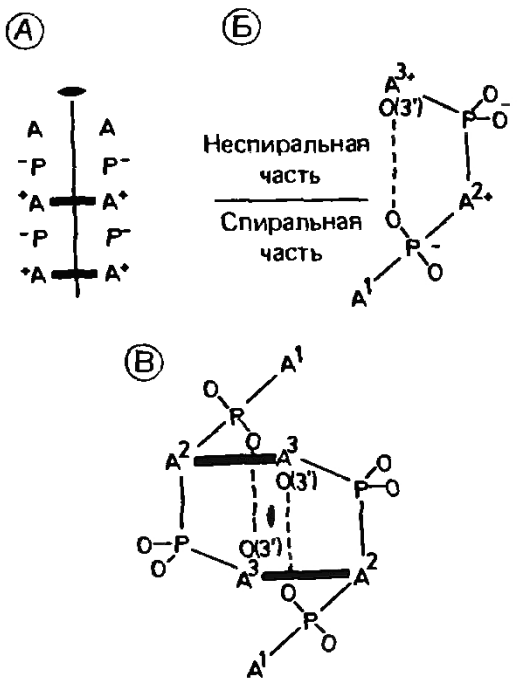


Рис. 13.7. Ожидаемая (*А*) и реально наблюдаемые (*Б*, *В*) конфигурации $ApAH^+pAH^+$ [968]. В случае *А* димер образует короткую двойную спираль с такими же, как на рис. 13.1, парами, с такой же, как на рис. 13.6, структурой и с параллельно ориентированными цепями. Однако в кристаллическом дуплексе молекулы, содержащие спиральный и неспиральный участки (*Б*), объединены в антипараллельную структуру (*В*), стабилизируемую теми же парами $AH^+\cdots AH^+$ (жирные линии), образование которых *предполагает параллельную организацию*. Это противоречие приводит к повороту олигонуклеотидной цепи, показанному на рис. 13.8.

атом $O_{5'}$ располагается «над» рибозой. Однако ориентация нуклеозидов относительно фосфоэфирных связей P—O у двух динуклеозидфосфатных фрагментов совершенно разнаи: у фрагмента $ApAH^+$ она имеет спиральный характер ($-$ *ск*), а у фрагмента AH^+pAH^+ указывает на наличие π-поворота ($+$ *ск*) [964] (разд. 15.4).

Какие силы стабилизируют димер $ApAH^+pAH^+$? Из рис. 13.8 видно, что это в первую очередь стэкинг оснований, благодаря которому дуплекс приобретает вид глобулярной, почти спиральной структуры. Кроме того, между концевой $O_{3'}$-Н-группой и предпоследним фосфатом образуется водородная связь, которая стабилизирует AH^+pAH^+-поворот.

13.4. ОДНОЦЕПОЧЕЧНАЯ СПИРАЛЬ *POLY*(*dT*) БЕЗ СТЭКИНГА И С ВЫВЕРНУТЫМИ «НАРУЖУ» ОСНОВАНИЯМИ, ПОСТРОЕННАЯ ПО ДАННЫМ О СТРУКТУРЕ ДЕЗОКСИДИНУКЛЕОТИДА *d*(*pTpT*)

В отличие от poly(U), который может образовывать двойную спираль (по крайней мере при низких температурах), его дезоксирибоаналог poly(dT) и олигомеры oligo(dT), судя по спектроскопическим данным, не упорядочены [146, 147, 969, 970].

Динуклеотид *d*(*pTpT*) был закристаллизован в виде натриевой соли из водного раствора, содержащего этанол [358]. Основной особенностью молекулярной структуры d(pTpT) является то, что конформации двух нуклеотидов фактически идентичны: сахарные остатки находятся в $C_{2'}$-*эндо*-конформации, основания — в *анти*, а угол вращения γ вокруг связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ лежит в области $+$ *ск*. Эти структурные параметры со-

храняются и в случае водного раствора d(pTpT) [970], что не так уж неожиданно, поскольку молекула в кристалле сильно гидратирована – на динуклеотид приходится 26 молекул воды, т. е. кристалл больше похож на концентрированный раствор.

Вытянутая молекулярная структура *d(pTpT)*. Угол вращения α вокруг фосфодиэфирной связи лежит в области *– ск*, как при спиральной конформации, но угол ζ находится в области *ап*, и вследствие этого молекула d(pTpT) вытягивается (рис. 13.9). Основания оказываются слиш-

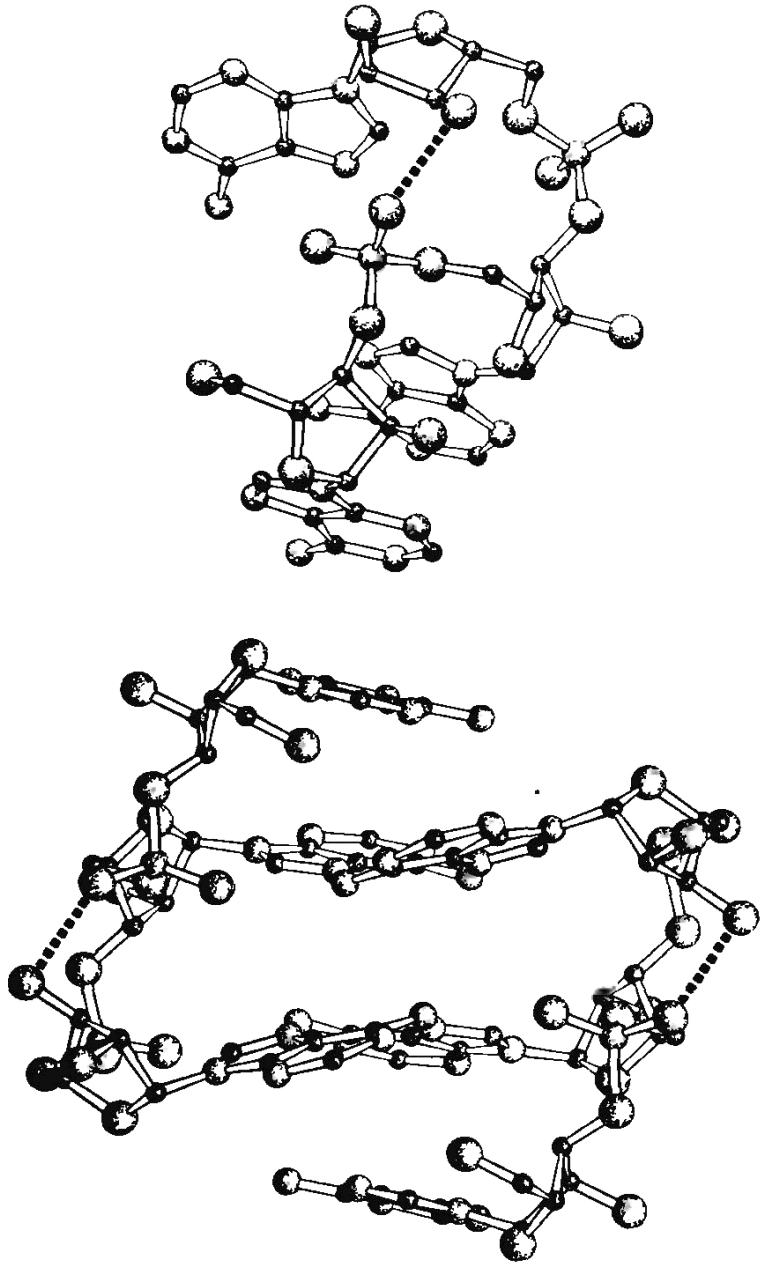


Рис. 13.8. Молекулярная структура мономера $ApAH^+pAH^+$ (*вверху*) и димера $ApAH^+pAH^+ \cdot ApAH^+pAH^+$ (*внизу*) [968]. Пунктирными линиями показаны водородные связи $O_3H\cdots O^-P$. Атомы водорода не указаны, чтобы не загромождать рисунок.

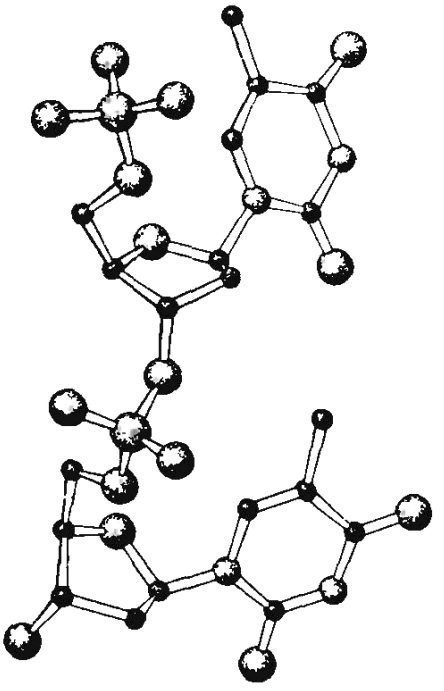


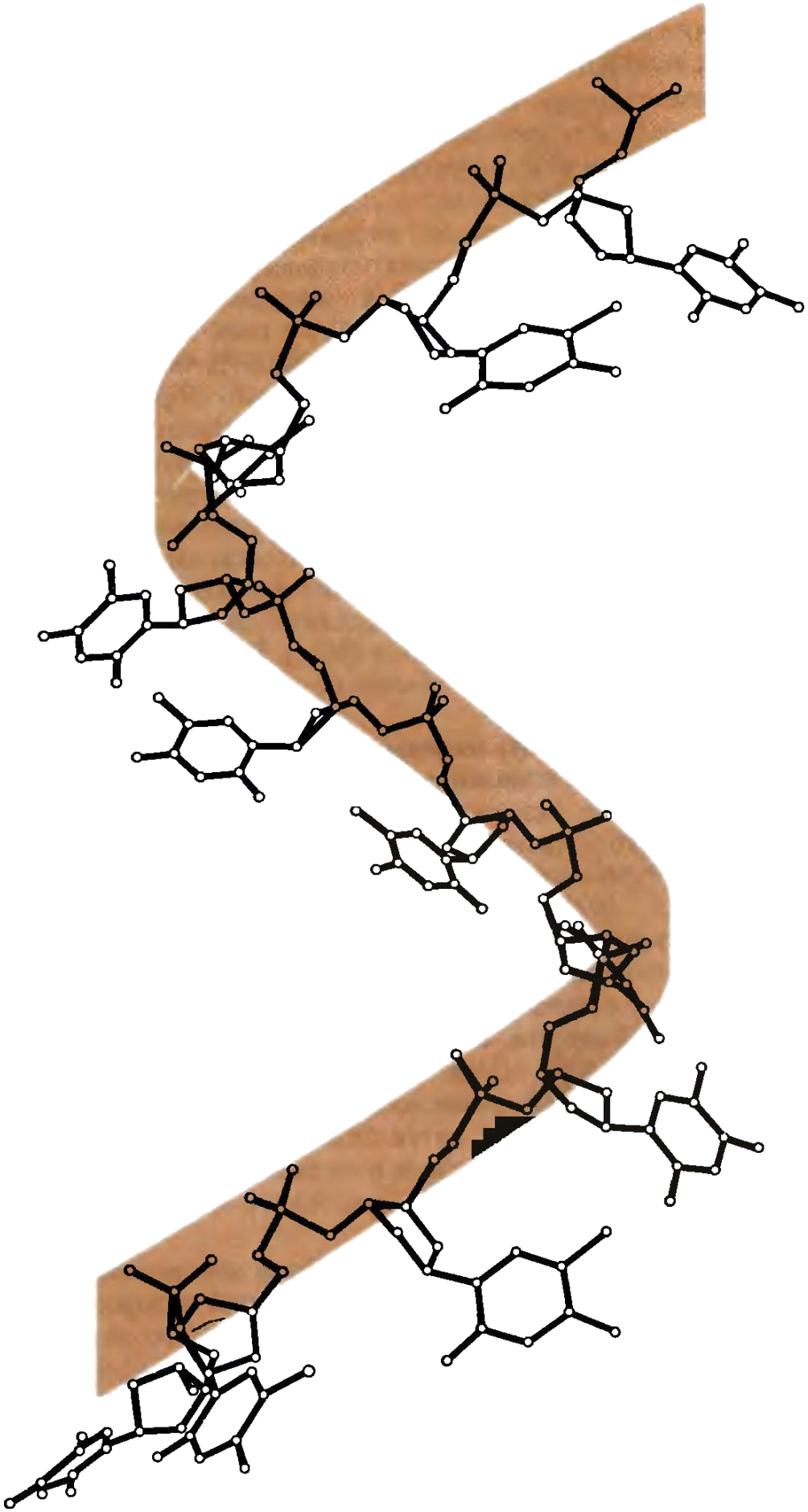
Рис. 13.9. Молекулярная структура d(pTpT). В кристалле молекулы сильно гидратированы и оба атома кислорода O_2 кетогрупп образуют координационные связи с ионом Na^+, который, кроме того, окружен молекулами воды и атомами кислорода фосфатных групп, заполняющими его октаэдрическую координационную оболочку. Оба нуклеотида имеют, по существу, одинаковые конформационные параметры, и, следовательно, можно размножить структуру динуклеотида до структуры одиоцепочечной спирали (см. рис. 13.10). Структура построена по координатам атомов, приведенным в работе [358]. Атомы H не указаны.

ком далеко друг от друга, чтобы можно было говорить о наличии внутримолекулярного стэкинга, однако имеется явный межмолекулярный стэкинг с участием оснований соседних молекул.

Координационное связывание Na^+ с атомами O_2 тиминов. Фосфаты и основания молекулы d(pTpT) сильно гидратированы, и атомы O_2 обоих тиминов образуют координационные связи с ионами Na^+, тогда как атомы O_4 образуют только водородные связи с молекулами воды. С аналогичной ситуацией мы уже сталкивались при рассмотрении структуры димера ApU; это дает основания полагать, что, по-видимому, взаимодействие (кето)$O_2 \cdots Na^+$ является специфическим.

Одноцепочечная спираль с вывернутыми наружу основаниями. Поскольку конформации двух нуклеотидов в d(pTpT) сходны, можно построить соответствующую полинуклеотидную структуру, исходя из молекулярной структуры динуклеотида. В результате получается правая спираль с вынесенными на периферию и наклоненными на угол 48° основаниями (рис. 13.10). Это нецелочисленная спираль – на шаг 25,2 Å приходится 7,2 остатка, т.е. угол спирального вращения равен 50°, а расстояние между остатками вдоль оси спирали составляет 3,5 Å.

Рис. 13.10. Модель одноцепочечной спирали poly(dT), построенная на основании кристаллической структуры d(pTpT) [358]. Это правая спираль с шагом 25,2 Å и числом нуклеотидов на виток 7,2; основания вывернуты «наружу», и, следовательно, стэкинг отсутствует.



13.5. АНТИПАРАЛЛЕЛЬНЫЕ ДВОЙНЫЕ СПИРАЛИ А-ТИПА У ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ POLY(U), POLY(s^2U) И POLY(X)

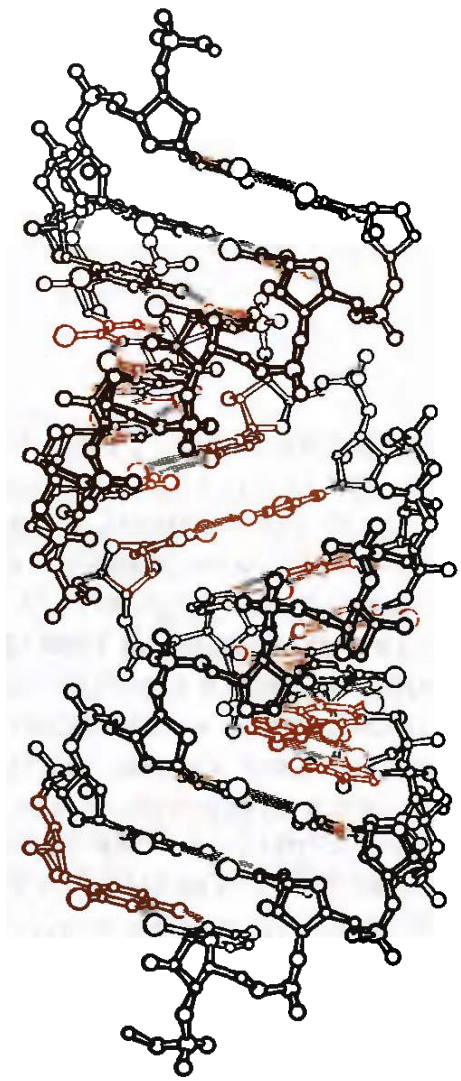
Образование структур типа шпилек. В противоположность полинуклеотиду poly(dT) его рибоаналог poly(U) при низкой температуре (~ 5°) обладает вторичной структурой, которую можно выявить по гипохромному эффекту в УФ-области, а также при помощи ЯМР, кругового дихроизма, светорассеяния, инфракрасной спектроскопии и по изменению вязкости и кинетических параметров методом температурного скачка [237, 459, 460, 971, 972]. Структура состоит из шпилек, которые образуются, когда цепь складывается сама на себя и формирует антипараллельные двойные спирали с несимметричными парами, показанными на рис. 13.1 [237, 460]. Относительно короткие спиральные фрагменты poly(U) плавятся кооперативно и стабилизируются высокой концентрацией противоионов и полиаминов [972, 973].

Так как полиамины могут повышать температуру плавления poly(U) до 28°, удается приготовить волокна poly(U), используя в качестве противоиона спермин, и применить для их исследования рентгеноструктурный анализ [974]. Получается довольно размытая (диффузная) рентгенограмма, по которой удается определить лишь шаг спирали (24 Å) и оценить число нуклеотидов на виток (9–11). Тем не менее можно предположить, что спираль poly(U) похожа по структуре на свой тиокетоаналог poly(s^2U) [461].

2-тиокетозамещение в нуклеиновых кислотах повышает температуру плавления. Температура плавления нуклеиновых кислот повышается, если в пиримидиновые основания ввести 2-тиокетогруппу. Особенно сильный эффект наблюдается в случае poly(s^2U) – при одной и той же ионной силе температура плавления poly(U) равна 5,8°, а poly(s^2U) – 68,5° [975]. 4-тиокетозамещение сопровождается лишь слабым стабилизирующим, а иногда даже дестабилизирующим эффектом. Причины этого явления будут обсуждаться ниже.

Для poly(s^2U) в отличие от poly(U) получается рентгенограмма достаточно хорошего качества, похожая по своим параметрам на рентгенограмму А-ДНК [461]. Судя по этой рентгенограмме, в случае poly(s^2U) образуется антипараллельная двойная спираль с числом пар на виток, равным 11, высотой витка 28,8 Å, отрицательным углом наклона пар относительно оси спирали и типичной для структур А-семейства конформацией сахара C_3-*эндо* (рис. 13.11). Конформационные параметры спирали указаны в табл. 9.3.

Двойная спираль без осей 2-го порядка. Из-за неэквивалентности двух гликозидных связей пары s^2U—s^2U (образованной водородными связями $N_3H\cdots S_2$ и $N_3H\cdots O_4$) исчезает ось симметрии 2-го порядка, связывающая полинуклеотидные цепи друг с другом. Следовательно, теперь две цепи не обязательно идентичны, поэтому их называют по-разному – α- и β-цепи [461]. В дальнейшем при уточнении модели по методу наименьших квадратов было показано, что различие между цепями невелико и касается главным образом величины угла вращения вокруг



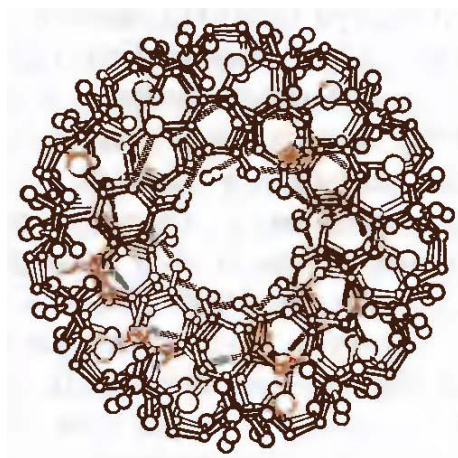


Рис. 13.11. Спираль poly(s^2U)·poly(s^2U) с парами s^2U—s^2U, которые по своей геометрии сходны с парами U—U, показанными на рис. 13.1. Двойная спираль poly(s^2U) похожа на спираль А-ДНК и А-РНК. Структурный мотив повторяется через каждые 28,8 Å и состоит из 11 нуклеотидов. Атомы серы изображены большими кружками. Структура построена по координатам, приведенным в работе [461]. Описание деталей изображения и масштаб даны в подписи к рис. 10.1.

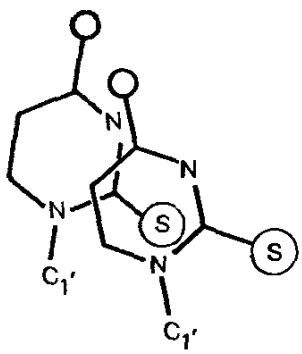


Рис. 13.12. Схема перекрывания оснований в спирали poly(s^2U)·poly(s^2U), иллюстрирующая наличие взаимодействия $S_2 \cdots N_1$, которым обусловлена необычная стабильность двухцепочечной спирали poly(s^2U) ($T_m = 68{,}5°$).

гликозидной связи [976]. Можно было бы предложить и другую модель, согласно которой одно из оснований s^2U представлено в виде енольной таутомерной формы с образованием симметричной пары. Однако в свете соображений, изложенных в работе [461], последнее представляется маловероятным.

Почему poly (s^2U) **гораздо стабильнее, чем** poly (U)? Из схемы стэкинга оснований в poly(s^2U), приведенной на рис. 13.12, видно, что атом S_2 располагается непосредственно над атомом N_1 соседнего нуклеотида. Именно такое взаимодействие, на основе которого формируется повторяющийся структурный мотив, многократно наблюдалось в кристаллических структурах нуклеозидов и оснований, содержащих тиокетогруппы [453]. Таким образом, мы можем заключить, что повышенная стабильность всех полимеров, содержащих 2-тиокетопиримидины, обусловлена именно этим типом взаимодействия, которому способствует сильная поляризуемость и гидрофобный характер атома серы [975]. В полимерах с 4-тиокетогруппами взаимодействие типа S···N невозможно, поэтому никакой стабилизации не наблюдается.

Стабильность спиралей poly (dT), poly (rT), poly (dU) **и** poly (U) **различается. Ключевая роль атома** $O_{2'}$. Почему вторичная структура poly(dT) менее стабильна, чем poly(U)? Данные ЯМР показывают, что в случае oligo(dT) сахарные остатки предпочитают находиться в $C_{2'}$-*эндо*-конформации, а в случае oligo(U) – в $C_{3'}$-*эндо* [146, 147, 237, 970]. Аналогичное различие обнаружено также у аденозиновых аналогов oligo(dA) и oligo(A) [331, 958]. Различие в конформации сахарных остатков может быть обусловлено различиями либо в электроотрицательности (разд. 4.3), либо в геометрии стэкинга, который неодинаков у $C_{2'}$-*эндо*- (B-семейство) и $C_{3'}$-*эндо*-полинуклеотидов (A-семейство).

Другим фактором, увеличивающим относительную стабильность двойной спирали poly(U), могло бы быть образование водородной связи (непосредственно или через водный мостик) между группой $O_{2'}$H одного остатка рибозы и атомом $O_{4'}$ соседнего [237]. Имеющиеся в настоящее время данные не позволяют сказать, какой эффект сильнее, однако совершенно ясно, что $O_{2'}$H-группа играет важную роль в стабилизации спирали. Это особенно очевидно при сопоставлении полинуклеотида poly(dU), у которого вторичная структура отсутствует, с poly(U) или

poly(dT) с poly(rT), структура которого, судя по температуре плавления, даже более стабильна, чем структура poly(U) [402].

Пуриновая двойная спираль, образуемая поликсантиловой кислотой. В пуриновом основании ксантине присутствуют такие же функциональные группы, что и в урациле. Следовательно, при спаривании оснований возникает такая же ситуация, что и в случае урацила и 2-тиоурацила (s^2U), т.е. либо образуются несимметричные пары (XVI на рис. 6.1), либо один из партнеров находится в енольной таутомерной форме, и тогда пары симметричны. Какими бы ни были пары, рентгенограммы волокон показывают, что в зависимости от pH среды можно наблюдать две структурно родственные формы двойной спирали. Та из них, которая образуется при pH 5,7, представляет собой спираль 10-го порядка. Расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали h равно 3,01 Å, и рентгенограмма напоминает рентгенограмму A-РНК. Для другой спирали, которая образуется при pH 8,0, h равно 2,52 Å, на виток приходится 11 пар оснований и рентгенограмма больше похожа на рентгенограмму A-ДНК. В обоих случаях межгликозидное расстояние $C_{1'}\cdots C_{1'}$ на 2 Å больше, чем в уотсон-криковских парах, потому что пара состоит из двух пуринов [854].

13.6. «ЛИПКИЙ» ГУАНОЗИН. СТРУКТУРА ГЕЛЕЙ ИЗ ГУАНОЗИНА И ГУАНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ. ЧЕТЫРЕХЦЕПОЧЕЧНЫЕ СПИРАЛИ *POLY(G)* И *POLY(I)*

Чтобы образовался гель, нужны вакансии для водородных связей и высокая концентрация соли. В отличие от всех остальных компонентов нуклеиновых кислот гуанозин, гуаниловая кислота и их производные (но не свободный гуанин) в водном растворе образуют гели. Анализ более 60 гуанозиновых производных показал, что для образования геля (1) группы N_1H, N_2H, N_7 и O_6 в молекуле должны быть свободны, т.е. не должны участвовать в образовании водородных связей; (2) должны присутствовать гидроксильная группа $O_{5'}H$ или ее заместители: фосфат, сульфат или хлор (но не другой заместитель); (3) важно, чтобы имел место некоторый избыток ($\sim 0{,}1$ М) основной соли [978].

Гель из нуклеотидов образуется только в том случае, если мы имеем дело с моноанионами, которые существуют при значениях pH выше первого pK фосфатной группы. При нейтральных pH гуанин-5′-фосфат еще формирует упорядоченные структуры, но гель уже не образуется [979].

Для образования геля в раствор необходимо добавить соль. Если соль присутствует не в избытке, то мононатриевая соль гуанозин-5′-фосфата и сам гуанозин образуют не гель, а кристаллы [980, 981].

Стопки из тетрамерных плоских агрегатов в геле из гуанозиновых производных и гуанозин-3′-фосфата. Представление о структуре гелей, которые формируются из гуанозинсодержащих молекул, было получено на основании данных рентгеноструктурного анализа [982, 983]. Во всех

случаях образуются показанные на рис. 13.1 плоские тетрамерные агрегаты, в которых мономеры «скреплены» друг с другом посредством водородных связей между остатками гуанина. Далее эти плоские агрегаты укладываются друг на друга, образуя стопки с выступающими к периферии сахарными остатками. Взаимодействие между соседними слоями в стопке, по-видимому, не ограничивается стэкингом. Из того факта, что гели формируются при замещении O_5·H-группы на фосфат, сульфат и ион хлора, следует, что все эти группы также вовлечены во взаимодействие, образуя, по-видимому, водородные связи с гуаниновыми остатками в соседнем слое [978, 984].

Ориентация отдельных тетрамерных слоев в стопке неодинакова – каждый следующий тетрамерный слой повернут относительно предыдущего на определенный угол (вокруг оси стопки), причем величина этого угла зависит от вида сахара. В гуанозиновых гелях два последовательных слоя повернуты друг относительно друга на угол 45°, в 8-бромгуанозиновых – на угол 54° (вероятно, из-за *син*-конформации основания). В дезоксигуанозине угол поворота равен $-54°$, откуда можно заключить, что одним из факторов, определяющих структуру, является образование водородной связи с гидроксилом O_2·H в гуанозине [978, 984].

Во всех перечисленных случаях слои в стопке «смотрят» в одну сторону (выстроены в шеренгу), поэтому на рентгенограммах присутствуют характерные рефлексы, отвечающие расстоянию $\sim 3{,}4$ Å [984]. Но в гелях из 2′,3′-О-диацетилгуанозина и из гуанозин-3′-фосфата слои обращены один к *другому* («лицом к лицу»), что приводит к появлению характерных рефлексов, отвечающих удвоенному межплоскостному расстоянию $3{,}4 \cdot 2$ Å, т. е. $\sim 6{,}8$ Å.

Гуанозин-5′-фосфат образует спиральные агрегаты. В гелях гуанозин-5′-фосфата тетрамерный ассоциат оснований не плоский, он разрезан наподобие пружинной шайбы. В результате из тетрамеров формируется «непрерывная» спираль, по-видимому, левая, на каждые ее 4 витка приходится 15 нуклеотидов [982, 983]. Чтобы изменить структуру таким образом (от стопки из плоских агрегатов до спирали), достаточно незначительно деформировать водородные связи – сама система усилит любое изменение в 4 раза. Структура спирали, по-видимому, стабилизируется с помощью водородной связи между группой N_2H гуанина и 5′-фосфатом нуклеотида, расположенного в соседнем слое (в гуанозин-3′-фосфате такое взаимодействие невозможно). Если хранить натриевую соль гуанозин-5′-фосфата в нейтральном растворе, содержащем 1,3 М NaCl, то образуются кристаллические волокна, которые после ориентации под рентгеновским пучком дадут рентгенограмму, напоминающую рентгенограмму правой четырехцепочечной спирали poly(G), которую мы будем обсуждать ниже [985].

Результаты спектроскопических исследований согласуются с рентгеновскими данными. Структурные модели гелей, образуемых гуанозиновыми производными и гуанозин-3′- и гуанозин-5′-фосфатами, в целом

согласуются с результатами спектроскопических исследований. Данные по изменению поглощения в УФ-области и по изменению давления паров над раствором показывают, что формирование геля – это в высшей степени кооперативный процесс, механизм которого описывается схемой Мономер⇄Тетрамер⇄Октамер⇄Полимер [986]. Судя по поведению пиков резонансного поглощения ^{1}H, ^{23}Na и ^{31}P в спектрах ЯМР нейтральных растворов натриевой соли гуанозин-5′-фосфата, при концентрации нуклеотида ниже 0,2 М наблюдается нормальный стэкинг оснований. При концентрации выше 0,3 М нуклеотиды образуют скрепленные водородными связями ассоциаты, преимущественно тетрамеры, октамеры и гексадекамеры. Энтальпия самосборки ассоциатов равна $\Delta H = -17 \pm 2$ ккал·моль$^{-1}$, энтропия $\Delta S = -51 \pm 6$ кал·моль$^{-1}$·К$^{-1}$ (в отличие от положительного изменения энтропии, которое наблюдалось бы в процессах с нормальным стэкингом) [987].

Почему для образования геля из производных гуанозина нужен избыток соли? Исследования методом ЯМР убедительно показали, что катион является неотъемлемой частью гуаниновых тетрамерных ассоцитатов (рис. 13.13) [987, 988]. Он располагается в центральной полости, окруженный четырьмя атомами кислорода O_6 кетогрупп, каждый из которых удален от центра на расстояние 2,28 Å [985]. Это на 0,88 Å больше вандерваальсова радиуса кислорода. Анализ значений ионных радиусов для Li^+ (0,68 Å), Na^+ (0,97 Å), K^+ (1,33 Å), Rb^+ (1,47 Å) и Cs^+ (1,67 Å) [196] показывает, что ион Li^+ слишком мал и не может заполнить всю центральную полость; размеры ионов Na^+, K^+ и Rb^+ таковы, что эти ионы заполняют полость, располагаясь либо непосредственно в ее центре, либо несколько выше, между двумя соседними слоями, в окружении восьми атомов кислорода; наконец, ион Cs^+ слишком велик и, по-видимому, не умещается в полости, а потому не может способствовать агрегации гуанозинов с образованием тетрамерных ассоциатов. Вообще говоря, прослеживается параллель между этими специфическими комплексами с катионами и целой группой природных ионофоров и синтетических краун-эфиров, в которых лигандами, специфически связывающими катион, являются атомы кислородов эфиров и кетогрупп, а отбор катионов осуществляется главным образом за счет пространственных эффектов [989].

Геометрические характеристики структуры геля сохраняются и в случае четырехцепочечных спиралей $[poly(G)]_4$ **и** $poly(I)]_4$. Самые разные физические данные свидетельствуют о том, что тетрамерные структуры, обнаруженные в гелях из производных гуанозина, образуются и в случае четырехцепочечных спиралей poly(G) и poly(I) – 2-дезаминированного аналога poly(G) [990, 991]. Авторы двух независимых кристаллографических работ, в которых исследовались волокна двух полимеров, пришли к одинаковому выводу и показали, что обе спирали являются правыми. Высота витка 39,5 Å отвечает числу нуклеотидов 11,5 (т. е. расстояние между остатками вдоль оси спирали равно 3,4 Å), или, говоря другими словами, структура повторяется через каждые 23 нуклеотида

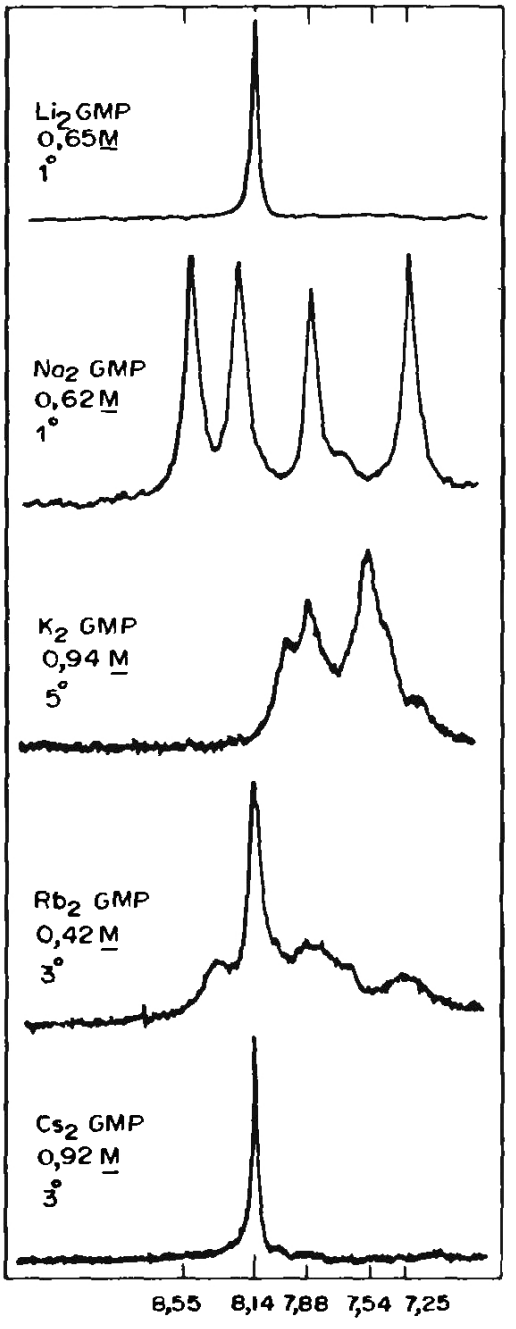


Рис. 13.13. Спектры ЯМР гуанозин-5′-фосфата (полученные при рабочей частоте 220 МГц), на которых видно изменение сигнала для протона H_8 в присутствии ионов различных щелочных металлов [988]. Концентрация растворов GMP близка к насыщающей (0,4–0,9 М), $T = 1 \div 5$°C, растворитель D_2O. В присутствии ионов Li^+ и Cs^+ спектр не изменяется, а в присутствии ионов Na^+, K^+ и Rb^+ пик резонансного поглощения H_8 расщепляется из-за образования тетрамерного комплекса, в котором ион располагается в центральной полости в окружении четырех атомов O_6 гуанозинов.

(или через каждые два витка); таким образом, симметрия спирали 2_3 [990, 992]. Конформационные углы в такой модели близки к значениям, характерным для А-семейства полинуклеотидных спиралей (табл. 9.3). Результаты этих двух исследований позволяют фактически исключить из рассмотрения спирали 4-го порядка с конформацией сахара C_2-*эндо* [993], а также все спирали 3-го порядка, предложенные на основании более ранних рентгеновских данных [994], и, наконец, отказаться от левой спирали, которая предложена на основании спектроскопических данных [990]. Структурное сходство между четырехцепочечными спиралями poly(G) и poly(I) было установлено также с помощью иммунологических экспериментов, из которых следовало, кроме того, что помимо четырехцепочечных образуются и одноцепочечные спирали [995].

Poly(G) и *poly(I)* **образуют не только четырехцепочечные, но также одно- и двухцепочечные спирали.** Упомянутые выше иммунологические данные и данные по круговому дихроизму [990] и инфракрасной спектроскопии [996] указывают на то, что в растворах обоих типов полимеров при низкой концентрации соли присутствуют упорядоченные одноцепочечные, по всей вероятности, спиральные структуры со стэкингом оснований. В случае poly(G) такая форма метастабильна в присутствии ионов металлов, но стабильна в присутствии большего по размерам и, следовательно, обладающего меньшим экранирующим эффектом иона тетраметиламмония. Это означает, что электростатическое отталкива-

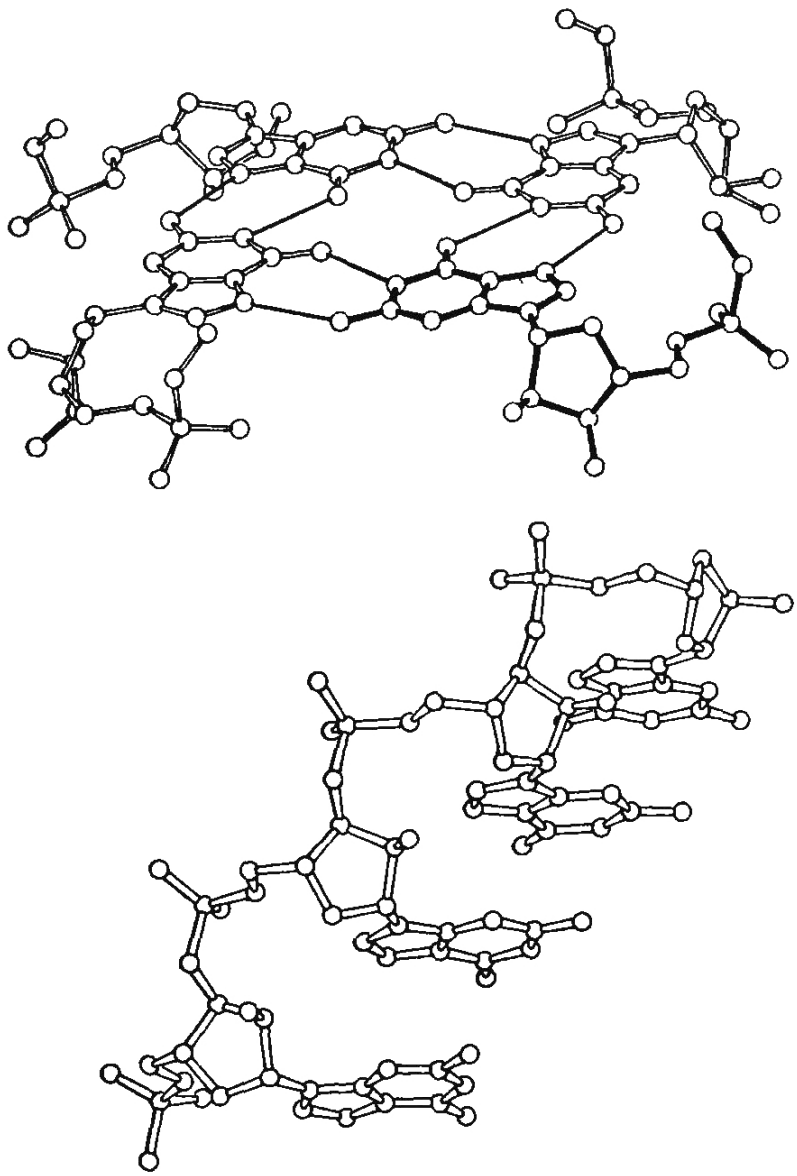


Рис. 13.14. Четырехцепочечная спираль poly(G) [992]. Сахар находится в C_3-*эндо*-конформации, шаг спирали 39,2 Å, число нуклеотидов на виток 11,5. Структура повторяется через каждые два витка, т.е. симметрия спирали 2_3. *Вверху* показана четверка нуклеотидов – аналог пары в двойной спирали, *внизу* – одна из цепей четырехцепочечной спирали.

ние между соседними отрицательно заряженными фосфатами одной цепи или между различными полинуклеотидными цепями вносит существенный вклад в стабилизацию данной спиральной структуры [996].

И наконец, на основании рентгеновских данных для волокон poly(G), полученных в присутствии 0,03 М HCl, была предложена последняя модель — модель двухцепочечной спирали с восемью нуклеотидами на виток [997]. В этих условиях происходит протонирование атома N_7, и легко представить себе пары оснований GH^+—GH^+ с такой же геометрией водородных связей, как у дуплекса poly(AH^+)·poly(AH^+), в котором образуются связи $N_7 \cdots HN_6$ (см. рис. 13.1). Хотя рентгенограмма в данном случае слишком бедна, чтобы можно было говорить о каких бы то ни было деталях структуры, аналогия между дуплексами poly(AH^+)·poly(AH^+) и poly(GH^+)·poly(GH^+) очевидна, поскольку обе структуры стабильны только тогда, когда протонированы основания.

Такие же гели, как и в случае мономерного гуанозина и его производных, образуются из дезоксирибоаналогов [978]. В случае полимеров сколько-нибудь детальная структурная информация отсутствует, но результаты электронно-микроскопических исследований позволяют предположить, что полинуклеотид может формировать одно-, двух- и трехцепочечные структуры; впрочем, они могут быть просто денатурированными формами четырехцепочечной спирали [998].

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Синтетические РНК-гомополимеры (в отличие от *природных* РНК) могут существовать в виде различных структурных форм — от одноцепочечных до четырехцепочечных правых спиралей. Гомополимер poly(C) и его $O_{2'}$-метилированный аналог образуют одноцепочечные спирали 6-го порядка, а poly(A) в денатурирующих условиях (в присутствии формамида) — одноцепочечную зигзагообразную спираль 2-го порядка, которая при переходе к физиологическим условиям трансформируется в правую спираль 9-го порядка. В структуре олигонуклеотида ApApA, закристаллизованного в кислой среде, представлены и спиральная конформация, и поворот цепи; в молекуле образуются пары $AH^+ \cdots AH^+$, обнаруженные у полученной в кислом растворе двухцепочечной спирали poly(AH^+), у которой полинуклеотидные цепи ориентированы параллельно. Более привычные *анти*параллельные спиральные структуры A-РНК-типа образуются в случае poly(s^2U), poly(U) и poly(X). Для poly(dT) исходя из кристаллической структуры d(pTpT) построена модель одноцепочечной спирали. Очень интересные структуры образует гуанозин в гелях — стопки из нуклеозидных ассоциатов, обладающих симметрией 4-го порядка. Такой же структурный мотив повторяется в спиральных тетрамерах $[poly(G)]_4$ и $[poly(I)]_4$.

ГЛАВА 14

Гипотезы и спекуляции: модель „бок о бок", ДНК с изломами и „вертикальная" двойная спираль

Прежде чем закончить рассмотрение упорядоченных спиральных молекул РНК и ДНК, следует упомянуть о некоторых гипотезах, касающихся их структуры и динамики. Наибольший интерес представляют альтернативная модель двухцепочечной ДНК, в которой отсутствует закручивание полинуклеотидных цепей друг относительно друга,–модель «бок о бок», а также «вертикальная» модель ДНК, предложенная для двойной спирали с основаниями в *высокой-анти*(– *ск*)-конформации. Модель ДНК с изломами («кинками») вначале была предложена для того, чтобы объяснить способность «жесткой» спиральной молекулы ДНК обвиваться вокруг гистонового кора в хроматине, но затем ее стали использовать для объяснения механизма «дыхания» ДНК.

14.1. МОЖНО ЛИ СЧИТАТЬ МОДЕЛЬ «БОК О БОК» АЛЬТЕРНАТИВОЙ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ?

Топологическая проблема, возникающая при раскручивании двойной спирали, решается так же, как проблема гордиева узла,–путем разрезания. В уотсон-криковской двойной спирали две полинуклеотидные цепи закручены вокруг одной оси и, следовательно, друг относительно друга. Поскольку в процессе репликации полинуклеотидные цепи расходятся и связываются с новосинтезированными дочерними комплементарными цепями [999], исходная родительская ДНК должна раскручиваться. Понятно, что раскручивание такой длинной нитевидной молекулы (гл. 1), сопряженное с многократным поворотом всей молекулы (один полный оборот на каждый виток спирали), требует чрезвычайно интенсивного вращения. Следует еще учесть, что в хроматине, где осуществляется репликация, ДНК плотно упакована. Попытки представить себе все эти процессы вращения и раскручивания выглядят совершенно безнадежными [1000], и тем не менее в конце концов эта проблема была решена: «гордиев узел» из ДНК был разрублен. Этому способствовало открытие целого ряда специфических ферментов, названных впоследствии топоизомеразами. Они создают в молекуле ДНК разрывы и делают возможным локальное раскручивание двойной спирали, а после того, как

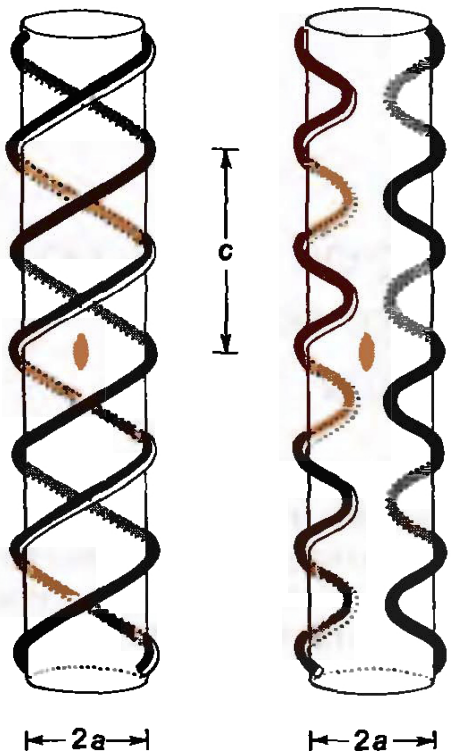


Рис. 14.1. Схематическое изображение двойной спирали (*слева*) и структуры «бок о бок» (*справа*) [112]. Обратите внимание, что общие размеры (c = шаг спирали и $2a$ = диаметр спирали) и ось симметрии 2-го порядка (обозначена символом ⬮) в обоих случаях одинаковы.

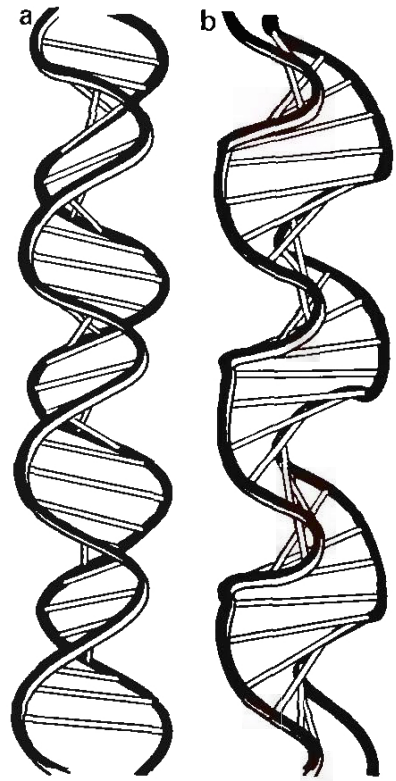


Рис. 14.2. Схематическое изображение двух проекций модели «бок о бок» [112]. Одна из цепей нарисована в цвете, чтобы показать ее зигзагообразный (неспиральный) ход.

раскручивание произойдет, вновь соединяют концы молекулы, восстанавливая ее исходную структуру [1001].

Другое решение проблемы: модель «бок о бок». Можно ли представить себе комплекс из двух цепей ДНК, в котором основания образуют уотсон-криковские пары, но цепи *не* перекручиваются и который при этом удовлетворяет экспериментальным рентгенограммам, полученным на волокнах ДНК? Ответ на этот вопрос был получен независимо двумя группами ученых [112, 113, 1002–1004]. Они построили модели двухцепочечных ДНК, имитирующие спиральную геометрию, но вместо спирального вращения одного знака – правого – ввели в модели чередование знака вращения через каждые пол-оборота (рис. 14.1 и 14.2).

Как стереохимически представить себе точки поворота? В пределах чередующихся право- и левоспиральных участков особых стереохимических проблем не возникает. Однако изменение знака спирали сопряжено с некоторыми трудностями, которые удалось обойти путем введения нестандартных, но стереохимически приемлемых углов вращения вокруг связей $C_{4'}$—$C_{5'}$, гликозидной и фосфодиэфирной связей, а также с по-

мощью изменения конформации сахара с $C_{2'}$-*эндо* на $C_{3'}$-*эндо* и наоборот. В модели, предложенной позднее [113], меняется также ориентация сахаров – сахарные остатки вдоль цепи ориентированы поочередно то вверх, то вниз, как в левой спирали Z-ДНК (гл. 12). Наконец, поскольку правоспиральное вращение энергетически более выгодно, чем вращение противоположного знака, молекула ДНК в модели «бок о бок» представляет собой слабозакрученную правую сверхспираль [112].

Модель «бок о бок» имеет то преимущество, что она не требует раскручивания ДНК при репликации – достаточно разорвать водородные связи, и цепи разойдутся сами [1004а]. Структура обладает значительной гибкостью; такую ДНК легче изогнуть при укладке в хроматине, чем двойную спираль (гл. 19). Кроме того, в модели «бок о бок», как и в спиральной структуре, имеются главный и минорный желобки; и наконец, сахарофосфатный остов все время остается на некой «плоской» поверхности (рис. 14.2), что создает условия для тесного контакта между соседними молекулами и тоже облегчает плотную упаковку в хроматине.

Модель «бок о бок» согласуется с результатами кристаллографических расчетов [1005] и биохимических исследований, которые показывают, что кольцевые одноцепочечные ДНК образуют некий дуплекс, названный ДНК V [1006]. Предполагается, что это особая форма ДНК, у которой число правых и левых витков одинаково. Такую ДНК можно представлять либо в виде структуры «бок о бок», либо в виде структуры, в которой чередуются протяженные право- и левоспиральные участки одинаковой длины.

Однако авторы работы [122] считают, что метод рентгеновской дифракции на волокнах ДНК в принципе не может решить вопрос о том, можно ли считать модель «бок о бок» альтернативой двойной спирали, поскольку он не дает необходимого количества данных. Более сильным аргументом против модели «бок о бок» являются результаты гель-электрофореза сверхспиральных кольцевых замкнутых ДНК, которые показывают, что молекулам одного размера, но с разным числом сверхвитков отвечает на электрофореграмме серия дискретных полос [1007]. Наличие дискретности легче объяснить в рамках модели двойной спирали, чем модели «бок о бок», если предположить, что все молекулы ДНК в полосе имеют одинаковый порядок зацепления (гл. 19).

Наконец, со структурной точки зрения трудно понять, почему через каждые 5 нуклеотидов спираль ДНК должна менять знак вместо того, чтобы просто оставаться непрерывной правой спиралью. Особенно непонятно, что является «сигналом» к повороту полинуклеотидной цепи в случае гомополинуклеотидов, таких, как poly(dA)·poly(dT). И наконец, чем можно объяснить существование различных форм ДНК – A, B, C и D, если не структурными модификациями двойной спирали?

Конечно, при взаимодействии ДНК с белками ситуация может измениться. В настоящее время мы не можем полностью отвергнуть возможность существования структуры «бок о бок», однако следует рас-

сматривать такую структуру скорее как особый топологический вариант двухцепочечной ДНК.

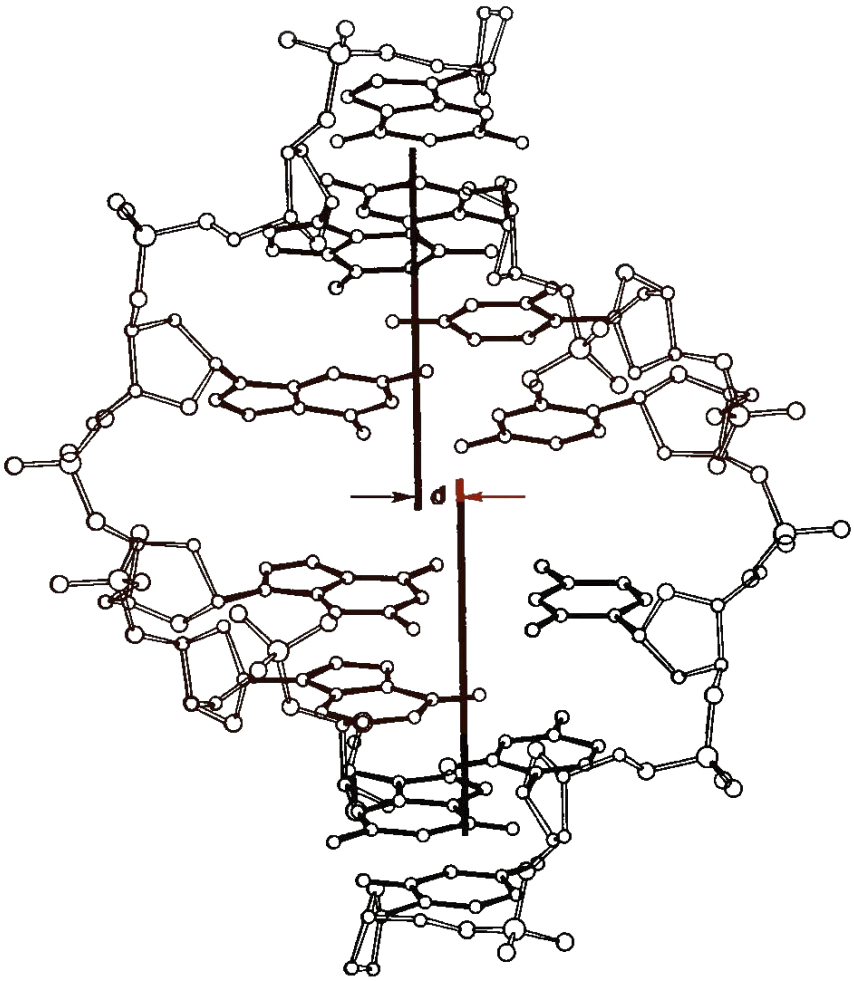
14.2. МОЖЕТ ЛИ ЦЕПЬ ДНК СВОРАЧИВАТЬСЯ ПУТЕМ ОБРАЗОВАНИЯ ИЗЛОМОВ?

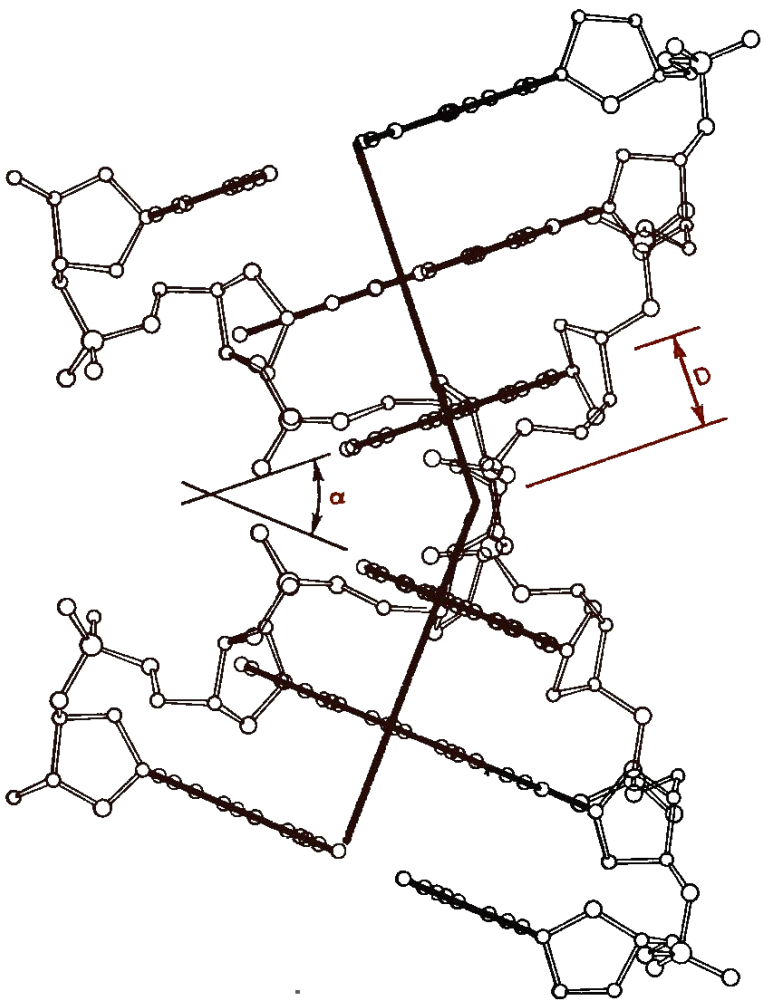
В хроматине двухцепочечная ДНК в В-форме наматывается на белковый кор, образуя сверхспираль радиусом ~ 50 Å (гл. 19). Вначале казалось невероятным, чтобы спираль ДНК диаметром 20 Å плавно изгибалась с образованием такой компактной структуры. Поэтому было высказано предположение, что через каждые 20 пар в молекуле появляется излом [1008, 1009]. Эта гипотеза на первый взгляд подтверждалась результатами частичного гидролиза ДНКазой I хромосомных ДНК-белковых комплексов. После обработки комплексов этим ферментом образовывались фрагменты ДНК, имеющие длину, кратную 10 парам, и это рассматривалось как результат расщепления молекулы в местах изломов [1008]. Хотя позднее такая интерпретация была признана ошибочной [907], изломы в двойной спирали по-прежнему считают возможным структурным элементом ДНК.

Геометрическое описание излома в ДНК. Анализ структурных моделей показывает, что излом в двойной спирали ДНК легче всего образуется в том случае, если изгибать ее в сторону минорного желобка (рис. 14.3). Даже такой большой угол излома α, как 100°, можно получить путем изменения одного торсионного угла γ (вращение вокруг связи $C_{4'}$—$C_{5'}$) от обычных значений, лежащих в области $+sc$, до значений, лежащих в *ап*-области. Энергетические расчеты показали, что такое конформационное изменение, связанное с разрушением стэкинг-взаимодействия, легче всего происходит между двумя АТ-парами. Необходимая для этого энергия по оценкам составляет не больше 5 ккал $\cdot$ моль$^{-1}$ в зависимости от принятого теоретического приближения [1010, 1011].

Излом имеет следующие макроскопические характеристики: 1) оси двух прилегающих к месту излома спиральных участков не обязательно пересекаются, они могут быть смещены в любую сторону друг от друга на расстояние ~ 1 Å (расстояние d на рис. 14.3); 2) соседние спиральные участки связаны псевдоосью симметрии 2-го порядка, совпадающей с биссектрисой угла излома; 3) расстояние D между точкой излома и ближайшей парой оснований может достигать 7–8 Å; 4) вообще говоря, излом сопровождается небольшим «раскручиванием» молекулы на угол 15–20°.

Рис. 14.3. Излом в В-ДНК. Показаны две взаимно перпендикулярные проекции [1012]. Определения угла α и расстояний d и D даны в тексте. Псевдоось 2-го порядка (вертикальная на верхнем и горизонтальная на нижнем рисунках) связывает два спиральных участка молекулы, примыкающие к излому.


d


D
α

Если изломы в ДНК периодически повторяются, то молекула принимает некую характерную форму. Так, образование изломов через каждые 5 пар оснований приводит к формированию зигзагообразной структуры, а если изломы происходят через каждые $n \cdot 10$ пар, то образуется левая сверхспиральная структура, точно такая же, как в хроматине. Как мы увидим в гл. 19, в свете современных данных более вероятным представляется плавное изгибание ДНК в хроматине. Тем не менее понятие излома используется при описании «дыхания» двойной спирали.

14.3. $\varkappa$- И β-ИЗЛОМЫ ДНК: «ДЫХАНИЕ» СО СКОРОСТЬЮ ЗВУКА

Поскольку гипотеза изломов казалась приемлемым решением проблемы упаковки ДНК в хроматине, ее обобщили на случай комплексов динуклеозидфосфатов с интеркаляторами, которые используются в качестве модельных систем для изучения взаимодействия ДНК с лекарственными препаратами (гл. 16). В таких модельных комплексах, которые большей частью принадлежат к риборяду, самокомплементарные молекулы образуют мини-спирали; пары оснований в спирали раздвигаются, образуя щель размером 3,4 Å, в которую входит интеркалятор. Этот процесс обычно сопровождается некоторым раскручиванием мини-спирали и (по крайней мере для большинства соединений) изменением конформации сахара от C_3'-*эндо* к C_2'-*эндо*. Хотя в случае олиго- и по*лидезокси*рибонуклеотидов ситуация может оказаться иной, тем не менее предполагается, что при указанном изменении конформации сахара и раскручивании соседних пар на угол $-10°$ в этом месте молекулы В-ДНК образуется излом с $\alpha \simeq 40°$ [1012–1014]. Считается, что в хроматине такие изломы должны встречаться через каждые 10 пар оснований («$\varkappa$-изломы В-ДНК»). Изломы каждой второй пары приводят к менее определенной структуре – «В-ДНК с β-изломами». Сегменты с такой структурой могут образовываться в ДНК непосредственно перед тепловой денатурацией или кратковременно возникать в АТ-богатых участках, облегчая тем самым взаимодействие ДНК с белками и лекарственными препаратами, которое включает интеркаляцию плоских боковых цепей ароматических аминокислот или других молекул.

Предполагается, что участки «В-ДНК с β-изломами» возникают в результате броуновских столкновений с молекулами растворителя. В большинстве случаев такие столкновения будут приводить к беспорядочным колебаниям в структуре ДНК, однако, если молекула растворителя случайно столкнется с ДНК в нужный момент времени, может возникнуть гармоническая волна, которая приведет к нормальным колебаниям («дыханию») и будет распространяться вдоль спирали со скоростью звука (акустическая волна). Это движение связывают со структурным переходом В-ДНК в «В-ДНК с β-изломами» – спираль, у которой каждый второй сахарный остаток зафиксирован в C_3'-*эндо*-конформации [1014].

Мы не будем здесь касаться вопроса о том, насколько справедлива данная гипотеза. Отметим лишь, что двойная спираль действительно раскрывается на короткое время, поскольку при 0°С характерное время тритиевого обмена в ДНК составляет всего лишь ~ 5 мин, хотя температура плавления ДНК при этом превышает 80°. Было высказано предположение, что вдоль цепи ДНК мигрируют раскрытые участки длиной около 10 пар в виде возбуждаемых солитонами одиночных волн. Напоминают ли такие участки по своей структуре «ДНК с β-изломами» (или с изломами другого типа), пока неизвестно [1014а]. Однако следует уяснить, что ДНК, конечно же, не является абсолютно жестким стержнем; скорее следует рассматривать ее как молекулу с ограниченной макроскопической гибкостью, в которой происходят микроскопические локальные движения.

14.4. ИЗГИБЫ ДНК В МЕСТЕ СОЕДИНЕНИЯ СПИРАЛЕЙ А- И В-ТИПА

Если предположить, что для двойной спирали ДНК, как и для тРНК (гл. 15), характерна тенденция к насыщению стэкинга, становится интересной другая модель: для того чтобы молекула ДНК резко изогнулась, в нее вводится не излом (разрушение стэкинга), а лишь изменение конформации сахара [381, 1015].

Смешанная конформация сахара, стэкинг оснований и изгиб на 26° в месте (А–В)-контакта. При попытке объединить спирали В- (10-го порядка) и А-ДНК (11-го порядка) в единую непрерывную спираль было обнаружено, что «стык» легко осуществляется, если в месте контакта два сахарных остатка пары имеют разную конформацию. Контакт выглядит наиболее приемлемым, когда при переходе от А- к В-ДНК сахар в цепи с полярностью $5' \rightarrow 3'$ находится в $C_{2'}$-*эндо*-конформации, а сахар комплементарного нуклеотида – в $C_{3'}$-*эндо*-конформации. Несмотря на такое конформационное изменение, стэкинг в месте перехода полностью сохраняется и все торсионные углы имеют обычные значения; тем не менее спираль при этом изгибается на угол 26° (рис. 14.4) и, поскольку $B \rightarrow A$-переход приводит к повороту пары на $-3{,}3°$, немного раскручивается.

Описанные предположения подтверждаются некоторыми экспериментальными данными. На полное сохранение стэкинга в месте (А–В)-контакта указывают спектры КД и ЯМР гибридного дуплекса [poly(dG)·$(rC)_{11}$—$(dC)_{16}$], в котором «ДНК-участки» находятся в В-форме, а соседние $(rC)_{11}$-сегменты – в А-форме [1015, 1016]. Раскручивание, обусловленное ($B \rightarrow A$)-переходом, действительно наблюдается при связывании ДНК с РНК-полимеразой в форме холофермента [1017]. Длина промоторного участка, оцененная по величине угла раскручивания 140°, составляет 40 нуклеотидов, что находится в очень хорошем соответствии с данными по анализу различных промоторов [1018].

Легко видеть, что непрерывный ряд таких изгибов, т.е. последова-

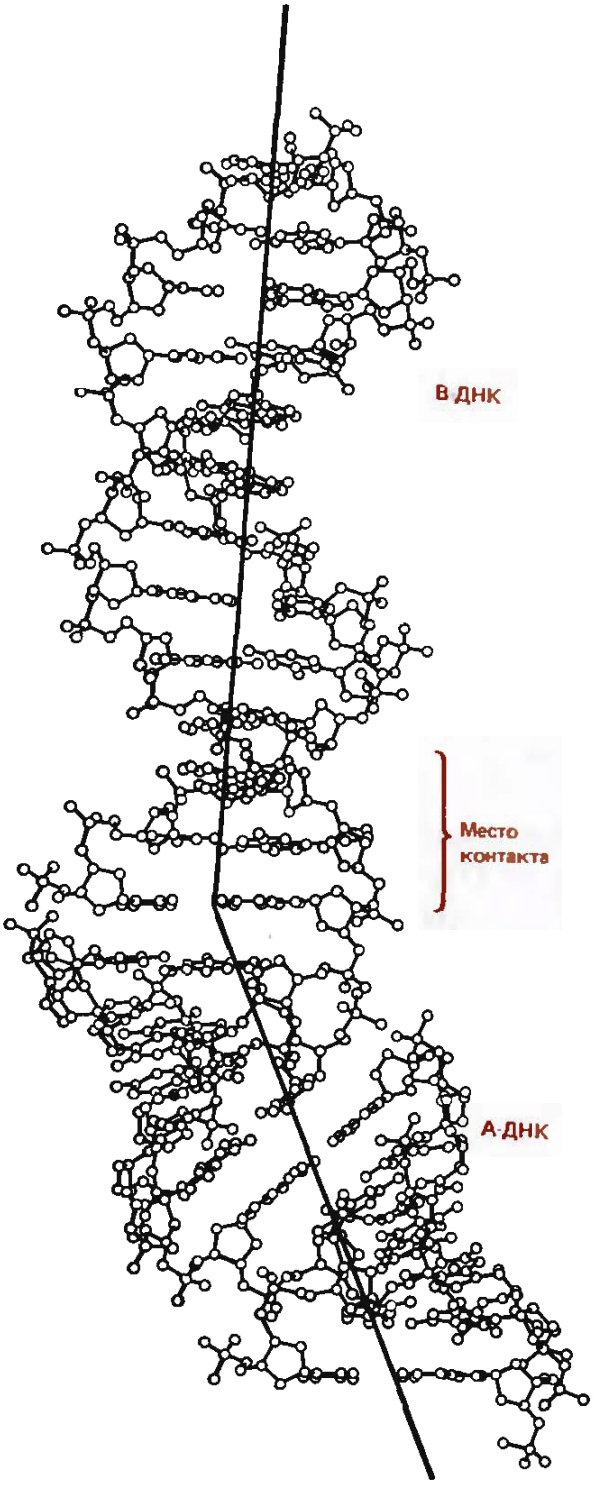


Рис. 14.4. (A–B)-контакт в структуре двойной спирали [1015]. У пары оснований, расположенной в точке контакта, один сахарный остаток находится в $C_{2'}$-*эндо*-конформации, а другой – в $C_{3'}$-*эндо*-конформации, но все торсионные углы имеют обычные значения и в отличие от ДНК с изломами (рис. 14.3) полностью сохраняется стэкинг оснований. Ось спирали, показанная цветной линией, изгибается на 26°.

тельность (А–В)-контактов, приведет к тому, что спираль ДНК совершит полный оборот без каких бы то ни было изломов в цепи и в целом останется более или менее гладкой. Кроме того, поскольку А- и В-ДНК «энергетически близки», вполне возможно, что динамическое поведение ДНК обусловлено миграцией А-ДНК-кластеров вдоль спирали В-типа, а не кластеров β-изломов, наличие которых привело бы к более существенным структурным изменениям.

Следует заметить, что реально существующие в ДНК некоторых эукариот протяженные участки poly(dA)·poly(dT) являются терминаторами транскрипции [1016a]. Это экспериментальное наблюдение можно объяснить структурными особенностями таких участков. Известно, что полинуклеотид poly(dA)·poly(dT) [но не poly(dA—dT)] является конформационно жестким и может находиться только в B′-форме. Следовательно, B→A-переход в таких участках не происходит, что, возможно, и препятствует их связыванию с РНК-полимеразой [1016b].

14.5. «ВЕРТИКАЛЬНАЯ» ДВОЙНАЯ СПИРАЛЬ В СЛУЧАЕ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ С *высокой-анти*-КОНФОРМАЦИЕЙ

Когда основания в полинуклеотиде находятся в *высокой-анти*(*– ск*)-конформации (например, из-за образования связи между атомом C_6 пиримидина или C_8 пурина и атомом $C_{2'}$ сахара), полинуклеотид может образовывать одноцепочечные спирали двух типов: левую, с основаниями, перпендикулярными оси спирали, и правую, с почти параллельными оси основаниями.

На основе последней структуры можно построить «вертикальную» двойную спираль с уотсон-криковскими парами, параметры которой значительно отличаются от параметров двойных спиралей ДНК и РНК [1022, 1023] (рис. 14.5). Пары оснований в такой спирали располагаются почти параллельно оси, а сахарофосфатный остов с основаниями в *высокой-анти*(*– ск*)-конформации обвивает ось на расстоянии от 8 до 18 Å (= радиусу спирали) в зависимости от выбранной модели. Значения всех торсионных углов в целом близки к таковым для двойных спиралей ДНК и РНК, причем можно построить модели как с конформацией сахара $C_{3'}$-эндо, так и с конформацией $C_{2'}$-эндо. Гипотетическая «вертикальная» двойная спираль целиком основана на компьютерных модельных построениях, однако ее адекватность подтверждается результатами спектроскопических исследований, которые показывают, что гомополинуклеотиды с основаниями, зафиксированными в *высокой-анти*(*– ск*)-конформации, способны образовывать одно-, двух- и трехцепочечные спиральные структуры, напоминая тем самым систему poly(A)·poly(U) [1024–1026].

Приведенные примеры показывают, что построить разумную с точки зрения стереохимии модель структуры относительно просто; довольно трудно доказать, что такая модель неверна, но еще труднее доказать, что она справедлива.

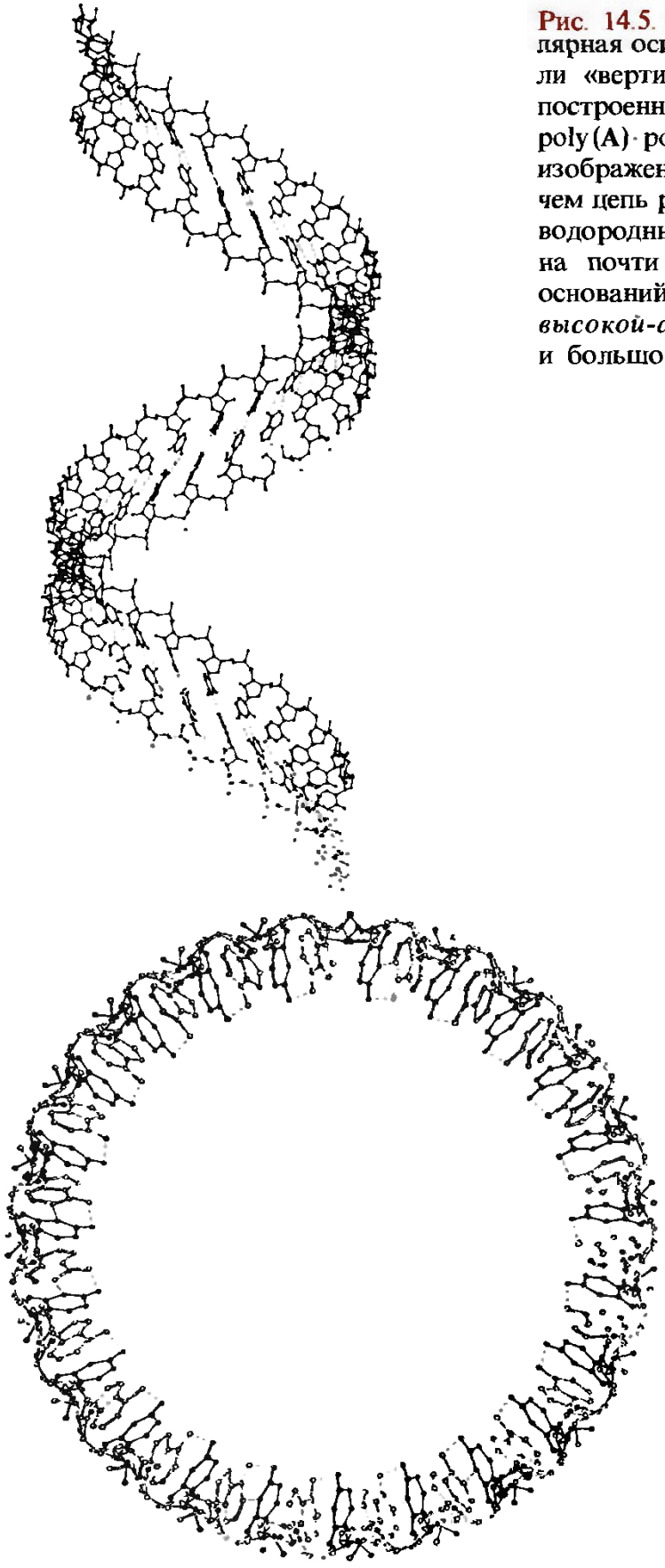


Рис. 14.5. Две проекции (перпендикулярная оси спирали и вдоль оси) модели «вертикальной» двойной спирали, построенной для дуплекса poly(A)·poly(U) [1022]. Цепь poly(U) изображена более жирными линиями, чем цепь poly(A); пунктиром показаны водородные связи. Обратите внимание на почти вертикальную ориентацию оснований, находящихся в *высокой-анти*(–*ск*)-конформации, и большой радиус спирали.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В этой главе описаны некоторые гипотетические структуры ДНК и РНК, основанные главным образом на теоретических расчетах. Чтобы избежать «распутывания» цепей при репликации двухцепочечной ДНК, была предложена модель «бок о бок», в которой правая спираль сменяется левой и, наоборот, через каждые полвитка, или через каждые пять нуклеотидов. Способность ДНК закручиваться вокруг нуклеосомного кора объяснялась изломами в двойной спирали, а не ее плавным изгибанием, причем изломы образовывались путем изменения конформации сахара и (или) торсионного угла γ. Изломы двойной спирали использовались для объяснения поведения ДНК при температурах, близких к T_m, а также в процессе интеркаляции в ДНК лекарственных препаратов. Предполагается также, что изгибы (или изломы) возникают на переходных участках, когда в пределах одной спирали встречаются структуры А- и В-типов. Для полинуклеотидов с основаниями в *высокой-анти*(— *ск*)-конформации была предложена модель «вертикальной» двойной спирали. Закручивающаяся спираль располагается довольно далеко от оси, и внутри остается цилиндрическая полость большого радиуса.

ГЛАВА 15

т РНК – сокровищница стереохимической информации

тРНК – одна из наиболее подробно изученных биологических макромолекул. Связь между ее структурой и функциями рассмотрена во многих книгах и статьях [164, 1027–1038]. Описаны ее спектроскопические свойства, причем особое внимание уделено динамическим аспектам [1027], хорошо изучена термодинамика ее конформационных переходов [449, 554, 1027, 1039, 1040]. Обсуждение всех структурно-функциональных аспектов тРНК увело бы нас слишком далеко, поэтому мы отсылаем читателя к указанным работам и в данной главе сконцентрируем свое внимание непосредственно на структурных проблемах: на первичной, вторичной и третичной структуре тРНК, на роли стэкинга и спаривания оснований в стабилизации спиралей и петель, на конформации нуклеотидов и взаимодействии тРНК с ионами металлов.

15.1. ПЕРВИЧНАЯ И ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА тРНК. «КЛЕВЕРНЫЙ ЛИСТ»

Общие выводы, основанные на анализе нуклеотидной последовательности 200 молекул тРНК. Типичная молекула тРНК – это полинуклеотидная цепь длиной от 75 до 90 нуклеотидов. В ней встречаются не только четыре стандартных типа нуклеотидов, но и приблизительно 10% «редких», или минорных; некоторые из них уже упоминались в разд. 7.4. Проведен анализ первичной структуры примерно 200 известных молекул тРНК [1037, 1041, 1042]. Все они могут быть уложены таким образом, что получается вторичная структура, напоминающая по форме клеверный лист (рис. 15.1).

Каждый из четырех стеблей «клеверного листа» состоит из 4–7 уотсон-криковских пар, образующих двойные спирали. Стебли называются акцепторным, антикодоновым, D- и T-стеблями. Акцепторный стебель содержит 3′- и 5′-концы полинуклеотидной цепи, причем к концевой 3′-гидроксильной группе (C—C—$A_{O_3'}$H) присоединяется специфическая аминокислота, отвечающая последовательности антикодонового триплета в антикодоновой петле (генетический код см. в разд. 6.9). D- и T-стебли названы так потому, что соответствующие петли содержат диги-

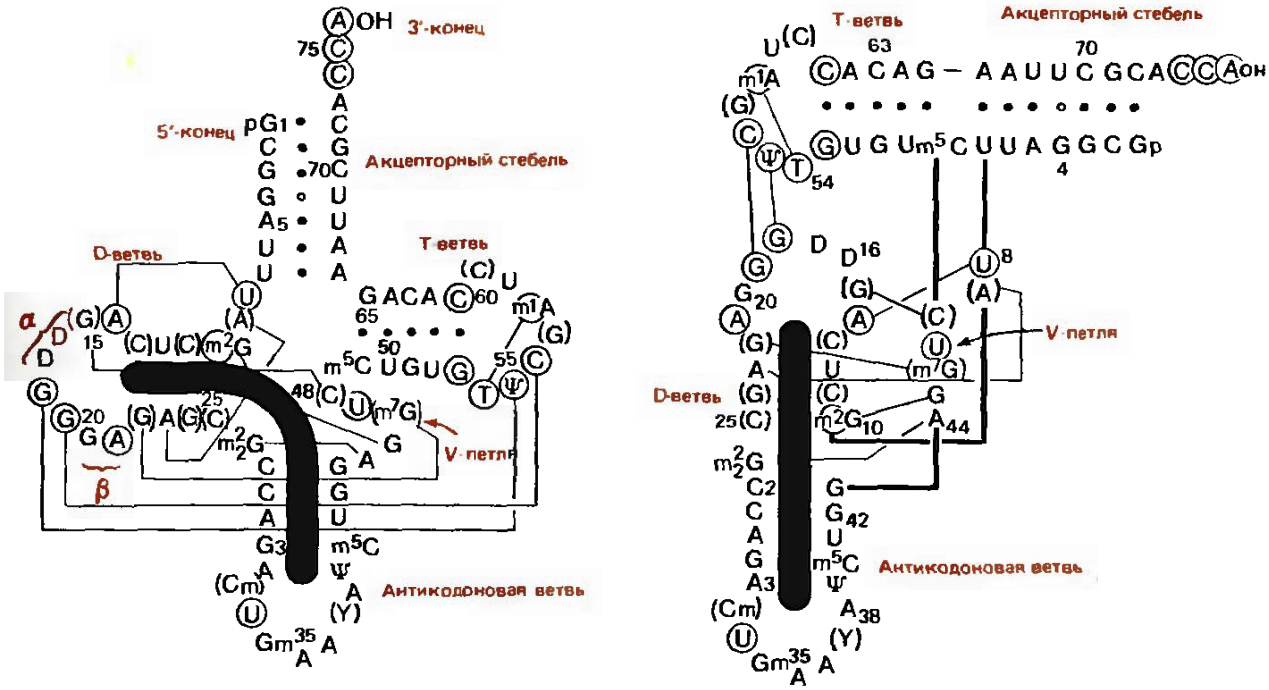


Рис. 15.1. Вторичная и третичная структура дрожжевой тРНК^{Phe}; «клеверный лист» (*слева*) и Г-форма (*справа*) [1031]. Инвариантные в тРНК класса I основания помечены кружками, полуинвариантные заключены в круглые скобки. Точками отмечены уотсон-криковские пары, маленьким кружочком – «качающаяся» пара ($G_4 - U_{69}$). Число нуклеотидов в вариабельной петле V и в областях α и β зависит от вида тРНК. Тонкими линиями соединены пары оснований, которые образуют «третичные» водородные связи. Обратите внимание, что большинство инвариантных и полуинвариантных остатков расположено в середине буквы Г и в шарнирной области и образует третичные водородные связи, которые наряду со стэкингом оснований (рис. 15.3) стабилизируют пространственную структуру тРНК. Черным цветом показано, какие части «клеверного листа», объединяясь, образуют «ножку» буквы Г.

дроуридин (D) и риботимидин (T). Число нуклеотидов в стеблях и петлях, вообще говоря, постоянно, за исключением вариабельных петель, которые у большинства тРНК состоят из 4–5 нуклеотидов (класс I), но в некоторых случаях могут включать от 13 до 21 нуклеотида (класс II). Число нуклеотидов в α- и β-областях D-петли варьирует от 1 до 3 у различных видов тРНК.

Инвариантные и полуинвариантные нуклеотиды. Если последовательности всех тРНК расположить одну под другой, то окажется, что в некоторых позициях всегда находятся одни и те же нуклеотиды; их называют инвариантными. В других местах оказываются только пуриновые нуклеотиды (R), только пиримидиновые (Y) или только гипермодифицированные пуриновые (H); все это так называемые полуинвариантные нуклеотиды. Из рис. 15.1 видно, что большинство инвариантных и полуинвариантных нуклеотидов сконцентрировано в районе петель. Структурная интерпретация этого явления основана на особенностях пространственной укладки цепи тРНК.

15.2. СВЕРТЫВАНИЕ «КЛЕВЕРНОГО ЛИСТА» В ТРЕТИЧНУЮ СТРУКТУРУ. Г-ФОРМА

Как расположены в пространстве четыре ветви «клеверного листа»? Третичная структура, установленная по данным рентгеноструктурного анализа. Еще до того, как в 1973 г. было завершено первое рентгеноструктурное исследование кристаллов тРНК [1043], предпринимались попытки построить модели тРНК на основании имеющихся физических и химических данных и предсказать, как происходит свертывание молекулы тРНК в пространстве [235, 1044]. Особенно близка к общепринятой в настоящее время структуре одна из моделей, предложенная Левиттом. Она верно предсказывает даже большинство пространственных контактов [1045].

В нескольких лабораториях были получены кристаллы тРНК [1044], и три независимые группы ученых успешно провели рентгеноструктурное исследование орторомбических [396, 1046] и моноклинных [85, 87, 1047] кристаллов дрожжевой $тРНК^{Phe}$. Позднее была определена структура дрожжевой $тРНК^{Asp}$ [1048], инициаторных $тРНК^{fMet}$ из дрожжей [1049] и *E. coli* [1050] и дрожжевой $тРНК^{Gly}$ [1051].

Г-форма состоит из двух почти перпендикулярных друг другу спиралей А-РНК. Результаты рентгеноструктурного анализа кристаллов показали, что все тРНК имеют более или менее одинаковую Г-образную конфигурацию; длина обеих частей буквы Г составляет около 70 Å, а толщина – 20 Å и равна диаметру двойной спирали А-РНК. Молекулярная структура двух (независимо исследованных) кристаллических форм дрожжевой $тРНК^{Phe}$ оказалась практически одинаковой, хотя упаковка молекул в моноклинных и орторомбических кристаллах различна. При сравнении со структурой $тРНК^{Asp}$ и инициаторной $тРНК^{fMet}$ обнаружены небольшие, но все же заметные различия, которые здесь рассматриваться не будут.

Два конца буквы Г образованы ССА-концом и антикодоновой петлей, которые находятся друг от друга на расстоянии около 80 Å (рис. 15.1 и 15.2). Наружный край угла буквы Г образован Т-петлей. Акцепторный и Т-стебли уложены один вслед за другим и образуют единую двойную спираль А-РНК из 11 пар оснований. В аналогичную структуру организованы антикодоновый и D-стебли, но в образуемой ими общей спирали имеется излом: угол между двумя осями равен 26° [396].

тРНК – молекула с псевдосимметрией 2-го порядка. Если рассматривать структуру тРНК в общих чертах, то вертикальная и горизонтальная части буквы Г оказываются связанными псевдоосью 2-го порядка, которая делит пополам угол «Г» и связывает друг с другом спирали «антикодон/D» и «акцептор/Т» (рис. 15.2). Так как аминоацил-тРНК-синтетазы (ферменты, которые катализируют присоединение к тРНК специфических аминокислот) существуют в виде мономеров, димеров и структур с бóльшим числом субъединиц, можно предположить, что симметрия тРНК обусловлена димерным (с симметрией 2-го

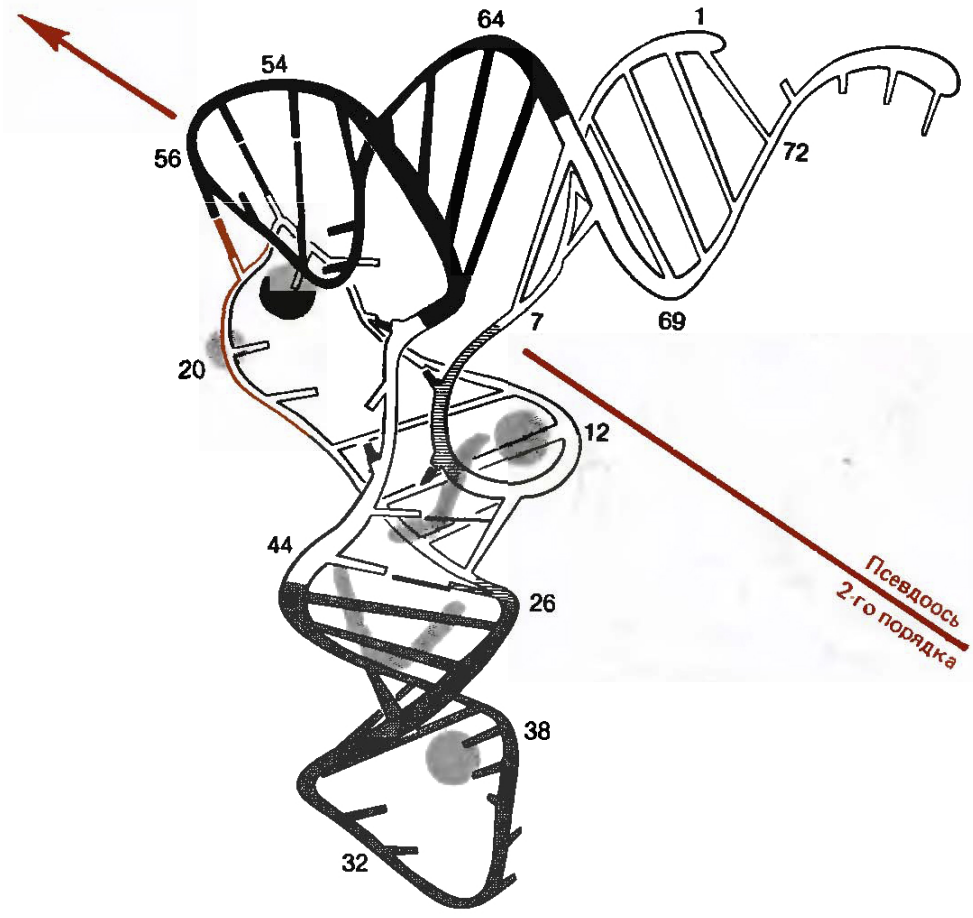


Рис. 15.2. Схематическое представление структуры молекулы тРНК^{Phe} [396]. Непрерывная лента – сахарофосфатный остов. Пары оснований изображены в виде длинных полосок, неспаренные основания – в виде коротких. Цветными линиями показаны третичные водородные связи, которые сконцентрированы в шарнирной области и с наружной стороны угла буквы Г. Четыре ветви «клеверного листа» по-разному затенены. Катионы Mg^{2+}, расположенные в местах сильного связывания, обозначены серыми кружками, две молекулы спермина — серыми изогнутыми линиями.

порядка) состоянием фермента или его агрегацией более высокого порядка – она облегчает узнавание ферментом и субстратом друг друга и обеспечивает наличие симметрии 2-го порядка в структуре комплекса [1052]. Эта привлекательная гипотеза пока не доказана, так как не определена структура ни одного комплекса с тРНК-синтетазой.

15.3. СТАБИЛИЗАЦИЯ ВТОРИЧНОЙ И ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ тРНК ГОРИЗОНТАЛЬНЫМИ И ВЕРТИКАЛЬНЫМИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯМИ МЕЖДУ ОСНОВАНИЯМИ

Кроме уотсон-криковских пар, ответственных за бóльшую часть горизонтальных взаимодействий между основаниями (особенно в стеблях), в тРНК имеется ряд нестандартных пар и триплетов. Нестандартные пары располагаются преимущественно с наружной стороны угла и

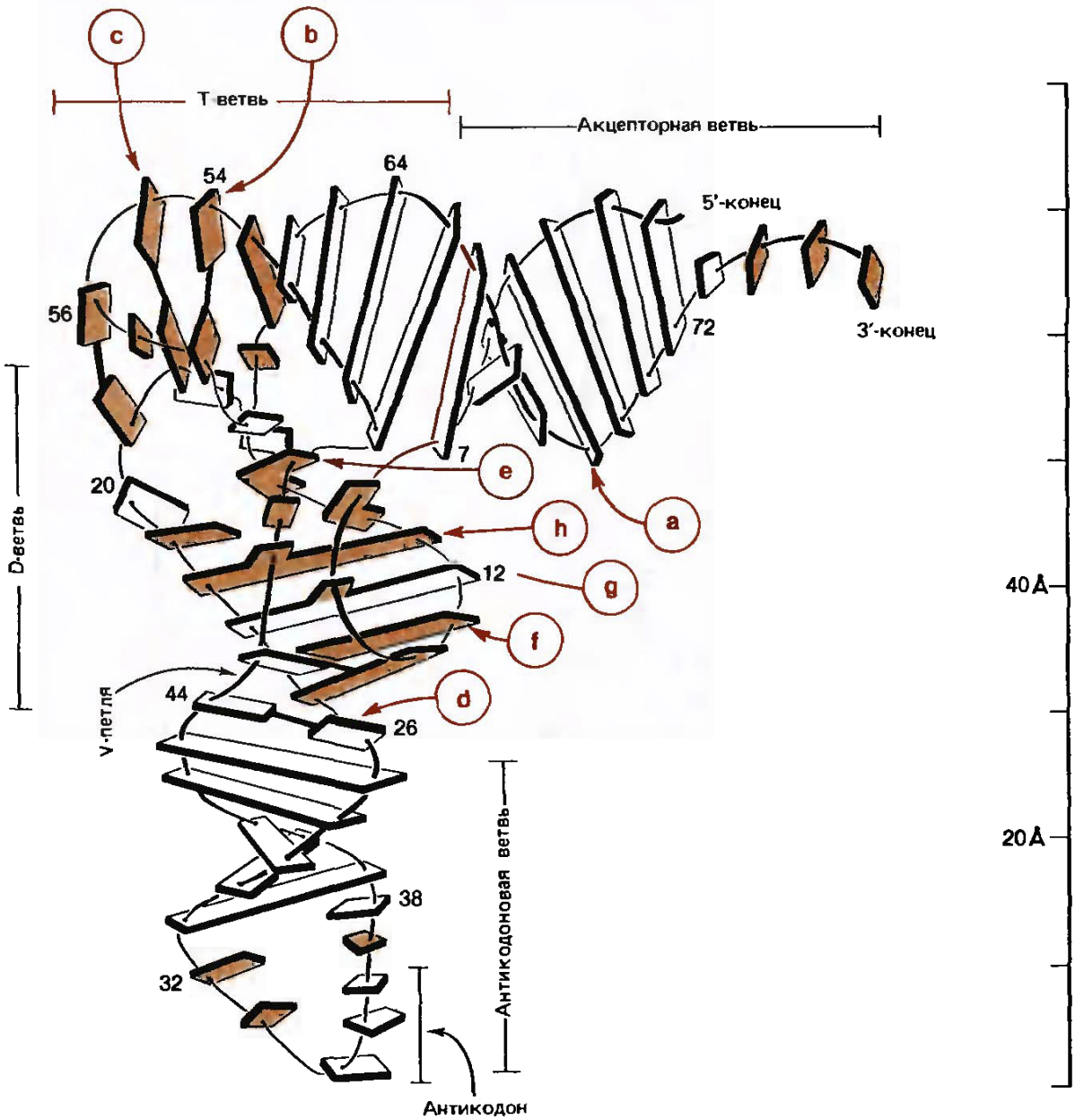


Рис. 15.3. Спаривание оснований и стэкинг-взаимодействия в дрожжевой тРНК^{Phe} [1030, 1046]. Пары, стабилизирующие вторичную и третичную структуру, изображены в виде вытянутых пластин или в виде двух соединенных стержнем коротких пластин. Инвариантные и полуинвариантные основания (закрашены) сконцентрированы в антикодоновой петле, на ССА-конце акцепторного стебля, с наружной стороны буквы Г и в шарнирной области (ср. с третичными водородными связями, изображенными на рис. 15.2 цветными линиями). Обратите внимание на стэкинг оснований 34–38, расположенных в антикодоновой петле, в состав которой входит антикодон Gm_{34}—A_{35}—A_{36}. Буквами от a до h помечены пары и триплеты, изображенные на рис. 15.4.

в шарнирной области буквы Г, где соединяются два спиральных домена. Нестандартное спаривание стабилизирует укладку «клеверного листа» с образованием третичной Г-образной структуры, а многочисленные вертикальные стэкинг-взаимодействия, наличие которых являет-

ся одной из главных характеристик архитектуры тРНК, укрепляют эту структуру (рис. 15.2, 15.3).

Не-уотсон-криковские пары, обнаруженные в дрожжевой тРНК^{Phe}, изображены на рис. 15.4. Одна из них, «качающаяся» пара G_4—U_{69}, входит

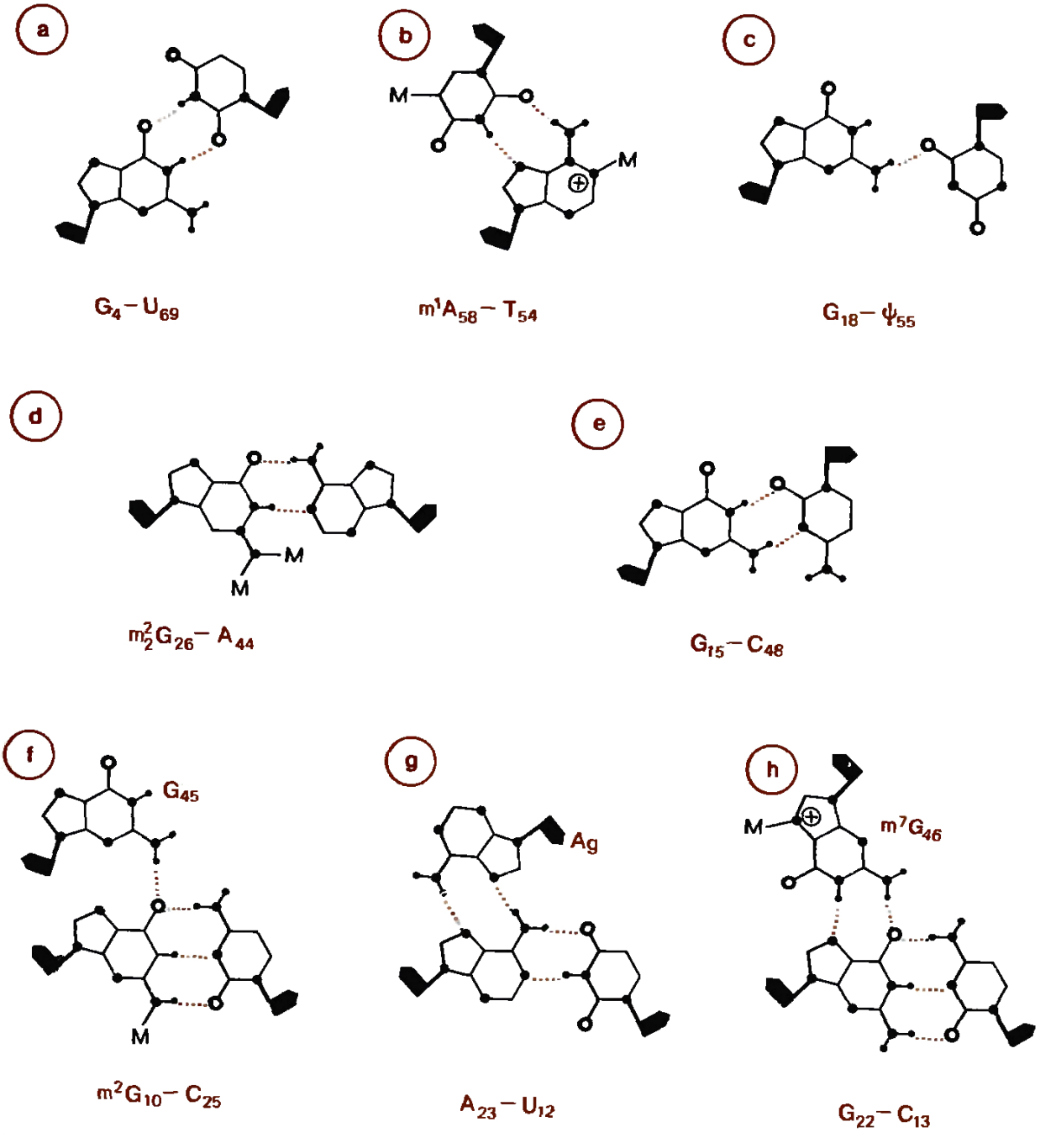


Рис. 15.4. Необычные взаимодействия между основаниями, обнаруженные у дрожжевой тРНК^{Phe}. Их местонахождение в молекуле тРНК показано на рис. 15.3. Все остальные пары принадлежат к уотсон-криковскому типу. Флажки на гликозидных связях указывают ориентацию остова. В случаях c, e, f (m^2G_{10}, G_{45}), g(A_9, A_{23}), h(C_{13}, m^7G_{46}) цепи параллельны, а во всех остальных случаях антипараллельны. Все эти пары уже были изображены на рис. 6.1.

в состав акцепторного стебля. По своей структуре она сходна с уотсон-криковской и поэтому не нарушает структуру двойной спирали, а лишь создает небольшую выпуклость в сахарофосфатном остове. Пара G_{15}—C_{48} – это обратная уотсон-криковская пара с параллельной ориентацией цепей. В обратной хугстеновской паре m^1A_{58}—T_{54} наблюдается антипараллельная ориентация. Образование здесь уотсон-криковской пары блокируется метилированием основания m^1A_{58}. Следовательно, хугстеновское спаривание в данном случае является единственно возможным способом образования водородных связей с другим основанием. Вероятно, образованию хугстеновской пары благоприятствует также положительный заряд, который возникает из-за метилирования N_1. Пурин-пуриновая пара $m_2^2G_{26}$—A_{44} «длиннее», чем нормальная уотсон-криковская, а кроме того, она в значительной степени непланарна из-за стерического отталкивания между диметиламиногруппой G_{26} и группой C_2H аденина. Так как эта пара находится на стыке между антикодоновым стеблем и D-стеблем и взаимодействует с обоими, то именно она ответственна за излом в 26° между двумя спиралями.

В тРНК имеется также несколько триплетов оснований, в которых кроме уотсон-криковской пары присутствует дополнительное основание, присоединенное со стороны главного желобка либо одной водородной связью, как в триплете m^2G_{10}—C_{25}—G_{45}, либо двумя, как в триплетах G_{22}—C_{13}—m^7G_{46} и A_{23}—U_{12}—A_9; в последнем триплете пара A–A выглядит так же, как пары оснований в двойной спирали poly(AH^+)·poly(AH^+) (разд. 13.3). Во всех этих триплетах обязательно представлена одновременно и параллельная, и антипараллельная ориентация полинуклеотидных цепей.

Большинство «третичных» водородных связей образуется между постоянными основаниями. Из рис. 15.2 и 15.3 видно, что большая часть стабилизируюших третичную структуру водородных связей образуется между инвариантными и полуинвариантными основаниями. Так как все тРНК можно сложить в «клеверный лист», это означает, что их пространственная структура более или менее одинакова, т.е. имеет вид буквы Г [1053, 1054].

Стэкинг оснований как главная структурная особенность. В дрожжевой $тРНК^{Phe}$ только 42 основания из 76 входят в спиральные участки. Тем не менее в стэкинг-взаимодействиях участвует 71 основание. Свободные от стэкинга основания – это G_{20}, U_{47}, концевой аденин A_{74} и остатки дигидроурацила D_{16}, D_{17}. Последние, будучи неплоскими и неароматическими, в общем-то и не должны участвовать в стэкинге (разд. 7.4).

Схема стэкинга оснований в спиральных доменах практически такая же, как у двухцепочечных А-РНК. Однако перекрывание оснований несколько сильнее; по своей плотности спирали эквивалентны структуре с числом пар на виток, меньшим 11 [1052]. Хотя основания U_7 и m^2C_{49} непосредственно не связаны друг с другом, спиральная структура в этом месте (в месте контакта между акцепторным стеблем и Т-сте-

блем) не нарушается, потому что сохраняется регулярность стэкинга – оба основания взаимодействуют с примыкающими к ним парами.

Интересная схема стэкинга обнаружена у уотсон-криковской пары m^2G_{10}—C_{25}, расположенной над основанием $m_2^2G_{26}$ упоминавшейся ранее «длинной» пурин-пуриновой пары. Она приводит к излому 26° между антикодоновым стеблем и D-стеблем. Далее в Т-петле обратная хугстеновская пара m^1A_{58}—T_{54} между инвариантными основаниями и инвариантная пара G_{18}—Ψ_{55} с единственной водородной связью образуют стэкинг с уотсон-криковской парой G_{53}–C_{61}, причем последняя также инвариантна во всех тРНК [1055]. Одно время считали, что расположенная в углу Г-образной молекулы тРНК инвариантная последовательность $T_{54}\Psi_{55}C_{56}G_{57}$ обусловливает связывание тРНК с рибосомной 5S-РНК [1056]. Более новые данные показывают, однако, что в процессе биосинтеза белка такое взаимодействие, вероятно, не осуществляется [1056а].

Интеркаляция оснований – особый вид стэкинга. Чтобы оптимизировать общую схему стэкинг-взаимодействий в молекуле, в отдельных местах основание из одной цепи встраивается между двумя основаниями другой цепи. Такое взаимодействие осуществляется там, где встречаются сразу три цепи: с внутренней стороны угла буквы Г и в области Т-петли. Кроме изображенного на рис. 15.5 случая интеркаляции основания A_9 между основаниями G_{45} и m^7G_{46} обнаружены еще три: C_{13} между U_8 и A_9; G_{18} между m^1A_{58} и G_{57}; G_{57} между G_{18} и G_{19} [1057]. Такое расположение основания подразумевает, что расстояние от него до каждого из соседей равно 3,4 Å, поэтому сахарофосфатный остов в месте вставки основания должен перестроиться. К описанию того, как это происходит, мы теперь и перейдем.

15.4. ИЗМЕНЕНИЕ КОНФОРМАЦИИ САХАРА, π-ПОВОРОТ И ПЕТЛЯ СО СТЭКИНГОМ «ФОСФАТ—ОСНОВАНИЕ»: НАИБОЛЕЕ ВАЖНЫЕ СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ

Для того чтобы молекула тРНК могла свернуться с образованием столь сложной структуры, состоящей из спиралей и петель, конформация нуклеотидов в определенных участках молекулы должна отличаться от стандартной.

При изменении конформации сахара *C_3'-эндо → C_2'-эндо* **рибозофосфатный остов вытягивается** и расстояние P···P увеличивается от 5,9 до 7 Å (рис. 9.3). Такое изменение происходит в интеркаляционных участках, включающих остатки A_9, G_{19}, m^7G_{46} и m^1A_{58}, где примыкающие друг к другу основания должны раздвинуться еще на 3,4 Å, чтобы могла произойти интеркаляция (рис. 15.5). C_2'-*эндо*-конформация сахара встречается также в тех участках, где происходит резкое «переключение» структуры со спирали на петлю, т. е. в положениях U_7, C_{48} и C_{60}, а также там, где цепь вытягивается,–в положениях D_{17} и G_{18} [1057, 1058].

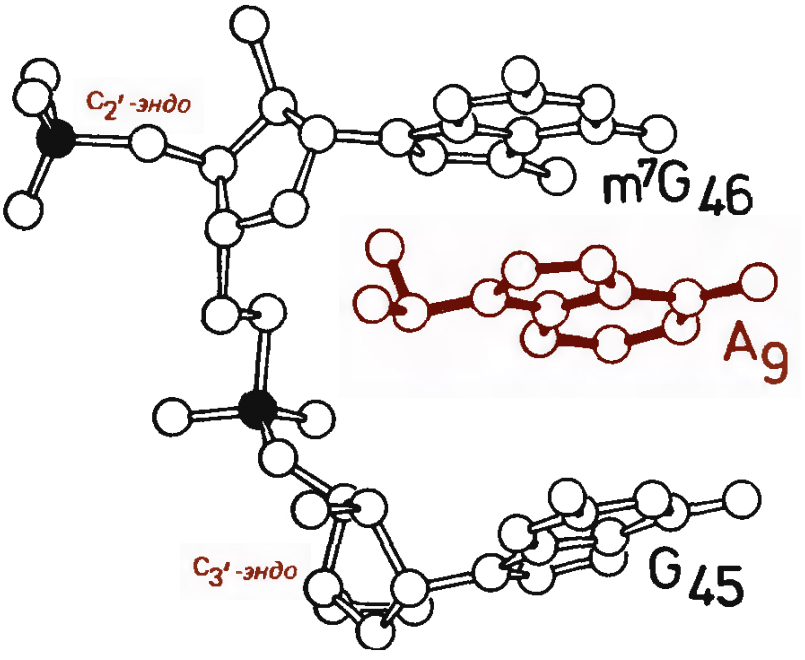


Рис. 15.5. Интеркаляция аденина A_9 (изображен в цвете) между остатками гуанина m^7G_{46} и G_{45} [1054]. Этот особый вид стэкинг-взаимодействия сопряжен с расхождением остатков гуанина еще на 3,4 Å; при этом конформация рибозы изменяется от $C_{3'}$-*эндо* до $C_{2'}$-*эндо*. Черными кружками изображены атомы фосфора.

π-поворот: изменение углов вращения вокруг связей P—O остова в местах поворота цепи. Характерные отклонения значений этих углов от величин, свойственных спиральной конформации, обнаружены в антикодоновой и Т-петлях дрожжевой $тРНК^{Phe}$, в дуплексе $ApAH^+pAH^+ \cdot ApAH^+pAH^+$, в $UpAH^+$ и в комплексе ApU с 9-аминоакридином (разд. 10.5, 13.3 и 16.2). Во всех этих молекулярных структурах две рибозы, соединенные фосфодиэфирной связью, ориентированы не одинаково (как в спиралях), а смотрят в противоположные стороны (антипараллельны). Этот резкий поворот, названный по аналогии с полипептидными цепями π-поворотом, обусловлен в первую очередь изменением углов вращения вокруг связи $P—O_{3'}$ или $P—O_{5'}$ (рис. 15.6). Существуют три типа π-поворотов, π_1, π_2 и π_3, со значениями угла ζ в окрестности 85, 170 и 285° соответственно (рис. 15.7). Степень поворота определяется углом α, величина которого в спиральных структурах лежит в области 290°. Таким образом, π_3-поворот с величиной $\alpha = 290°$ — это классическая спиральная конформация. Именно такой поворот чаще всего встречается во всех тРНК. У 3′-концов нуклеотидов 9, 17, 33, 46 и 55 наблюдаются неспиральные π_3-повороты с величиной угла вращения α вокруг связи $P—O_{5'}$ в области $+ск$ или *ап*. Нуклеотиды 33 и 55 находятся в антикодоновой и Т-петлях и стабилизируются в соответствующей ориентации характерным взаимодействием «основание—фосфат». В дрожжевой $тРНК^{Phe}$ π_1-поворот обнаружен у 3′-конца нуклеотида U_{47}, а π_2-поворот — в положении G_{15}.

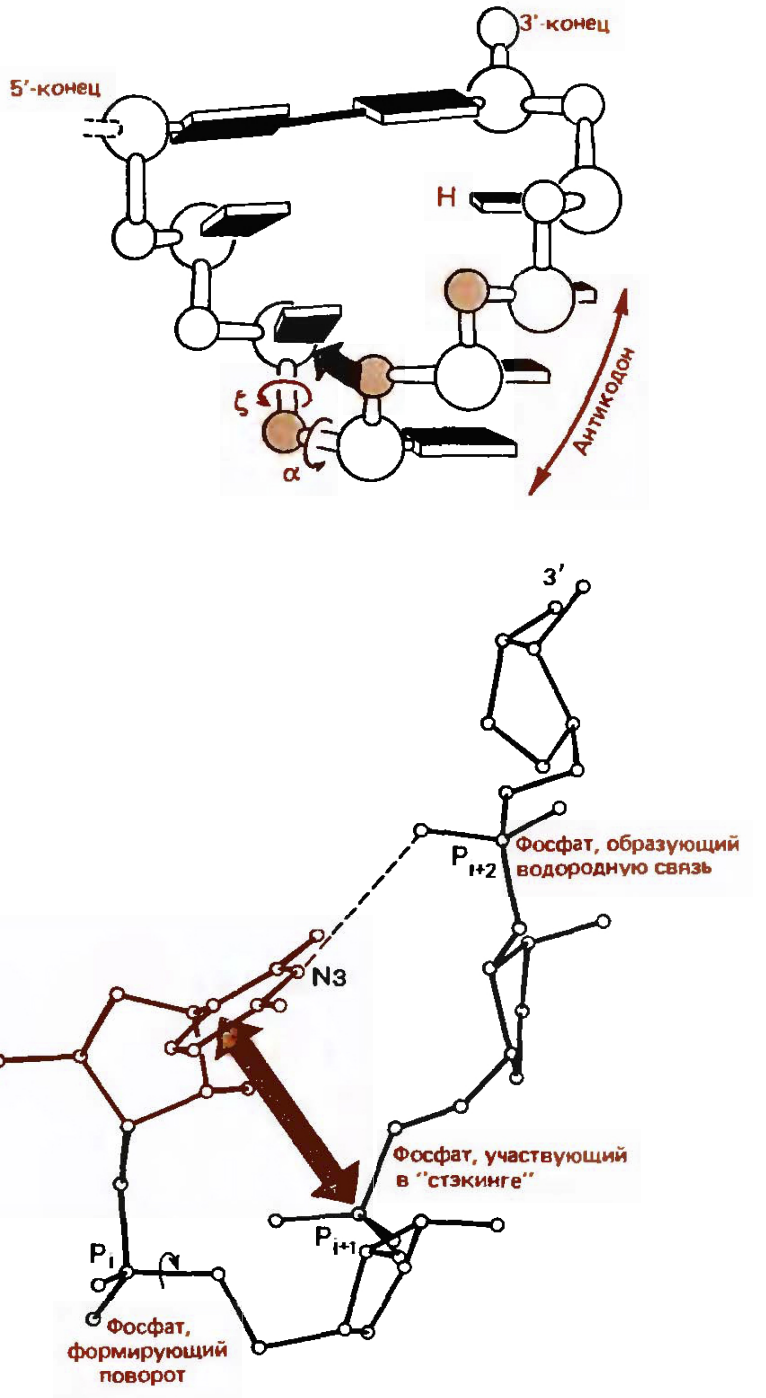


Рис. 15.6. *Вверху.* Схематическое представление π_3-поворота, который присутствует в антикодоновой и Т-петлях дрожжевой тРНК^{Phe} [964]. Сахарные остатки и фосфатные группы изображены соответственно в виде больших и малых сфер; основания показаны в виде пластинок, пары – в виде пластинок, соединениых стержнем; символом H помечено гипермодифицированное основание. Полуинвариантные и инвариантные основания образуют стэкинг с парой, расположенной на верхнем краю петли, и в то же время самое нижнее основание антикодоновой петли участвует в стэкинг-взаимодействии с основаниями, расположенными справа. Фосфаты, изображенные в цвете, принимают активное участие в формировании поворота – они образуют водородные связи (пунктирная линия) и стэкинг (жирная стрелка); соответствующие углы вращения α и ζ лежат в областях *ап* и *– ск*, что отвечает π_3-повороту. *Внизу.* Детальное изображение петли, иллюстрирующее образование водородной связи, стэкинг и расположение фосфатов (закрашены) в области поворота. Стэкинг между фосфатной группой и урацилом показан двойной стрелкой, водородная связь между N_3H-группой урацила и атомом кислорода фосфата – пунктирной линией [1060].

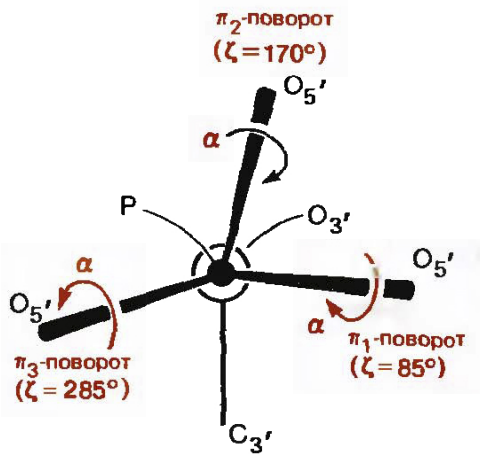


Рис. 15.7. Три типа π-поворота различаются по величине угла ζ (вид вдоль связи P—$O_{3'}$) [964]. Степень поворота зависит от того, насколько угол α отличается от 290° — величины, отвечающей спиральной конформации.

π_3-повороты в антикодоновой и Т-петлях стабилизируются стэкинг-взаимодействием «основание — фосфат». В этих двух петлях наблюдается характерная и, по-видимому, идентичная укладка полинуклеотидной цепи (рис. 15.6) [1055]. В обоих случаях π_3-поворот происходит на уровне 3′-фосфатов инвариантных нуклеотидов U_{33} и Ψ_{55}. Последние образуют стэкинг с основаниями, непосредственно предшествующими спиралям, т.е. с полуинвариантным C_{m32} и инвариантным T_{54}. Однако нуклеотиды G_{m34} и C_{56}, следующие за U_{33} и Ψ_{55}, смещаются в результате π_3-поворота (углы α и ζ лежат в областях *ап* и *— ск*). За это нарушение ответственны фосфаты, расположенные на 3′-конце данных нуклеотидов, которые находятся в стэкинг-взаимодействии с предшествующими основаниями U_{33} и Ψ_{55} [1059]. Кроме того, между N_3H-группой основания U_{33} и атомом кислорода фосфатной группы, присоединенной к атому $O_{3'}$ нуклеотида, стоящего по цепи на две позиции ниже, т.е. A_{35}, образуется водородная связь, которая также способствует стабилизации этой структуры. Поскольку этот тип укладки цепи связан с полуинвариантым и инвариантным основаниями, следует ожидать, что он будет структурным инвариантом во всех тРНК класса I.

15.5. НЕКОТОРЫЕ СТЕРЕОХИМИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯЦИИ, ЗАТРАГИВАЮЩИЕ ТОРСИОННЫЕ УГЛЫ χ, δ И α, ζ

Стереохимия нуклеотидов тРНК подробно рассмотрена в нескольких статьях [87, 396, 1032, 1046, 1047, 1058–1060]. Здесь мы обсудим только наиболее характерные особенности, связанные с конформацией нуклеотидов тРНК.

Общие структурные характеристики, представленные с помощью конформационного круга. Если изобразить графически функциональную зависимость торсионных углов α, β, γ, δ, ε и χ от нуклеотидной последовательности, представленной в кольцевой форме, то мы получим картину, изображенную на рис. 15.8 [1061, 1062]. Из такого суммарного представления видно, что в двух- и одноцепочечных спиралях значения всех торсионных углов согласуются со стандартной геометрией нуклеотидов, описанной в гл. 4. Однако в области петель наблюдаются значи-

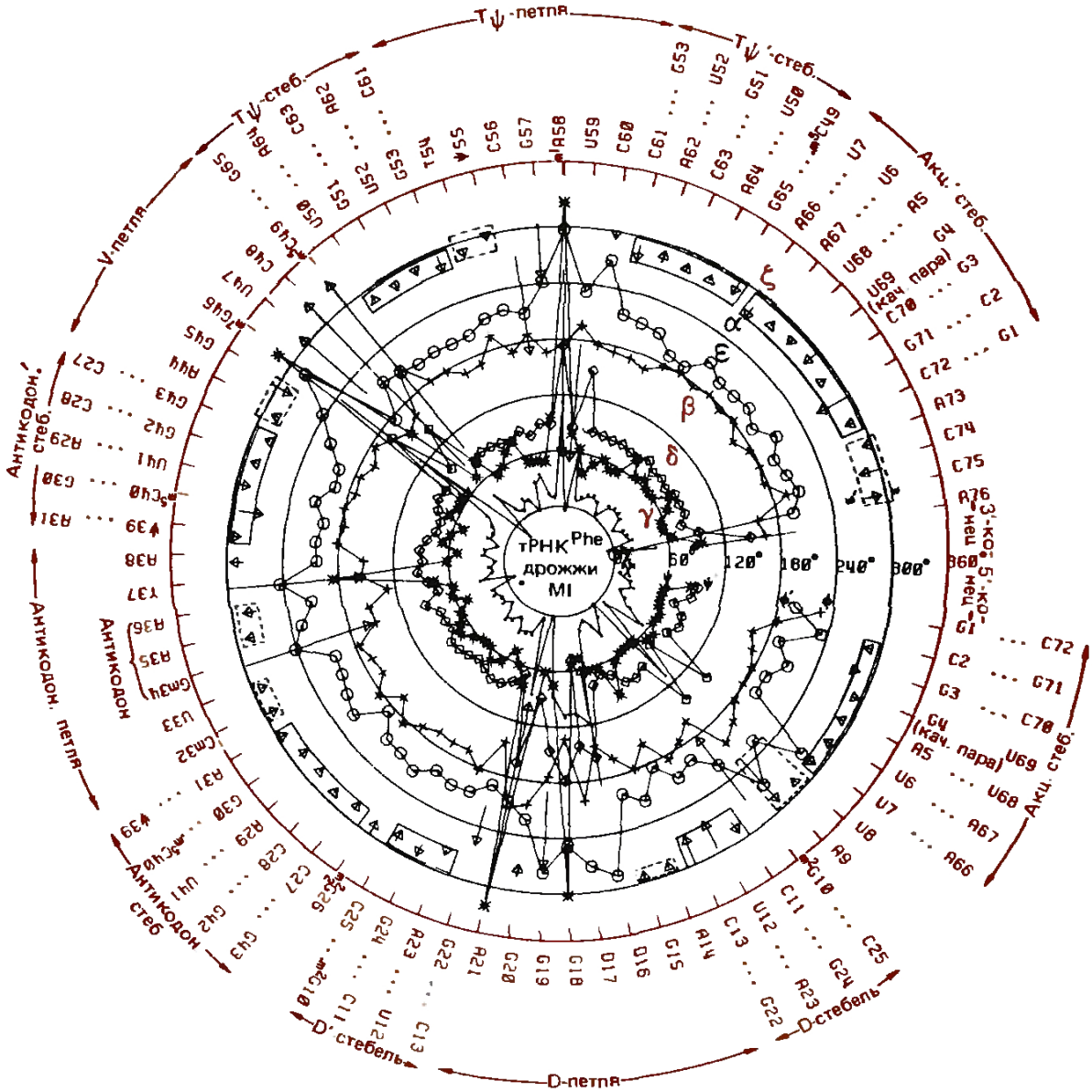


Рис. 15.8. Конформационный круг для моноклинной формы дрожжевой тРНК^{Phe}, построенный по координатам, опубликованным в работе [1058]. На периферии круга приведена нуклеотидная последовательность и показаны уотсон-криковские пары в спиралях стеблей. Концентрические окружности разбивают круг на зоны, соответствующие интервалам углов по 60° (углы пропорциональны радиусу). Условные обозначения для торсионных углов (от периферии к центру): α и ζ – стрелочки; конец стрелки отвечает значению α, а начало – значению ζ, ε – кружки, β – плюсы, δ – ромбы, γ – звездочки, χ – точки. χ – это торсионный угол $O_{4'}$—$C_{1'}$—N— (C_8 или C_6). Чтобы привести его в соответствие с нашей номенклатурой, где используется угол $O_{4'}$—$C_{1'}$—N— (C_4 или C_2), нужно к указанным значениям прибавить 180°. Спиральной конформации фосфодиэфирной связи отвечают значения α и ζ, лежащие в области *– ск*, т.е. 270–300°; на рисунке они заключены в рамку из сплошных линий. Пунктирные рамки отвечают одноцепочечным участкам. Пики указывают на нарушения конформационной регулярности. Они приходятся на области D-, V- и T-петель [1062].

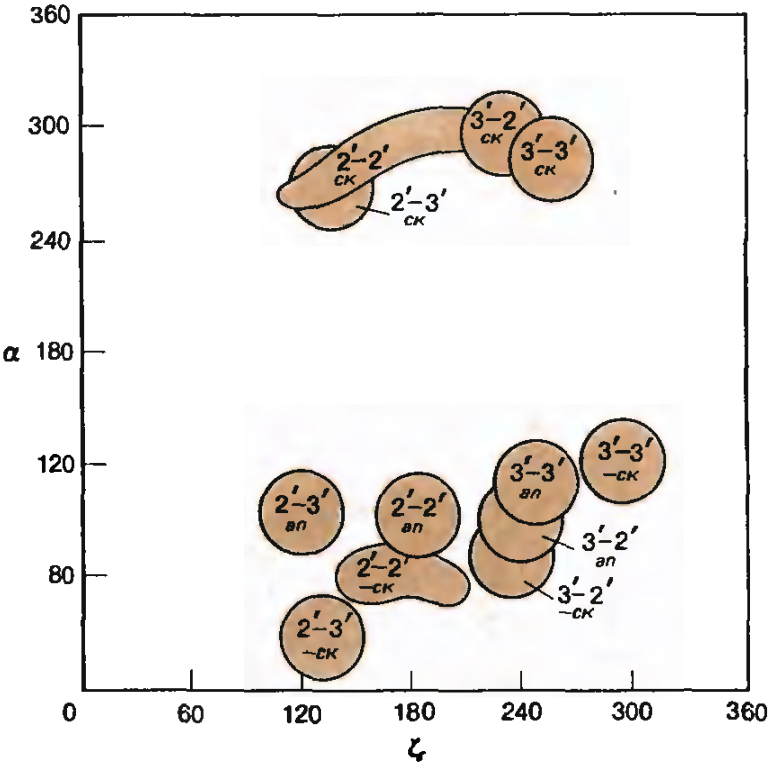


Рис. 15.9. Корреляция между углами вращения α и ζ вокруг связей P—O с конформацией сахара ^2E, ^3E и углом вращения γ вокруг связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ для различных динуклеозидфосфатов тРНК [1063]. Конформация рибозы C_2'-*эндо* обозначена цифрой 2, а $C_{3'}$-*эндо*–цифрой 3. Комбинация 2–3 отвечает фрагменту рибоза(^2E)–фосфат–рибоза(^3E). Области значений угла γ указаны как $+$*ск*, $-$*ск* и *ап*.

тельные отклонения, которые отвечают радиальным пикам на круговой диаграмме. При более внимательном анализе рисунка обнаруживается, что в большинстве случаев пики появляются в тех местах, где величина угла δ, описывающего конформацию сахара, возрастает от нормального для $C_{3'}$-*эндо*-конформации значения 90° до типичного для $C_{2'}$-*эндо*-конформации значения 140°. Изменение δ сопровождается изменением χ-гликозидного торсионного угла (который теперь в некоторых случаях отвечает *высокой-анти*($-$*ск*)-конформации), а также изменением углов α, ζ и γ (рис. 15.9).

Связь между конформацией сахара, торсионным углом γ (вращение вокруг связи $C_{4'}$—$C_{5'}$) и углами вращения α и ζ вокруг связей P—O. Данные, представленные на рис. 15.9, отвечают обобщенной геометрии дирибозотрифосфатных фрагментов дрожжевой тРНК^{Phe}, полученной расчетным путем [1063]. Если конформация одной или двух рибоз в таком фрагменте $C_{2'}$-*эндо*, т.е. конформация всего фрагмента ^2E–^3E, ^2E–^2E или ^3E–^2E, то торсионный угол ζ (вращение вокруг связи P—$O_{3'}$) для центрального фосфата принимает значения 120, 180 и 240° соответственно. В спиральных же участках, где конформация фрагмента ^3E–^3E, угол ζ уже попадает в типичную область в окрестности 270°. Что касается торсионного угла α (вращение вокруг связи P—$O_{5'}$), то

его значение сильнее коррелирует с величиной угла вращения γ вокруг связи $C_{4'}$—$C_{5'}$. Если значение γ отвечает $+ск$-конформации, то α лежит в окрестности 270°; если же γ принадлежит области *ап* или $-ск$, то α смещается в область $+ск$. В отличие от ζ торсионный угол α, по-видимому, определяется не конформацией сахара, а величиной γ.

Правила, сформулированные в гл. 4 для обобщенной конформации нуклеотида, справедливы также для тРНК. Вернувшись к рис. 4.25, на котором представлены торсионные углы полинуклеотидного остова и гликозидный угол χ для тРНК, мы увидим, что в целом картина согласуется с теми положениями, которые сформулированы для моно- и олигонуклеотидов, т.е. стереохимия нуклеотидов сохраняется даже тогда, когда полимер укладывается в такую сложную структуру, как структура тРНК. Совершенно очевидно, что из двух углов вращения вокруг связи Р—О α меняется в больших пределах, чем ζ. В паре углов вращения вокруг связи С—О β лежит в области *ап*, тогда как угол ε смещен в область $-ак$, и его значения концентрируются в окрестности 235°. Из двух углов, определяющих повороты вокруг связей С—С остова, γ в подавляющем большинстве случаев предпочитает находиться в области $+ск$, иногда лежит в $+ак$-области и только в нескольких случаях обнаружен в областях $-ск$ и $-ак$; значения δ, напротив, всегда ограничены областью $+ск$ при конформации $C_{3'}$-*эндо* и областью $+ак$ при конформации $C_{2'}$-*эндо*, причем, судя по углам псевдовращения *P*, преобладает первая из них. Наконец, гликозидный торсионный угол χ в основном ограничен областью *анти* и лишь у нескольких нуклеозидов лежит в *высокой-анти* ($-ск$)-области.

Следует подчеркнуть, что численные значения углов, которые приведены на рис. 4.25 и 15,8, не очень точны; они немного изменяются от одного уточнения структуры к другому. Но общий вид распределения остается неизменным даже при сравнении результатов для разных кристаллических форм дрожжевой $тРНК^{Phe}$.

15.6. СВЯЗЫВАНИЕ С тРНК КАТИОНОВ МЕТАЛЛОВ И ПОЛИАМИНОВ

Поскольку тРНК представляет собой полианион, не удивительно, что она связывает ионы металлов и полиамины биологического происхождения, например путресцин, спермидин и спермин (схема 15.1), которые при физиологических условиях представляют собой поликатионы [1064, 1065].

Схема 15.1. Химические формулы некоторых биологических полиаминов при физиологических условиях

Путресцин $H_3N^+—(CH_2)_4—N^+H_3$

Спермидин $H_3N^+—(CH_2)_3—N^+H_2—(CH_2)_4—N^+H_3$

Спермин $H_3N^+—(CH_2)_3—N^+H_2—(CH_2)_4—N^+H_2—(CH_2)_3—N^+H_3$

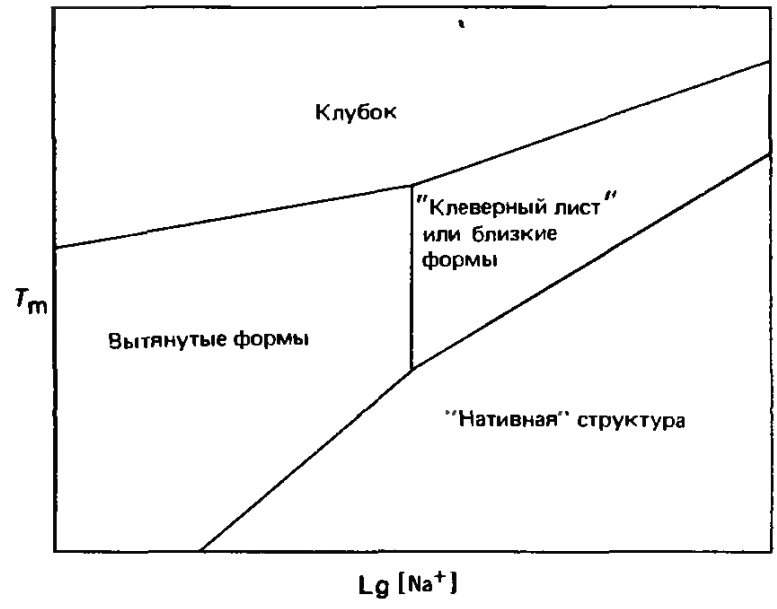


Рис. 15.10. Фазовая диаграмма для тРНК^{Phe} *E. coli*, показывающая зависимость конформационного состояния молекулы от $\log[Na^+]$ и температуры. Ниже некоего определенного значения концентрации Na^+ у молекулы исчезает третичная структура. По мере повышения концентрации Na^+ температура структурных переходов (третичная структура → вторичная структура → клубок) постепенно повышается. (Из работы Cole P. E., Yang S. K., Crothers D. M., Biochemistry, 1972, **11**. 43–58. Приведено с разрешения издателя.)

Связывание ионов двухвалентных металлов осуществляется кооперативно. Самое удивительное, что присутствие определенных катионов является обязательным условием стабилизации нативной структуры тРНК [1027, 1039, 1066]. Более того, в тРНК имеются места сильного и слабого связывания двухвалентных катионов. Об этом свидетельствуют результаты самых разных исследований: с помощью равновесного диализа, ЯМР, тушения флуоресценции, калориметрии [1067–1075].

Сильное связывание, которое характеризуется константами связывания $\sim 10^5$ л·моль$^{-1}$, вообще говоря, кооперативно [1068]. В случае Mg^{2+} равновесие устанавливается очень медленно, постоянная времени представляет собой величину порядка секунд. Это обусловлено высокой энергией активации (~ 30 ккал·моль$^{-1}$), характерной для реакции замещения сильно связанного Mg^{2+} [1074]. Все эти данные предполагают, что, связываясь с Mg^{2+}, молекула тРНК из денатурированной формы переходит в нативную. Вместо ионов Mg^{2+} с тРНК могут связываться одновалентные ионы, и (по крайней мере в случае натрия) процесс протекает ступенчатым образом в соответствии со схемой «Беспорядочный клубок → Вторичная структура → Третичная структура» (рис. 15.10) [1076]. Число мест сильного связывания у различных тРНК неодинаково и меняется от единицы для тРНК^{fMet} *E. coli* [1067] до 17 (из которых кооперативны только пять) для дрожжевой тРНК^{Phe} [1069]. Ион Mg^{2+}

можно также заменить на Mn^{2+} [1069, 1070] и ионы других переходных металлов, связывающихся в виде разнообразных координационных комплексов [1071]. Слабое связывание, которое характеризуется константами порядка 10^3 л·моль$^{-1}$ [1068], не является кооперативным, и соответствующие места связывания менее специфичны, чем в случае сильного связывания.

Где происходит связывание катионов Mg^{2+}? Рентгеноструктурные данные для моноклинной и орторомбической модификаций кристаллов дрожжевой тРНК^{Phe} показывают, что Mg^{2+} связывается с тРНК в виде октаэдрических комплексов $[Mg(H_2O)_6]^{2+}$ и в обеих кристаллических формах занимает примерно одни и те же места [85, 1032, 1077–1079]. Взаимодействие с тРНК^{Phe} осуществляется либо путем образования водородной связи с молекулой воды из гидратной оболочки Mg^{2+}, либо путем замещения одной или двух молекул воды на атом кислорода фосфатных групп (табл. 15.1; рис. 15.2). Все четыре гидратированных катиона магния локализованы в неспиральных областях и, по-видимому, нужны для того, чтобы стабилизировать пространственную структуру петель; в целом это представление согласуется с данными ЯМР [1079, 1080].

Связывание с переходными металлами. С тРНК могут связываться не только ионы Mg^{2+}, но и другие катионы. По результатам рентгеноструктурного анализа не удается однозначно локализовать ионы натрия. Однако места связывания некоторых переходных металлов установлены, причем эти металлы представляют интерес не столько для

Таблица 15.1. Связывание катионов магния (II) с дрожжевой тРНК^{Phe}

Комплекс	Место связывания	Атомы, участвующие в образовании координационных связей	Атомы, участвующие в образовании водородных связей
$Mg(H_2O)_5^{2+}$	D-петля	Атом кислорода фосфатной группы G_{19}	Атомы кислорода фосфатных групп G_{19} и оснований G_{20}, U_{59} и C_{60}
$Mg(H_2O)_4^{2+}$	D-петля	Атомы кислорода фосфатных групп G_{20} и A_{21}	Молекулы воды
$Mg(H_2O)_6^{2+}$	Поворот, образованный остатками U_8–U_{12}	—	Атомы кислорода фосфатных групп U_8, A_9, C_{11} и U_{12}
$Mg(H_2O)_5^{2+}$	Антикодоновая петля	Атом кислорода фосфатной группы Y_{37}	Основания C_{32}, Y_{37}, A_{38} и Ψ_{39}

Примечание. Здесь перечислены четыре места сильного связывания [1079].

биохимиков, сколько для кристаллографов, так как они используются при решении фазовой проблемы (гл. 3). В большинстве случаев такие катионы связываются с тРНК при помощи координационных связей с основаниями, как это описано в гл. 8. Так, *транс*-дихлордиаминоплатина (II) образует координационные связи с атомами N_7 и O_6 гуанина G_{34}. Связывание с атомами N_7 гуанинов обнаружено в нескольких случаях: осмий—бипиридин—G_{30}, Mn^{2+}—G_{20} и Co^{2+}—G_{15}. В этих комплексах молекулы воды образуют дополнительные водородные связи с кислородом O_6 кетогруппы гуанина и с основаниями и фосфатами соседних нуклеотидов (см. рис. 8.5) [1077]. В связывании с $AuCl_2^-$ участвуют одновременно атомы N_7 и N_6 аденина A_{31} и атомы N_7 и O_6 гуанина G_{m34} [1047]. Лантаниды, которые подробно рассматривались на примере Sm^{3+}, присоединяются преимущественно к двум соседним фосфатным группам, когда последние располагаются достаточно близко друг к другу [85, 1077].

Связывание спермина. Присутствие поликатиона спермина (схема 15.1) необходимо для получения больших и высокоупорядоченных кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного анализа. Поэтому можно было ожидать, что спермин, связанный с дрожжевой $тРНК^{Phe}$, будет обнаружен в кристаллической решетке. Действительно, удалось выявить несколько мест связывания этого поликатиона с тРНК. Место самого сильного связывания локализовано в главном желобке, в области контакта антикодонового стебля и D-стебля; заряженные аминогруппы спермина располагаются вблизи фосфатов A_{44}, G_{43} и G_{42} одного участка цепи и фосфатов A_{23} и G_{24} комплементарного участка цепи (рис. 15.2). Молекула спермина не просто заполняет желобок, она заметно влияет на его геометрию. Это очевидно из сравнения расстояний между противоположными фосфатами в желобке – в данном случае оно равно 8,6 Å, а для спирали «акцепторный стебель/Т-стебель», где нет спермина, стягивающего края желобка, оно составляет 12 Å. Кроме того, спермин стабилизирует излом в 26° между антикодоновым стеблем и D-стеблем [1079].

Другая молекула спермина, которая несколько хуже просматривается на карте электронной плотности, связывается с верхней частью D-стебля, в районе резкого изгиба, образованного остатками 8–12. Вдоль всего этого участка тянется цепочка отрицательных зарядов, однако при этом фосфат 10 всего на 7 Å удален от фосфата 47. Спермин, необходимый для нейтрализации этого заряда, располагается возле фосфатов 9, 10 и 11 одного участка цепи и фосфатов 45, 46 и 47 другого [1079]. Обе молекулы спермина были обнаружены в орторомбических кристаллах дрожжевой $тРНК^{Phe}$. Для моноклинных кристаллов упоминалось о дополнительных местах связывания спермина, расположенных в акцепторном стебле [85].

В разд. 18.3 описано взаимодействие тРНК с еще более длинным поликатионом – природным протамином AI.

15.7. СТРУКТУРА АНТИКОДОНА ТАКОВА, ЧТО ОН МОЖЕТ БЫСТРО УЗНАВАТЬ КОДОН, ОБРАЗУЯ С НИМ ДВОЙНУЮ МИНИ-СПИРАЛЬ

В процессе биосинтеза белка связанная с рибосомой аминоацил-тРНК должна узнавать «свой» комплементарный кодон на информационной РНК путем образования уотсон-криковских и «качающихся» пар. Можем ли мы, не зная детально, как устроена рибосома, предложить стереохимическую модель этого взаимодействия?

Одноцепочечная спиральнаи структура антикодонового триплета. В гипотезе, выдвинутой задолго до того, как была установлена пространственная структура тРНК, предполагалось, что три основания антикодона укладываются в стопку, образуя одноцепочечную спираль на антикодоновом стебле, а инвариантный уридин U_{34} и полуинвариантный (пиримидин)$_{33}$ отходят в сторону и стэкинг-взаимодействие между ними практически отсутствует [579] (рис. 15.11). Структура, которая действительно образуется в области антикодоновой петли в дрожжевых тРНК^{Phe} [85, 86, 1032], тРНК^{Asp} [1042] и тРНК^{fMet} [1049], а также в тРНК^{fMet}, выделенной из *E. coli* [1050], оказывается очень близка к этой модели. По существу, верен основной элемент модели – структура антикодона. Такая особая форма антикодоновой петли, как оказалось, наиболее предпочтительна – она сохраняется даже при разных условиях кристаллизации. Дополнительное подтверждение тому дают работы по изучению связывания различных тРНК с комплементарными нуклеотидными триплетами; эти работы показывают, что антикодон имеет довольно жесткую структуру, способствующую взаимодействию кодон – антикодон [1081, 1082].

Мини-спираль, образуемая кодоновым и антикодоновым триплетами. Развитие этой гипотезы привело к предположению, что кодон информационной РНК образует с антикодоном уотсон-криковские и «качающуюся» пары и таким образом на антикодоновом стебле появляется двойная мини-спираль (рис. 15.11). Поскольку «качающаяся» пара располагается на дальнем конце спирали, антикодон может найти оптимальное положение для спаривания. Другими словами, чтобы образовалась «качающаяся» пара, кодону не нужно принимать какие-то необычные конформации, что и было показано ранее с помощью теоретических расчетов [1083]. Это согласуется с предположением о том, что на рибосоме все кодоны должны находиться в одной и той же структурной конфигурации, чтобы были обеспечены их геометрическая эквивалентность и быстрое считывание. Кроме того, гипермодифицированное полуинвариантное основание в положении 37 («алкилированный» пурин на рис. 15.11) правильным образом локализует кодон и предотвращает неверное считывание со сдвигом рамки.

По современным представлениям, обнаруженный в дрожжевой тРНК^{Phe} излом в 26° между антикодоновым стеблем и D-стеблем не является постоянным, а зависит от типа рассматриваемой тРНК. По-видимому, место контакта «антикодон/D» играет роль шарнира, обеспе-

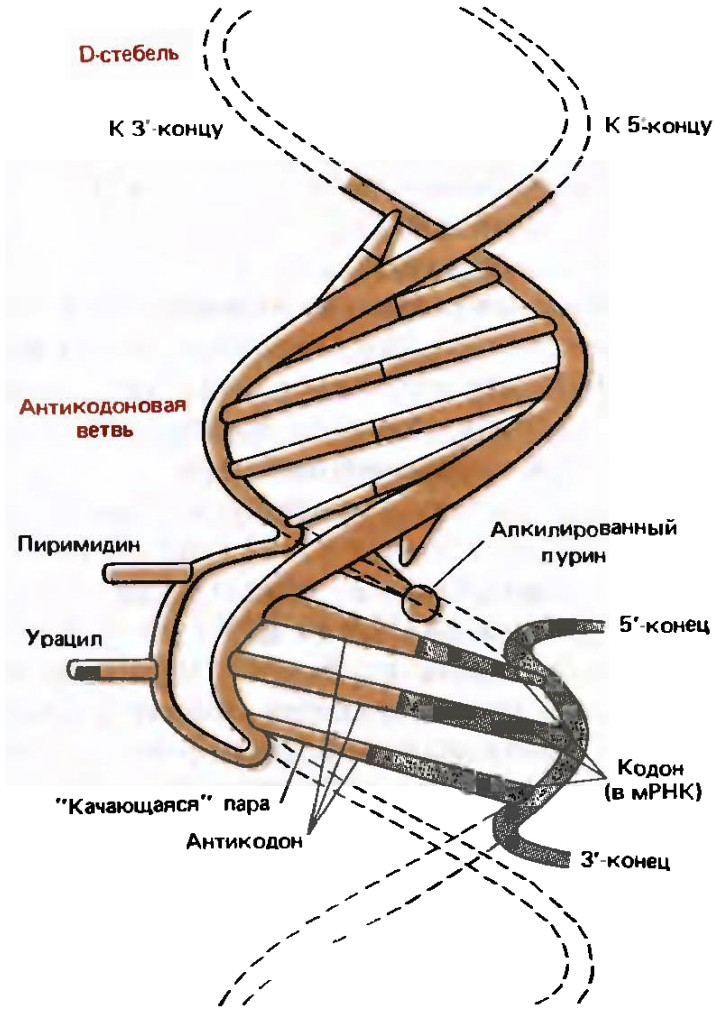


Рис. 15.11. Предполагаемая структура антикодона во время взаимодействия с мРНК [579]. В цвете изображен антикодоновый участок тРНК, фрагмент мРНК выделен серым цветом. Обратите внимание на хорошее согласие между этой гипотетической структурой антикодона и структурой, обнаруженной в кристаллах тРНК (рис. 15.2, 15.3).

чивающего функциональную гибкость и соответствующую настройку антикодона в процессе биосинтеза белка [1049].

15.8. «ОПЛАВЛЕННАЯ АРХИТЕКТУРА» ДРОЖЖЕВОЙ тРНК^{Gly}

Пространственные структуры дрожжевых тРНК^{Gly} и тРНК^{Phe} соотносятся между собой так же, как архитектура известного собора Гауди в Барселоне с архитектурой других европейских соборов,–их общая форма одинакова, но детали архитектуры сильно различаются.

Кристаллы дрожжевой тРНК^{Gly} были получены в необычных условиях: при температуре $T = 32°C$ и в 50%-ном диоксане; среднее время кристаллизации составляло ~ 6 мес. Совершенно очевидно, что ионы

Mg^{2+} и полиамины поддерживали общую пространственную структуру этой тРНК, но не могли предотвратить разрушения вторичной структуры, которое, судя по результатам спектроскопических исследований, должно происходить при высокой концентрации спирта и диоксана [1084].

Кристаллическая структура $тРНК^{Gly}$ определена не с таким высоким разрешением, как структура других тРНК, и мы можем описать ее только в общих чертах (рис. 15.12) [1051]. У этой тРНК сохраняются привычная Г-образная форма и пространственный ход цепи, характерные для всех других тРНК. Остатки 18 и 19 в D-петле сближены с инвариантными основаниями Ψ_{55} и C_{56} в Т-петле и образуют наружную часть угла буквы Г. Антикодоновая область такая же, как в других тРНК. Однако акцепторный стебель имеет совершенно иную структуру – 3′- и 5′-концы не образуют единой спирали. Они раскрутились и разошлись в разные стороны и в этих новых положениях образовали двухцепочечные спирали с соседней молекулой в кристаллической ячейке (рис. 15.12). Есть ли в образовании такого димера какой-либо биологический смысл – пока неясно [1051, 1085].

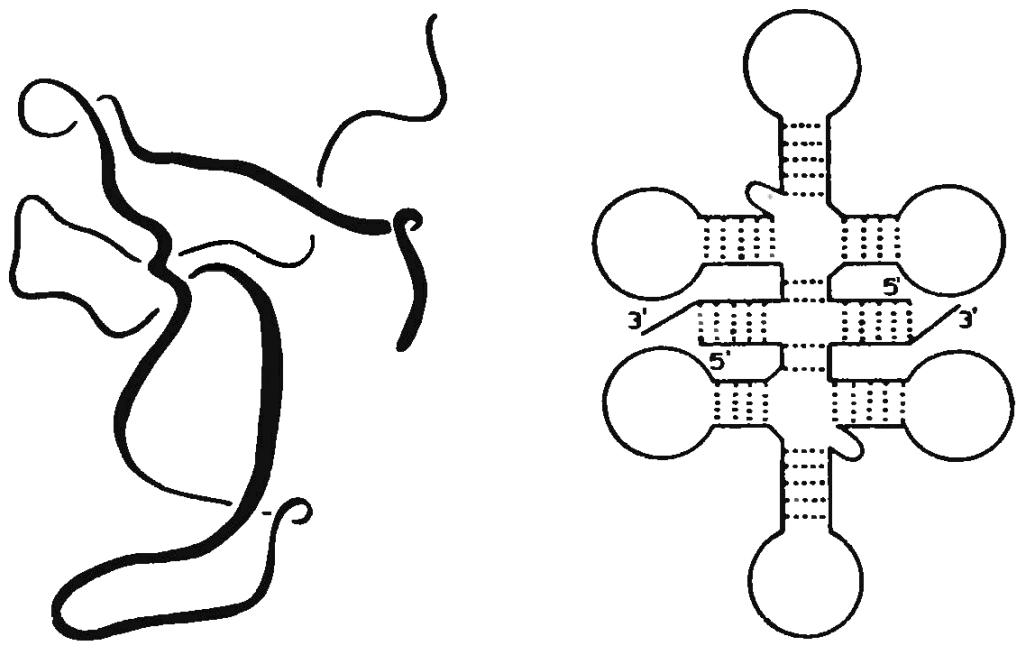


Рис. 15.12. «Оплавленная архитектура» дрожжевой $тРНК^{Gly}$ (*слева*); конформационный остов показан в той же ориентации, что и для молекулы тРНК на рис. 15.2 и 15.3 [1051]. Обратите внимание на общее соответствие формы и пространственных контактов в этих молекулах, которое имеет место, несмотря на большие различия во вторичной структуре. В кристалле две соседние молекулы, связанные осью симметрии, образуют димер (*справа*) с водородными связями между акцепторными стеблями.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Рентгеноструктурный анализ кристаллов тРНК позволил установить такие детали стереохимии полинуклеотидов, которые невозможно определить в случае других систем. Последовательность тРНК насчитывает от 75 до 90 нуклеотидов, включает $\sim 10\%$ минорных компонентов и может образовывать вторичную структуру, известную под названием «клеверный лист»; эта структура состоит из четырех двухцепочечных спиральных стеблей и трех петель. В последовательности имеются инвариантные основания, т.е. основания, присутствующие во всех тРНК. Они участвуют главным образом в «третичных» взаимодействиях, которые возникают тогда, когда молекула тРНК сворачивается в нативную Г-образную структуру. Одну часть буквы Г образуют уложенные друг за другом антикодоновый и дигидроуридиновый стебли, а другую – тимидиловый и акцепторный стебли. Третичные взаимодействия включают стэкинг, интеркаляцию и необычное спаривание оснований, при котором образуются не только пары, но и триплеты. В двухцепочечных спиральных стеблях нуклеотиды имеют ту же конформацию, что и в А-РНК, однако в области петель часто встречается сахар в конформации C_2-*эндо*; иногда торсионный угол γ лежит в области *ап* или *– ск*, что указывает на растяжение цепи. Взаимодействие фосфат–основание стабилизирует резкие повороты в тимидиловой и антикодоновой петлях, названные π_3-поворотами, при которых цепь меняет свое направление на противоположное. Спермин связывается с тРНК в желобках стеблей за счет электростатического взаимодействия с фосфатными группами. Двухвалентные катионы Mg^{2+} связываются в виде комплекса $[Mg(H_2O)_6]^{2+}$ в окружении атомов фосфатных групп, сахаров и оснований. Антикодон имеет жесткую архитектуру, которая позволяет ему быстро «читать» информационную РНК путем образования мини-спирали. Третичная структура $тРНК^{Gly}$, закристаллизованной из 50%-ного раствора диоксана, несколько отличается от структуры $тРНК^{Phe}$, однако основная ее особенность – Г-форма – сохраняется.

ГЛАВА 16

Интеркаляция

ДНК – носитель генетической информации – взаимодействует со многими лекарственными препаратами, канцерогенными и мутагенными веществами, а также с красителями, характерной особенностью которых является наличие вытянутых (гетеро) циклических ароматических хромофоров. Поскольку ДНК играет ключевую роль в процессах репликации и биосинтеза белка, ее модификация при взаимодействии с этими соединениями оказывает сильное влияние на клеточный метаболизм, замедляя, а в некоторых случаях прекращая рост клеток [1086–1090]. Все эти свойства упомянутых выше соединений вызвали к ним большой интерес, особенно возросший за последние три десятилетия. Обнаружилась возможность их применения в медицине; широкое использование они нашли также и в лабораториях при изучении структуры и функции ДНК.

Одну из категорий таких соединений образуют вещества, приводящие к химической модификации ДНК (причем мишенью является в первую очередь гуанин), другую – те, которые связываются с двойной спиралью. Связывание происходит либо по периферии молекулы, либо, как в случае представленных на рис. 16.1 лекарственных препаратов, путем интеркаляции между соседними парами оснований без нарушения уотсон-криковского спаривания. Поскольку стереохимия интеркаляции достаточно ясна и весьма интересна со структурной точки зрения, мы в данной главе рассмотрим ее более подробно [1089, 1090].

16.1. ОСНОВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИНТЕРКАЛЯЦИИ В ДВОЙНЫЕ СПИРАЛИ ДНК И РНК

При интеркаляции физические свойства двойных спиралей изменяются. Впервые предположение о возможном встраивании плоских ароматических молекул между соседними парами оснований было высказано на основании результатов гидродинамических и рентгеноструктурных исследований ДНК в присутствии акридиновых красителей [1092]. Если в раствор ДНК добавить акридиновый краситель, а затем приготовить волокно и поместить его в рентгеновский пучок, то получится рентгенограмма, на которой рефлексы, обусловленные наличием регулярной

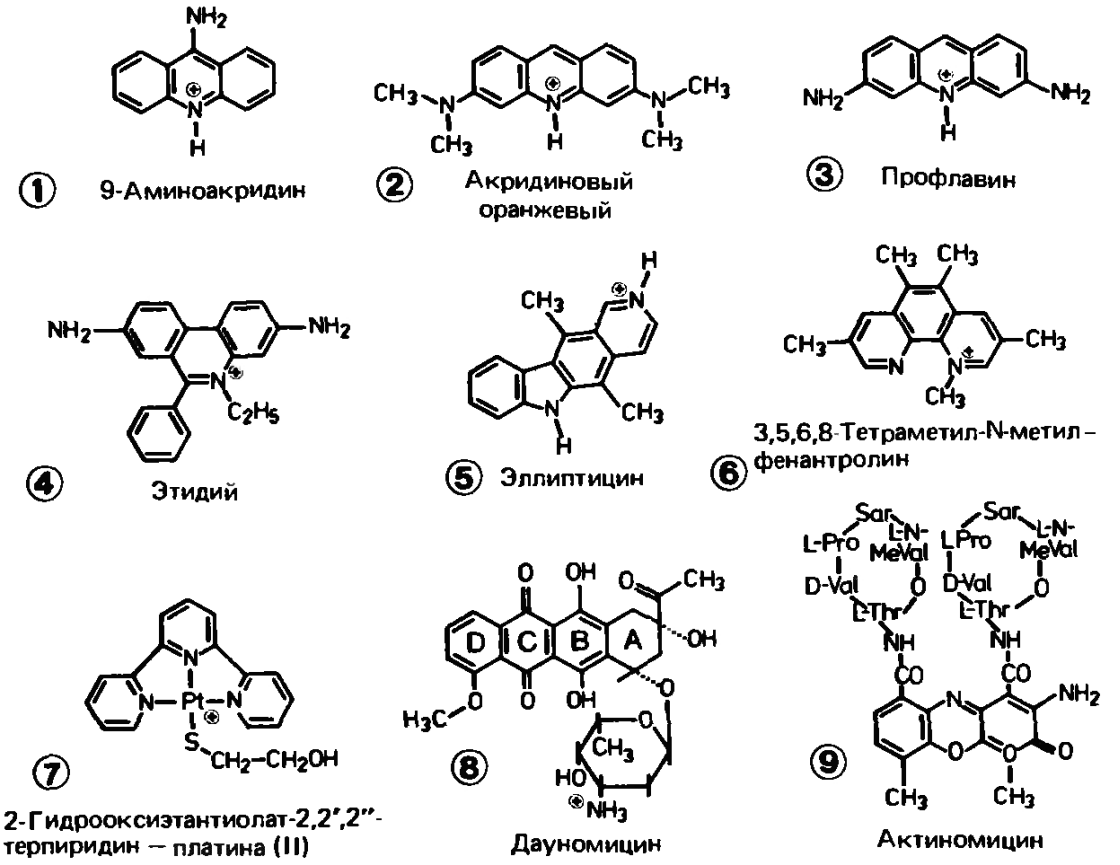


Рис. 16.1. Структурные формулы некоторых интеркалирующих лекарственных препаратов и красителей, образующих с олигонуклеотидами кристаллические комплексы, структура которых определена методом рентгеноструктурного анализа.

спиральной структуры, расплываются или пропадают. Остаются только экваториальные рефлексы, указывающие на регулярную упаковку молекул вдоль волокна, и сильный меридиональный рефлекс (3,4 Å), отвечающий межплоскостному расстоянию между парами [1092–1094]. Вообще говоря, при встраивании ароматических молекул «толщиной» 3,4 Å общая схема стэкинга может и не нарушаться. Однако, чтобы интеркаляция произошла, пары должны раздвинуться, а это приведет к изменению геометрии сахарофосфатного остова и разрушению регулярной спиральной структуры (рис. 16.2). В соответствии с этим представлением молекула ДНК по мере добавления в систему красителя должна удлиняться. Именно об этом свидетельствуют наблюдаемые увеличение вязкости и уменьшение коэффициента седиментации; оба эффекта предполагают также увеличение жесткости двойной спирали ДНК [1092].

Двухстадийный процесс связывания. Поскольку для интеркалирующих агентов характерно наличие хромофорных групп, их взаимодействие с ДНК и РНК можно изучать с помощью спектроскопических методов [1095], которые позволяют определить как термодинамические,

так и кинетические параметры связывания [1096, 1097]. Судя по нелинейным графикам Скэтчарда и кинетическим параметрам, связывание представляет собой двухстадийный антикооперативный процесс. Из кинетических данных следует, что самой интеркаляции с характерными временами порядка миллисекунд предшествует лимитируемое диффузией быстрое связывание по периферии двойной спирали. Константы связывания для этих двух процессов тоже различаются: для интеркаляции она больше, чем для наружного присоединения [1095–1097].

Принцип исключения ближайших мест связывания. Характер удлинения молекулы ДНК фага Т2 при связывании профлавина говорит о том, что из всех потенциальных мест интеркаляции занято только 44% [1098]. Это означает, что каждое второе место (ближайший сосед вдоль оси двойной спирали ДНК) остается свободным, по-видимому, из-за нарушения геометрии нуклеотидов, примыкающих к интеркаляторам. Принцип исключения ближайших соседей подтверждается результатами рентгеноструктурного анализа волокон ДНК в комплексе с платиносодержащим интеркалирующим агентом, показанным на рис. 16.1 [1099, 1100]. Вместе с тем при изучении бифункциональных интеркаляторов были получены данные, заставляющие усомниться в справедливости этого принципа [1101]; с другой стороны, такие молекулы могут обладать структурными особенностями, которые у монофункциональных аналогов отсутствуют [1102].

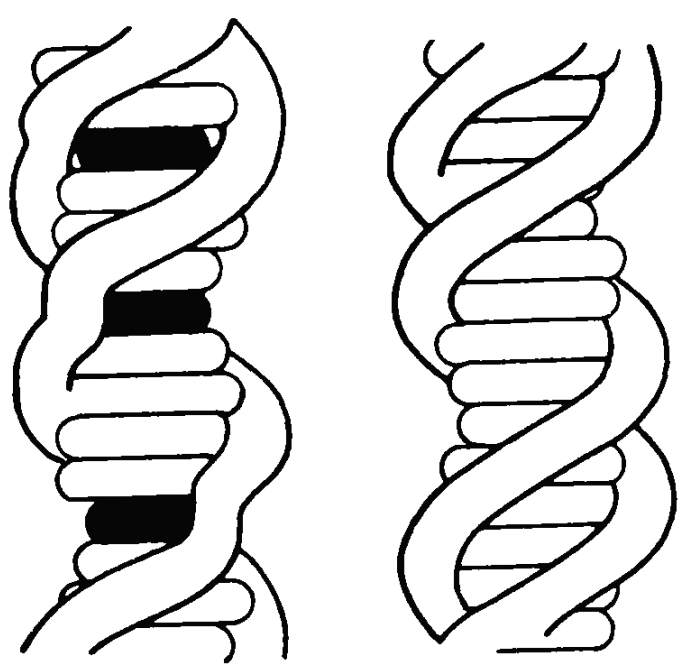


Рис. 16.2. Интеркаляция плоских молекул лекарственных препаратов (черные пластины) в двойную спираль ДНК [1089]. Обратите внимание, что регулярный ход сахарофосфатного остова (*справа*) в местах интеркаляции нарушается (*слева*).

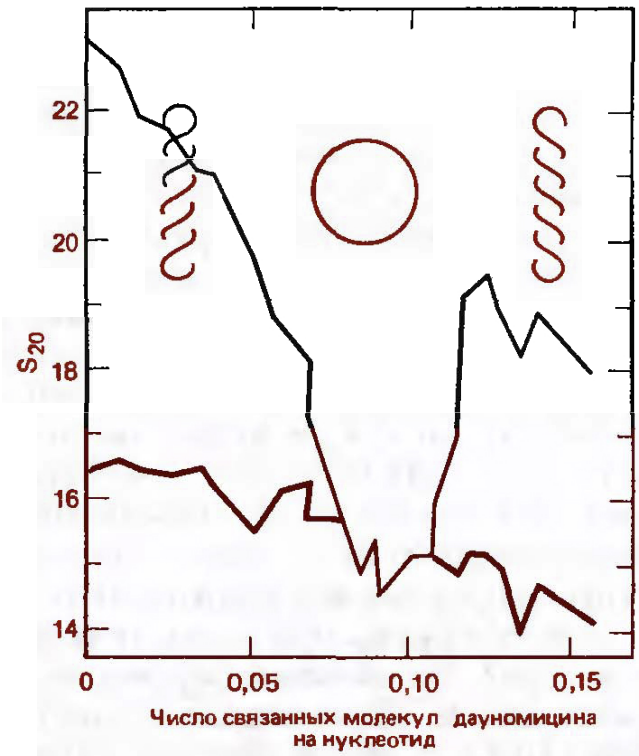


Рис. 16.3. Влияние связывания дауномицина на коэффициент седиментации репликативной формы кольцевой ДНК ϕX174 [1103]. *Красная кривая* – ДНК с разрывом (некольцевая форма). *Черная кривая* – кольцевая ДНК с правыми сверхвитками (*слева*), без сверхвитков (*в центре*) и с левыми сверхвитками (*справа*).

Интеркаляция приводит к раскручиванию молекулы ДНК. Чтобы освободить место для интеркалятора, пары оснований должны раздвинуться. Это осуществляется за счет одновременного растяжения двойной спирали В-ДНК вдоль оси и ее раскручивания, которое нужно для того, чтобы сахарофосфатный остов при растяжении не разорвался [1093]. О том, что раскручивание действительно происходит, свидетельствуют результаты экспериментов по интеркаляции ряда соединений в плазмидную ДНК – кольцевую замкнутую двойную спираль (гл. 19), которая образует правую сверхспираль. При интеркаляции наблюдается раскручивание двойной спирали (10–20° на каждую интеркалированную молекулу), при котором число правых сверхвитков уменьшается до тех пор, пока не будет достигнуто равновесие, т. е. пока ДНК не станет простым кольцом без сверхвитков. При дальнейшей интеркаляции двойная спираль продолжает раскручиваться, и в результате образуется левая сверхспираль. За процессом легко наблюдать по изменению коэффициента седиментации [1103] (рис. 16.3).

Кристаллографические исследования дают наглядную картину интеркаляции. Результаты всех описанных выше экспериментов лишь позволяют предположить, что плоские ароматические молекулы могут интеркалировать между парами оснований ДНК и РНК. Прямое доказательство того, что такие комплексы действительно образуются, дают

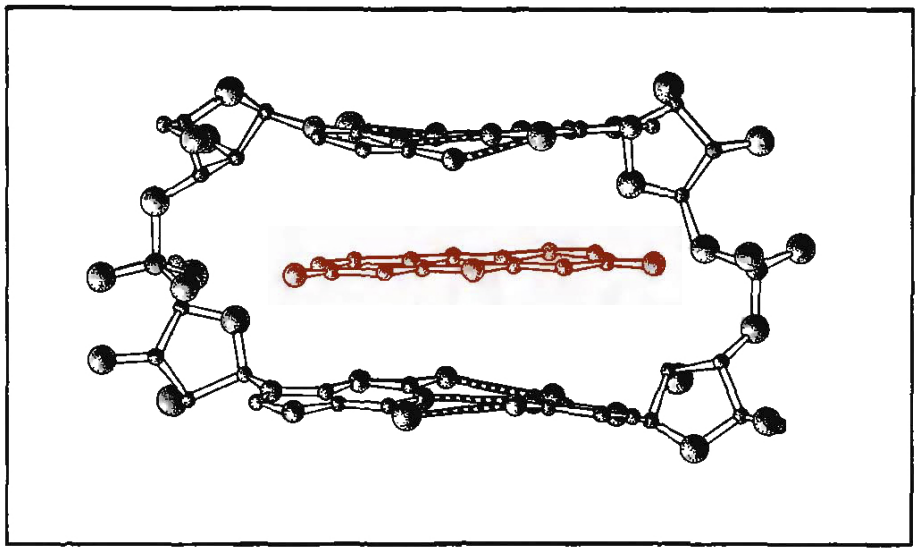
кристаллографические исследования, которые позволяют оценить различные стерические факторы, играющие роль в этом процессе. Результаты соответствующих исследований опубликованы в нескольких обзорных статьях [1089, 1090, 1104–1107, 1112].

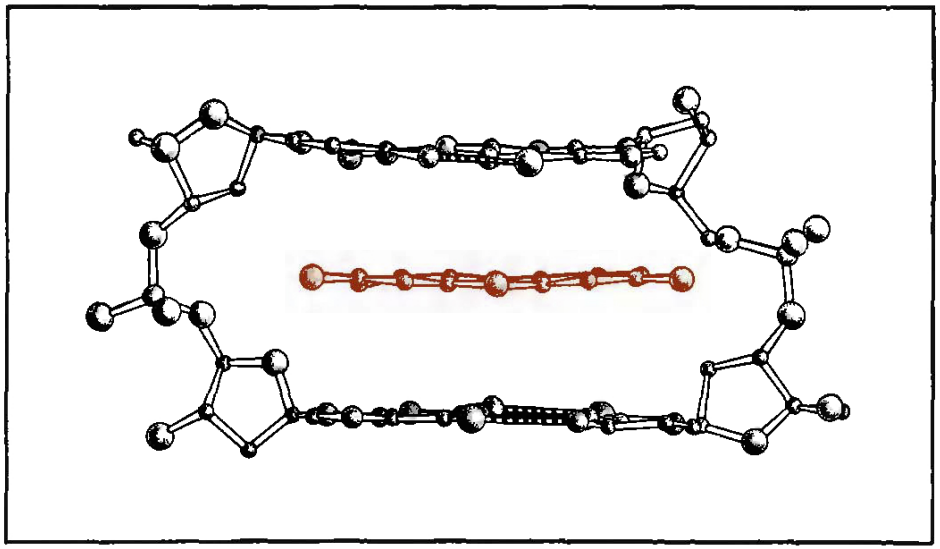
16.2. СТЕРЕОХИМИЯ ИНТЕРКАЛЯЦИИ В ДНК- И РНК-ДИНУКЛЕОЗИДФОСФАТЫ

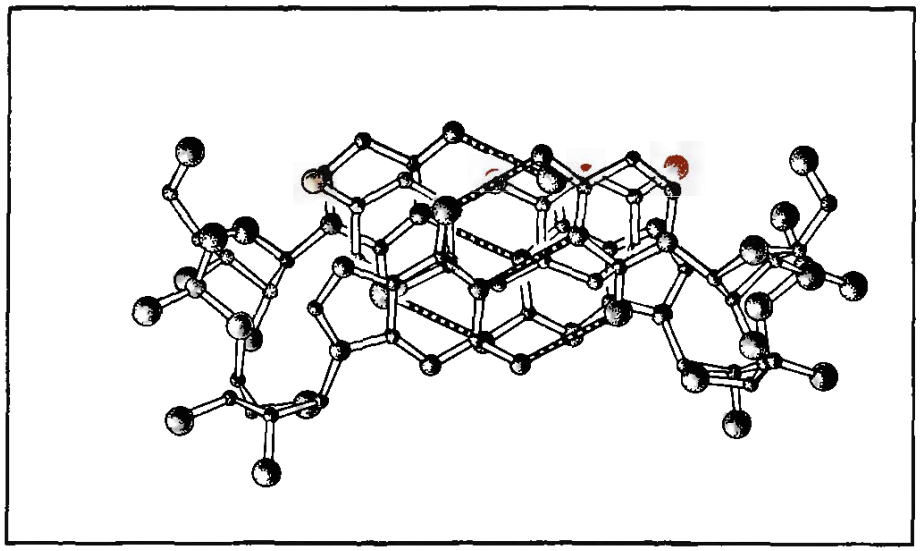
Информацию о геометрии комплексов между двойными спиралями ДНК и РНК и интеркалирующими соединениями можно получить, изучая любые комплексы, в которых молекула того или иного лекарственного препарата встраивается между двумя уотсон-криковскими парами. Здесь мы остановимся именно на таких комплексах; системы, в которых интеркаляция отсутствует, или системы с не-уотсон-криковскими парами мы рассматривать не будем [1108–1110]. Во всех случаях, о которых пойдет речь ниже [за исключением комплекса дауномицина с гексадезоксинуклеотидом (разд. 16.3)], мы будем иметь дело не с ДНК и РНК, а с динуклеозидмонофосфатами. Следовательно, чтобы можно было делать правильные обобщения, нам придется учитывать концевые эффекты. Наконец, большинство комплексов с интеркаляторами включают РНК-динуклеозидмонофосфаты, и справедливость экстраполяции этих результатов на случай ДНК, вообще говоря, сомнительна, особенно если вспомнить, что двойные спирали ДНК гораздо более конформационно подвижны, чем РНК, которые всегда принадлежат А-семейству.

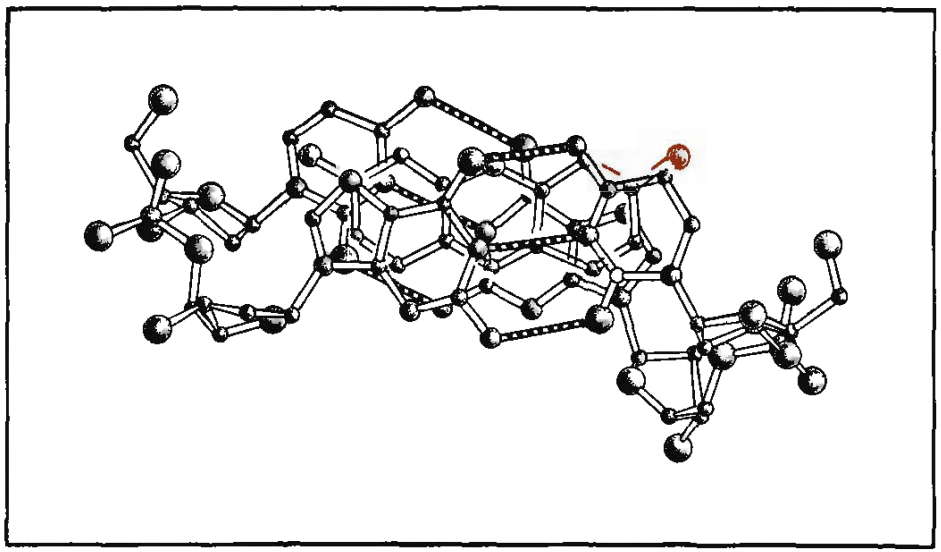
Специфическая последовательность пиримидин-3′,5′-пурин [1111]. Во всех известных кристаллических комплексах интеркаляторы располагаются между двумя уотсон-криковскими парами, образованными (и в случае рибо-, и в случае дезоксириборяда) самокомплементарными динуклеозидмонофосфатами, у которых нуклеозид на 5′-конце всегда является пиримидином, а на 3′-конце – пурином (рис. 16.4; табл. 16.1). Если поменять основания местами, то либо не образуются кристаллы, либо комплекс будет иметь неспиральную структуру [1110]. Даже в случае некомплементарного комплекса ЦпА·Профлавин, который образуется при интеркаляции профлавина между парами А—А и С—С параллельной двойной спирали, последовательность тем не менее остается такой же – пиримидин – 3′,5′ – пурин [1109].

Эта специфическая зависимость интеркаляции от последовательности обнаружена также и для водных растворов (по результатам ЯМР-спектроскопии [1112, 1113]). Она получила и теоретическое обоснование [1114–1118, 1118а]. Показано, что как для ДНК, так и для РНК при интеркаляции в последовательность пиримидин – 3′,5′ – пурин происходит гораздо более сильное перекрывание оснований с интеркалятором, чем при интеркаляции в последовательность пурин – 3′,5′ – пиримидин. Поэтому в первом случае интеркаляция оказывается на 7–13 ккал·моль$^{-1}$ выгоднее, чем во втором [1119]. Это межмолекулярное взаимодействие









стабилизируется *внутри*молекулярными электростатическими силами, также обеспечивающими предпочтительную интеркаляцию в последовательность пиримидин–3′,5′–пурин [1115]. Кроме того, в случае перевернутой последовательности могут возникать стерически невыгодные контакты, затрудняющие интеркаляцию [1115, 1117].

Характерное распределение конформаций сахаров при интеркаляции. У *всех* одиннадцати комплексов, приведенных в табл. 16.1, сахар, присоединенный к пиримидину и расположенный на 5′-конце, имеет конформацию $C_{3'}$-*эндо*. Сахар, находящийся на 3′-конце и присоединенный к пурину, в большинстве случаев находится в конформации $C_{2'}$-*эндо*, но иногда и в $C_{3'}$-*эндо*. Эти исключения показывают, что предположение о наличии общей схемы смешанных конформаций $C_{3'}$-*эндо*-3′,5′-$C_{2'}$-*эндо* [1101] несостоятельно и необязательно конформация сахара представляет собой именно тот параметр, который отвечает за «раздвигание» пар при интеркаляции. Тот факт, что при интеркаляции наблюдаются характерные изменения торсионных углов χ и β, также подтверждает этот вывод [1120].

Данные табл. 16.2 позволяют провести сравнение средних значений торсионных углов в ДНК, РНК и мини-спиралях динуклеозидмонофосфатов с величинами этих углов в комплексах с интеркаляторами. Видно, что в обоих случаях углы более или менее одинаковы, за исключением углов β и χ на 3′-конце. Углы χ и β при интеркаляции увеличиваются более чем на 50°, при этом угол χ сдвигается в *высокую-анти(– ск)*-область [1107, 1120]. Построение модели с помощью компьютеров подтверждает, что если в уотсон-криковскую мини-спираль внести такие изменения, то пары действительно разойдутся на расстояние, необходимое для интеркаляции (т.е. раздвинутся еще на 3,4 Å) (рис. 16.5).

Раскручивание и повороты пар. Интеркаляция в случае кольцевых замкнутых сверхспиральных ДНК сопровождается раскручиванием ДНК. Мерой раскручивания может служить изменение угла между направлениями $C_{1'}\cdots C_{1'}$, спроецированными на некую среднюю плоскость. В случае комплексов динуклеозидмонофосфатов с интеркаляторами никаких закономерностей в углах раскручивания не наблюдается, вероятно, из-за того, что картина смазывается концевыми эффектами. Это подтверждают данные, полученные для комплекса дауномицина с гексадезоксинуклеотидом (разд. 16.3). Модельные построения позволяют предположить, что угол раскручивания зависит *не только* от конформации сахара, он определяется комбинацией небольших изменений

Рис. 16.4. Кристаллическая структура комплексов профлавина с d(CpG) (*вверху*) и с CpG (*внизу*) (по результатам рентгеноструктурного анализа). Показаны вид сбоку и сверху. Сходная структура характерна для большинства комплексов динуклеозидфосфатов с лекарственными препаратами, приведенными в табл. 16.1. Молекулы антибиотика изображены в цвете, атомы водорода не указаны. Описание деталей изображения см. в подписи к рис. 10.1; соответствующие ссылки приведены в табл. 16.1.

Таблица 16.1. Конформационные углы и углы раскручивания для комплексов интеркаляторов с динуклеозидфосфатами и для L-ДНК

Комплекс	α P-O_5'	β O_5'-C_5'	γ C_5'-C_4'	δ[1] C_4'-C_3'	ε C_3'-O_3'	ζ O_3'-P	χ(5')[2] C_1'-N	χ(3')[2] C_1'-N	Конформация сахара: 5'-конец	Конформация сахара: 3'-конец	Углы раскручивания, град	Ссылка
А. Ряд дезоксирибонуклеозидов												
Профлавин · dCpG	290	219	46		210	290	−164	−100	^3E	^3E	17	[1107]
	287	218	73		203	300	−170	−67	^3E	^2E		
Терпиридин – Pt · dCpG[3]	282	226	57		201	287	−148	−66	^3E	^2E	23	[1107, 1141]
	308	217	84		194	292	−146	−63	^3E	^2E		
ДНК · [(bipy) Pt(en)]$^{2+}$,	82	198	180	76; 147	276	98	26	167	^3E	^2E	36	[1100]
или L-ДНК	300	227	221	76; 147	171	125	26	167	^3E	^2E		
Б. Для рибонуклеозидов												
Профлавин · CpG	287	234	53	75; 79	204	292	−162	−93	^3E	^3E	0[4]	[1120]
Акридиновый оранжевый ·	288	237	50		211	301	−171	−75	^3E	^2E	23	[1142]
· CpG	297	226	40		225	298	−172	−65	^3E	^2E		
Этидий · 5-иод-CpG	286	210	72	87; 131	226	281	−151	−79	^3E	^2E	26	[1143]
	291	224	55	84; 134	225	291	−156	−71	^3E	^2E		
Этидий · 5-иод-UpA	291	236	52	98; 133	207	286	−154	−81	^3E	^2E	26	[1119]
	276	230	70	95; 118	218	302	−166	−80	^3E	^2E		
9-аминоакридин · 5-иод-CpG	280	220	67	72; 110	236	311	−163	−61	^3E	^3E	26	[1144]
	300	229	38	85; 130	216	296	−142	−81	^3E	^2E		
	295	208	58	99; 106	216	310	−163	−97	^3E	^3E	23	[1144]
	294	222	45	105; 156	209	287	−160	−78	^3E	^2E		
Профлавин · 5-иод-CpG	305	273	3	102; 122	224	294	−176	−77	^3E	^3E	−3[5]	[1132]
	323	206	53	79; 119	273	273	−161	−95	^3E	^3E		
Акридиновый оранжевый ·	291	235	58	84; 145	217	294	−161	−85	^3E	^2E	23	[1132]
· 5-иод-CpG	299	228	60	81; 139	226	284	−165	−90	^3E	^2E		

Эллиптицин·5-иод-CpG	281	214	65	91; 145	199	285	−155	−100	^3E	^2E	}	22	[1145]
	315	194	47	104; 141	234	258	−166	−106	^3E	^2E	}		
ТМР·5-иод-CpG[6]	283	219	71	93; 141	203	278	−158	−94	^3E	^2E	}	22	[1145]
	303	206	55	95; 143	212	285	−167	−111	^3E	^2E	}		

Примечание. Структурные формулы интеркаляторов приведены на рис. 16.1; L-ДНК – это комплекс ДНК·$[(bipy)Pt(en)]^{2+}$.

[1] Первая из приведенных величин относится к пиримидину, вторая – к пурину.

[2] Если угол определять последовательностью $O_{4'}—C_{1'}—N—C_6/C_8$, как в ранних работах, то для того, чтобы получить приведенные здесь значения, нужно вычесть 180°.

[3] Терпиридинплатина – это 2-гидроксиэтантиолат-2,2',2''-терпиридин—платина (II).

[4] Пары не раскручиваются, а сдвигаются в горизонтальном направлении на 1,8 Å.

[5] Вместо раскручивания происходит закручивание. Кроме того, пары сдвигаются в горизонтальном направлении на ~ 1,3 Å.

[6] 3,5,6,8-тетраметил-N-метилфенантролин.

Таблица 16.2. Сравнение средних конформационных углов для комплексов динуклеозидмонофосфатов с интеркаляторами и для динуклеозидфосфатов A-РНК, A-ДНК и B-ДНК без интеркаляторов [1107]

	α	β	γ	δ	ε	ζ	χ(5')[1]	χ(3')[1]	Конформация сахара	
									5'-конец	3'-конец
Усредненные значения углов для комплексов с интеркаляторами	290(8)	225(9)	59(14)		211(11)	293(7)	−162(10)	−76(12)	$C_{3'}$-*эндо*	$C_{3'}$-*эндо*
Динуклеозидмонофосфаты	290(6)	174(7)	57(7)		217(5)	289(4)				$C_{2'}$-*эндо*
A-РНК	300	175	49	83	213	281	−166	−166	$C_{3'}$-*эндо*	
A-ДНК	270	211	47	83	175	315	−153	−153	$C_{3'}$-*эндо*	
B-ДНК	321	209	31	157	159	261	−95	−95	$C_{2'}$-*эндо*	

Примечание. Данные для конкретных интеркаляционных комплексов см. в табл. 16.1. В круглых скобках приведено стандартное отклонение.

[1] Вначале эти углы определялись последовательностью $O_{4'}—C_{1'}—N—C_6/C_8$. Приведенные здесь значения получены путем вычитания 180°.

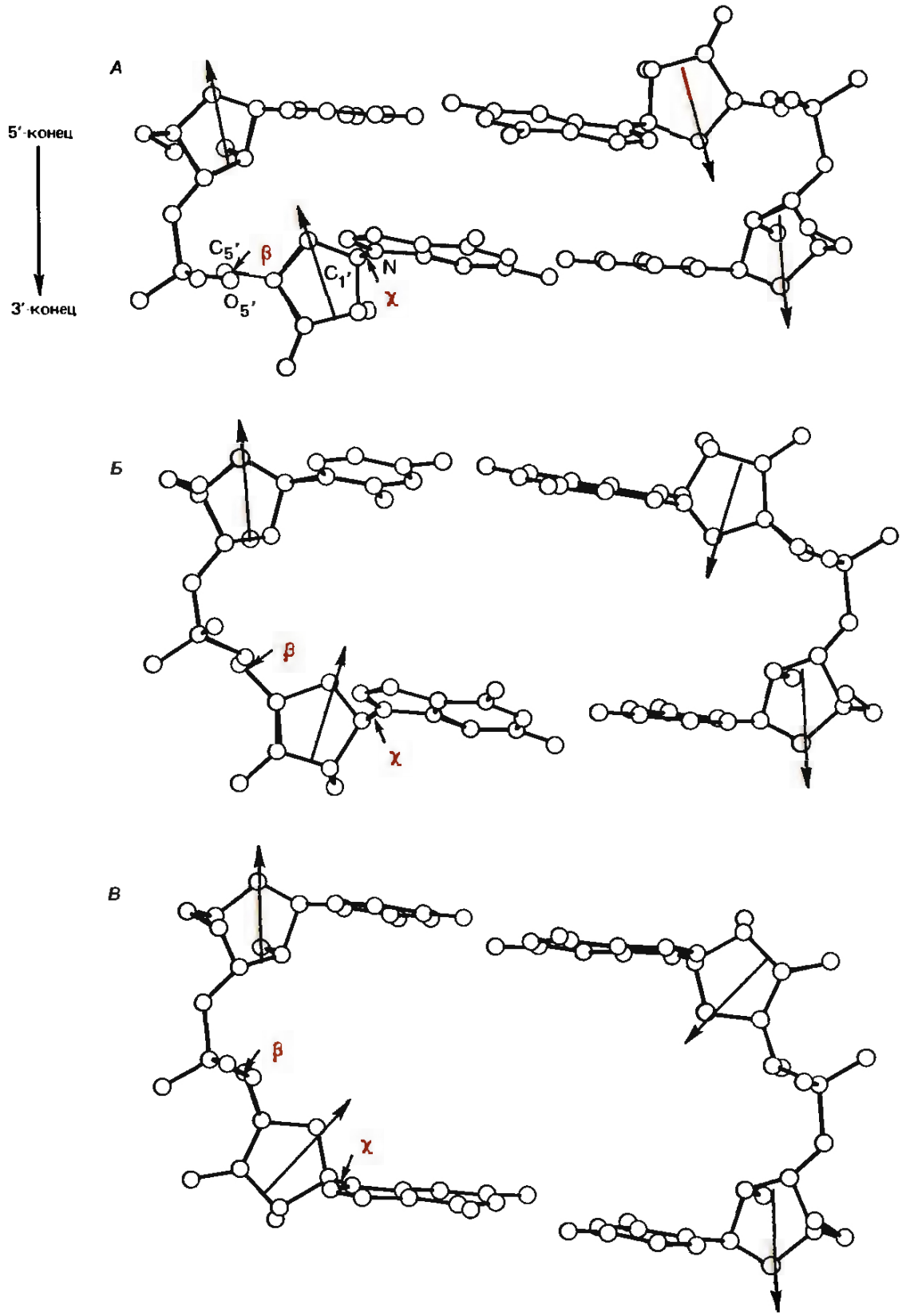


Рис. 16.5. Увеличение расстояния между парами в дуплексе CpG при изменении торсионных углов χ и β [1120]. *А.* Геометрия А-РНК: $\chi = -166°$, $\beta = 175°$. *Б.* Конформация при $\chi = -140°$ и $\beta = 200°$. *В.* Дуплекс с раздвинутыми парами: $\chi = -100°$, $\beta = 225°$. Красные стрелки, которые проходят через середину связи $C_{2'}$—$C_{3'}$ и атом $O_{4'}$, показывают ориентацию сахара. При спиральной конформации (*А*) они попарно параллельны, но в структуре (*В*) ориентированы по-разному. Это служит подтверждением принципа исключения ближайших мест связывания, основанного на предположении о нарушении укладки пар, примыкающих к месту интеркаляции.

в торсионных углах остова и геометрии пар, что в совокупности выглядит как изгиб и поворот [1120, 1121]. Существует также корреляция между углом раскручивания спирали и формой интеркалирующего агента [1122].

16.3. УЛУЧШЕНИЕ МОДЕЛИ ИНТЕРКАЛЯЦИИ. КОМПЛЕКС ДАУНОМИЦИНА С ОЛИГОНУКЛЕОТИДОМ d(CpGpTpApCpG)

Чтобы избавиться от концевых эффектов, следует использовать более длинные фрагменты нуклеиновых кислот. Эти эффекты удалось в какой-то мере ослабить в случае комплекса дауномицина с d(CpGpTpApCpG). Хотя в дуплексе, образованном самокомплементарным гексануклеотидом, интеркаляция дауномицина (см. формулу на рис. 16.1) затрагивает как раз концевые участки CpG, соседние молекулы в кристалле уложены друг над другом так, что получается псевдонепрерывная спиральная структура и концевые эффекты оказываются пренебрежимо малы [1123].

Общая геометрия интеркаляции дауномицина отличается от геометрии интеркаляции других лекарственных препаратов. При образовании комплекса дауномицина с гексадезоксинуклеотидом (рис. 16.6) встраивающийся хромофор развернут к парам оснований не боковой кромкой, как обычно, а передним кольцом. Кольцо D выступает в главный желобок, а кольцо A с присоединенным к нему сахаром остается в минорном, т. е. структура выглядит именно так, как предполагалось на основании спектроскопических данных [1124–1126]. Комплекс стабилизирован не только стэкинг-взаимодействием, но и водородными связями с гидроксильной и карбонильной группами хромофора, отходящими от атома C_9, при этом наличие гидроксильной группы существенно для активности дауномицина [1127, 1128]. Сахарный остаток дауномицина почти полностью закрывает минорный желобок, и именно этим объясняется тот факт, что при интеркаляции связывается не более одной молекулы дауномицина на три пары оснований. Положительно заряженная аминогруппа дауномицина (в положении $C_{3'}$ сахара) не принимает участия в связывании с олигонуклеотидом, хотя на основании спектроскопических данных предполагалось, что такой контакт осуществляется [1125].

Нарушения «дальнего» порядка. Структура гексануклеотида в комплексе в целом подобна структуре B-ДНК, однако на самом деле лишь две центральные AT-пары располагаются точно так же, как в B-ДНК. Пара, примыкающая к интеркалятору, и пара, которая следует за ней, смещаются: первая сдвигается в сторону главного желобка на 0,4 Å, вторая раскручивается на 8°. Раскручивание (которое, таким образом, в месте самой интеркаляции равно 0°) обусловлено в первую очередь изменениями углов вращения ε и ζ вокруг связей $C_{3'}$—$O_{3'}$ и $O_{3'}$—P соответственно. Угол раскручивания, равный 8°, в целом согласуется

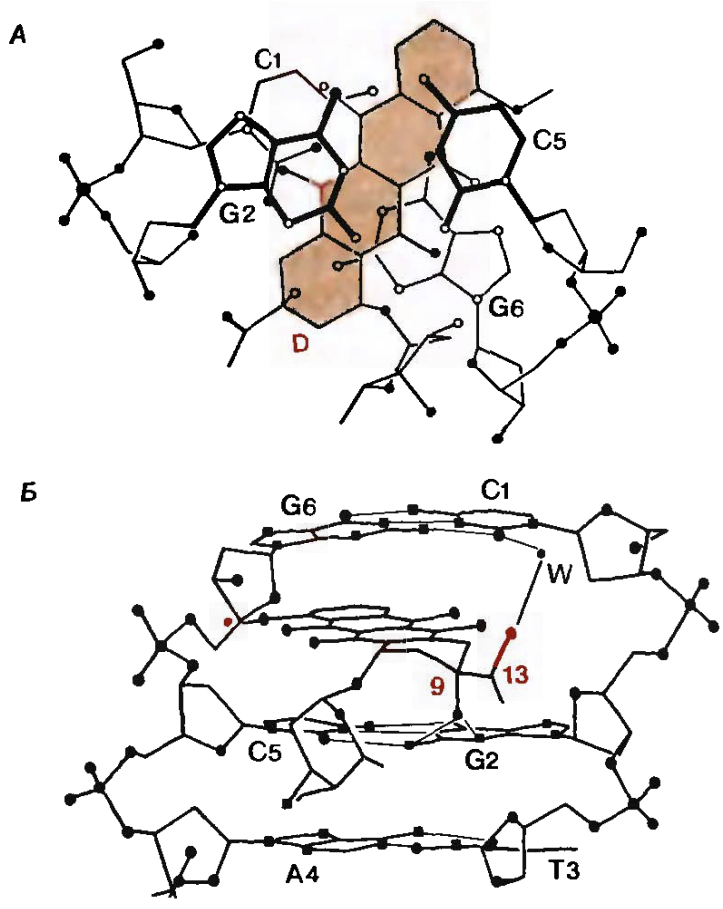


Рис. 16.6. Две проекции комплекса дауномицина с d(CpGpTpApCpG) [1123]. *А.* Пары лежат в плоскости рисунка. *Б.* Пары перпендикулярны плоскости рисунка. Дауномицин показан в цвете. На рис. *Б* изображена только половина структуры. Другая половина точно такая же и связана с первой осью симметрии 2-го порядка, расположенной ниже пары A_4-T_3. Обратите внимание на водородные связи между гидроксилом при атоме C_9 дауномицина и гуанином G_2, а также на водный мостик W между ацетилкетогруппой при C_{13} и атомом O_2 цитозина C_1. На рис. *А* жирными линиями показана ближайшая к наблюдателю пара G_2-C_5, а тонкими – пара C_1-G_6, расположенная дальше.

с оценкой 11°, полученной в экспериментах с кольцевой ДНК [1103, 1129].

Конформация остова не подчиняется каким-либо простым закономерностям. Конформация сахарных остатков гексануклеотида, вообще говоря, характерна для В-ДНК, т.е. $C_{2'}$-*эндо*. Индивидуальные же сахарные остатки (считая от дезоксирибозы 1 к дезоксирибозе 6) находятся в следующих конформациях: $C_{2'}$-*эндо*, $C_{1'}$-*экзо*, $O_{4'}$-*эндо*, $C_{2'}$-*эндо*, $C_{2'}$-*эндо*, $C_{3'}$-*экзо*. С ними связаны следующие значения углов χ: -153, -93, -131, -107, -82, $-85°$ (низкое значение χ для первого остатка, по-видимому, обусловлено концевыми эффектами).

Проявляется ли у дауиомицина специфичность к нуклеотидиой последовательиости? Схема образования водородных связей между молекулой дауномицина и CpG-элементами дуплекса (рис. 16.6) предполагает,

что дауномицин будет легко интеркалировать и в участки с другой последовательностью, если на месте атома N_3 гуанина будет находиться другой акцептор водородной связи (атом N_3 пурина или O_2 пиримидина). Другая существующая в этом комплексе связь – водный мостик между кетогруппой и атомом O_2 цитозина – может образоваться и при замене цитозина на другие основания. Отсутствие у дауномицина специфичности к нуклеотидной последовательности сочетается со специфичностью его к знаку спирали (спираль должна быть правой), которая возникает из-за несимметричного размещения заместителей в положениях C_7 и C_9 дауномицина. Таким образом, для интеркаляции дауномицина не обязательно наличие последовательности CpG; достаточно, чтобы двойная спираль была правой.

16.4. ЭКСТРАПОЛЯЦИЯ МОДЕЛЕЙ ИНТЕРКАЛЯЦИИ НА СЛУЧАЙ ДНК В А- И В-ФОРМАХ

Модели интеркаляции в случае полимерных молекул А- и В-ДНК были построены с помощью ЭВМ. Построение основывалось на известной стереохимии ДНК и стереохимии взаимодействия между интеркаляторами и парами оснований в динуклеозидмонофосфатах [1130, 1131].

А-ДНК и А-РНК: расхождение пар без раскручивания спирали. При интеркаляции в двойные спирали А-типа все сахарные остатки могут оставаться в $C_{3'}$-*эндо*-конформации. Расхождение пар осуществляется главным образом за счет изменения конформационных углов остова ζ и γ, значения которых сдвигаются в область *ап*; при этом процесс происходит без раскручивания и приемлемыми моделями образующихся структур, по-видимому, являются комплексы профлавина с CpG и с 5-иод-CpG (табл. 16.1) [1120, 1132]. Так как конформация и ориентация сахаров, по существу, не меняются (для сравнения см. рис. 16.4), можно предположить, что при интеркаляции в А-ДНК и А-РНК принцип исключения ближайших мест связывания не выполняется.

Типичные интеркаляционные явления в В-ДНК. В случае В-ДНК, у которой при интеркаляции углы α и γ сдвигаются в область *ап*, наблюдается иная картина. В наилучшей с точки зрения интеркаляции модели [1131] конформация сахара, расположенного с 5′-стороны от места интеркаляции, меняется с $C_{2'}$-*эндо* на $C_{3'}$-эндо в соответствии с тем, что наблюдалось для комплексов динуклеозидмонофосфатов с интеркаляторами. Конформационные изменения не ограничиваются нарушением положения двух прилегающих к интеркалятору пар, а простираются и на другие, дальние пары. Связанное с внедрением каждой молекулы интеркалятора раскручивание на 18° затрагивает по крайней мере по три пары до и после места интеркаляции.

Это «дальнодействие» отчетливо прослеживается у комплекса дауномицина с гексадезоксинуклеотидом и согласуется с принципом исключения ближайших мест связывания. О таких же эффектах дальнего порядка свидетельствуют и ^{31}P-спектры ЯМР для комплекса актиномицина

с гексануклеотидом в растворе [1133]. Как показали эксперименты по дихроизму, плоскость интеркалятора не перпендикулярна оси спирали, а наклонена к ней под углом $\sim 20°$. Это влияет на расположение как ближайшей пары, так и пары, стоящей вслед за ней, т.е. в данном случае мы имеем дело с кооперативным эффектом [1134, 1135].

16.5. ПОЛНОСТЬЮ РАСКРУЧЕННАЯ L-ДНК, ОБРАЗУЮЩАЯСЯ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С ПЛАТИНОСОДЕРЖАЩИМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ ПРЕПАРАТОМ В УСЛОВИЯХ НАСЫЩЕНИЯ. СТРУКТУРА «ВЕРЕВОЧНОЙ ЛЕСТНИЦЫ»

Если ДНК тимуса теленка обработать избытком этилендиамин-(2,2′-бипиридин)-платины(II)-препаратом, принадлежащим к семейству платиновых соединений, описанных в табл. 8.6 как $[(\text{bipy})\,\text{Pt}(\text{en})]^{2+}$ (см. рис. 16.1),-то образуется комплекс, на основе которого удается получить пригодные для рентгеноструктурного анализа волокна. Рентгенограмма этих волокон приведена на рис. 16.7. Распределение рефлексов на рентгенограмме уникально. Она имеет простой вид и не похожа ни на одну из тех рентгенограмм, которые получены на волокнах двухцепочечных спиральных ДНК (см. рис. 3.9); расстояние между слоевыми линиями показывает, что параметр элементарной ячейки вдоль оси волокна равен 10,2 Å.

L-ДНК похожа по своей структуре на веревочную лестницу и обладает конформационными особенностями, напоминающими Z-ДНК. Анализ рентгенограмм показывает, что при насыщении ДНК молекулами интеркалятора двойная спираль полностью раскручивается, превращаясь в линейную двухцепочечную конструкцию, по виду напоминающую веревочную лестницу (ladder-отсюда и название L-ДНК) [1100] (рис. 16.8). Уотсон-криковская схема спаривания оснований сохраняется. Сохраняется также стопкообразное расположение пар с характерным расстоянием 3,4 Å, однако место каждой третьей пары занято теперь молекулой интеркалятора. Чтобы разойтись на расстояние, достаточное для того, чтобы поместилась молекула интеркалятора, нуклеотиды принимают довольно необычные конформации; участок из двух последовательных пар напоминает скорее CpG-ступеньки Z-ДНК (гл. 12), чем A- или B-ДНК (табл. 16.1). Так, в каждой уотсон-криковской паре L-ДНК одно из оснований находится в *син*-конформации, а другое-в *анти*. *Син*-конформация сопряжена с $C_{3'}$-эндо-конформацией сахара, а *анти*-конформация-с $C_{2'}$-*эндо*. В Z-ДНК соблюдается строгая корреляция: пурин-*син*, пиримидин-*анти*, которая, как это следует из стереохимических соображений, вероятно, имеет место и в L-ДНК. Однако, поскольку L-ДНК совершенно не закручена, некоторые торсионные углы, например ε, ζ и χ (вращение вокруг связей с атомом $O_{3'}$ и гликозидной связи), имеют необычные значения, которые отличаются от соответствующих значений для CpG-фрагментов Z-ДНК (табл. 16.1).

Рис. 16.7. Рентгенограмма ДНК тимуса теленка, насыщенной интеркалирующим агентом $[(bipy)_2Pt(en)]^{2+}$ [1100]. Расстояние между слоевыми линиями отвечает параметру ячейки вдоль оси волокна 10,2 Å. ДНК полностью раскручена и имеет форму «веревочной лестницы» (L-ДНК) [1100].

16.6. АКТИНОМИЦИН D – ИНТЕРКАЛЯТОР, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИЙСЯ С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ GpC

Актиномицин D состоит из феноксазиновой системы колец, связанной с двумя циклическими пентапептидами, которые содержат необычные аминокислоты – саркозин, L-метилвалин и D-валин (рис. 16.1). Этот антибиотик, как показывают биохимические исследования, интеркалирует не в CpG-, а в GpC-участки ДНК, при этом важную роль в связывании играет 2-аминогруппа гуанина [1136, 1137]. По своей специфичности к последовательности GpC актиномицин D резко отличается от всех лекарственных препаратов и красителей, представленных в табл. 16.1, для которых характерна общая схема участка связывания пиримидин – 3′,5′ – пурин. Чем же отличается от этих соединений актиномицин?

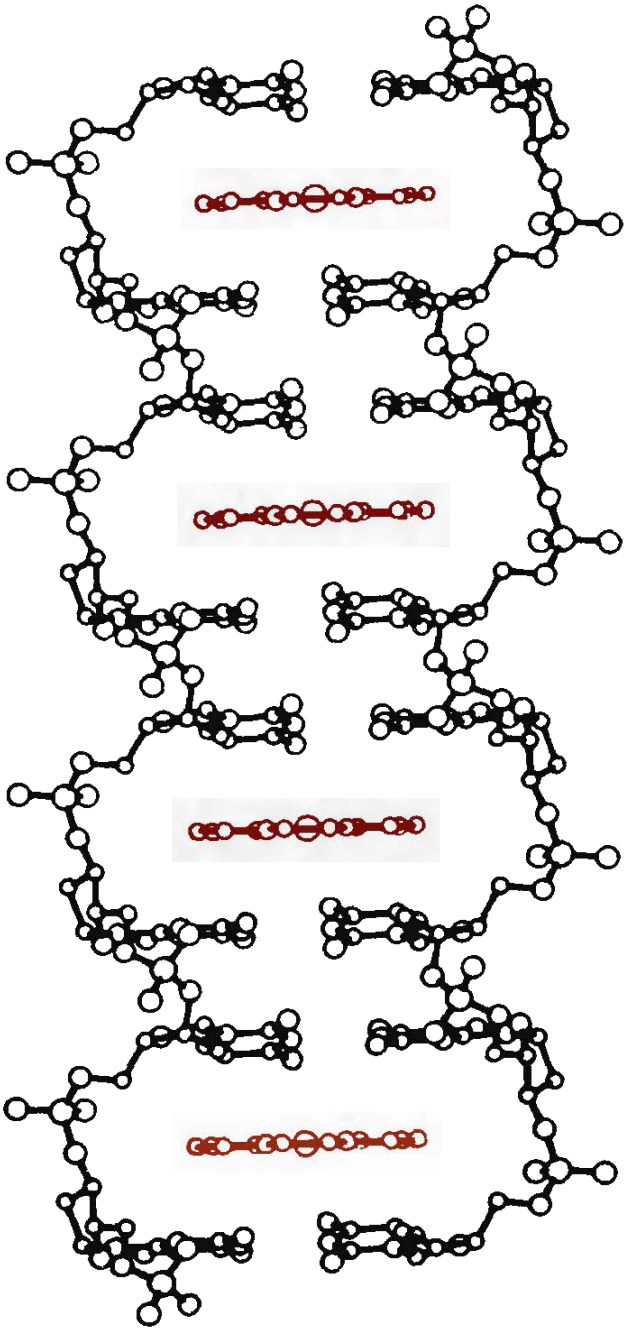
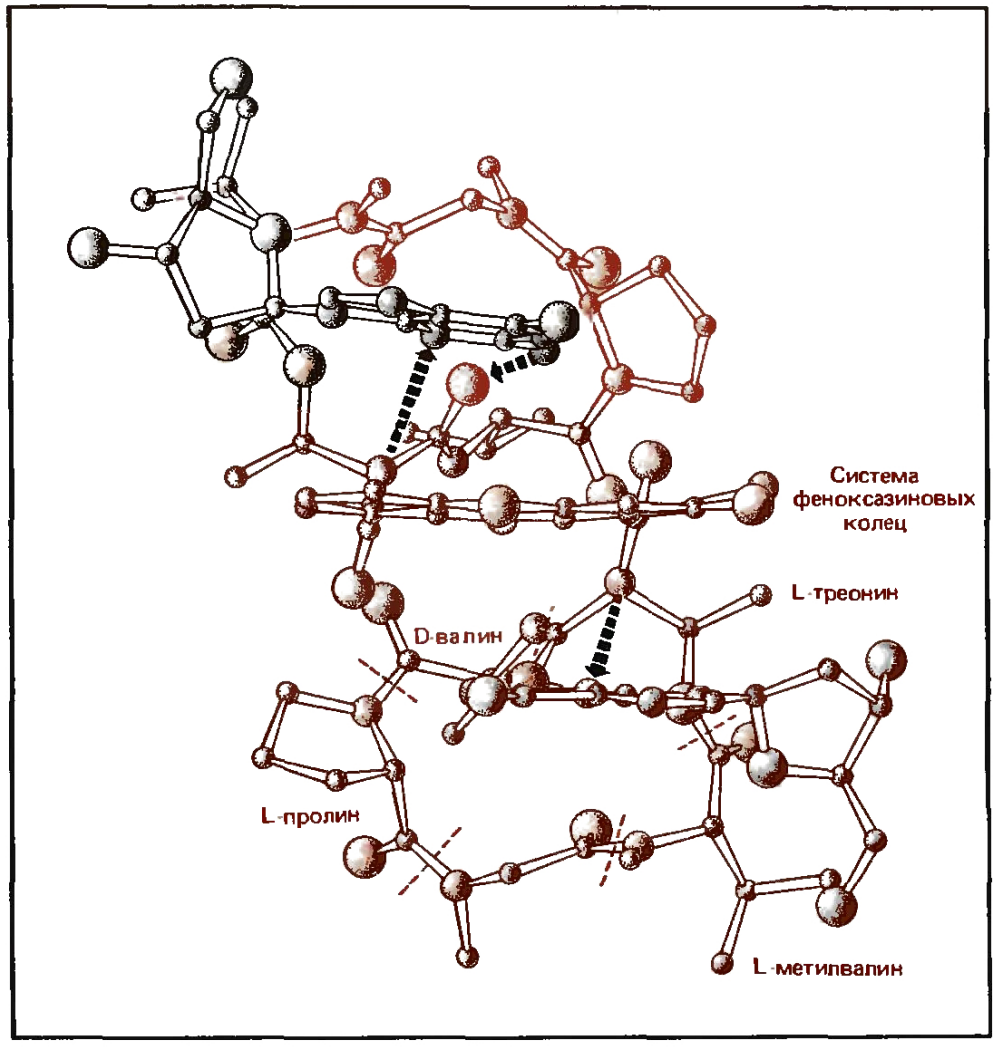
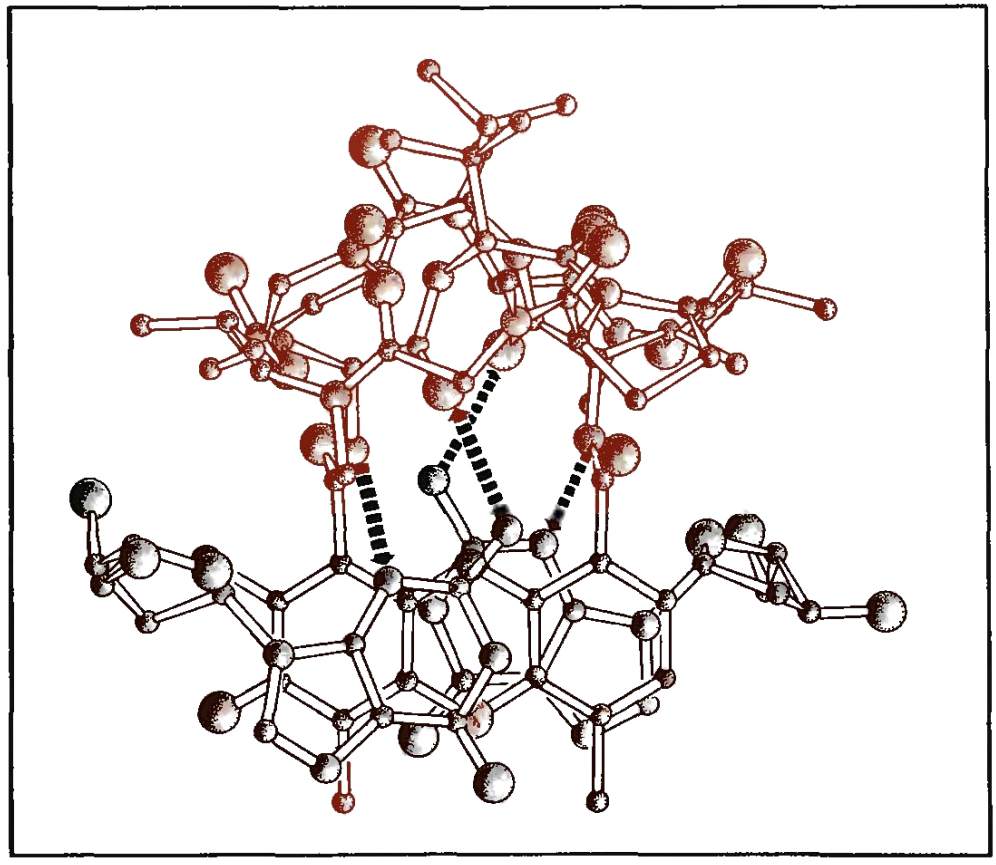


Рис. 16.8. Структура ДНК тимуса теленка, полностью насыщенной $[(bipy)_2Pt(en)]^{2+}$ (структурную формулу соединения см. в табл. 8.6) [1100]. Двойная спираль ДНК раскручивается и вырождается в структуру «веревочной лестницы». В соответствии с принципом исключения ближайших мест связывания интеркалятор заполняет лишь каждое второе место возможного связывания (интеркалятор показан в цвете).

В кристаллах комплекса дезоксигуанозина с актиномицином D между пептидами и гуанином образуются специфические водородные связи. Молекулярная структура этого антибиотика обладает осью симметрии 2-го порядка, которая связывает друг с другом два циклических пентапептида. Пептиды имеют почти эквивалентные конформации, и вся структура поддерживается водородными связями между остатками D-валина

Рис. 16.9. Структура комплекса актиномицина D с дезоксигуанозином. Черным цветом изображены нуклеозиды. Обратите внимание на специфические водородные связи между остатками гуанина и L-треонина. Структура построена по координатам атомов, опубликованным в работе [1138]. Описание деталей изображения см. в подписи к рис. 10.1.


Система
феноксазиновых
колец
L-треонин
D-валин
L-пролин
L-метилвалин



[1136, 1138] (рис. 16.9). В комплексе симметрия сохраняется, поскольку один дезоксигуанозин располагается «над», а другой «под» феноксазиновой системой колец. В образовании специфических водородных связей между актиномицином и основанием участвуют атом N_3 и N_2-аминогруппа гуанина, а также пептидная группа L-треонина. Очевидно, что это взаимодействие перекрывает все те преимущества, которые дает связывание с последовательностью пиримидин–3′,5′–пурин, характерное для более простых интеркаляторов.

Если путем компьютерного моделирования присоединить к обоим дезоксигуанозинам дезоксицитидины, образовав две уотсон-криковские пары и стэкинг с феноксазиновой системой колец, то получится модель комплекса актиномицина с GpC. Эту модель легко экстраполировать на случай двойной спирали B-ДНК. При интеркаляции актиномицина пептидные кольца попадают в минорный желобок и сохраняется симметрия 2-го порядка [1136, 1139]. Модель симметричного ДНК-пептидного комплекса позволила выдвинуть ряд гипотез относительно более сложных белковых систем, взаимодействующих с ДНК, поскольку для многих из них тоже характерно образование комплексов с симметрией 2-го порядка [1140].

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Взаимодействие ДНК с лекарственными препаратами имеет большое значение для фармакологии. Здесь рассматривались только интеркаляционные комплексы с препаратами, обладающими плоскими группировками. Связывание таких препаратов с двойной спиралью протекает в две стадии: на первой происходит их присоединение по периферии спирали, на второй осуществляется интеркаляция, которая сопровождается раскручиванием и удлинением спирали, а также увеличением ее жесткости. В соответствии с принципом исключения ближайших мест связывания молекулы интеркаляторов заполняют лишь половину таких мест. Расхождение оснований при интеркаляции сопровождается изменениями конформации сахара и торсионных углов χ и β. В комплексе между дауномицином и гексадезоксинуклеотидом обнаружены нарушения дальнего порядка; образуются также водородные связи между молекулами антибиотика и ДНК, которые могут обусловливать специфичность такого связывания. Лекарственные препараты с планарной структурой, содержащие хелатный комплекс Pt с бипиридином, очень сильно меняют структуру ДНК, которая принимает вид «веревочной лестницы» (L-ДНК); при этом в каждой уотсон-криковской паре один нуклеотид находится в *син*-форме, а другой – в *анти*, как у Z-ДНК. Обнаружена высокая специфичность комплексов актиномицина D, который связывается исключительно с участками d(GpC), поскольку лишь в этом случае могут образовываться стабилизирующие комплекс водородные связи.

ГЛАВА 17

Вода и нуклеиновые кислоты

Мы уже неоднократно говорили о том, насколько велика роль водного окружения нуклеиновых кислот. Вода – это не просто среда, в которой растворены те или иные молекулы. Вода взаимодействует с растворенными молекулами, и именно она главным образом стабилизирует вторичную и третичную структуру макромолекул [525, 1146–1148]. Это относится и к белкам, и к ДНК, причем к ДНК, пожалуй, даже в большей степени, поскольку высокая диэлектрическая проницаемость воды и гидратированные противоионы ослабляют электростатическое отталкивание фосфатов. Молекулы воды принимают участие и в процессе самосборки оснований в упорядоченные структуры, так как этот процесс в значительной степени обусловлен гидрофобными взаимодействиями. Степень гидратации ДНК имеет определяющее значение для ее конформации: при высокой относительной влажности ДНК находится в B-форме, уменьшение влажности (или увеличение ионной силы) приводит к переходу ДНК из B- в C-, A- или (если позволяет последовательность) в D- и Z-формы.

17.1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВА СУЩЕСТВОВАНИЯ ПЕРВИЧНЫХ И ВТОРИЧНЫХ ГИДРАТНЫХ ОБОЛОЧЕК ДВОЙНЫХ СПИРАЛЕЙ ДНК

Параметр Г – мера гидратации. Сольватацию, или гидратацию макромолекулы определяют параметром Г, который в случае ДНК равен числу молей воды, приходящихся на один моль нуклеотидов. Вторичная структура ДНК тесно связана с параметром Г [1149, 1150], который в свою очередь непосредственно связан с активностью воды a_w, увеличивающейся с понижением концентрации соли в растворе [1151]. Хотя влияние катионов на активность воды определяется ионной силой и в первом приближении не зависит от вида катиона, разные катионы поразному влияют на вторичную структуру ДНК, что свидетельствует об определенной специфичности взаимодействия ДНК с катионами [1150].

Две гидратные оболочки двойной спирали ДНК. Экспериментальные данные, полученные при равновесном центрифугировании [1151–1155],

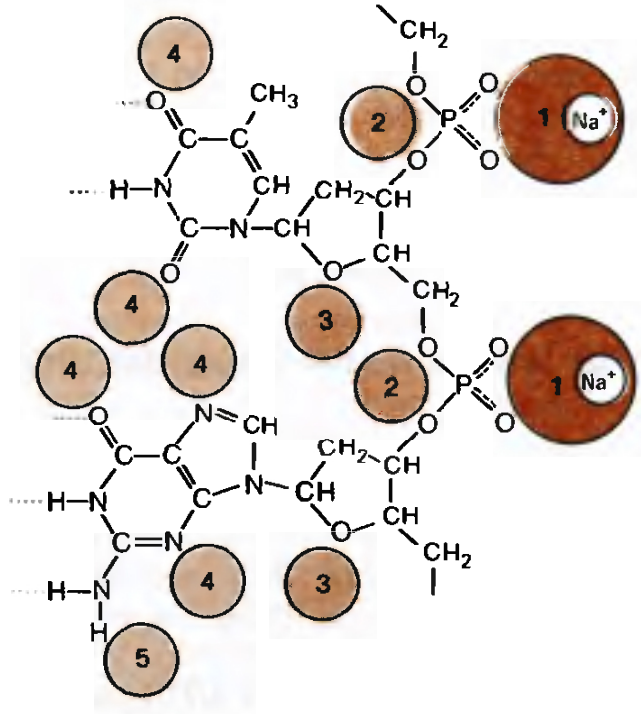


Рис. 17.1. Места предпочтительного связывания молекул воды с В-ДНК [1158]. Числа от 1 до 5 указывают порядок, в котором уменьшается сила связывания. Вблизи фосфатной группы находится примерно 5 молекул воды.

изопиестических [1156] и гравиметрических [1157] измерениях, методами ИК-спектроскопии [1158–1160] и рентгеновской дифракции на волокнах (гл. 9), свидетельствуют о том, что молекула ДНК, представляющая собой полиэлектролит, сильно и неравномерно гидратирована. Вокруг нее образуются два дискретных слоя молекул воды – первичная и вторичная гидратные оболочки.

Первичная гидратная оболочка непроницаема для катионов и по структуре не похожа на лед. В соответствии со схемой, приведенной на рис. 17.1, первичная гидратная оболочка двойной спирали включает по крайней мере 11–12 молекул воды на нуклеотид. Эти молекулы в соответствии с уменьшением силы связывания можно разбить на три класса: связанные с фосфатами (I), с фосфодиэфирными связями и остатками сахаров (II) и с основаниями (III). По данным ИК-спектроскопии атомы кислорода фосфатов гидратированы даже при относительной влажности меньше 65%; при этом на нуклеотид приходится 5–6 молекул воды. Атомы кислорода фосфодиэфирной связи и кислород $O_{4'}$ фуранозы при относительной влажности ниже 60% гидратированы лишь частично. Гидратация функциональных амино-, имино- и кетогрупп оснований происходит при относительной влажности выше 65% и приводит к дополнительному связыванию 8–9 молекул воды. При относительной влажности ~80% первичная гидратная оболочка двойной спирали ДНК заполняется, при этом на нуклеотид приходится примерно 20 молекул воды. Дальнейшее увеличение степени гидратации приво-

дит к набуханию образца, о чем свидетельствуют результаты рентгеновской дифракции на волокнах ДНК [1161] (рис. 17.2).

Как показывает ИК-спектроскопия, первичная гидратная оболочка отличается по своей структуре от обычной воды. В прямом контакте с ДНК находятся не все 20 молекул; 8–9 из них связаны с остальными 11–12 молекулами внутренней части гидратной оболочки. Внутренняя оболочка непроницаема для катионов [1155] и «не замерзает» (т. е. не образует структуры льда) при температурах значительно ниже 0°C [1160] (рис. 17.3). Вместо искаженных шестиугольных колец, характерных для структуры льда I, гидратная оболочка, по-видимому, образует другие более или менее упорядоченные структуры (разд. 17.5).

Вторичная гидратная оболочка не отличается от обычной воды по проницаемости для ионов и по способности образовывать структуру льда I. Однако в структурном отношении, она, по-видимому, все-таки отличается от воды, которая находится вдали от полиэлектролитной молекулы ДНК, из-за эффектов доннановского типа [1151].

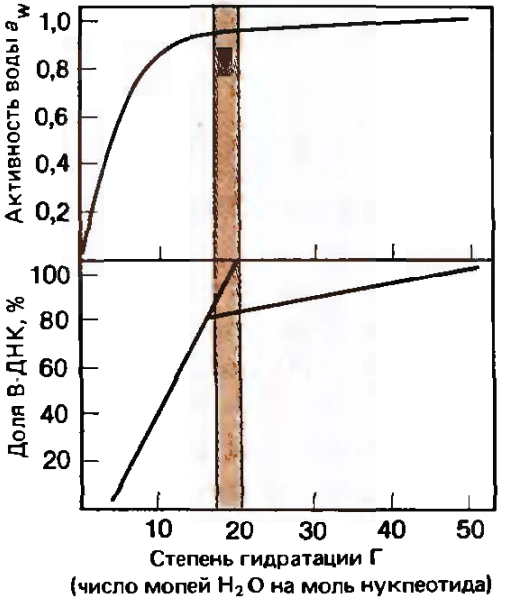


Рис. 17.2. *Вверху.* Связь между активностью воды (a_w) и степенью гидратации ДНК (Г) [1153]. Активность воды варьировали, меняя концентрации различных солей Cs^+. Полученная зависимость показывает, что для пезиевых солей ДНК степень гидратации практически перестает расти, когда на нуклеотид приходится ~20 молекул воды. *Внизу.* Зависимость процентного содержания В-ДНК от степени гидратации Г [1151]. Нужную степень гидратации получали путем изменения концентрации хлоридов щелочных металлов. Значения Г при содержании В-ДНК 0% и 100% показывают, что минимальная степень гидратации двойной спирали ДНК (ее структура при этом отличается от В-формы) равна 3,6 молекулы воды на нуклеотид, а когда на нуклеотид приходится ~20 молекул воды, ДНК полностью переходит в В-форму. При дальнейшем увеличении концентрации воды образец ДНК набухает, но конформация ДНК при этом не меняется.

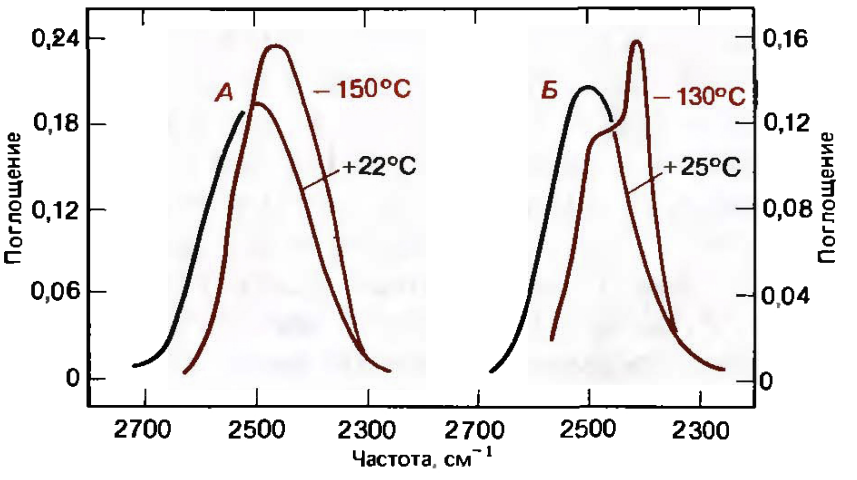


Рис. 17.3. ИК-спектры препаратов ДНК в HDO при относительной влажности 76% (*А*) и 86,5% (*Б*) [1160]. *А*. На каждый нуклеотид приходится ~9 молекул воды, которые образуют внутренний слой первичной гидратной оболочки, непроницаемый для катионов и неспособный к образованию структуры льда. *Б*. С нуклеотидом связано ~14 молекул воды; 5 из них образуют наружный слой, который не так прочно связан с ДНК и может кристаллизоваться в структуру льда I (на это указывает появление характерной полосы поглощения 2410 $см^{-1}$).

17.2. РАЗНЫЕ СОСТОЯНИЯ ГИДРАТАЦИИ А-, В- И С-ДНК

При высокой активности воды, когда катионы не нарушают первичную гидратную оболочку, состоящую из 20 молекул воды на нуклеотид, ДНК находится в В-форме. По мере уменьшения относительной влажности в волокне или пленке или при увеличении концентрации соли в растворе степень гидратации уменьшается и при некотором пороговом значении Г, соответствующем ~20 молекулам воды на нуклеотид, наблюдается структурный переход ДНК из В-формы в С- или А-форму в зависимости от природы присутствующего противоиона (рис. 17.2). В→С-переход происходит «непрерывно» [1151], как это и должно быть в случае двух структурно близких форм. Что касается переходов В→А и С→А, то из-за изменения конформации сахара C_2-*эндо*→C_3-*эндо* они должны происходить скачком, кооперативно.

Структурные переходы при высокой концентрации соли и в спиртовых растворах. За переходами ДНК из одной структурной формы в другую можно следить по изменению спектров кругового дихроизма (рис. 17.4). По мере увеличения концентрации соли идет «*непрерывный*» *внутри*семейственный структурный переход В→С; когда концентрация соли достигает определенной величины, наблюдается резкий кооперативный *меж*семейственный переход С→А или В→А. Такие кооперативные переходы (В→А или С→А) происходят также при изменении полярности среды, например при добавлении в систему этанола, изопропанола или диоксана до концентраций ~80% [839].

Специфические взаимодействия «катион–ДНК» в 80%-ном метаноле. В водных растворах катионы взаимодействуют с двойными спиралями В-семейства неспецифическим образом. Однако в растворе, содержащем 80% метанола, взаимодействие становится специфичным. Так, для ДНК в комплексе с ионами Cs^+ угол спирального вращения равен 45° (D-ДНК), а в комплексе с ионами Li^+ –33° (B′-ДНК), что, по-видимому, объясняется точным пространственным соответствием между гидратированными катионами различной геометрии и узким желобком двойных спиралей В-семейства [839, 1162].

В водных растворах В-ДНК немиого раскручена. Спектры КД и эксперименты по рентгеновскому рассеянию [1163] свидетельствуют о том, что в растворе число нуклеотидов на виток ДНК в В-форме не равно в точности 10, как в волокнах, исследованных методами рентгеновской дифракции (гл. 10). В-ДНК в растворе немного раскручена, угол спирального вращения у нее меньше, чем у В-ДНК в волокнах, что согласуется с теорией, кристаллографическими данными и с результатами экспериментов по ферментативному расщеплению, о которых говорилось в разд. 9.2.

Стабилизация структуры В-ДНК с помощью полиаминов. Двойные спирали В-типа можно стабилизировать, добавив в раствор протамины или гомополипептиды – полилизин или полиаргинин [1164]. Такие основные гомополимеры образуют с ДНК комплексы, располагаясь, по-видимому, в минорном желобке и связываясь, подобно полиаминам спермину и спермидину (разд. 15.6), с фосфатами противоположных цепей [1165–1167]. У двух упомянутых полиаминов, а также у род-

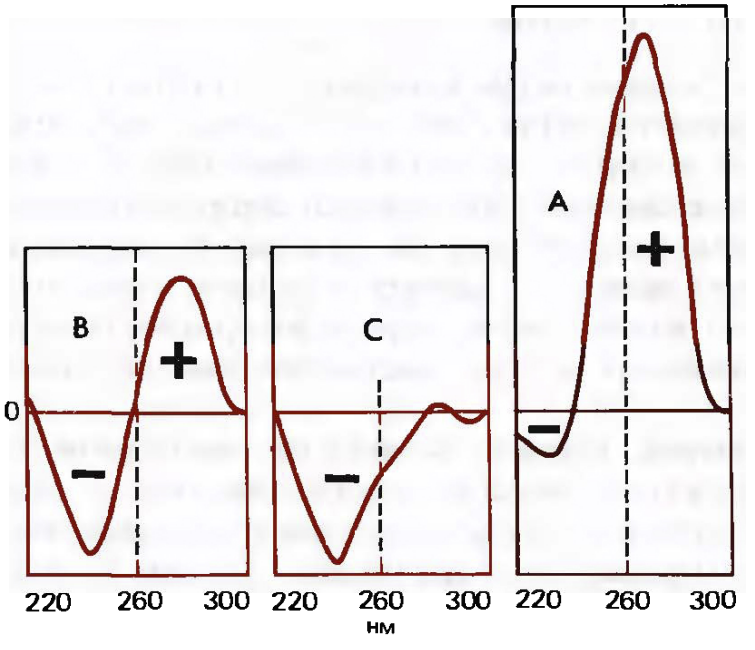


Рис. 17.4. Общая форма спектров кругового дихроизма А-, В- и С-ДНК [839]. Пунктиром показано положение максимума УФ-спектров поглощения.

ственных им путресцина и кадаверина (схема 15.1) различаются расстояния $N^+ \cdots\cdots N^+$, поэтому они стабилизируют разные структурные формы ДНК. Так, в водных растворах этанола спермин и спермидин предпочитают связываться с А-формой, тогда как кадаверин или путресцин – с В-формой [1165].

Эти данные, полученные для растворов этанола, находятся в противоречии с результатами структурного исследования комплекса додекамера В-ДНК со спермином, который кристаллизовали в растворе, содержащем высший спирт (2-метил-2,4-пентандиол) [1168]. В двойной спирали, образованной додекамером d(CGCGAATTCGCG) (разд. 11.2), молекула спермина располагается в главном желобке и ориентирована почти перпендикулярно оси спирали, т. е. совсем не так, как предполагалось выше [1165–1167]. Кроме двух солевых мостиков между концевыми аминогруппами спермина и фосфатами противоположных полинуклеотидных цепей одна из внутренних аминогрупп спермина образует водородную связь с выступающим в главный желобок атомом O_6 гуанина. Один из двух солевых мостиков ослаблен контактами с соседней молекулой додекамера. Таким образом, указанное выше расположение спермина может быть обусловлено упаковкой молекул комплекса в кристалле, и тогда справедливость экстраполяции полученных результатов к условиям в растворе сомнительна. С другой стороны, интерпретация экспериментов, проведенных в растворе, основана на предположении о локализации спермина и его аналогов в минорном желобке, и в свете новых данных ее, по-видимому, следует пересмотреть.

17.3. ДОСТУПНАЯ МОЛЕКУЛАМ РАСТВОРИТЕЛЯ ПОВЕРХНОСТЬ А- И В-ДНК

Сворачивание полипептидов и полинуклеотидов с образованием вторичной и третичной структуры обусловлено тем, что определенные группы атомов, которые у неупорядоченных полимеров контактировали бы с растворителем, при сворачивании цепи оказываются внутри. Для оценки влияния растворителя на укладку полипептидной цепи [525, 1146–1148] была развита концепция доступной поверхности, с помощью которой можно количественно определить соотношение между скрытыми и доступными для молекул растворителями группами атомов [1169, 1170].

Пробный шарик, который катится по поверхности молекулы. Если трехмерная структура макромолекулы известна, ее объемную модель можно представить в виде совокупности вандерваальсовых сфер, центры которых задаются координатами атомов. Если теперь по такой модели прокатить пробный шарик радиусом r_w, мы определим поверхность молекулы, доступную для растворителя или любого атома с радиусом r_w; параллельные сечения этой поверхности дадут карту доступной поверхности (рис. 17.5).

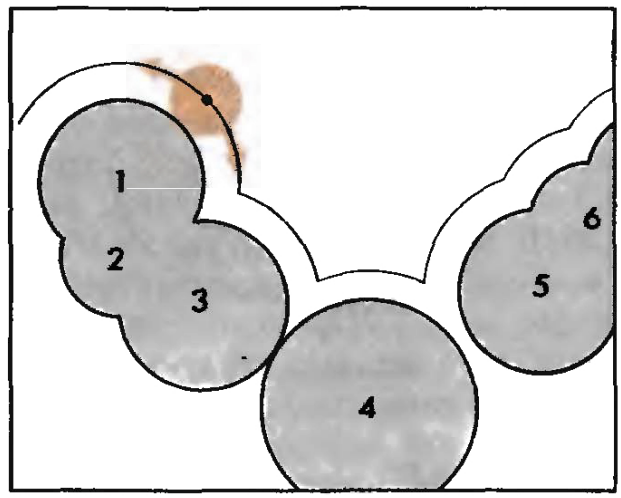


Рис. 17.5. Схематическое изображение доступной поверхности молекулы, состоящей из 6 атомов (затенены) [1172]. Вдоль поверхности движется пробный шарик (показан в цвете) радиуса r_w, его центр описывает контур доступной поверхности. Такая же процедура проводится для других плоских сечений молекулы, затем путем интегрирования вычисляется площадь доступной поверхности ($Å^2$). При увеличении r_w атомы, лежащие во впадинах, становятся недоступными.

При образовании двойной спирали ДНК становится более полярной. В двух независимых работах были определены доступные поверхности молекул $тРНК^{Phe}$ [1171, 1172], А- и В-ДНК [1172]. Если сравнить площади доступной поверхности полностью вытянутой ДНК и ДНК в А- или В-форме, то мы увидим, что при образовании двойной спирали атомы кислорода фосфатных групп остаются почти полностью открытыми, тогда как основания на 80% заслоняются другими атомами. Иными словами, если у раскрученной вытянутой ДНК на долю фосфатов приходится ~20% площади поверхности, на долю оснований – 50% и на долю сахаров – 30%, то у двойной спирали фосфаты занимают 45% площади поверхности, основания – 20%, а сахара – 35% (рис. 17.6). Таким образом, полярность молекулы ДНК при образовании двойной спирали увеличивается. Такая же картина наблюдается и у белков при образовании глобулярных структур: полярные группы располагаются на поверхности, а неполярные, гидрофобные – внутри.

Доступность поверхности ДНК для растворителя определяет ее свойства в растворе. Если принять r_w равным 1,4 Å, что соответствует радиусу молекулы воды, то площадь доступной поверхности у А- и В-ДНК окажется почти одинаковой. Однако с увеличением r_w (т. е. при рассмотрении гидратированных катионов или боковых групп аминокислот) относительная доступность фосфатов у В-ДНК растет быстрее, чем у А-ДНК, поскольку у В-формы атомы кислорода фосфатных групп экспонированы сильнее. Соответственно атомы углерода у В-ДНК с ростом r_w быстрее попадают в скрытую область, чем у А-ДНК (рис. 17.7).

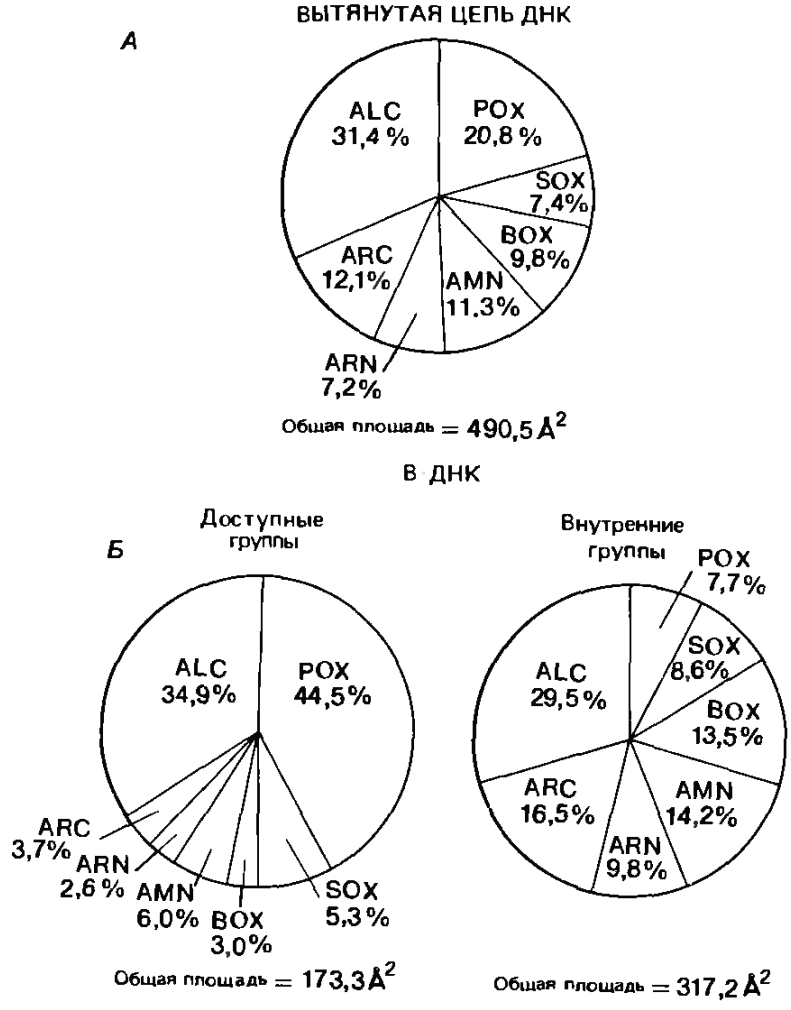


Рис. 17.6. Вклад различных групп в общую площадь поверхиости раскрученной вытянутой ДНК (*А*) и В-формы ДНК (*Б*) со случайной последовательностью [1172]. На рис. *Б* приведены данные как для экспонированных, так и для скрытых групп; площади экспонированной и скрытой поверхностей в сумме дают общую площадь поверхиости. При сворачивании в спираль атомы кислорода фосфатных групп остаются экспонированными, а основания оказываются внутри молекулы. *Обозначения*: ALC – алифатический углерод, AMN – азот аминогруппы, ARC – ароматический углерод, ARN – азот ароматического кольца, BOX – кислород карбонильной группы оснований, POX – кислород фосфатной группы, SOX – кислород сахарного остатка.

Эти результаты можно объяснить следующим образом [1172]. Пересечение кривых на рис. 17.7 означает, что для молекул воды площадь доступной поверхности у А- и В-ДНК фактически одинакова, следовательно, первичные гидратные оболочки обеих форм количественно эквивалентны. Из хода кривых при увеличении r_w видно, что для кластеров молекул растворителя более доступны фосфатные группы В-ДНК, так как в отличие от А-формы, у которой атомы кислорода фосфатных групп повернуты в сторону минорного желобка и потому менее доступны, в В-ДНК они направлены от оси спирали. Эта общая схема

подтверждается результатами расчета числа молекул воды, которые можно разместить в главном и минорном желобках в окрестности одного нуклеотида – 10,5 для А-ДНК и 19,3 для В-ДНК. Последняя величина хорошо согласуется с экспериментально определенным числом молекул воды в первичной гидратной оболочке В-ДНК (~ 20).

Концепция доступной поверхности позволяет объяснить также зависимость конформации ДНК от содержания АТ- и GC-пар [1172]. Как показали эксперименты по центрифугированию ДНК в градиенте плотности [1155] и теоретические расчеты [1173], АТ-пара может связать на 1–2 молекулы воды больше, чем пара GC. Если рассмотреть доступную поверхность молекулы, то мы увидим, что у АТ-пары гидрофобная метильная группировка сильно экспонирована и, следовательно, должна способствовать агрегации молекул воды, что предполагает наличие широкого главного желобка. Этим можно объяснить тот факт, что у ДНК с высоким АТ-содержанием переход в А-форму, т. е. в форму с более узким главным желобком, затруднен (см. рис. 9.2). В месте расположения GC-пар оба желобка окаймлены гидрофильными аминогруппами, наличие которых способствует взаимодействию воды с основаниями. Следо-

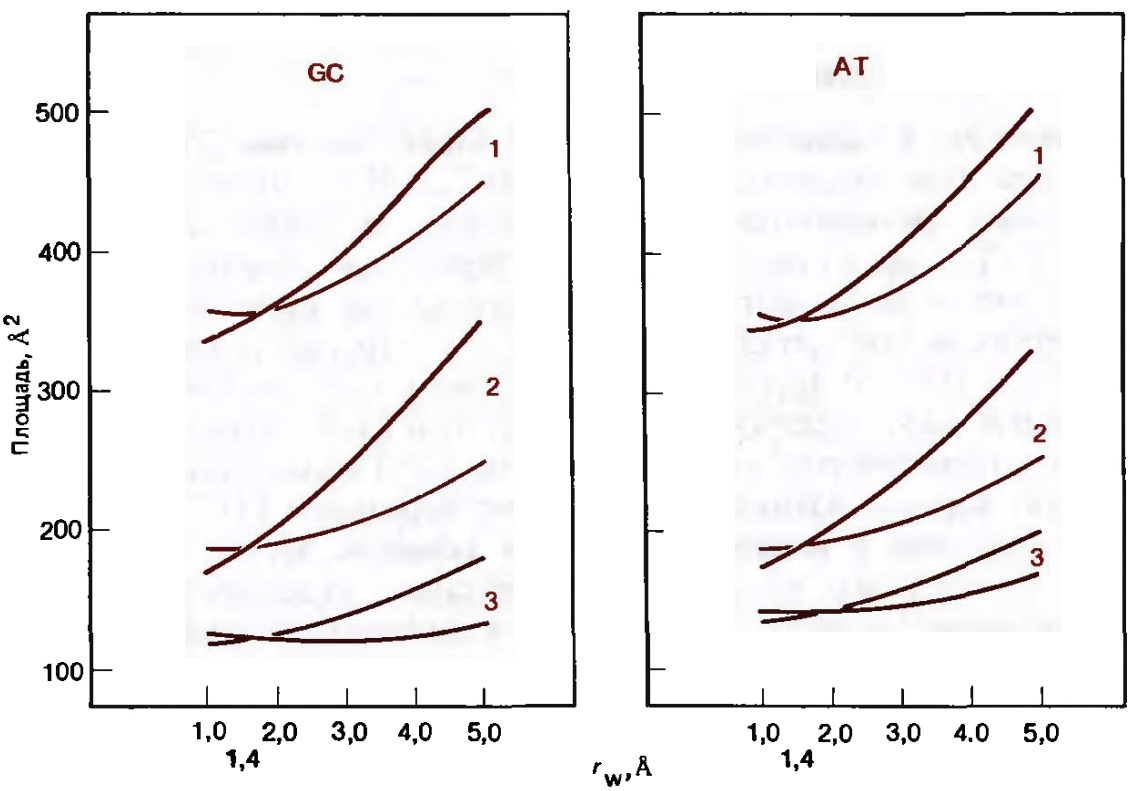


Рис. 17.7. Зависимость площади доступной поверхности пары оснований poly(dG)·poly(dC) (*слева*) и poly(dA)·poly(dT) (*справа*) в А-форме (черная кривая) и в В-форме (цветная кривая) от r_w пробного шарика [1172]. *1* – общая площадь доступной поверхности пары; *2* и *3* – вклад в общую площадь атомов кислорода и углерода соответственно. С увеличением r_w доступность атомов кислорода фосфатных групп у В-ДНК становится больше, чем у А-ДНК; для атомов углерода наблюдается обратная тенденция.

вательно, для ДНК с высоким GC-содержанием никакая из структурных форм не будет предпочтительной, и структурные переходы в ней должны происходить легче, чем в АТ-богатой ДНК (см. также разд. 17.6).

Доступная поверхность и взаимодействие между ДНК и белками. Как показывают оценки площади доступной поверхности ДНК для пробного шарика радиусом 3 Å и более, основания В-ДНК открыты главным образом со стороны главного желобка (экспонированы N_4-атом цитозина и метильная группа тимина), а основания А-ДНК – со стороны минорного (N_2-атом гуанина). Это означает, что при взаимодействии белка с интактной двойной спиралью специфические контакты между парами оснований и боковыми группами аминокислот в случае В-формы будут осуществляться в главном желобке, а в случае А-формы – в минорном. Это согласуется с данными о взаимодействии В-ДНК со специфическими белками: РНК-полимеразы *E. coli* с *lac*-промотором, *lac*-репрессора с *lac*-оператором [1172], а также с данными по λ- и *cro*-репрессорам и взаимодействию ДНК с гистонами в нуклеосомах (гл. 18 и разд. 19.3).

17.4. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

«Статическая» и «динамическая» модели взаимодействии ДНК с молекулами воды. Для описания гидратации ДНК, РНК и их мономерных составляющих применяются главным образом два теоретических подхода [1173–1178]. Один из них – супермолекулярное приближение – использует метод самосогласованного поля и эмпирические функции потенциальной энергии и дает детальную статическую картину гидратации молекулы [1173–1176]. В другом используется метод Монте-Карло, при этом с помощью карт электростатического потенциала макромолекулы вычисляют статистическое распределение молекул воды и получают динамическую картину взаимодействия с растворителем [1177–1180].

Сопоставление с экспериментальными данными. Метод Монте-Карло позволил определить положение и ориентацию отдельных молекул воды, взаимодействующих с молекулой нуклеиновой кислоты и с другими близлежащими молекулами воды. Оказалось, что в случае двойной спирали ДНК первичная гидратная оболочка имеет характерную структуру с периодом, равным расстоянию между фосфатами. Между каждыми двумя соседними фосфатами одной цепи образуется мостик из молекулы воды. Вблизи PO_2^--группы располагаются также другие молекулы воды, взаимодействующие одновременно с обоими атомами кислорода PO_2^--группы. В целом каждый фосфат удерживает по 6 молекул воды первичной гидратной оболочки, что согласуется с результатами ИК-спектроскопии (разд. 17.1). Распределение остальных молекул воды в первичной гидратной оболочке зависит от того, какой тип ДНК рассматривается – А или В. В модели гидратной оболочки В-ДНК предпо-

лагается наличие водных нитей, связывающих фосфаты противоположных цепей через главный желобок [1180]. Энергия стабилизации в данном случае составляет 15 ккал·(моль воды)$^{-1}$, т.е. настолько велика, что вокруг ДНК образуется второй и даже третий гидратные слои, что увеличивает общий радиус (гидратированной) ДНК на 6 Å в случае двух слоев и на 9 Å в случае трех. Молекулы воды, располагающиеся внутри главного и минорного желобков между сахарофосфатными цепями, связаны с ДНК слабее; энергия стабилизации для них составляет ~ 10 ккал·(моль воды)$^{-1}$ [1177, 1179].

Согласно методу супермолекулярного приближения, с каждой фосфатной группой B-ДНК связывается 5 молекул воды, причем одна из них сильнее, чем остальные четыре (энергия стабилизации на 4 ккал·моль$^{-1}$ больше [1175]). В случае GC-пары в главном желобке располагаются 3 молекулы воды, связанные с атомами кислорода кетогрупп и атомами азота аминогрупп гуанина и цитозина; еще 3 молекулы воды находятся в минорном желобке и связываются с атомами $O_{4'}$ сахара, N_3 гуанина и O_2 цитозина. Таким образом, на каждый нуклеотид в среднем приходится ~ 8 молекул воды, которые образуют внутреннюю гидратную оболочку, что в целом согласуется с приведенными выше данными (разд. 17.1).

Как влияет гидратация на энергию стабилизации двойной спирали B-ДНК? Для анализа сил, ответственных за стабилизацию двойной спирали, можно использовать модель гидратации ДНК, полученную методом супермолекулярного приближения [1175]. Вклад гидратации в стабилизацию двойной спирали связан в основном с уменьшением отталкивания между соседними отрицательно заряженными фосфатами [15 ккал·(моль пар)$^{-1}$]. Кроме того, при гидратации усиливается притяжение между основанием и фосфатной группой (12 ккал·моль$^{-1}$) и заметно изменяется стэкинг соседних оснований (7–10 ккал·моль$^{-1}$).

Какие силы участвуют в стабилизации? Ослабление отталкивания фосфатов обусловлено в первую очередь уменьшением электростатических сил и лишь в небольшой степени увеличением энергии поляризации. Усиление притяжения между фосфатами и основаниями также определяется главным образом существенным увеличением электростатической составляющей и лишь в небольшой мере сопутствующим увеличением энергии поляризации и дисперсионной энергии. Наконец, стабилизирующее действие гидратации на стэкинг в основном связано с электростатическим и дисперсионным взаимодействием. Роль поляризации по оценкам невелика, вклад отталкивания в энергию образования стэкинга составляет 5 ккал·моль$^{-1}$, а суммарный энергетический выигрыш -7–10 ккал·моль$^{-1}$ (для GC-пары).

В стабилизации структуры A-РНК принимает участие $O_{2'}$-гидроксил. Как показали расчеты, в A-РНК гидроксильная группа $O_{2'}$—H может участвовать в трех типах взаимодействия в зависимости от ориентации атома водорода [1176]. Во-первых, может образоваться (слабая) водородная связь $O_{2'}$—H$\cdots O_{4'}$ между двумя соседними остатками рибозы.

Во-вторых, если гидроксильная группа $O_{2'}$—H *цис-планарна* относительно связи $C_{2'}$—$C_{3'}$, то молекула воды может образовать внутримолекулярный мостик между атомом $O_{2'}$ рибозы и атомом O_2 пиримидина (или N_3 пурина), т.е. связь $O_{2'}\cdots H—O—H\cdots O_2$ (N_3). В-третьих, образуется очень прочный водный мостик между атомами $O_{2'}$ и $O_{3'}$ одной и той же рибозы. Кислород $O_{3'}$ обладает заметной электроотрицательностью, поскольку участвует в образовании фосфодиэфирной связи (см. также разд. 4.3).

Гидратные оболочки со структурой типа «айсберг» не образуются. Расчеты показывают, что вопреки предположению об образовании вокруг макромолекул гидратных оболочек со структурой «айсберг» в случае двойных спиралей ДНК и РНК подобные структуры не образуются [1181]. Упорядоченная структура клатратов льда [1183], по-видимому, является слишком жесткой и не может сформироваться вокруг молекул с такой сложной поверхностью, как у нуклеотидов или нуклеиновых кислот. Это, однако, не исключает возможности образования гидратной оболочки хотя и не с такой упорядоченной, но все-таки с более или менее регулярной структурой (разд. 17.6).

17.5. ХАРАКТЕР ГИДРАТАЦИИ ТЕТРАМЕРА А-ДНК И ДОДЕКАМЕРА В-ДНК В КРИСТАЛЛАХ И А → В-ПЕРЕХОД

Гидратный монослой и водный «хребет» в главном и минорном желобках В-ДНК. Кристаллическая структура В-додекамера ДНК d(CGCGAATTCGCG) дает информацию не только о геометрических особенностях двойной спирали В-ДНК, но и о структуре ее гидратной оболочки. При обычных условиях в кристалле на один додекамерный дуплекс приходится 72 более или менее упорядоченные молекулы воды [1168]. Если концентрацию спирта (2-метил-2,4-пентадиола) при кристаллизации увеличить до 60% или проводить эксперимент при 16 K, связывается еще 48 молекул воды [1183а]. В обычных условиях [1168] систематическая гидратация фосфатных групп отсутствует; исключение составляют молекулы воды, располагающиеся между метильной группой тиминов и 5′-фосфатами тех же нуклеотидов. При высокой концентрации спирта или при 16 K выявляются дополнительные молекулы воды, связанные с атомами кислорода фосфатных групп [1183а]. При этом на один атом кислорода приходится от 1 до 5 молекул воды (в среднем $3 \pm 1{,}3$), из которых почти 40% образуют мостики между двумя или большим числом атомов кислорода фосфатов. Такой тип гидратации осуществляется в главном желобке; кроме того, там же наблюдается монодентатное связывание молекул воды с атомами кислорода кетогрупп и с аминогруппами пуриновых и пиримидиновых гетероциклов, а в нескольких случаях (и в меньшей степени)—с N_7-атомами пуринов. Связанная с первичной вторичная гидратная оболочка слишком разупорядочена, и в рентгеновских экспериментах при комнатной температуре

ее не удается обнаружить [1168]. Однако некоторую информацию о вторичном гидратном слое дают низкотемпературные эксперименты и исследование кристаллов, полученных при высокой концентрации спирта [1183а]. Кроме упомянутых выше монодентатных взаимодействий встречаются бидентатные, когда одна молекула воды выступает в роли донора сразу двух водородных связей либо в роли акцептора двух связей, либо как донор и акцептор одновременно. Бидентатные мостики образуются преимущественно между N- и O-атомами двух соседних пар оснований. Молекулы воды, связанные с основаниями, вместе с водой, сгруппированной вокруг фосфатов, образуют цепочки водородных связей, которые соединяют фосфаты противоположных цепей через главный желобок, т.е. именно так, как это предсказывают теоретические расчеты [1178, 1179] («нити» в разд. 14.4).

В минорном желобке, вдоль центральной последовательности AATT, находятся высокоупорядоченные молекулы воды, соединяющие O_2-атомы тиминов и N_3-атомы аденинов. Эти два атома, связанные водным мостиком, принадлежат соседним парам оснований, при этом мостик соединяет те основания, которые относятся к разным олигонуклеотидным цепям (рис. 17.8). К этому первому гидратному слою примыкает второй, который заполняет тетраэдрические связи молекул первого слоя и образует вместе с ними характерный водный «хребет» в минорном желобке спирали додекамера. Молекулы воды третьего и четвертого слоев видны не так отчетливо; по-видимому, они образуют водородные связи с фосфатными группами, окаймляющими края минорного желобка. На участках CGCG, фланкирующих центральную последовательность AATT, не обнаружено такой упорядоченной водной структуры, вероятно, из-за того, что присутствующие здесь объемные N_2-аминогруппы, являющиеся донорами при образовании водородных связей, мешают формированию регулярного гидратного «хребта».

Водные мостики между фосфатами противоположных цепей в главном желобке A-ДНК. Анализ кристаллической структуры иодированного тетрамера d(^{I}CCGG) показал, что характер гидратации A-ДНК и B-формы существенно различается [893]. У A-ДНК ни в одном из желобков нет гидратного «хребта» и отсутствует явно выраженная первичная гидратная оболочка сахаров и оснований. Фосфатные группы, однако, гидратированы, причем в отличие от B-ДНК гидратный слой высокоупорядочен.

Вопреки теоретическим расчетам, предполагающим связывание молекул воды одновременно с двумя свободными атомами кислорода фосфатной группы, ни одного примера такого рода не обнаружено [1177–1179]. Тем не менее вдоль каждой цепи тянутся мостики, состоящие из 1–3 молекул воды, которые связывают друг с другом соседние фосфатные группы. Кроме того, имеются цепочки из четырех молекул воды (схематически изображены на рис. 17.8), которые пересекают главный желобок и соединяют $O_{3'}$-атомы одной олигонуклеотидной цепи с O_{P_2}-атомами другой (определение атома O_{P_2} дано на рис. 2.3); при

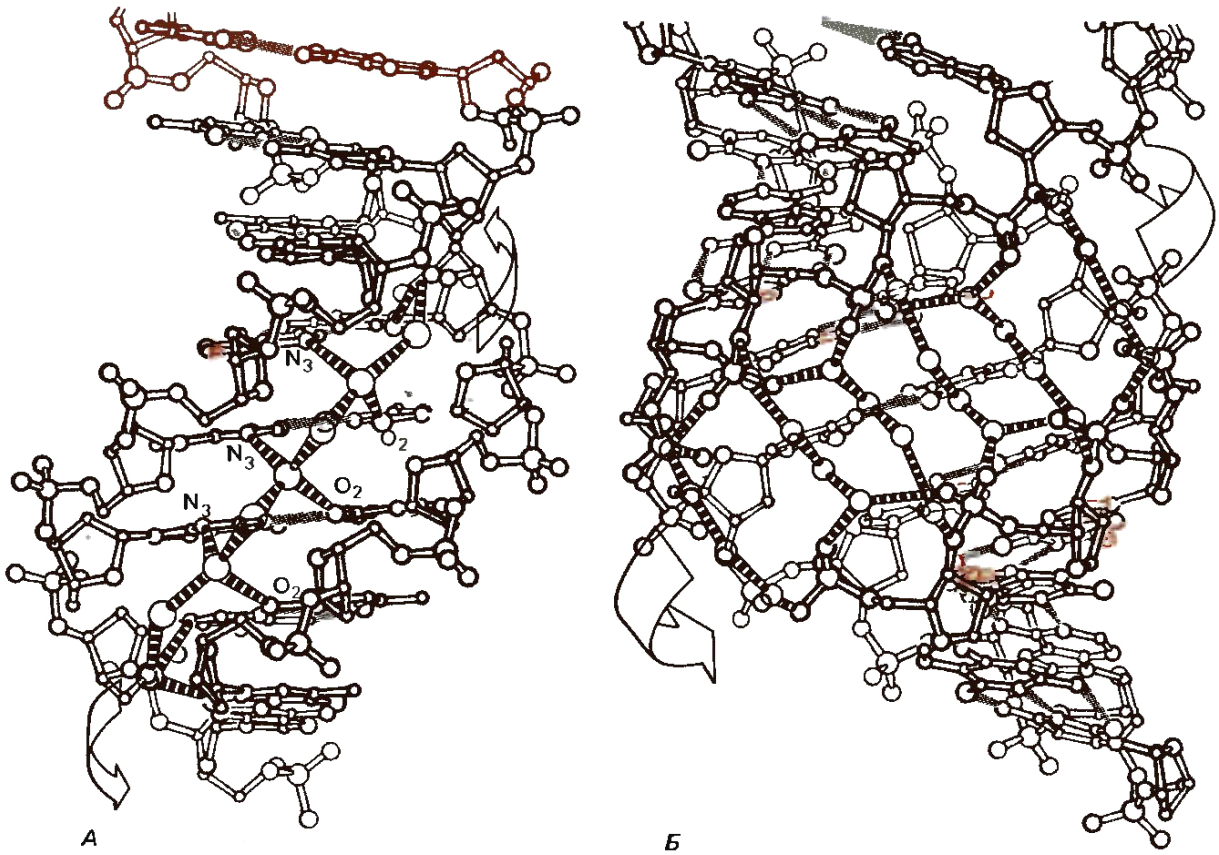


Рис. 17.8. *А.* Расположение молекул воды в минорном желобке на участке AATT додекамера **B**-ДНК [1168]. Первый гидратный слой образует водородные связи с атомами O_2 пиримидинов и N_3 пуринов, второй слой заполняет тетраэдрические координационные оболочки молекул воды первого слоя. *Б.* В А-форме ДНК через главный желобок тянутся «нити» из молекул воды, которые «сшивают» фосфатные группы друг с другом [893].

этом появляется ось симметрии 2-го порядка, связывающая две водные цепи, отходящие от одной фосфатной группы. Легко видеть, что систематически расположенные цепочки молекул воды, соединяющие противоположные фосфатные группы, «сшивают» края главного желобка и тем самым стабилизируют А-форму двойной спирали ДНК (или РНК). Существование таких водных мостиков между фосфатными группами было предсказано ранее на основании теоретических расчетов [1180].

А ↔ В-переходы и гидратация. После экспериментального определения расположения молекул воды в гидратных оболочках стало понятно, почему при изменении активности воды происходят А ↔ В-переходы. В условиях, когда активность воды высока (при низкой концентрации соли), монослоем молекул воды (и слоями более высокого порядка) окружены все функциональные группы фосфатов, оснований и сахаров, что способствует сохранению структуры В-формы. Если полинуклеотид содержит протяженные участки, состоящие из АТ-пар, то в минорном же-

лобке образуется водный хребет, который еще сильнее стабилизирует данную конформацию. Поэтому в случае poly(dA)·poly(dT) перехода B → A не происходит (разд. 11.4), а для poly(dA–dT)·poly(dA–dT) A-форма является лишь метастабильным состоянием. Уместно вспомнить также, что полинуклеотиды, у которых гуанозины замещены на иносины (т.е. у которых отсутствуют N_2-аминогруппы, мешающие образованию водного хребта), ведут себя подобно полимерам, состоящим из AT-пар, т.е. также образуют только двойные спирали B-семейства (табл. 9.1).

При уменьшении активности воды гидратные оболочки оснований и сахаров разрушаются, остаются гидратированными лишь наиболее полярные группы – атомы кислорода фосфатных групп. Такое изменение гидратации индуцирует B → A-переход, при этом A-форму стабилизируют цепочки молекул воды, связывающие атомы кислорода противоположных фосфатов и «стягивающие» края главного желобка. Если снова увеличить активность воды, двойная спираль ДНК станет более гидратированной и произойдет переход A → B.

17.6. ВОДНЫЕ ПЕНТАГОНЫ В КРИСТАЛЛАХ ИНТЕРКАЛЯЦИОННОГО КОМПЛЕКСА ДИНУКЛЕОЗИДФОСФАТА. ОБЩЕЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О ЦИКЛИЧЕСКИХ ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЯХ И «ФЛИП-ФЛОП»-МЕХАНИЗМЕ

Высокоупорядоченная гидратная оболочка комплекса d(CpG) с профлавином. В кристаллической структуре сильно гидратированного интеркаляционного комплекса d(CpG) с профлавином в независимой части ячейки присутствуют 26 молекул воды [1184]. 15 из них связаны друг с другом водородными связями и образуют регулярную структуру из четырех соприкасающихся пятиугольников (пентагонов), ребрами которых являются водородные связи. Кластеры таких пятиугольников, расположенные в соседних элементарных ячейках, связаны между собой одной общей молекулой воды. Пятый пентагон включает лишь 4 молекулы воды; в вершине пятого угла располагается атом кислорода фосфатной группы, связанной водородными связями с двумя молекулами воды (рис. 17.9).

Пятиугольники локализованы вблизи главного желобка и устроены таким образом, что образуют водородные связи через каждые 3,4 Å. Это соответствует хорошо известному расстоянию между основаниями, связанными стэкингом, или между основанием и интеркалятором. Вследствие такой периодичности молекулы воды в главном желобке образуют водородные связи в первую очередь с атомами оснований и с гетероатомами интеркалированной молекулы профлавина. Все эти водородные связи лежат в плоскости оснований (или интеркалятора), как и предсказывалось теоретическими расчетами [1174].

Циклические водородные связи. Общее представление. Такие составленные из водородных связей пятиугольники встречаются и в нерегу-

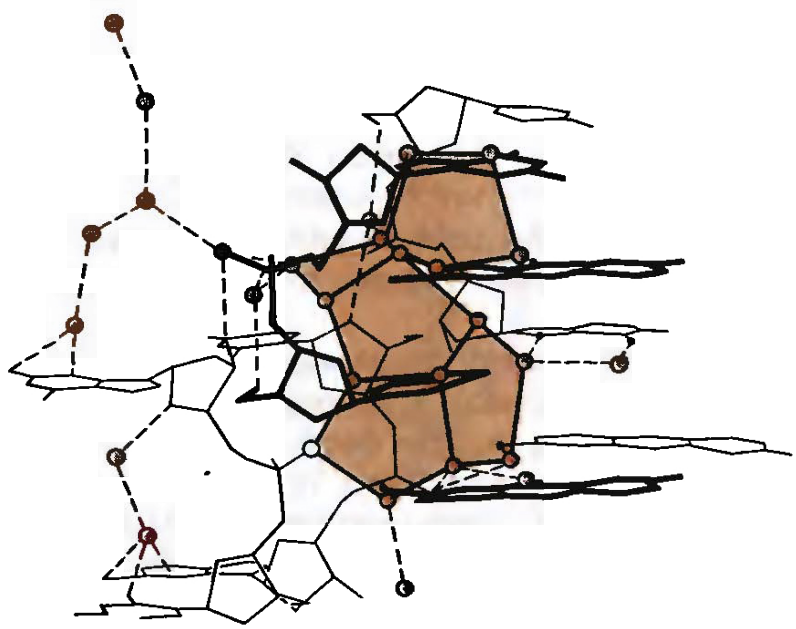


Рис. 17.9. Схематическое изображение кристаллической структуры комплекса d(CpG)·профлавин·$26H_2O$ [1184]. Линиями нарисованы молекулы d(CpG) и профлавина, молекулы воды обозначены цветными кружками. 15 молекул воды и одии атом кислорода фосфатной группы (черный кружок) образуют 5 соприкасающихся пятиугольников (показаны в цвете). Расстояния между молекулами воды в пятиугольниках составляют 2,8–3,1 Å. Пятиугольники связаны водородными связями с гетероатомами профлавина и d(CpG). Локализовать в этих структурах атомы водорода не удается.

лярных структурах, например в гидратированном α-циклодекстрине – олигосахариде, состоящем из 6 соединенных α-1,4-связями молекул глюкозы и содержащем 6 первичных и 12 вторичных гидроксильных групп. Исследования гексагидрата циклодекстрина с помощью дифракции нейтронов и рентгеновских лучей показали, что гидроксильные группы и молекулы воды образуют сложную упорядоченную сеть связей, содержащую четырех-, пяти- и шестичленные циклы и бесконечные цепи, состоящие исключительно из OH-групп [1185, 1186]. Поскольку в этих кристаллических структурах определены положения атомов водорода, а следовательно, и направления водородных связей, было установлено, что водородные связи образуют преимущественно два типа циклических структур (рис. 17.10) – *гомодромные*, когда все водородные связи O—H···O—H···O—H в цикле ориентированы одинаково, и *антидромные*, когда две цепочки водородных связей O—H···O—H···O—H идут от одной молекулы воды в противоположных направлениях и замыкают цикл, образуя связи с одним и тем же атомом кислорода (рис. 17.11). *Гетеродромная* структура, для которой характерна случайная ориентация водородных связей O—H···O, реализуется редко. Квантово-механические расчеты показывают, что *гомодромные* циклы энергетически более выгодны, чем *антидромные*, из-за кооперативного

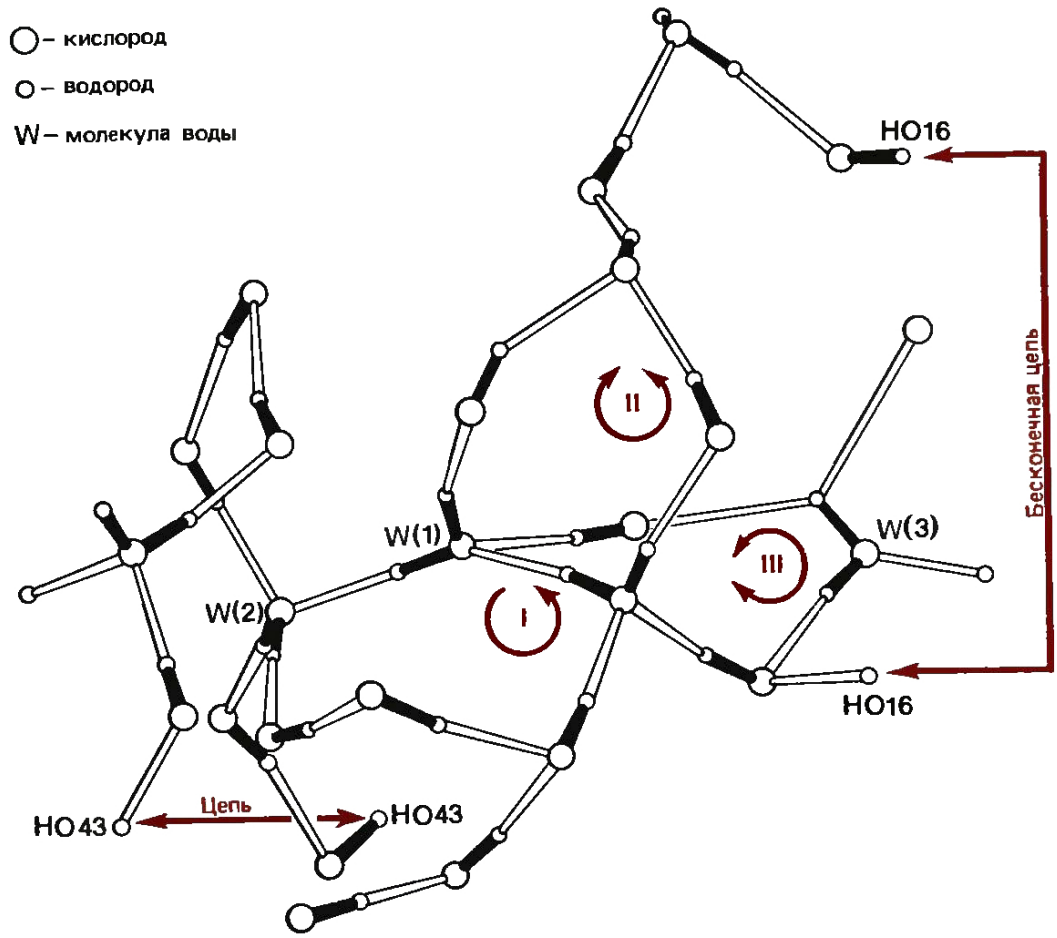


Рис. 17.10. Фрагмент кристаллической структуры α-циклодекстрина·$6H_2O$ с указанием системы водородных связей [1185]. Большими и малыми кружками изображены атомы O и H соответственно. Молекулы воды обозначены буквой W. Обратите внимание, что цикл I является *гомодромным*, циклы II и III – *антидромными* (определение см. на рис. 17.11).

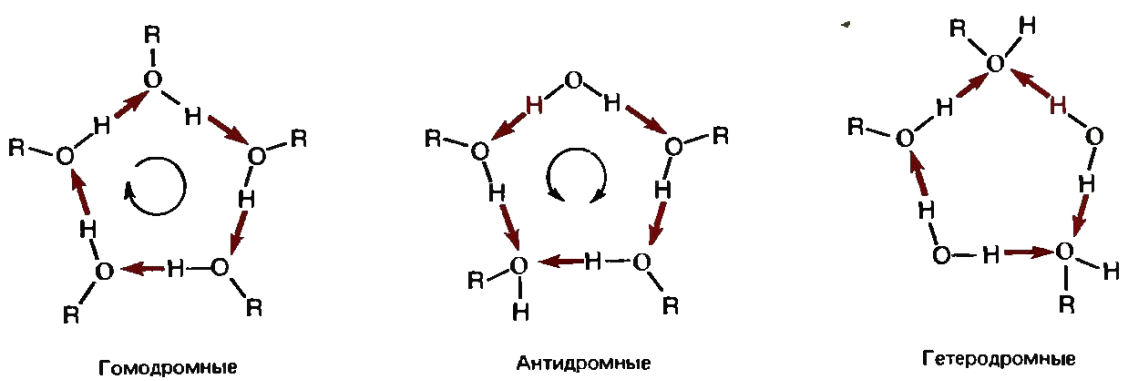


Рис. 17.11. Определение *гомо-*, *анти-* и *гетеродромных* циклических водородных связей [1186]. Водородные связи могут быть ориентированы в одном направлении (*гомодромные*), в двух противоположных направлениях (*антидромные*) и случайным образом (*гетеродромные*).

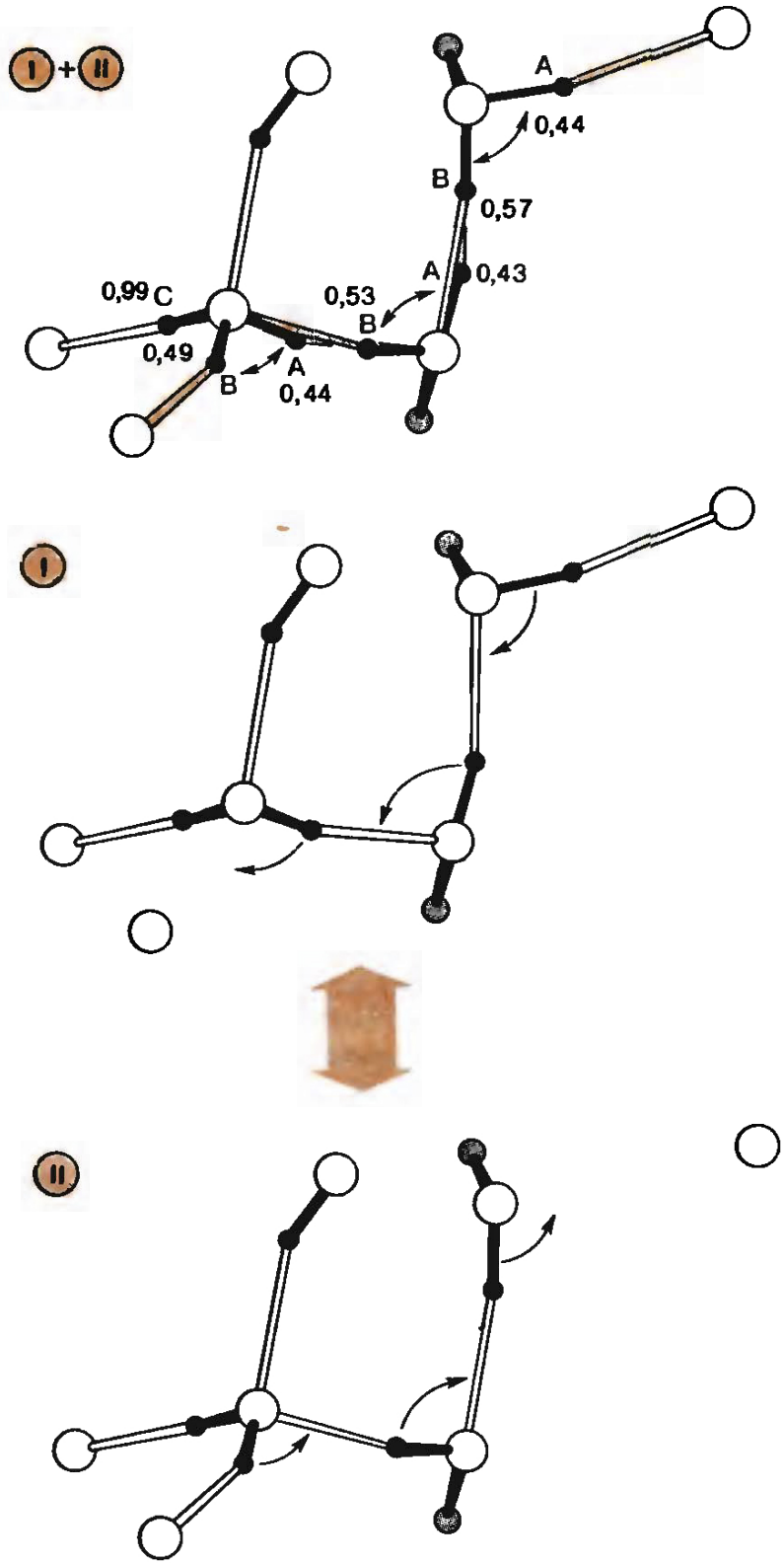


Рис. 17.12. Переориентация водородных связей по механизму «флип-флоп» в кристалле β-циклодекстрина·12H_2O [1188]. Атомы углерода изображены серыми кружками, водорода – малыми черными, кислорода – большими белыми. *Вверху.* Места расположения водородных атомов A и B заселены лишь наполовину, потому что эти атомы водорода входят в систему связей O—H···H—O, способных к переориентации по механизму «флип-флоп». Эта система является суперпозицией двух типов водородных связей – OH···O (средний рисунок) и O···H—O (нижний рисунок). Если какая-то гидроксильная группа повернется так, как это показано двойными стрелками на верхнем рисунке, то остальные гидроксильные группы «флип-флоп»-цепи также должны будут совершить соответствующий поворот.

эффекта, который стабилизирует «бесконечную» цепь гомодромных линейных взаимодействий O—H···O—H···O—H [1187].

По сравнению с клатратами льда структуры, образуемые циклическими водородными связями, менее регулярны; геометрия координационных связей вокруг молекул воды и гидроксильных групп может сильно искажаться. Возможно, первичные и вторичные гидратные оболочки макромолекул состоят именно из структур такого типа, поскольку они геометрически более гибки и не так строго детерминированы, как структура «айсбергов».

Некоторые представления о динамике водородных связей: механизм «флип-флоп» у системы O—H···H—O. С помощью дифракции нейтронов была определена также кристаллическая структура β-циклодекстрина [1188]. Кроме «нормальных» водородных связей O—H···O в структуре этого соединения встречается 19 связей типа O—H···H—O, при этом расстояние O···O остается обычным: 2,8–3,0 Å (рис. 17.12). Таким образом, расстояние H···H оказывается слишком малым (около 1 Å) и два атома водорода не могут одновременно занимать указанные положения, о чем свидетельствует также величина коэффициентов заселенности, равная 0,5. Таким образом, на самом деле мы наблюдаем результат статистического усреднения двух состояний O—H···O⇄O···H—O, и совокупность нескольких таких водородных связей образует системы больших размеров. Если одна из водородных связей перейдет из состояния O—H···O в состояние O···H—O или наоборот (как показано на рис. 17.12), то во всей системе должно будет произойти кооперативное изменение ориентации водородных связей. Такой механизм взаимопревращений цепей O—H···O—H···O—H и H—O···H—O···H—O носит название механизма «флип-флоп». Подобные системы в циклических структурах должны быть более выгодны, чем изолированные O—H···O-связи. Поэтому предполагается, что динамические системы «флип-флоп»-циклов образуют «осциллирующие» гидратные оболочки.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Гидратация нуклеиновых кислот играет важную роль в формировании их структуры и отвечает за A ⇄ B-переходы в ДНК. Вокруг молекулы ДНК образуются две гидратные оболочки. Первая из них, состоящая из ~20 молекул воды на нуклеотид, непроницаема для катионов и по структуре не похожа на лед; вторая оболочка неотличима от обычной воды. Если известна структура, то доступная молекулам растворителя поверхность ДНК или РНК может быть определена расчетным путем. Результаты таких расчетов объясняют некоторые особенности поведения ДНК в растворе и, в частности, показывают, что при сворачивании в двойную спираль молекула ДНК становится более полярной. Рентгеноструктурный анализ монокристаллов олигонуклеотидов показал, что на участках, состоящих из AT-пар, в минорном желобке B-ДНК обра-

зуется «хребет» из молекул воды, связанных водородными связями с основаниями; в А-ДНК образуются водные «нити», которые сшивают фосфатные группы, лежащие на краях главного желобка. Такие различия в структуре гидратных оболочек проливают свет на природу B→ →A-перехода, происходящего при уменьшении содержания воды в ДНК. В кристаллах некоторых циклодекстринов и комплекса d(CpG) с профлавином обнаружены четырех-, пяти- и шестичленные циклические структуры, которые образуют соединенные водородными связями атомы кислорода или O—H-группы. Возможно, такие структуры входят в гидратные оболочки макромолекул. Водородные связи в гидратных оболочках, по-видимому, образуют «флип-флоп»-циклы, для которых характерно динамическое равновесие $O—H\cdots O \rightleftarrows O\cdots H—O$.

ГЛАВА 18

Взаимодействия между белками и нуклеиновыми кислотами

Взаимодействия между белками и нуклеиновыми кислотами осуществляются на всех этапах репликации и экспрессии ДНК, а также в ходе многочисленных процессов регуляции, и, следовательно, их роль чрезвычайно велика. Тем не менее наши знания о механизме таких взаимодействий весьма ограничены. Мы не понимаем, каким образом эндонуклеазы рестрикции присоединяются к ДНК и разрезают ее в специфических местах. Точно так же мы не имеем ясного представления о геометрии узнавания репрессором операторных участков и о том, как аминоацил-тРНК-синтетазы узнают «свои» тРНК. Главная трудность при изучении этих сложных систем состоит в том, что нужно одновременно наблюдать за каждой из взаимодействующих макромолекул. При этом спектроскопические методы, за редким исключением, дают неадекватные результаты, а кристаллизация комплексов белков с нуклеиновыми кислотами сопряжена со многими трудностями. Тем не менее недавно появились публикации, авторам которых удалось получить специфические комплексы белков с ДНК [1189, 1190] и тРНК [1191] в форме, пригодной для рентгеноструктурного анализа. Таким образом, мы можем надеяться, что в ближайшие несколько лет удастся решить проблему нуклеиново-белкового узнавания.

Чтобы упростить процесс изучения столь сложных систем, проводят исследования модельных соединений с применением как теоретических, так и экспериментальных подходов. Главная цель таких исследований – установить специфичность узнавания четырех типов оснований нуклеиновых кислот боковыми группами двадцати аминокислот. При этом используют как мономерные составляющие обоих партнеров, так и полимеры, в некоторых случаях синтетические. Изучается также связывание нуклеотидов (ингибиторов или коферментов) в активных центрах ферментов. Совсем недавно были получены кристаллы нескольких белков, узнающих специфические последовательности ДНК, и определена их пространственная структура. Это, пожалуй, максимум того, что можно сделать, не имея кристаллов специфических ДНК-белковых комплексов. Такие структуры дают представление об общих принципах нуклеиново-белковых взаимодействий, однако последнее слово в конечном счете остается за исследованиями самих комплексов. В этой главе, прежде

чем приступить к обсуждению конкретных фактов, мы рассмотрим общие представления о взаимодействии между белками и нуклеиновыми кислотами и обсудим некоторые гипотезы.

18.1. ОБЩИЕ СООБРАЖЕНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНО НУКЛЕИНОВО-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Если внимательно проанализировать строение боковых групп аминокислот и полипептидного остова (рис. 18.1), то мы увидим, что существуют четыре потенциально возможных типа взаимодействий между белками и нуклеиновыми кислотами [1192–1195] (рис. 18.2).

1. Солевые мостики между фосфатами и положительно заряженными группами аминокислот (N_ζ-аминогруппой лизина, гуанидиновой группой аргинина и протонированным остатком His).

2. Водородные связи между фосфатами, сахарами, основаниями нуклеиновых кислот и пептидными группами или гидрофильными боковыми цепями аминокислотных остатков.

3. Стэкинг-взаимодействия между боковыми группами ароматических аминокислот (Trp, Tyr, Phe, His) и основаниями.

4. Гидрофобные взаимодействия между основаниями нуклеиновых кислот и боковыми группами неполярных аминокислот.

Энергия этих четырех типов взаимодействия в целом уменьшается в том порядке, в каком они здесь перечислены. Поскольку притяжение разноименных зарядов играет основную роль, в табл. 18.1 суммированы данные о распределении заряда в боковых цепях аминокислот и в пептидной группе. Их нужно сопоставить с аналогичными данными для компонентов нуклеиновых кислот, приведенными в табл. 5.1, и тогда можно предсказать некоторые взаимодействия. Однако на самом деле наблюдается более сложная ситуация, поскольку многочисленные слабые взаимодействия могут подавлять специфические взаимодействия типа «заряд-заряд» (разд. 18.6).

Взаимодействия между отдельными компонентами. Если рассмотреть взаимодействие между отдельными аминокислотами и нуклеотидами, то обнаружится, что структуру комплексов определяет не стэкинг и не гидрофобные силы, а притяжение между заряженными группами и водородные связи, которые в наибольшей степени могут обеспечить избирательность взаимодействий. Можно предложить целый ряд гипотетических моделей взаимодействия компонентов нуклеиновых кислот с аминокислотами (рис. 18.2). Получены количественные характеристики связывания оснований с боковыми группами аминокислот [1196–1198] (табл. 18.2), которые согласуются с результатами квантово-механических расчетов (по крайней мере для комплексов гуанина и цитозина с аргинином, глутамином и лизином, образованных при помощи водородных связей [1202]). Оказалось, что эти взаимодействия особенно выгодны в том случае, когда одновременно образуются по крайней мере две водородные связи, что может осуществляться разными способами

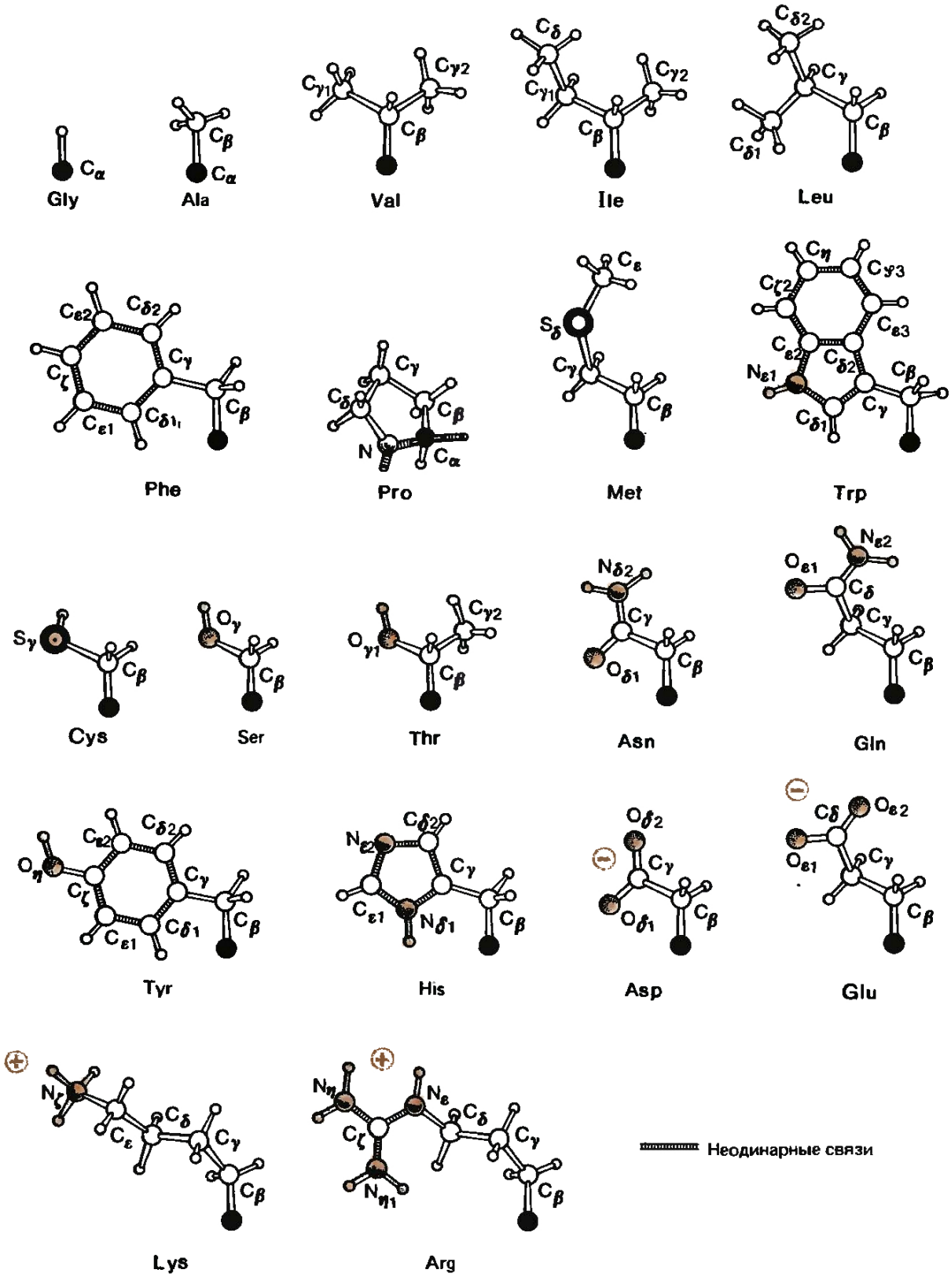


Рис. 18.1. Структура боковых групп 20 аминокислот [1289]. Функциональные группы показаны в цвете, С-атомы углерода изображены в виде черных кружков.

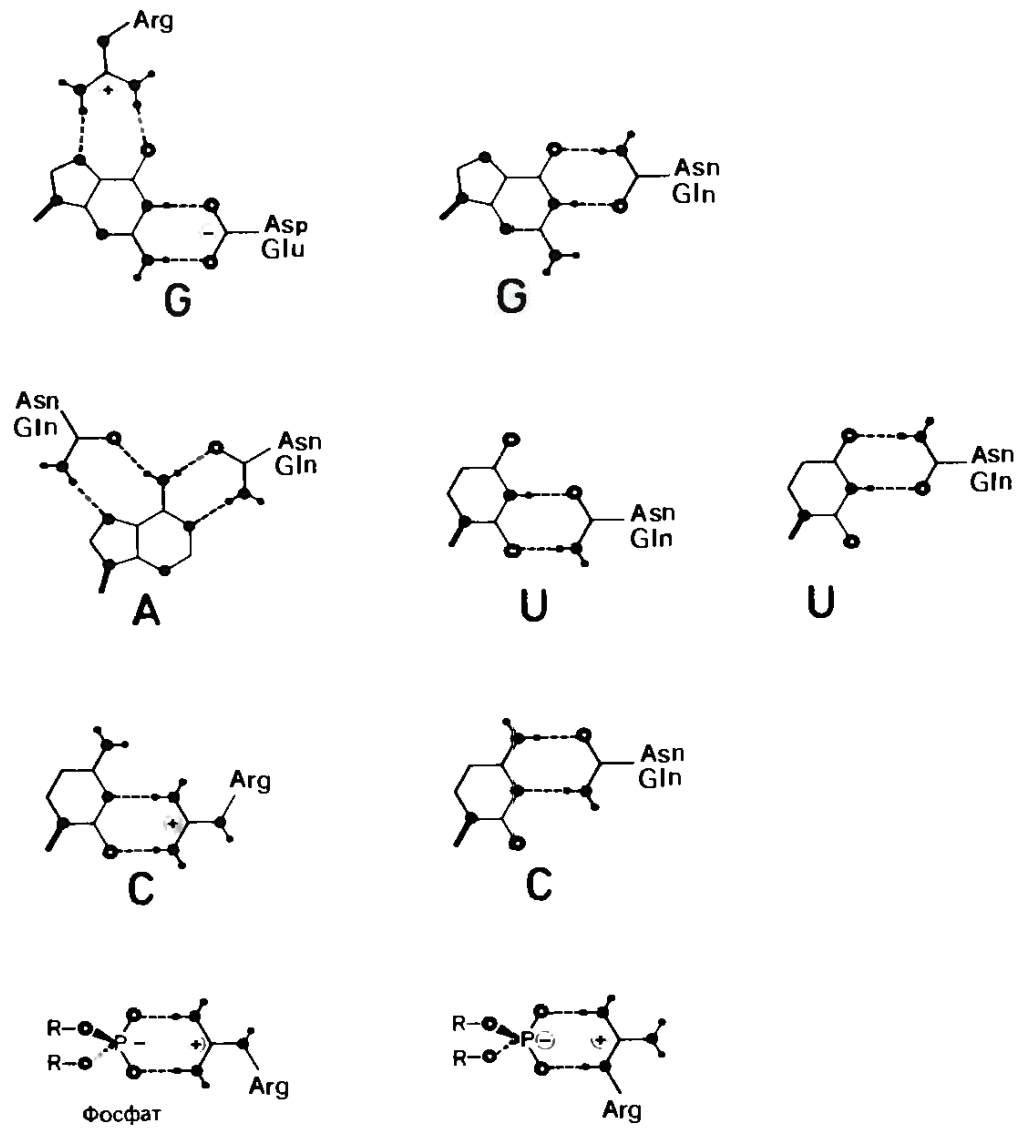
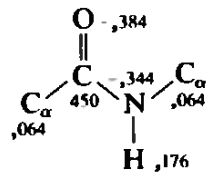
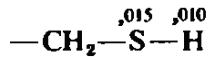
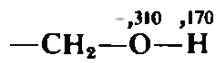
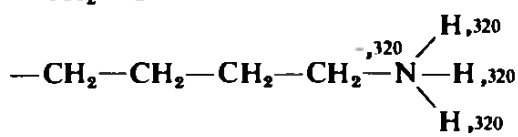
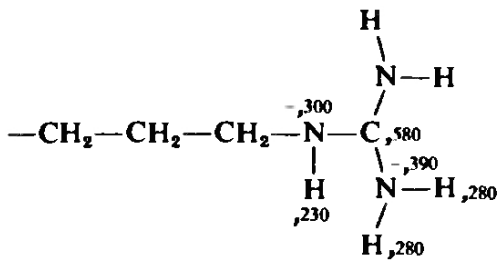
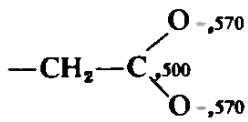
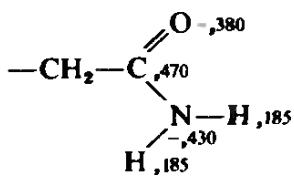
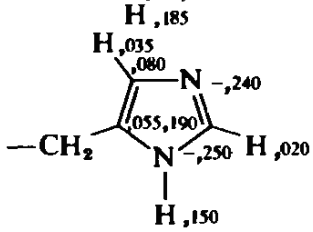
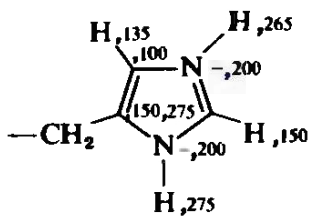
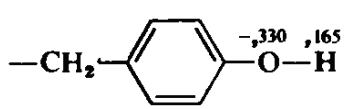
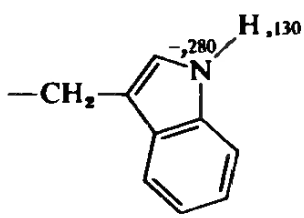


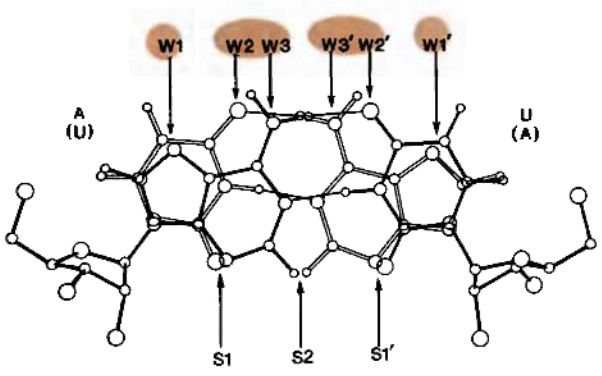
Рис. 18.2. Возможные типы взаимодействий между боковыми цепями аминокислот, основаниями нуклеиновых кислот и фосфатными группами. Если ввести в рассмотрение еще и пептидные группы и допустить одновременное связывание двух аминокислот с одним нуклеотидом, то схемы связывания будут существенно сложнее.

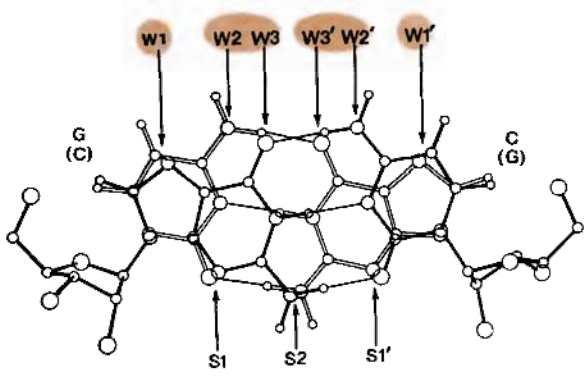
[1203]. Ситуация здесь такая же, как при спаривании оснований (гл. 6): одна водородная связь является слишком слабой и малоспецифичной, чтобы обеспечить системе нужную стабильность.

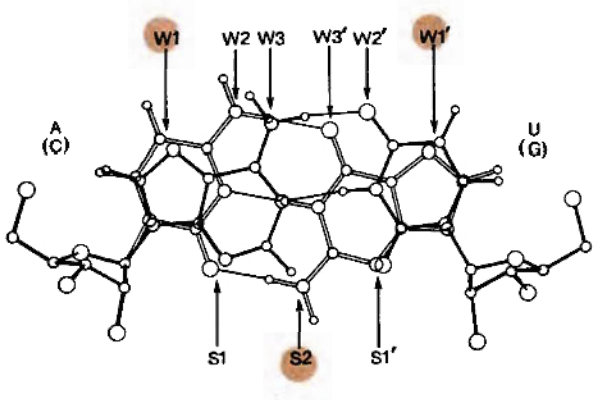
Взаимодействия между уотсон-криковскими парами и боковыми группами аминокислот. Если рассматривать не отдельные основания, а двойные спирали ДНК и РНК, то ситуация меняется, потому что теперь некоторые атомы оснований участвуют в уотсон-криковском спаривании (рис. 18.3). Построение моделей [1204, 1205] и теоретические расчеты [1206] показывают, что в соответствии со сказанным выше специфическое взаимодействие пар оснований в составе двойной спирали с боковыми группами аминокислот (или пептидными группами) подра-

Таблица 18.1. Распределение заряда в пептидной связи и в боковых группах некоторых аминокислот, интересных с точки зрения взаимодействия с нуклеиновыми кислотами. Более полные сведения представлены в работе [1298], откуда взяты приведенные данные

Пептидная связь	
Цистеин	
Серин	
Лизин$^{\oplus}$	
Аргинин$^{\oplus}$	
Аспарагиновая и глутаминовая кислоты$^{\ominus}$	
Аспарагин и глутамин	
Гистидин	
Гистидин$^{\oplus}$	
Тирозин	
Триптофан	


W1
W2 W3
W3′ W2′
W1′
A
(U)
U
(A)
S1
S2
S1′


W1
W2 W3
W3′ W2′
W1′
G
(C)
C
(G)
S1
S2
S1′


W1
W2 W3
W3′ W2′
W1′
A
(C)
U
(G)
S1
S2
S1′

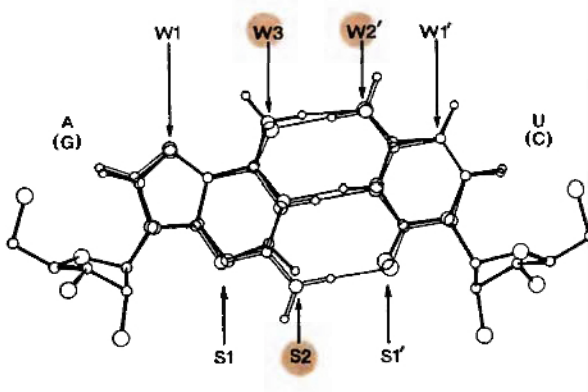

W1
W3
W2′
W1′
A
(G)
U
(C)
S1
S2
S1′

Таблица 18.2. Константы связывания для комплексов между основаниями нуклеиновых кислот и аминокислотами или между соответствующими аналогами

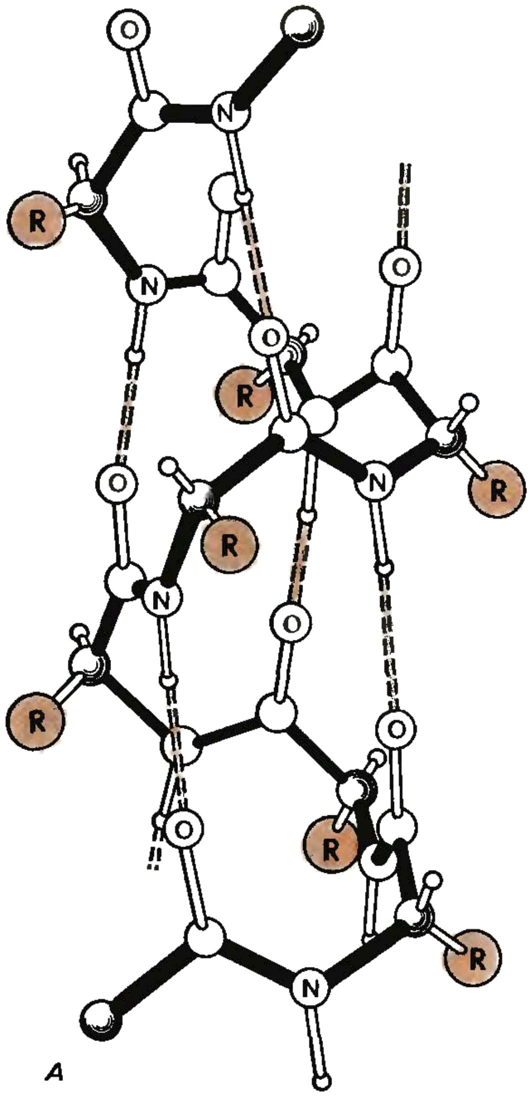
Нуклеозид или основание[1)]	K, л·моль$^{-1}$				
	L-аргинин	L-лизин	L-глутамин	L-глутамат	L-глицин
Тимин	0,6 ± 0,1	—	0,31 ± 0,24	—	—
Цитозин	1,5 ± 0,2	0,63 ± 0,20	0,46 ± 0,21	—	0,27 ± 0,12
Инозин	1,26 ± 0,09	0,04 ± 0,15	1,02 ± 0,18	0,26 ± 0,15	0,12 ± 0,09
Аденозин	1,14 ± 0,08	0,06 ± 0,10	0,78 ± 0,14	—	—
Гуанозин	1,91 ± 0,10	0,85 ± 0,14	1,05 ± 0,15	0,71 ± 0,12	0,51 ± 0,07

Основание[2)]	Аминокислота или аналог	Условия/методы	K, л·моль$^{-1}$	Ссылка
9-этилгуанин	Na-ацетат	DMCO/H_2O, 303 К/ЯМР	110 ± 30	[1197]
9-этиладенин	Масляная кислота	$CHCl_3$, 308 К/ИК	130 ± 30	[1200]
Циклогексил-урацил	Масляная кислота	$CHCl_3$, 308 К/ИК	60 ± 20	[1200]
Циклогексил-урацил	*n*-Крезол (= Тирозин)	$CDCl_3$, 219 К/ЯМР	69 ± 4	[1200]
Диметил-урацил	*n*-Крезол (= Тирозин)	$CDCl_3$, 300 К/ЯМР	6,3 ± 0,2	[1200]
9-этиладенин	*n*-Крезол (= Тирозин)	$CDCl_3$, 303 К/ЯМР	6,32 ± 0,15	[1201]

[1)] Определены по растворимости в водном растворе при нейтральных pH и 25°C [1198].
[2)] Определены спектроскопическими методами для неводных растворителей.

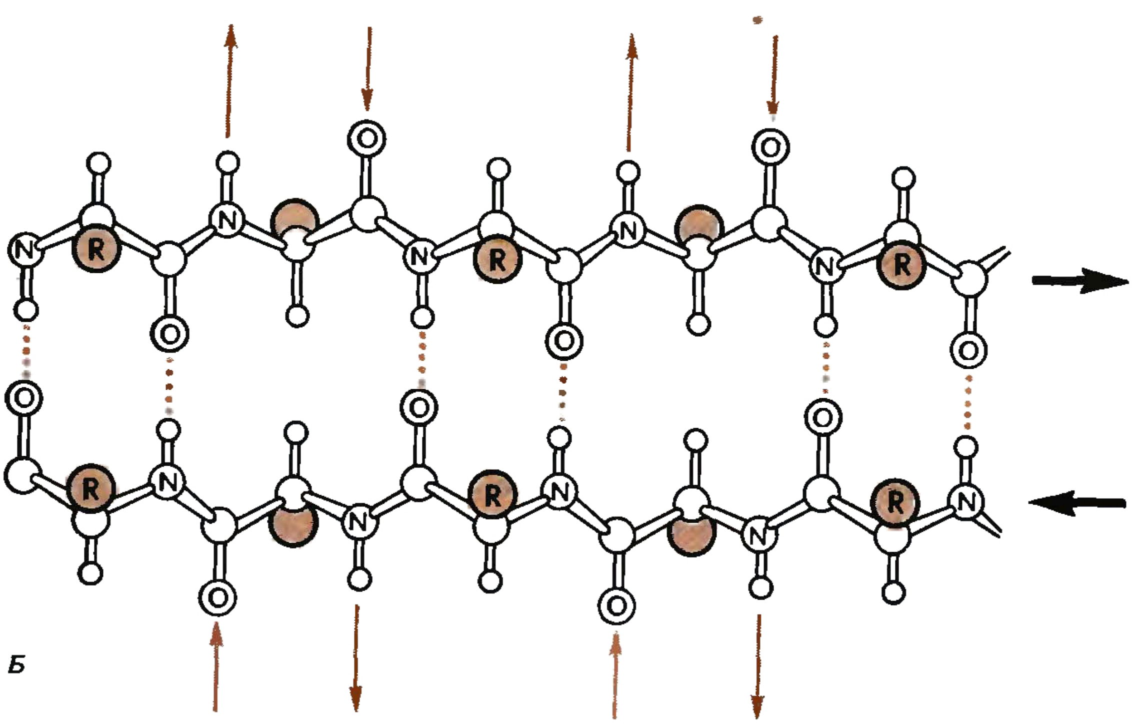
зумевает образование по крайней мере двух водородных связей. В этом смысле со стороны минорного (малого) желобка только гуанин «отличается» от остальных оснований (из-за наличия уникальной группировки N_2H). Главный (широкий) желобок предоставляет больше возможностей для узнавания и поэтому действительно является главным, когда

Рис. 18.3. Различные суперпозиции пар AU и GC, показывающие, как эти пары могли бы различаться при образовании ими водородных связей с другими молекулами [1204]. Верхние буквы у каждого из оснований относятся к паре, изображенной жирными линиями, нижние (в скобках) – к паре, изображенной двойными линиями. Места W в главном (широком, wide) желобке и S в минорном (малом, small) связаны с местами W′ и S′ осью симметрии 2-го порядка, присущей двойным спиралям ДНК и РНК. Эти места выделены цветом в том случае, если при переходе от нижней пары к верхней (или наоборот) меняются донорно-акцепторные характеристики пары, т.е. по этим местам боковые аминокислотные цепи могут различать данные пары.



А

Рис. 18.4. Основные элементы структуры белка. *А*. α-Спираль содержит 3,6 остатка на виток высотой 5,4 Å и стабилизируется водородными связями, параллельными оси спирали. Боковые группы (цветные кружки) выступают из спирали и ориентированы почти радиально. *Б*. В β-структуре (или β-слое) полипептидные цепи располагаются либо параллельно, либо антипараллельно друг другу и соединены водородными связями. Боковые группы аминокислот направлены попеременно то вверх, то вниз. Тонкими цветными стрелками указаны атомы, которые могут образовывать водородные связи с другими молекулами (отсутствующие в α-спирали). Разное направление черных стрелок указывает на антипараллельность цепей β-слоя, изображенного на данном рисунке.



Б

требуется отличить одну комбинацию пар оснований от другой. Минорный желобок в свою очередь может быть основным местом связывания ионов металлов и молекул воды (гл. 8 и 17).

Взаимодействие между двойными спиралями нуклеиновых кислот и антипараллельными β-слоями полипептидов. Анализ кристаллических структур ряда глобулярных белков показал, что антипараллельный β-слой (рис. 18.4), как правило, закручен в правую спираль [1207], кривизна которой очень хорошо согласуется с кривизной поверхности двухцепочечных РНК [837] и ДНК [1208]. При моделировании комплексов этих двух макромолекулярных компонентов сразу становится видно, что β-слой легко укладывается в минорный желобок А-РНК. Структура стабилизируется водородными связями между гидроксильными группами O_2'-H рибозы и карбонильными атомами кислорода пептидных групп, а кроме того, водными мостиками между пептидными NH-группами и атомами кислорода рибозы – O_4' и O_2', причем последний принадлежит предыдущему остатку рибозы. Полярность у связанных друг с другом цепей – 5′ → 3′ у РНК и $NH_2 \rightarrow COO^-$ у полипептида – совпадает, и из-за антипараллельности β-слоя в комплексе сохраняется симметрия 2-го порядка, присущая РНК.

Так как у В-ДНК минорный желобок у́же, чем у А-РНК, сначала предполагалось что β-структура не способна принимать участие в ДНК-белковом узнавании. Оказалось, однако, что можно построить две модели, которые полностью удовлетворяют необходимым стереохимическим требованиям [1208], в предположении, что в минорный желобок не попадают пролины и триптофаны. В одной из этих моделей цепи ДНК и полипептида параллельны (как в описанном выше комплексе с РНК), а в другой антипараллельны. Тем не менее схема образования водородных связей в обеих моделях одинакова, причем она состоит исключительно из связей (пептид) $NH \cdots O_3'$ (нуклеотид) (рис. 18.5).

Комплекс между β-структурой и двойной спиралью В-ДНК образуется, по-видимому, при связывании с ДНК *cro*-репрессора (разд. 18.6); возможно, он играет определенную роль и в узнавании *lac*-репрессором «своего» оператора. Аминокислотная последовательность первых 60 N-концевых остатков (малого N-концевого домена) *lac*-репрессора предполагает преобладание в этом домене β-структуры [1209] (другую интерпретацию см. в работе [1209а]). Однако связывание β-слоя с минорным желобком В-ДНК само по себе не может объяснить обнаруженной высокой специфичности комплекса. На основании данных о связывании двух других пептидных молекул – нетропсина и дистамицина – с АТ-богатыми участками В-ДНК, а также структурных данных была выдвинута гипотеза, в которой предполагается, что, когда β-слой «узнает» специфические последовательности В-ДНК, он становится несимметричным. Две цепи ДНК, как полагают, слегка отличаются друг от друга по своей конформации, что позволяет белку различать АТ- и GC-пары и тем самым узнавать нужную последовательность ДНК при ус-

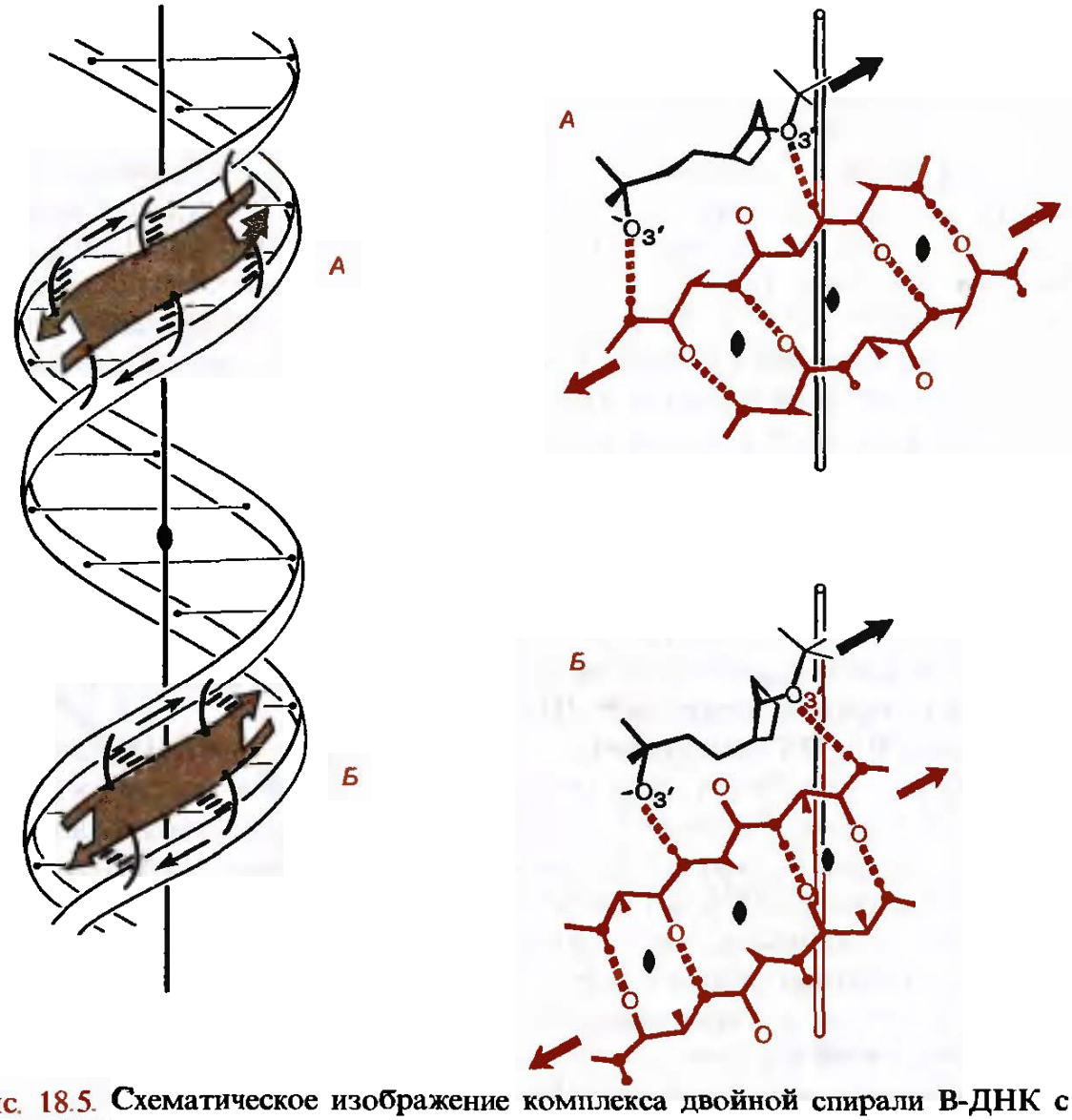


Рис. 18.5. Схематическое изображение комплекса двойной спирали В-ДНК с β-слоем [1208]. Последний располагается в минорном желобке так, что его ось симметрии 2-го порядка совпадает с осью симметрии В-ДНК. *А*. Полярность цепей нуклеиновой кислоты (5′ → 3′) и полипептида ($N \rightarrow COO^-$) различается. *Б*. Полярность цепей совпадает. Справа показана только одна из цепей ДНК; пунктиром обозначены водородные связи.

ловии, что в белковой цепи в определенных положениях находятся соответствующие аминокислотные радикалы [1210].

Взаимодействие между двойными спиралями нуклеиновых кислот и полипептидными α-спиралями. Сравнительно недавно описаны примеры специфического узнавания двойных спиралей РНК и ДНК белковыми α-спиралями; мы будем обсуждать их в разд. 18.6. Детали этого взаимодействия пока не установлены; ясно, однако, что пептидные группы в нем не участвуют, так как все они остаются занятыми в системе водородных связей, стабилизирующих α-спираль (рис. 18.4). В данном случае в стабилизации комплекса, по-видимому, участвуют выступающие из α-спирали боковые группы аминокислот.

Многие комплексы белков с нуклеиновыми кислотами обладают осью симметрии 2-го порядка. Антипараллельный β-слой, взаимодействующий с минорными желобками А-РНК и В-ДНК, обладает собственной осью симметрии 2-го порядка, которая совпадает с осью симметрии двойной спирали нуклеиновой кислоты. α-Спираль такой симметрией не обладает. Тем не менее *пара* антипараллельных α-спиралей уже может удовлетворять требованиям симметрии 2-го порядка. В трех известных случаях (разд. 18.6) белки, связывающиеся с ДНК, были закристаллизованы в виде димеров (как минимум), у которых α-спирали, предположительно взаимодействующие с ДНК в области главного желобка, ориентированы антипараллельно и разнесены на расстояние ~ 30 Å (см. также [1209а]). Если специфическую нуклеотидную последовательность «узнает» α-спираль, то димерная форма белка означает, что эта последовательность должна быть симметричной (палиндромной; см. дополнение 18.1). Для некоторых участков ДНК, связывающихся со специфическими белками (например, для промоторных и операторных участков, а также для участков узнавания рестриктаз и ферментов модификации), это действительно так [1211]. Во всех этих случаях белковые димеры (или тетрамеры) узнают участки двухцепочечных ДНК, обладающие симметрией 2-го порядка, которая относится не только к общей геометрии двойной спирали, но и к нуклеотидной последовательности этого участка. Точная симметрия последовательности и отклонения от нее являются весьма эффективным инструментом для тонкой регулировки взаимодействия.

18.2. МОДЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ИЗ КОМПОНЕНТОВ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Рентгеноструктурный анализ кристаллов модельных комплексов мог бы дать представление о геометрии специфических взаимодействий типа «нуклеотид–аминокислота». Однако, как показывают спектроскопические данные, такие взаимодействия довольно слабы (табл. 18.2). Обычно происходит самоассоциация компонентов, и попытки их сокристаллизации редко приводят к успеху. Примеры удачной сокристаллизации (включая и кристаллизацию ковалентно связанных нуклеопротеинов) можно разбить по типу взаимодействия между компонентами на шесть классов.

Взаимодействия между основаниями и карбоксильными группами аминокислот. В зависимости от типа основания эти взаимодействия затрагивают либо диссоциированные, либо недиссоциированные карбоксильные группы. В случае цитозина происходит протонирование атома N_3, и отрицательно заряженная карбоксильная группа при взаимодействии с цитозином выступает в роли акцептора двух водородных связей, при этом роль доноров играют группы N_4—H и N_3^+—H [1212–1214]. В двух комплексах с 5-бромцитозином основания соединяются друг с другом двумя водородными связями N_4—H$\cdots N_3$, образуя димер, и,

следовательно, атом N_3 не может быть протонирован. В этом случае образуются водородные связи (карбоксил)O—H···O_2(цитозин) с недиссоциированной карбоксильной группой присутствующего в системе производного глутаминовой кислоты [1215, 1216]. Недиссоциированные карбоксильные группы обнаружены в 5-карбокситимидине, где они связываются с группами O_4 и N_3—H тимина [1217], и в нуклеозиддипептиде, у которого концевой карбоксил взаимодействует с группами N_6H и N_7 аденина [1218].

Водородные связи с NH-группой индольного кольца. Индольное кольцо триптофана несет свободную NH-группу, которая в кристаллических комплексах с N_9-замещенными производными аденина образует водородные связи с атомами N_3 [1219, 1220] и N_7 [1221]. В этих кристаллических структурах обнаружен только стэкинг между основаниями, но не между основанием и индольным кольцом. Это удивительно, поскольку разностные УФ-спектры водных растворов указывают на наличие между триптофаном и 5′-фосфатами (особенно AMP и ATP) стэкинг-взаимодействия с «переносом заряда» [1222].

Стэкинг между основаниями и боковыми группами ароматических аминокислот. Будем рассматривать индол как модель боковой цепи триптофана, а тирамин – как модель тирозина. Если модифицировать основания так, чтобы были созданы условия для взаимодействия с переносом заряда, то может возникнуть стэкинг между указанными соединениями и основаниями. Это сделано для 1,9-диметиладенина (несущего положительный заряд), никотинамида и изоаллоксазина [1223–1228] в первую очередь для того, чтобы установить геометрию комплексов, которые, как показано спектроскопическими методами, играют важную роль при связывании апоферментов с коферментами [1229]. В кристаллических структурах этих модельных систем гетероциклические партнеры обычно располагаются параллельно друг другу на расстоянии не более 3,4 Å. Единственный случай, когда наблюдался стэкинг между двумя «природными» компонентами, урацилом и фенилаланином,–это кристаллическая структура нуклеозидпептида 5-[N-(L-фенилаланил)амино]уридина [1230], в которой, кроме того, осуществляются взаимодействия между основанием и пептидной группой.

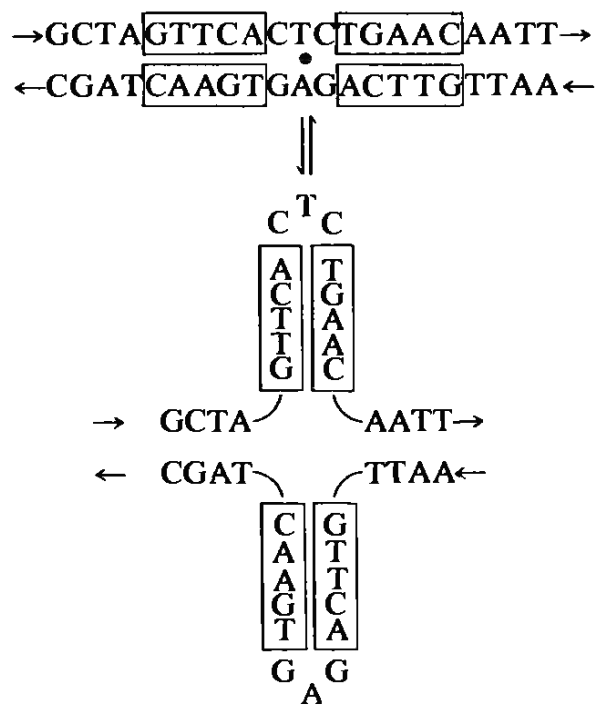
Взаимодействия между основанием и пептидной группой были обнаружены у упомянутого выше нуклеозидпептида [1230] и у другого синтетического соединения – 3-(аденин-9-ил)пропионамида [1230а]. В первом

Дополнение 18.1

Палиндромные последонательности

Вторичная структура тРНК («клеверный лист»), самокомплементарные участки которой могут образовывать шпильки, навела Гирера на мысль, что по-

добные структуры должны образовываться и в двухцепочечной ДНК [1289а]. Для этого в последовательности ДНК должны присутствовать инвертированные, или «палиндромные», повторы. Благодаря наличию у палиндромов собственной симметрии 2-го порядка они могут образовывать либо шпилечные структуры простой крестообразной формы, либо более сложные образования, называемые «гиреровскими деревьями».



• Ось симметрии палиндромных последовательностей

Впоследствии в ДНК часто находили палиндромные последовательности, длина которых в отдельных случаях достигала нескольких тысяч нуклеотидов, что составляет 3% от общей длины молекулы. Такие последовательности способствуют специфическим нуклеиново-белковым взаимодействиям (об этом говорил и Гирер) и, возможно, участвуют в процессах регуляции. Поскольку палиндромы обладают симметрией 2-го порядка, соответствующие белки должны быть как минимум димерами [1292]. Непонятно только, остаются ли палиндромные участки составной частью непрерывной двойной спирали или действительно образуются гиреровские деревья. Этот вопрос особенно интересен в случае сверхспирализованной ДНК (гл. 19), потому что гиреровские образования могут уменьшать кручение и тем самым модифицировать сверхспираль [1293–1295].

Две (или более) ветви гиреровского дерева также связаны операциями симметрии и в принципе могут объединяться, образуя четырехцепочечные спиральные структуры. Стабилизация этих структур может осуществляться путем образования водородных связей между функциональными амино- и кетогруппами уотсон-криковских пар оснований, расположенными со стороны главного желобка. Это приводит к формированию квартетов A—T : T—A и G—C : C—G [1296]. Такие четырехцепочечные структуры до сих пор рассматривались главным образом в теоретических работах; экспериментальные данные по этому поводу отсутствуют, и возможная биологическая роль указанных образований неясна.

случае образуется водородная связь между группой N_3H и атомом кислорода пептидной группы, а концевая аминогруппа фенилаланина NH_2 взаимодействует с атомом O_4 урацила. Во втором аденины спариваются (пара V на рис. 6.1) и между основанием и «пептидом» имеется только одна водородная связь: (амид)$NH\cdots N_3$(аденин). Строго говоря, ни одно из этих соединений не образует аддукта «пептид–основание» с ожидаемой структурой. Однако геометрия комплекса позволяет понять, какие типы структур могут образовываться при узнавании белком основания.

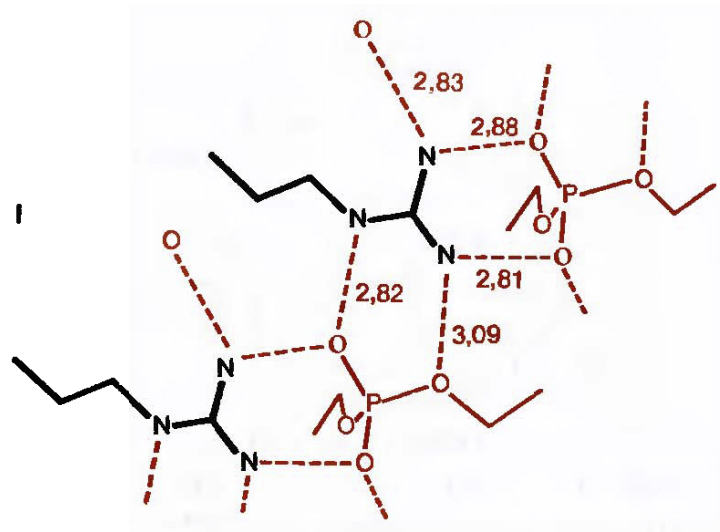
Отсутствие взаимодействий между компонентами нуклеиновых кислот и белков. В нескольких кристаллических структурах ковалентно сшитых нуклеиново-белковых компонентов две составляющие предполагаемого комплекса вообще не взаимодействуют друг с другом [1231, 1232]. Образуется множество водородных связей с соседними молекулами и молекулами воды из гидратной оболочки, но прямые контакты между компонентами нуклеиновых кислот и белков отсутствуют.

Солевые мостики между фосфатами, первичными аминогруппами и гуанидиновыми группами (рис. 18.6). Исследования этого класса взаимодействий проводились на кристаллах фосфата или диэтилфосфата с аргинином, пропилгуанидином и путресцином (1,4-диамино-н-бутаном) [1233–1235]. Последний представляет собой алифатический диамин, который присутствует в клетках прокариот и эукариот в качестве предшественника спермина и спермидина (дополнение 15.1), а в данном случае используется как модель концевой аминогруппы в боковой цепи лизина.

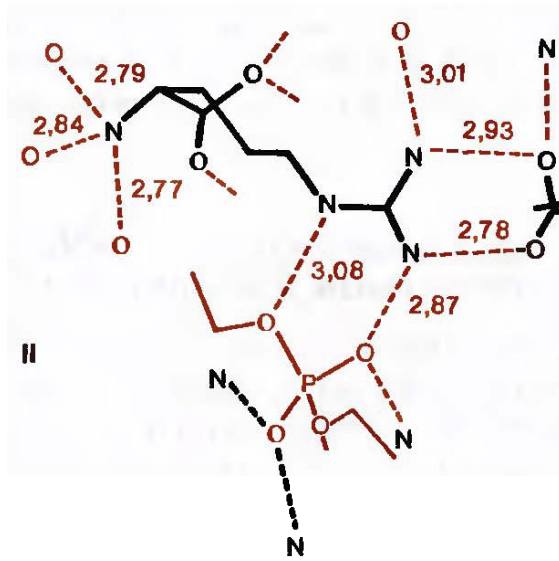
В кристаллах, полученных путем сокристаллизации путресцина с фосфатом [1234] и диэтилфосфатом [1233], каждая концевая аминогруппа образует три почти тетраэдрические водородные связи со свободными атомами кислорода фосфатов (рис. 18.6). Если рассмотреть эти данные применительно к системам, более близким к природным (таким, например, как комплекс полинуклеотида с лизином), то мы можем предположить, что аналогичным образом связывается со свободным атомом кислорода фосфатной группы концевая аминогруппа лизина, образуя при этом вторую связь с эфирным кислородом ближайшего вдоль цепи фосфата. Третья связь N—H остается свободной и может притягивать свободный атом кислорода фосфатной группы другой полинуклеотидной цепи [1233]. Поскольку полилизин сильнее связывается с АТ-богатой В-ДНК [1236], предполагается также, что концевая аминогруппа боковой цепи лизина связывается не только с фосфатными группами, но и с атомами $O_{4'}$, N_3 и O_2 участков ApT или TpA, имеющих конформацию В-спирали. Эти три акцептора водородных связей

Рис. 18.6. Схема водородных связей в комплексах диэтилфосфата с пропилгуанидином (I), аргинином (II) и путресцином (III) [1233]. Водородные связи изображены пунктирными линиями. Указано расстояние $N\cdots O$ в Å.

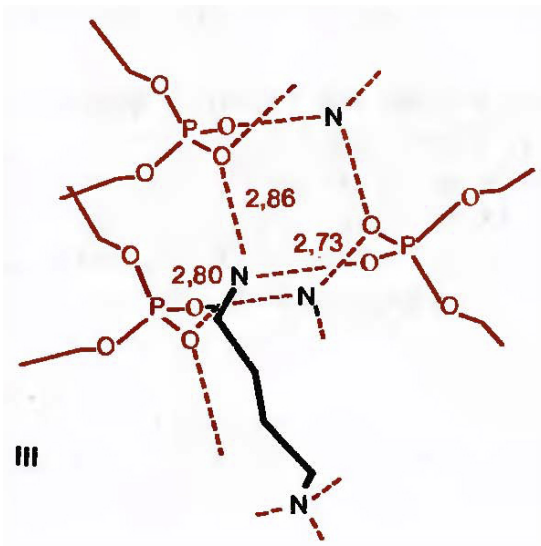
I



II



III



расположены именно так, чтобы могло происходить подобное взаимодействие [1234].

В случае концевой гуанидиновой группы аргинина ситуация оказывается более сложной. В комплексе с фосфатом наблюдаются отдельные взаимодействия типа NH···O [1235], а в комплексе с диэтилфосфатом гуанидиновая группа проявляет бидентатность, образуя водородные связи одновременно с двумя фосфатами (рис. 18.6). Можно ожидать, что в комплексах аргинина с нуклеиновыми кислотами будут преобладать бидентатные (сильные) взаимодействия; было высказано предположение, что гуанидиновая группа может образовывать поперечные сшивки между спиралями ДНК в волокнах комплексов ДНК с полиаргинином и ДНК с протамином [1233].

Все эти исследования нуклеиново-белковых модельных систем показывают, что солевые мостики между аминогруппами лизина или гуанидиновыми группами аргинина и атомами кислорода фосфатных групп довольно прочны. Относительно прочными являются также связи, которые образуются в комплексах «с переносом заряда». Однако для того, чтобы водородные связи, гидрофобные взаимодействия или стэкинг играли роль в нуклеиново-белковых системах, взаимодействие между нуклеотидами и белковой поверхностью или между двойной спиралью и белковым β-слоем или α-спиралью должно носить кооперативный характер.

18.3. МОДЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ИЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИПЕПТИДОВ ИЛИ ПРОТАМИНОВ

Исследование этих систем опирается главным образом на спектроскопический и рентгеноструктурный анализ волокон, и только в одном случае – для комплекса протаминов с тРНК – использовались не волокна, а монокристаллы. Все попытки закристаллизовать комплексы олигомерных нуклеиновых кислот с пептидами до сих пор оказывались безуспешными, поэтому детальные данные о геометрии специфических взаимодействий между этими двумя типами модельных соединений пока отсутствуют (о взаимодействии полиаминов со спиральными участками тРНК см. разд. 15.6).

Полиаргинин и полилизин взаимодействуют с фосфатными группами полинуклеотидов по-разному. Поскольку синтетические гомополимеры, такие, как полиаргинин и полилизин, по своей основности очень похожи на протамины (дополнение 18.2) и гистоны (дополнение 19.1), их часто используют в качестве модельных соединений при изучении взаимодействия между положительно заряженными боковыми группами аминокислот и фосфатными группами полинуклеотидов [1164, 1192, 1195, 1237–1241].

Образование комплекса ДНК с полилизином или полиаргинином – это кооперативный и необратимый процесс [1192, 1239]. Боковые группы полипептидов полностью компенсируют заряд фосфатных групп, что

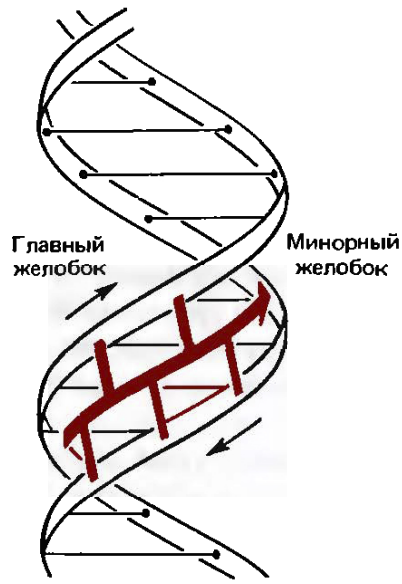


Рис. 18.7. Модель комплекса В-ДНК с протамином, построенная на основании дифракционных данных для волокон [1243]. Полипептид располагается в минорном желобке так, что положительные заряды соседних аминокислотных боковых групп смотрят в разные стороны и нейтрализуют отрицательные заряды фосфатов обеих цепей ДНК.

при соответствующих концентрациях приводит к образованию коацерватов. В случае комплекса ДНК с полилизином наблюдается конденсация стержнеобразных и тороидальных структур, которые будут рассмотрены в разд. 19.1 [1242]. Во всех таких комплексах (даже в комплексах с короткими олигопептидами) температура плавления РНК и ДНК повышается [1239], что указывает на увеличение стабильности двойной спирали из-за экранировки зарядов.

Что касается структуры комплексов, то на основании рентгеновских данных для волокон можно заключить, что полипептид располагается в минорном желобке ДНК в растянутом виде и, чтобы нейтрализовать отрицательный заряд фосфатных групп сразу обеих цепей, направляет свои боковые группы то в одну, то в другую сторону (рис. 18.7) [1239, 1243, 1244].

В комплексах полилизина с ДНК соотношение между молярными концентрациями нуклеотида и лизина равно 1 : 1 [1192, 1239]. Для комплексов с РНК и синтетическими полимерами, такими, как poly(A)·poly(U) и poly(A)·2poly(U), это соотношение равно 3 : 2, а для комплекса poly(I)·poly(C) – 2 : 1 [1239]. Такое различие, по-видимому, обусловлено образованием поперечных сшивок между РНК в комплексе с полилизином и свободными двойными спиралями РНК; образованию таких сшивок должны способствовать наличие дополнительной гидроксильной группы O_2·H и А-конформация.

В комплексе с моно-, олиго- или полиаргинином ДНК остается в В-форме при всех значения относительной влажности – от 0% до насыщения [1238, 1240]. Однако при образовании комплекса с полилизином происходят конформационные изменения двойной спирали ДНК. Природа этих изменений пока до конца не установлена; это может быть и переход в А-, и переход в С-форму [1238, 1245, 1246], и образование

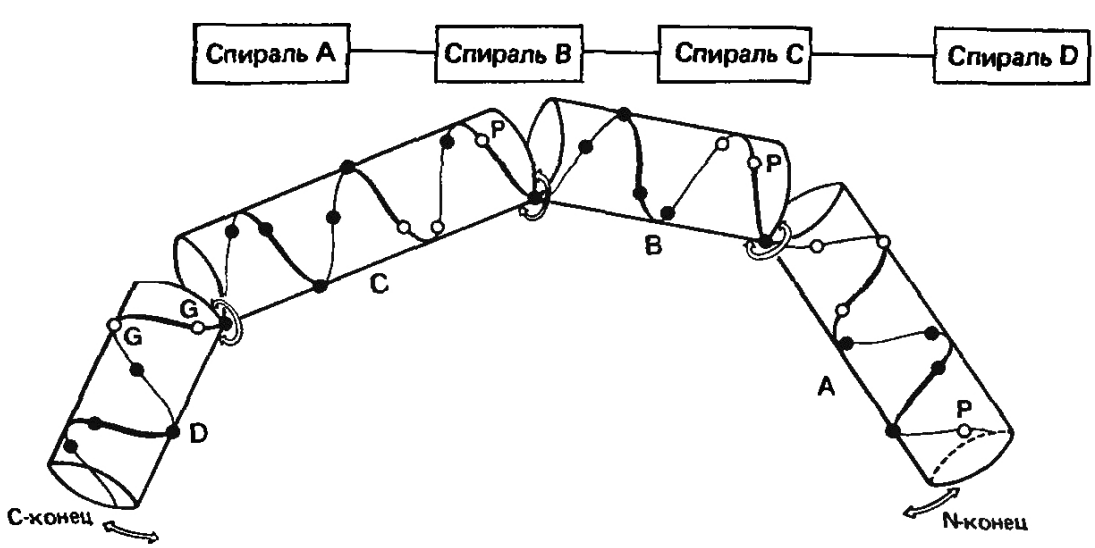
Дополнение 18.2

Олигоаргинины в аминокислотной последовательности протаминов

Протамины – это небольшие белки с мол. массой около 4200. Из-за наличия большого числа аргининовых остатков они проявляют высокую основность и очень прочно связываются с ДНК и РНК. В аминокислотной последовательности протаминов аргинины собраны в кластеры длиной от четырех до шести остатков; при этом пролиновые остатки располагаются в таких положениях, что разбивают последовательность на почти правильные интервалы. Это позволяет предположить, что вторичная структура протаминов состоит из четырех α-спиралей.

В приведениой ниже таблице известиые последовательности протаминов представлены таким образом, чтобы положения большинства аргининов (обозначенных символом «+») совпадали. Использованы следующие сокращения: A – аланин, E – глутаминовая кислота, G – глицин, I – изолейцин, P – пролин, Q – глутамин, S – серин, T – треонин, V – валин, Y – тирозин. Предполагается, что протамины имеют вторичную структуру, показанную внизу, т. е. состоят из четырех α-спиралей, соединенных подвижными шарнирами. Аргинины обозначены черными точками, пролины и глицины – буквами P и G (из [1252]).

Сальмин	AI	P + + + + S S S +	P V + + + + +	P + V S + + + + + +	G G + + + +
Иридин	I(A)	P + + + + S S S +	P V + + + + +	P + + V S + + + + + +	G G + + + +
Иридин	I(B)	P + + + + + + S S S +	P I + + + + +	P + + V S + + + + +	G G + + + +
Иридин	II	P + + + + S S S +	P V + + + +	A + + V S + + + + + +	G G + + + +
Тиннин	Y1	P + + + + E A S +	P V + + + + +	Y + + S T A A + + + + +	V V + + + +
Тиннин	Y2	P + + + + Q A S +	P V + + + + +	Y + + S T A A + + + + +	V V + + + +
Тиннин	Z1	P + + + + + S S +	P V + + + + +	Y + + S T V A + + + + +	V V + + + +
Тиннин	Z2	P + + + + + S S +	P V + + + + +	Y + + S T A A + + + + +	V V + + + +
Клупин	Z	P + + + + S + + A S +	P V + + + +	P + + V S + + + +	A + + + +
Клупин	YI	A + + + + S S S +	P I + + + +	P + + + T T + + + +	A G + + + +
Клупин	YII	P + + + T + + A S +	P V + + + +	P + + V S + + + +	A + + + +



искаженной B-формы [1241]. Аналогичное поведение ДНК наблюдается и в случае комплекса с полигистидином [1247].

Почему полиаргинин и полилизин по-разному влияют на структурные свойства ДНК в комплексе? Возможно, дело в том, что комплексы фосфатов с концевыми амино- и гуанидиновыми группами имеют разную геометрию (см. разд. 18.2) и что аргинин связывается с ДНК сильнее, чем лизин; это согласуется также с результатами, полученными методом равновесного диализа [1248].

Взаимодействие ДНК и одноцепочечных полинуклеотидов с боковыми группами ароматических аминокислот. Гипотеза «книжной закладки». Для этих систем имеются только спектроскопические и гидродинамические данные. Чтобы оценить возможность взаимодействия боковых групп ароматических аминокислот основных пептидов (гистонов, протаминов) с двойной спиралью ДНК, изучали комплексы двух- и одноцепочечных полинуклеотидов с модельными ди- и трипептидами, у которых одна ароматическая аминокислота присоединена (у дипептидов) или с двух сторон окружена (у трипептидов) остатками аргинина или лизина [1195, 1249–1251]. В связывании с одноцепочечными полинуклеотидами в основном участвуют заряженные концевые группы пептидов и боковая цепь ароматической аминокислоты, которая вступает в стэкинг-взаимодействие с основаниями. В случае poly(A) константы связывания уменьшаются в следующем ряду: триптофан, тирозин, фенилаланин [1250].

Двойные спирали ДНК при образовании комплексов с боковыми группами ароматических аминокислот проявляют определенную специфичность. Быстрое и сильное электростатическое связывание ($K_{св} \sim \sim 10^5$ моль·л$^{-1}$) сопровождается медленной и слабой ($K_{св} \sim \sim 10^2$ моль·л$^{-1}$) интеркаляцией ароматической боковой цепи между парами оснований [1251а]. Так как ароматический остаток проникает между парами лишь частично, он действует как своего рода клин и создает изгиб в двойной спирали [1195, 1251] (рис. 18.8). Такая «закладка» чаще располагается между AT-парами, для которых, как отмечалось в гл. 6, характерен менее сильный стэкинг, чем для GC-пар. Для пептидов ряда Lys—X-амид, где X – разные ароматические остатки, наблюдается и специфичность другого типа – специфичность к виду остатка X, которая возрастает в ряду триптофан, фенилаланин, тирозин, лейцин [1251].

В описанных комплексах существенно повышается температура плавления одно- и двухцепочечных полинуклеотидов [1195, 1249–1251]. Этот неожиданный результат (по крайней мере для двухцепочечных ДНК), вероятно, означает, что энергетические потери, связанные с образованием излома, который должен понижать T_m, с избытком компенсируются выигрышем в энергии, обусловленным взаимодействиями типа «заряд–заряд» между фосфатами и положительно заряженными боковыми группами аминокислот.

Взаимодействие между двойной спиралью и α-спиралью в комплексе тРНК с протаминами. Когда протамин AI из спермы лосося, который

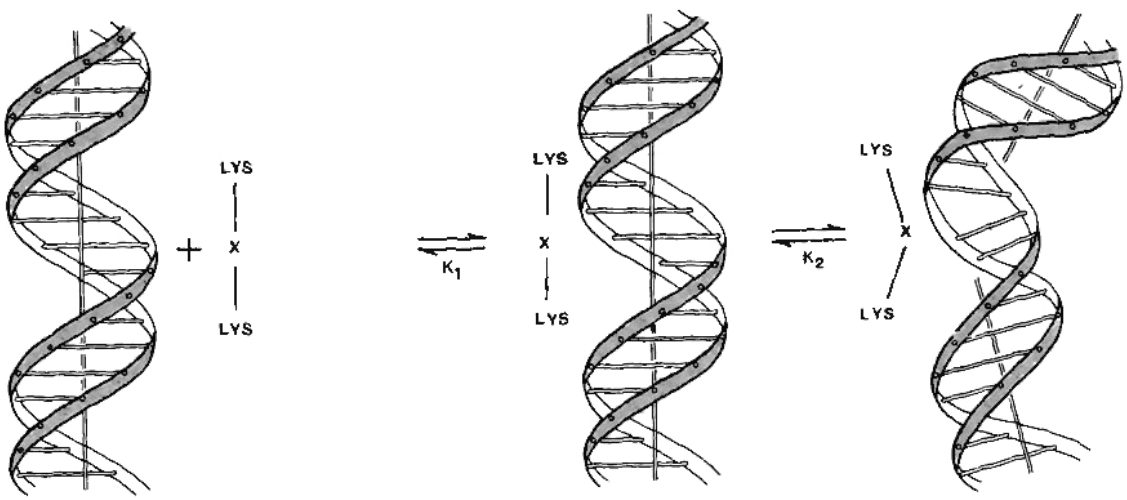


Рис. 18.8. Схематическое изображение взаимодействия трипептидов Lys—X—Lys (X – ароматическая аминокислота) с двухцепочечной ДНК [1195]. Первая стадия – быстрое связывание по периферии молекулы ДНК – стабилизируется силами электростатического притяжения. Затем следует медленная частичная интеркаляция боковой цепи аминокислоты X между парами оснований (модель «книжной закладки»), приводящая к появлению изгиба в молекуле ДНК.

представляет собой смесь полипептидов со средней мол. массой 4200 (состоящих главным образом из остатков лизина и аргинина; дополнение 18.2), ввели методом диффузии раствора в орторомбические кристаллы дрожжевой $тРНК^{Phe}$, оказалось, что он оседает в нишах, образованных минорными желобками соседних молекул тРНК [1252]. Общая структура протамина в комплексе не похожа на вытянутое изображение молекулы, показанное на рис. 18.7, а скорее напоминает α-спираль. Если принять, что последовательность протамина AI характерна для большинства протаминов из спермы лосося, то наиболее удивительным свойством протамина является присутствие в каждом из четырех составляющих его участков по 4–6 аргининовых остатков подряд. Из распределения электронной плотности для комплекса тРНК с протамином можно заключить, что протамин образует четыре короткие α-спирали, состоящие из аргининовых остатков, которые соединены короткими пептидами, содержащими другие аминокислоты.

По периферии коротких α-спиральных участков протамина располагаются гуанидиновые группы аргинина, которые взаимодействуют с фосфатами тРНК. Исходя из геометрии этого комплекса была предложена модель взаимодействия протаминов с ДНК, согласно которой α-спирали протамина располагаются в главном желобке ДНК; однако нельзя исключить и возможности расположения протаминов в минорном желобке. Такое предположение было высказано ранее на основании результатов рентгеноструктурного анализа волокон [1243, 1244]. Поскольку боковые группы аргинина сильно вытянуты, могут образовываться поперечные сшивки между соседними молекулами ДНК. Это согласуется с той картиной, которая наблюдается на электронных микрофотографиях нуклеопротаминов, где видна сетка из связанных молекул ДНК [1253]. Однако правильность такого предположения была поставлена под сомнение [1254] и предложена другая интерпретация электронных микрофотографий – вокруг гребнеобразного или звездообразного протамина обвивается ДНК в сверхспиральной форме. Сейчас трудно судить, какая из моделей более адекватна; по-видимому, эту дилемму можно решить только с получением новых данных. В любом случае нужно иметь в виду, что взаимодействие α-спирали с двойной спиралью, обнаруженное в комплексе протамина с тРНК, вероятно, имеет место и при взаимодействии белков с ДНК (разд. 18.6).

18.4. ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С БЕЛКАМИ НУКЛЕОТИДЫ И ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ПРИОБРЕТАЮТ ВЫТЯНУТУЮ КОНФИГУРАЦИЮ

Как было показано в предыдущих главах, нуклеотиды в виде мономерных единиц или в составе полинуклеотидной цепи со спиральной упорядоченной конфигурацией имеют «жесткую стандартную» геометрию со следующими характеристиками:

· основание находится относительно сахара в *анти*-ориентации, т. е.

угол вращения вокруг гликозидной связи $C_{1'}$—N лежит в интервале $-90° \leqslant \chi \leqslant -160°$;
- конформация сахара—$C_{2'}$-*эндо* или $C_{3'}$-*эндо*;
- торсионный угол γ, описывающий поворот вокруг связи $C_{4'}$—$C_{5'}$, как правило, лежит в области $+ск$ ($\sim 60°$);
- углы вращения β и ε вокруг связей С—О лежат в области *транс* ($\sim 180°$);
- у правоспиральных полинуклеотидов углы вращения α и ζ вокруг связей Р—О лежат в области $-ск$ ($\sim 300°$).

Все эти структурные особенности в целом сохраняются и тогда, когда двойные спирали ДНК и РНК взаимодействуют с полипептидами, а также при конденсации ДНК в присутствии определенных реагентов или гистонов (гл. 19). Однако ситуация меняется, если с белками связываются мононуклеотиды или одноцепочечные неспиральные полинуклеотиды.

При связывании с активными центрами белков нуклеотиды принимают вытянутую, «открытую» конфигурацию. Когда нуклеотид связывается с активным центром белка, его стандартная структура более или менее сохраняется, за исключением одной важной детали—угол вращения γ вокруг связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ меняется от значений $+ск$ до значений $-ск$ или *ап*, что отвечает повороту атома $O_{5'}$ и присоединенного к нему фосфата *от* фуранозного кольца. Такой поворот «раскрывает» нуклеотид, в результате сахар, основание и фосфатная группа становятся экспонированными, что облегчает взаимное узнавание и связывание нуклеотида и белка.

В табл. 18.3 описаны конформации нуклеотидов в составе комплексов их с белками, определенные кристаллографическими методами. Лишь в двух случаях угол γ лежит в обычном диапазоне $+ск$: у комплекса GDP с фактором элонгации Tu [1261] и у комплекса никотинамид-риботидного элемента NAD^+ с глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназой омара [1256]. Кроме того, в последнем случае аденин в двух субъединицах из четырех («зеленые» субъединицы в табл. 18.3) находится в *син*-ориентации, тогда как в остальных молекулах NAD^+, указанных в табл. 18.3,—в *анти*.

В *син*-ориентации, по-видимому, находится также центральное основание триплета, связанного с субъединицей вируса табачной мозаики [1266, 1267]. Примечательно, что все 8-бромаденозиновые производные, представленные в табл. 18.3, находятся в *анти*-ориентации, несмотря на то что 8-бром-замещение усиливает тенденцию пуринового кольца пребывать в *син*-ориентации (разд. 4.7). Это означает, что энергия связывания достаточно велика, чтобы компенсировать стерически невыгодные эффекты, связанные с *анти*-ориентацией. Тот же фактор, по-видимому, начинает действовать и в том случае, когда принимает необычные значения угол γ.

18.5. ПРИРОДА НУКЛЕОТИДНО-БЕЛКОВОГО И НУКЛЕИНОВО-БЕЛКОВОГО УЗНАВАНИЯ

Для большинства комплексов, представленных в табл. 18.3, геометрия компонентов определена достаточно хорошо, поэтому можно выделить детали, связанные с их взаимным узнаванием. Однако необходимо помнить, что для белковых структур (в том числе и для тех, которые рассматриваются здесь) разрешение обычно не превышает 2–3 Å, а следовательно, такие тонкие детали структуры, как водородные атомы, не выявляются. Тем не менее полученной информации в целом достаточно для того, чтобы воссоздать картину образования нуклеиново-белковых комплексов, отражающую все наиболее интересные структурные особенности. Как мы увидим далее, нуклеотидно-белковые взаимодействия определяются двумя главными факторами: общей топологией партнеров и – более детально – взаимодействиями между нуклеотидом и атомами остова и боковыми группами белка.

Общая топология нуклеотид-связывающих белков. Домен Россмана. Для ряда белков, которые связываются с нуклеотидными коферментами (NAD^+, NADPH) или нуклеозидди- и трифосфатами, характерна определенная топологическая укладка α-спиралей и β-цепей в области, где происходит связывание нуклеотидов. Нуклеотид-связывающий домен построен из шести цепей параллельного β-слоя и четырех соединяющих их α-спиралей; структура обладает примерной псевдосимметрией 2-го порядка (рис. 18.9, 18.10). Основываясь на сравнительном анализе холоферментных комплексов NAD-зависимых дегидрогеназ, Россман и его коллеги высказали предположение об эволюционном консерватизме по крайней мере четырех центральных цепей β-слоя и связанных с ними α-спиралей, т. е. доменной структуры $\beta\alpha\beta\cdot\beta\alpha\beta$ или $(\beta\alpha\beta)_2$ [1269, 1270]. Динуклеотид NAD^+ при связывании располагается около оси 2-го порядка, при этом с каждым βαβ-доменом связывается один нуклеотид.

Впоследствии аналогичные βαβ-домены были обнаружены также у ряда других белков, связывающих нуклеотиды (рис. 18.10), и таким образом возникло представление об общей топологии цепи, предназначенной специально для «узнавания» нуклеотидов. При этом, по существу, имеется в виду следующее: для формирования нуклеотид-связывающего центра нужна, во-первых, особая общая пространственная геометрия и, во-вторых, для обеспечения специфичности связывания с этой геометрией должно быть сопряжено определенное расположение некоторых аминокислотных остатков.

Нуклеотидно-белковые взаимодействия непостоянны и многофункциональны. Беглый просмотр табл. 18.4 и рис. 18.11 и 18.12 (где приведены более подробные схемы для нескольких известных нуклеотидно-белковых комплексов) показывает, что нет никаких предопределенных , исключительных и специфических видов взаимодействий между основанием и аминокислотными боковыми цепями. Скорее имеется целая палитра возможностей. Тем не менее при детальном рассмотрении некоторых примеров выявляются и общие тенденции.

Таблица 18.3.

Конформация нуклеотидов в комплексах с белками

Белок	Нуклеотид[1]		Торсионные углы, град					Конформация сахара	Ссылка
			α	β	γ	ζ[2]	χ[3]		
Лактатдегидрогеназа	5′-AMP			177	178		− 91	C_3-*эндо*	[1255]
Лактатдегидрогеназа	ADP		165	168	− 168		− 92	C_3-*эндо*	[1255]
Лактатдегидрогеназа	NAD^+	A	103	− 176	− 72	156	− 96	C_3-*эндо*	[1255]
		N	109	178	− 87	37	− 90	C_3-*эндо*	
Лактатдегидрогеназа	NAD^+-пируват	A	109	− 156	− 78	156	− 91	C_3-*эндо*	
		N	87	− 171	− 53	49	− 74	C_3-*эндо*	[1255]
Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа	NAD^+								
	«зеленая» субъединица	A	+ *ак*	+ *ак*	*an*	*an*	*син*	C_3-*эндо*	
		N	+ *ск*	+ *ак*	+ *ск*	*ак* −	*син*	C_2-*эндо*	[1256]
	«красная» субъединица	A	+ *ак*	*an*	− *ск*	*an*	*анти*	C_2-*эндо*	
		N	+ *ск*	*ск*	+ *ск*	+ *ак*	*син*	C_2-*эндо*	
Малатдегидрогеназа	NAD^+, субъединица 1								
		A	58	− 167	− 78	− 166	− 70	C_3-*эндо*	[1257]
		N	147	160	− 40	88	− 48	C_2-*эндо*	
Алкогольдегидрогеназа печени	ADP-рибоза	A	175	167	159	39	− 102	C_3-*эндо*	
		R	51	152	154	112	—		[1258]
Алкогольдегидрогеназа печени	8-Br-ADP-рибоза	A	165	167	171	39	− 80	C_2-*эндо*	
		R	51	152	154	112	—		[1258]
Дигидрофолатредуктаза	NADPH	A	77	122	161	− 112	− 93	C_3-*эндо*	
		N	− 74	− 156	− 68	− 74	− 39	C_2-*эндо*	[1259]

Белок	Нуклеотид[1]	Торсионные углы, град					Конформация сахара	Ссылка
		α	β	γ	ζ[2]	χ[3]		
Тирозил-тРНК–синтетаза	Тирозил-5′-аденилат	170	140	− *ск*	30	*анти*	C_3′-*экзо*	[1260]
Фактор элонгации Tu	GDP	60	160	+ *ск*		*анти*	C_3′-*эндо*	[1261]
Гексокиназа	Комплекс кобальта с 8-Br-ATP			*ап*		*анти*	C_2′-*эндо*	[1262]
Панкреатическая рибонуклеаза S	UpcA (уридилил-3′,5′-5′-метиленаденозин) U	—	—	—	+ *ак*	*анти*	C_3′-*эндо*	
	A	+ *ск*	*ап*	*ап*	—	*анти*	C_3′-*эндо*	[1263]
Панкреатическая рибонуклеаза S	Cp(2′,5′)A (цитидилил-2′,5′-аденозин) C			270		− 107	C_3′-*эндо*	[1264]
	A	− 42	173	153	121	− 82	C_3′-*эндо*	
Стафилококковая нуклеаза	pdTp (дезокситимидин-3′,5′-дифосфат)			*ап*		*анти*	C_2′-*эндо*	[1265]
Вирус табачной мозаики[4]	РНК (три нуклеотида на субъединицу белка) 1	145	220	170	70	− 70	C_2′-*эндо*	
	2	40	185	195	275	− 10	C_2′-*эндо*	[1266]
	3	150	135	270	290	− 75	C_2′-*эндо*	

[1] A, C, N, R – аденозин, цитидин, никотинамидрибоза, рибоза.

[2] У NAD^+, NADPH и ADP ζ – это торсионный угол O_5′—P—O—P.

[3] Чтобы получить соответствие с нашей номенклатурой, из значений χ, приведенных в соответствующих работах и отвечающи торсионному углу O_4′—C_1′—N—C (8 или 6), мы вычли 180°.

[4] У всех трех рибоз δ = 135°, торсионные углы ε равны 250° (1); 210° (2); 210° (3). В недавно опубликованной работе [1267] дл всех трех нуклеотидов приводится конформация сахара C_3′-*эндо*.

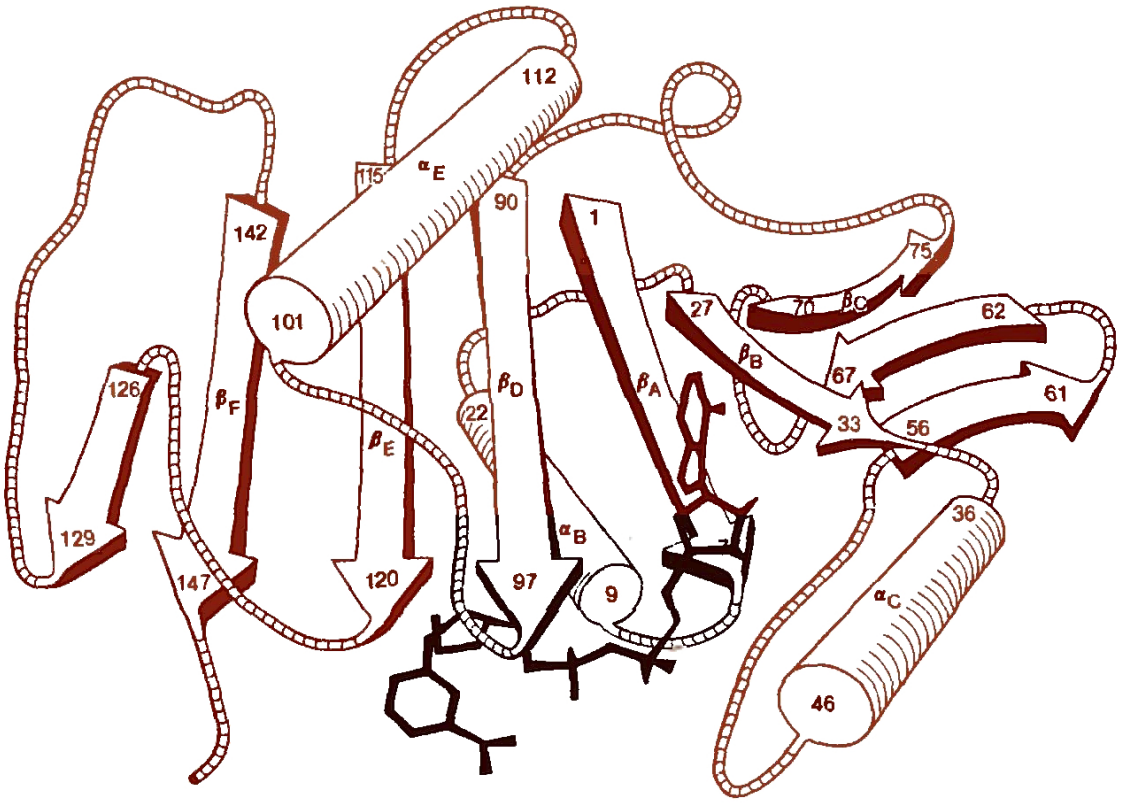


Рис. 18.9. Структура NAD^+-связывающего домена в глицеральдегидфосфат-дегидрогеназе [1271]. Сложный ход белковой цепи представлен схематически: β-структура изображена в виде стрелок, идущих от N-конца к С-концу, α-спирали – в виде цилиндров. Номера на стрелках и цилиндрах соответствуют номерам аминокислот в последовательности белка (еще более схематичное описание структуры дано на рис. 18.10). Обратите внимание, что NAD^+ связывается в «россмановском» домене, βxβxβ, где x обозначает либо α-спираль, либо β-цепь; при этом аденозин-5′-фосфат взаимодействует с элементами β_A, α_B и β_B, а никотинамидрибозо-5′-фосфат – с элементами β_D, α_E и β_E.

Специфические и неспецифические «гидрофобные карманы». NADPH связывается с дигидрофолатредуктазой – ферментом, катализирующим NADPH-зависимое восстановление дигидрофолатов в тетрадигидрофолаты. Примечательно, что при связывании аденин располагается в гидрофобном кармане и не образует ни одной водородной связи (табл. 18.4). Хотя между аденином и His64 имеет место стэкинг-взаимодействие, его нельзя считать специфическим, поскольку His64 не является инвариантным остатком в этом классе ферментов. В противоположность этому O_2'-фосфат NADPH образует водородные связи с остатками Thr63, His64 и Arg43, причем последний инвариантен во всех дигидрофолатредуктазах и таким образом обеспечивает как общее, так и специфическое связывание. Пирофосфат и никотинамидрибоза взаимодействуют с пептидными группами основной цепи, а кроме того, образуют водородные связи с боковыми группами и участвуют в электростатическом взаимодействии, особенно с Arg44. Важную роль

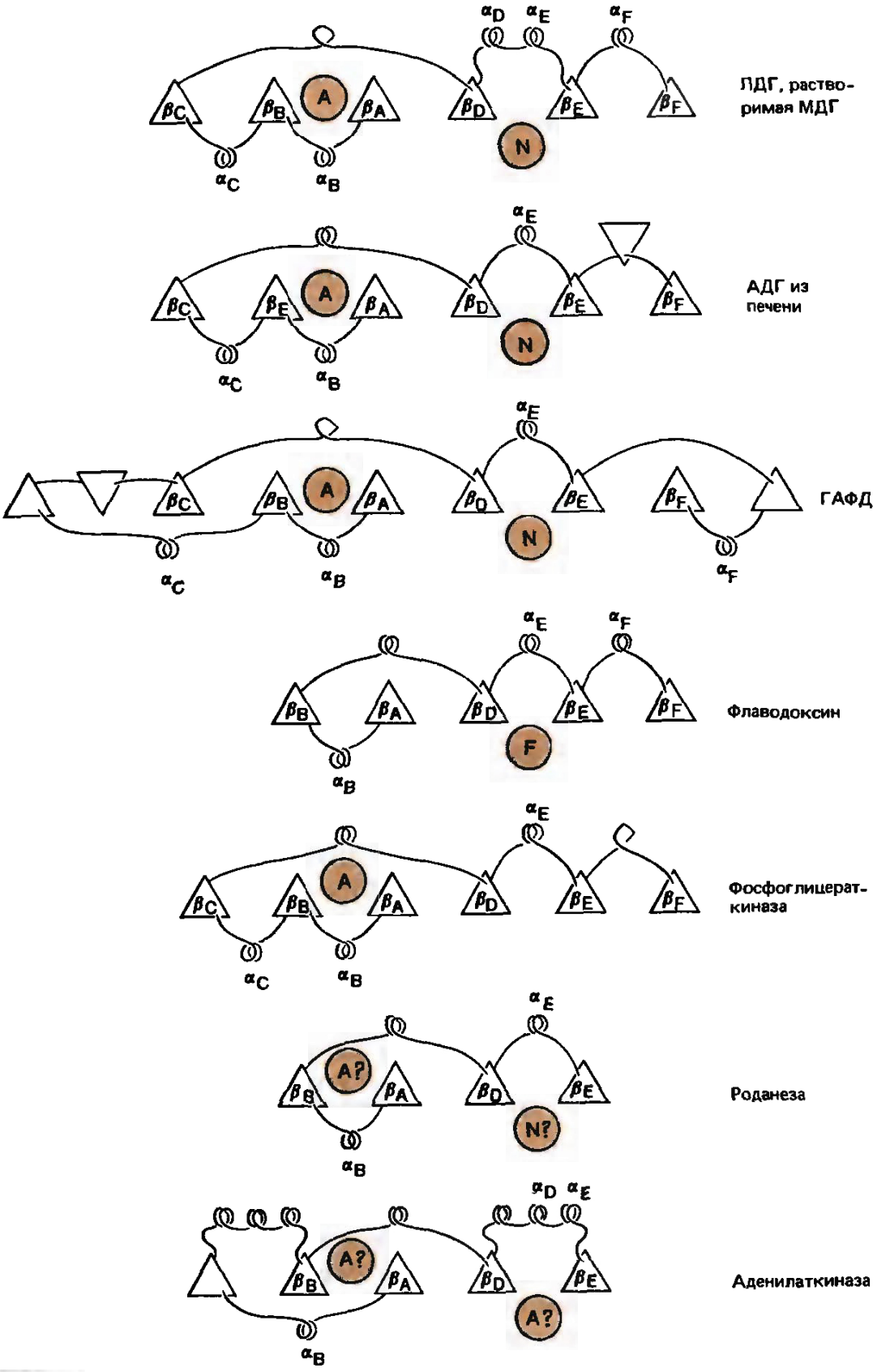


Рис. 18.10. Схематическое изображение нуклеотид-связывающих доменов в различных белках [1270]. α-Спирали и элементы β-структуры изображены в виде кружков и треугольников соответственно. Буквами N и A обозначены никотинамидриботид и аденозин-5′-фосфат. ЛДГ – лактатдегидрогеназа, МДГ – малатдегидрогеназа, АДГ – алкогольдегидрогеназа печени, ГАФД – глицеральдегид-3-фосфат – дегидрогеназа. Во всех перечисленных случаях нуклеотид связывается с доменами βαβ.

Таблица 18.4. Описание взаимодействия нуклеотид–белок для двух комплексов, структура которых определена с высоким разрешением[1)]

Нуклеотидная группа	Связывание посредством		
	солевого мостика	водородной связи	гидрофобного взаимодействия
Дигидрофолатредуктаза в комплексе с NADPH [1259]			
Аденин			Leu62, His64, Thr63, Ile102, His77, Asp78
Аденин-2′-моно-нуклеотидрибоза	Arg43 (фосфат)	Thr63 (фосфат) His64 (фосфат) Glu101 ($O_{3'}$)	Ile102, Gly42
Пирофосфат	Arg44	NH-Thr63, NH-Ala100, Thr45, Thr126	Gly99
Никотинамидмоно-нуклеотидрибоза		CO-Gly17 ($O_{2'}$), CO-His ($O_{3'}$), Ser48 ($O_{2'}$)	Ile13, Gly14
Никотинамнд		NH-Ala6 (O_7), CO-Ala6 (N_7) CO-Ile13 (N_7)	Trp5, AIa6, Ile13, Leu19, Trp21, CO-Ala97
Рибонуклеаза S *в комплексе с Cp(2′,5′)A* [1263]			
Цитидин		Thr45 (N_3)	Thr45, Phe120
Рибоза		Lys41 (O_4), His119 ($O_{5'}$)	
Фосфат		Gln11 (O), His12 (O), NH-Phe120 (O)	Phe120, His119
Аденин		Glu111 (N_1), Cln69 (N_6), Asn71 (N_6)	Glu111, Ala109
Рибоза		His119 ($O_{4'}$)	His119

[1)] Боковые группы белков обозначены как Thr64, Ile102 и т.д., пептидные карбонильные группы – как CO-Gly17 и т.д., пептидные амидные группы – как NH-Ala6 и т.д. Группы, участвующие в образоваиии солевых мостиков, и акцепторы или доноры водородных связей со стороиы нуклеотида указаны в круглых скобках [например, ($O_{3'}$), (фосфат)].

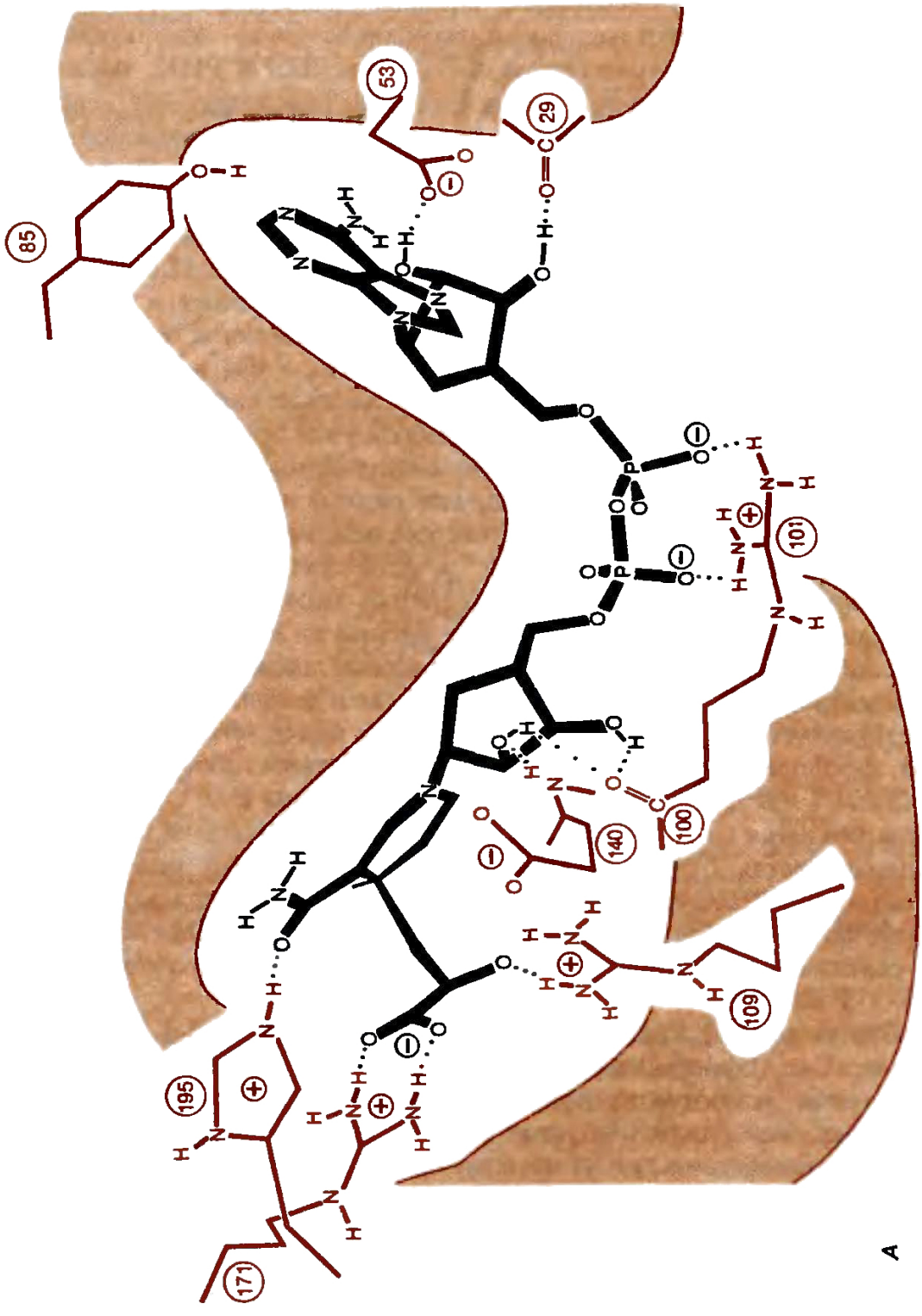
играют инвариантные остатки Gly42 и Gly99, которые, по-видимому, отвечают за соответствие кофермента белковой матрице,– их замена на аминокислоты с более объемными боковыми группами привела бы к стерическим затруднениям при связывании. В отличие от аденинового кармана область связывания никотинамида более специфична – амидные группы главной цепи «узнают» 3-карбоксамидную группу никотинамидного кольца. Следует заметить, что совсем иной характер носит связывание с NAD-зависимыми дегидрогеназами, которые узнают никотинамидный остаток главным образом благодаря его взаимодействию с боковыми цепями белка [1271].

Сильное связывание фосфатов и неспецифическая гидрофобная впадина в стафилококковой нуклеазе. Хорошо изучены еще две нуклеотидно-бел-

ковые системы – комплекс между цитидилил-2′,5′-аденозином [Cp(2′, 5′)A] и панкреатической рибонуклеазой S [1264] и тройной комплекс Ca^{2+}-дезокситимидин-3′,5′-дифосфат (pdTp)·стафилококковая нуклеаза [1265]. В последнем комплексе, который схематически изображен на рис. 18.12, pdTp действует как ингибитор, а Ca^{2+} – как активатор нуклеазы, которая гидролизует связь $O_{5'}$–P в ДНК и РНК, высвобождая нуклеотид или фрагмент нуклеиновой кислоты со свободной $O_{5'}$H-группой. Ингибитор хорошо «закреплен» в активном центре с помощью водородной связи между гидроксильной группой фенольного кольца Tyr85 и 3′-фосфатом. Между 5′-фосфатом и остатками Arg87 и Arg35 образуются солевые мостики с бидентатными водородными связями, аналогичные тем, которые показаны на рис. 18.6. Кроме того, 5′-фосфат связан с ионом Ca^{2+}, который расположен в центре октаэдрического комплекса и образует координационные связи с Asp40, Asp21, с карбонильной группой основной цепи Val41 и с двумя молекулами воды. Такое довольно сильное и жесткое связывание двух фосфатных групп не должно распространяться на основание и рибозу, потому что фермент не специфичен ни к виду основания, ни к типу сахара (РНК или ДНК). Действительно, мы видим, что тиминовый остаток располагается в узкой гидрофобной впадине на поверхности нуклеазы, а все контакты между белком и специфическими нуклеотидными атомами – $O_{2'}$, $O_{4'}$, N_3H – осуществляются через водные мостики, т.е. по-видимому, фермент «узнает» все четыре вида оснований.

Слабое связывание фосфата и узнавание пиримидиновых оснований панкреатической РНКазой S. РНКаза S, как и стафилококковая нуклеаза, представляет собой «5′-гидролазу»; тем не менее механизмы расщепления фосфодиэфирной связи этими ферментами совершенно разные. РНКазе S для функционирования не нужны ионы Ca^{2+}, но необходима гидроксильная группа $O_{2'}$H, потому что промежуточным продуктом реакции является 2′,3′-O,O-циклофосфат; следовательно, она гидролизует только цепи РНК. Кроме того, РНКаза расщепляет только те связи, которые расположены после пиримидиновых нуклеотидов, т.е. в результате реакции высвобождаются фрагменты РНК с 3′-концевыми пиримидин-3′-фосфатами.

В цитидилил-2′,5′-аденозине [Cp(2′,5′)A] и уридилил-3′,5′-метиленаденозине (UpcA) фосфодиэфирные связи модифицированы, и поэтому эти соединения являются ингибиторами РНКазы S. В противоположность сильному связыванию фосфатов в стафилококковой нуклеазе, в РНКазе эти взаимодействия довольно слабы; они затрагивают остатки His12, His119 и Gln11 (табл. 18.4). Аденин, хотя и не является специфическим для этого фермента основанием, связывается с ним; при этом образуются водородные связи с N_6-аминогруппой и атомом N_1. Что касается пиримидиновых оснований, то они располагаются в пиримидин-связывающем участке в немного различающихся ориентациях; пептидная NH-группа Thr45 образует водородную связь с O_2-атомом UpcA, но не с атомом O_2 Cp(2′, 5′)A (здесь расстояние $N\cdots O_2$ равно пример-



А

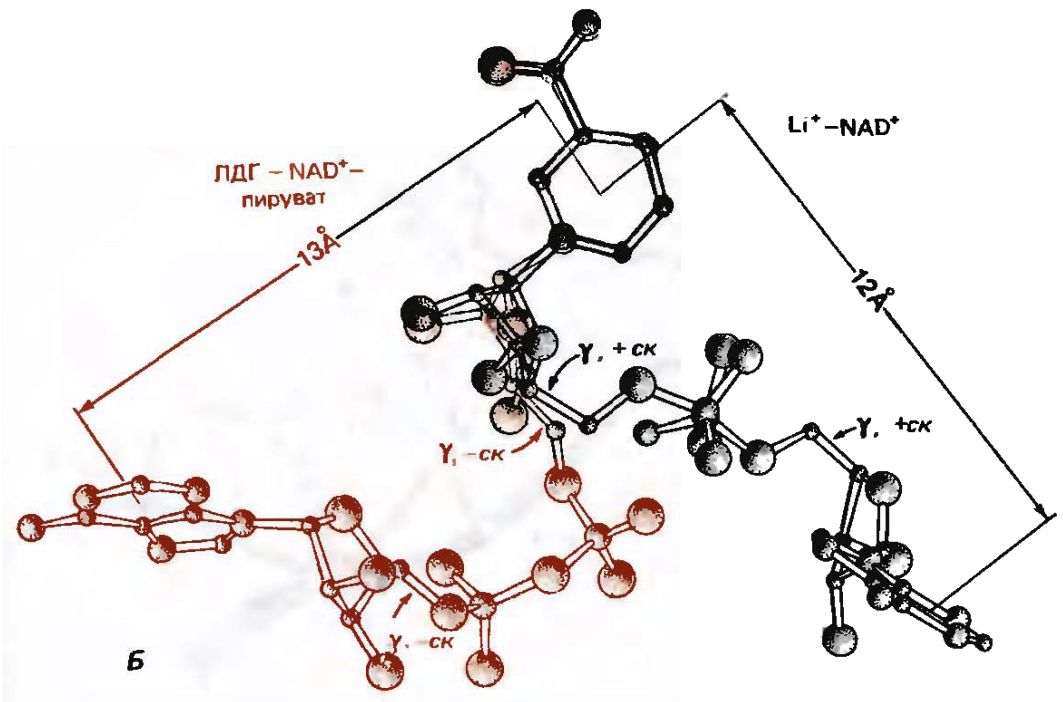


Рис. 18.11. *А.* Схема связывания кофермента в тройном комплексе лактатдегидрогеназа – NAD^+ – пируват [1255]. Обратите внимание на вытянутую конфигурацию NAD^+ – пирувата и солевые мостики между фосфатом и Arg101 и между пируватом и Arg171. Аденин размещен в гидрофобном кармане и не образует водородных связей с белковыми группировками, тогда как атом кислорода карбоксамидной группы никотинамида образует связь с His195. Все O_2·H- и O_3·H-группы остатков рибозы также участвуют во взаимодействии с белком, образуя водородные связи с амидными группами основной цепи и боковой группой Asp53. *Б.* Сравнение конформации NAD^+ в активном центре лактатдегидрогеназы (в цвете) и в кристаллическом комплексе с ионами Li^+. Ориентация молекул выбрана так, чтобы никотинамидные остатки совместились друг с другом. При такой ориентации видно, что в обеих структурах никотинамид и аденин почти перпендикулярны друг другу и разнесены на расстояние ~ 12 Å, т. е. в целом структура молекулы NAD^+ в этих комплексах одинакова. В комплексе с Li^+ все торсионные углы имеют обычные значения и угол γ (угол вращения вокруг связи $C_{4'}$—$O_{5'}$) лежит в области $+ск$. Однако в комплексе с белком угол γ меняется и попадает в область $-ск$, при этом пирофосфатная группировка оказывается направленной от никотинамида и аденина, и фосфаты экспонируются в область активного центра белка; в комплексе Li^+—NAD^+ нуклеозиды сильнее закрывают пирофосфат. Структуры построены по координатам, приведенным в работах [709, 1255].

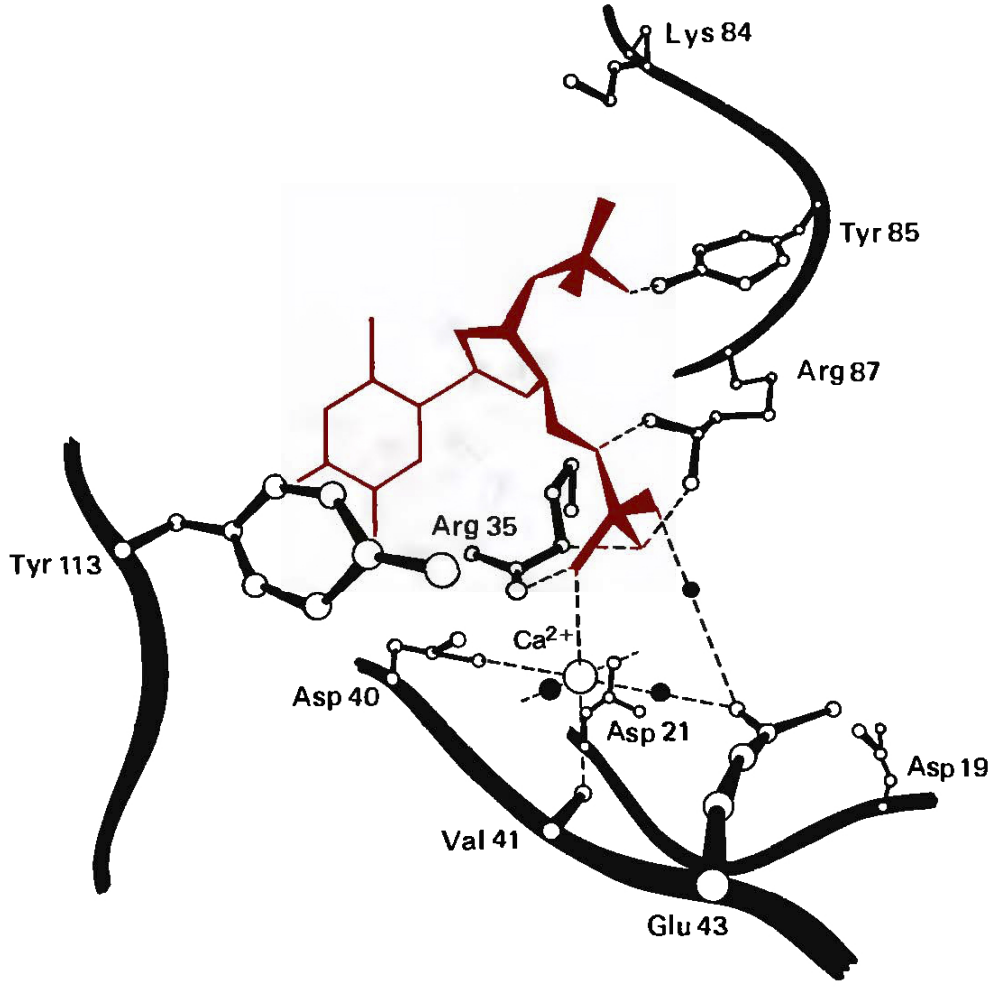


Рис. 18.12. Схематическое изображение нуклеотид-связывающего центра в стафилококковой нуклеазе [1265]. 3′-фосфатная группа ингибитора pdTp присоединена к остатку Tyr85 слабой связью, тогда как 5′-фосфат связывается с активным центром очень прочно; он образует связи с двумя боковыми группами аргининовых остатков Arg35 и Arg87, связь через водный мостик с Glu43 (черные кружки – это молекулы воды) и координационную связь с ионом Ca^{2+}. Связь $P—O_{5'}$ расщепляется во время ферментативного гидролиза нуклеиновых кислот (ДНК и РНК). Основание локализовано в узкой впадине активного центра, и какие бы то ни было детерминированные взаимодействия основания с белком отсутствуют. Поэтому стафилококковая нуклеаза не проявляет специфичности к виду основания.

но 4 Å). Гидроксильная группа боковой цепи Thr45 выступает в роли донора при образовании водородной связи с атомом N_3 цитозина, но действует как акцептор в случае группы N_3H урацила (рис. 18.13). Способность отличать пуриновые основания от пиримидиновых при помощи только гидроксильной группы Thr45 и «якорной» пептидной группы NH того же остатка находится на грани возможного, поскольку расположение функциональных групп оснований в обоих случаях почти одинаково. Однако участок полипептидной цепи с остатком Thr45, прохо-

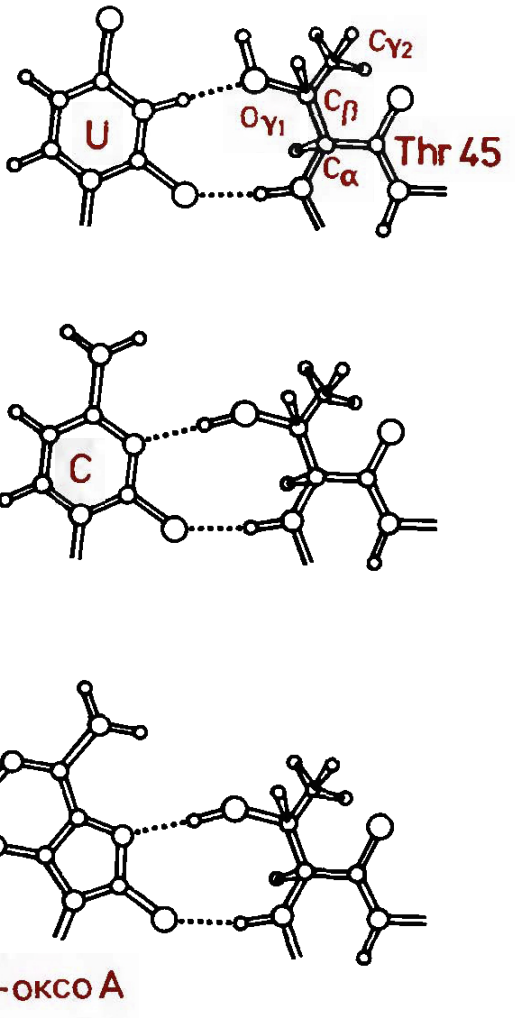


Рис. 18.13. Схема водородных связей между остатком Thr45 в РНКазе S и пиримидиновыми основаниями урацилом и цитозином (*вверху*) и 8-оксоаденином (*внизу*). Атомы H, C, N и O изображены в виде кружков возрастающего радиуса.

дящий перед атомами N_3 и O_2 пиримидинового основания, стал бы для пуринов стерической помехой, если бы фосфат и сахар оставались в тех же положениях, в которых они находятся в комплексах UpcA и Cp(2′,5′)A с РНКазой S. В связи с этим интересно отметить, что 8-оксоаденозин-3′-фосфат связывается с пиримидиновым «центром» РНКазы S в *син*-ориентации, при этом оксогруппа имитирует атом O_2 пиримидина, а атом N_7 аденина – атом N_3 цитозина [1272].

Специфическое узнавание гуанина рибонуклеазой T_1 путем взаимодействия с остовом и боковыми группами белка. В отличие от рибонуклеазы A эукариот рибонуклеаза T_1 (РНКаза T_1), выделенная из гриба *Aspergillus oryzae*, функционирует строго специфично и узнает только одно основание – гуанин. Изучение кристаллического комплекса этого фермента с ингибитором – 2′-гуаниловой кислотой (2′-GMP) – позволяет получить детальную схему комбинированных взаимодействий (водородных связей и стэкинга) с атомами основной цепи и боковых групп белка, которые окружают и связывают гуанин. Как видно из рис. 18.14, водородные связи с основанием образуют только атомы основной цепи – (Asn43)NH$\cdots O_6$ (гуанин) и (гуанин)$N_1H\cdots$O=C(Asn44). Такое взаимодействие позволяет белку отличать G от A и C, но не обязательно от U, функциональные группы которого O_4 и N_3H могут образовывать ана-

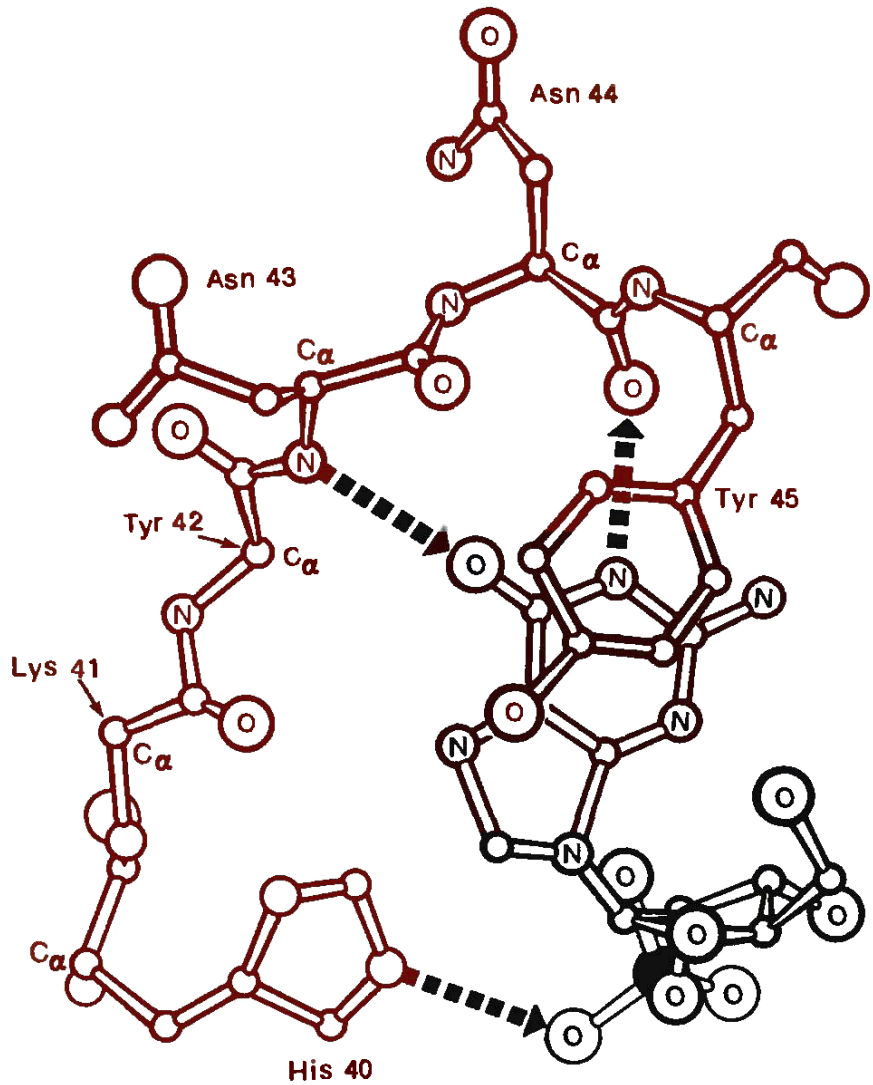


Рис. 18.14. Фермент рибонуклеаза T_1 расщепляет РНК специфически, по гуанозину. Изображена часть кристаллической структуры комплекса рибонуклеазы T_1 с ингибитором – 2′-гуаниловой кислотой в *син*-форме. «Узнавание» гуанина обеспечивается благодаря образованию водородных связей (пунктир) между функциональными группами основной цепи белка и группами O_6 и N_1H гуанина; N_2-аминогруппа гуанина и атом N_7 в связывании не участвуют. В структуре комплекса осуществляется стэкинг между феноксигруппой Tyr45 и гуанином, при этом феноксигруппа Tyr42 (не показана) располагается за атомом O_6 гуанина на расстоянии вандерваальсова контакта. Такая конфигурация напоминает сэндвич, в котором гуанин находится между двумя остатками тирозина [1272a].

логичную систему связей. Однако вдобавок ко всему над гуаниновым кольцом на расстоянии 3,5 Å располагается боковая цепь Tyr45, так что возникает стэкинг-взаимодействие, которое в случае пуриновых оснований, конечно, более выгодно, чем в случае пиримидиновых (см. гл. 6 и предыдущий раздел), а кроме того, гуанин находится в *син*-ориентации, почти неприемлемой для пиримидиновых оснований.

α-Спираль действует как диполь, и ее *N*-конец притягивает фосфатные группы. Все пептидные группы и все водородные связи ориентированы в α-спиралях одинаково. Это приводит к появлению довольно значительного дипольного момента, направленного вдоль оси спирали, с положительным зарядом на N-конце. Потенциал на расстоянии ~5 Å от N-конца α-спирали длиной 10 Å (примерно два витка) равен ~0,5 В. Отсюда следует, что связывание с единичным отрицательным зарядом (фосфатом) должно привести к выигрышу в энергии 0,5 эВ, т.е. ~12 ккал·моль$^{-1}$; это довольно значительная величина даже в предположении, что одновременно с этим происходит вытеснение молекул воды, на которое затрачивается ~0,2 ккал·моль$^{-1}$ [1273].

Такой тип взаимодействия α-спиралей с фосфатами обнаружен у ряда белков. Особенно интересен в этом отношении «россмановский домен» с βαβ-конфигурацией в дегидрогеназах и связывание фосфатных групп в дигидрофолатредуктазе, триозофосфатизомеразе, тирозил-тРНК–синтетазе и *n*-гидроксибензоат–гидроксилазе [1259, 1260].

РНК при связывании с вирусом табачной мозаики приобретает вытянутую конфигурацию. В вирусах идентичные белковые субъединицы уложены в сферическую или спиральную структуру, образующую капсид, в который упакована молекула ДНК или РНК (в зависимости от природы вируса). Так как у сферических вирусов симметрия наружной оболочки не совпадает с симметрией расположенной внутри молекулы нуклеиновой кислоты, на карте электронной плотности эта молекула имеет вид пятна, которое не поддается интерпретации [1274]. У палочковидного вируса табачной мозаики (ВТМ) ход цепи одноцепочечной молекулы РНК согласован со спиральной укладкой субъединиц, и цепь РНК можно увидеть, хотя основания из-за «случайной» нуклеотидной последовательности выглядят на карте как усредненные диски.

Капсид ВТМ состоит из 2140 белковых субъединиц с мол. массой 17420 каждая, которые уложены по спирали с числом субъединиц на 1 виток $16\frac{1}{3}$ и шагом 23 Å. По периферии внутренней полости обвивается одноцепочечная молекула РНК длиной 6400 нуклеотидов. Белковая субъединица состоит из 158 аминокислотных остатков; 60 из них образуют четыре α-спирали – LS, RS, LR и RR. Все они ориентированы примерно вдоль радиуса спирали вирусной частицы (рис. 18.15) [1266–1268, 1275]. Цепь РНК идет по спирали с радиусом 40 Å и удерживается в данном положении главным образом с помощью α-спирали LR, к которой присоединяется нуклеотидный триплет. Наиболее важными компонентами связывающегося участка являются остатки Asp115 и Asp116; они взаимодействуют с O_2'H-группами рибозных остатков 1 и 3, образуя мотив, который обнаружен также в комплексах NAD^+-зависимых дегидрогеназ. Соответствующие основания располагаются в полостях в окружении гидрофобных остатков; они прижаты к α-спирали. Основание 2, которое находится в *син*-ориентации (тогда как 1 и 3 – в *анти*), расположено дальше от оси спирали и может образовы-

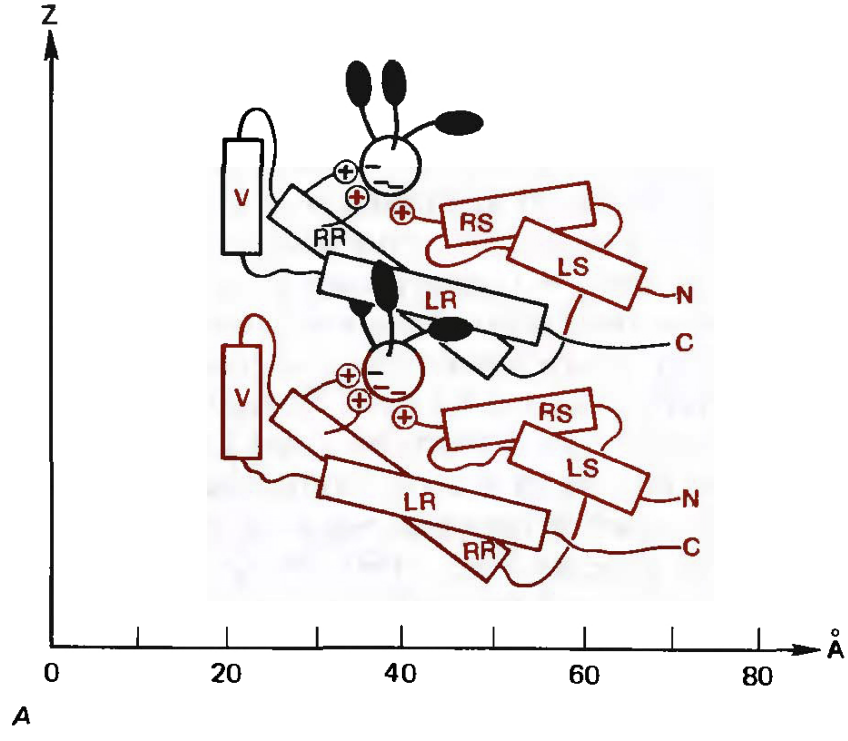
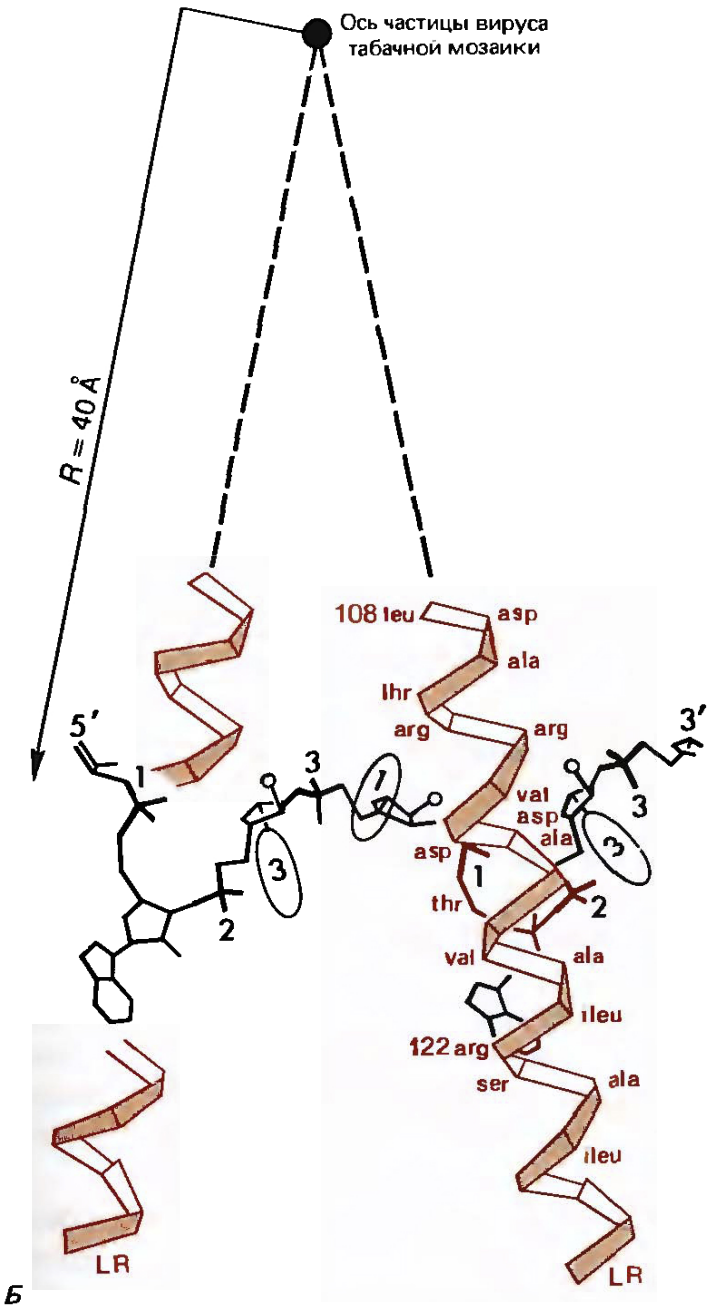


Рис. 18.15. *А.* Схематическое изображение взаимодействия РНК (черный цвет) с двумя субъединицами белка вируса табачной мозаики (коричневый цвет). Последние уложены по спирали, небольшой фрагмент которой – из двух субъединиц – показан на рисунке. РНК в первую очередь связывается с остатками 114–123 спирали LR (см. рис. *Б*) и эта спираль оказывается зажатой между основаниями, которые изображены на рисунке в виде черных овалов. Другое место сильного связывания – остатки Arg90 и Arg92 спирали RR (показаны символами ⊕), которая принадлежит субъединице, расположенной непосредственно под данной; эти остатки связываются с фосфатами РНК (показаны символами ⊖). *Б.* Другая проекция РНК-связывающего центра: вид вдоль оси спирали ВТМ. Показаны два повторяющихся элемента РНК и LR-спирали. Обратите внимание на вытянутую конформацию цепи РНК и на то, как основания нуклеотидов 1 и 3 (изображенные в виде эллипсов) «обхватывают» спираль LR. Такое слишком близкое расположение нуклеотидов 1 и 3 заставляет пуриновый нуклеотид 2 сдвигаться дальше от оси спирали [1268].

вать водородную связь с Ser123. Тесный контакт нуклеотидов 1 и 3 со спиралью LR сжимает цепь РНК и фосфаты приближаются друг к другу, образуя при этом солевые мостики с остатками Arg90 и Arg92 спирали RR, принадлежащей другой субъединице, которая располагается непосредственно под данной.

Некоторые общие выводы относительно взаимодействий между белками и нуклеиновыми кислотами. Совершенно очевидно, как это отмечалось в начале раздела, что существует широкий спектр нуклеиново-белковых взаимодействий. Сюда относятся не только контакты с боковыми группами аминокислот, но и взаимодействия с пептидными группами, выступающими в роли акцепторов или доноров при образо-



Б

вании водородных связей. Как оказалось, основания более охотно вступают в контакт с пептидными функциональными группами, чем с боковыми радикалами аминокислотных остатков. Это весьма удивительно, если принять во внимание разнообразие последних (от положительно заряженных до отрицательно заряженных), но вполне объяснимо с точки зрения геометрических требований, которые должны выполняться при узнавании. Так, боковые группы довольно подвижны и не всегда занимают фиксированное положение, тогда как основная цепь находится в определенной, строго детерминированной конфигурации. Она образует некую матрицу, которую основание может легко просканировать с помощью своих комплементарных функциональных групп.

Кроме того, повороты и изгибы основной цепи и ее положение и ориентация в области активного центра являются мощным инструментом для модуляции и тонкой настройки взаимодействий; гораздо менее пригодны для этой цели аминокислотные боковые цепи, несущие бифункциональные группы – гуанидиновую, карбоксильную и карбоксамидную, т.е. группы с фиксированной геометрией.

В противоположность этому фосфатные группы более охотно образуют солевые мостики с боковыми цепями аминокислот – Arg, Lys и His, хотя образуются также и водородные связи с другими группами, включая группы основной цепи. Кроме того, фосфаты притягиваются к α-спиралям, обладающим дипольным моментом. Что касается гидроксилов рибозы, то для них тоже не выявлено какой-либо общей схемы связывания, хотя чаще всего они образуют водородные связи с карбоксильными группами белка. Стэкинг-взаимодействие оснований с боковыми группами ароматических аминокислот обнаружено лишь в нескольких комплексах, и часто упоминаемый гидрофобный «карман» в большинстве случаев действительно является просто карманом, т.е. не проявляет никакой специфичности к типу основания и его ориентации.

18.6. БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С ДВОЙНЫМИ СПИРАЛЯМИ И ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫМИ ДНК

К настоящему времени методом рентгеноструктурного анализа установлена пространственная структура пяти разных ДНК-связывающих белков: *cro*- и λ-репрессоров, белка, активирующего катаболизм (БАК), белка гена 5 фага fd и олигопептида нетропсина. Предложенные модели ДНК-белкового взаимодействия являются пока предметом дискуссий, поскольку установлена структура только белков, а не их комплексов с ДНК. Тем не менее можно сделать некие предварительные выводы, представляющие определенный интерес в связи с рассматриваемыми здесь проблемами.

Антибиотик нетропсин – олигопептид, связывающийся с АТ-богатыми участками В-ДНК. Константа связывания равна $\sim 10^8$ л·моль$^{-1}$ (измерена для poly(dA)·poly(dT) [1276]), длина участка связывания составляет ~5 пар оснований [1277]. Молекула нетропсина (рис. 18.16) имеет вытянутую дугообразную конфигурацию, и все NH-группы – потенциальные доноры водородных связей – обращены внутрь дуги. Построение моделей комплекса нетропсина с В-ДНК показывает, что связывание происходит в минорном желобке ДНК, при этом антибиотик располагается почти параллельно оси спирали, а NH-группы образуют водородные связи с атомами O_2 пиримидинов и N_3 пуринов, которые в спирали В-ДНК расположены примерно одинаково, так что связывание с парами А–Т и Т–А равновероятно.

Взаимодействие В-ДНК с α-спиралью и β-слоем *cro*-репрессора [1278]. Белок *cro* бактериофага λ – полипептид длиной 66 аминокислотных остатков – узнает определенные операторные участки на фаговой ДНК,

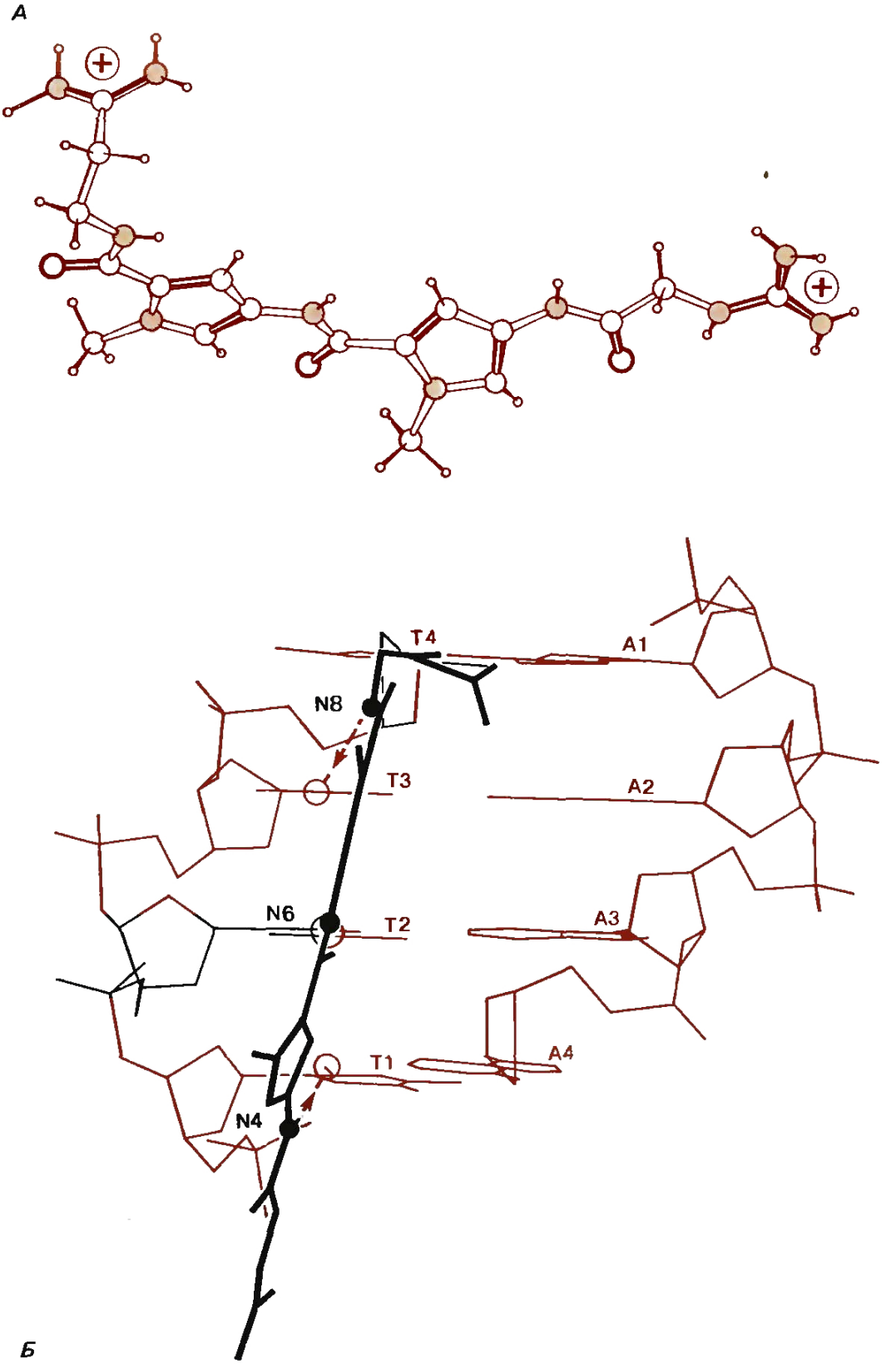


Рис. 18.16. *А*. Структура ДНК-связывающего антибиотика нетропсина. Все потенциальные доноры водородных связей (затененные NH-группы) направлены в одну сторону (обращены внутрь дуги). *Б*. Модель комплекса нетропсина с В-ДНК; антибиотик (показан жирными линиями) располагается в минорном желобке В-ДНК (показана в цвете). Концевая гуанидиновая группа не участвует в связывании и образует пропионамидные мостики с соседней молекулой ДНК. [1277].

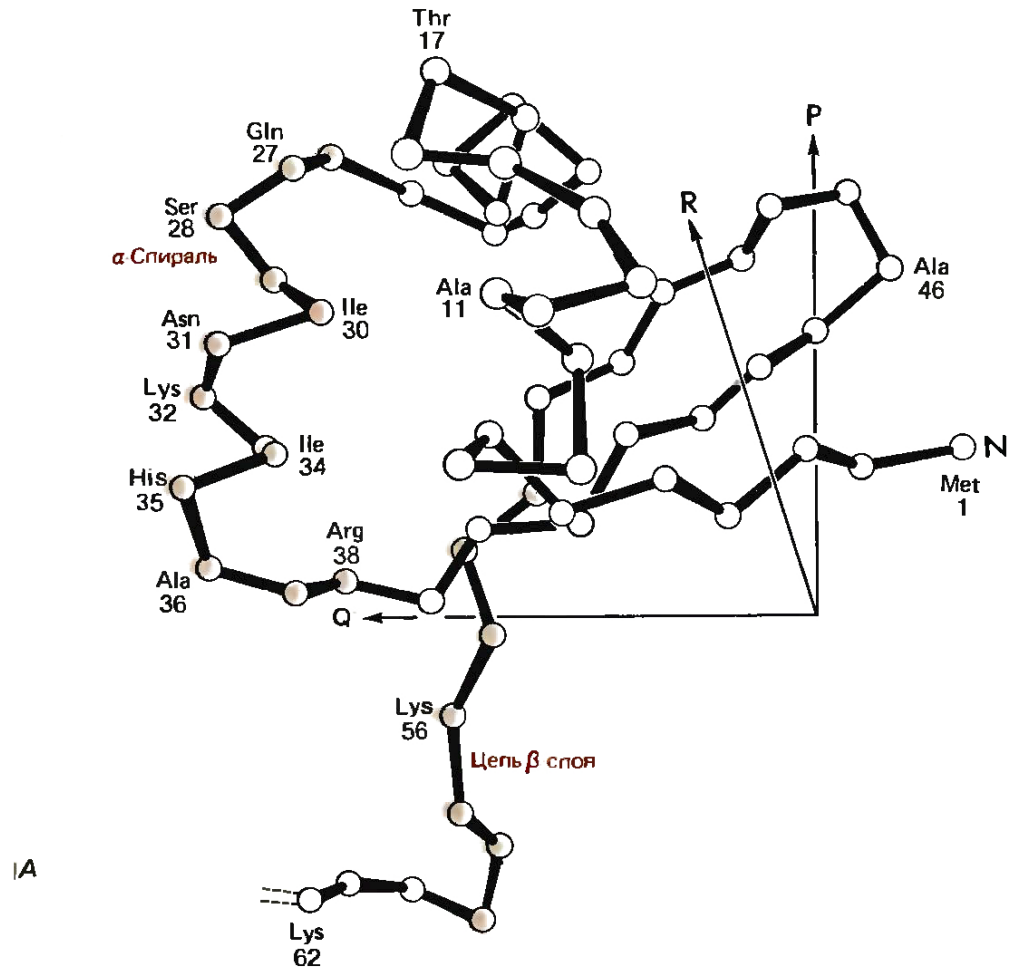
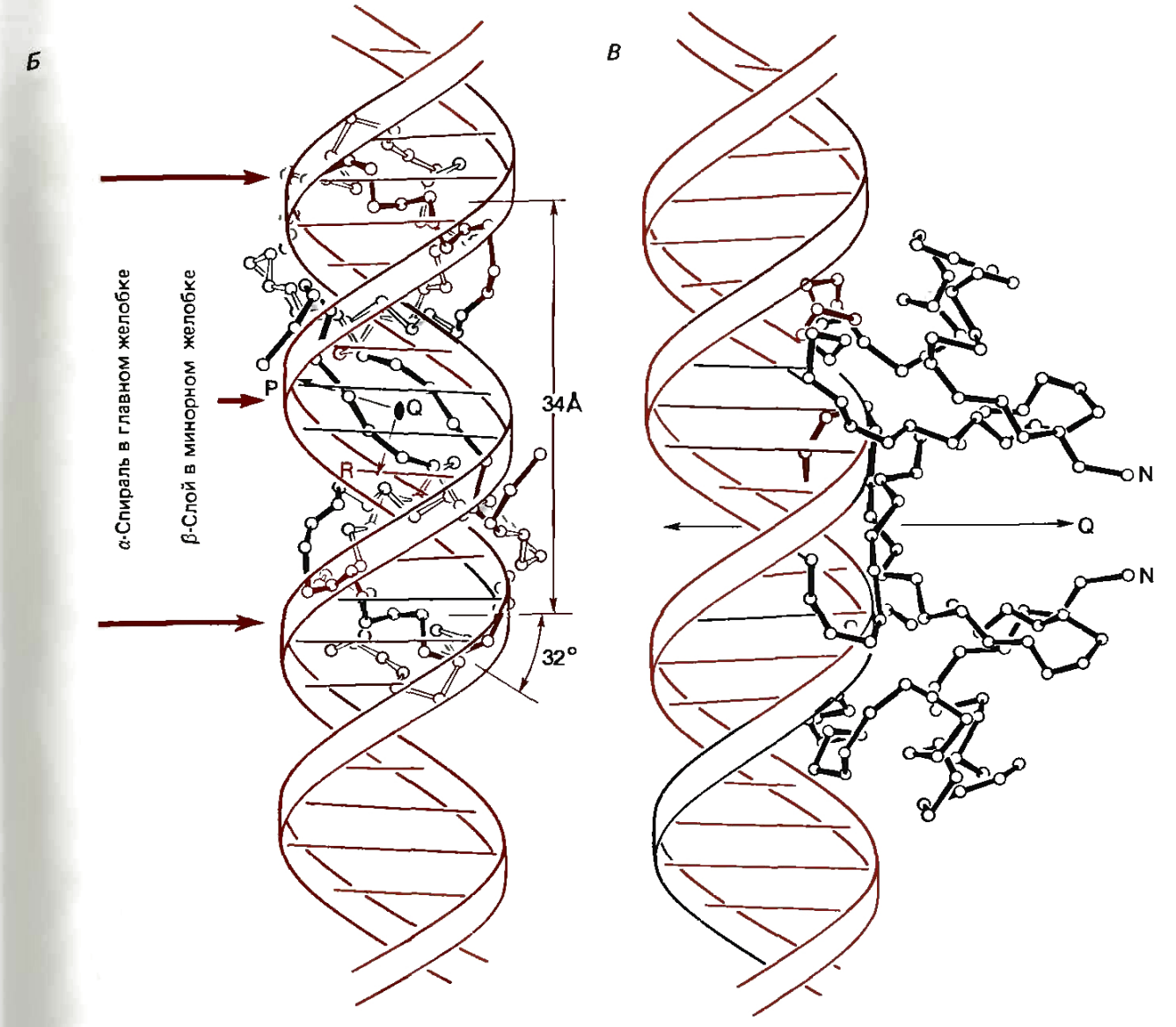


Рис. 18.17. *А.* Ход полипептидной цепи *cro*-репрессора; показаны только C_α-атомы. Предполагаемые участки связывания с ДНК – α-спираль (остатки 27–38) и С-концевые аминокислотные остатки 53–62 (закрашенные кружки); последние образуют антипараллельный β-слой *с* другой молекулой *cro*, связанной с данной осью симметрии 2-го порядка Q. Две другие оси 2-го порядка, P и R, переводят димер *cro* в тетрамер. Концевые остатки обладают повышенной подвижностью и на карте электронной плотности не видны. Возможно, С-концы при узнавании ДНК выполняют роль «щупалец». *Б* и *В.* Модель комплекса димера *cro*-репрессора с В-ДНК. Ось димера Q совпадает с осью симметрии В-ДНК. *Б.* Вид вдоль оси димера Q. Жирными линиями выделены α-спирали и β-слой, связывающиеся с желобками В-ДНК. Белок расположен за спиралью ДНК. *В.* Проекция, представленная на рис. *Б*, повернута вокруг вертикали на 90°. Теперь ось Q расположена в плоскости рисунка. [1278].

имеющие специфическую (и почти палиндромную) последовательность; связываясь с этими участками, он препятствует экспрессии гена λ-репрессора. В растворе *cro*-репрессор существует в виде димера или тетрамера, в кристалле – в виде тетрамера с приблизительной точечной симметрией 222; в комплексе с ДНК он, по-видимому, также должен находиться в виде димера или тетрамера. Субъединица *cro* состоит из антипараллельного β-слоя, образованного тремя отрезками цепи (остатки 2–6, 39–45, 48–55), и трех α-спиралей (остатки 7–14, 15–23 и 27–36).



В димере С-концевые участки двух соседних молекул *cro*, связанных осью симметрии Q (рис. 18.17), образуют еще один элемент β-структуры. Другая ось симметрии, R, преобразует димер в тетрамер, и далее из тетрамеров формируется кристалл.

Если посмотреть вдоль оси димера Q (рис. 18.17, *Б*), то мы сразу увидим, что спирали, образованные остатками 27–36, находятся на расстоянии ~34 Å друг от друга, антипараллельны и наклонены к вертикали под углом 32°, т.е. идеально вписываются в двойную спираль В-ДНК. β-Слой, образованный С-концевыми участками двух молекул, оказывается между этими спиралями. Была предложена модель комплекса, в которой димер *cro*-репрессора располагается с одной стороны ДНК; при этом α-спирали размещаются в главном желобке, а β-слой – в минорном, что согласуется с результатами химических исследований [1279]. Ось Q совпадает с собственной осью симметрии 2-го порядка двойной спирали В-ДНК, и, таким образом, собственная симметрия почти палиндромной операторной области, с которой связывается *cro*-ре-

прессор, совпадает с симметрией белкового димера. Рассмотрим теперь более подробно детали взаимодействия двойной спирали нуклеиновой кислоты с элементами белковых структур – α-спиралью и β-слоем, не забывая при этом, что комплекс *cro*-репрессора с ДНК – это пока лишь модель.

Можно предположить, что положение остатков α-спирали Ser28, Ala29, Asn31, Lys32, Ala33 и His35 позволяет им взаимодействовать с функциональными группами, расположенными в главном желобке ДНК [1279]. Lys32 и близлежащие остатки Arg38 и Lys39, по-видимому, связываются с фосфатами. Кроме того, антипараллельный β-слой, образованный концевыми участками Glu54, Val55 и Lys56 двух молекул, вероятно, располагается в минорном желобке, как описано в разд. 18.1. На карте электронной плотности *cro*-репрессора четыре С-концевых остатка каждого мономера не видны. Это указывает на их разупорядоченность, а следовательно, и на повышенную подвижность, которая может иметь место и в растворе. Возможно, гибкие концы, снабженные двумя лизиновыми остатками (Lys62, Lys63), действуют как «щупальца», инициируя и направляя связывание с ДНК.

Поскольку имеется столь детальная модель комплекса *cro*-репрессора с ДНК и известны аминокислотная последовательность белка и нуклеотидная последовательность операторного участка, была предпринята попытка установить причину специфичности взаимодействия. Оказалось, что боковые цепи остатков Arg38, Lys32, Ser28, Gln27 и Tyr26 могут образовывать водородные связи с функциональными группами гуанинов и аденинов [1279a], расположенными со стороны главного желобка (рис. 18.3). Это объясняет химические аспекты взаимодействия, но окончательное доказательство правильности модели можно будет получить лишь тогда, когда комплекс *cro*-репрессора с оператором удастся закристаллизовать и установить его пространственную структуру с помощью рентгеноструктурного анализа.

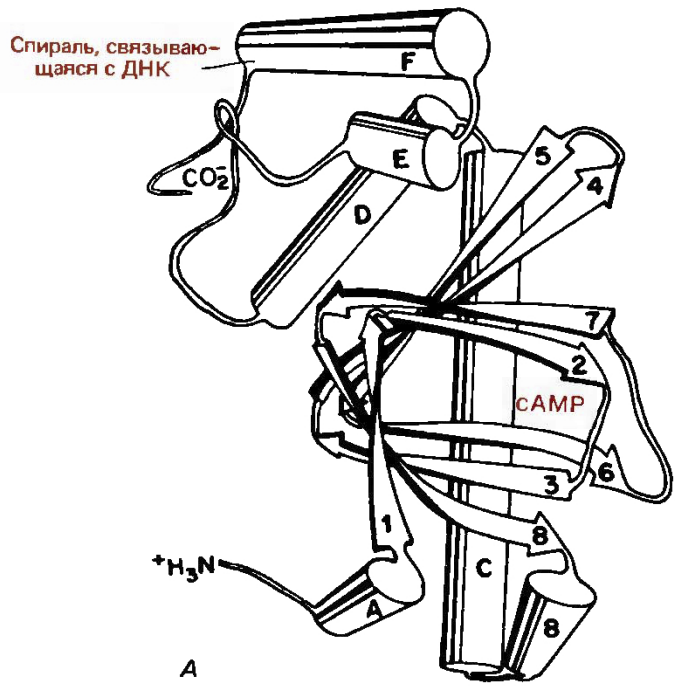
Домен λ-репрессора, связывающийся с оператором, обладает теми же структурными особенностями, что и *cro* [1279*b*, 1279c]. Интактный репрессор фага λ – это белок из 236 аминокислотных остатков, образующих двухдоменную структуру. Мягкий гидролиз с помощью папаина приводит к отщеплению N-концевого фрагмента из 92 остатков, который, как и сам λ-репрессор, специфически связывается с оператором ДНК. Рентгеноструктурный анализ кристаллов N-концевого домена λ-репрессора показал, что он состоит из пяти α-спиралей; две спирали (2 и 3) располагаются почти перпендикулярно друг другу, т.е. образуют такую же структуру, как спирали 2 и 3 (остатки 15–23 и 27–36) в *cro*-репрессорах и спирали E и F в белке БАК (см. ниже). И у *cro*-, и у λ-репрессоров спирали 3 легко встраиваются в главный желобок B-ДНК (рис. 18.17); кроме того, N-концевые «руки» λ-репрессора «обхватывают» ДНК, располагаясь в главном желобке двойной спирали с противоположной стороны.

N-концевые последовательности репрессоров, являющиеся местами

предполагаемого связывания с ДНК, гомологичны. N-концевую последовательность *cro*-репрессора фага λ, содержащую предполагаемое место связывания с ДНК, сравнивали с соответствующими последовательностями *cro*-репрессора фага 434, белков cI и cII фага λ, репрессорного белка фага P22 сальмонеллы и *lac*-репрессора [1279d]. Для аминокислотных последовательностей и для нуклеотидных последовательностей соответствующих генов была обнаружена довольно значительная гомология. Это позволяет предположить, что N-концы всех этих репрессоров сходны также и по своей вторичной структуре и имеют общего предшественника. Если эта гипотеза верна, получают объяснение эксперименты по химической защите и генетической модификации, которые проводились с *lac*-репрессором. Кроме того, становится понятно, почему тетрамер *lac*-репрессора связывает одновременно два операторных участка.

Белок, активирующий катаболизм (БАК): с правой или с левой спиралью B-ДНК связываются его α-спиральные участки [1280, 1280a]? Если *cro*- и λ-репрессоры подавляют транскрипцию ДНК, то БАК, напротив, включает оперон, к которому он специфичен, используя при этом в качестве аллостерического эффектора циклический AMP. БАК состоит из одной полипептидной цепи длиной в 201 аминокислотный остаток. В активной форме он представляет собой димер, который был закристаллизован в комплексе с эффектором – циклическим AMP. Пространственная структура комплекса БАК – cAMP гораздо сложнее, чем структура *cro*-репрессора. Молекула БАК состоит из двух структурных доменов. Большой домен, расположенный на N-конце, включает две короткие α-спирали A и B, антипараллельную β-структуру, уложенную в восьмицепочечный «β-roll» («рулет»), и протяженную спираль C, которая соединяет большой N-концевой домен с малым C-концевым. Малый домен состоит из спиралей D, E и F и C-концевого участка, который плохо виден на карте электронной плотности.

Две молекулы БАК в димере располагаются почти параллельно друг другу и удерживаются вместе благодаря взаимодействию длинных C-спиралей. Молекулы связаны друг с другом псевдоосью 2-го порядка (рис. 18.18), а участок ДНК, с которым связывается БАК, содержит палиндромную последовательность (дополнение 18.1). Поэтому естественно предположить, что в структуре комплекса две оси 2-го порядка совпадают. Если следовать этому предположению, легко заметить, что структурными элементами белкового димера, которые могли бы взаимодействовать с двойной спиралью ДНК, являются F-спирали – их длина равна ~ 22 Å, а расстояние между ними ~ 34 Å. Однако угол наклона этих спиралей к линии, соединяющей их центры, составляет 65–70°, что значительно отличается от величины $\sim 32°$, характерной для наклона цепей в B-ДНК. Это может означать, что БАК связывается не с правой, а с левой двойной спиралью B-ДНК, подобной той, которая была предложена на основании теоретических расчетов [1281, 1281a]. Такая модель комплекса не только удовлетворяет стереохимическим крите-



А

Б

риям, но и объясняет соответствующие генетические и химические данные [1280].

Если эта модель верна, то отсюда следует, что cAMP, действуя как аллостерический эффектор, задает относительную ориентацию двух субъединиц БАК в димере. Его удаление должно изменить общую структуру димера БАК, и следовательно, разрушить ДНК-связывающий центр. Возможно, изменение знака спирали ДНК при связывании с БАК активирует процесс транскрипции за счет локальной дестабилизации (или выплавления) двойной спирали B-ДНК внутри промоторной области. Это согласуется с данными о том, что БАК действует наиболее эффективно тогда, когда он может снимать отрицательные сверхвитки у кольцевой замкнутой ДНК, т. е. именно в том случае, когда можно предполагать локальный переход правой формы двойной спирали ДНК в левую. Замена правого витка на левый уменьшает кручение T_w на -2 и (поскольку мы говорим о кольцевой замкнутой ДНК) увеличивает райзинг W_r (отрицательный) на $+2$, что отвечает процессу релаксации отрицательно сверхспирализованной ДНК (определение T_w и W_r см. в разд. 19.7).

В более поздней работе [1281b] было высказано предположение, что на самом деле две симметрично расположенные F-спирали димера БАК связываются не с двумя последовательными участками желобка одной и той же (левой) двойной спирали ДНК, а с желобками (правых) ДНК, расположенных параллельно друг другу. Две параллельные спирали ДНК могут быть частью левой сверхспирали, подобной той, которая показана на рис. 19.3, только более компактной (т. е. с тесно примыкающими сверхвитками), что находится в соответствии с результатами электронно-микроскопических исследований. Общая топология сверхспиральной ДНК в такой структуре должна быть иной; это также согласуется с упомянутыми выше экспериментальными данными о том,

Рис. 18.18. *А.* Молекулярная структура белка, активирующего катаболизм (БАК); α-спирали изображены в виде цилиндров, а β-складчатый «рулет», представляющий собой место связывания cAMP,–в виде стрелок. БАК образует димер, при этом две молекулы белка оказываются связанными друг с другом осью симметрии 2-го порядка (идущей почти вертикально), межмолекулярный контакт возникает главным образом из-за взаимодействия длинных спиралей С, которые в димере располагаются почти параллельно и близко прилегают друг к другу. *Б.* Модель комплекса димера БАК с левой спиралью B-ДНК (отличной от Z-ДНК, о которой идет речь в гл. 12); α-спирали белка F располагаются в главном желобке ДНК. Левая B-ДНК построена по координатам, приведенным в работе [1281]; спираль ДНК наклонена на $\sim 65°$ к вертикали так, что спирали F димера БАК лежат в плоскости рисунка. Одна молекула димера изображена жирными линиями, другая–пунктиром. Более поздние данные показывают, что эта модель может быть неверна и в действительности БАК связывается с правой ДНК (см. также [1281b]). [1280].

что БАК наиболее эффективен, когда происходит (частичная) релаксация кольцевой замкнутой ДНК. Пока вопрос о том, каким образом БАК активирует РНК-полимеразу – путем прямого белок-белкового взаимодействия или благодаря локальным изменениям конформации ДНК,– остается открытым. Если причиной активации является изменение конформации ДНК, то БАК действует как аллостерический эффектор топологических изменений сверхспиральной ДНК, тогда как репрессоры (например, *cro*) можно считать отрицательными аллостерическими эффекторами [1281b].

Сейчас трудно сказать, какая из рассмотренных моделей связывания БАК с ДНК верна (возможно, что неверны обе модели). Однако более правдоподобной кажется модель связывания БАК с правой спиралью ДНК; модель комплекса БАК с левой двойной спиралью более спекулятивна и получила поддержку главным образом потому, что с появлением Z-ДНК левые спирали «вошли в моду». Размышления на эту тему привели бы нас к обсуждению философской проблемы интерпретации научных результатов, которая лежит вне рамок этой книги и которую мы оставляем читателю в качестве домашнего задания.

Структурный мотив из двух α-спиралей в белках, связывающихся с двойной спиралью ДНК. Сравнение пространственной структуры *cro*- и λ-репрессоров и БАК показывает, что в субъединице каждого белка присутствует один и тот же структурный мотив, состоящий из двух α-спиралей, которые, по-видимому, связываются с ДНК [1281]. Эти спирали – 2 и 3 в репрессорах и E и F в активаторе БАК – выступают над поверхностью глобулы соответствующих белков. Если смотреть на белки со стороны ДНК, то мы увидим, что к N-концам α-спиралей, связывающихся в главном желобке ДНК (спирали 3 в репрессорах и спираль F в БАК), присоединены другие короткие спирали, которые располагаются за данными спиралями и под прямым углом к ним. Это спирали 2 в репрессорах и спираль E в БАК. Было высказано предположение, что наличие такого структурного элемента характерно для всех белков, связывающихся с двойными спиралями ДНК; об этом же свидетельствует и гомологичность последовательностей ряда репрессоров [1279c, 1279d]. Основное структурное отличие репрессоров от активатора БАК состоит в неодинаковой ориентации этих спиралей, как было описано, а также в их локализации в белковой цепи (на N-конце у репрессоров и на C-конце у активатора).

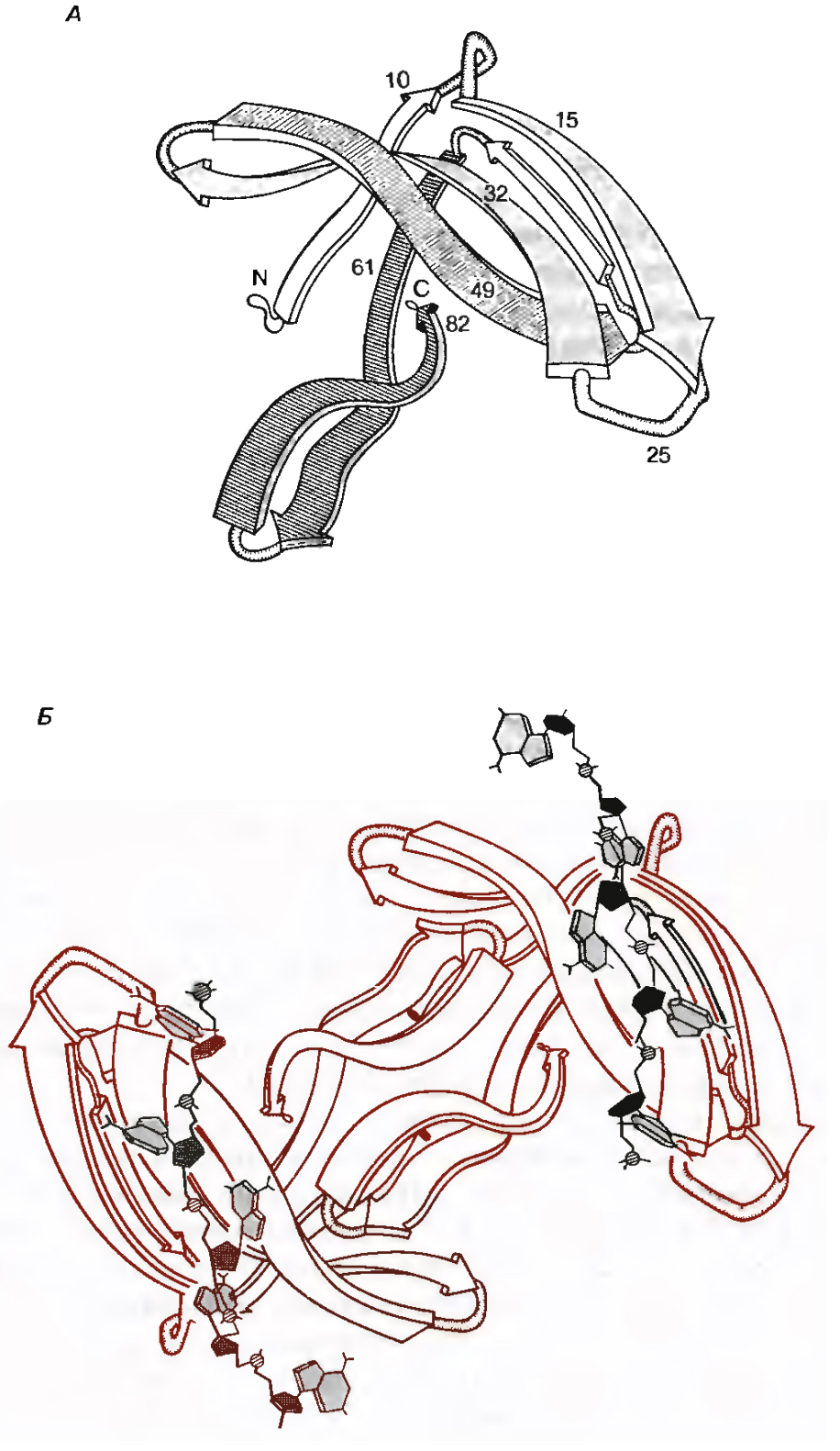
Продукт гена 5 фага fd кооперативно связывается с одноцепочечной ДНК. Расплетающие белки. И в живых организмах, и in vitro экспрессия ДНК сопровождается раскручиванием двойной спирали, которое облегчает связывание ферментов с ДНК, выступающей в качестве субстрата. Расплетание двойной спирали и стабилизация одноцепочечной ДНК легче всего происходят тогда, когда полинуклеотидные цепи образуют комплексы с ДНК-связывающими белками. К этому широко распространенному классу белков относится белок гена 5 фага fd. Он представляет собой полипептидную цепь длиной 87 аминокислотных остатков,

которая продуцируется в количестве ~75000 копий на инфицированную клетку *E. coli* [1282].

С помощью рентгеноструктурного анализа кристаллов белка гена 5 установлено, что молекула белка имеет Т-образную форму и целиком состоит из β-слоев (рис. 18.19, *А*) [1190, 1190а]. Первые десять N-концевых остатков образуют короткую β-цепь; за ней следует большая «ДНК-связывающая петля» (остатки 15–32), к которой присоединена «комплексная петля» (остатки 33–49). Образовав еще одну короткую β-цепь (остатки 52–59), полипептидная цепь переходит от горизонтальной перекладины буквы Т к «ножке»; здесь образуется вертикальный стебель из большой «диадной петли» (остатки 61–82).

В растворе, в кристаллическом состоянии и в комплексе с ДНК белок гена 5 существует в виде димера; при этом две молекулы белка связаны друг с другом осью симметрии 2-го порядка, расположенной так, что две «диадные петли» в димере слипаются (рис. 18.19, *Б*), а перекладины двух букв Т оказываются ориентированными антипараллельно. Вдоль перекладины Т располагается ДНК-связывающий канал шириной ~10 Å и длиной ~35 Å, образованный остатками 15–32. Длина канала оказывается достаточной для того, чтобы в нем разместился фрагмент одноцепочечной ДНК в ~5 нуклеотидов, имеющий растянутую конформацию (рис. 18.19, *В*). Во впадине канала находится несколько аминокислотных боковых цепей, которые могут взаимодействовать с расположенной в канале одноцепочечной ДНК, если допустить, что при связывании ДНК происходит незначительная переориентация подвижных боковых цепей в структурной модели белка гена 5. Предполагается, что в комплексе осуществляются два типа взаимодействия: притяжение разноименных зарядов и гидрофобное стэкинг-взаимодействие боковых цепей ароматических аминокислот с основаниями (рис. 18.19, *В*). Первый тип взаимодействия распространяется на фосфатные группы ДНК и положительно заряженные группы Arg16, 21, 80, Lys46 и, вероятно, Lys24 и 69; во втором принимают участие остатки Tyr26, 34, 41 и Phe73′ (штрихом отмечен остаток из симметрично связанной субъединицы димера) [1190а, 1283–1285].

Повышенное содержание остатков лизина и аргинина во впадине предполагает, что белок в первую очередь «узнает» отрицательно заряженный сахарофосфатный остов ДНК, который связывается с поверхностью белковой молекулы за счет притяжения между разноименными зарядами. Связывание сопровождается конформационными изменениями, в результате которых основания в стопке расходятся, а боковые цепи ароматических аминокислот поворачиваются в положение, из которого они могут «проскользнуть» между основаниями, как закладки между страницами книги, и тем самым скрепить комплекс белка с ДНК (разд. 18.3). В кристалле, как и в растворе, белок гена 5 присутствует в виде димера. При связывании с двойной спиралью этот димер, вероятно, сначала разделяет антипараллельные цепи ДНК, а затем связывается с ними; связывание стимулирует образование линейных агрега-


А
10
15
32
N
61
C
49
82
25
Б

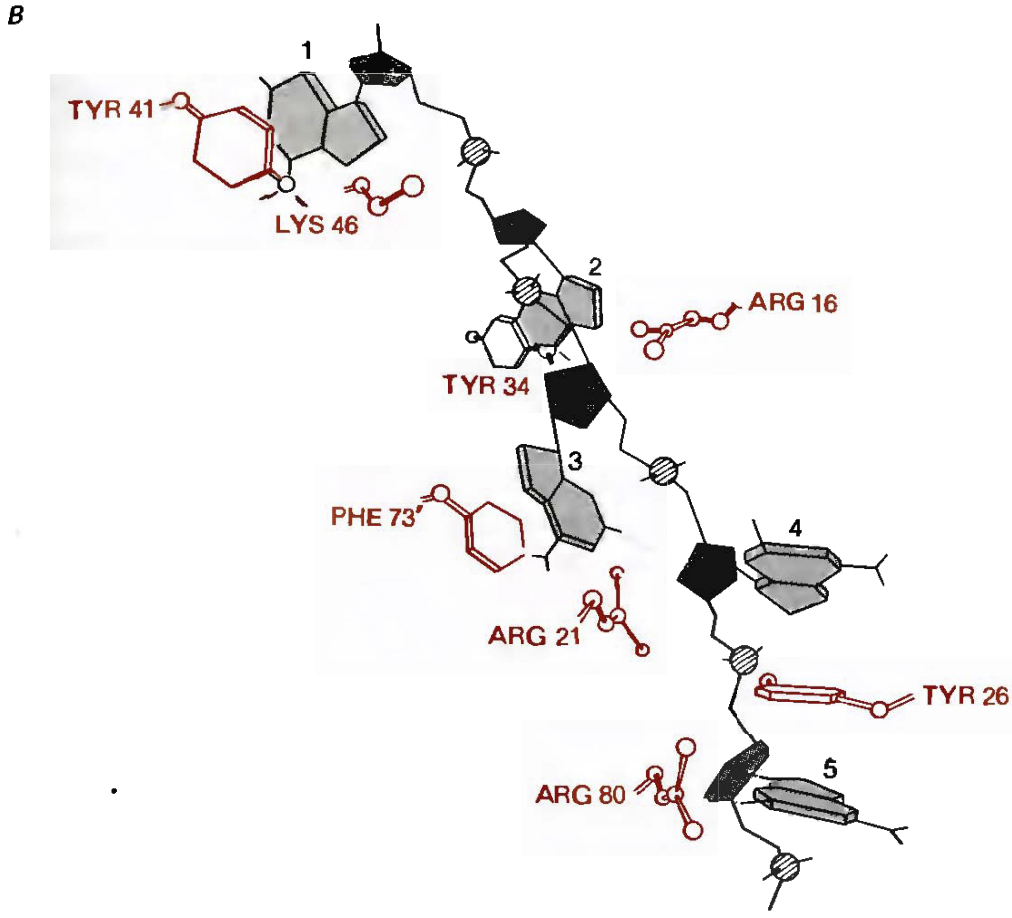


Рис. 18.19. Схематическое изображение полипептидной цепи белка гена 5 фага fd. *А*. Мономер белка гена 5. Т-образная молекула состоит исключительно из β-цепей; «ДНК-связывающую петлю» образуют остатки 15–32, «диадную петлю» – остатки 61–82. *Б*. Белок гена 5 образует димер, при этом две молекулы оказываются связанными осью симметрии 2-го порядка и две «диадные петли» примыкают друг к другу, а перекладины букв Т и соответственно две ДНК-связывающие петли располагаются в антипараллельной ориентации. Приведена модель связывания одноцепочечной ДНК «ДНК-связывающей петлей». *В*. Цепь пентануклеотида $(dA)_5$, представленная в той же ориентации, что и на рис. *Б*; показаны участвующие во взаимодействии с ДНК боковые группы белка. Боковые группы всех ароматических аминокислот участвуют в стэкинг-взаимодействии с основаниями, при этом Tyr26 и два аденина образуют структуру типа «сэндвич». Рисунки любезно предоставлены авторами работы [1190а] до опубликования статьи.

тов белковых димеров вдоль цепей ДНК. Эти агрегаты образуют новую спиральную структуру с диаметром ~100 Å, шагом 80–90 Å и с шестью димерами белка на виток, которые составляют белковый кор. В коре проходят две отдельные цепи ДНК [1190, 1286]. Они располагаются на расстоянии 21–23 Å от оси (по данным нейтронного рассеяния [1287]), и это означает, что ДНК находится не на периферии белковой спирали, а уложена в какую-то выемку внутри. Продольная агрегация белков является высококооперативным процессом, способствующим эффективному расплетанию двойной спирали ДНК.

18.7. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРЕАЛЬБУМИНА С ДНК. ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Рентгеноструктурный анализ первого хорошо охарактеризованного гормон-связывающего белка – преальбумина плазмы крови человека, связывающего гормон щитовидной железы, – показал, что этот белок состоит из четырех идентичных субъединиц, каждая из 127 аминокислотных остатков, которые образуют тетраэдр. Структурная модель преальбумина предполагает наличие поверхности, которая по размеру и форме комплементарна фрагменту В-ДНК длиной 10–12 пар оснований. По обе стороны от полуцилиндрического желобка выступают две спирали (которые при связывании с ДНК могли бы выполнять роль «щупалец») [1288]. Дно желобка выстилает пара симметрично расположенных β-слоев, а «наружные щупальца» хорошо укладываются в главный желобок двойной спирали ДНК.

Комплекс между этим белком и ДНК (если он действительно существует) также должен обладать симметрией 2-го порядка, о которой говорилось ранее при рассмотрении других ДНК-белковых комплексов, и, следовательно, участок связывания на ДНК должен представлять собой палиндром (дополнение 18.1). Молекулярная модель комплекса ДНК с преальбумином была построена без детальной подгонки белковых боковых цепей под модель ДНК; тем не менее видно, что 10 остатков лизина, 4 остатка гистидина, 8 остатков глутаминовой кислоты и 6 аспарагиновой находятся в таких положениях, что в принципе они могли бы взаимодействовать с ДНК.

Хотя эта модель кажется весьма правдоподобной, однако доказательств того, что преальбумин взаимодействует с ДНК, до сих пор не получено. Более того, некоторые экспериментальные данные свидетельствуют о том, что связывания преальбумина с ДНК не происходит [1289]. Если обратиться к расчетам потенциалов поверхностей ДНК и преальбумина, то окажется, что обе эти величины отрицательны, а следовательно, образование комплекса невозможно. Этот пример показывает, что даже хорошего соответствия моделей макромолекул предполагаемого комплекса еще недостаточно и кроме структурной комплементарности важную роль в образовании комплекса играет комплементарность зарядов [839а].

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Взаимодействия между белками и нуклеиновыми кислотами весьма разнообразны: это могут быть солевые мостики, водородные связи, стэкинг и гидрофобные контакты. В них могут быть вовлечены любые части обеих макромолекул. Двойная спираль ДНК может взаимодействовать с полипептидами несколькими способами: (I) при помощи образования специфических водородных связей между уотсон-криковскими парами оснований и боковыми цепями аминокислот; (II) путем интеркаляции боковых цепей ароматических аминокислот между парами оснований (модель «книжной закладки»), при которой также проявляется некоторая специфичность, (III) путем непосредственного связывания белковых α-спиралей и β-слоев в желобках ДНК. Предполагается, что последний тип взаимодействия (правильнее сказать «два типа взаимодействия») имеет место в комплексах ДНК с *cro*-репрессором (в модели комплекса α-спираль и β-слой попадают в главный и минорный желобки двойной спирали соответственно) и с белком, активирующим катаболизм (БАК), для которого были предложены две модели связывания α-спиралей – с левой и правой двойной спиралью В-ДНК. На основании данных о кристаллической структуре преальбумина предложена гипотетическая модель комплекса преальбумина с ДНК; однако в действительности такой комплекс, по-видимому, не образуется. И полилизин, и полиаргинин присоединяются к ДНК необратимо; в обоих случаях процесс присоединения носит кооперативный характер, однако структура соответствующих комплексов различается.

Нуклеотиды и одноцепочечные РНК и ДНК при связывании с белками обычно принимают вытянутую форму, т.е. торсионный угол γ для них лежит в области *– ск* или *ап*. Такое изменение угла γ происходит при связывании NAD^+ с дегидрогеназами (в «россмановском» домене), при связывании динуклеозидфосфатов с рибонуклеазами А и S и при связывании РНК с белком вируса табачной мозаики. Взаимодействия в комплексе могут представлять собой контакты любого типа и затрагивать любую часть молекулы каждого из партнеров. Например, в случае специфического комплекса рибонуклеазы T_1 с гуаниловой кислотой узнавание гуанина осуществляется за счет образования водородной связи с пептидным остовом и стэкинга с боковой группой тирозина. Оказалось, что взаимодействия между нуклеотидами и атомами основной цепи белка вообще встречаются чаще и являются более специфичными, чем взаимодействия с боковыми группами аминокислот.

Связывание ДНК с белком гена 5 фага fd способствует расхождению цепей двойной спирали. Если (одноцепочечная) ДНК и белок образуют комплекс, т.е. если ДНК присоединяется к «активному центру» белка, который состоит исключительно из элементов β-структуры, начинается образование белковых агрегатов; при этом молекулы белка выстраиваются одна за другой, формируя спираль, на которую навиваются одноцепочечные участки ДНК.

ГЛАВА 19

Более высокие уровни структурной организации ДНК

Для одно- и двухцепочечных РНК нет никаких более высоких уровней структурной организации, помимо рассмотренных нами ранее, если не считать структур, которые образуются при взаимодействии РНК с белками оболочки вирусных частиц и рибосом (рис. 18.15). Совершенно иная картина наблюдается для ДНК. В хроматине (комплексе ДНК с белками, из которого состоят хромосомы) ДНК навивается на глобулы гистоновых октамеров, образуя кор-частицы нуклеосом. Нуклеосомы располагаются вдоль молекулы ДНК, в результате чего хроматин становится похожим на нитку бус. Такая нить может компактизоваться и дальше, образуя соленоидальные, сверхспиральные структуры. Закручиваясь вокруг гистоновых октамеров, ДНК образует сверхвитки, при этом возникают топологические проблемы, которые требуют особого обсуждения (разд. 19.7).

Молекула ДНК образует упорядоченную компактную структуру не только при взаимодействии с гистоновым октамером. Она обладает способностью компактизоваться и сама по себе, например в присутствии солей или инертных полимеров. В таких условиях происходит спонтанная конденсация с образованием агрегатов, в которых молекулы ДНК уложены параллельно бок о бок. Такое же явление наблюдается и при добавлении в систему полиаминов или этанола. При очень медленном, постепенном увеличении концентрации этанола можно получить и более упорядоченные структуры типа ламеллярных микрокристаллов. Самоорганизация такого типа моделирует упаковку ДНК в головке фага и поэтому представляет значительный интерес [1161, 1290–1294]. Описанию структурной организации ДНК в составе таких структур и посвящена данная глава.

19.1. КОНДЕНСАЦИЯ ДНК С ОБРАЗОВАНИЕМ ψ-ФОРМЫ, СВЕРХСПИРАЛЕЙ, БУС, ПАЛОЧКООБРАЗНЫХ И ТОРОИДАЛЬНЫХ СТРУКТУР

Если в водном растворе постепенно увеличивать концентрацию Mg^{2+} [1295], полиаминов или основных полипептидов [1295–1301], полиэтиленоксида или других инертных полимеров [1300], а также этанола

[1302–1306], то полианионная молекула ДНК компактизуется в конденсированные формы с различной морфологией. Из этих форм наименее изучена макроскопически плотная ψ-ДНК, которая образуется в присутствии «инертного» полимера и избытка соли. В других условиях, например при добавлении полиаминов и этанола, ДНК образует структуры, напоминающие сверхспирализованные нити, нити с бусинами, а также прямые или слегка изогнутые палочки. Конкретный вид структуры зависит главным образом от ионной силы раствора и природы катиона. Следует подчеркнуть, что во всех этих конденсированных структурах ДНК, вообще говоря, находится в обычной В-форме.

ψ-форма: почти параллельное расположение молекул ДНК в слабоупорядоченных агрегатах. При добавлении к водному раствору ДНК соли (до высоких концентраций) и этанола или таких макромолекул, как полиэтиленоксид, полиакрилат и поливинилпирролидон, происходит обратимый кооперативный переход ДНК в компактную форму, названную ψ-ДНК (ψ – результат сокращения английского выражения "polymer-and salt-induced condesation") [1295, 1296]. Опыты по рассеянию рентгеновских лучей показали, что в ψ-ДНК двойные спирали обычной В-формы ориентированы более или менее параллельно и находятся на расстоянии ~ 38 Å друг от друга; отсутствие рефлексов высокого порядка свидетельствует об относительно слабой упорядоченности ψ-ДНК. При увеличении концентрации инертного полимера расстояние между соседними молекулами уменьшается до 25 Å, т.е. мало отличается от межмолекулярного расстояния (~ 23,9 Å) в микрокристаллах ДНК (разд. 19.2). ψ-ДНК образуется также при добавлении к водному раствору ДНК NaCl в различной концентрации и этанола. Исследование спектров КД показало, однако, что ситуация в этой и других подобных системах оказывается несколько сложнее [1296а]. При низкой концентрации соли и концентрации этанола 35% ДНК тимуса теленка конденсируется в форму, имеющую положительную эллиптичность в диапазоне 250–300 нм (ψ^+-форма). При повышении концентрации NaCl эллиптичность уменьшается и меняет знак (образуется ψ^--форма); при этом структура проходит несколько промежуточных состояний. Предполагается, что во всех этих состояниях изменяется лишь характер агрегации молекул, а ДНК неизменно остается в В-форме.

Три вида компактных форм ДНК, которые образуются в растворах разной ионной силы при осаждении спиртом. При концентрации этанола 50–95% ДНК конденсируется в различные структуры, морфология которых определяется величиной ионной силы. Следовательно, упаковка двойной спирали ДНК зависит не только от способности ДНК укладываться в упорядоченные структуры, но также от плотности электростатического заряда вокруг этой полиэлектролитной молекулы [1305].

При низкой ионной силе ДНК компактизуется в левую сверхспираль. При осаждении из раствора, содержащего 95% этанола и 1 мМ Трис (pH 7,5), ДНК компактизуется примерно в 9 раз и образует волокна почти постоянного диаметра 80–90 Å. Эти волокна по структуре представ-

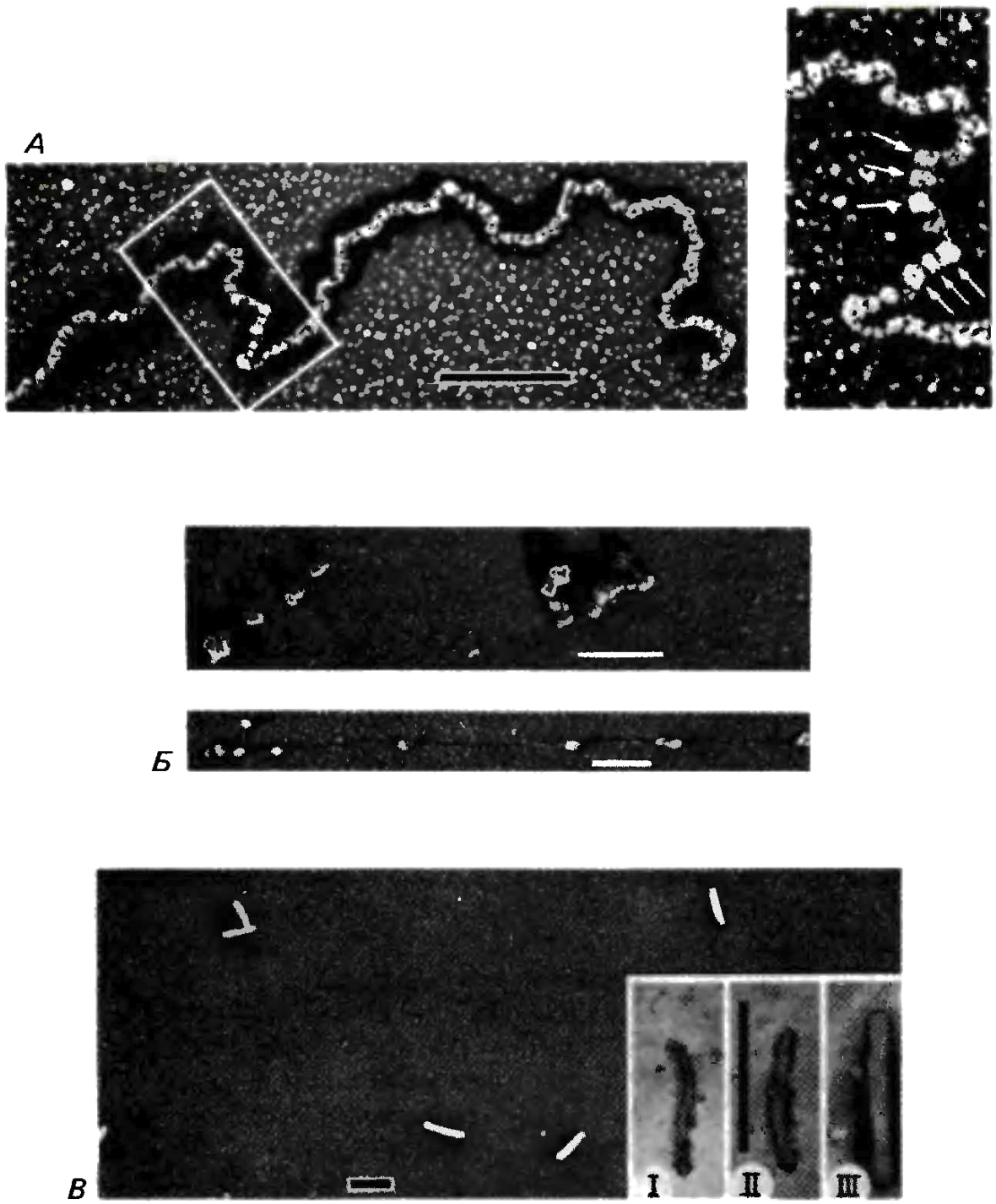


Рис. 19.1. Конденсация ДНК фага λ в 95%-ном этаноле при различных значениях ионной силы [1305]. Отрезок на электронных микрофотографиях соответствует 2000 Å. *А.* Перекрученные волокна, которые образуются при низкой ионной силе: 1 мМ Трис, pH 7,5. *Слева* – малое увеличение, *справа* – большое; видны элементы левой сверхспиральной структуры (указаны стрелками). *Б.* Волокна в виде нитей с бусинами, которые образуются при промежуточных значениях ионной силы: 1 мМ Трис, pH 7,5, 10 мМ ацетат аммония. *Вверху* – нерастянутые волокна, *внизу* – волокна, вытянутые при сорбции на угольную пленку-подложку, чтобы можно было видеть структуру нити с бусинами. *В.* Палочкообразные структуры, образующиеся при высокой ионной силе: 1 мМ Трис, pH 7,5, 0,5 М ацетат аммония. На вставках I, II и III показаны те же структуры при бо́льшем увеличении. «Палочки» образуются при складывании молекулы ДНК самой на себя с изменением направления цепи через каждые 2000 Å.

ляют собой левые сверхспирали (рис. 19.1, *А*), которые образуются, по-видимому, из-за постепенной дегидратации ДНК [1305].

При промежуточных значениях ионной силы ДНК образует волокна в виде нитей с бусинами. Если перед осаждением спиртом в раствор добавить ацетат аммония или другую соль до концентрации 10 мМ, то молекулы ДНК образуют волокна диаметром ~150 Å; это отвечает компактизации ДНК в 30–35 раз. Иногда волокна имеют вид нитей с бусинами (рис. 19.1, *Б*).

При высоких значениях ионной силы ДНК образует палочкообразные структуры. Если концентрацию ацетата аммония повысить до 0,15–0,5 М, то осаждение 95%-ным спиртом приведет к появлению палочкообразных частиц. Эти частицы имеют одинаковую длину (примерно 2000 Å) и пропорциональное молекулярной массе ДНК поперечное сечение. Возможно, такая структура образуется в результате многократного складывания молекулы ДНК самой на себя с изменением направления хода цепи через каждые 2000 Å. Волокна приблизительно такой же длины, но большего диаметра получаются при осаждении комплекса ДНК с полилизином или при замене этанола на спермидин [1305].

По своей способности складываться ДНК напоминает некоторые синтетические полимеры, которые образуют ламеллярные кристаллы. Молекула полимера может заполнять также несколько ламеллярных слоев [1307, 1308]. Такая же картина наблюдается в микрокристаллах ДНК (разд. 19.2), поэтому палочкообразные частицы ДНК можно рассматривать как фрагменты кристаллов.

Под электронным микроскопом кроме палочкообразных структур видны и тороидальные («бублики»). Они образуются при слипании двух концов одной палочкообразной частицы друг с другом. Соотношение между числом «палочек» и «бубликов» зависит от природы присутствующего в растворе катиона. Так, вероятность образования тороидальной структуры значительно возрастает в присутствии двухвалентных катионов типа Mg(II) [1299–1301, 1305]. Существование тороидальных структур свидетельствует о значительной гибкости «палочек». Они легко замыкаются в кольца, которые мы и наблюдаем, когда концы «палочек» достаточно прочно скреплены.

19.2. ЛАМЕЛЛЯРНЫЕ МИКРОКРИСТАЛЛЫ ФРАГМЕНТИРОВАННОЙ ДНК

При обработке ДНК ультразвуком она расщепляется на фрагменты, для которых характерно широкое распределение по длинам. Оказалось, что в отличие от нативной ДНК фрагменты, средняя длина которых равна ~2000 Å, при увеличении концентрации этанола до ~50% образуют ламеллярные гексагональные пластинки толщиной 1600–2400 Å и диаметром несколько микрометров [80, 89] (рис. 19.2).

Толщина кристаллов равна длине фрагмента ДНК. Электронная микроскопия реплик таких кристаллов, полученных методом замораживания-

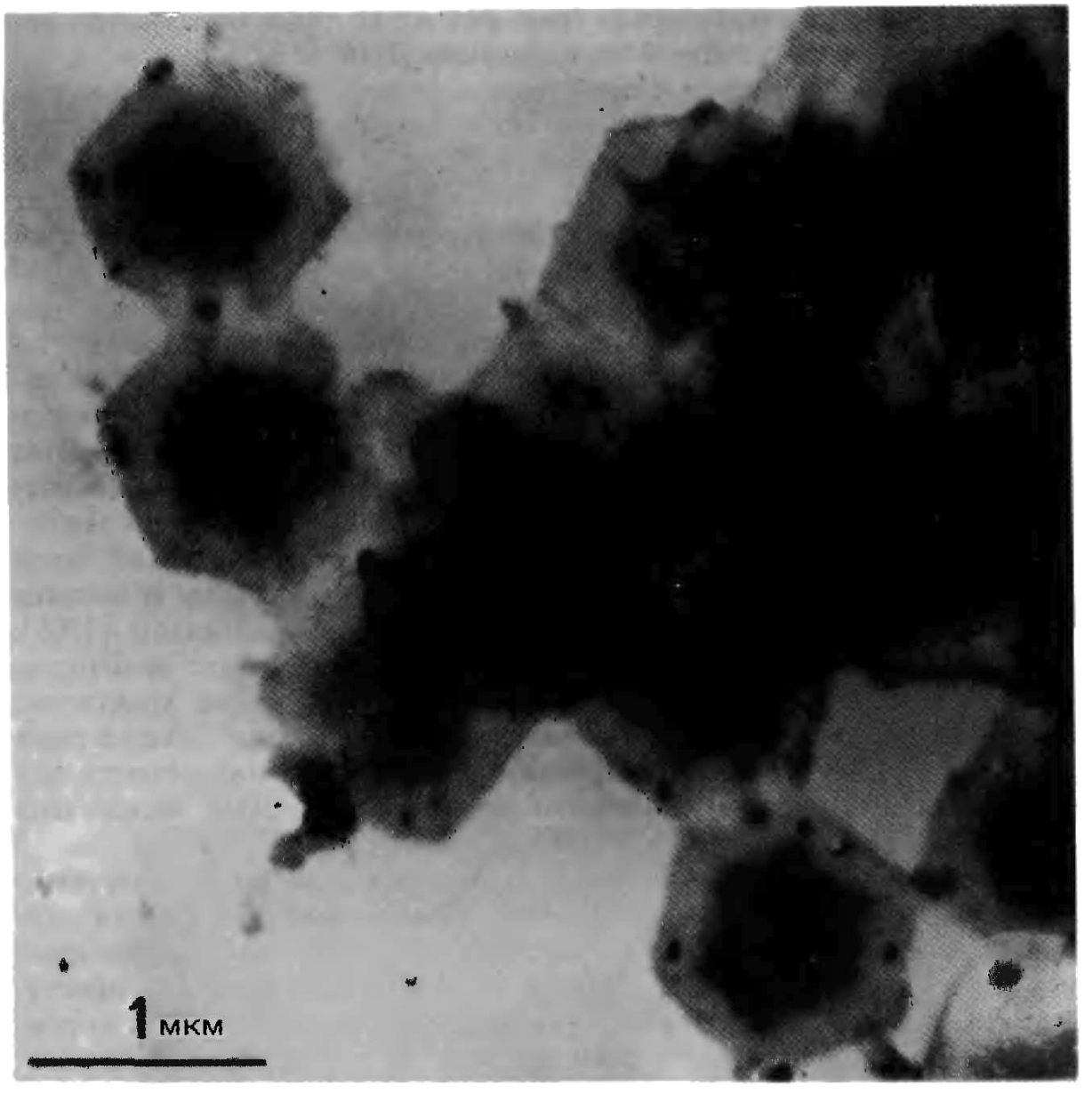


Рис. 19.2. Электронная микрофотография кристаллов, образованных фрагментами ДНК (2000 Å) спермы лосося [88]. Условия кристаллизации: 2–3 мг·мл$^{-1}$ ДНК, обработанной ультразвуком, в 0,05 М натрий-какодилатном буфере, pH 6,5. Этанол добавляли по каплям до появления мутности. Затем осадок растворяли, повышая температуру до 60–70°С, и медленно охлаждали раствор для того, чтобы получить кристаллы.

ния – скалывания – травления, и результаты рентгеновской дифракции на порошкообразных образцах привели к выводу, что кристаллы состоят из почти прямолинейных молекул ДНК В-формы, плотно упакованных в гексагональную решетку. Расстояние между соседними молекулами ДНК равно 23,9 Å. Молекулы ориентированы перпендикулярно поверхности гексагональных пластинок и вытянуты по толщине кристалла от одной поверхности до другой [89]. Поскольку длина фрагментов ДНК, из которых состоят кристаллы, колеблется от 1000 до 5000 Å [88], на-

иболее длинные молекулы должны сложиться по крайней мере вдвое. Следует отметить, что при этом два участка одной и той же молекулы не могут быть ближайшими соседями, поскольку ДНК не должна изгибаться слишком резко. Угол, на который изгибается молекула ДНК при складывании, должен отвечать значению персистентной длины [1304] или по крайней мере быть равным углам гипотетических изломов, которые обсуждались в разд. 14.2 и 14.3. Здесь уместно вспомнить, что длина палочек, которые образует ДНК (разд. 19.1), также составляет 2000 Å. Таким образом, 2000 Å, т.е. 60 витков спирали B-ДНК с шагом 34 Å,–это некая «магическая» величина для процессов, связанных с упаковкой ДНК.

19.3. В КЛЕТКАХ ДНК ОРГАНИЗОВАНА В ХРОМОСОМЫ

По мере повышения уровня эволюционного развития организма количество содержащегося в клетке генетического материала – ДНК – увеличивается от 10^4 до $\sim 10^{10}$ пар нуклеотидов. Иногда, например у некоторых бактериофагов *E. coli*, ДНК линейна. Однако у бактерий ДНК гораздо чаще (если не всегда) представляет собой кольцевую (или по крайней мере квазикольцевую) замкнутую молекулу, у которой два конца соединены вместе и не могут свободно вращаться [1310, 1311]. Кроме основной хромосомной ДНК в бактериях присутствуют небольшие кольцевые плазмидные ДНК. Молекулы ДНК такого типа обнаружены также в митохондриях и хлоропластах эукариотических клеток. Мол. масса типичной плазмиды составляет всего $10 \cdot 10^6$ [1314]. В последние годы такие малые кольцевые ДНК нашли важное применение в качестве векторов в генетической инженерии. В разд. 19.7 будут обсуждаться некоторые топологические проблемы кольцевых молекул ДНК.

Простое устройство бактериальной хромосомы. В таких бактериях, как *E. coli*, кольцевая хромосомная ДНК организована сравнительно просто. В клетке диаметром ~ 5 мкм находится молекула ДНК, контурная длина которой равна 1,36 мм, что отвечает числу пар $4 \cdot 10^6$ и мол. массе $2{,}8 \cdot 10^9$. Очевидно, что молекула ДНК в клетке должна сильно компактизоваться. Этой цели служит особая структура – кор, в состав которого входят РНК и белок; связываясь с кором, ДНК конденсируется и формирует плотно упакованные витки (рис. 19.3) [1313]. Таким образом, в клетках прокариот, как и в ядре эукариот, хромосомная ДНК тоже связана с основными белками и РНК [1314а].

В клетках эукариот хромосомная ДНК в комплексе с гистонами образует хроматин. В клеточном ядре эукариот, объем которого приблизительно такой же, как и объем всей бактериальной клетки, содержится гораздо большее количество ДНК, поэтому ее структурная организация в этом случае существенно сложнее. В соматических клетках различных организмов содержится от нескольких единиц до нескольких десятков хромосом. В клетках человека, например, присутствует 46 хромосом, каждая из которых содержит молекулу ДНК со средней длиной 4 см. Ес-

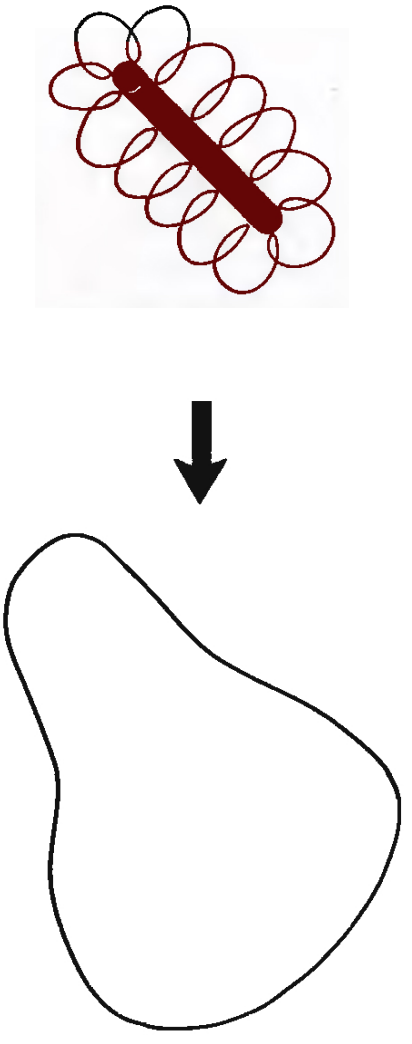


Рис. 19.3. Хромосома клеток прокариот, например *E. coli*, содержит единственную кольцевую молекулу ДНК, сверхспирализованную и упакованную в компактную структуру вокруг кора, содержащего РНК и белок [1313].

ли все молекулы клеточной ДНК сложить одну за другой, то получится нить длиной ~ 2 м; суммарная мол. масса ДНК составляет $4 \cdot 10^{12}$, что эквивалентно $5{,}5 \cdot 10^9$ пар оснований (дополнение 19.1; рис. 1.4).

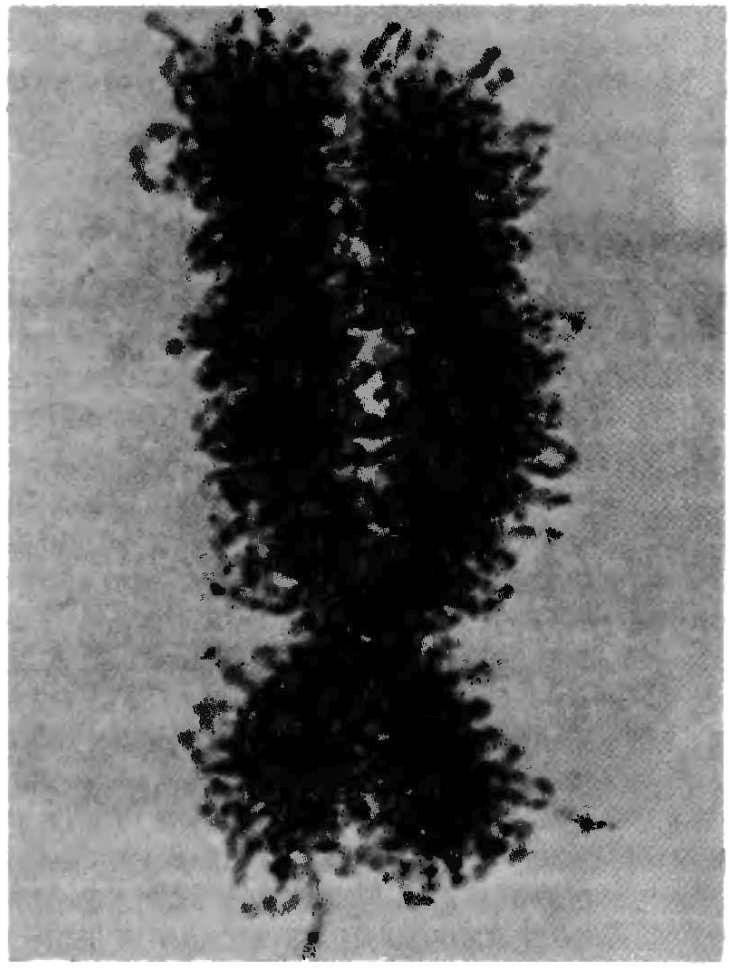
ДНК в хромосомах эукариот связана с РНК и белками. Среди этих белков следует выделить гистоны – основные белки, выполняющие в хроматине структурную функцию; весовое отношение ДНК/гистоны в хроматине равно ~ 1. Кроме гистонов в хромосомах содержатся другие, главным образом кислые белки; для них весовое соотношение ДНК/белок колеблется от 0,5 до 1,5 в зависимости от типа клетки и ее физиологического состояния.

Комплекс ДНК с гистонами обычно называют хроматином. Вначале предполагали, что ДНК в хроматине покрыта равномерным слоем гистонов [1315]. Однако, судя по электронным микрофотографиям, это не так. Гистоны в хроматине образуют небольшие глобулярные частицы диаметром ~ 100 Å, которые располагаются вдоль молекулы ДНК на расстоянии 30–70 Å друг от друга. Эти частицы, которые называют нуклеосомами [1316] или ν-частицами [1317], содержат 5 разных типов гистонов. Пары молекул гистонов H2A, H2B, H3 и H4 образуют окта-

Дополнение 19.1

Интерфазные и метафазные хромосомы

В зависимости от стадии жизненного цикла эукариотической клетки ДНК в ней может присутствовать в виде двух основных, макроскопически различающихся форм. В одной форме ДНК лишена определенной макроструктуры и занимает фактически все клеточное ядро; это означает, что клетка находится в *интерфазе* – состоянии, в котором происходит репликация и транскрипция. Вторая, конденсированная форма ДНК, существует гораздо более короткое время, на стадии деления клетки (митоз, *метафаза*), и имеет характерный вид, показанный на рисунке.



Электронная микрофотография хромосомы 12 человека. Такая хромосома состоит из хроматина, уложенного в волокна диаметром 200–300 Å и длиной 700–800 мкм, и содержит двухцепочечную ДНК общей длиной около 4 см [1314].

мер [1318, 1319], на который навита цепь ДНК; с каждым гистоновым октамером связаны почти два левых сверхвитка ДНК [1321]. Места «входа» и «выхода» ДНК скреплены гистоном H1, который, по-видимому, локализован с наружной стороны нуклеосомы, на ДНК [1322–1330] (дополнение 19.2).

Дополнение 19.2

Общие свойства гистонов

Гистоны – это белки, содержащие в большом количестве основные аминокислотные остатки. С-концевые участки гистонов H2A, H2B, H3 и H4 являются гидрофобными, а N-концевые – гидрофильными (основными); считается, что гидрофобные участки гистонов имеют выраженную вторичную (спиральную) структуру. Гистон H1 по своим свойствам отличается от остальных гистонов; он имеет другую молекулярную массу и связывается непосредственно с ДНК, тогда как остальные четыре гистона образуют октамер, содержащий по 2 молекулы гистона каждого типа. Молекула ДНК обвивается *вокруг* этого октамера, формируя $1\frac{3}{4}$ левых сверхвитка [1330].

Молекулярные свойства гистонов [1330]

Гистон	Мол. масса	Число аминокислотных остатков			
		всего	основных[1)]	Lys	Arg
H1	22000	220	65	62	3
H2A	14000	129	30	14	12
H2B	13800	125	30	20	8
H3	15300	135	33	13	18
H4	11300	102	26	11	14

[1)] Lys, Arg и His.

19.4. СТРУКТУРА НУКЛЕОСОМНОЙ КОР-ЧАСТИЦЫ

Если метафазную хромосому суспендировать в среде с низкой ионной силой, то она разворачивается и принимает форму, по виду напоминающую нитку бус. В зависимости от организма и типа клетки в такой хромосоме на каждую нуклеосому приходится в среднем 180–250 пар оснований ДНК, причем чаще всего имеет место соотношение «одна нуклеосома на 200 пар ДНК»» [1318, 1327]. После обработки микрококковой нуклеазой и последующей очистки из хроматина удается выделить нуклеосомные частицы без гистона H1, содержащие фрагмент ДНК длиной 146 ± 1 пар оснований, которые называют нуклеосомным кором [1332].

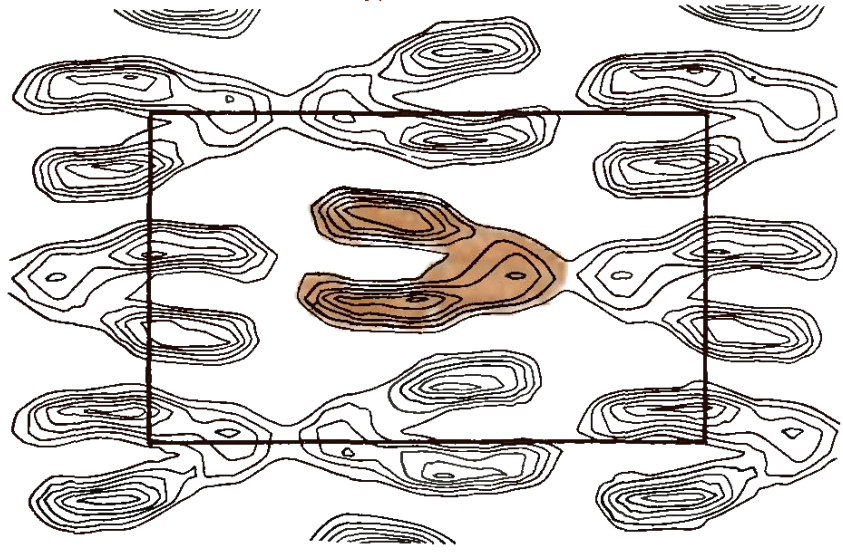
Взаимное расположение восьми молекул гистонов в такой частице более или менее известно. Эксперименты по самосборке гистоновых молекул в растворе и химическому сшиванию получающихся комплексов показали, что центральным кором октамера является легко образующийся тетрамер $H3_2$, $H4_2$; кроме него образуются также прочные димеры (H2A, H2B) и (H2B, H4) и слабосвязанные димеры (H2A, H4) и (H2B, H3) [1323, 1327, 1330]. Гистоновый октамер по форме напоминает сердце (рис. 19.4 и 19.5); центральную и нижнюю его части образует тетрамер $H3_2$, $H4_2$, а верхние выступы – два димера (H2A, H2B) [1330]. Октамер, по-видимому, стабилизируется гидрофобными взаимодействиями между С-концевыми участками гистонов (дополнение 19.2), а богатые аргининовыми и лизиновыми остатками N-концевые участки располагаются на поверхности октамера и связываются с ДНК, которая обвивает гистоновый кор, образуя около двух левых сверхвитков.

Нуклеосомные кор-частицы образуют монокристаллы и агрегаты дугообразной и спиральной формы. Нуклеосомные кор-частицы, содержащие фрагмент ДНК длиной в 146 пар оснований, могут образовывать микрокристаллы; электронно-микроскопические исследования этих кристаллов дают представление об общих размерах нуклеосом [1327]. Однако в тех же условиях, при которых происходит кристаллизация, образуются также агрегаты нуклеосом цилиндрической и дугообразной формы; при этом в цилиндрических агрегатах нуклеосомные частицы уложены в спиральную структуру. По данным электронной микроскопии во всех этих структурах каждая отдельная нуклеосома имеет вид компактного толстого бочонка высотой 57 Å и диаметром 110 Å. Поскольку при агрегации нуклеосом образуются дугообразные структуры разной кривизны, можно предположить, что либо сами нуклеосомные кор-частицы обладают достаточной гибкостью, либо при агрегации изменяется характер межмолекулярных взаимодействий и это приводит к изменению кривизны. Кроме того, само существование агрегатов свидетельствует о том, что нуклеосомные кор-частицы имеют тенденцию слипаться друг с другом, причем слипание идет главным образом по торцам бочонков [1331].

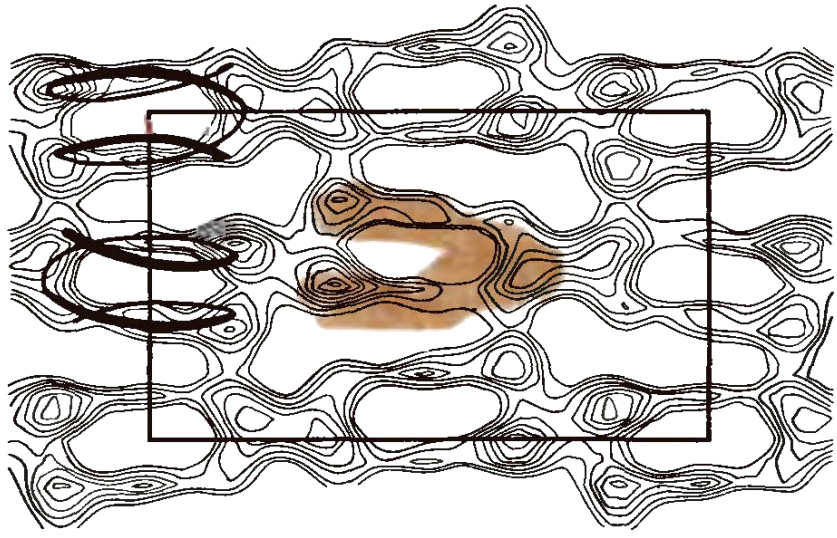
Если в мягких условиях расщепить нуклеосомный кор протеазами, получатся частицы, которые сохраняют первоначальную форму и дают при кристаллизации достаточно большие, пригодные для рентгеноструктурных исследований кристаллы. Для этих кристаллов с помощью дифракции рентгеновских лучей и нейтронов в сочетании с электронно-микроскопическими методами были получены карты электронной плотности с разрешением 20 Å [1332, 1333] (рис. 19.4).

Нуклеосомная кор-частица, состоящая из гистонового октамера и навитых на него левых сверхвитков $\left(1\frac{3}{4}\right)$ ДНК, обладает симметрией 2-го порядка. Судя по картам электронной плотности, нуклеосомный кор имеет форму сплюснутого клиновидного цилиндра (с размерами, указанными выше), который состоит из двух четко разграниченных поло-

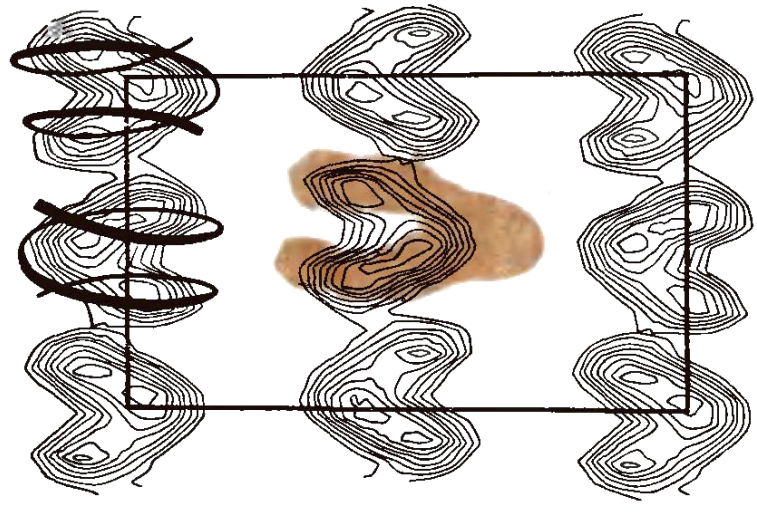
ДНК + белок



ДНК



Белок



вин (рис. 19.4). С помощью метода вариации контраста, в котором используются растворы с различным соотношением D_2O/H_2O [чтобы поочередно скомпенсировать рассеяние нейтронов на ДНК (65% D_2O) и на белке (39% D_2O)], было четко показано, что сам гистоновый октамер по форме напоминает сердце и обвит $1\frac{3}{4}$ витка левой сверхспирали ДНК с шагом 27 Å. Такую же организацию имеют нуклеосомные кор-частицы и в растворе [1320, 1324] (рис. 19.5, 19.6).

Если исходить из того, что ДНК в нуклеосоме находится в В-форме (т.е. имеет диаметр 20 Å), то мы получим, что при наружном диаметре нуклеосомной кор-частицы 110 Å диаметр сверхспирали ДНК равен 90 Å; это означает, что на один виток сверхспирали ДНК должно приходиться 80 пар оснований. Учитывая эти оценки, а также результаты по расщеплению нуклеосомных коров панкреатической дезоксирибонуклеазой (ДНКазой I), можно сделать вывод, что кор должен обладать симметрией 2-го порядка [1333–1335] (рис. 19.5). В пользу такого предположения свидетельствуют следующие факты. Во-первых, места предпочтительного расщепления ДНК находятся друг от друга на расстоянии 10 пар оснований, как и следовало ожидать для В-формы ДНК. Во-вторых, места наиболее частого расщепления разделены расстоянием в 80 нуклеотидов, что предположительно соответствует размеру витка сверхспирали. И наконец, локализация мест «частого» и «редкого» расщепления показывает, что для нуклеосомного кора в целом характерно наличие оси симметрии 2-го порядка.

При закручивании ДНК вокруг гистоновых октамеров происходит локальное перекручивание двойной спирали. Немного забегая вперед (этот вопрос будет обсуждаться в разд. 19.7, где вводятся понятия порядка зацепления, райзинга и кручения кольцевых ДНК), отметим, что при формировании вокруг гистонового октамера сверхвитков двойная спираль ДНК перекручивается. Был проведен эксперимент, в котором очищенную кольцевую ДНК вируса SV40 инкубировали с гистоновыми октамерами. При образовании нуклеосомных частиц спираль ДНК делала

Рис. 19.4. Результаты, полученные с помощью рентгеновской и нейтронной дифракции, демонстрирующие структуру полного нуклеосомного кора (*вверху*), одной только ДНК (*в центре*) и белкового компонента (*внизу*) [1327]. Верхний рисунок получен по данным рентгеновской дифракции, остальные – по результатам рассеяния нейтронов с помощью метода вариации контраста, при котором используются растворы с различным соотношением D_2O/H_2O, чтобы поочередно скомпенсировать рассеяние на белке (39% D_2O, центральный рисунок) и на ДНК (65% D_2O, нижний рисунок). Цветной линией показаны границы элементарной ячейки кристалла; цветом выделена также одна из нуклеосомных кор-частиц, которые видны на рисунке в боковой проекции. Обратите внимание, что кор-частица имеет клиновидную форму и состоит из двух частей. Распределение плотности для ДНК (*в центре*) отвечает $1\frac{3}{4}$ сверхвитка.

Рис. 19.5. Модель нуклеосомного кора, состоящего из гистонового октамера $(H2A, H2B, H3, H4)_2$, расположенного в центре, и фрагмента ДНК длиной 146 пар оснований, который навивается на гистоновый октамер, образуя левые сверхвитки. Показана ось симметрии 2-го порядка (*слева*). Полная нуклеосомная частица содержит фрагмент ДНК длиной 166 пар оснований, который образует два сверхвитка. Гистон H1 располагается у края нуклеосомы и скрепляет точки «входа» и «выхода» ДНК (*справа*).

вокруг каждого октамера почти два оборота, в результате чего в кольцевой молекуле возникало напряжение. Затем ДНК переводили в релаксированное состояние с помощью топоизомеразы I [1321]. После удаления гистонов была получена кольцевая ДНК с отрицательной сверхспирализацией, причем на нуклеосому приходилось от -1 до $-1\frac{1}{4}$ (в среднем $-1\frac{1}{8}$) сверхвитка. Из этих данных следует, что на виток двойной спирали ДНК, закрученной вокруг гистонового октамера, приходится 10,0 пар оснований и, следовательно, по сравнению с ДНК в растворе, у которой на виток приходится 10,4 пар (гл. 9), она перекручена.

Взаимодействие с гистонами облегчает изгибание ДНК. Обычно считается, что из-за взаимного отталкивания отрицательно заряженных фосфатных групп, расположенных вдоль сахарофосфатного остова, двойная спираль ДНК ведет себя как довольно жесткий стержень [1336, 1337]. Однако теоретические расчеты показывают, что можно плавно обвить ДНК вокруг гистонового кора, не вводя в молекулу изломов, без которых, как предполагалось вначале (гл. 14), указанное закручивание невозможно. В пользу такой точки зрения свидетельствует и то обстоятельство, что основные аминокислоты на N-концевых участках гистонов будут частично нейтрализовать отрицательный заряд фосфатных групп ДНК. С помощью экспериментов по сшиванию можно показать, что гистоны взаимодействуют с двойной спиралью ДНК в основном со стороны главного желобка [1339]; это согласуется с изложенными выше представлениями о доступной поверхности ДНК (разд. 17.3). Как видно из рис. 19.7, все гистоны (за исключением гистона H1) связываются с ДНК таким образом, что нейтрализуют отрицательные заряды лишь с одной стороны двойной спирали; на противоположной

стороне отталкивание зарядов остается прежним, и все это должно способствовать изгибанию молекулы ДНК вокруг гистонового кора [1340].

19.5. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ НУКЛЕОСОМ В ВОЛОКНАХ ДИАМЕТРОМ 100 И 300 Å. СУПЕРСВЕРХСПИРАЛЬ, ИЛИ СОЛЕНОИД

Из-за больших размеров и сложности компонент нуклеосом и хроматина их структурная организация в хромосомах не является строго регулярной, поэтому для исследования структуры хромосом дифракционные

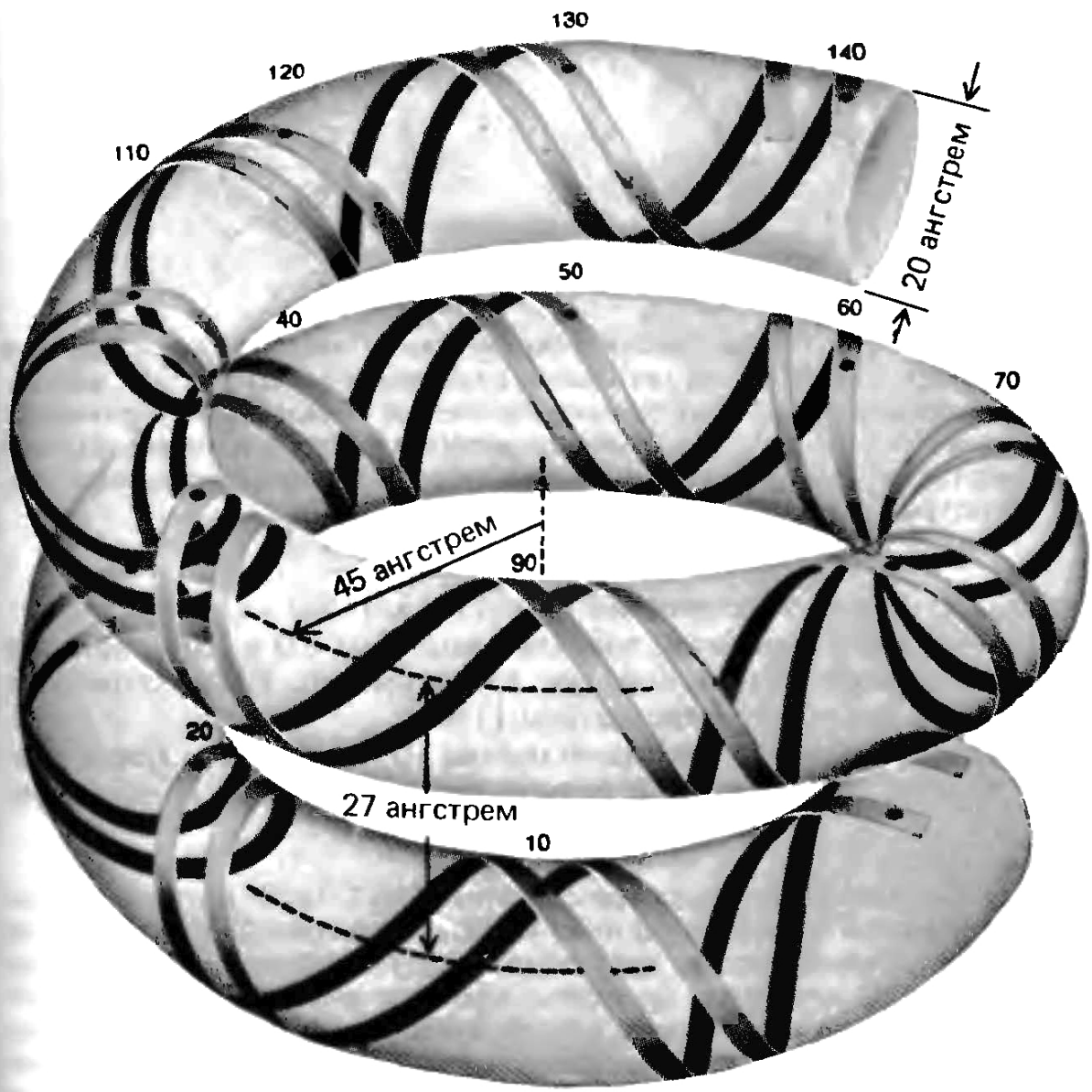


Рис. 19.6. Показанный крупным планом фрагмент ДНК, образующий $1\frac{3}{4}$ сверхвитка вокруг гистонового октамера [1327]. Диаметр ДНК равен 20 Å, наружный диаметр сверхспирали 110 Å, шаг сверхспирали 27 Å. На один сверхвиток приходится 80 пар оснований ДНК.

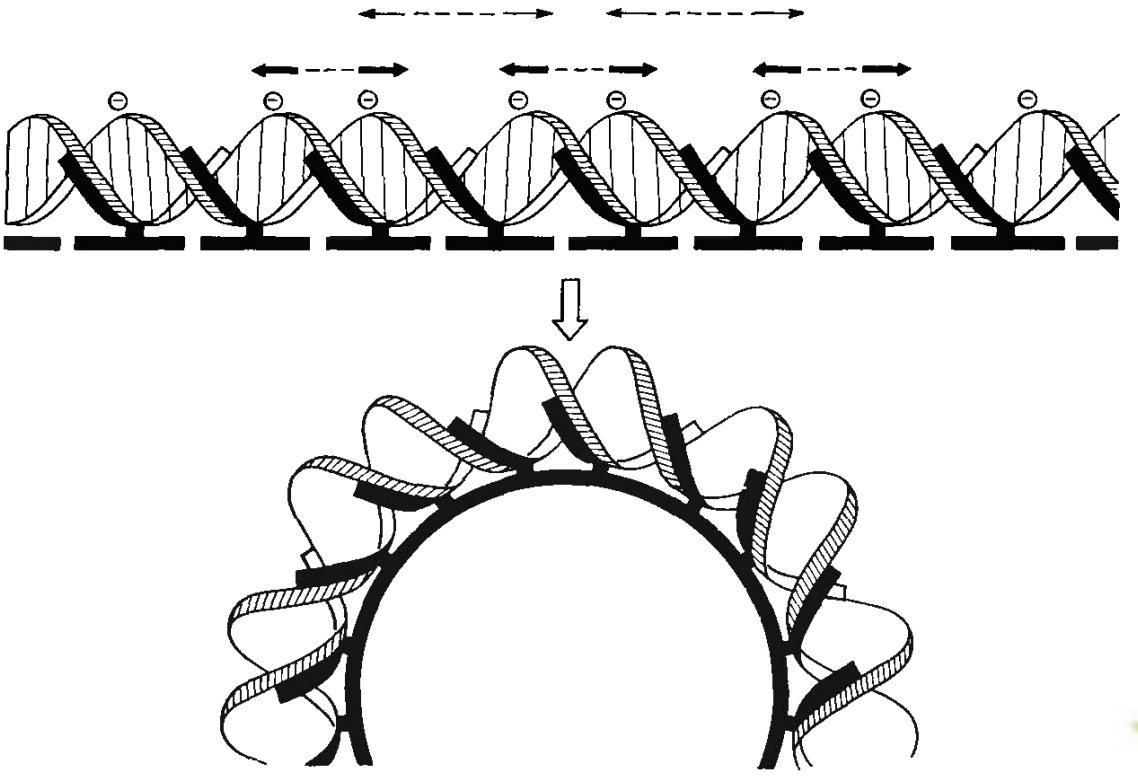
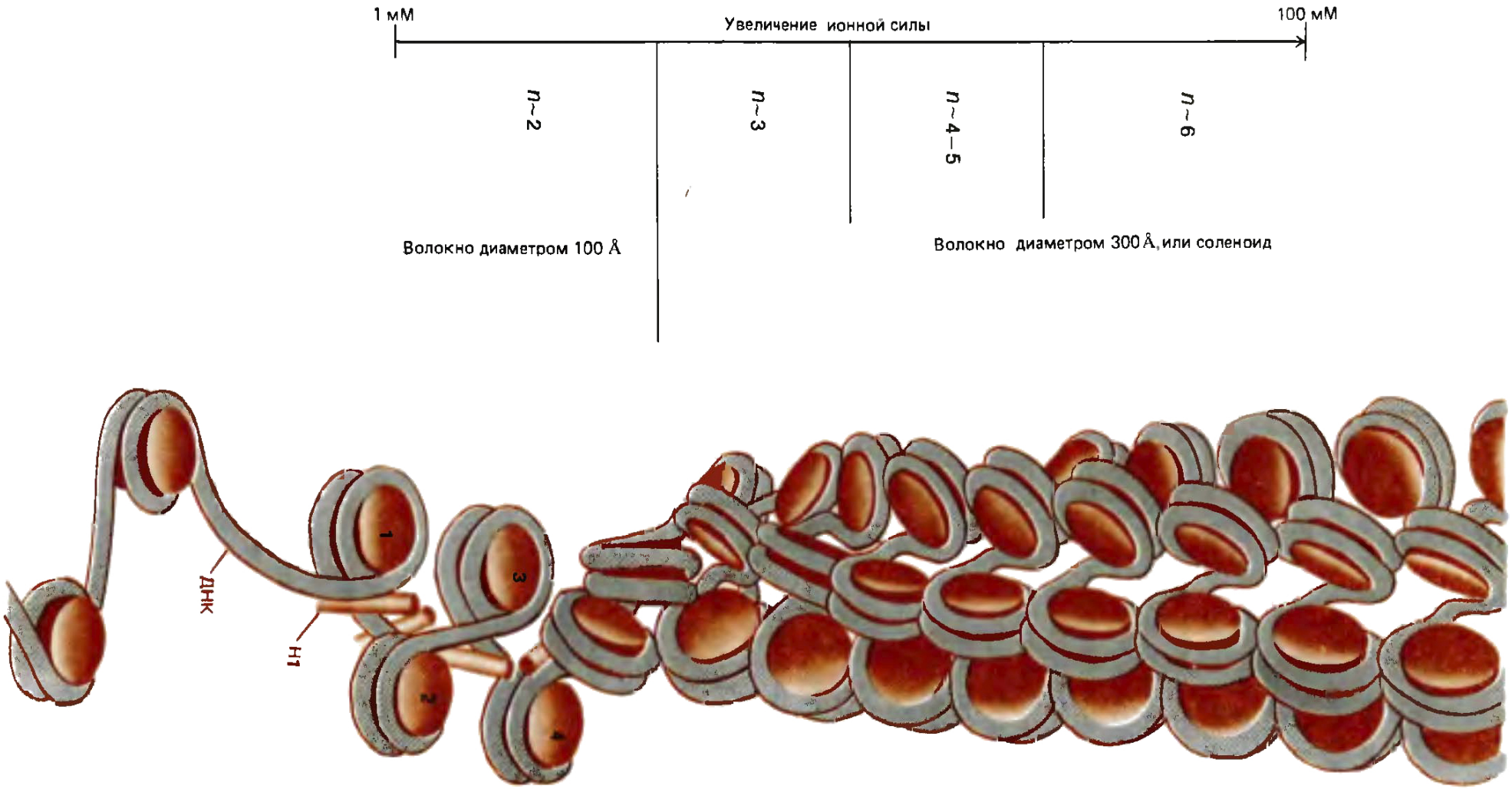


Рис. 19.7. Схема, иллюстрирующая асимметричную нейтрализацию зарядов фосфатных групп на ДНК при связывании с гистонами [1340]. Гистоны изображены в виде черных полосок. Электростатическое отталкивание заряженных фосфатных групп в минорном и главном желобках (жирные и тонкие стрелки) приводит к изгибанию молекулы ДНК, при котором гистоны оказываются внутри структуры.

методы оказываются непригодными. Чтобы хотя бы на макроскопическом уровне изучить строение волокон диаметром 100 и 300 Å, которые являются главной составной частью хромосом (рис. 19.8), используют электронно-микроскопические методы [1341].

Структура хроматина, лишенного гистона H1, нерегулярна. После удаления гистона H1 при низкой ионной силе нуклеосомы по-прежнему

Рис. 19.8. Соленоидальная структура хроматина [1327, 1341]. В отсутствие гистона H1 (в нижией части рисунка) точки «входа» и «выхода» ДНК оказываются на противоположных сторонах нуклеосомы и регулярной структуры не образуется. Гистон H1 «скрепляет» нуклеосому, при этом точки «входа» и «выхода» ДНК располагаются уже на одной стороне нуклеосомы. При увеличении концентрации соли нуклеосомы, содержащие гистон H1, образуют спиральную структуру, у которой на виток приходится 3–6 нуклеосом (n). При этом гистоны H1 группируются в центре спирали, скрепляя ее структуру, которая иначе была бы довольно рыхлой. Спираль может быть как правой, так и левой (на рисунке показана левая спираль) и не обязательно строго регулярной. Наружный диаметр соленоида равен 250–300 Å, шаг 110 Å (об альтернативной модели см. в тексте).


1 мМ
Увеличение ионной силы
100 мМ
n~2
n~3
n~4–5
n~6
Волокно диаметром 100 Å
Волокно диаметром 300 Å, или соленоид
ДНК
H1
1
2
3
4

располагаются вдоль молекулы ДНК примерно через каждые 200 пар оснований, однако теперь они не имеют такой регулярной структуры и точки «входа» и «выхода» ДНК располагаются не с одной, а с противоположных сторон нуклеосомы. При ионной силе выше 40 мМ NaCl такой хроматин образует уже не спиральную структуру, изображенную на рис. 19.8, а клубки неправильной формы. Таким образом, гистон H1 играет важную структурную роль и необходим для упаковки хроматина в структуры с более высоким уровнем организации.

Нуклеосомная нить и волокно диаметром 100 Å. Низкий уровень структурной организации. Если интактный хроматин, содержащий все гистоны, поместить в раствор с низкой концентрацией соли (~ 1 мМ NaCl), он образует развернутую структуру с хорошо различимыми нуклеосомами, у которых точки «входа» и «выхода» ДНК практически совпадают. Диаметр такой структуры равен 100 Å, и она называется нуклеосомной нитью [1341]. При увеличении ионной силы до 100 мМ NaCl длина спейсерных, или линкерных участков ДНК между нуклеосомами уменьшается, и это приводит к образованию более плотной конфигурации, в которой нуклеосомы уложены в зигзагообразную структуру. Такую форму обычно называют единичным волокном или волокном-100 Å (рис. 19.9).

Структура «соленоида» стабилизируется с помощью взаимодействия между гистонами H1. При дальнейшем увеличении ионной силы или при добавлении небольшого количества двухвалентных катионов (Mg^{2+}) единичные волокна образуют еще более плотную структуру – волокна диаметром 250 Å. Для описания молекулярной архитектуры этих волокон было предложено несколько моделей. Мы рассмотрим только две из них. Согласно одной модели, основанной на электронно-микроскопических исследованиях, волокна-100 Å сворачиваются в спиральную структуру, у которой – в зависимости от концентрации соли в растворе – на виток приходится от 3 до 6 нуклеосом (рис. 19.8). Общий диаметр такого соленоида [1342], или суперсверхспирали [1343], составляет 250–300 Å, а высота витка 110 Å. Знак спирали не обязательно фиксирован; она может быть как правой, так и левой. В частности, на рис. 19.8 приведена левая спираль.

Важной особенностью этой модели, а также других моделей, аналогичных данной и предложенных независимо [1343], является то обстоятельство, что нуклеосомы в волокне располагаются так, что гистоны H1 оказываются локализованными в центре соленоида и, следовательно, находятся в тесном контакте друг с другом. Это согласуется с результатами экспериментов по сшиванию, в которых наблюдается образование гомополимеров из гистонов H1 [1344, 1345]. Основной вклад в стабилизацию соленоида, очевидно, вносит взаимодействие гистонов H1, а не специфические контакты между нуклеосомами; в противном случае такие контакты в строго эквивалентных участках нуклеосом должны были бы привести к образованию из нуклеосом регулярной квазикристаллической спиральной структуры, чего на самом деле нет. Совершенно оче-

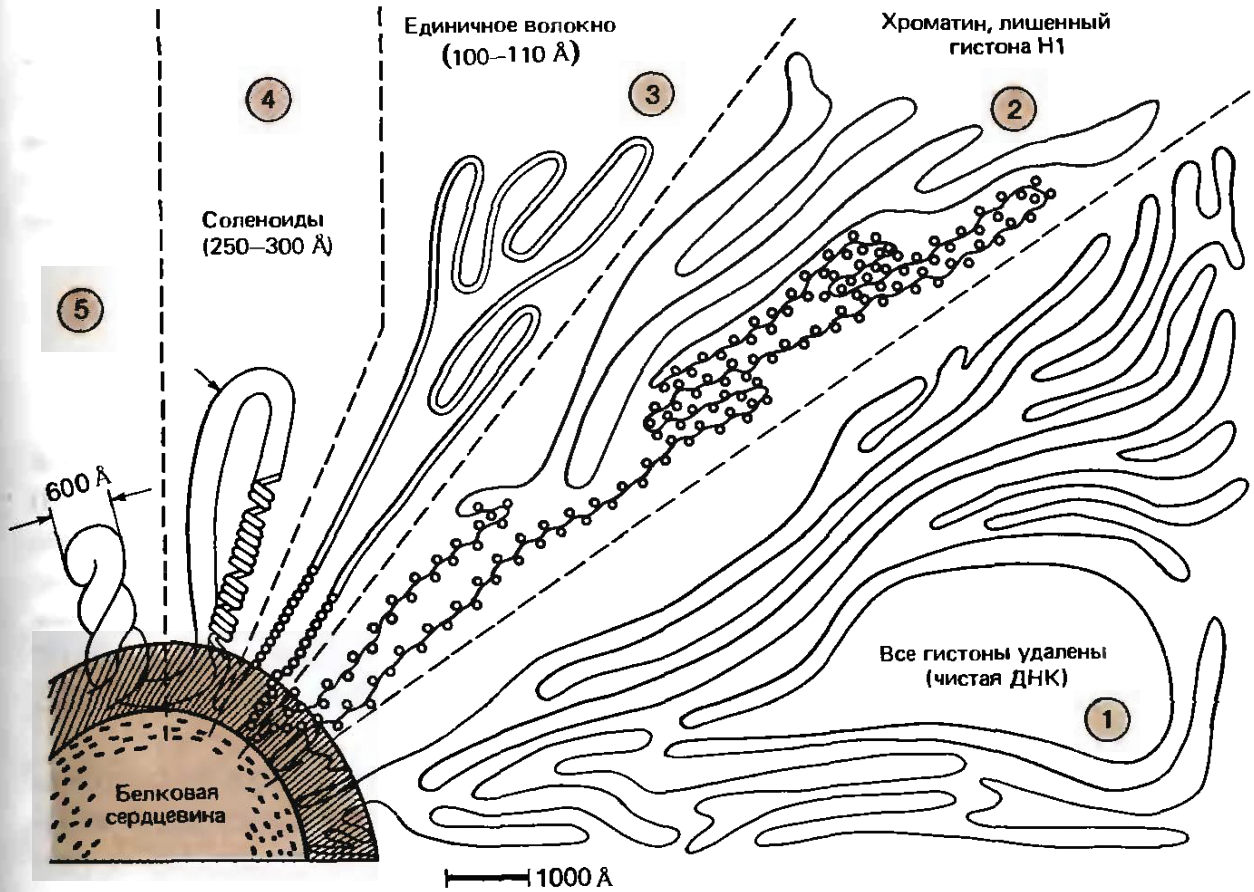


Рис. 19.9. Схематическое изображение последовательных уровней структурной организации ДНК в высококонденсированном хроматине [1332]. (1) ДНК, прикрепленная к белковой сердцевине (см. также рис. 1.5). (2) Добавление гистонов H2A, H2B, H3 и H4 приводит к образованию довольно рыхлой, но тем не менее конденсированной зигзагообразной структуры, которая при связывании с гистоном H1 образует волокна диаметром 100 Å. (3) Такие волокна (они показаны также в нижней части рисунка 19.8) образуются при низкой ионной силе. При увеличении ионной силы образуются «соленоиды», или «суперсверхспирали», диаметром 250–300 Å (4); они могут компактизоваться и дальше, образуя жгуты диаметром 600 Å (5).

видно также, что спейсерные участки, соединяющие нуклеосомы, не оказывают заметного влияния на стабилизацию соленоида, поскольку такая же структура образуется и из изолированных нуклеосомных частиц [1342, 1346].

В другой, более поздней модели предполагается, что повторяющейся единицей в структуре волокна диаметром 250 Å является не нуклеосома, а димер из двух зигзагообразно уложенных элементов волокна-100 Å. При закручивании этого волокна вокруг оси образуется цилиндрическая спираль диаметром 250–300 Å, в центре которой располагается спейсерная ДНК в конденсированной форме [1347]. На боковой поверхности этой спирали имеется желобок, способный разместить гистон H1, который в данном случае также будет стабилизировать общую структуру.

Хотя обе модели волокна диаметром 250 Å приписывают ему в целом сходную, спиральную структуру, они тем не менее предполагают совершенно разное расположение гистона H1 – в центре соленоида или на поверхности закрученного в спираль волокна-100 Å. В настоящее время трудно решить, какая из этих моделей справедлива, поскольку прямые экспериментальные данные о локализации гистона H1 в волокне отсутствуют.

19.6. ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМАТИНА В ХРОМОСОМЕ; ТРАНСКРИПЦИЯ

Формы структурной организации хроматина, схематически показанные на рис. 19.9, являются лишь частью общей картины структурного устройства хромосомы. В хромосомах хроматин прикреплен к белковому каркасу, который образует центральную часть структуры. Если удалить из хромосомы все гистоны, то под электронным микроскопом вокруг белкового каркаса будет виден «ореол» из ~4000 петель ДНК длиной от 40000 до 90000 пар оснований каждая (см. рис. 1.5) [1322, 1348].

По мере усложнения системы ДНК сначала связывается с гистонами, образуя хроматин в виде нитки бус. Затем происходит процесс компактизации хроматина – образование волокон-100 Å, волокон-300 Å (соленоидов) и еще более сложных, по-видимому, также спиральных структур (рис. 19.9). Степень компактизации ДНК в хромосоме достигает 5000–8000 [1322], а по некоторым оценкам даже 250000 [1327].

Как происходит транскрипция? В настоящее время об этом процессе известно далеко не все. Одна из чисто гипотетических моделей транскрипции показана на рис. 19.10. В результате локального раскручивания соленоидальной структуры высвобождаются содержащие гистон H1 неактивные нуклеосомы. После удаления гистонов H1 и связывания с белками HMG (high-motility-group) нуклеосомы становятся активными, разворачиваются (при этом остальные гистоны остаются связанными с ДНК и расположены вдоль нее в соответствующем порядке) и цепи ДНК временно расходятся. Некодирующая цепь ДНК по-прежнему связана с гистонами и белками HMG и не участвует в процессе транскрипции, тогда как комплементарная ей цепь транскрибируется РНК-полимеразным комплексом.

На новосинтезированной РНК сразу же формируются короткие спирали (вторичная структура) и происходит связывание РНК со структурными белками с образованием гетероядерного РНК-белкового комплекса, в котором РНК защищена от нуклеазного расщепления. Такой процесс происходит не на одном, а одновременно на многих участках хромосомы, и, таким образом, информация, содержащаяся в ДНК, быстро транскрибируется, после чего образовавшиеся молекулы мРНК подвергаются процессингу (сплайсингу) и транслируются на рибосомах [1349].

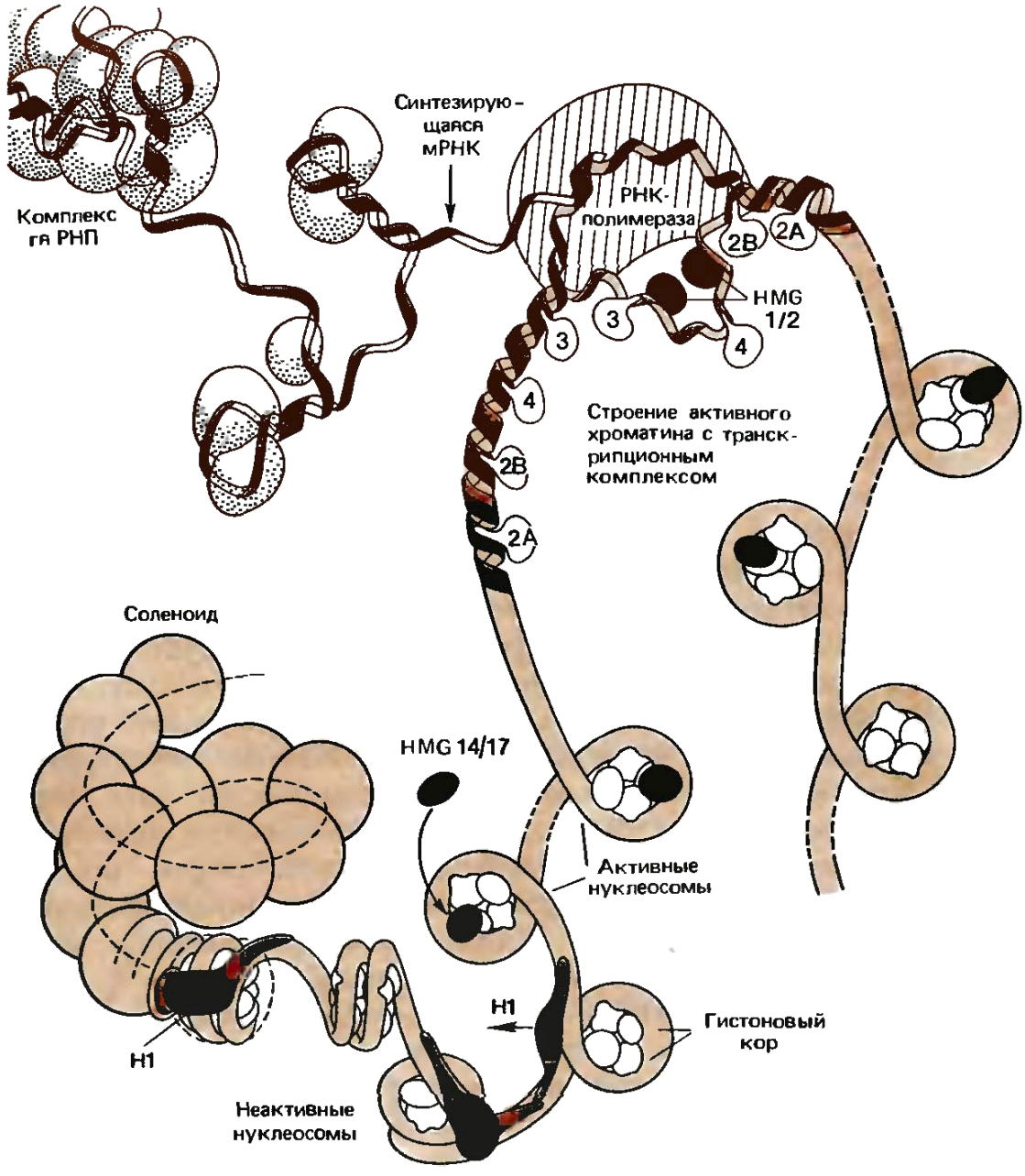


Рис. 19.10. Схематическое изображение транскрипции (описание см. в тексте) [1322].

19.7. ТОПОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ КОЛЬЦЕВЫХ ЗАМКНУТЫХ СВЕРХСПИРАЛЬНЫХ ДНК

Сверхспиральная ДНК – биологически активная форма молекулы [1349а]. Линейная двухцепочечная ДНК в растворе или волокне находится в топологически релаксированном состоянии. В этом состоянии она либо совсем неактивна, либо проявляет пониженную активность в таких процессах, как репликация, транскрипция и рекомбинация. Для того чтобы эти процессы протекали с нормальной скоростью, нужна ДНК в напряженном, сверхспиральном состоянии с более или менее детерминиро-

ванной пространственной структурой [1350–1354]. Наличие сверхспирализации ДНК означает, что мы имеем дело с кольцевой замкнутой формой ДНК, причем под замыканием в кольцо в данном случае подразумевается не обязательно образование «сшивки» между 3′- и 5′-концами обеих цепей ДНК, как это имеет место у бактериальных и митохондриальных плазмид [1349а], но и фиксация концов ДНК, например на хромосомном белковом каркасе у эукариот (разд. 19.5; рис. 1.5 и 19.9), или просто ограничение свободы вращения концов молекулы (в случае очень длинной двухцепочечной ДНК).

Что такое сверхспиральная ДНК? Если молекулу ДНК в обычной релаксированной В-форме замкнуть в кольцо, от этого она еще не станет сверхспиральной. Представим себе теперь, что перед тем, как замкнуть ее в кольцо и сшить концы друг с другом, мы слегка раскрутили двойную спираль, а после сшивания предоставили ей полную возможность вновь образовать нормальную В-форму. Молекула будет стремиться скомпенсировать предыдущее раскручивание. Однако наша ДНК представляет собой кольцевую замкнутую молекулу, поэтому то напряжение, которое мы ввели в нее, раскрутив двойную спираль, будет компенсироваться закручиванием кольца в сверхспиральную структуру, т. е. сверхспирализацией. Если до сшивания концов молекула была *раскручена*, говорят об *отрицательной* сверхспирализации, хотя сверхспираль будет правой (рис. 19.11). Обычно наблюдается именно такая сверхспирализация. При интеркаляции лекарственных препаратов в кольцевую ДНК возникает *положительная* сверхспирализация и образуется *левая* сверхспираль, как должно было бы произойти, если бы ДНК перед замыканием в кольцо *пере*крутили (рис. 16.3).

Сверхспирализацию ДНК регулируют особые ферменты – топоизомеразы. Эти ферменты были названы так потому, что они переводят ДНК из одной топологической формы в другую с перестройкой общей пространственной геометрии ДНК [1350–1358]. И у эукариот, и у прокариот были обнаружены топоизомеразы I – ферменты, снимающие сверхспирализацию без помощи АТР или других источников энергии. Эти ферменты иногда называют также свивелазами, ДНК-раскручивающими или ДНК-релаксирующими ферментами, N/C-ферментами (от англ. nicking-closing) или ω-белком (в *E. coli* [1356]). Они разрезают одну из цепей сверхспиральной двухцепочечной ДНК, поворачивают ее вокруг второй цепи и затем вновь сшивают, используя для этого процесса энергию сверхспирализации ДНК.

Обратный процесс – сверхспирализация релаксированной ДНК в клетках прокариот и эукариот – осуществляется ферментами, которые называют гиразами или топоизомеразами II [1357, 1358]. Субстратом для них служит обычная двухцепочечная ДНК. Фермент закручивает двойную спираль ДНК до тех пор, пока не будет достигнута нужная степень сверхспирализации – обычно это величина порядка одного отрицательного сверхвитка (т. е. один оборот правой сверхспирали) на ~15 витков двойной спирали В-ДНК [1354, 1358]. Такая изомеризация ДНК (ее механизм обсуждается в работе [1358]) требует энергетических за-

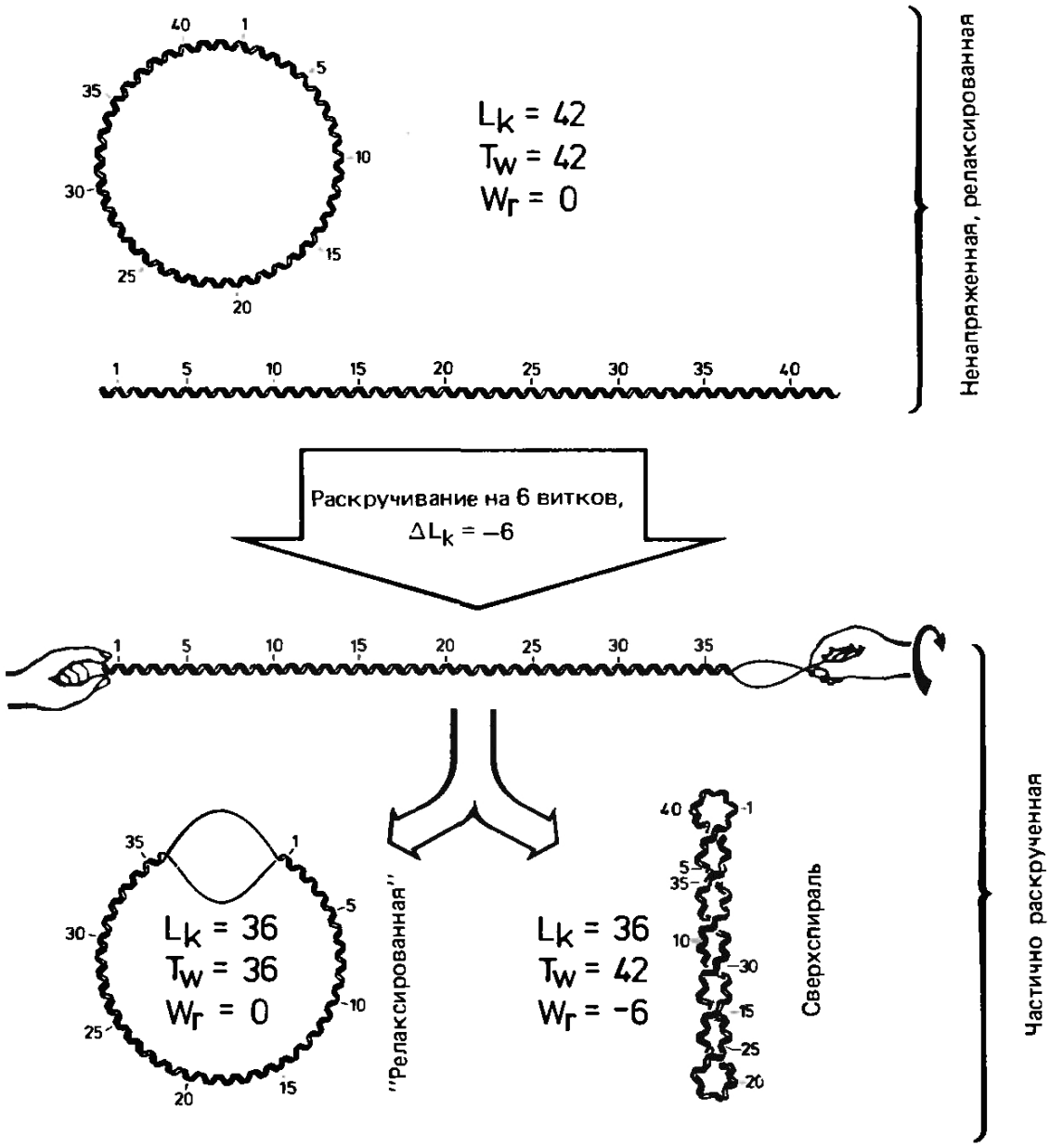


Рис. 19.11. Взаимосвязь между порядком зацепления L_k, кручением T_w и райзингом W_r. Одна из цепей ненапряженной релаксированной ДНК в B-форме (длиной 420 пар оснований) делает 42 оборота вокруг второй цепи: $L_k = T_w = 42$, $W_r = 0$ (*вверху*). Если теперь левый конец молекулы закрепить, а правый вращать, как показано на рисунке, чтобы он сделал 6 оборотов (двойная спираль при этом частично расплетается), то L_k и T_w уменьшатся до 36. Эту ДНК можно опять замкнуть в кольцо так, что будет соблюдаться условие $L_k = T_w = 36$, $W_r = 0$. Однако у такой молекулы пары оснований, составляющие 6 витков двойной спирали, должны быть разрушены. Поскольку ДНК стремится остаться в B-форме, на самом деле T_w увеличится до исходного значения (что соответствует 420 парам оснований), а порядок зацепления, который является топологическим инвариантом, останется равным 36. Таким образом, чтобы выполнялось уравнение (19.1), должен измениться параметр W_r – райзинг, т. е. теперь $W_r = -6$, и это означает, что образовалась правая сверхспираль из 6 сверхвитков.

трат, поэтому гираза для нормальной работы нуждается в ATP, а кроме того, в ионах Mg(II) и в спермине, стимулирующем эту реакцию.

Сверхспирализация как способ запасания энергии. Возможно, сверхспирилизация ДНК нужна не только для того, чтобы придать молекуле форму, необходимую для взаимодействия с определенными белками, и не только для того, чтобы снять напряжение в репликационной вилке [1350]. Возможно, сверхспирализация представляет собой новый способ запасания энергии по аналогии с финансовым принципом [1358]: покупаем (используем энергию сверхспирализации) сейчас, платим (закручиваем ДНК в сверхспираль с использованием энергии ATP) потом. Продолжая аналогию, уместно задаться вопросом о валюте, которая используется в этих сделках. С одной стороны, мы имеем ATP/Mg(II), с другой – порядок зацепления сверхспиральной ДНК. Что же такое порядок зацепления?

Порядок зацепления, райзинг и кручение – параметры, позволяющие математически описывать сверхспиральное состояние. Для описания сверхскрученной замкнутой ленты математики вывели уравнение, которое применимо и для описания сверхспиральной ДНК [1359–1362].

В этом уравнении *порядок зацепления* L_k (от англ. linking number) является целочисленным инвариантом для любых топологических состояний замкнутого кольца. В случае ДНК L_k равно числу оборотов одной полинуклеотидной цепи вокруг другой; при этом правоспиральному кручению (как в двойной спирали ДНК) соответствуют положительные значения L_k, а левоспиральному – отрицательные. У релаксированной, ненапряженной кольцевой ДНК L_k совпадает с величиной T_w (*кручением* ДНК), которая равна числу витков двойной спирали (рис. 19.11); при этом форма молекулы ДНК соответствует плоскому кольцу:

$$L_k = T_w.$$

Если бы двойная спираль ДНК обладала способностью отвечать на раскручивание (или закручивание) уменьшением (или увеличением) угла спирального вращения, это соотношение выполнялось бы всегда и явления сверхспирализации не возникало. Однако ДНК выгодно (при заданных условиях среды) оставаться в B-форме с числом пар на виток, равным 10,5; поэтому значение T_w может меняться лишь в очень узких пределах; внесенное в порядок зацепления изменение может компенсироваться либо разрушением нескольких пар оснований (рис. 19.11), либо, что более вероятно, сверхспирализацией ДНК. Число витков в сверхспирали определяется райзингом W_r [1360], и три параметра – L_k, T_w и W_r – связаны соотношением

$$L_k = T_w + W_r. \qquad (19.1)$$

Как уже говорилось, L_k является целочисленным инвариантом и, следовательно, не меняется, если кольцо ДНК остается замкнутым. Па-

раметры T_w и W_r могут принимать любые значения в зависимости от пространственной формы ДНК. Следует подчеркнуть, что по определению L_k и T_w положительны в случае правых спиралей и отрицательны в случае левых, а райзинг W_r, наоборот, отрицателен в случае правой сверхспирали и положителен в случае левой (см. рисунок в дополнении 19.3).

Дополнение 19.3

Определенне райзинга

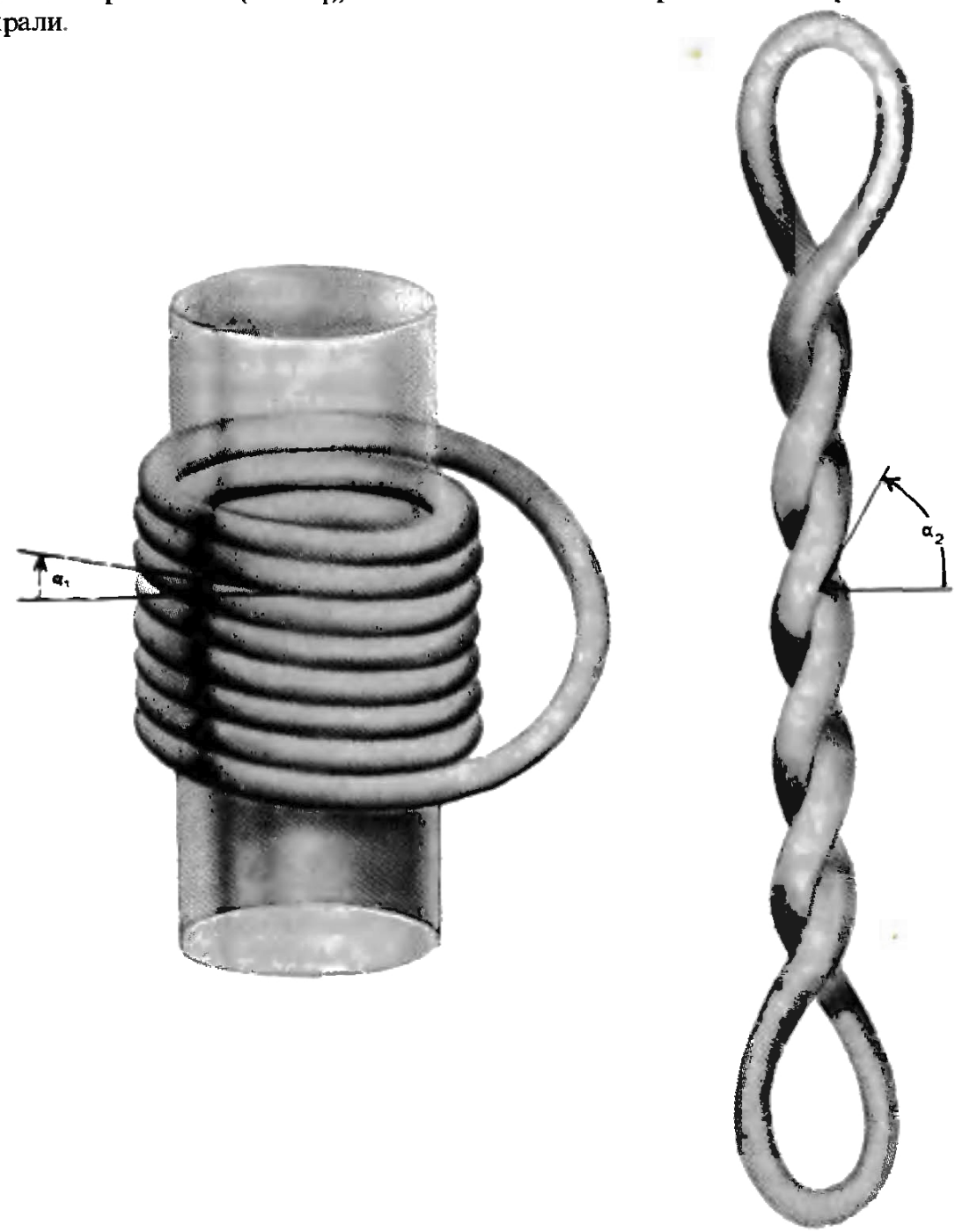
Словесное определение знака сверхспирали ДНК такое же, как и в случае двойной спирали (т.е. связано с понятием левого и правого винта). Однако знак, приписываемый райзингу W_r, который используется при описании сверхспиралей, определяется по-другому. Это требует некоторых пояснений, для которых мы воспользуемся рисунком, приведенным ниже.

Предположим, что резиновую трубку, которую мы будем использовать в качестве модели двойной спирали ДНК, намотали на цилиндр так, что образовалось N *лево*винтовых витков. Свободный конец трубки во время наматывания мог свободно вращаться. После этого концы трубки соединили и удалили цилиндр. Трубка сразу же перейдет в другую топологическую конфигурацию, которая будет представлять собой аналог закрученной на себя двойной спирали (= сверхспирали). У этой сверхспирали угол α_2 (см. рисунок) будет больше, чем угол α_1 у исходной левовинтовой структуры, при этом в сверхспирали «образуется» приблизительно $N/2$ витков. На самом деле мы видим на рисунке не $N/2$ (т.е. не 4), а только 3 витка, потому что искривление осевой линии трубки (райзинг) при сворачивании ее в сверхспираль частично компенсируется внутренним кручением и появлением изгибов на обоих концах сверхспирали. Самое удивительное, что получившаяся сверхспираль оказывается правой. Тем не менее, поскольку мы начинали с левого винта, определим число сверхвитков спирали *отрицательной* величиной, $-N/2$ [1357, 1365]. При подсчете райзинга W_r учитываются все точки пересечения, поэтому в нашем примере $W_r = -8$ (см. подпись к рисунку).

Наша трубка (ДНК) при образовании сверхспирали раскручивается на N витков, $\Delta T_w = -N$. Вы можете это легко проверить с помощью следующего эксперимента. Возьмите резиновую трубку за два конца и вращайте конец, который вы держите в правой руке, по часовой стрелке («по правому винту»). Это будет соответствовать раскручиванию двойной спирали ДНК (в чем вы можете легко убедиться, если возьмете не шланг, а скрученную в «правую спираль» веревку или телефонный шнур). Если сделать N вращений (т.е. повернуть конец трубки на угол $N \cdot 360°$), то порядок зацепления нашей модели ДНК уменьшится: $\Delta L_k = -N$. Теперь соедините концы трубки и дайте ей возможность принять равновесную, сверхспиральную форму. Образовавшаяся сверхспираль будет в точности идентична той, которая получалась ранее, в результате наматывания трубки на цилиндр (см. рисунок).

Эти опыты моделируют закручивание молекулы ДНК вокруг гистоновых октамеров в нуклеосомах. В разд. 19.4 был описан эксперимент, в котором закрученную в левую спираль вокруг гистонового октамера кольцевую ДНК переводили в релаксированное состояние при помощи топоизомеразы I. После удаления гистонов «недокрученная» ДНК сворачивалась в правую сверхспираль.

Причину образования этой сверхспирали можно понять, обратившись к уравнению (19.1). Поскольку ДНК стремится сохранить B-форму, значение ΔT_w будет близко к нулю. Поэтому недокручивание ($-\Delta L_k$) должно компенсироваться изменением райзинга ($-\Delta W_r$), что эквивалентно образованию правой сверхспирали.



Определение райзинга. Предположим, что резиновая трубка свободно, без напряжения, намотана на цилиндр, образуя при этом 8 *левых* витков. Если соединить концы этой трубки и удалить цилиндр, она примет форму *правой* спирали с 8 точками пересечения (из-за концевых эффектов в этом примере получится только 6 пересечений). Поскольку исходная спираль была левой, райзингу приписывают отрицательное значение $W_r = -8$, хотя сверхспираль, которая получается после удаления цилиндра, является правой [1362].

Рассмотрим теперь два примера, показанные на рис. 19.11. Если кольцевая ДНК сохраняет плоскую конфигурацию, то изменение порядка зацепления

$$\Delta L_k = \Delta T_w + \Delta W_r \tag{19.2}$$

компенсируется лишь изменением кручения T_w, поскольку в этом случае и W_r и ΔW_r равны нулю. Необходимое изменение T_w достигается либо путем монотонной модификации всех витков спирали, либо (с сохранением B-формы ДНК) в результате разрушения нескольких пар оснований. С другой стороны, если параметр T_w не меняется ($\Delta T_w = 0$), то

$$\Delta L_k = \Delta W_r,$$

т. е. изменение порядка зацепления почти полностью переходит в сверхспиральный райзинг W_r (почти, потому что при образовании сверхспирали немного изменяется и величина T_w [1362]). В примере, приведенном на рис. 19.11, ДНК *раскручивают*, при этом L_k уменьшается и, следовательно, ΔL_k *отрицательно* ($\Delta L_k = -6$).

Если теперь замкнуть ДНК в кольцо и отпустить его, оно примет форму правой сверхспирали с отрицательным райзингом ($-\Delta W_r$) (см. дополнение 19.3). Если, наоборот, *перекрутить* двойную спираль (т. е. внести положительное ΔL_k), то после замыкания в кольцо образуется левая сверхспираль, число витков которой определяется положительным райзингом ΔW_r.

В альтернативном способе описания используются другие обозначения $-\alpha$, β, τ, причем

$$\alpha = \beta + \tau. \tag{19.3}$$

Здесь *число топологических витков* α эквивалентно L_k, а β и τ эквивалентны T_w и W_r соответственно. При описании степени сверхспиральности часто используют понятие *плотности сверхвитков* $\sigma = \tau/\beta$. Эта величина дает грубую оценку числа сверхвитков на 10 пар оснований; для ДНК, выделенной из клеток и вирусных частиц, σ обычно равно $-1/15$, или $-0{,}06$ [1353, 1363, 1364].

Z-форма ДНК имеет особое значение для сверхспирализации. Если у B-ДНК перевести один виток в Z-форму, т. е. преобразовать правый виток в левый, то у оставшейся части молекулы в идеальном случае (в отсутствие концевых эффектов) кручение T_w увеличится на 2, $\Delta T_w = -2$. Так как L_k у кольцевой замкнутой молекулы ДНК является топологическим инвариантом, при изменении T_w должен соответствующим образом измениться и райзинг: $\Delta W_r = 2$. Это означает, что переход $B \rightleftarrows Z$ даже на небольшом участке молекулы будет оказывать очень сильное влияние на макроскопическую топологию сверхспиральной ДНК и поэтому, возможно, используется клеткой в процессе экспрессии генов (см. также гл. 12).

Как экспериментально установить наличие сверхспирализации ДНК?

Прямой путь обнаружения сверхспиральных структур – это, конечно, их визуализация с помощью электронной микроскопии [1350, 1362].

Косвенный, но тем не менее очень чувствительный метод, пригодный для исследования ДНК в водном растворе, основан на интеркаляции молекул антибиотиков или красителей в двойную спираль кольцевой ДНК. Как описано в гл. 16 и показано на рис. 16.3, при некоторой концентрации интеркалятора наблюдается полная компенсация отрицательных сверхвитков (т.е. правой сверхспирализации ДНК) и дальнейшее добавление интеркалятора приводит к образованию сверхспирали противоположного знака (а значит, и к изменению знака W_r).

Обратимся теперь к уравнению (19.1) и вновь напомним, что значение L_k все время остается постоянным, поскольку мы имеем дело с кольцевой замкнутой молекулой ДНК. Каждая интеркалированная молекула раскручивает двойную спираль ДНК на угол $\sim 26°$ [1350, 1362, 1365]. Уменьшение кручения, $-\Delta T_w$, должно компенсироваться соответствующим увеличением (отрицательного) райзинга ΔW_r (поскольку $L_k = \text{const}$). Поэтому при некоторой концентрации интеркалятора W_r становится равным 0 и ДНК принимает форму расправленного кольца без сверхвитков; дальнейшее добавление интеркалятора приводит к тому, что T_w становится меньше L_k и, следовательно, параметр W_r становится положительным. Это означает, что ДНК теперь образует сверхспираль противоположного знака (левую). На первый взгляд кажется парадоксальным, что исходная сверхспираль, образованная из-за «недокручивания» ДНК, компенсируется при дополнительном раскручивании двойной спирали под действием интеркаляторов. Однако это легко понять, если промоделировать процесс с помощью гибкой резиновой трубки.

Дискретность параметра порядка зацепления можно проверить при помощи электрофореза в агарозном геле [1365]. Этим методом разделяют молекулы ДНК одинаковой длины (и заряда) по их форме и степени компактности. Если обработать кольцевую ДНК топоизомеразой I при разной концентрации этидия, который в данном случае используется в качестве интеркалирующего агента, получится набор кольцевых молекул с различным порядком зацепления L_k. При электрофорезе таких молекул получается набор хорошо разделяющихся дискретных полос. Сверхспирализацию ДНК можно обнаружить также с помощью некоторых ферментов, которые взаимодействуют преимущественно со сверхспиральной ДНК [1350–1352].

Другие виды топологической изомеризации, осуществляемые при помощи ферментов. Кроме релаксации и «закручивания» двойной спирали ДНК в результате действия топоизомеразы I могут происходить и другие изменения в топологии молекулы ДНК, в том числе одноцепочечной.

При взаимодействии топоизомеразы I с одноцепочечной кольцевой или линейной ДНК могут образовываться топологические узлы, пока-

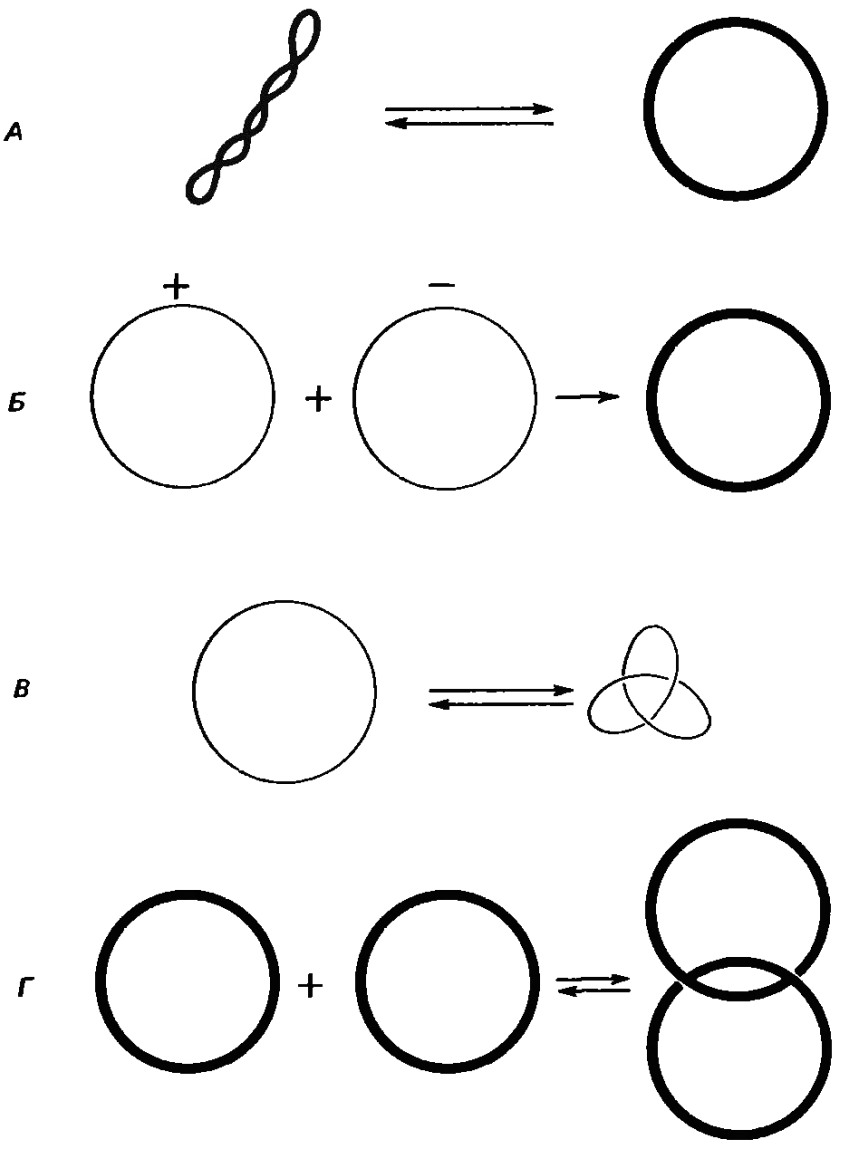


Рис. 19.12. Схематическое изображение структур, образующихся при действии различных топоизомераз на двухцепочечную (*жирные линии*) и одноцепочечную (*тонкие линии*) ДНК [1375]. Символами «+» и «−» на схеме *Б* обозначены комплементарные цепи ДНК. Реакция *В* может проходить и с двухцепочечными ДНК. В ходе реакции *Г* образуются катенаны.

занные на рис. 19.12, причем реакция образования этих узлов обратима. Аналогичным образом двухцепочечную кольцевую ДНК можно разделить на составляющие одноцепочечные кольца, из которых опять можно собрать исходную структуру. Наконец, возможно образование довольно экзотической структурной формы, которая состоит из замкнутых, продетых одна в другую кольцевых молекул. Молекулы ДНК в такой форме называют *катенанами*. Катенаны удается получить in vitro, они были выделены также из некоторых организмов [1354, 1366]. Особенно большое количество конкатенантных молекул ДНК (до 50%) можно выделить из митохондрий L-клеток млекопитающих (когда эти клетки находятся в стационарной фазе роста), обрабатывая клетки ци-

клогексимидом или переводя их в среду, не содержащую аминокислот [1366–1368].

Сверхспиральные кольцевые ДНК имеют определенную третичную структуру. Эксперименты по ультрацентрифугированию и светорассеянию, а также электронно-микроскопические исследования сверхспиральных кольцевых замкнутых ДНК показывают, что эти молекулы могут образовывать не только регулярную перекрученную сверхспираль, но и структуры, по форме напоминающие звезду [1311, 1369–1371]. Вероятность образования таких пространственных конфигураций зависит от ионной силы; они особенно стабильны в условиях, характерных для клеточного ядра [1371].

Формирование подобных структур, по-видимому, обусловлено гетерогенностью нуклеотидной последовательности ДНК, и они образуются даже при относительно небольшой разнице в энергиях. Согласно распределению Больцмана, даже при разнице в энергии 2 ккал·моль$^{-1}$ энергетически более выгодную конформацию будут иметь 98% молекул [1370]. Возможно, лепестки «звезды» образуются преимущественно из АТ-богатых участков, поскольку они более «гибкие». С другой стороны, палиндромные последовательности (дополнение 18.1), которые могут образовывать структуры типа гиреровских деревьев (дополнение 18.2), вероятно, формируют дополнительные ветви [1368], особенно в случае «недокрученной» ДНК с отрицательной сверхспиральностью, у которой таким образом может частично сниматься напряжение [1372]. Вопрос о том, имеют ли палиндромные последовательности (особенно длинные палиндромные последовательности, найденные в геноме эукариот [1373, 1374]) в условиях клеточного ядра обычную структуру или они образуют петли, которые могут служить «сигналами» для определенных белков, все еще является предметом дискуссий. Следует упомянуть также о пространственных структурах типа крестообразных деревьев, в которых два палиндромных двухцепочечных участка свертываются вместе, образуя четырехцепочечную сверхспираль [1375]. В принципе образование таких легко распознаваемых характерных структурных элементов возможно, однако их биологическое значение и сам факт существования до сих пор находятся под вопросом.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Для двухцепочечной ДНК (но не РНК) известно несколько форм с высоким уровнем структурной организации. Они образуются путем простой агрегации в присутствии двухвалентных катионов, таких, как Mg^{2+}, полиаминов или основных полипептидов, и представляют собой компактные структуры, которые могут свертываться в тороиды. При высокой концентрации соли и в присутствии макромолекул типа полиэтиленоксида ДНК конденсируется в форму, которую называют ψ-ДНК; переход в эту форму является кооперативным и обратимым. Полученные при обработке ультразвуком фрагменты ДНК длиной 2000 Å при постепенном увеличении концентрации спирта кристалли-

зуются, хотя получающиеся кристаллы и не пригодны для дифракционных исследований. Эти кристаллы по толщине равны длине одного фрагмента ДНК; подобные структуры образуют и другие полимеры при многократном складывании.

В клеточном ядре ДНК компактизуется с помощью четырех видов различных гистонов. Гистоны – это основные белки, их мол. масса равна 14000–22000. При агрегации 8 молекул гистонов (по 2 молекулы гистона каждого типа) образуется глобулярный гистоновый октамер, вокруг которого обвивается ДНК длиной 146 пар оснований, образующая $1^3/_4$ левых сверхвитка. Такая структура называется нуклеосомным кором. С ДНК связан еще один гистон, H1, скрепляющий нуклеосомный кор, который вместе с гистоном H1 образует нуклеосому. Цепь ДНК с нуклеосомами, которые разделены сегментами ДНК длиной 40–100 пар оснований, по виду напоминает нитку бус (волокно-100 Å). Эта структура образуется при низкой ионной силе и называется хроматином. При увеличении ионной силы или при добавлении в систему двухвалентных катионов типа Mg(II) нить компактизуется в «соленоидальную» форму с 3–6 нуклеосомами на виток, скрепленными друг с другом с помощью гистонов H1. Такой соленоид (или волокно диаметром 300 Å) закручивается в еще более конденсированную спиральную структуру, образуя хромосому. Хромосомы человека содержат двухцепочечную ДНК общей длиной около 2 м и имеют хорошо известную X-образную форму; образование такой формы обеспечивается белковым каркасом, а конденсация ДНК – ее взаимодействием с гистонами.

В хромосомах и кольцевых замкнутых (плазмидных) ДНК концы двухцепочечной молекулы фиксированы либо путем образования обычной ковалентной связи, либо с помощью определенной упаковки молекулы. Имеется класс ферментов – так называемые топоизомеразы – которые закручивают молекулу ДНК и создают в ней сверхвитки (что эквивалентно запасанию энергии) или, напротив, сбрасывают эти сверхвитки. С их помощью можно изменять общую структуру ДНК, играющую важную роль в экспрессии генов. Топология замкнутой ленты (ДНК) описывается с помощью соотношения $L_k = W_r + T_w$, где порядок зацепления L_k (в случае ДНК) определяет, сколько раз одна цепь молекулы обвивает другую. Параметр L_k является целочисленным инвариантом для всех топологических форм, а райзинг W_r и кручение T_w могут принимать любые значения. Число сверхвитков определяется райзингом W_r (для плоского кольца $W_r = 0$). Сильное влияние на топологию молекулы оказывает образование левой спирали Z-ДНК (при переходе одного витка правой спирали в левый виток L_k меняется на -2). Одно- и двухцепочечные ДНК могут образовывать и другие топологические формы: узлы, катенаны, кресты и т. д., биологическая роль которых не установлена.

Acknowledgments

Acknowledgments is gratefully made for permission to reproduce material as follows:

Figures 6.3, 6.15, 6.16, 6.17, 6.18, 11.4, 11.5, 11.6, 12.1, 12.3, 12.4, 12.8, 13.14, 15.2, 15.3, 16.3, 17.6, 17.7, and 18.11 are reprinted by permission from the *Journal of Molecular Biology*, copyright Academic Press Inc. (London) Ltd.

Table 3.2 is reprinted by permission from the *Journal of Theoretical Biology*, copyright Academic Press Inc. (London) Ltd.

Reprinted with permission from the *Journal of the American Chemical Society* are Figure 6.10, copyright 1967 American Chemical Society; Figures 2.8 and 15.10, copyright 1972 American Chemical Society; Figures 3.8 and 7.6, copyright 1977 American Chemical Society; Figures 4.6 and 13.13, copyright 1978 American Chemical Society.

Reprinted by permission from *Nature* are Figure 18.7, copyright 1955 Macmillan Journals Ltd; Figure 10.5, copyright 1971 Macmillan Journals Ltd; Table 6.10, copyright 1973 Macmillan Journals Ltd; Figure 4.24, copyright 1977 Macmillan Journals Ltd; Figure 4.29 A and Table 4.4, copyright 1978 Macmillan Journals Ltd; Figure 17.10, copyright 1979 Macmillan Journals Ltd; Figures 11.3, 16.7, and 16.8, copyright 1980 Macmillan Journals Ltd; Figures 18.17 and 18.18, copyright 1981 Macmillan Journals Ltd; Figures 8.5 and 17.12, copyright 1982 Macmillan Journals Ltd.

Reprinted by permission from *Science* is Figure 1.3, copyright 1969 by the American Association for the Advancement of Science.

Reprinted by permission of the authors from *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.* are Figures 3.5, 6.5, 6.6, 14.2, 14.3, 14.5, 16.6, 18.3, 18.5, 18.12, 19.2, and 19.7.

Figures 4.27, 6.14, 6.20, and 16.5 are reprinted by permission from *Biopolymers*, copyright John Wiley and Sons. Figure 15.1 is reprinted by permission from *Advances in Enzymology*, copyright John Wiley and Sons.

Figures 19.4, 19.6, 19.8 are from "The Nucleosome" by Roger D. Kornberg and Aaron Klug, copyright 1981 by Scientific American, Inc. All rights reserved. Box 19.3 is from "Supercoiled DNA" by William R. Bauer, F.H.C. Crick, and James H. White, copyright 1980 by Scientific American, Inc. All rights reserved.

Figure 19.1 is reprinted by permission from *Cell*, copyright M.I.T. Press.

Литература

1. *Furberg S.* The crystal structure of cytidine, Acta Crystallogr., **3**, 325–331 (1951).
2. *Dekker C. R., Michelson A. M., Todd A. R.* Nucleotides, Part XIX, Pyrimidine deoxyribonucleoside diphosphates, J. Chem. Soc., 947–951 (1953).
3. *Zamenhof S., Brawermann G., Chargaff E.* On the desoxypentose nucleic acids from several microorganisms, Biochim. Biophys. Acta, **9**, 402–405 (1952).
4. *Astbury W. T.* X-ray studies of nucleic acids, Symp. Soc. Exp. Biol. (Nucleic Acids), **1**, 66–76 (1947).
5. *Gulland J. M.* The structures of nucleic acids, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **12**, 95–103 (1947).
6. *Wilkins M. H. F.* Molecular configuration of nucleic acids, Science, **140**, 941–950. Angew. Chem. **75**, 429–439 (1963).
7. *Watson J. D., Crick F. H. C.* A structure of deoxyribose nucleic acid, Nature, **171**, 737–738 (1953).
8. *Crick F. H. C., Watson J. D.* The complementary structure of deoxyribonucleic acid, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A, **223**, 80–96 (1954).
9. *Watson J. D.* The Double Helix, Weidenfeld and Nicholson, London, 1968.
10. *Britten R., Davidson E.* Gene regulation for higher cells: A theory, Science, **165**, 349–357 (1969).
11. *Paulson J. R., Laemmli U. K.* The structure of histone-depleted metaphase chromosomes, Cell, **12**, 817–828 (1977).
12. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN), Abreviations and symbols for nucleic acids, polynucleotides and their constituents, Eur. J. Biochem., **15**, 203–208 (1970); for correction, see Eur. J. Biochem., **25**, 1–4 (1972).
13. IUPAC Commision on Macromolecular Nomenclature, Stereochemical definitions and notations relating to polymers, Pure Appl. Chem., **51**, 1101–1121 (1979).
14. IUPAC, Definitive Rules for Nomenclature of Organic Chemistry, Section A. Hydrocarbons, Section B, Fundamental heterocyclic systems, J. Amer. Chem. Soc., **82**, 5545–5574.
15. *Pullman B., Saenger W., Sasisekharan V., Sundaralingam M., Wilson H. R.* Recommendations of standard conventions and nomenclature for the description of the conformation of polynucleotide chains, Jerus. Symp. Quant. Chem. Biochem., **5**, 815–820 (1973).
16. *Seeman N. C., Rosenberg J. M., Suddath F. L., Parc Kim J. J., Rich A.* A simplified alphabetical nomenclature for dihedral angles in the polynucleotide backbone, J. Mol. Biol., **104**, 142–143 (1976).

17. *Arnott S., Hukins D. W. L.* Conservation of conformation in mono-and polynucleotides, Nature, **224**, 886–888 (1969).
18. *Lakshminarayanan A. V., Sasisekharan V.* Stereochemistry of nucleic acids and polynucleitides. II. Allowed conformations of the monomer unit for different ribose puckering, Biochim. Biophys. Acta, **204**, 49–53 (1970).
19. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, Abreviations and symbols for the descriptions of conformations of polynucleotide chains, Eur. J. Biochem., **131**, 9–15 (1983).
20. *Suhadolnik R. J.* Nucleoside Antibiotics, Wiley, New York (1970).
21. *Bloch A. (ed.).* Chemistry, Biology and Clinical Uses of Nucleoside Analogs. Annu. N. Y. Acad. Sci., **225** (1975).
22. IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature, Abbreviations and symbols for the description of the conformation of polypeptide chains, Eur. J. Biochem., **17**, 193–201 (1970).
23. *Klyne W., Prelog V.* Description of steric relationships across single bonds, Experientia, **16**, 521–523 (1960).
24. IUPAC. Tentative rules for the nomenclature of organic chemistry. Section E. Fundamental stereochemistry, Eur. J. Biochem., **18**, 151–170 (1971).
25. *Hall L. D.* Conformations of some ribofuranosides, Chem. Ind. (London), 950–951, 1963.
26. *Jardetzky C. D.* Proton magnetic resonance studies on purines, pyrimidines, ribose nucleosides and nucleotides. III. Ribose conformation, J. Amer. Chem. Soc., **82**, 229–223 (1960).
27. *Kilpatrick J. E., Pitzer K. S., Spitzer R.* The tehrmodynamics and molecular structure of cyclopentane, J. Amer. Chem. Soc., **69**, 2483–2488 (1947).
28. *Pitzer K. S., Donath W. E.* Conformations and strain energy of cyclopentane and its derivatives, J. Amer. Chem. Soc., **81**, 3213–3218 (1959).
29. *Hall L. D., Steiner P. R., Pedersen C.* Studies of specifically fluorinated carbohydrates, Part VI. Some pentafuranosyl fluorides, Can. J. Chem., **48**, 1155–1165 (1970).
30. *Altona C., Geise H. J., Romers C.* Conformation of nonaromatic ring compounds. XXV. Geometry and conformation of ring D in some steroids from X-ray structure determinations, Tetrahedron, **24**, 13–32 (1968).
31. *Altona C., Sundaralingam M.* Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides. A new description using the concept of pseudorotation, J. Amer. Chem. Soc., **94**, 8205–8212 (1972).
32. *Levitt M., Warshel A.* Extreme conformational flexibility of the furanose ring in DNA and RNA, J. Amer. Chem. Soc., **100**, 2607–2613 (1978).
33. *Donohue J., Trueblood K. N.* Base pairing in DNA, J. Mol. Biol., **2**, 363–371 (1960).
34. *Haschemeyer A. E. V., Rich A.* Nucleoside conformations: An analysis of steric barriers to rotation about the glycosidic bond, J. Mol. Biol., **27**, 369–384 (1967).
35. *Sundaralingam M.* The concept of a conformationally "rigid" nucleotide and its significance in polynucleotide conformational analysis, Jerus. Symp. Quant. Chem. Biochem., **5**, 417–456 (1973).
36. *Prusiner P., Sundaralingam M.* Stereochemistry of nucleic acids and their constituents. XXV. Crystal and molecular structure of allopurinol, a potent inhibitor of xantine oxidase, Acta Cryctallogr., B, **28**, 2148–2152 (1972).
37. *Shefter E., Trueblood K. N.* The crystal and molecular structure of D(+ +)Ba-uridine-5'-phosphate, Acta Crystallogr., **18**, 1067–1077 (1965).
38. *Arnott S.* The geometry of nucleic acids, Prog. Biophys. Mol. Biol., **21**, 267–319 (1970).

39. *Lai T.F., Marsh R.E.* The crystal structure of adenosine, Acta Crystallogr., B, **28**, 1982–1989 (1972).
40. *Green E.A., Rosenstein R.D., Shiono R., Abraham D.J., Trus B.L., Marsh R.E.* The crystal structure of uridine, Acta Crystallogr., B, **31**, 102–108 (1975).
41. *Tavale S.S., Sobell H.M.* Crystal and molecular structure of 8-bromoguanosine and 8-bromoadenosine, two purine nucleosides in the *syn* conformation, J. Mol. Biol., **48**, 109–123 (1970).
42. *Suck D., Saenger W.* Molecular and crystal structure of 6-methyluridine. A pyrimidine nucleoside in the *syn* conformation, J. Amer. Chem. Soc., **94**, 6520–6526 (1972).
43. *Glusker J.P., Trueblood K.N.* Crystal Structure Analysis, A Primer. Oxford Univ. Press, London, 1972.
44. *Stout G.H., Jensen L.H.* X-Ray Structure Determination – A Practical Guide, McMillan, London, 1968.
45. *Buerger M.J.* Contemporary Crystallography, McGraw-Hill, New York, 1970.
46. *Woolfson M.M.* An Introduction to X-Ray Crystallography, Cambridge Univ. Press, London, 1970.
47. *Sherwood D.* Crystals, X-Rays and Proteins, Longman, London, 1976.
48. *Arndt U.W., Willis B.T.M.* Single Crystal Diffractometry, Cambridge Univ. Press, London 1966.
49. *Henry N.F.M., Lonsdale K.* (*eds.*). International Tables for X-Ray Crystallography, Vols. II – IV, Kynoch Press, Birmingham, 1968.
50. *Mizushima S.-I., Shimanouchi T.* Possible polypeptide configurations of proteins from the viewpoint of internal rotation potential, Adv. Enzymol., **23**, 1–27 (1961).
51. *Ramachandran G.N., Ramakrishnan C., Sasisekharan V.* Stereochemistry of polypeptide chain configurations, J. Mol. Biol., **7**, 95–99 (1963).
52. *Schellman J.A., Schellman C.* The conformation of polypeptide chains in proteins. In: The Proteins (H. Neurath, ed.), 2nd ed., Vol. 2, pp. 1–139, Academic Press, New York, 1964.
53. *Nemethy G., Scheraga H.A.* Theoretical determination of a polypeptide chain by a computer method, Biopolymers, **3**, 155–184 (1965).
54. *Sasisekharan V., Lakshminaranyanan A.V., Ramachandran G.N.* Stereochemistry of nucleic acids and polynucleotides. I. Theoretical determination of the allowed conformation of the monomer unit. In: Conformation of Biopolymers (G.N. Ramachandran, ed.), Vol. 2, pp. 641–654, Academic Press, London (1967).
55. *Scheraga H.A.* Calculations of conformations of polypeptides, Adv. Phys. Org. Chem., **6**, 103–183 (1968).
56. *Ramachandran G.N., Sasisekharan V.* Conformation of polypeptides and proteins, Adv. Protein Chem., **23**, 283–437 (1968).
57. *Lakshminarayanan A.V., Sasisekharan V.* Stereochemistry of nucleic acids and polynucleotides. IV. Conformational energy of base-sugar units, Biopolymers, **8**, 475–488 (1969).
58. *Yatindra N., Sundaralingam M.* Correlation between the backbone and side chain conformations in 5'-nucleotides. The concept of a "rigid" nucleotide conformation, Biopolymers, **12**, 297–314 (1973).
59. *Millner O.E., Jr., Andersen J.A.* The conformational analysis of adenosine triphosphate by classical potential energy calculations, Biopolymers, **14**, 2159–2179 (1975).
60. *Broyde S.B., Wartell R.M., Stellman S.D., Hingerty B., Langridge R.*, Classical

potential energy calculations for ApA, CpC, GpG and UpU. The influence of the bases on RNA subunit coformations, Biopolymers, **14**, 1597–1613 (1975).
61. *Olson W. K., Flory P. J.* Spatial configurations of polynucleotide chains. II. Conformational energies and average dimensions of polyribonucleotides, Biopolymers, **11**, 25–56 (1972).
62. *Kitaigorodsky A. I., Dashevsky V. G.* Conformational analysis of overcrowded aromatic molecules, Tetrahedron, **24**, 5917–5928 (1968).
63. *Govil G., Saran A.* Quantum chemical studies of nucleic acids. I. Extended Hückel calculations on D-ribose phosphate, J. Theor. Biol., **30**, 621–630 (1971).
64. *Lifson S.* Potential energy functions for structural molecular biology. In: Methods in Structural Molecular Biology (D. B. Davies, W. Saenger, and S. S. Danyluk, eds.), pp. 359–385, Plenum Press, London, 1981.
65. *Jordan F.* Lennard-Jones potential calculations of the barrier to rotation about the glycosidic C–N linkage in selected purine nucleosides and nucleotides. A direct comparison of the results of 6–12 potential calculations with results of semiempirical molecular orbital studies, J. Theor. Biol., **41**, 375–395 (1973).
66. *Klopman G., Evans R. C.* The neglect-of-differential-Overlap methods of molecular orbital theory. In: Electronic Structure Calculation (G. A. Segal, ed.), pp. 29–67, Plenum Press, New York, 1977.
67. *Pullman B., Pullman A.*, Quantum Biochemistry, Interscience, New York, 1963.
68. *Del Re G.* A simple MO-LCAO method for the calculation of charge distributions in saturated organic molecules, J. Chem. Soc., 4031–4040 (1958).
69. *Del Re G.* Theoretical procedures for the study of biochemical δ-systems. In: Electronic Aspects of Biochemistry (B. Pullman, ed.), pp. 221–235, Academic Press, New York/London, 1964.
70. *Pullman A., Pullman B.* Aspects of the electronic structure of the purine and pyrimidine bases of the nucleic acids and of their interactions, Adv. Quant. Chem., **4**, 267–325 (1968).
71. *Jordan F., Pullman B.* Molecular orbital calculations on the preferred conformation of nucleosides, Theor. Chim. Acta (Berlin), **9**, 242–252 (1968).
72. *Renugopalakrishnan V., Lakshminarayanan A. V., Sasisekharan V.* Stereochemistry of nucleic acids and polynucleotides. III. Electronic charge distribution, Biopolymers, **10**, 1159–1167 (1971).
73. *Scott R. A., Scheraga H. A.* Method for calculating internal rotation barriers, J. Chem. Phys., **42**, 2209–2215 (1965).
74. *Warshel A.* The consistent force field and its quantum chemical extension. In: Modern Theoretical Chemistry (G. Segal, ed.), Plenum Press, New York, Vol. 7, pp. 133–172 (1977).
75. *Trinajstić N.* Hückel theory and Topology. In: Electronic Structure Calculation (G. A. Segal, ed.), pp. 1–28, Plenum Press, New York, 1977.
76. *Jordan F.* An extenden Hückel molecular orbital approach to the study of the electronic structures and barriers to *syn–anti* interconversion in *syn* purine nucleosides, Biopolymers, **12**, 243–255 (1973).
77. *Malrieu J.-P.* The PCILO method. In: Electronic Structure Calculation (G. A. Segal, ed.), pp. 69–103. Plenum Press, New York, 1977.
78. *Pullman B., Pullman A.* Molecular orbital calculations on the conformation of amino-acid residues of proteins, Adv. Protein Chem., **28**, 348–526 (1974).
79. *Roothaan C. C. J.* New Developments in molecular orbital theory, Rev. Mod. Phys, **23**, 69–89 (1951).
80. *Blundell T. L., Johnson L. N.* Protein Crystallography, Academic Press, New York, 1976. [Имеется перевод: Бланделл Т., Джонсон Л., Кристаллография белка.– М.: Мир, 1979.]

81. *Holmes K. C., Blow D. M.* The Use of X-Ray Diffraction in the Study of Protein and Nucleic Acid Structure, Interscience, New York, 1966.
82. *Dickerson R. E., Kopka M. L., Varnum J. C., Weinzierl J. E.* Bias, feedback and reliability in isomorphous phase analysis, Acta Crystallogr., **23**, 511–522 (1967).
83. *Richards F. M.* The matching of physical models to three-dimensional electron-density maps; a simple optical device, J. Mol. Biol., **37**, 225–230 (1968).
84. *Chambers J. L., Stroud R. M.* The accuracy of refined protein structures: Comparison of two independently refined models of bovine trypsin, Acta Crystallogr., B, **35**, 1861–1874 (1979).
85. *Stout C. D., Mizuno H., Rao S. T., Swaminathan P., Rubin J., Brennan T., Sundaralingam M.* Crystal and Molecular structure of yeast phenylalanyl transfer RNA. Structure determination, difference Fourier refinement, molecular conformation, metal and solvent binding, Acta Crystallogr., B, **34**, 1529–1544 (1978).
86. *Sussman J. L., Holbrook S. R., Warrant R. W., Kim S.-H.* Crystal structure of yeast phenylalanine transfer RNA. I. Crystallographic refinement, J. Mol. Biol., **123**, 607–630 (1978).
87. *Jack A., Ladner J. E., Klug A.* Crystallographic refinement of yeast phenylalanine transfer RNA at 2,5 Å resolution, J. Mol. Biol., **108**, 619–649 (1976).
88. *Giannoni G., Padden F., Keith H. D.* Crystallization of DNA from dilute solution, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **62**, 964–971 (1969).
89. *Lerman L. S., Wilkerson L. S., Venable J. H., Jr., Robinson B. H.* DNA packing in single crystals inferred from freeze-fracture-etch replicas, J. Mol. Biol., **108**, 271–293 (1976).
90. *Kliya M. O., Osika V. D.* Morphology and growth of DNA cetavlate salt crystals, Sov. Phys. Crystallogr., **21**, 681–687 (1976) [in English].
91. *Polivtsev O. F., Osika V. D., Sukharevskii B. Ya., Tsvankin D. Ya.* X-Ray diffraction from individual crystals of cetavlon salt of DNA, Sov. Phys. Crystallogr., **22**, 45–48 (1977) [in English].
92. *Fuller W., Hutchinson F., Spencer M., Wilkins M. H. F.* Molecular and crystal structure of double-helical RNA. I. An X-ray diffraction study of fragmented yeast RNA model, J. Mol. Biol., **27**, 507–524 (1967).
93. *Henry N. F. M., Lipson H., Wooster W. A.* The Interpretation of X-ray Diffraction Photographs, Macmillan, New York, 1961.
94. *Marvin D. A., Spencer M., Wilkins M. H. F., Hamilton L. D.* The molecular configuration of DNA. III. X-ray diffraction study of the C form of the lithium salt, J. Mol. Biol., **3**, 547–565 (1961).
95. *Marvin D. A., Nave C.* X-Ray fiber diffraction. In: Methods in Structural Molecular Biology (D. B. Davies, W. Saenger, and S. S. Danyluk, eds.), pp. 3–43, Plenum Press, London, 1981.
96. *Cochran W., Crick F. H. C., Vand V.* The structure of synthetic polypeptides. I. The transform of atoms on a helix, Acta Crystallogr., **5**, 581–586 (1952).
97. *Stokes A. R.* The theory of X-ray fiber diagrams, Prog. Biophys., **5**, 140–167 (1955).
98. *Klug A., Crick F. H. C., Wyckoff H. S.* Diffraction by helical molecules, Acta Crystalligr., **11**, 199–213 (1958).
99. *Ramachandran G. N.* Analysis of the X-ray diffraction pattern of helical structures, Proc. Indian Acad. Sci., **52A**, 240–254 (1960).
100. *Arnott S.* Fiber diffraction analysis of biopolymer molecules, Trans. Amer. Cryst. Assoc., **9**, 31–56 (1973).

101. *Langridge R., Marvin D. A., Seeds W. E., Wilson H. R., Hooper C. W., Wilkins M. H. F., Hamilton L. D.* The molecular configuration of deoxyribonucleic acid. II. Molecular models and their Fourier transforms, J. Mol. Biol., **2**, 38–64 (1960).
102. *Arnott S., Dover S. D., Wonacott A. J.* Least-squares refinement of the crystal and molecular structures of DNA and RNA from X-ray data and standard bond lengths and angles, Acta Crystallogr., B, **25**, 2192–2206 (1969).
103. *Langridge R. A., Rich A.* Molecular structure of helical polycytidylic acid. Nature, **198**, 725–728 (1963).
104. *Arnott S., Chandrasekharan R., Leslie A. G. W.* Structure of the single-stranded polyribonucleotide polycytidilic acid, J. Mol. Biol., **106**, 735–738 (1976).
105. *Rich A.* The molecular structure of polyinosinic acid, Biochim. Biophys. Acta. **29**, 502–509 (1958).
106. *Arnott S., Chandrasekharan R., Marttila C. M.* Structures of polyinosinic acid and polyguanylic acid, Biochem. J., **141**, 537–538 (1974).
107. *Donohue J.* Hydrogen-bonded helical configurations of polynucleotides. Proc. Nat. Acad. Sci USA, **42**, 60–65 (1956).
108. *Wu T. T.* Secondary structures of DNA, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **63**, 400–405 (1969).
109. *Donohue J.* Fourier analysis and the structure of DNA, Science, **165**, 1091–1096 (1969).
110. *Donohue J.* Crystal symmetry of deoxyribonucleic acid. On the validity of the use of intensity statistics on limited numbers of data, J. Mol. Biol., **41**, 291–294 (1969).
111. *Donohue J.* Fourier series and diffrence maps as lack of structure proof: DNA is an example, Science, **167**, 1700–1702 (1970).
112. *Rodley G. A., Scobie R. S., Bates R. H. T., Lewitt R. M.* A possible conformation for double-stranded polynucleotides, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **73**, 2959–2963 (1976).
113. *Sasisekharan V., Pattabiraman N., Gupta Goutam.* Some implications of an alternative structure for DNA, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75**, 4092–4096 (1978).
114. *Cyrax B., Gäth R.* The conformation of double-stranded DNA, Naturwissenschaften, **65**, 106–108 (1978).
115. *Hopkins R. C.* Deoxyribonucleic acid structure. A new model, Science, **211**, 289–291 (1981).
116. *Arnott S., Wilkins M. H. F., Hamilton L. D., Langridge R.* Fourier synthesis studies of lithium DNA. Part III, Hoogsteen models, J. Mol. Biol., **11**, 391–402 (1965).
117. *Wilkins M. H. F., Arnott S., Marvin D. A., Hamilton L. D.* Fourier analysis and the structure of DNA. Some misconceptions on Fourier analysis and Watson–Crick base pairing, Science, **167**, 1693–1694 (1970).
118. *Arnott S.* Crystallography of DNA: Difference synthesis supports Watson–Crick base pairing, Science, **167**, 1694–1670 (1970).
119. *Wilkins M. H. F., Wilson H. R., Hamilton L. D.* Secondary structures of DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **65**, 761–762 (1970).
120. *Arnott S.* Investigation of the crystal and molecular simmetry of DNA using X-ray intensity statistics, J. Mol. Biol., **59**, 381–384 (1971).
121. *Arnott S.* Is DNA really a double helix? Nature, **278**, 780–781 (1979).
122. *Greenall R. J., Pigram W. J., Fuller W.* X-Ray diffraction from the side-by-side model of DNA, Nature, **282**, 880–882 (1979).
123. *Blomfield V. A., Crothers D., Tinoco I., Jr.*, Physical Chemistry of Nucleic Acids. Harper and Row, New York, 1974.

124. *Cantoni G. L., Davies D. R. (eds.).* Procedures in Nucleic Acid Research, Vol. 2, pp. 3–296, Harper and Row, New York, 1971.
125. *Ts'o P. O. P. (ed.).* Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry, Vols. 1 and 2, Academic Press, New York, 1974.
126. *Pullman B. (ed.).* Nucleic Magnetic Resonance Spectroscopy in Molecular Biology, Jerus. Sympos. Quant. Chem. Biochem., **11** (1978).
127. *Tinoco I., Jr., Bustamente C.* Chiroptical methods and their applications to biomolecular systems. In: Methods in Structural Molecular Biology (D. B. Davies, W. Saenger, and S. S. Danyluk, eds.), pp. 269–305, Plenum Press, London, 1981.
128. *Peticolas W. L.* Classical and resonance Raman spectroscopy of biological macromolecules. In: Methods in Structural Molecular Biology (D. B. Davies, W. Saenger, and S. S. Danyluk, eds.), pp. 237–266, Plenum Press, London, 1981.
129. *Altona C.* High resolution NMR studies of nucleic acids. In: Methods in Structural Molecular Biology (D. B. Davies, W. Saenger, and S. S. Danyluk, eds.), pp. 161–213, Plenum Press, London, 1981.
130. *Davies D. B.* Conformations of nucleosides and nucleotides, Prog. NMR Spectrosc., **12**, 135–225 (1978).
131. *Danyluk S. S.* Nuclear magnetic resonance studies of nucleoside confomational properties. In: Nucleoside Analogues. Chemistry, Biology, and Medical Application (R. T. Walker, F. DeClercq, and F. Eckstein, eds.), pp. 15–34, Plenum Press, New York, 1979.
132. *Dhingra M. M., Sarma R. H.* Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Chemical shifts, coupling constants and molecular geometry. In: Stereodynamics of Molecular Systems (R. H. Sarma, ed.), pp. 3–38, Pergamon, New York, 1979.
133. *Giessner-Prettre G., Pullman B.* On the conformational dependence of the proton chemical shifts in nucleosides and nucleotides. I. Proton shifts in the ribose ring of pyrimidine nucleosides as a function of the torsion angle about the glycosyl bond; and II. Proton shifts in the ribose ring of purune nucleosides as a function of the torsion angle about the glycosidic bond, J. Theor. Biol., **65**, 171–188 (1977).
134. *Giessner-Prettre C., Pullman B., Caillet J.* Theoretical study on the proton chemical shifts of hydrogen bonded nucleic acid bases, Nucleic Acids Res., **4**, 99–116 (1977).
135. *Giessner-Prettre C., Pullman B., Borer P. N., Kan L.-S., Ts'o P. O. P.* Ring-current effects in the NMR of nucleic acids: A graphical approach, Biopolymers, **15**, 2277–2286 (1976).
136. *Karplus M.* Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments, J. Chem. Phys., **30**, 11–15 (1959).
137. *Altona C., Sundaralingam M.* Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides. Improved method for the interpretation of proton magnetic resonance coupling constants, J. Amer. Chem. Soc., **95**, 2333–2344 (1973).
138. *Davies D. B., Danyluc S. S.* Nuclear magnetic resonance studies of 5'-ribo- and deoxyribonucleotide structures in solution, Biochemisrty, **13**, 4417–4434 (1974).
139. *Guschlbauer W., Tran-Dinh Son.* Nucleoside conformations, 20. Determination of sugar conformations of nucleosides and nucleotides by a simple graphical method, Nucleic Acids Res. Spec. Publ., No. 1, S. 85–88, 1975.
140. *Evans F. E., Sarma R. H.* The intramolecular conformation of adenosine-5'-monophosphate in aqueous solution as studied by Fast Fourier Transform ^{1}H

and ^{1}H-{^{31}P} nuclear magnetic resonance spectroscopy, J. Biol. Chem., **249**, 4754–4759 (1974).
141. *Jaworski A., Ekiel I., Shugar D.* Coupling constants between cisoidal protons in pentose nucleosides. Limitations of range of application of Karplus relation, and solution conformations of β-arabinofuranosyl and β-xylofuranosyl nucleotides, J. Amer. Chem. Soc., **100**, 4357–4361 (1978).
142. *Niemczura W.P., Hruska F.E.* A ^{13}CMR study of 2′-deoxynucleotides in the *syn* and *anti* conformation, Can. J. Chem., **58**, 472–478 (1980).
143. *Alderfer J.L., Ts'o P.O.P.* Conformational properties of the furanose phosphate backbone in nucleic acids. A carbon-13 nuclear magnetic resonance study, Biochemistry, **16**, 2410–2416 (1977).
144. *Smith I.C.P., Mantsch H.H., Lapper R.D., Deslauriers R., Schleich T.* A study of the conformations of nucleic acids by carbon-13 and hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy, Jerus. Symp. Quant. Chem. Biochem., **5**, 381–401 (1973).
145. *Ezra F.S., Lee C.H., Kondo N.S., Danyluk S.S., Sarma R.H.* Conformational properties of purine-pyrimidine and pyrimidine-purine dinucleoside monophosphate, Biochemistry, **16**, 1977–1987 (1977).
146. *Cheng D.M., Dhingra M.M., Sarma R.H.* Spatial configuration of deoxyribotrinucleoside diphosphate in aqueous solution, Nucleic Acids Res., **5**, 4399–4416 (1978).
147. *Cheng D.M., Sarma R.H.* Intimate details of the conformational characteristics of deoxyribodinucleoside monophosphates in aqueous solution, J. Amer. Chem. Soc., **99**, 7333–7348 (1977).
148. *Chachaty C., Zemb T., Langlet G., Tran-Dinh Son, Buc H., Morange M.* A proton-relaxation-time study of the conformation of some purine and pyrimidine 5′-nucleotides in aqueous solution, Eur. J. Biochem., **62**, 45–53 (1976).
149. *Schirmer R.E., Davies J.P., Noggle J.H., Hart P.A.* Conformational analysis of nucleosides in solution by quantitative application of the nuclear Overhauser effect, J. Amer. Chem. Soc., **94**, 2561–2572 (1972).
150. *Noggle J.H., Schirmer R.E.* The Nuclear Overhauser Effect: Chemical Applications, Academic Press, New York, 1971.
151. *Danyluk S.S., Hruska F.E.* The effect of pH upon the nuclear magnetic resonance spectra of nucleosides and nucleotides, Biochemistry, **7**, 10–38 (1968).
152. *Schweizer M.P., Broom A.D., Ts'o P.O.P., Hollis D.P.* Studies of mononucleotides by proton magnetic resonance, J. Amer. Chem. Soc., **90**, 1042–1055 (1968).
153. *Schweizer M.P., Robins R.K.* NMR studies on the conformation of nucleosides and 3′,5′-nucleotides, Jerus. Sympos. Quant. Chem. Biochem., **5**, 329–344 (1973).
154. *Lemieux R.U., Nagabushan T.L., Paul B.* Relationship of ^{13}C to vicinal ^{1}H coupling to the torsion angle in uridine and related structures, Can. J. Chem., **50**, 773–776 (1972).
155. *Reid B.R.* NMR studies of RNA structure and dynamics, Annu. Rev. Biochem., **50**, 969–996 (1981).
156. *Patel D.J., Pardi A., Itakura K.* DNA conformation, dynamics, and interactions in solution, Science, **216**, 581–590 (1982).
157. *Bondi A.* Van der Waals volumes and radii, J. Phys. Chem., **68**, 441–451 (1964).
158. *Allinger N.L.* Calculation of molecular structural energy by force-field methods, Adv. Phys. Org. Chem., **13**, 1–82 (1976).
159. *Weast R.C. (ed.).* Handbook of Chemistry and Physics, p. D-178, CRC Press Cleveland, Ohio, 1976.

160. *Suck D., Manor P. C., Germain G., Schwalbe C. H., Weimann G., Saenger W.* X-Ray study of helix, loop and base pair stacking in trinucleoside diphosphate ApApA, Pature New Biol., **246**, 161–165 (1973).
161. *Reeke G. N., Marsch R. E.* The ctrystal structure of 5-ethyl-6-methyluracil, Acta Crystallogr., **20**, 703–708 (1965).
162. *Kim S.-H., Quigley G., Suddath F. L., Rich A.* High resolution X-ray diffraction patterns of crystalline transfer RNA that show helical regions, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **68**, 841–845 (1971).
163. *Allen F. H., Bellard S., Brice M. D., Cartwright B. A., Doubleday A., Higgs H., Hummelink T., Hummelink-Peters B. G., Kennard O., Motherwell W. D. S., Rodgers J. R., Watson D. G.* The Cambridge Grystallographic Data Centre: Computer-based search, retrieval, analysis and display of information, Acta Crystallogr., B, **35**, 2331–2339 (1979).
164. *Rich A.* Three-dimensional structure of transfer RNA, Acc. Chem. Res., **10**, 388–402 (1977).
165. *Langridge R., Wilson H. R., Hooper C. W., Wilkins M. H. F., Hamilton L. D.* The molecular configuration of DNA. I. X-Ray diffraction study of a crystalline form of the lithium salt, J. Mol. Biol., **2**, 19–37 (1960).
166. *Sundaralingam M.* Stereochemistry of nucleic acids and their constituents. IV. Allowed and preferred conformations of nucleosides, nucleoside mono-, di-, tri-, tetraphosphate, nucleic acids and polynucleotides, Biopolymers, **7**, 821–860 (1969).
167. *Sundaralingam M.* Structure and conformation of nucleosides and nucleotides and their analogs as determined by X-ray diffraction, Ann. N. Y. Acad. Sci., **255**, 3–42 (1976).
168. *Wilson H. R.* Some aspects of nucleotide conformation in cristals and in nucleic acids, Jerus. Symp. Quant. Chem. Biochem., **5**, 261–270 (1973).
169. *Saenger W.* Structure and function of nucleosides and nucleotides. Angev. Chem. Int. Ed. Engl., **12**, 591–601 (1973); Angev. Chem, **85**, 680–690 (1973).
170. *de Leeuw H. P. M. de, Haasnoot C. A. G., Altona C.* Empirical correlations between conformational parameters in β-D-furanoside fragments derived from a statistical survey of crystal structures of nucleic acid constituents. Full description of nucleoside molecular geometries in terms of four parameters, Isr. J. Chem., **20**, 108–126 (1980).
171. *Murray-Rust P., Motherwell S.* Computer retrieval and analysis of molecular geometry. III. Geometry of the β-1′-aminofuranoside fragment, Acta Crystallogr., B, **34**, 2534–2546 (1978).
172. *Westhof E., Sundaralingam M.* Interrelationships between the pseudorotation parameters P and m and the geometry of the furanose ring, J. Amer. Chem. Soc., **102**, 1493–1500 (1980).
173. *Hruska F. E.* Mapping nucleoside conformations in aqueous solution – A correlation of some furanose structural parameters, Jerus. Symp. Quant. Chem. Biochem., **5**, 345–360 (1973).
174. *Hart P. A., Davis J. P.* Purine nucleoside conformational analysis – Applications of the nuclear Overhauser effect, Jerus. Symp. Quant. Chem. Biochem., **5**, 297–310 (1973); Pyrimidine nucleoside conformational analysis. Nuclear Overhauser effect and circular dichroism correlations, J. Amer. Chem. Soc., **93**, 753–760 (1973).
175. *Sarma R. H., Mynott R.* Manifestation of the conformation of pyridine coenzymes in ^{31}P and ^{1}H Fourier transform nuclear magnetic resonance spectroscopy, Jerus. Symp. Quant. Chem. Biochem., **5**, 591–626 (1973).

176. *Altona C.* Backbone conformation of several dinucleoside monophosphates in solution deduced from Fourier transform NMR spectroscopy at 270 MHz. In: Structure and Conformation of Nucleic Acids and Protein–Nucleic Acid Interactions (M. Sundaralingam and S. T. Rao, eds.), pp. 613–630, Univ. Park Press, London, 1975.
177. *Thomas G. J., Jr.* Structural studies of nucleic acids and polynucleotides by laser-Raman spectroscopy, Ibid., pp. 253–281, 1975.
178. *Schleich T., Cross B. P., Blackburn B. J., Smith I. C. P.* Elucidation of nucleic acid conformation by carbon-13-nuclear magnetic resonance spectroscopy, Ibid., pp. 223–252, 1975.
179. *Kwiatkowski J. S., Pullman B.* Tautomerism and electronic structure of biological pyrimidines, Adv. Heterocyc. Chem., **18**, 199–335 (1975).
180. *Pullman B., Pullman A.* Electronic aspects of purine tautomerism, Adv. Heterocyc. Chem., **13**, 77–159 (1971).
181. *Pullman B.* Proteins, nucleis acids and their constituents. In: Quantum-Mechanics of Molecular Conformations (B. Pullman, ed.), pp. 295–383, Wiley, New York, 1976.
182. *Pullman B., Saran A.* Quantum-mechanical studies on the conformation of nucleic acids and their constituents, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., **18**, 215–322 (1976).
183. *Harbers E., Domagk G. F., Müller W.* Introduction to Nucleic Acids, Reinhold, New York/Amsterdam/London, 1968.
184. *Duchesne J. (ed.).* Physico-Chemical Properties of Nucleis Acids, Vols. 1 and 2, Academic Press, New York, 1973.
185. *Guschlbauer W.* Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag, Heidelberg (Science Library), 1976.
186. *Davidson J. N.* The Biochemistry of the Nucleic Acids, 8th ed. (revised by R. L. P. Adams, R. H. Burdon, A. M. Campbell, and R. M. S. Smellie), Chapman and Hall, London, 1976.
187. *Wang S. Y.* Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids, Vol. I. Chemistry, Vol. II. Biology, Academic Press, New York, 1976.
188. *Cohn W. E. (ed.).* Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vols. 1–23, Academic Press, New York, 1963–1979.
189. *Pullman B. (ed.).* Molecular Associations in Biology, Academic Press, New York, 1968.
190. *Neidle S. (ed.).* Topics in Nucleic Acid Structure, McMillan, London, 1981.
191. *Taylor R., Kennard O.* The molecular structures of nucleosides and nucleotides. I. The influence of protonation on the geometries of nucleic acid constituents, J. Mol. Struct., **78**, 1–28 (1982).
192. *Voet D., Rich A.* The crystal structures of purines, pyrimidines and their intermolecular complexes, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., **10**, 183–265 (1970).
193. *Ringertz H. G.* Crystal structure studies of purines, Jerus. Symp. Quant. Chem. Biochem., **4**, 61–72 (1973).
194. *Lister J. H.* Current views on some physicochemical aspects of purines, Adv. Heterocyc. Chem., **24**, 215–216 (1979).
195. *Rao S. T., Sundaralingam M.* Stereochemistry of nucleic acids and their constituents. XIII. The crystal and molecular structure of 3′-O-acetyl-adenosine. Conformational analysis of nucleosides and nucleotides with *syn* glycosidic torsion angle, J. Amer. Chem. Soc., **92**, 4963–4970 (1970).
196. *Weast R. C. (ed.).* Handbook of Chemistry and Physics, p. F-215, CRC Press Cleveland, Ohio, 1976.

197. *Sutton L.E. (ed.).* Tables of Interatomic Distances and Configuration in Molecules and Ions, Chem. Soc., Burlington House, London, 1965.
198. *Pauling L.* The Nature of the Chemical Bond, Cornell Univ, Press, Ithaca, N.Y., 1978.
199. *Pullman A., Pullman B.* Recherches sur la structure en chimothérapie anticancéreuse. II. Les bases puriques fondamentales, Bull. Soc. Chim. (Paris), 766–772, 1958; Part VI: Les pyrimidines naturelles fondamentales, Bull. Soc. Chim. (Paris), 594–597, 1959.
200. *Rao C.N.R.* Conformational studies on amides and related systems, Jerus. Symp. Quant. Chem. Biochem., **5**, 107–120 (1973).
201. *Geller M., Lesyng B.* Barrier to rotation and conformation of the $—NR_2$ group in cytosine and its derivatives. I. Theoretical studies of cytosine, Biochem. Biophys. Acta, **417**, 407–419 1975.
202. *Kulakowska I., Geller M., Lesyng B., Bolewska K., Wierzchowski K.L.* Barrier to rotation and conformation of the $—NR_2$ group in cytosine and its derivatives. II. Theoretical dipole moments of methylated cytosines, Biochim Biophys. Acta, **417**, 420–429 (1975).
203. *Rao K.G., Rao C.N.R.* Restricted rotation about the exocyclic C—N bond in nucleic acid bases, J. Chem. Soc. Perkin Trans., **2**, 889–891 (1973).
204. *Raszka M., Kaplan N.O.* Association by hydrogen bonding of mononucleotides in aqueous solution, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **69**, 2025–2029 (1972).
205. *Shoup R.R., Miles H.T., Becker E.D.* Restricted rotation about the exocyclic carbon–nitrogen bond in cytosine derivatives, J. Phys. Chem., **76**, 64–70 (1972).
206. *Shoup R.R., Becker E.D., Miles H.T.* Restricted rotation of the amino group in 1-methylcytosine, Biochem. Biophys. Res. Commun., **43**, 1350–1353 (1971).
207. *Dattagupta J.K., Saenger W., Bolewska K., Kulakowska I.* X-Ray study of 1,5,N_4,N_4-tetramethylcytosine–An overcrowded molecule with planar structure, Acta Cryctallogr., B, **33**, 85–89 1977.
208. *Lesyng B., Saenger W.* Theoretical investigations on the conformation of 1,5,N_4,N_4-tetramethylcytosine, Biochim. Biophys. Acta, **544**, 215–224 (1978).
209. *Singh C.* Location of hydrogen atoms in certain heterocyclic compounds, Acta Crystallogr., **19**, 861–864 (1965).
210. *Sundaralingam M., Jensen L.H.* Stereochemistry of nucleic acid constituents. II. A comparative study, J. Mol. Biol., **13**, 930–943 (1965).
211. *Saran A., Perahia D., Pullman B.* Molecular orbital calculations on the conformation of nucleic acids and their constituents. VII. Conformation of the sugar ring in β-nucleosides: The pseuorotational representation, Theor. Chim. Acta (Berlin), **30**, 31–44 (1973).
212. *Sasisekharan V.* Conformation of polynucleotides, Jerus. Symp. Quant. Chem. Biochem., **5**, 247–260 (1973).
213. *Govil G., Saran A.* Quantum chemical studies on the conformational structure of nucleic acids. II. EHT and CNDO calculations on the puckering of D-ribose, J. Theor. Biol., **33**, 399–406 (1971).
214. *Луговской А.А., Дашевский В.Г.* Конформации β-D-рибозы. Молек. биол., 1972, **6**, 440–448.
215. *Луговской А.А., Дашевский В.Г., Китайгородский Л.И.* Конформации сахарных остатков в пиримидиновых нуклеозидах. Молек. биол., 1972, **6**, 449–456. Конформации сахарных остатков в пуриновых нуклеозидах. Молек. биол., 1972, **6**, 614–620.
216. *Olson W.K., Sussman J.L.* How flexible is the furanose ring? 1. A comparison of experimental and theoretical studies, J. Amer. Chem. Soc., **104**, 270–278 (1982);

How flexible is the furanose ring? 2. An updated potential energy estimate, J. Amer. Chem. Soc., **104**, 278–286 (1982).

217. *Spencer M.* The stereochemistry of deoxyribonucleic acid: I. Covalent bond lengths and angles, Acta Crystallogr., **12**, 59–65 (1959).
218. *Sarma R.H., Mynott R.J.* Conformation of pyridine nucleotides studied by phosphorus-31 and hydrogen-1 fast Fourier transform nuclear magnetic resonance spectroscopy. I. Oxidized and reduced mononucleotides, J. Amer. Chem Soc., **95**, 1641–1649 (1973).
219. *Dugas H., Blackburn B.J., Robins R.K., Deslauriers R., Smith I.C.P.* A nuclear magnetic resonance study of the conformation of β-cyanuric acid roboside. Further evidence for the *anti* rotamer in pyrimidine nucleosides, J. Amer. Chem. Soc., **93**, 3468–3470 (1971).
220. *Schleich T., Blackburn B.J., Lapper R.D., Smith I.C.P.* A nuclear magnetic resonance study of the influence of aqueous sodium perchlorate and temperature on the solution conformation of uracil nucleosides and nucleotides, Biochemistry, **11**, 137–145 (1972).
221. *Hruska F.E., Danyluk S.S.* Conformational changes of the ribose group in dinucleoside mono- and diphosphates. Temperature dependence, J. Amer. Chem. Soc., **90**, 3266–3267 (1968).
222. *Hruska F.E., Grey A.A., Smith I.C.P.* A nuclear magnetic resonance study of the molecular conformation of β-pseudouridine in solution, J. Amer. Chem. Soc., **92**, 4088–4094 (1970).
223. *Röder O., Lüdemann H.-D., von Goldammer E.* Determination of the activation energy for pseudorotation of the furanose ring in nucleosides by ^{13}C nuclear-magnetic-resonance relaxation, Eur. J. Biochem., **53**, 517–524 (1975).
224. *Cushley R., Codington J.F., Fox J.J.* Nucleosides. XLIX. Nuclear magnetic resonance studies of 2′- and 3′-halogeno nucleosides. The conformations of the 2′-deoxy-2′-fluorouridine and 3′-deoxy-3′-fluoro-β-Darabinofuranosyluracil, Can. J. Chem., **46**, 1131–1140 (1968).
225. *Ekiel I., Darzynkiewicz E., Dudycz L., Shugar D.* Solution conformation and relative acidities of the sugar hydroxyls of the O′-methylated derivatives of the antimetabolite 9-β-D-xylofuranosyladenine, Biochemistry, **17**, 1530–1536 (1978).
226. *Imazawa M., Ueda T., Ukita T.* Nucleosides and nucleotides. XII. Synthesis and properties of 2′-deoxy-2′-mercaptouridine and its derivatives, Chem. Pharm. Bull., **23**, 604–610 (1975).
227. *Leeuw H.P.M. de, de Jager J.R., Koeners H.J., van Boom J.H., Altona C.* Puromycin and some of its analogues: Conformational properties in solution, Eur. J. Biochem., **76**, 209–217 (1977).
228. *Plach H., Westhof E., Lüdemann H.-D., Mengel R.* Solution conformational analysis of 2′-amino-2′-deoxyadenosine, 3′-amino-3′-deoxyadenosine and puromycin by pulsed nuclear magnetic resonance methods, Eur. J. Biochem., **80**, 295–304 (1977).

228a. *Haasnoot C.A.G., de Leeuw F.A.A.M. de Leeuw H.P.M., Altona C.* The relationship between proton–proton NMR coupling constants and substituent electronegativities II. Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides in solution using a generalized Karplus equation, Org. Magn. Res., **15**, 43–52 (1982).

229. *Uesugi S., Miki H., Ikehara M., Iwahashi H., Kyogoku Y.* A linear relationship between electronegativity of 2′-substituents and conformation of adenine nucleosides, Tetrahedron Lett., **42**, 4073–4076 (1979).
230. *Guschlbauer W., Jankowski K.* Nucleoside conformation is determined by the

electronegativity of the sugar substituent, Nucleic Acids Res., **8**, 1421–1433 (1980).

231. *Klimke G., Cuno I., Lüdemann H.-D., Mengel R., Robins M.J.* Ribose conformations of adenosine analogs modified at the 2′, 3′ or 5′ positions, J. Naturforsch., C, **34**, 1075–1084 (1979).
232. *Rohrer D.C., Sundaralingam M.* Stereochemistry of nucleic acids and their constituents. XII. The crystal and molecular structure of α-D-2′-amino-2′-deoxyadenosine monohydrate, J. Amer. Chem. Soc., **92**, 4956–4962 (1970).
233. *Narayanan P., Berman H.* A crystallographic determination of a chemical structure: 6-Amino-10-(β-D-ribofuranosylamino)pyrimido[5,4-d]pyrimidine, an example of an unusual D-ribose conformation, Carbohyd. Res., **44**, 169–180 (1975).

233a. *Gerlt J.A., Youngblood A.V.* The solution conformational preference of the sugar and sugar phosphate constituents of RNA and DNA, J. Amer. Chem. Soc., **102**, 7433–7438 (1980).

234. *Rabczenko A., Shugar D.* Hydrogen bonding scheme involving ribose 2′-hydroxyls in polyribouridylic acid, Acta Biochem. Pol., **19**, 89–94 (1972).
235. *Abraham D.J.* Proposed detailed structural model for tRNA and its geometric relationship to a messenger, J. Theor. Biol., **30**, 83–91 (1971).
236. *Kölkenbeck K., Zundel G.* The significance of the 2′-OH group and the influence of cations on the secondary structure of the RNA backbone, Biophys. Struct. Mechanism, **1**, 203–219 (1975).
237. *Young P.R., Kallenbach N.R.* Secondary structure in polyuridilic acid. Non-classical hydrogen bonding and the function of the ribose 2′-hydroxyl group, J. Mol. Biol., **126**, 467–479 (1978).
238. *Zmudzka B., Shugar D.* Role of the 2′-hydroxyl in polynucleotide conformation. Poly 2′-O-methyl-uridilic acid, FEBS Lett., **8**, 52–54 (1970).
239. *Zmudzka B., Janion C., Shugar D.* Poly 2′-O-methylcytidylic acid and the role of the 2′-hydroxyl in polynucleotide structure, Biochem. Biophys. Res. Commun., **37**, 895–901 (1969).
240. *Bobst A.M., Rottman F., Cerutti P.A.* Effect of the methylation of the 2′-hydroxyl group in polyadenylic acid on its structure in weakly acidic and neutral solutions and on its capability to form ordered complexes with polyuridylic acid, J. Mol. Biol. **46**, 221–234 (1969).
241. *Hobbs J., Sternbach H., Sprinzl M., Eckstein F.* Polynucleotides containing 2′-chloro-2′-deoxyribose, Biochemistry, **11**, 4336–4344 (1972).
242. *Blandin M., Tran-Dinh S., Catlin J.C., Guschlbauer W.* Nucleoside conformations. 16. Nuclear magnetic resonance and circular dichroism studies on pyrimidine-2′-fluoro-2′-deoxyribonucleosides, Biochim. Biophys. Acta, **361**, 249–256 (1974).
243. *Catlin J.C., Guschlbauer W.* Oligonucleotide conformations. III. Comparative optical and thermodynamic studies of uridylyl-3′,5′-nucleosides containing ribose, deoxyribose or 2′-deoxy-2′-fluororibose in the uridine moiety, Biopolymers, **14**, 51–72 (1975).
244. *Guschlbauer W., Blandin M., Drocourt J.L., Thang M.N.* Poly-2′-deoxy-2′-fluorocytidylic acid: Enzymatic synthesis, spectroscopic characterization and interaction with polyinosinic acid, Nucleic Acids Res., **4**, 1933–1944 (1977).
245. *Pitha J.* Unexpected conformational stability of poly(2′-azido-2′-deoxyuridilic acid), J. Amer. Chem. Soc., **94**, 3638–3639 (1972).
246. *Bolton P.H., Kearns D.R.* Hydrogen bonding of the 2′-OH in RNA, Biochim. Biophys. Acta, **517**, 329–337 (1978).

247. *Bolton P.H., Kearns D.R.* Intramolecular water bridge between the 2′-OH and phosphate groups of RNA. Cyclic nucleotides as a model system, J. Amer. Chem. Soc., **101**, 479–484 (1979).
248. *Ts'o P.O.P., Barrett J.C., Kan L.S., Miller P.S.* Proton magnetic resonance studies of nucleic acid conformation, Annu. Rev. N.Y. Acad. Sci., **222**, 290–306 (1972).
249. *Geise H.J., Adams W.J., Bartell L.S.* Electron diffraction study of gaseous tetrahydrofuran, **25**, 3045–3052 (1969).
250. *Almenningen A., Seip H.M., Willadsen T.* Studies on molecules with five-membered rings. II. An electron diffraction investigation of gaseous tetrahydrofuran, Acta Chem. Scand., **23**, 27–48 (1969).
251. *Engerholm G.G., Luntz A.C., Gwinn W.D., Harris D.O.* Ring puckering in five-membered rings, J. Chem. Phys., **50**, 2446–2457 (1969).
252. *Cremer D., Pople J.A.* Molecular orbital theory of the electronic structure of organic compounds. XXIII. Pseudorotation in saturated five-membered ring compounds, J. Amer. Chem. Soc., **97**, 1358–1367 (1975).
253. *Hendrickson J.B.* Molecular geometry. I. Machine computation of the common rings, J. Amer. Chem. Soc., **83**, 4537–4547 (1961); **85**, 4057 (1963).
254. *Dunitz J.D.* Approximate relationship between conformational parameters in 5- and 6-membered rings, Tetrahedron, **28**, 5459–5467 (1972).
255. *Westheimer F.H.* Calculation of the magnitude of steric effects. In: Steric Effects in Organic Chemistry (M.S. Hewman, ed.), Chap. 12, pp. 523–555, Wiley, New York, 1956.
256. *Hingerty B., Saenger W.* Topography of cyclodextrin inclusion complexes. 8. Crystal and molecular structure of the α-cyclodextrin–methanol pentahydrate complex. Disorder in a hydrophobic cage, J. Amer. Chem. Soc., **98**, 3357–3365 (1976).
257. *Sundaralingam M.* Conformations of the furanose ring in nucleic acids and other carbohydrate derivatives in the solid state, J. Amer. Chem. Soc., **87**, 599–606 (1965).
258. *Saenger W., Scheit K.H.* A pyrimidine nucleoside in the *syn* conformation: molecular and crystal structure of 4-thiouridine-hydrate, J. Mol. Biol., **50**, 153–169 (1970).
259. *Lesyng B., Saenger W.* Influence of crystal packing forces on molecular structure in 4-thiourudine. Comparison of *anti* and *syn* forms, Z. Naturforsch., C, **36**, 956–960 (1981).
260. *Scheit K.H., Saenger W.* The conformation of 4-thiouridine-5′-phosphate in single and double stranded polynucleotides, FEBS Lett., **2**, 305–308 (1969).
261. *Schweizer M.P., Witkowski J.T., Robins R.K.* Nuclear Magnetic Resonance determination of *syn* and *anti* conformation in pyrimidine nucleosides, J. Amer. Chem. Soc., **93**, 277–279 (1971).
262. *Hruska F.E., Ogilvie K.K., Smith A.A., Wayborn H.* Molecular conformation of 4-thiouridine in aqueous solution, Can. J. Chem., **49**, 2449–2452 (1971).
263. *Viswamitra M.A., Reddy B.S., Lin G.H.-Y., Sundaralingam M.* Stereochemistry of nucleic acids and their constituents. XVII. Crystal and molecular structure of deoxycytidine 5′-phosphate monohydrate. A possible puckering for the furanoside ring in B-deoxyribonucleic acid, J. Amer. Chem. Soc., **93**, 4565–4572 (1971).
264. *Dickerson R.E., Drew H.R.* A kinematic model for B-DNA, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **78**, 7318–7322 (1982).
265. *Lin G.H.-Y., Sundaralingam M., Arora S.K.* Stereochemistry of nucleic acids and

their constituents. XV. Crystal and molecular structure of 2-thiocytidine dihydrate, a minor constituent of transfer ribonucleic acids, J. Amer. Chem. Soc., **93**, 1235–1241 (1971).

266. *Lo A., Shefter E., Cochran T.G.* Analysis of N-glycosyl bond length in crystal structures of nucleosides and nucleotides, J. Pharm. Sci., **64**, 1707–1710 (1975).
267. *Lüdemann H.-D., Westhof E., Röder O.* A dynamic correlation between ribose conformation and glycosyl torsion angle of dissolved xathosine studies by continuous wave mode and pulsed nuclear magnetic resonance methods, Eur. J. Biochem., **49**, 143–150 (1974).
268. *Ts'o P.O.P., Kondo N.S., Schweizer M.P., Hollis D.P.* Studies of the conformation and interaction in dinucleoside mono- and diphosphates by proton magnetic resonance, Biochemistry, **8**, 997–1029 (1969).
269. *Kondo N.S., Fang J.N., Miller P.S., Ts'o P.O.P.* Influence of the furanose on the conformation of adenine dinucleoside monophosphates in solution, Biochemistry, **11**, 1991–2003 (1972).
270. *Deslauriers R., Smith I.C.P.* A proton magnetic resonance study of the influence of base ionization on the conformation of pseudouridine, Can. J. Biochem., **50**, 766–774 (1972).
271. *Miles D.W., Townsend L.B., Robins M.J., Robins R.K., Inskeep W.H., Eyring H.* Circular dichroism of nucleoside derivatives. X. Influence of solvents and substituents upon the Cotton effects of guanosine derivatives, J, Amer. Chem. Soc., **93**, 1600–1608 (1971).
272. *Dudycz L., Stolarski R., Pless R., Shugar D.* A ^{1}H NMR study of the *syn–anti* dynamic equilibrium in adenine nucleosides and nucleotides with the aid of some synthetic model analogues with fixed conformations, Z. Naturforsch., C. **34**, 359–373 (1979).
273. *Klimke G., Lüdemann H.-D., Townsend L.B.* Further evidence for a S-*syn* correlation in the purine (β) ribosides: The solution conformation of two tricyclic analogs of adenosine and guanosine, Z. Naturforsch., C **34**, 653–657 (1979).
274. *Miles D.W., Townsend L.B., Miles D.L., Eyring H.* Conformation of nucleosides: Circular dichroism study on the *syn–anti* conformational equilibrium of 2-substituted benzimidazole nucleosides, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **76**, 553–556 (1979).
275. *Schweizer M.P., Banta E.B., Witkowski J.T., Robins R.K.* Determination of pyrimidine *syn–anti* conformational preference in solution by proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance, J. Amer. Soc., **95**, 3770–3778 (1973).
276. *Rhodes L.M., Schimmel P.R.* Nanosecond relaxation processes in aqueous mononucleoside solution, Biochemictry, **10**, 4426–4433 (1971).
277. *Hemmes P.R., Oppenheimer L., Jordan F.* Ultrasonic relaxation evaluation of the thermodynamics of *syn–anti* glycosidic isomerization of adenosine, J. Amer. Chem. Soc., **96**, 6023–6026 (1974).
278. *Cadet J., Ducolomb R., Taieb C.* Analyse de RMN à 250 MHZ de la méthyl-6-desoxy-2'-uridin–Conformation preferentielle en solution aqueuse, Tetrahedron Lett., **40**, 3455–3458 (1975).
279. *George A.L., Hruska F.E., Ogilvie K.K., Holý A.* Proton magnetic resonance studies of 2'-deoxynucleosides in the *syn* conformation, Can. J. Chem., **56**, 1170–1176 (1978).
280. *Nanda R.K., Tewari R., Govil G., Smith I.C.P.* The conformation of β-pseudouridine about the glycosidic bond as studied by ^{1}H homonuclear Overhauser measurements and molecular orbital calculations, Can. J. Chem., **52**, 371–375 (1974).

281. *Geraldes C.F.G.C.* Nuclear magnetic resonance study of the solution conformation of adenine mononucleosides using the lanthanide probe method, J. Magn. Resonance, **36**, 89–98 (1979).
282. *Бобрушин С.К., Кирпичников М.П., Флорентьев В.Л.* Изучение методом ЯМР конформации нуклеотидов, олигонуклеотидов и их аналогов в растворе. II. *Син-анти*-равновесие в растворе аденозина, 5′-AMP, 3′-AMP, 5′-CMP, 3′-CMP. Молек. биол. 1979, **13**, 870–877.
283. *Wilson H.R., Rahman A.* Nucleoside conformation and non-bonded interactions, J. Mol. Biol., **56**, 129–142 (1971).
284. *Berthod H., Pullman B.* Molecular orbital calculations on the conformation of nucleic acids and their constituents. I. Conformational energies of β-nucleosides with C_3- and C_2-endo sugars, Biochim. Biophys. Acta, **232**, 595–606 (1971).
285. *Kang S.* Stereochemistry of pyrimidine nucleosides: Conformational analysis of cytidine, thymidine, 4-thiouridine and deoxycytidine by the neglect of differential overlap molecular orbital method, J. Mol. Biol., **58**, 297–315 (1971).
286. *Kang S.* Stereochemistry of purine nucleosides. Conformational analysis of adenosine and guanosine, Jerus. Symp. Quant. Chem. Biochem., **5**, 271–282 (1973).
287. *Schwalbe C.H., Saenger W.* 6-Azauridine, a nucleoside with unusual ribose conformation, J. Mol. Biol., **75**, 129–143 (1973).
288. *Saenger W., Suck D., Knappenberg M., Dirkx J.* Theoretical drug design: 6-Azauridine-5′-phosphate–Its X-ray crystal structure, potential energy maps, and mechanism of inhibition of orotidine-5′-phosphate decarboxylase, Biopolymers, **18**, 2015–2036 (1979).
289. *Singh P., Hodgson D.J. High-anti* conformation in *o*-azanucleosides. The crystal and molecular structure of 6-azacytidine, Biopolymers, **13**, 5445–5452 (1974).
290. *Yasuniwa M., Tokuoka R., Ogawa K., Yamagata Y., Fujii S., Tomita K.-I., Limm W., Ikehara M.* The crystal and molecular structure of 8-methyladenosine-3′-monophosphate dinydrate, Biochim. Biophys. Acta, **561**, 240–247 (1979).
291. *Fujii S., Fujiwara T., Tomita K.-I.* Structural studies on two forms of 8-bromo-2′,3′-O-isopropylideneadenosine, Nucleic Acids Res., **3**, 1985–1996 (1976).
292. *Ikehara M., Uesugi S., Yoshida K.* Studies on the conformation of purine nucleosides and their 5′-phosphates, Biochemistry, **11**, 830–836 (1972).
293. *Sarma R.H., Lee C.-H., Evans F.E., Yathindra N., Sundaralingam M.* Probing the interrelation betweem the glycosil torsion, sugar pucker, and backbone conformation in C_8-substituted adenine nucleotides by ^1H and ^1H-$\{^{31}P\}$ fast Fourier transform nuclear magnetic resonance methods and conformational energy calculations, J. Amer. Chem. Soc., **96**, 7337–7348 (1974).
294. *Jordan F., Niv H.* C-8 amino purine nucleosides. A well-defined steric determinant of glycosyl conformational preferences, Birchim. Biophys. Acta, 476, 265–271 (1977).
295. *Abdallah M.A., Biellmann J.F., Nordström B., Brändén C.-I.* The conformation of adenosine diphosphoribose and 8-bromoadenosine diphosphoribose when bound to liver alcohol dehydrogenase, Eur. J. Biochem., **50**, 475–481 (1975).
296. *Neidle S., Sanderson M.R., Subbiah A., Chattopadhyaya J.B., Kuroda R., Reese C.B.* 9-β-D-Arabinofuranosyl-8-n-butylaminoadenine, a C_8 substituted nucleoside in the *anti* conformation, Biochim. Biophys. Acta, **565**, 379–386 (1979).
297. *Pless R., Dudycz L., Stolarski R., Shugar D.* Purine nucleosides and nucleotides

unequivocally in the *syn* conformation: Guanosine and 5′-GMP with 8-*tert*-butyl and 8-(α-hydroxyisopropyl) substituents, Z. Naturforsch., C **33**, 902–907 (1978).

298. *Birnbaum G.I., Shugar D.* A purine nucleoside unequivocally constrained in the *syn* form. Crystal structure and conformation of 8-(α-hydroxyisopropyl)-adenosine, Biochim. Biophys. Acta, **517**, 500–510 (1978).
299. *Guschlbauer W.* Why is guanosine different? Jerus. Symp. Quant. Chem. Biochem., **4**, 297–310 (1972).
300. *Young D.W., Tollin P., Wilson H.R.* Molecular conformation of deoxyguanosine-5′-phosphate, Nature, **248**, 513–514 (1974); The crystal structure of disodium deoxyguanosine-5′-phosphate tetrahydrate, Acta Crystallogr., B **30**, 2012–2128 (1974).
301. *Viswamitra M.A., Seshadri T.R.* Molecular structure of deoxyguanosine-5′-phosphate, Nature, **252**, 176–177 (1974).
302. *Drew H., Takano T., Tapaka S., Itakura K., Dickerson R.E.* High-salt d(CpGpCpG): A left-hended Z′ DNA double helix, Natur, **286**, 567–573 (1980).
303. *Wang A.H.-J., Quigley G.J., Kolpak F.J., Crawford J.L., Boom J.H. van, Marel G. van der, Rich A.* Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution, Nature, **282**, 680–686 (1979).
304. *Arnott S., Chandrasekaran R., Birdsall D.L., Leslie A.G.W., Ratcliff R.L.* Left handed DNA helices, Nature, **283**, 743–745 (1980).
305. *Guschlbauer W., Frič I., Holý A.* Oligonucleotide conformations. Optical studies on GpU analogues with modified uridine residues, Eur. J. Biochem., **31**, 1–13 (1972).
306. *Tran-Dinh Son, Guschlbauer W., Guéron M.* Flexibility and conformations of guanosine monophosphates by the Overhauser effect, J. Amer. Chem. Soc., **94**, 7903–7911 (1972).
307. *Yathindra N., Sundaralingam M.* Conformational studies on guanosine nucleotides and polynucleotides. The effect of the base on glycosyl and backbone conformations, Biopolymers, **12**, 2075–2082 (1973).
308. *Olson W.K. Syn–anti* effects on the spatial configuration of polynucleotide chains, Biopolymers, **12**, 1787–1814 (1973).
309. *Lespinasse J.-N., Broch H., Cornillon R., Vasilescu R.* Flexibility of deoxyguanosine 5′-monophosphate (5′-dGMP): An E.H.T. conformational analysis, J. Theor. Biol., **57**, 225–230 (1976).
310. *Berthod H., Pullman B.* Complementary studies on the rigidity–flexibility of nucleotides, FEBS Lett., **33**, 147–150 (1973).
311. *Rao S.T., Sundaralingam M.* Stereochemistry of nucleic acids and their constituents. V. The crystal and molecular structure of a hydrated monosodium inosine 5′-phosphate. A commonly occurring unusual nucleotide in the anticodons of tRNA, J. Amer. Chem. Soc., **91**, 1210–1217 (1969).
312. *Nagashima N., Iitaka Y.,* The crystal structures of barium inosine-5′-phosphate and disodium inosine-5′-phosphate, Acta Crystallogr., B, **24**, 1136–1138 (1968).
313. *Hruska F.E., Smith A.A., Dalton J.G.* A correlation of some structural parameters of pyrimidine nucleosides. A nuclear magnetic resonanse study, J. Amer. Chem. Soc., **93**, 4334–4336 (1971).
314. *Lakshminarayanan A.V., Sasisekharan V.* Stereochemistry of nucleic acids and polynucleosides. V. Conformational energy of a ribisephosphate unit, Biopolymers, **8**, 489–503 (1969).
315. *Saran A., Pullman B., Perahia D.* Molecular orbital calculations on the conformation of nucleic acids and their constituents. IV. Conformation about

the exocyclic $C_4 - C_5$ bond, Biochim. Biophys. Acta, **287**, 211–231. See also (1973) VI. Conformation about the exocyclic $C_4 - C_5$ bond in α-nucleosides, Biochim. Biophys. Acta, **299**, 497–499 (1973).

316. *Saran A., Govil G.* Quantum chemical studies on the conformational structure of nucleic acids. III. Calculation of backbone structure by extended Hückel theory, J. Theor. Biol., **33**, 407–418 (1971).
317. *Sussman J.L., Seeman N.C., Kim S.-H., Berman H.* Crystal structure of naturally occurring dinucleoside phosphate: Uridylyl-3′,5′-adenosine phosphate. Model for RNA chain folding, J. Mol. Biol., **66**, 403–421 (1972).
318. *Rubin J., Brennan T., Sundaralingam M.* Crystal and molecular structure of a naturally occurring dinucleoside monophosphate. Uridylyl-3′,5′-adenosine hemihydrate. Conformational "rigidity" of the nucleotide unit and models for polynucleotide chain folding, Biochemistry, **11**, 3112–3128 (1972).
319. *Egert E., Lindner H.-J., Hillen W., Gassen H.G.* Crystal structure and conformation of 5-aminouridine, Acta Crystallogr., B, **34**, 2204–2208 (1978).
320. *Taylor R., Kennard O.* Crystallographic evidence for the existence of C–H···O, C–H···N, and C–H···Cl hydrogen bonds, J. Amer. Chem. Soc., **104**, 5063–5070 (1982).
321. *Donohue J.* Selected topics in hydrogen bonding. In: Structural Chemistry and Molecular Biology (A. Rich and N. Davidson, eds.), pp. 443–465, Freeman, San Francisco, 1968.
322. *Goel A., Rao C.N.R.* Hydrogen bonds formed by C–H groups, Trans. Faraday Soc., 2828–2832, 1972.
323. *Schweizer M.P., Chan S.I., Helmkamp G.H., Ts'o P.O.P.* An experimental assignment of proton magnetic resonance spectrum of purine, J. Amer. Chem. Soc., **86**, 696–700 (1964).
324. *Маслова Р.Н., Лесник Е.А., Варшавский Я.М.* Влияние конформации на скорость изотопного обмена водорода в полиадениловой кислоте и ее комплексах. Молек. биол., 1969, **3**, 728–738.
325. *Брусков В.И., Бушуев В.Н., Полтев В.И.* Исследование методом ЯМР водородных связей типа C—O···O в аналогах оснований нуклеиновых кислот. Молек. биол., 1980, **14**, 316–322.
326. *Amidon G.L., Anik S., Rubin J.* An energy partitioning analysis of base–sugar intramolecular C–H···O hydrogen bonding in nucleosides and nucleotides. In: Structure and Conformations of Nucleic Acids and Protein–Nucleic Acid Interactions (M. Sundaralingam and S.T. Rao, eds.), pp. 729–744, Univ. Park Press, Baltimore, 1975.
327. *Wong Y.-S., Lippard S.J.* X-Ray crystal structure of a 2:2 chloroterpyridineplatinum(II)-adenosine-5′-monophosphate intercalation complex, J. Chem. Soc. Commun., 824–825, 1977.
328. *Neidle S., Taylor G., Sanderson M., Shieh H.-S., Berman H.* A 1:2 crystalline complex of ApA: proflavine: A model for binding to single-stranded regions in RNA, Nucleic Acids Res., **5**, 4417–4422 (1978).
329. *Viswamitra M.A., Seshadri T.P., Post M.L.* An uncommon nucleotide conformation shown by molecular structure of deoxyuridine-5′-phosphate and nucleic acid stereochemistry, Nature, **258**, 542–544 (1975).
330. *Barry C.D., North A.C.T., Glasel J.A., Williams R.J.P., Xavier A.V.* Quantitative determination of mononucleotide conformations in solution using lanthanide ion shift and broadening NMR probes, Nature, **232**, 236–245 (1971).
331. *Evans F.E., Sarma R.H.* Nucleotide rigidity, Nature, **263**, 567–572 (1976).
332. *Berthod H., Pullman B.* Nucleotides: rigid or flexible? FEBS Lett., **30**, 231–235 (1973).

333. *Jack A., Klug A., Ladner J.E.* "Non-rigid" nucleotides in tRNA: A new correlation in the conformation of a ribose, Nature, **261**, 250–251 (1976).
334. *Sundaralingam M., Westhof E.* The "rigid" nucleotide concept in perspective, Int. J. Quant. Chem.: Quant. Biol. Symp., **6**, 115–130 (1979).
335. *Cruickshank D.W.* The role of 3d-orbitals in π-bonds between(a) silicon, phosphorus, sulphur or chlorine and (b) oxygen or nitrogen, J. Chem. Soc. (London), 5486–5504 (1961).
336. *Corbridge D.E.C.* The Structural Chemistry of Phosphorus, pp. 1–8, Elsevier, New York, 1974.
337. *Matheja J., Degens E.T.* Structural Molecular Biology of Phosphates, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1971.
338. *Shomaker V., Stevenson D.P.* Some revisions of the covalent radii and the additivity rule for the lengths of partially ionic single covalent bonds, J. Amer. Chem. Soc., **63**, 37–40 (1941).
339. *Akishin P.A., Rambidi N.G., Zasorin E.Z.* An electron diffraction investigation of the structure of the phosphorus pentoxide molecule, Sov. Phys. Crystallogr., **4**, 334–338 (1959).
340. *Pauling L.* Interatomic distances and bond character in the oxygen acids and related substances, J. Phys. Chem., **56**, 361–365 (1952).
341. *Baur W.H.* The geometry of polyhedral distortions. Predictive relationships for the phosphate group, Acta Crystallogr., B, **30**, 1195–1215 (1974).
342. *Brown I.D., Shannon R.D.* Empirical bond-strength-bond-length curves for oxides, Acta Crystallogr., A, **29**, 266–282 (1973).
343. *Lipmann F.* Metabolic generation and utilisation of phosphate bond energy, Adv. Enzymol., **1**, 99–162 (1941).
344. *Saenger W., Reddy B.S., Mühlegger K., Weimann G.* X-Ray study of the lithium complex of NAD^+, Nature, **267**, 225–229 (1977).
345. *Boyd D.B., Lipscomb W.* Electronic structures for energy-rich phosphates, J. Theor. Biol., **25**, 403–420 (1969).
346. *Fernandez-Alonso J.I.* Electronic structures in quantum biochemistry, Adv. Chem. Phys., **7**, 3–83 (1964).
347. *Watson D.G., Kennard O.* The structure of "high-energy" phosphate compounds. II. An X-ray analysis of cyclohexylammonium phosphoenolpyruvate, Acta Crystallogr., B, **29**, 2358–2364 (1973).
348. *Stryer L.* Biochemistry, Freeman, San Francisco, 1975. [Имеется перевод 2-го издания: Страйер Л. Биохимия.–М.: Мир, 1985.]
349. *Lehninger A.L.* Biochemistry, 2nd ed. Worth, New York, 1975.
350. *Alberty R.A.* Standard Gibbs free energy, enhalpy, and entropy changes as a function of pH and pMg for several reactions involving adenosine phosphate, J. Biol. Chem., **244**, 3290–3302 (1969).
351. *Emerson J., Sundaralingam M.* Structure of the potassium salt of the modified nucleotide dihydrouridine 3′-monophosphate hemihydrate: Correlation between the base pucker and sugar pucker and models for metal interaction with ribonucleic acid loops, Acta Crystallogr., B, **36**, 537–543 (1980).
352. *Patel D.J.* Proton and phosphorus NMR studies of $d-CpG(pCpG)_n$ duplexes in solution. Helix-coil transition and complex formation with actinomycin-D, Biopolymers, **15**, 533–558 (1976).
353. *Lee C.-H., Ezra F.S., Kondo N.S., Sarma R.H., Danyluk S.S.* Conformational properties of dinucleoside monophosphates in solution: Dipurines and dipyrimidines, Biochemistry, **15**, 3627–3639 (1976).
354. *Dobson C.M., Geraldes C.F.G.C., Ratcliffe G., Williams R.J.P.* Nuclear-

magnetic-resonanse studies of 5′-ribonucleotide and 5′-deoxyribonucleotide conformations in solution using the lanthanide probe method, Eur. J. Biochem., **88**, 259–266 (1978).

355. *Inagaki F., Tasumi M., Miyazawa T.* Structures and populations of conformers of nucleoside monophosphates in solution. I. General methods of conformation search with lanthanide-ion probes and spin-coupling constants and application to uridine-5′-monophosphate, Biopolymers, **17**, 267–289 (1978).
356. *Thornton J. M., Bayley P. M.* Conformational energy calculations for dinucleotide molecules. A study of the component mononucleotides adenosine 5′-monophosphate, nicotinamide mononucleotide and adenosine 3′-monophosphate, Biochem. J., **149**, 585–596 (1975).
357. *Pullman B., Perahia D., Saran A.* Molecular orbital calculations ob the conformation of nucleic acids and their constituents. III. Backbone structure of di- and polynucleotides, Biochim. Biophys. Acta, **269**, 1–14 (1972).
358. *Camerman N., Fawcett J. K., Camerman A.* Molecular structure of a deoxyribose-dinucleotide, sodium thymidylyl-5′,3′-thymidilate-5′ hydrate (pTpT), and a possible structural model for polythymidilate, J. Mol. Biol., **107**, 601–621 (1976).
359. *Viswamitra M., Kennard O., Jones P. G., Sheldrick G. M., Salisbury S., Falvello L., Shakked Z.* DNA double helical fragment at atomic resolution, Nature, **273**, 687–688 (1978).
360. *Kim S.-H., Berman H. M., Seeman N. C., Newton M. D.* Seven basic conformations of nucleic acid structural units, Acta Crystallogr., B, **29**, 703–710 (1973).
361. *Newton M. D.* A model conformational study of nucleic acid phosphate ester bonds, The torsional potential of dimethyl phosphate monoanion, J. Amer. Chem. Soc., **95**, 256–258 (1973).
362. *Perahia D., Pullman B., Saran A.* Molecular orbital calculations on the conformation of nucleic acids and their constituents. IX. The geometry of the phosphate group: Key to the conformation of polynucleotides? Biochim. Biophys. Acta, **340**, 299–313 (1974).
363. *Sasisekharan V., Lakshminarayanan A. V.* Stereochemistry of nucleic acids and polynucleotides. VI. Minimum energy conformations of dimethyl phosphate, Biopolymers, **8**, 505–514 (1969).
364. *Tosi C., Lipari G.* Molecular orbital computations on the conformational energy of ethyl methyl phosphate, Theoret. Chim. Acta, **60**, 41–51 (1981).
365. *Lemieux R. U.* Effects of unshared pairs of electrons and their solvation on conformational equilibria. Pure Appl. Chem., **25**, 527–548 (1971).
366. *Wolfe S.* The *gauche* effect. Some stereochemical consequences of adjacent electron pairs and polar bonds, Acc. Chem. Res., **5**, 102–111 (1972).
367. *Radom L., Hehre W. J., Pople J. A.* Molecular orbital theory and the electronic structure of organic compounds. XIII. Fourier component analysis of internal rotation potential functions in saturated molecules, J. Amer. Chem. Soc., **94**, 2371–2381 (1972).
368. *Brunck T. K., Weinhold F.* Quantum-mechanical studies on the origin of barriers to internal rotation about single bonds, J. Amer. Chem. Soc., **101**, 1700–1709 (1979).
369. *Yathindra N., Sundaralingam M.* Backbone conformations i≤ secondary and tertiary structure units of nucleic acids. Constraint in the phosphodiester conformation, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **71**, 3325–3328 (1974).
370. *Olson W. K., Flory P. J.* Spatial configurations of polynucleotide chains. I. Steric

interactions in polyribonucleotides: A virtual bond model, Biopolymers, **11**, 1–23 (1972).

371. *Stellman S.D., Hingerty B., Broyde S.D., Subramanian E., Sato T., Langridge R.* Structure of guanosine-3′,5′-cytidine monophosphate. I. Semi-empirical potential energy calculations and model-building, Biopolymers, **12**, 2731–2750 (1973).
372. *Govil G.* Nucleic acid conformations and biological activitъ, Jerus. Sympos. Quant. Chem. Biochem., **5**, 283–295 (1973).
373. *Tewari R., Nanda R.K., Govil G.* Quantum chemical studies on the conformational structure of nucleic acids. IV. Calculation of backbone structure by CNDO method, J. Theor. Biol., **46**, 229–239 (1974).
374. *Perahia D., Pullman B., Saran A.* Molecular orbital calculations on the conformation of nucleic acids and their constituents. XI. The backbone structure of 3′, 5′ and 2′,3′-linked diribose monophosphates with different sugar puckers, Biochim. Biophys. Acta, **353**, 16–27 (1974).
375. *Govil G.* Conformational structure of polynucleotides arount the O–P bonds: Refined parameters for CPF calculations, Biopolymers, **15**, 2303–2307 (1976).
376. *Srinivasan A.R., Yathindra N., Rao V.S.R., Prakash S.* Preferred phosphodiester conformations in nucleic acids. A virtual bond torsion potential to estimate lone-pair interactions in a phosphodiester, Biopolymers, **19**, 165–171 (1980).
377. *Kitamura K., Wakahara A., Mizuno H., Baba Y., Tomita K.-I.* Conformationally "concerted" changes in nucleotide structure. A new description using circular correlation and regression analyses, J. Amer. Chem. Soc., **103**, 3899–3904 (1981).
378. *Kitamura K., Wakahara A., Mizuno H., Amizaki T., Baba Y., Tomita K.-T.* A quantitative description of conformational change in nucleic acid helices. Submitted for publication.
379. *Yayaraman S., Yathindra N.* Theoretical evidence for the occurence of sequence-dependent helical variations in B-DNA dodecamer. A backbone near-neighbour bond correlation between sugar residue and phosphodiester, Nucleic Acids Res., Submitted for publication.
380. *Olson W.K.* The spatial configuration of ordered polynucleotide chains. I. Helix formation and base stacking, Biopolymers, **15**, 859–878 (1976).
381. *Yathindra N., Sundaralingam M.* Analysis of possible helical structures of nucleic acids and polynucleotides. Application of (n–h) plots, Nucleic Acids Res., **3**, 729–747 (1976).
382. *Sundaralingam M., Yathindra N.* Probing possible left- and right-handed polynucleotide helical conformations from n–h plots. Glycosil and backbone torsional variation on handedness of helix, Int. J. Quant. Chem.: Quant. Biol. Symp., **4**, 285–303 (1977).
383. *Sasisekharan V., Pattabiraman N.* Structure of DNA predicted from stereochemistry of nucleoside derivatives, Nature, **275**, 159–162 (1978).

383a. *Einspahr H., Cook W.J., Bugg C.E.* Conformational flexibility in single-stranded oligonucleotides: Crystal structure of a hydrated calcium salt of adenylyl-(3′,5′)-adenosine, Biochemistry, **20**, 5788–5794 (1981).

384. *Gupta G., Bansal M., Sasisekharan V.* Conformational flexibility of DNA: Polymorphism and handedness, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **77** 6486–6490 (1980).
385. *De Santis P., Morosetti S., Pallesche A., Savino M.* Conformational and structural constraints in double-helical polynucleotides, Biopolymers, **20**, 1707–1725 (1981).
386. *Gupta G., Bansal M., Sasisekharan V.* Polymorphism and conformational

flexibility of DNA: Right and left handed duplexes, Int. J. Biol. Macromol., **2**, 368–379 (1980).
387. *Poltev V.I., Molova L.A., Zhorov B.S., Govyrin V.A.* Simulation of conformational possibilities of DNA via calculation of nonbonded interactions of complementary dinucleoside phosphate complexes, Biopolymers, **20**, 1–15 (1981).
388. *Mitsui Y., Langridge R., Shortle B.E., Cantor C.R., Grant R.C., Kodama M., Wells R.D.* Physical and enzymatic studies on poly d(I-C)·poly d(I-C), an unusual double-helical DNA, Nature, **228**, 1166–1169 (1970).
389. *Malathi R., Yathindra N.* Virtual bond probe to study ordered and random coil conformations of nucleic acids, Int. J. Quant. Chem., **20**, 241–257 (1981).
390. *Yayaraman S., Yathindra N.* Probing possible left- and right-handed poly(dinucleotide) helical conformations from (n-h) plots. Models for polysequential nucleotides, Int. J. Quant. Chem., **20**, 211–230 (1981).
391. *Sasisekharan V., Gupta G., Bansal M.* Sequence-dependent molecular conformations of polynucleotides: Right and left-handed helices, Int. J. Biol. Macromol., **3**, 2–8 (1981).
392. *Arnott S., Hukins D.W.L.* The dimensions and shapes of the furanose rings in nucleic acids, Biochem. J., **130**, 453–465 (1972).
393. *Evans F.E., Kaplan N.O.* 8-Alkylaminoadenyl nucleotides as probes of dehydrogenase interactions with nucleotide analogs of different glycosyl conformation, J. Biol. Chem., 251, 6791–6797 (1976).
394. *Pohorille A., Perahia D., Pullman B.* Molecular orbital studies on the conformations of 8-amino- and 8-dimethylaminoadenosine 5'-monophosphate, Biochim. Biophys. Acta, **517**, 511–516 (1978).
395. *Fluck E., Maas K.* Themen zur Chemie des Phosphors, p. 45, A Hüthig Verlag, Heidelberg, 1973.
396. *Holbrook S.R., Sussman J.L., Warrant R.W., Kim S.-H.* Crystal structure of yeast phenylalanine transfer RNA. II. Structural features and functional implications, J. Mol. Biol., **123**, 631–660 (1978).
397. *Konnert J., Karle I.L., Karle J.* The structure of dihydrothymidine. Acta Crystallogr., B, **26**, 770–778 (1970).
398. *Grand A., Cadet J.* Crystal and molecular structure of (–)-(5S)-5-hydroxy-5,6-dihydrothymidine, Acta Crystallogr., B, **34**, 1524–1528 (1978).
399. *Tougard P.* Structure cristalline et moléculaire de la 1-β-D-arabinofuanosil-thymine, isomorphe de la 1-β-D-arabinofuranosyl-5-bromo-uracile, Acta Crystallogr., B, **29**, 2227–2232 (1973).
400. *Sutton L.E.* Chemische Bindung und Molekülstruktur, Springer-Verlag, Heidelberg, 1961.
401. *Clauwaert J., Stockx J.* Interactions of polynucleotides and their components. I. Dissociation constants of the bases and their derivatives, Z. Naturforsch., B, **23**. 25–30 (1968).
402. *Fasman G.D.* (ed.). Nandbook of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. I. Nucleic Acids, pp. 76–206, Chem. Rubber Co., Cleveland, Ohio, 1975.
403. *Sober H.A., Harte R.A., Sober E.K.* Handbook of Biochemistry Selected Data for Molecular Biology, pp. G-3 to G-98, Chem. Rubber Co., Cleveland, Ohio. 1970.
404. *Kirkwood J.G., Westheimer F.H.* The electrostatic influence of substituents on the dissociation constants of organic acids. I. J. Chem. Phys., **6**, 506–513 (1938).
405. *Agnell C.L.* An infrared spectroscopic investigation of nucleic acid constituents. J. Chem. Soc., 504–515, 1961.

406. *Tsuboi M., Kyogoku Y., Shimanouchi T.* Infrared absorption spectra of protonated and deprotonated nucleosides, Biochim. Biophys. Acta, **55**, 1–12 (1962).
407. *Lord R. C., Thomas G. J., Jr.* Raman spectral studies of nucleic acids and related molecules. I. Ribonucleic acid derivatives, Spectrochim. Acta, **A23**, 2551–2591 (1967).
408. *Fox J. J., Shugar D.* Spectrophotometric studies of nucleic acid derivatives and related compounds as a function of pH. II. Natural and synthetic pyrimidine nucleosides, Biochim. Biophys. Acta, **9**, 369–384 (1952).
409. *Jardetzky C. D., Jardetzky O.* Investigation of the structure of purines, pyrimidines, ribose nucleosides and nucleotides by Proton Magnetic resonance. II. J. Amer. Chem. Soc., **82**, 222–229 (1960).
410. *Katritzky A. R., Waring A. J.* Tautomeric azines. Part I. The tautomerism of 1-methyluracil and 5-bromo-1-methyluracil, J. Chem. Soc., 1540–1544 (1962), Part III. The structure of cytosine and its mono-cation, J. Chem. Soc., 3046–3051 (1963).
411. *Poulter C. D., Anderson R. B.* Direct observation of uracil dication and related derivatives, Tetrahedron Lett., **36**, 3823–3826 (1972).
412. *Wagner R., Philipsborn W. von.* Protonierung von amino- und hydroxypyrimidinen. NMR-Spectren und Structuren der mono- und dikationen, Helv. Chim. Acta, **53**, 299–320 (1970).
413. *Sobell H. M., Tomita K.* The crystal structures of salts of methylated purines and pyrimidines. IV. 9-Methylguanine hydrobromide, Acta Crystallogr., **17**, 126–131 (1964).
414. *Iball J., Wilson H. R.* The crystal and molecular structure of guanine hydrochloride dihydrate, Proc. Roy. Soc., A, **288**, 418–429 (1965).
415. *Bryan R. F., Tomita K.* Crystal structure of salts of methylated purines and pyrimidines, Nature, **192**, 812–814 (1961); The crystal structures of salts of methylated purines and pyrimidines. II. 9-Methyladenine dihydrobromide, Acta Crystallogr., **15**, 1179–1182 (1962).
416. *Sobell H. M., Tomita K.* The crystal structures of salts of methylated purines and pyrimidines. III. 1-Methyluracil hydrobromide, Acta Crystallogr., **17**, 122–126 (1964).
417. *Izatt R. M., Christensen J. J., Rytting H.* Sites and thermodynamic quantities associated with proton and metal ion interaction with ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and their constituent bases, nucleosides, and nucleotides, Chem. Rev., **71**, 439–481 (1971).
418. *Pullman B.* Electronic structure, chemical reactivity and basicity of purines and pyrazolopyrimidines, J. Chem. Soc., 1621–1623 (1959).
419. *Bonaccorsi R., Pullman A., Scrocco E., Tomasi J.* The molecular electrostatic potentials for the nucleic acids bases: adenine, thymine, and cytosine, Theor. Chim. Acta, **24**, 51–60 (1972).
420. *Izatt R. M., Hansen L. D., Rytting J. H., Christensen J. J.* Proton ionization from adenine, J. Amer. Chem. Soc., **87**, 2760–2761 (1965).
421. *Birnbaum G. I., Giziewicz J., Huber C. P., Shugar D.* Intramolecular hydrogen bonding and acidities of nucleoside sugar hydroxyls. Crystal structure and conformation of O^2,2′-anhydro-1-α-D-xylofuranosyl-uracil, J. Amer. Chem. Soc., **98**, 4640–4644 (1976).
422. *Etten R. L. van, Clowes G. A., Sebastian J. F., Bender M. L.* The mechanism of the cycloamylose accelerated cleavage of phenylesters, J. Amer. Chem. Soc., **89**, 3253–3262 (1967).

423. *Chim T.-F., Chung P.-H., Lach J.L.* Influence of cyclodextrins on ester hydrolysis, J. Pharm. Sci., **57**, 44–48 (1968).
424. *Jordan D.O.* The Chemistry of Nucleic Acids, Butterworth, Washington, D.C., 1960.
425. *Phillips R., Eisenberg P., George P., Rutman R.J.* Thermodynamic data for the secondary phosphate ionizations of adenosine, guanosine, inosine, cytidine and uridine nucleotides and triphosphates, J. Biol. Chem., **240**, 4393–4397 (1965).
426. *Jonáš J., Gut J.* Nucleic acid components and their analogues. XVI. Dissociation constants of uracil, 6-azauracil, 5-azauracil and related compounds, Coll. Czech. Chem. Commun., **27**, 716–723 (1962).
427. *Ingold C.K.* Structure and Mechanism in Organic Chemistry, Cornell Univ. Press, New York, 1953.
428. *Beak P.* Energies and alkylations of tautomeric heterocyclic compounds: Old problems–New answers, Acc. Chem. Res., **10**, 186–192 (1977).
429. *Elguero J., Marzin C., Katritzky A.R., Linda P.* The Tautomerism of Heterocycles, Adv. Heterocycl. Chem. Suppl. I, 1976.
430. *Dreyfus M., Bensaude O., Dodin G., Dubois J.E.* Tautomerism in cytosine and 3-methylcytosine. A thermodynamic and kinetic study, J. Amer. Chem. Soc., **98**. 6338–6349 (1976).
431. *Stolarski R., Remin M., Shugar D.* Studies on prototropic tautomerism in neutral and monoanionic forms of pyrimidines by nuclear magnetic resonance spectroscopy, Z. Naturforsch., C., **32**, 894–900 (1977).
432. *Lin J., Yu C., Peng S., Akiyama I., Li K., Lee Li Kao, Le–Breton P.R.* Ultraviolet photoelectron studies on the ground-state electronic structure and gas-phase tautomerism of hypoxanthine and guanine, J. Phys. Chem., **84**, 1006–1012 (1980).
433. *Norton R.S., Gregson R.P., Quinn R.J.* ^{13}C-N.M.R. Spin-lattice relaxation time measurements determining the major tautomer of 1-methylisoguanosine in solution, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 339–341, 1980.
434. *Wolfenden R.V.* Tautomeric equilibria in inosine and adenosine, J. Mol. Biol., **40**, 307–310 (1969).
435. *Nowak M.J., Szczepaniak K., Barski A., Shugar D.* Spectroscopic studies on vapor phase tautomerism of natural bases found in nucleic acids, Z. Naturforsch. C., **33**, 876–883 (1978).
436. *Pieber M., Kroon P.A., Prestegard J.H., Chan S.I.* Erratum. Tautomerism of nucleic acid bases, J. Amer. Chem. Soc., **95**, 3408(1973).
437. Wong Y.P., Wong K.L., Kearns D.R. On the tautomeric states of guanine and cytosine, Biochem. Biophys. Res. Commun., **6**, 1580–1587 (1972).
438. *Czerminski R., Lesyng B., Pohorille P.* Tautomerism of pyrimidine bases–Uracil, cytosine, isocytosine: Theoretical study with complete optimization of geometry, Int. J. Quant. Chem., **16**, 605–613 (1979); Tautomerism of oxopyridines and oxopyrimidines: Theoretical study with complete optimization of geometry, Int. J. Quant. Chem., **16**, 1141–1148 (1979).
439. *Hillen W., Egert E., Lindner H.J., Gassen H.G., Vorbrüggen H.* 5-Methoxyuridine: The influence of 5-substituents on the keto-enol tautomerism of the 4-carbonyl group, J. Carbohyd., Nucleosides, Nucleotides, **5**, 23–32 (1978).
440. *Viswamitra M.A., Post M.L., Kennard O.* The crystal structure of the dipotassium salt of uridine-5'-diphosphate, Acta Crystallogr., B, **35**, 1089–1094 (1979).
441. *Cherbuliez E., Bernhard K.* Recherches sur la graine de croton. I. Sur le crotonoside (2-oxy-6-amino-purine-d-riboside), Adv. Chim. Acta, **15**, 464–471 (1932).

442. *Purrmann R.* Über die Flugelpigmente der Schmetterlinge. VII. Synthese des Leukopterins und Natur des Guanopterins, Liebigs Ann. Chem., **544**, 182–186 (1940).
443. *Sepiol J., Kasimierczuk Z., Shugar D.* Tautomerism of isoguanosine and solvent-induced keto-enol equilibrium, Z. Naturforsch. C, **31**, 361–370 (1976).
444. *Chenon M.-T. Pugmire R.J., Grant D.M., Panzica R.P., Townsend L.B.* Carbon-13 magnetic resonance. XXVI. A quantitative determination of the tautomeric populations of sertain purines, J. Amer. Chem. Soc, **97**, 4636–4642 (1975).
445. *Psoda A., Kazimierczuk Z., Shugar D.* Structure and tautomerism of the neutral and monoanionic forms of 4-thiouracil derivatives, J. Amer. Chem. Soc., **96**, 6832–6839 (1974).
446. *Berens K., Shugar D.* Ultraviolet absorbtion spectra and structure of halogenated uracils and their glycosides, Acta Biochim. Pol., **10**, 25–48 (1963).
447. *Dimroth K., Reichardt C., Siempmann T., Bohlmann F.* Über Pyridinium-N-Phenol-Betaine und ihre Verwendung zur Charakterisierung der Polarität von Lösungsmitteln, Liebigs Ann. Chem., **661**, 1–37 (1963).
448. *Ts'o P.O.P.* Bases, nucleosides, and nucleotides. In: Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry (P.O.P. Ts'o, ed.), Vol. I, pp. 453–584, Academic Press, New York, 1974.
449. *Riesner D., Römer R.* Thermodynamics and kinetics of conformational transitions in oligonucleotides and tRNA. In: Physico-Chemical Properties of Nucleic Acids (J. Duchesne, ed.), pp. 237–318, Academic Press, New York, 1973.
450. *Vinogradov S.N., Linnell R.H.* Hydrogen Bonding, Van Nostrand Reinhold, New York, 1971.
451. *Jeffrey G.A., Takagi S.* Hydrogen-bond structure in carbohydrate crystals, Acc. Chem. Res., **11**, 264–270 (1978).
452. *Kollman P.A., Allen L.C.* The theory of the hydrogen bond, Chem. Rev., **72**, 283–303 (1972).
453. *Saenger W., Suck D.* The relationship between hydrogen bonding and base stacking in crystalline 4-thiouridine derivatives, Eur. J. Biochem., **32**, 473–478 (1973).
454. *Donohue J.* On N–H···S hydrogen bonds, J. Mol. Biol., **45**, 231–235 (1969).
455. *Staab H.A.* Einführung in die theoretische organische Chemie, pp. 270, Verlag Chemie, Weinheim, 1962.
456. *Kroon J., Kanters J.A., Duijneveldt-van de Rijdt J.G.C.M. van, Duijneveldt F.B. van, Vliegenthart J.A.* O–H···O hydrogen bonds in molecular crystals. A statistical and quantum-chemical analysis, J. Mol. Struct., **24**, 109–129 (1975).
456a. *Kaun E. Rüterjans H., Hull W.E.* ^{1}H NMR study of ^{15}N labeled tRNA, FEBS Lett., **141**, 217–221 (1982).
457. *Donohue J.* Hydrogen-bonded helical configurations of polynucleotides, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **42**, 60–65 (1956).
458. *Rich A., Davies D.R., Crick F.H.C., Watson J.D.* The molecular structure of polyadenylic acid, J. Mol. Biol., **3**, 71–86 (1961).
459. *Bode D., Heinecke M., Schernau U.* An IR-investigation of the helic-coil conversion of poly(U), Biochem. Biophys. Res. Commun., **52**, 1234–1240 (1973).
460. *Rabczenko A., Shugar D.* Studies in the conformation of nucleosides, dinucleoside monophosphates and homopolynucleotides containing uracil or thymine base residues, and ribose, deoxyribose or 2'-O-methylribose, Acta Biochim. Pol., **18**, 387–402 (1971).

461. *Mazumdar S.K., Saenger W., Scheit K.H.* Molecular structure of poly-2-thiouridylic acid, a double helix with non-equivalent polynucleotide chains, J. Mol. Biol., **85**, 213–229 (1974).
462. *Wang J.C.* Helical repeat of DNA in solution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 200–203 (1979).
463. *Rhodes D., Klug A.* Helical periodicity of DNA determined by enzyme digestion. Nature, **286**, 573–578 (1980).
464. *Wing R., Drew H., Takano T., Broka C., Tanaka S., Itakura K., Dickerson R.E.* Crystal structure analysis of a complete turn of DNA, Nature, **287**, 755–758 (1980).
465. *Seeman N.C., Rosenberg J.M., Suddath F.L., Kim J.J.P., Rich A.* RNA double-helical fragment at atomic resolution. I. The crystal and molecular structure of sodium adenylyl-3′,5′-uridine hexahydrate, J. Mol. Biol., **104**, 109–144 (1976).
466. *Rosenberg J.M., Seeman N.C., Day R.O., Rich A.* RNA double-helical fragment at atomic resolution. II. The crystal structure of sodium guanylyl-3′,5′-cytidine nonahydrate, J. Mol. Biol., **104**, 145–167 (1976).
467. *Frey M.N., Koetzle T.F., Lehmann M.S., Hamilton W.C.* Precision neutron diffraction structure determination of protein and nucleic acid components. XII. A study of hydrogen bonding in the purine–pyrimidine base pair 9-methyladenine·1-methylthymine, J. Chem. Phys., **59**, 915–924 (1973).
468. *Sakore T.D., Tavale S.S., Sobell H.M.* Base-pairing configurations between purines and pyrimidines in the soil state. I. Crystal and molecular structure of a 1:2 purine-pyrimidine hydrogen-bonded complex: 9-Ethyladenine:1-methyl-5-iodouracil. J. Mol. Biol., **43**, 361–374 (1969).
469. *Hoogsteen K.* The crystal and molecular structure of a hydrogenbonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine, Acta Crystallogr., **16**, 907–916 (1963).
470. *Katz L., Tomita K.-I., Rich A.* The molecular structure of the crystalline complex ethyladenine:methyl-bromouracil. J. Mol. Biol., **13**, 340–350 (1965).
471. *Tomita K.-I., Katz L., Rich A.* Crystal structure of the intermolecular complex 9-ethyladenine:1-methyl-5-fluorouracil, J. Mol. Biol., **30**, 545–549 (1967).
472. *Shoup R.R., Miles H.T., Becker E.D.* NMR evidence of specific base-pairing between purines and pyrimidines, Biochem. Biophys. Res. Commun., **23**, 194–201 (1966).
473. *Kyogoku Y., Lord R.C., Rich A.* The effect of substituents on the hydrogen bonding of adenine and uracil derivatives, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **57**, 250–257 (1967).
474. *Iwahashi H., Kyogoku Y.* Detection of proton acceptor sites of hydrogen bonding between nucleic acid bases by the use of ^{13}C magnetic resonance. J. Amer. Chem., Soc., **99**, 7761–7765 (1977).
475. *Haynes W.* The Genetics of Bacteria and Viruses, Blackwell, Oxford, 1964.
476. *Nagel G.M., Hanlon S.*, Higher order associations of adenine and uracil by hydrogen bonding. I. Self-association of 9-ethyl-adenine and 1-cyclohexyluracil. Biochemistry, **11**, 816–823; II. Formation of complexes in mixed solutions of 9-ethyladenine and 1-cyclohexyluracil, Biochemistry, **11**, 823–830 (1972).
477. *Newmark R.A., Cantor C.R.* Nuclear magnetic resonance study of the interactions of guanosine and cytidine in dimethyl sulfoxide, J. Amer. Chem. Soc., **90**, 5010–5017 (1968).
478. *Kyogoku Y., Lord R.C., Rich A.* An infrared study of hydrogen bonding between adenine and uracil derivatives in chloroform solution, J. Amer. Chem. Soc., **89**, 496–504 (1967).

479. *Binford J. S., Jr., Holloway D. M.* Heats of base pair formation with adenine and uracil analiogs, J. Mol. Biol., **31**, 91–99 (1968).
480. *Yanson I. K., Teplitsky A. P., Sukhodub L. F.* Experimental studies of molecular interactions between nitrogen bases of nucleic acids, Biopolymers, **18**, 1149–1170 (1979).
481. *Hammes G. G., Park A. C.* Kinetic studies of hydrogen bonding. 1-Cyclohexyluracil and 9-ethyladenine, J. Amer. Chem. Soc., **90**, 4151–4157 (1968).
482. *Pullman B., Claverie P., Caillet J.* van der Waals-London interactions and the configuration of hydrogen-bonded purine and pyrimidine pairs, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **55**, 904–912 (1966).
483. *Pullman B.* Associations moléculaires en biologie: théorie et expérience. Propos d'introduction. In: Mollecular associations in Biology (B. Pullman, ed.), pp. 1–19, Academic Press, New York, 1968.
484. *Kudritskaya Z. G., Danilov V. I.* Quantum mechanical study of bases interactions in various associates in atomic dipole approximation, J. Theor. Biol., **59**, 303–318 (1976).
485. *Rein R.* On physical properties and interactions of polyatomic molecules: With application to molecular recognition in biology, Adv. Quant. Chem., **7**, 335–396 (1973).
486. *Voet D., Rich A.* The structure of an intermolecular complex between cytosine and 5-fluorouracil, J. Amer. Chem. Soc., **91**, 3069–3075 (1969).
487. *Kim S.-H. Rich A.* A non-complementary hydrogen-bonded complex containing 5-fluorouracil and 1-methylcytosine, J. Mol. Biol., **42**, 87–95 (1969).
488. *Hanlon S.* The importance of London dispersion forces in the maintenance of the deoxyribonucleic acid double helix, Biochem. Biophys. Res. Commun., **23**, 861–867 (1966).
489. *DeVoe H., Tinoco I., Jr.* The stability of helical polynucleotides: Base contributions, J. Mol. Biol., **4**, 500–517 (1962).
490. *Bugg C. E.* Solid-state stacking patterns of purine bases, Jerus. Symp. Quant. Chem. Biochem., **4**, 178–204 (1972).
491. *Bugg C. E., Thomas J. M., Sundaralingam M., Rao S. T.* Stereochemistry of nucleic acids and their constituents. X. Solid-state base-stacking patterns in nucleic acid constituents and polynucleotides, Biopolymers, **10**, 175–219 (1971).
492. *Watson D. G., Sutor D. J., Tollin P.* The crystal structure of adenosine monohydrate, Acta Crystallogr., **19**, 111–124 (1965).
493. *Kraut J., Jensen L. H.* Refinement of the crystal structure of adenosine-5′-phosphate, Acta Crystallogr., **16**, 79–88 (1963).
494. *Haschemeyer A. E. V., Sobell H. M.* The crystal structure of a hydrogen bonded complex of adenosine and 5-bromouridine, Acta Crystallogr., **18**, 525–532 (1965).
495. *Bugg C. E., Thewalt U., Marsh R. E.* Base stacking of nucleic acid components: The crystal structures of guanine, guanosine and inosine, Biochem. Biophys. Res. Commun., **33**, 436–440 (1968).
496. *Bugg C. E., Thewalt U.* Effects of halogen substituents on base stacking in nucleic acid components: The crystal structure of 8-bromoguanosine, Biochem. Biphys. Res. Commun., **37**, 623–629 (1969).
497. *O'Brien E. J.* Crystal structures of two complexes containing guanosine and cytosine derivatives, Acta Crystallogr., **23**, 92–106 (1967).
498. *Jefrey G. A., Kinoshita Y.* The crystal structure of cytosine monohydrate, Acta Crystallogr., **16**, 20–28 (1963).
499. *Mathews F. S., Rich A.* The molecular structure of hydrogen bonded complex of

N-ethyl adenine and N-methyl uracil, J. Mol. Biol., **8**, 89–95 (1964).
500. *Stewart R.F., Jensen L.H.* Redetermination of the crystal structure of uracil, Acta Crystallogr., **23**, 1102–1105 (1967).
501. *Iball J., Morgan C.H., Wilson H.R.* The crystal and molecular structure of a 1 : 1 complex of 5-bromouridine and dimethylsulphoxide, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A, **302**, 225–236 (1968).
502. *Harris D.R., MacIntyre W.M.* The crystal and molecular structure of 5-fluoro-2′-deoxy-β-uridine, Biophys. J., **4**, 203–225 (1964).
503. *Furberg S., Peterson C.S., Rømming C.* A refinement of the crystal structure of cytidine, Acta Crystallogr., **18**, 313–320 (1965).
504. *Ts'o P.O.P., Melvin I.S., Olson A.C.* Interaction and association of bases and nucleosides in aqueous solutions, J. Amer. Chem. Soc., **85**, 1289–1296 (1963).
505. *Nakano N.I., Igarashi S.J.* Molecular interactions of pyrimidines, purines and some other heteroaromatic compounds in aqueous media, Biochemistry, **9**, 577–583 (1970).
506. *Broom A.D., Schweizer M.P., Ts'o P.O.P.* Interaction and association of bases and nucleosides in aqueous solution. V. Studies of the association of purine nucleosides by vapor pressure osmometry and by proton magnetic resonance, J. Amer. Chem. Soc., **89**, 3612–3622 (1967).
507. *Ts'o P.O.P., Kondo N.S., Robins R.K., Broom A.D.* Interaction and association of bases and nucleosides in aqueous solutions. VI. Properties of 7-methylinosine as related to the nature of the stacking interaction, J. Amer. Chem. Soc., **91**, 5625–5631 (1969).
508. *Pörschke D., Eggers F.* Thermodynamics and kinetics of base-stacking interactions, Eur. J. Biochem., **26**, 490–498 (1972).
509. *Gratzer W.* Association of nucleic-acid bases in aqueous solution: A solvent partition study, Eur. J. Biochem., **10**, 184–187 (1969).
510. *Solie T.N., Schellman J.A.* The interaction of nucleosides in aqueous solution, J. Mol. Biol., **33**, 61–77 (1968).
511. *Mitchell P.R., Sigel H.* A proton nuclear magnetic resonance study of self-stacking in purine and pyrimidine nucleosides and nucleotides, Eur. J. Biochem., **88**, 149–154 (1978).
512. *Topal M.D., Warshaw M.M.* Dinucleoside monophosphates. II. Nearest neighbor interactions, Biopolymers, **15**, 1775–1793 (1976).
513. *Davies D.B.* Co-operative conformational properties of nucleosides, nucleotides and nucleotidyl units in solution, Jerus. Sympos. Quant. Chem. Biochem., **11**, 71–85 (1978).
514. *Haasnoot C.A.G., Altona C.* A conformational study of nucleic a acid phosphate ester bonds using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance, Nucleic Acids Res., **6**, 1135–1149 (1979).
515. *Baker B.M., Vanderkooi J., Kallenbach N.R.* Base stacking in a fluorescent dinucleoside monophosphate: ApεA, Biopolymers, **17**, 1361–1372 (1978).
516. *Kondo N.S., Danyluk S.S.* Conformational properties of adenylyl-3′,5′-adenosine in aqueous solution, Biochemistry, **15**, 756–767 (1976).
517. *Pörschke D.* The dynamic of nucleic-acid single-strand conformation changes. Oligo- and polyriboadenylic acids, Eur. J. Biochem., **39**, 117–126 (1973).
518. *Olsthoorn C.S.M., Haasnoot C.A.G., Altona C.* Circular dichroism studies of 6-N-methylated adenylyladenosine and adenylyluridine and their parent compounds. Thermodynamics of stacking Eur. J. Biochem., **106**, 85–95 (1980).
519. *Olsthoorn C.S.M., Bostelaar L.J., Rooij J.F.M. de, Boom J.H. van, Altona C.* Circular dichroism study of stacking properties of oligodeoxyadenylates and

polydeoxyadenilate. A three-state conformational model, Eur. J. Biochem., **115**, 309–321 (1981).
520. *Altona C., Hartel A.J., Olsthoorn C.S.M., Leeuw H.P.M. de, Haasnoot C.A.G.* The quantitative separation of stacking and selfassociation phenomena in a dinucleoside monophosphate by means of NMR concentration–temperature profiles: 6-N-(Dimethyl)-adenylyl-(3′,5′)-uridine, Jerus. Symp. Quant. Chem. Biochem., **11**, 87–101 (1978).
521. *Reich C., Tinoco I., Jr.* Fluorescence-detected circular dichroism of dinucleoside phosphates. A study of solution conformations and the twostate model, Biopolymers, **19**, 833–848 (1980).
522. *Powell J.T., Richards E.G., Gratzer W.B.* The nature of stacking equilibria in polynucleotides, Biopolymers, **11**, 235–250 (1972).
523. *Herskovits T.T.* Nonaqueous solutions of DNA: Denaturation by urea and its methyl derivatives, Biochemistry, **2**, 335–340 (1963).
524. *Herskovits T.T.* Nonaqueous solutions of DNA: Factors determining the stability of the helical configuration in solution, Arch. Biochem. Biophys., **97**, 474–484 (1962).
525. *Edelhoch H., Osborne J.C., Jr.,* The thermodynamic basis of the stability of proteins, nucleic acids, and membranes, Adv. Protein Chem., **30**, 183–250 (1976).
526. *Kauzmann W.* Some factors in the interpretation of protein denaturation, Adv. Protein Chem., **14**, 1–63 (1959).
527. *Tanford C.* The hydrophobic effect and the organization of living matter, Science, **200**, 1012–1018 (1978).
528. *Scheraga H.A.* Interactions in aqueous solution, Acc. Chem. Res., **12**, 7–14 (1978).
529. *Hildebrand J.H.* Is there a "hydrophobic effect"? Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **76**, 194 (1979).
530. *Frank H.S., Evans M.W.* Free volume and entropy in condensed systems, J. Chem. Phys., **13**, 507–532 (1945).
531. *Franks F.* The hydrophobic interaction. In: Water, a Comprehensive Treatise (F. Franks, ed.), pp. 1–94, Plenum Press, New York, 1975.
532. *Némethy G., Scheraga H.A.* The structure of water and hydrophobic bonding in proteins, J. Phys. Chem., **66**, 1773–1789 (1962).
533. *Némethy G.* Hydrophobe Wechselwirkungen, Angev. Chem., **79**, 260–271 (1967).
534. *Sinanoglu O.* Solvent effects on molecular associations. In: Molecular Assotiations in Biology (B. Pullman, ed.), pp. 427–445, Academic Press, New York, 1968.
535. *Sinanoglu O., Abdulnur S.* Effects of water and other solvents on the structure of biopolymers, Fed. Proc., 24, Suppl. 15, S12–S23, 1965.
536. *Crothers D.M., Ratner D.I.* Thermodynamic studies of a model system for hydrophobic bonding, Biochemistry, **7**, 1823–1827 (1968).
537. *Tazawa I., Koike T., Inoue Y.* Stacking properties of a highly hydrophobic dinucleotide sequence, N^6,N^6-dimethyl adenylyl(3′-5′)N^6,N^6-dimethyladenosine, occuring in 16–18S ribosomal RNA, Eur. J. Biochem, **109**, 33–38 (1980).
538. *Sapper H., Lohmann W.* Stacking interactions of nucleobases: NMR investigations. III. Molecular aspects of the solvent dependence. Biophys. Struct. Mechanism, **4**, 327–335 (1978).
539. *Sukhorukov B.I., Gukovsky I.Ya., Petrov A.I., Gukovskaya A.S., Mayevsky A.A., Gusenkova N.M.* Interactions and self-organization of nucleic bases, nucleotides, and polynucleotides into ordered structures. Effect of ionization and solvent salt composition, Int. J. Quant. Chem., **17**, 339–359 (1980).

540. *London F.* Über die Eigenschaften und Anwendungen der Molecularkräfte, Z. Phys. Chem. Abt., B **11**, 222–251 (1930).
541. *Waugh D.F.* Protein–protein interactions, Adv. Protein Chem., **9**, 326–437 (1954).
542. *Ornstein R.L., Rein R., Breen D.L., MacElroy R.D.* An optimized potential function for calculation of nucleic acid interaction energies. I. Base stacking, Biopolymers, **17**, 2341–2360 (1978).
543. *Langlet J., Claverie P., Caron F., Boeuve J.C.* Interaction between nucleic acid bases in hydrogen bonded and stacked configurations: The role of the molecular charge density, Int. J. Quant. Chem., **19**, 299–338 (1981).
544. *Pörschke D.* Elementary steps of base recognition and helix-coil transitions in nucleic acids, Mol. Biol. Biochem. Biophys., **24**, 191–218 (1977).
545. *Pörschke D.* Cooperative nonenzymic base recognition. II. Thermodynamics of the helix coil transition of oligoadenylic + oligouridylic acids, Biopolymers, **10**, 1989–2013 (1971).
546. *Filimonov V.V., Privalov P.L.* Thermodynamics of base interaction in $(A)_n$ and $(A \cdot U)_n$, J. Mol. Biol., **122**, 465–470 (1978).
547. *Schernau U., Marcinowski S., Ackerman Th.* Infrared spectroscopic studies of the interaction between polyuridylic acid and adenosine mono- and oligonucleotides, Z. Phys. Chem. N.F., **117**, 11–18 (1979).
548. *Pörschke D., Eigen M.* Cooperative nonenzymic base recognition. III. Kinetics of the helix-coil transition of the oligoribouridylic oligoriboadenylic acid system and of oligoriboadenylic acid alone at acidic pH, J. Mol. Biol., **62**, 361–381 (1971).
549. *Marmur J., Doty P.* Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature, J. Mol. Biol., **5**, 109–118 (1962).
550. *Spatz H.C., Crothers D.M.* The rate of DNA unwinding, J. Mol. Biol., **42**, 191–219 (1969).
551. *Yen W.S., Blake R.D.* Analysis of high-resolution melting (thermal dispersion) of DNA. Methods, Biopolymers, **19**, 681–700 (1980).
552. *Frank-Kamenitskii M.D., Vologodskii A.V.* The nature of the fine structure of DNA melting curves, Nature, **269**, 729–730 (1977).
553. *Steger G., Müller H., Riesner D.* Helix-coil transitions in doublestranded viral RNA. Fine resolution melting and ionic strength dependence, Biochim. Biophys. Acta, **606**, 274–284 (1980).
554. *Privalov P.L., Filimonov V.V.* Thermodynamic analysis of transfer RNA unfolding, J. Mol. Biol., **122**, 447–464 (1978).
555. *Gotoh O., Takashira Y.* Stabilities of nearest-neighbor doublets in double-helical DNA determined by fitting > alculated melting profiles to observed profiles, Biopolymers, **20**, 1033–1042 (1981).
556. *Borer P.N., Dengler B., Tinoco I., Jr., Uhlenbeck O.C.* Stability of ribonucleic acid double-stranded helices, J. Mol. Biol., **86**, 843–853 (1974).
557. *Tinoco I., Jr., Borer P.N., Dengler B., Levine M.D., Uhlenbeck O.C., Crothers D.M., Gralla J.* Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids, Nature New Biol., **246**, 40–41 (1973).
558. *Blake R.D., Lefoley S.G.* Spectral analysis of high resolution direct-derivative melting curves of DNA for instantaneous and total base composition, Biochim. Biophys. Acta, **518**, 233–246 (1978).
559. *Fink T.R, Krakauer H.* The enthalpy of the "bulge" defect of imperfect nucleic acid helices, Biopolymers, **14**, 433–436 (1975).
560. *Pipas J.M., McMahon J.E.* Method for prediciting RNA secondary structure, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 2017–2021 (1975).

561. *Gralla J., Crothers D.M.* Free energy of imperfect nucleic acid helices. III. Small internal loops resulting from mismatches, J. Mol. Biol., **78**, 301–319 (1973).
562. *Coutts S.M.* Thermodynamics and kinetics of G–C base pairing in the isolated extra arm of serine-specific trвnsfer RNA from yeast, Biochim. Biophys. Acta, **232**, 94–106 (1971).
563. *Hippel P.H. von, Wong K.-Y.* Dynamic aspects of native DNA structure: Kinetics of the formaldehyde reaction with calf thymus DNA, J. Mol. Biol., **61**, 587–613 (1971).
564. *Woese C.R.* The Genetic Code, Harper and Row, New York, 1967.
565. *Freese E.* The difference between spontaneous and base-analogue induced mutations of phage T4, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **45**, 622–633 (1959).
566. *Drake J.W., Allen E.F., Forsberg S.A., Preparata R.-M., Greening E.O.* Spontaneous mutation, Nature, **221**, 1128–1132 (1969); Drake J.W. Apendix: Comparative rates of spontaneous mutation, Nature, **221**, 1132 (1969).
567. *Kornberg A.* DNA Synthesis, Freeman, San Francisco, 1974. [Имеется перевод: Корнберг А. Синтез ДНК.–М.: Мир, 1977.]
568. *Brutlag D., Kornberg A.* Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXVI. A proofreading function for the 3′→5′ exonuclease activity in deoxyribonucleic acid polymerase, J. Biol. Chem., **247**, 241–248 (1972).
569. *Fersht A.R.* Enzymic editing mechanisms in protein synthesis and DNA replication, Trends Biochem. Sci., **5**, 262–265 (1980).
570. *Topal M.D., Fresco J.R.* Complementary base pairing and the origin of substitution mutations, Nature, **263**, 285–289 (1976).
571. *Poltev V.I., Bruskov V.I.* On molecular mechanisms of nucleic acid synthesis. Fidelity aspects. 1. Contribution of base interactions, J. Theor. Biol., **70**, 69–83 (1978).
572. *Crick F.H.C.* Codon–anticodon pairing: The wobble hypothesis, J. Mol. Biol., **19**, 548–555 (1966).
573. *Söll D., Cherayil J.D., Bock R.M.* Studies on polynucleotides. LXXV. Specificity of tRNA for codon recognition as studied by the ribosomal binding technique, J. Mol. Biol., **29**, 97–112 (1967).
574. *Söll D., RajBhandary U.L.* Studies on polynucleotides. LXXVI. Specificity of tRNA for codon recognition as studied by amino acid incorporation, J. Mol. Biol., **29**, 113–124 (1967).
575. *Kellog D.A., Doctor B.P., Loebel J.E., Nirenberg M.W.* RNA codons and protein synthesis. IX. Synonym codon recognition by multiple species of valine- and methionine-sRNA, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **55**, 912–919 (1966).
576. *Lomant A.J., Fresco J.R.* Structural and energetic consequences of noncomplementary base opposition in nucleic acid helices, Prog. Nucl. Acad. Res. Mol. Biol., **15**, 185–218 (1975).
577. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., Vol. XXXI, 1966.
578. *Sprinzl M., Grueter F., Spelzhaus A., Gauss D.H.* Compilation of tRNA sequences, Nucl. Acids Res., **8**, r1-r22 (1980).
579. *Fuller W., Hodgson A.* Conformation of the anti-codon loop in tRNA, Nature, **215**, 817–821 (1967).
580. *Topal M.D., Fresco J.R.* Base pairing and fidelity in codon-anticodon interaction, Nature, **263** 289–293 (1976).
581. *Sakore T.D., Sobell H.M.* Crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex containing adenine and hypoxanthine derivatives: 9-ethyl-8-bromoadenine—9-ethyl-8-bromohypoxanthine, J. Mol. Biol., **43**, 77–87 (1969).

582. *Lezius A. G., Domin E.* A wobbly double helix, Nature, **244**, 169–170 (1973).
583. *Romaniuk P. J., Hughes D. W., Gregorie R. J., Neilson T., Bell R. A.* Contribution of a G·U base pair to the stability of a short RNA helix, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 559–560 (1979).
584. *Crick F. H. C.* Central dogma of molecular biology, Nature, **227** 561–563 (1970).
585. *Bresch C., Hausmann R.* Klassische und molekulare Genetik, Springer-Verlag, Berlin, p. 243, 1970.
586. *Walker R. T., Clercq E. De, Eckstein F.* (eds.). Nucleoside Analogues, Chemistry, Biology and Molecular Applications, Plenum Press, New York, 1979.
587. *Suhadolnik R. J.* Nucleoside Antibiotics, 1970; Nucleosides as Biological Probes, Wiley, New York, 1979.
588. *Harmon R. E., Robins R. K., Townsend L. B.* (eds.). Chemistry and Biology of Nucleosides and Nucleotides, Academic Press, New York, 1978.
589. *Hall R. H.* The Modified Nucleosides in Nucleic Acids, Columbia Univ. Press, New York, 1971.
590. *Agris P. F.* The Modified Nucleosides of Transfer RNA, A. R. Liss, New York, 1980.
591. *Suck D., Saenger W.* The crystal and molecular structure of $O_{2,2'}$-cyclouridine. Influence of O(2)–C(2′) cyclization on the sugar conformation of pyrimidine nucleosides, Acta Crystallogr., B, **29**, 1323–1330 (1973).
592. *Delbaere L. T. J., James M. N.* The crystal and molecular structure of 2,2′-anhydro-1-β-D-arabinofuranosyl uracil, Acta Crystallogr., B, **29**, 2905–2912 (1973).
593. *Yamagata Y., Yoshimura J., Fujii S., Fujiwara T., Tomita K.-I.* Structural studies of pyrimidine cyclonucleoside derivatives. V. Structure of 2,2′-anhydro-1-β-arabinofuranosyl-2-thiouracil, Acta Crystallogr., B, **36**, 343–346 (1980).
594. *Yamagata Y., Suzuki Y., Fujii S., Fujiwara T., Tomita K.-I.* Structural studies of O-cyclocytidine derivatives. III. The crystal and molecular structure of 2,2′-anhydro-1-β-D-arabinofuranosylcytosine-3′,5′-diphosphate monohydrate, Acta Crystallogr., B, **35**, 1136–1140 (1979).
595. *Yamagata Y., Fujii S., Kanai T., Ogawa K., Tomita K.-I.* Structural studies of O-cyclonuleoside derivatives. I. The crystal and molecular structure of 6,2′-anhydro-1-β-D-arabinofuranosyl-6-hydroxycytosine, Acta Crystallogr., B, **35**, 378–382 (1979).
596. *Neidle S., Taylor G. L., Cowling P. C.* The crystal structure of 8,2′-cycloadenosine trihydrate, Acta Crystallogr., B, **35**, 708–712 (1979).
597. *Tanaka K., Fujii S., Fujiwara T., Tomita K.-I.* Structural studies of S-cycloadenosine derivatives. I. The crystal and molecular structure of 8,2′-anhydro-8-mercapto-9-β-D-arabinofuranosyladenine-5′-monophosphate trihydrate(8,2′-S-cyclo 5′-AMP), Acta Crystallogr., B 35, 929–933 (1979).
598. *Yoneda M., Tanaka K., Fujiwara T., Tomita K.-I.* Structural studies of S-cycloadenosine derivatives. II. The crystal and molecular structure of 8,3′-anhydro-8-mercapto-9-β-D-xylofuranosyladenine (8,3′-S-Cyclo A), Acta Crystallogr., B, **35**, 2355–2358 (1979).
599. *Manor P. C., Saenger W., Davies D. B., Jankowski K., Rabczenko A.* Conformational of nucleosides: The comparison of an X-ray diffraction and proton NMR study of 5′,2-O-cyclo-2′,3′-O-isopropylidene uridine, Biochim. Biophys. Acta, **340**, 472–483 (1974).
600. *Delbaere L. T. J., James M. N.* The crystal and molecular structure of 2,5′-anhydro-2′,3′-isopropylidene cyclouridine, Acta Crystallogr., B, **30**, 1241–1248 (1974).

601. *Yamagata Y., Fujii S., Fujiwara T., Tomita K.-I.* Structural studies of pyrimidine cyclonucleoside derivatives. IV. Structure of 2,5′-anhydro-1-(2′,3′-O-isopropylidene-β-D-ribofuranosyl)-2-thiouracil, Acta Crystallogr., B, **36**, 339–343 (1980).
602. *Sprang S., Rohrer D.C., Sundaralingam M.* The crystal structure and conformation of 2′,3′-O-isopropylideneadenosine: The coexistence of a planar and a puckered ribofuranose ring, Acta Crystallogr., B, **34**, 2803–2810 (1978).
603. *Kok A.J. de, Romers C., Leeuw H.P.M. de, Altona C. Boom J.H. van.* Crystal structure and molecular conformation of 2′,3′-O-methoxymethylene-uridine. X-ray and nuclear magnetic resonance investigation, J. Chem. Soc. Perkin Trans., **2**, 487–493 (1977).
604. *Brennan T., Sundaralingam M.* Molecular structure of 2,2′-anhydro-1-β-D-arabinofuranosyl cytosine hydrochloride (cyclo ara-C): Highly rigid nucleoside, Biochem. Biophys. Res. Commun., **52**, 1348–1353 (1973).
605. *Gaudemer A., Nief F., Pontikis R., Zylber J.* Etude conformationelle par résonance magnétique nucléaire protonique des dérivés de la O-isopropilidène-2′,3′-adénosine, Org. Magn. Reson., **10**, 135–145 (1977).
606. *Rogers G.T., Ulbricht T.L.V.* Optical properties and conformation of pyrimidine nucleosides in solution, Biochim. Biophys. Res. Commun., **39**, 414–418 (1970); Optical properties and conformation of purine nucleosides in solution, **39**, 419–422 (1970).
607. *Ueda T., Shibuya S.* Nucleosides and nucleotides. IX. Synthesis of sulfur-bridged cyclonucleosides: (S)-2,2′-, 2,3′-, and 2,5′-cyclo-2-thiouridines, Chem. Pharm. Bull., **22**, 930–937 (1974).
608. *Ikehara M., Kaneko M., Nakahara Y., Yamada S., Uesugi S.* Studies of nucleosides and nucleotides, XLIII. Purine cyclonucleotides (10). Optical rotatory dispersion and circular dichroism of adenine 8-cyclonucleosides, Chem. Pharm. Bull., **19**, 1381–1388 (1971).
609. *Cross B.P., Schleich T.* Determination of the molecular conformation of β-D-$O_{2,2'}$-cyclouridine in aqueous solution by proton magnetic resonance spectroscopy, Biopolymers, **12**, 2381–2389 (1973).
610. *Stolarski R., Dudycz L., Shugar D.* NMR studies on the *syn*⇌anti dynamic equilibrium in purine nucleosides and nucleotides, Eur. J. Biochem., **108**, 111–121 (1980).
611. *Hoshi A., Kanzawa F., Kuretani K., Saneyoshi M., Arai T.* 2,2′-O-Cyclocytidine, an antitumor cytidine analog resistant to cytidine deaminase, Gann, **62**, 145–146 (1971).
612. *Richards F.M., Wyckoff H.W.* In: The Enzymes (P.D. Boyer, ed.), 3rd ed., Vol. 4, pp. 647–608 (1971), Academic Press, New York.
613. *Robison G.A., Butcher R.W., Sutherland E.W.* Cyclic AMP, Academic Press, New York, 1971.
614. *Cramer H., Schultz J.* (eds.). Cyclic 3′,5′ Nucleotides: Mechanism of Action, Wiley, New York, 1977.
615. *Greengard P., Robison G.A.* (eds.). Advances in Cyclic Nucleotide Research, Vols. 1–13, Raven Press, New York, 1980.
616. *Ullmann A., Danchin A.* Role of cyclic AMP in regulatory mechanisms in bacteria, Trends Biochem. Sci., **5**, 95–96 (1980).
617. *Goldberg N.D., Haddox M.K., Dunham E., Lopez C., Hadden J.W.* In: Cold Spring Harbor Symposium, Control of Proliferation in Animal Cells, Vol. I, pp. 609–625 (1974), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

618. *Coulter C.L.* Structural chemistry of cyclic nucleotides. II. Crystal and molecular structure of sodium β-cytidine-2′,3′-cyclic phosphate, J. Amer, Chem. Soc., **95**, 570–575 (1973).
619. *Reddy B.S., Saenger W.* Molecular and crystal structure of the free acid of cytidine-2′,3′-cyclophosphate, Acta Crystallogr., B, **34**, 1520–1524 (1978).
620. *Saenger W., Eckstein F.* Stereochemistry of a substrate for pancreatic ribonuclease. Crystal and molecular structure of the triethylammonium salt of uridine 2′,3′-O,O-cyclophosphorothioate, J. Amer. Chem. Soc., **92**, 4712–4718 (1970).
621. *Kung W.-J., Marsh R.E., Kainosho M.* Crystal and solution structure of 2′,5′-arabinosylcytidine monophosphate. Influence of P–O–C bond angles on the proton – phosphorus vicinal coupling constants in the P–O–C–H fragments, J. Amer. Chem. Soc., **99**, 5471–5477 (1977).
622. *Chwang A. Ku, Sundaralingam M.* The crystal and molecular structure of guanosine 3′,5′-cyclic monophosphate (cyclic GMP) sodium tetrahydrate, Acta Crystallogr., B, **30**, 1233–1240 (1974).
623. *Coulter C.L.* The crystal and molecular structure of the triethylammonium salt of cyclic uridine-3′,5′-phosphate, Acta Crystallogr., B, **25**, 2055–2065 (1969); **26**, 441 (1970).
624. *Sundaralingam M., Abola J.* Stereochemistry of nucleic acids and their constitutents. XXVII. The crystal structure of 5′-methyleneadenosine-3′,5′-cyclic monophosphonate monohydrate, a biologically active analog of the secondary hormonal messenger cyclic adenosine-3′,5′-monophosphate. Conformational "rigidity" of the furanose ring in cyclic nucleotides, J. Amer. Chem. Soc., **94**, 5070–5076 (1972).
625. *Lavallee D.K., Coulter C.L.* Structural chemistry of cyclic nucleotides. III. Proton magnetic resonance studies of β-pyrimidine nucleotides, J. Amer. Chem. Soc., **95**, 576–581 (1973).
626. *Lavallee D.K., Myers R.B.* Role of the pyrimidine base in ribonuclease A hydrolysis of RNA. Determination of the conformatios of cyclic β-cytidine 2′,3′-phosphate and cyclic β-uridine 2′,3′-phosphate is solution, J. Amer. Chem. Soc., **100**, 3907–3912 (1978).
627. *Geraldes C.F.G.C., Williams R.J.P.* Conformational studies of some 2′,3′-cyclic mononucleotides in solution by different nuclear-magnetic-resonance methods. Eur. J. Biochem., **85**, 471–478 (1978).
628. *Lapper R.D., Smith I.C.P.* A ^{13}C and ^{1}H nuclear magnetic resonance study of the conformations of 2′,3′-cyclic nucleotides. J. Amer. Chem. Soc., **95**, 2880–2884 (1973).
629. *Saran A., Berthod H., Pullman B.* Molecular orbital calculations on the conformation of nucleic acids and their constitutents. VIII. Conformations of 2′,3′- and 3′,5′-cyclic nucleotides, Biochim. Biophys. Acta, **331**, 154–164 (1973).
630. *Yathindra N., Sundaralingam M.* Conformations of cyclic 2′,3′-nucleotides and 2′,3′-cyclic-5′-diphosphates. Interrelation between the phase angle of pseudorotation of the sugar and the torsions about the glycosyl C_1′-N and the backbone C_4′—C_5′ bonds, Biopolymers, **13**, 2061–2076 (1974).
631. *Lipkind G.M.* Theoretical conformational analysis of cytidine 2′,3′-cyclophosphate, Mol. Biol. (Moscow), **10**, 490–493 (1976).
632. *Watenpaugh K., Dow J., Jensen L.H., Furberg S.* Crystal and molecular structure of adenosine 3′,5′-cyclic phosphate, Science, **159**, 206–207 (1968).
633. *Druyan M.E., Sparagana M., Peterson S.W.* The molecular structure of the free acid of guanosine 3′,5′-cyclic monophosphate (cyclic GMP), J. Cyclic Nucleotide Res., **2**, 373–377 (1976).

634. *Sheldrick W. S., Rieke E.* 8-[(2-Aminoethyl)amino]-adenosine cyclic 3′,5′-monophosphate tetrahydrate, Acta Crystallogr., B, **24**, 2324–2327 (1978).
635. *Newton M. G., Pantaleo N. S., Bajwa G. S., Bentrude W. G.* The crystal structure of thymidine 3′,5′-cyclic N,N-dimethylphosphoroamidate, Tetrahedron Lett., **51**, 4457–4460 (1977).
636. *Depmeier W., Engels J., Klaska K. H.* The crystal and molecular structure of 2′-acetyluridine-3′,5′-cyclophosphate bensyl triester, a pyrimidine nucleotide with *syn* conformation, Acta Crystallogr., B, **33**, 2436–2440 (1977).
637. *Hemmes P., Oppenheimer L., Jordan F.* Ultrasonic relaxation evidence for a two-state glycosyl conformational equilibrium in aqueous solution of adenosine-3′,5′-cyclic monophosphate, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 929–930 (1976).
638. *Lee C.-H., Sarma R. H.* Aqueous solution conformation of rigid nucleosides and nucleotides, J. Amer. Chem. Soc., **98**, 3541–3548 (1976).
639. *Kainosho M., Ajisaka K.* Conformational study of cyclic nucleotides. Lanthanide ion assigned analysis of the hydrogen-1 nuclear magnetic resonance spectra, J. Amer. Chem. Soc., **97**, 6839–6843 (1975).
640. *McCoss M., Ezra F. S., Robins M. J., Danyluk S. S.* Proton magnetic resonance studies of 9-(β-D-xylofuranosyl)adenine 3′,5′-cyclic monophosphate and 9-(β-D-arabinofuranosyl)adenine 2′,5′-cyclic monophosphate, Carbohyd. Res., **62**, 203–212 (1978).
641. *McCoss M., Ainsworth C. F., Leo G., Ezra F. S., Danyluk S. S.* Conformational characteristics of rigid cyclic nucleotides. 3. The solution conformation of β-lyxonucleoside cyclic 2′,3′- and 3′,5′-monophosphates and of α-arabinonucleoside cyclic 2′,3′-monophosphates. Implications for evaluation of the solution properties of nucleoside analogues, J. Amer. Chem. Soc., **102**, 7353–7361 (1980).
642. *Bobruskin I. D., Guliaev N. N., Kirpichnikov M. P., Severin E. S., Tunitskaya V. A., Florent'ev V. L.* Nuclear magnetic resonance study of conformation of nucleotides, oligonucleotides, and their analogs in solution. I. Conformation of adenosine-3′,5′-cyclophosphate and its analogs in aqueous solutions, Mol. Biol. (Moscow), **13**, 87–95 (1979).
643. *Coulter C. L.* Structural chemistry of cyclic nucleotides. IV. Crystal and molecular structure of tetramethylene phosphoric acid, J. Amer. Chem. Soc., **97**, 4084–4088 (1975).
644. *Sturtevant J. M., Gerlt J. A., Westheimer F. H.* Enthalpy of hydrolysis of simple phosphate diesters, J. Amer. Chem. Soc., **95**, 8168–8169 (1973).
645. *Gerlt J. A., Westheimer F. H., Sturtewant J. M.* The enthalpies of hydrolysis of acyclic, monocuclic and glycoside cyclic phosphate diesters, J. Biol. Chem., **250**, 5059–5067 (1975).
646. *Gorenstein D. G., Kar D., Luxon B. A., Momii R. K.* Conformational study of cyclic and acyclic phosphate esters. CNDO/2 calculations of angle strain and torsional strain, J. Amer. Chem. Soc., **98**, 1668–1673 (1976).
647. *Müller W. E. G., Rohde H. J., Beyer R., Maidhof A., Lachmann M., Taschner H., Zahn R. K.* Mode of action of 9-β-D-arabinofuranosyl-adenine on the synthesis of DNA, RNA and protein in vivo and in vitro, Cancer Res, **35**, 2160–2168 (1975).
648. *Herrmann E. C., Jr.* (ed.). Third Conference on Antiviral Substances, Ann. N. Y. Acad. Sci., **285**, 1977.
649. *Miles D. L., Miles D. W., Redington P., Eyring H.* A conformational basis for the selective action of ara-adenine, J. Theor. Biol., **67**, 499–514 (1977).

650. *Dalton J. G., George A. L., Hruska F. E., McGaig T. N., Ogilvie K. K., Peeling J., Wood D. J.* Comparison of arabinose and ribose nucleosides conformation in aqueous and dimethylsulfoxide solution, Biochim. Biophys. Acta, **478**, 261–273 (1977).
651. *Remin N., Darżynkiewicz E., Ekiel I., Shugar D.* Conformation in aqueous medium of the neutral, protonated and anionic forms of 9-β-D-arabinofuranosyladenine, Biochim. Biophys. Acta, **435**, 405–416 (1976).
652. *Saran A., Pullman B., Perahia D.* Molecular orbital calculations on the conformation of nucleic acids and their constituents. X. Conformation of β-D-arabinosyl nucleosides, Biochim. Biophys. Acta, **349**, 189–203 (1974).
653. *Yathindra N., Sundaralingam M.* Conformational analysis of arabinonucleosides and nucleotides. A comparison with the ribonucleosides and nucleotides, Biochim. Biophys. Acta, **564**, 301–310 (1979).
654. *Dinglinger F., Renz P.* 9-α-D-Ribofuranosyladenin(α-Adenosin), das Nucleosid des Corrinoidfaktors C_X aus *Propionibacterium shermanii*, Hoppe Seyles's Z. Physiol. Chem., **352**, 1157–1161 (1971).
655. *Seto H., Otake N., Jonehara H.* The structures of pentopyranine A and C, two cytosine nucleosides with α-L-configuration, Tetrahedron Lett., 3991–3994 (1972).
656. *Suzuki K., Nakano H., Suzuki S.* Natural occurrence and enzymatic synthesis of α-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, J. Biol. Chem., **242**, 3319–3325 (1967).
657. *Bonnett R.* The chemistry of the vitamin B_{12} group, Chem. Rev., **63**, 573–605 (1963).
658. *Hawkinson S. W., Coulter C. L., Greaves M. L.* The structure of vitamin B_{12}. VIII. The crystal structure of vitamin B_{12}-5′-phosphate, Proc. Roy. Soc. Ser. A, **318**, 143–167 (1970).
659. *Holy A.* Nucleic acid components and their analogues. CLIV. Nucleoside and nucleotide derivatives of α-uridine, 2′-deoxy-α-uridine and 2′-deoxy-α-cytidine, and their affinity towards nucleolytic enzymes, Coll. Czech. Chem. Commun., **38**, 100–114 (1973).
660. *Kulikowski T., Shugar D.* 5-Alkylpyrimidine nucleosides. Preparation and properties of 5-enthyl-2′-deoxycytidine and related nucleosides, J. Med. Chem., **17**, 269–273 (1974).
661. *Henry M. C., Morrison R. K., Brown D. E., Marlow M., Davis R. D., Clooney D. A.* Preclinical toxicologic studies of β-thioguanine deoxyriboside (NSC–71261), Cancer Chem. Ther. Rep. Part 3, **4**, 41–49 (1973).
662. *Milne G. H., Townsend L. B.* Synthesis and antitumor activity of α- and β-2′-deoxy-6-selenoguanosine and certain related derivatives, J. Med. Chem., **17**, 263–268 (1974).
663. *Sundaralingam M.* Stereochemistry of nucleic acids and their constituents. XVIII. Conformational analysis of α-nucleosides by X-ray crystallography, J. Amer. Chem. Soc., **93**, 6644–6647 (1971).
664. *Cline S. J., Hodgson D. J.* The crystal and molecular structure of 9-α-D-arabinofuranosyladenine, Biochim. Biophys. Acta, **563**, 540–544 (1979).
665. *Remin M., Ekiel I., Shugar D.* Proton-magnetic-resonance study of the solution conformation of the α and β anomers of 5-ethyl-2′-deoxyuridine, Eur. J. Biochem., **53**, 197–206 (1975).
666. *Cadet J., Taieb C., Remin M., Niemczura W. P., Hruska F. E.* Conformational studies of α- and β-pyrimidine 2′-deoxyribonucleosides in the *syn* and *anti* conformation, Biochim. Biophys. Acta, **608**, 435–445 (1980).

667. *McCloskey J. A., Nishimura S.* Modified nuclosides in transfer RNA, Acc. Chem. Res., **10**, 403–410 (1977).
668. *Feldman M. Ya.* Minor components in transfer RNA: The locationfunction relationships, Prog. Biophys. Molec. Biol., **32**, 83–102 (1977).
669. *Hall R. H., Dunn D. B.* Natural occurrence of the modified nucleosides. In: Handbook of Biochemistry and Molecular Biology (G. D. Fasman, ed.), 3rd ed., pp. 216–250, CRC Press, Cleveland, 1975.
670. *Helgeson J. P.* The cytokinins, Science, **161**, 974–981 (1968).
671. *Hall R. H.* Cytokinins as probe of developmental processes, Annu. Rev. Plant Physiol., **24**, 415–444 (1973).
672. *Sternglanz H., Bugg C. E.* Conformation of N^6-methyladenine, a base involved in DNA modification: Restriction processes, Science, **182**, 833–834 (1973).
673. *Soriano-Garcia M., Parthassarathy R.* Structure–activity relationship of cytokinins: Crystal structure and conformations of 6-furfurylaminopurine, Biochem. Biophys. Res. Commun., **64**, 1062–1068 (1975); Stereochemistry and hydrogen bonding of cytokinins: 6-Furfurylaminopurine (kinetin), Acta Crystallogr., B, **33**, 2674–2677 (1977).
674. *Parthasarathy R., Ohrt J. M., Chheda G. B.* Modified nucleosides and conformation of anticodon loops: Crystal structure of t^6A and g^6A, Biochemistry, **16**, 4999–5008 (1977).
675. *Adamiak D. A., Blundell T. L., Tickle I. J., Kosturkiewicz Z.* The structure of the rubidium salt of N-(purin-6-ylcabamoyl)-L-threonine tetrahydrate, a hypermodified base in the anticodon loop of some tRNA's, Acta Crystallogr., B, **31**, 1242–1246 (1975).
676. *Parthasarathy R., Soriano-Garcia M., Chheda G. B.* Bifurcated hydrogen bonds and flip–flop conformation in a modified nucleic acid base gc^6Ade, Nature, **260**, 807–808 (1976).
677. *Bugg C. E., Thewalt U.* Crystal structure of N^6-(Δ^2-iso-pentenyl)-adenosine, a base in the anticodon loop of some tRNA's, Biochem. Biophys. Res. Commun., **46**, 779–784 (1972).
678. *Engel J. D., Hippel P. H. von,* Effects of methylation on the stability of nucleic acid conformations: Studies at the monomer level, Biochemistry, **13**, 4143–4158 (1974).
679. *Parthasarathy R., Ginell S. L., De N. C., Chheda G. B.* Conformation of N_4-acetylcytidine, a modified nucleoside of tRNA, and stereochemistry of codon–anticodon interaction, Biochem. Biophys. Res. Commun., **83**, 657–663 (1974).
680. *Yokoyama S., Miyazawa T., Iitaka Y., Yamaizumi Z., Kasai H., Nishimura S.* Three-dimensional structure of hyper-modified nucleoside Q located in the wobbling position of tRNA, Nature, **282**, 107–109 (1979).
681. *Morikawa K., Torii K., Iitaka Y., Tsuboi M.* Crystal and molecular structure of the methyl ester of uridine-5-oxyacetic acid: A minor constituent of *Escherichia coli* tRNAs. FEBS Lett., **48**, 279–282 (1974).
682. *Hillen W., Egert E., Lindner H. J., Gassen H. G.* Crystal and molecular structure of 2-thio-5-carboxy-methyluridine and its methyl ester: helix terminator nucleosides in the first position of some anticodons, Biochemistry, **17**, 5314–5320 (1978).
683. *Hillen W., Egert E., Lindner H. J., Gassen H. G.* Restriction or amplification of wobble recognition. The structure of 2-thio-5-methylaminomethyluridine and the interaction of odd uridines with the anticodon loop backbone, FEBS Lett., **94**, 361–364 (1978).

684. *Calabresi P., Parks R. E., Jr.* In: The Pharmacological Basis of Therapeutics (L. S. Goodman and A. Gilman, eds.), p. 1371, Macmillan, New York, 1970.
685. *Saenger W., Suck D.* Kristall- and Molekülstruktur von 2,4-Dithiouridin-monohydrat, Acta Crystallogr., B. **27**, 1178–1186 (1971).
686. *Thewalt U., Bugg C. E.* Effects of sulfur substituents on base staking and hydrogen bonding, The crystal structure of 6-thioguanosine monohydrate, J. Amer. Chem. Soc., **94**, 8892–8898 (1972).
687. *Bugg C. E., Thewalt U.* The crystal and molecular structure of 6-thioguanine, J. Amer. Chem. Soc., **92**, 7441–7445 (1970).
688. *Müller A., Hüttermann J.* Structure and formation of free radicals in irradiated single crystals of nucleic acid constituents, Ann. N. Y. Acad. Sci., **222**, (1973).
689. *Karle I. L.* Crystal and molecular structure of photo-products from nucleis acids. In: Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids (S. Y. Wang, ed.), Vol. 1, pp. 483–519, Academic Press, New York, 1976.
690. *Cadet J., Ducolomb R., Hruska F. E.* Proton magnetic resonance studies of 5,6-saturated thymidine derivatives produced by ionizing radiation. Conformational analysis of 6-hydroxylated diastereoisomers, Biochim. Biophys. Acta, **563**, 206–215 (1979).
691. *Hodgson D. J., Singh P.* Intra- and intermolecular interactions in azanucleosides. Jerus. Sympos. Quant Chem. Biochem., **8**, 343–354 (1976).
692. *Rada B., Doscočil J.* Azapyrimidine nucleosides, Pharmacol. Ther., **9**, 171–217 (1980).
693. *Saran A., Mitra C., Pullman B.* Molecular orbital studies on the structure of nucleoside analogs. I. Conformation of 8-azapurine nucleosides, Biochim. Biophys. Acta, **517**, 255–264 (1978).
694. *Mitra C., Pullman B.* Molecular orbital studies on nucleoside analogs. II. Conformation of 6-azapyrimidine nucleosides, Biochim. Biophys. Acta, **518**, 193–204 (1978).
695. *Sprang S., Scheller R., Rohrer D., Sundaralingam M.* Conformational analysis of 8-azanucleosides. Crystal and molecular structure of 8-azatubercidin monohydrate, a nucleoside analogue exhybiting the "high-anti" conformation, J. Amer. Chem. Soc., **100**, 2867–2872 (1978).
696. *Saenger W., Suck D.* 6-Azauridine-5′-phosphoric acid: Unusual molecular structure and functional mechanisms, Nature, **242**, 610–612 (1973).
697. *Knowles J. R.* Enzyme-catalyzed phosphoryl transfer reactions, Annu. Rev. Biochem., **49**, 777–819 (1980).
698. *Eckstein F.* Phosphorothioate analogues of nucleotides, Acc. Chem. Res., **12**, 204–210 (1979).
699. *Saenger W., Suck D., Eckstein F.* On the mechanism of ribonuclease A. Crystal and molecular structure of uridine-3′-O-thiophosphate methyl ester triethylammonium salt, Eur. J. Biochem., **46**, 559–567 (1974).
700. *Perahia D., Pullman B., Saran A.* A molecular orbital probe into the conformation of ATP, Biochim. Biophys. Res. Commun., **47**, 1284–1289 (1972).
701. *Lam Y.-F., Kuntz G. P. P., Kotowycz G.* ^{13}C relaxation studies on the manganese (II)–adenosine 5′-triphosphate complex in solution, J. Amer. Chem. Soc., **96**, 1834–1839 (1974).
702. *Mariam Y. H., Martin R. B.* Proximity of nucleic base and phosphate groups in metal ion complexes of adenine nucleotides, Inorg. Chim. Acta, **35** (1979).
703. *Basosi R., Niccolai N., Tiezzi E., Valensin G.* EPR and NMR combined analysis of the metal–ATP interaction, J. Amer. Chem. Soc. **100**, 8047–8050 (1978).
704. *Saenger W., Reddy B. S., Mühleger K., Weimann G.* Conformation of NAD^+ in

solution, in holoenzymes and in the crystalline Li^+-complex. In: Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases (H. Sund, ed.), pp. 222–236, 1977.

705. *Williams T.J., Zens A.P., Wisowaty J.C., Fisher R.R., Dunlap R.B., Bryson T.A., Ellis P.D.* Nuclear magnetic resonance studies on pyridine nucleotides, The pH dependence of the carbon-13 nuclear magnetic resonance and NAD^+ analogs, Arch. Biochem. Biophys., **172,** 490–501 (1976).
706. *Blumenstein M., Raftery M.A.* Natural abundance ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra of nicotinamide adenine dinucleotide and related nucleotides, Biochemistry, **12,** 3585–3590 (1973).
707. *Jacobus J.* Conformation of pyridine dinucleotides in solution, Biochemistry, **10,** 161–164 (1971).
708. *Thornton J.M., Bayley P.M.* Conformational energy calculations for dinucleotide molecules: A study of the nucleotide coenzyme nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+), Biopolymers, **16,** 1971–1986 (1977).
709. *Reddy B.S., Saenger W., Mühlegger K., Weimann G.* Crystal and molecular structure of the lithium salt of nicotinamide-adenine-dinucleotide (NAD^+, DPN^+, Cozymase, Codehydrase I), J. Amer. Chem. Soc., **103,** 907–914 (1981).
710. *Sundaralingam M., Arora S.K.* Stereochemistry of nucleic acids and their constitutents. IX. The conformation of the antibiotic puromycin dihydrochloride pentahydrate, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **64,** 1021–1026 (1970).
711. *Sundaralingam M., Arora S.K.* Crystal structure of the aminoglycosyl antibiotic puromycin dihydrochloride pentahydrate. Models for the terminal 3′-aminoacyladenosine moieties of transfer RNA's and protein-nucleic acid interactions, J. Mol. Biol., **71,** 49–70 (1972).
712. *Saenger W., Suck D.* Kristall- und Molekülstruktur von 3′-O-Acetil-4-thiothymidin, Acta Crystallogr., B, **27,** 2105–2112 (1969).
713. *Graaff R.A.G., Admiraal G., Koen E.H., Romers C.* Nucleic acid constituents. VI. The crystal and molecular structure of 3′,5′-di-O-acetyluridine at $-170°C$, Acta Crystallogr., B, **33,** 2459–2464 (1977).
714. *Tougard P., Lefebvre-Soubeyran O.* Stéréochimie de la 1-β-D-arabinofuranosyl-cytosine, Acta Crystallogr., B, **30,** 86–89 (1974).
715. *Bunick G., Voet D.* Crystal and molecular structure of 9-β-D-arabinofuranosyladenine, Acta Crystallogr., B, **30,** 1651–1660 (1974).
716. *Post M.L., Birnbaum G.I., Huber C.P., Shugar D.* α-Nucleosides and biological systems. Crystal structure and conformation of α-cytidine, Biochim. Biophys. Acta, **479,** 133–142 (1977).
717. *Cline S.J., Hodgson D.J.* The crystal and molecular structure of 9-α-D-arabinofuranosyladenine, Biochim. Biophys. Acta., **563,** 540–544 (1979).

717a. *Rohrer D., Sundaralingam M.* Stereochemistry of nucleic acids and their constituents. XII. The crystal and molecular structure of α-D-2′-amino-2′-deoxyadenosine monohudrate, J. Am. Chem. Soc. **92** (1970).

718. *Gibson J.W., Karle I.L.* Structure of the cis–syn photodimer of 6-methyluracil crystallized with a molecule of water, J. Cryst. Mol. Struct., **1,** 115–121 (1971).
719. *Konnert J., Karle I.L.* Crystal structures of the cis–anti photodimer of uracil, J. Cryst. Mol. Struct., **1,** 107–114 (1971).
720. *Suck D., Saenger W., Zechmeister K.* Molecular structure of the tRNA minor constituent dihydrouridine, Acta Crystallogr., B, **28,** 596–605 (1971).
721. *Kennard O., Isaacs N.W., Motherwell W.D.S., Coppola J.C., Wampler D.L., Larson A.C., Watson D.G.* The crystal and molecular structure of adenosine triphosphate, Proc. Roy. Soc. London, Ser. A, **325,** 401–436 (1971).
722. *Westheimer F.H.* Pseudo-rotation in the hydrolysis of phosphate esters, Acc. Chem. Res., **1,** 70–78 (1968).

723. *Eichhorn G.L.* (ed.), Inorganic Biochemistry, Elsevier, Amsterdam, 1973.
724. *Sissoëff L., Grisvard J., Guillé E.* Studies on metal ions–DNA interactions: Specific behavior of reiterative DNA sequences. Prog. Biophys. Molec. Biol., **31**, 165–199 (1973).
725. *Pezzano H., Podo F.* Structure of binary complexes of mono- and polynucleotides with metal ions of the first transition group, Chem. Rev., **80**, 365–401 (1980).
726. *Mildvan A.S., Loeb L.A.* The role of metal ions in the mechanism of DNA and RNA polymerases, CRC Crit. Rev. Biochem., **6**, 219–244 (1979).
727. *Holbrook S.P., Sussman J.L., Warrant R.W., Church G.M., Kim S.H.* RNA–ligand interactions: (1) Magnesium binding sites in yeast $tRNA^{Phe}$, Nucl. Acid. Res., **4**, 2811–2820 (1977).
728. *Lindahl T., Adams A., Fresco J.R.* Renaturation of transfer ribonucleic acids through site binding of magnesium, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **55**, 941–948 (1966).
729. *Eichhorn G.L., Shin Y.A.* Interaction of metal ions polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity. J. Amer. Chem. Soc., 90, 7323–7328 (1968).
730. *Davidson N., Widholm J., Nandi U.S., Jensen R., Olivera B.M., Wang J.C.* Preparation and properties of native crab dAT, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **53**, 111–118 (1965).
731. *Thomas C.A.* Interaction of $HgCl_2$ with sodium thymonucleate, J. Amer. Chem. Soc., **76**, 6032–6034 (1954).
732. *Dale R.M.K., Martin E., Livingston D.C., Ward D.C.* Direct covalent mercuration of nucleotides and polynucleotides, Biochemistry, **14**, 2447–2457 (1975).
733. *Jensen R.H., Davidson N.* Spectrophotometric, potentiometric, and density gradient ultracentrifugation studies of the silver ion by DNA, Biopolymers, **4**, 17–32 (1966).
734. *Arya S.K., Yang J.T.* Optical rotation, dispersion and circular dichroism of silver (I): Polyribonucleotide complexes, Biopolymers, **14**, 1847–1861 (1975).
735. *Eichhorn G.L., Tarien E., Butzow J.J.* Interaction of metal ions with nucleic acids and related compounds. XVI. Specific cleavage effects in the depolymerization of ribonucleic acids by zinc (II) ions, Biochemistry, **10**, 2014–2019 (1971).
736. *Butzow J.J., Eichhorn G.L.* Interaction of metal ions with nucleic acid and related compounds. XVII. On the mechanism of degradation of polyribonucleotides by zinc (II) ions, Biochemistry, **11**, 2019–2027 (1971).
736a. *Brown R.S., Hingerty B.E., Devan J.C., Klug A.* Pb(II)-catalyzed cleavage of the sugar–phosphate backbone of yeast $tRNA^{Phe}$–implications for lead toxicity and self-splicing RNA, Nature, **303**, 543–546 (1983).
737. *Rosenberg B., Camp L. Van, Trosko J.E., Mansour V.H.* Platinum compounds: A new class of potent antitumour agents, Nature, **222**, 385–386 (1969).
738. *Harrison R.C., McAuliffe C.A.* Platinum (II) complexes of DNA constituents, Inorg. Perspect. Biol. Med., **1**, 261–288 (1978).
739. *Pestayko A.W., Crooke S.T., Carter S.K.* (eds.). Cisplatin: Current Status and New Developments, Academic Press, New York, (1980).
740. *Millard M.M., Macquet J.P., Theophanides T.* X-ray photoelectron spectroscopy of DNA·Pt complexes. Evidence of O_6 (Gua)·N_7 (Gua) chelation of DNA with *cis*-dichlorodiammine platinum (II), Biochim. Biophys. Acta, **402**, 166–170 (1975).

741. *Marcelis A. T. M., Kralingen C. G., van, Reedijk J.* The interaction of *cis*- and *trans*-diammineplatinum compounds with 5'-guanosine monophosphate and 5'-deoxyguanosine monophosphate. A proton NMR investigation, J. Inorg. Biochem., **13**, 213–222 (1980).
742. *Wing R. M., Pjura P., Drew H. R., Dickerson R. E.* X-ray single crystal study of the interaction of cisplatin with the DNA dodecamer CGCGAATTCGCG. Private communication, 1982.
743. *Roberts J. J., Thomson A. J.* The mechanism of action of antitumor platinum compounds, Prog. Nucl. Acids Mol. Biol., **22**, 71–133 (1979).
744. *Connors T. A., Roberts J. J.* (eds.). Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy, Springer-Verlag, New York, 1977.
745. The Proceedings of the Third International Symposium of Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy (Dallas, Texas, 1976); J. Clin. Hematol. Oncol. (Wadley Medical Bull.), **7** (1977).
746. *Aoki K.* Interaction between transition metal ions and nucleic acid bases, nucleosides, and nucleotides (Jap.), J. Cryst. Soc. Japan, **23**, 309–327 (1981).
747. *Hodgson D. J.* The stereochemistry of metal complexes of nucleic acid constituents, Progr. Chem., **23**, 211–254 (1977).
747a. *Spiro T. G.* (ed.). Metal Ions in Biology, Vol. I, Nucleic Acid-Metal Ion Interactions, John Wiley and Sons, New York, 1980.
748. *Marzilli L. G., Kistenmacher T. J.* Stereoselectivity in the binding of transition-metal chelate complexes to nucleic acis constituents: Bonding and nonbonding effects, Acc. Chem. Res., **10**, 146–152 (1977).
749. *Gellert R-W., Bau R.* X-ray structural studies of metal–nucleoside and metal–nucleotide complexes. In: Metal Ions in Biological Systems (H. Sigel, ed.), Vol. VIII, pp. 1–55, Dikker, New York, 1979.
750. *Swaminathan V., Sundaralingam M.* The crystal structure of metal complexes of nucleic acids and their constituents, CRC, Crit. Rev. Biochem., **6**, 245–336 (1979).
751. *Lippard S. J.* Platinum complexes: probes of polynucleotide structure and antitumor drugs, Acc. Chem. Res., **11**, 211–217 (1978).
752. *Keinwächter V.* Interaction of platinum (II) coordination complexes with deoxyribonucleic acid, Stud. Biophys., **73**, 1–17 (1978).
753. *Phillips R. S. J.*, Adenosine and the adenine nucleotides. Ionization, metal complex formation and comformation in solution, Chem. Rev., **66**, 501–527 (1966).
754. *Sigel H.* Stability, structure and reactivity of ternary Cu^{2+}–complexes, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., **14**, 394–403 (1975).
755. *Tu A. T., Heller M. J.* Structure and stability of metal–nucleotide complexes. In: Metal Ions in Biological Systems (H. Sigel, ed.), Vol. I, Dekker, New York, 1973.
756. *Frey C. M., Stuehr J.* Kinetics of metal ion interactions with nucleotides and base-free phosphates, In: Metal Ions in Biological Systems (H. Sigel, ed.), Vol. 1, Dekker, New York, 1973.
757. *Daune M.* Interactions of metal ions with nucleic acids. In: Metal Ions in Biological Systems (H. Sigel, ed.), Vol. III, Dekker, New York, 1975.
758. *Marzilli L. G.* Metal–ion interactions with nucleic acids and nucleic acid derivatives, Prog. Inorg. Chem., **23**, 255–378 (1977).
759. *Martin R. B., Miriam Y. H.* The interactions between nucleotides and metal ions in solution. In: Metal Ions in Biological Systems (H. Sigel, ed.), Vol. VIII, Dekker, New York, 57–124 1979.

760. *Ahrland S., Chatt J., Davies N. K.* The relative affinities of ligand atoms for acceptor molecules and ions, Quart. Rev. Chem. Soc., **12,** 265–276 (1958).
761. *Pearson R. G.* Acids and bases, Science, **151,** 172–177 (1966).
762. *Goodgame D. M. L., Jeeves I., Reynolds C. D., Skapski A. C.* Multiplicity of cadmium binding sites in nucleotides: X-ray evidence for the involvement of O_2· and O_3· as well as phosphate N_7 in inosone 5′-monophosphate, Nucl. Acids Res., **2,** 1375–1379 (1975).
763. *Cook W. J., Bugg C. E.* Structures of calcium–carbohydrate complexes, Jerus. Symp. Quant. Chem. Biochem., **9,** 231–256 (1977).
764. *Brown E. A., Bugg C. E.* Calcium-binding to nucleotides: Structure of a hydrated calcium salt of inosine-5′-monophosphate, ActaCrystallogr., B, **36,** 2597–2404 (1980); for a strontium salt, see J. Cryst. Mol. Struct., **10,** 19–30 (1980).
765. *Sletten E.* Crystal structure of a copper-nucleoside analogue, Chem. Commun., 558, 1971.
766. *Kuntz G. P. P., Kotowycz G.* A nuclear magnetic resonance relaxation time study of the manganese (II)–inosine-5′-triphosphate complex in solution, Biochemistry, **14,** 4144–4150 (1975).
767. *Aoki K.* Crystallographic studies of interaction between nucleotides and metal ions. I. Crystal structure of the 1 : 1 complexes of cobalt and nickel with inosine 5′-phosphate, Bull. Chem. Soc. Japan, **48,** 1260–1271 (1975).
768. *Jack A., Ladner J. E., Rhodes D., Brown R. S., Klug A.* A crystallographic study of metal-binding to yeast phenylalanine transfer RNA, J. Mol. Biol., **11,** 315–328 (1977).
769. *Rosa J. J., Sigler P. B.* The site of covalent attachment in the crystalline osmium-$tRNA^{fMet}$ isomorphous derivative, Biochemistry, **13,** 5102–5110 (1974).
770. *Conn J. F., Kim J. J., Suddath F. L., Blattman P., Rich A.* Crystal and molecular structure of an osmium bispyridine ester of adenosine. J. Amer. Chem. Soc., **96,** 7152–7153 (1974).
771. *Kistenmacher T. J., Marzilli L. G., Rossi M.* Conformational properties of the osmium tetraoxide bispyridine ester of 1-methilthymine and a comment on the linearity of the *trans* O=Os=O group, Bioinorg. Chem., **6,** 347–364 (1976).
772. *Neidle S., Stuart D. I.* The crystal and molecular structure of an osmium bispyridine adduct of thymine, Biochim. Biophys. Acta, **418,** 226–231 (1976).
773. *Fischer B. E., Bau R.* Coordination sites in nucleotides, Inorg. Chem., **17,** 27–34 (1978).
774. *Chu G. Y. H., Duncan R. E., Tobias R. S.* Heavy metals–nucleosides interactions, Inorg. Chem., **16,** 2625–2636 (1977).
775. *Fazakerley G. V., Hermann D., Guschlbauer W.* Proton NMR study of the interaction of *cis*-dichloro-diammine-platinum (II) with poly(I) and poly(I)·poly(C), Biopolymers, **19,** 1299–1309 (1980).
776. *Miller C., Frey C. M., Stuehr J. E.* Interactions of divalent metal ions with inorganic and nucleoside phosphates. I. Thermodynamics, J. Amer. Chem. Soc., **94,** 8898–8904 (1972).
777. *Szent-Györgyi A.* Bioenergetics, Chap. 10, Academic Press, New York, 1957.
778. *Estrada-Parra S., Garcia-Ortigoza E.* Immunochemical determination of the molecular conformation of nucleotides, Immunochemistry, **9,** 779–807 (1972).
779. *Mariam Y. H., Martin R. B.* Proximity of nucleic base and phosphate groups in metal ion complexes of adenine nucleotides, Inorg. Chim. Acta, **35,** 23–28 (1979).
780. *Granot J., Kondo H., Armstrong R. N., Mildvan A. S., Kaiser E. T.* Nuclear magnetic resonance studies of the confomation of tetraamine–cobalt(III)–ATP

bound at the active site of bovine heart protein kinase, J. Amer. Chem. Soc., **18**, 2339–2345 (1979).

781. *Fazakerley G. V., Reid D. G.* Determination of the interaction of ADP and dADP with copper(II), manganese(II) and lanthanide(III) ions by nuclear-magnetic-resonance spectroscopy. Eur. J. Biochem., **93,** 535–543 (1979).
782. *TAN-Dinh Son, Roux M., Ellenberger M.* Interaction of Mg^{2+} with nucleoside triphosphates by phosphorus magnetic resonance spectroscopy, Acids Res., **2,** 1101–1110 (1975).
783. *Cleland W. W., Mildvan A. S.* Chromium(III) and cobalt(III) nucleotides as biological probes. In: Advances in Inorganic Biochemistry (G. L. Eichhorn and L. G. Marzilli, eds.), Vol. I, pp. 163–191, Elsevier, New York, 1979.
784. *Cornelius R. D., Hart P. A., Cleland W. W.* Phosphorus-31 NMR studies of complexes of adenosine triphosphate adenosine diphosphate, tripolyphosphate, and pyrophosphate with cobalt(III) ammines, Inorg. Chem., **16,** 2799–2805 (1977).
785. *Merritt E. A., Sundaralingam M., Cornelius R. D., Cleland W. W.* X-ray crystal and molecular structure and absolute configuration of (dihydrogen tripolyphosphato)tetramminecobalt(III) monohydrate $Co(NH_3)_4H_2P_3O_{10} \cdot H_2O$. A model for a metal–nucleoside polyphosphate complex, Biochemistry, **17,** 3274–3278 (1978).
786. *Cornelius R. D., Cleland W. W.* Substrate activity of (adenosine triphosphato)tetramminecobalt(III) with yeast hexokinase and separation of deastereomers using the enzyme, Biochemistry, **17,** 3279–3286 (1978).

786a. *Orioli P., Cini R., Donati D., Mangani S.* Crystal and molecular structure of the ternary complex bis [(adenosine-5′-triphosphato) (2,2′-bipyridine)zinc(II)]tetrahydrate, J. Amer. Chem. Soc., **103,** 4446–4452 (1981).

786b. *Sheldrick W. S.* Charge-Transfer-Wechselwirkungen zwischen den Liganden eines ternären ATP-Cu^{2+}-Phenanthrolin-Komplexes, Angew. Chem., **93,** 473–474 (1981).

787. *Adamiak D. A., Saenger W.* Structure of the monopotassium salt of adenosine-5′-diphosphate dihydrate, $KADP \cdot 2H_2O$, Acta Crystallogr., B, **36,** 2585–2589 (1980).
788. *Guay F., Beauchamp A. L.* Model compounds for the interaction of silver(I) with polyuridine.Crystal structure of a 1 : 1 silver complex with 1-methylthymine, J. Amer. Chem. Soc., **101,** 6260–6263 (1979).
789. *Clark G. R., Orbell J. D.* Transition metal–nucleotide complexes. X-ray and molecular structures of the cobalt(II) and cadmium(II) complexes of cytidine-5′-monophosphate, $[Co(CMP)(H_2O)]$ and $[Cd(CMP)(H_2O)] \cdot H_2O$, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 697–698, 1975.
790. *Arnott S.* The secondary structures of polynucleotide chains as revealed by X-ray diffraction analysis of fibers. In: S. Neidle, ed., Topics in Nucleic Acid sructure, Macmillan Publ. Ltd., London, 65–82, 1981.
791. *Dickerson R. E., Drew H. R., Conner B. N., Wing R. M., Fratini A. V., Kopka M. L.* The anatomy of A-, B-, and Z-DNA, Science, **216,** 475–485 (1982).
792. *Wells R. D., Goodman T. C., Hillen W., Horn G. T., Klein R. D., Larson J. E., Müller U. R., Neuendorf S. K., Panayotatos N., Stirdivant S. M.* DNA structure and gene regulation, Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., **24,** 167–267 (1980).
793. *Kallenbach N. E., Berman H. M.* RNA structure, Quart. Rev. Biophys., **10,** 138–236 (1977).
794. *Neifakh Yu. A., Tumanyan V. G.* Possible conformations of DNA, Biophysics, **24,** 577–585 (1980).

795. *Ivanov V.I., Lysov Yu.P., Malenkov G.G., Minchenkova L.E., Minyat E.E., Schyolkina A.K., Zhurkin V.B.* Conformational possibilities of double-helical DNA, Stud. Biophys., Berlin, **55,** 5–13 (1976).
796. *Poltev V.I., Milova L.A., Zhorov B.S., Govyrin V.A.* Simulation of conformational possibilities of DNA via calculation of non-bonded interactions of complementary dinucleoside phosphate complexes, Biopolymers, **20,** 1–15 (1981).
797. *Calascibetta F.G., Dentini M., Santis P. de, Morosetti S.* Conformational analysis of polynucleotide chains. Double stranded structures, Biopolymers, **14,** 1667–1684 (1975).
798. *Cornillon R., Lespinasse J.-N., Broch H., Vasilescu D.* Influence of the sugar configuration on the structure of DNA by conformational analysis of the deoxyribose-phosphate unit, Biopolymers, **14,** 1515–1529 (1975).
799. *Olson W.K.* Spatial configuration of ordered polynucleotide chains. V. Conformational energy estimates of helical structure, Biopolymers, **17,** 1015–1040 (1978).
800. *Kollman P.A., Weiner P.K., Dearing A.* Studies of nucleotide conformations and interactions. The relative stabilities of double helical B-DNA sequence isomers, Biopolymers, **20,** 2583–2621 (1981).
801. *Tosi C., Clementi E., Matsuoka O.* Conformational studies on polynucleotide chains. II. Analysis of steric interactions and derivation of potential functions for internal rotations, Biopolymers, **17,** 51–66; III. Intermolecular energy maps and comparison with experiments, Biopolymers, **17,** 67–84 (1978).
802. *Matouka O., Tosi C., Clementi E.* Conformational studies on polynucleotide chains. I. Hartree-Fock energies and description of nonbonded interactions with Lennard-Jones potentials, Biopolymers, **17,** 33–49 (1978).
803. *Miller K.J.* Interactions of molecules with nucleic acids. I. An algorithm to generate nucleic acid structures with an application to the B-DNA structure and a counterclockwise helix, Biopolymers, **18,** 959–980 (1979).
804. *Govil G., Fisk C., Howard F.B., Miles H.T.* Structure of poly-8-bromo-adenylic acid: Conformational studies by CPF energy calculations, Nucl. Acids Res., **4,** 2573–2592 (1977).
805. *Olson W.K.* Configurational statistics of polynucleotide chains. A single virtual bond treatment, Macromolecules, **8,** 272–275 (1975).
806. *Waterman M.S., Smith T.F.* RNA secondary structure: a complete mathematical analysis, Math. Biosci., **42,** 257–266 (1978).
807. *Il'Icheva I.A., Tumanyan V.G., Kister A.E., Dashevsky V.G.* Conformational studies of double-helical polynucleotides by the method of pair-wise potential functions, Int. J. Quant. Chem., **17,** 321–326 (1980).
808. *Zimmerman S.B.* Polynucleotide models. II. Prediction of the radial position and tilt of the bases from the helical parameters, Biopolymers, **16,** 749–763 (1977).
809. *Mitra C.K., Sarma M.H., Sarma R.H.* Plasticity of the DNA double helix, J. Amer. Chem. Soc., **103,** 6727–6737 (1981).
810. *Depew R.E., Wang J.C.* Conformational fluctuations of DNA helix, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72,** 4275–4279 (1975).
811. *Hogan M.E., Jardetzky O.* Internal motions in DNA, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, **76,** 6341–6345 (1979).
812. *Patel D.J., Pardi A., Itakura K.* DNA conformation, dynamics, and interactions in solutions, Science, **216,** 581–590 (1982).
813. *Millar D.P., Robbins M.J., Zewail A.H.* Time-resolved spectroscopy of

macromolecules: Effect of helical structure on the torsional dynamics of DNA and RNA, J. Chem. Phys., **74,** 4200–4201 (1981).
814. *Olson W. K.* The flexible DNA double helix. I. Average dimensions and distribution functions, Biopolymers, **18,** 1213–1233; II. Superhelix formation, Biopolymers, **18,** 1235–1260 (1979).
815. *Jolly D., Eisenberg H.* Photon correlation spectroscopy, total intensity light scattering with laser radiation, and hydrodynamic studies of a well fractionated DNA sample, Biopolymers, **15,** 61–95 (1976).
816. *Frontali C., Dore E., Ferranto A., Gratton E., Bettini A., Pozzan M. R., Valdevit E.* An absolute method for the determination of the persistence length of native DNA from electron micrographs, Biopolymers, **18,** 1353–1373 (1979).
817. *Akasaka K., Yamada A., Hatano H.* ^{31}P magnetic relaxation in polynucleotides, Bull. Chem. Soc. Japan, **50,** 2858–2862 (1977).
818. *Tewari R., Nanda R. K., Govil G.* Spatial configurations of single-stranded polynucleotides. Calculations of average dimensions and nmr coupling constants, Biopolymers, **13,** 2015–2035 (1974).
819. *Malenkov G. G., Gagua A. V., Timofeev V. P.* Influence of intermolecular interactions on the DNA conformation, Int. J. Quant. Chem., **16,** 655–668 (1979).
820. *Priore D. R. C., Allen F. S.* Comparisons between oriented film and solution tertiary structure of various nucleic acids, Biopolymers, **18,** 1809–1820 (1979).
821. *Baase W. A., Johnson W. C., jr.* Circular dichroism and DNA secondary structure, Nucl. Acids Res., **6,** 797–814 (1979).
822. *Haasnoot C. A. G., Hartog J. H. J. den, Rooij J. F. M. de, Boom J. H. van, Altona C.* Loop structures in synthetic oligodeoxynucleotides, Nucl. Acid Res., **8,** 169–181 (1980).
823. *Mitra C. K., Sarma R. H., Giessner-Prettre C., Pullman B.* Solution structure of DNA: The method of nuclear magnetic resonance spectroscopy, Int. J. Quant. Chem.: Quant. Biol. Symp., **7,** 39–66 (1980).
824. *Leslie A. G. W., Arnott S., Chandrasekaran R., Ratliff R. L.* Polymorphism of DNA double helices, J. Mol. Biol., **143,** 49–72 (1980).
825. *Bram S.* Secondary structure of DNA depends on base composition, Nature New Biol., **232,** 174–176 (1971).
826. *Bram S., Tougard P.* Polymorphism of natural DNA, Nature New Biol., **239,** 128–131 (1972).
827. *Pilet J., Blicharski J., Brahms J.* Conformations and structural transitions in polydeoxynucleotides, Biochemistry, **14,** 1869–1876 (1975).
828. *Gray D. M., Gall J. G.* The circular dichroism of three *Drosophila virilis* satellite DNA's, J. Mol. Biol., **85,** 665–679 (1974).
829. *Arnott S.* The sequence dependence of circular dichroism spectra of DNA duplexes, Nucl. Acids Res., **2,** 1493–1502 (1975).
830. *Selsing E.*, Arnott S. Conformations of A–T rich DNA's, Nucl. Acids Res., 3, 2443–2450 (1976).
831. *Selsing E., Leslie A. G. W., Arnott S., Gall J. G., Skinner E. M., Southern E. M., Spencer J. H., Harbers K.* Conformations of satellite DNA's, Nucl. Acids Res., **3,** 2451–2458 (1976).
832. *Premilat S., Albiser G.* X-ray diffraction study of three DNA fibers with different base composition, J. Mol. Biol., **99,** 27–36 (1975).
833. *Pilet J., Brahms J.* Dependence of B-A conformational change in DNA on base composition, Nature New Biol., **236,** 99–100 (1972).
834. *Anderson P., Bauer W.* Supercoiling in closed circular DNA: Dependence upon ion type and concentration, Biochemistry, **17,** 594–601 (1978).

835. *Chan A., Kilkuskie R., Hanlon S.* Correlations between the duplex winding angle and the circular dichroism spectrum of calf thymus DNA, Biochemistry, **18**, 84–91 (1979).
836. *Lewitt M.* How many base-pairs per turn does DNA have in solution and in chromatin? Some theoretical calculations, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, **75**, 640–644 (1978).
837. *Carter C. W., Jr., Kraut J.* A proposed model for interaction of polypeptides with RNA, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, **71**, 283–287 (1974).
838. *Kim S. H., Sussman J. L., Church G. M.* A model for recognition scheme between double stranded DNA and proteins. In: Structure and Conformation of Nucleic Acids and Protein–Nucleic Acid Interactions (M. Sundaralingam and S. T. Rao, eds.), Univ. Park Press, Baltimore, pp. 571–575, 1975.
839. *Ivanov V. I., Minchenkova L. E., Schyolkina A. K., Poletayev A. I.* Different conformations of duoble stranded nucleic acids in solution as revealed by circular dichroism, Biopolymers, **12**, 89–100 (1973).
839a. *Weiner P. K., Langridge R., Blaney J. M., Schaefer R., Kollman P.* Electrostatic potential molecular surfaces, Proc. Nat. Acad. Sci., **79**, 3754–3758 (1982).
839b. *Corbin S., Lavery R., Pullman B.* The molecular electrostatic potential and steric accessibility of double-helical A-RNA, Biochim. Biophys. Acta, **698**, 86 92 (1982).
839c. *Lavery R., Pullman A., Pullman B.* The electrostatic field of B-DNA, Theoret. Chim. Acta (Berl.), **62**, 93–106 (1982).
840. *Dover S. D.* Symmetry and packing in B-DNA, J. Mol. Biol., **110**, 699–700 (1977).
841. *Zimmerman S. B., Pheiffer B. H.* Helical parameters of DNA do not change when DNA fibers are wetted: X-ray diffraction study, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **76**, 2703–2707 (1979).
842. *Fuller W., Wilkins M. H. F., Wilson H. R., Hamilton L. D.* The molecular configuration of deoxyribonucleic acid. IV. X-ray diffraction study of the A-form, J. Mol. Biol., **12**, 60–80 (1965).
843. *Arnott S., Hukins D. W. L.* Optimised parameters for A-DNA and B-DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun., **47**, 1504–1510 (1972).
844. *Arnott S., Selsing E.* The structure of polydeoxyguanylic acid·polydeoxycytidylic acid, J. Mol. Biol., **88**, 551–552 (1974).
845. *Arnott S., Chandrasekaran R., Hukins D. W. L., Smith P. J. C., Watts L.* Structural details of a double-helix observed for DNA's containing alternating purine–pyrimidine sequences, J. Mol. Biol., **88**, 523–533 (1974).
845a. *Mahendrasingam A., Rhodes N. J., Goodwin D. C., Nave C., Pigram W. J., Fuller W., Brahms J., Vergne J.* Conformational transitions in oriented fibers of the synthetic polynucleotide poly[d(AT)]·poly[d(AT)] double helix, Nature, **301**, 535–537 (1983).
846. *Davies D. R., Baldwin R. L.* X-ray studies of two synthetic DNA copolymers, J. Mol. Biol., 6, 251–255 (1963).
847. *Selsing E., Arnott S., Ratliff R. L.* Conformations of poly d(A—T—T)·poly d(A—A—T), J. Mol. Biol., **98**, 243–248 (1975).
848. *Arnott S., Hukins D. W. L., Dover S. D., Fuller W., Hodgson A. R.*, Structure of synthetic polynucleotides in the A-RNA and A'-RNA conformations: X-ray diffraction analyses of the molecular conformations of polyadenylic acid·polyuridylic acid and polyinosinic acid·polycytidylic acid, J. Mol. Biol., **81**, 107–122 (1973).
849. *O'Brien E. J., MacEwan A. W.* Molecular and crystal structure of polynucleotide

complex: Polyinosinic acid plus polydeoxycytidylic acid, J. Mol. Biol., **48,** 243–261 (1970).
850. *Milman G., Langridge R., Chamberlin M.J.* The structure of a DNA–RNA hybrid, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, **57,** 1804–1810 (1967).
851. *Chamberlin M.J., Patterson D.L.* Physical and chemical characterization of the ordered complexes formed between polyinosinic acid, polycytidylic acid and their deoxyribo-analogues, J. Mol. Biol., **12,** 410–428 (1965).
852. *Arnott S., Hukins D.W.L., Dover S.D.* Optimised parameters for RNA double-helices, Biochem. Biophys. Res. Commun., **48,** 1392–1399 (1972).
853. *Arnott S., Bond P.J., Selsing E., Smith P.J.C.* Models of triple-stranded polynucleotides with optimised stereochemistry, Nucl. Acids Res., **3,** 2459–2470 (1976).
854. *Arnott S., Chandrasekaran R., Day A.W., Puigjaner L.C., Watts L.* Double helical structures for polyxanthylic acid, J. Mol. Biol., **149,** 489–505 (1981).
855. *Chou C.H., Thomas G.J., Jr., Arnott S., Campbel Smith P.J.* Raman spectral studies of nucleic acids. XVII. Conformational structures of polyinosinic acid, Nucl. Acids Res., 4, 2407–2419 (1977).
856. *Arnott S., Hukins D.W.L.* Refinement of the structure of B-DNA and implications for the analysis of X-ray diffraction data from fibers of biopolymers, J. Mol. Biol., **81,** 93–105 (1973).
857. *Arnott S., Selsing E.* The conformation of C-DNA, J. Mol. Biol., **98,** 265–269 (1975).
858. Мокульский М.А., Капитонова К.А., Мокульская Т.Д. Вторичная структура ДНК фага Т2, Мол. биол., 6 (1972).
859. *Arnott S., Selsing E.* Structures of poly d(A)·poly d(T) and poly d(T)·poly d(A)·poly d(T), J. Mol. Biol., **88,** 509–521 (1974).
860. *Laskowski M.* The poly d(A–T) of crab, Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., **12,** 161–188 (1972).
861. *Gall J.G., Atherton D.D.* Satellite DNA sequences in *Drosophila virilis,* J. Mol. Biol., **85,** 633–664 (1974).
862. *Bostock C.* A function for satellite DNA? Trends Biochem. Sci., **5,** 117–119 (1980).
863. *Sundaralingam M.* Principles governing nucleic acid and polynucleotide conformations. In: Structure and Conformation of Nucleic Acids and Protein–Nucleic Acid Interactions (M. Sundaralingam and S.T. Rao, eds.), pp. 487–524, Univ. Park Press, Baltimore, 1974.
864. *Nussinov R., Jackson A.B.* Fast algorithm for predicting the secondary structure of single-stranded RNA, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **77,** 6309–6313 (1980).
865. *Spencer M., Poole F.* On the origin of crystallizable RNA from yeast, J. Mol. Biol., **11,** 314–326 (1965).
866. *Erdmann V.* Structure and function of 5S and 5.8S RNA, Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., **18,** 45–90 (1976).
867. *Noller H.F., Woese C.R.* Secondary structure of 16S ribosomal RNA, Science, **212,** 403–411 (1981).
868. *Schwarz Zs., Kössel H.* The primary structure of 16SrRNA from *Zea mays* chloroplast is homologous to *E. coli* 16S rRNA, Nature, **283,** 739–742 (1980).
869. *Fiers W., Contreras R., Duerinck F., Haegemann G., Iserentant D., Merregaert F., Min Jou W., Molemans F., Raeymaekers A., Berghe A. Van den, Volckaert G., Ysebaert M.* Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: Primary and secondary structure of replicase gene, Nature, **260,** 500–507 (1976).
870. *Sanger F.* Nucleotide sequences in bacteriophage ribonucleic acid, Biochem. J., 124, 833–843 (1971).

871. *Proudfoot N. J., Brownlee G. G.* Sequence at the 3'-end of globin mRNA shows homology with immunoglobulin light chain mRNA, Nature, **252**, 359–362 (1974).
872. *White H. B.* III, *Laux B. E., Dennis D.* Messenger RNA structure: Compatibility of hairpin loops with protein sequences, Science, **175**, 1264–1266 (1972).
873. *Sato T., Kyogoku Y., Higuchi S., Mitsui Y., Itaka Y., Tsuboi M., Miura K.-I.* A preliminary investigation on the nuclear structure of rice dwarf virus ribonucleic acid, J. Mol. Biol., **16**, 180–190 (1966).
874. *Langridge R., Gomatos P.* The structure of RNA, Science, **141**, 694–698 (1963).
875. *Arnott S., Hutchinson F., Spencer M., Wilkins M. H. F., Fuller W., Langridge R.* X-ray diffraction studies of double helical ribonucleic acid, Nature, **211**, 227–232 (1966).
876. *Arnott S., Wilkins M. H. F., Fuller W., Langridge R.* Molecular and crystal structure of double-helical RNA. II. Determination and comparision of diffracted intensities for the α and β crystalline forms of reovirus RNA and their interpretation in terms of groups of three RNA molecules, J. Mol. Biol., **27**, 525–533; III. An 11-fold molecular model and comparison of the agreement between the observed and calculated three-dimensional diffraction data for 10- and 11-fold models, J. Mol. Biol., **27**, 535–548 (1967).
877. *Arnott S., Wilkins M. H. F., Fuller W., Venable J., Langridge R.* Molecular and crystal structures of double-helical RNA. IV. Molecular packing in crystalline fibers, J. Mol. Biol., **27**, 549–562 (1967).
878. *Tomita K.-I., Rich A.* X-Ray diffraction investigations of complementary RNA, Nature, **201**, 1160–1163 (1964).
879. *Arnott S., Fuller W., Hodgson A., Prutton I.* Molecular conformations and structure transitions of RNA complementary helices and their possible biological significanse, Nature, **220**, 561–564 (1968).
880. *Blacke R. D., Massoulié J., Fresco J. R.* Polynucleotides VIII. A spectral approach to the equilibria between polyriboadenylate and polyribouridylate and their complexes, J. Mol. Biol., **30**, 291–308 (1967).
881. *Massoulié J.* Associations de poly(A) et poly(U) en milieu acide. Phénomènes irréversibles, Eur. J. Biochem., **3**, 439–447 (1968).
882. *Hamilton L. D., Babcock V. I., Southern C. M.* Inhibition of herpes simplex virus by synthetic double-stranded RNA (polyriboadenylic and polyribouridylic acids and polyriboinosinic and polyribocytidylic acids), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **64**, 878–883 (1969).
883. *Field A. K., Tytell A. A., Lampson G. P., Hillemann M. R.* Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **58**, 1004–1010 (1967).
884. *Ikehara M., Hattori M., Fukui T.* Synthesis and properties of poly(2-methyladenylic acid). Formation of a poly(A)·poly(U) complex with Hoogsteen-type hydrogen bonding, Eur. J. Biochem., **31**, 329–334 (1972).
885. *Ishikawa F., Frazier J., Howard F. B., Miles H. T.* Polyadenylate·polyuridylate helices with non-Watson-Crick hydrogen bonding, J. J. Mol. Biol., **70**, 475–490 (1972).
886. *Fukui T., Ikehara M.* Polynucleotides. XLVII. Synthesis and properties of poly(2-methylthio- and 1-ethylthioadenylic acid). Formation of non-Watson-Crick type complexes, Biochim. Biophys. Acta, **562**, 527–533 (1979).
887. *Hakoshima T., Fukui T., Ikehara M., Tomita K.-I.* Molecular structure of a double helix with a non-Watson-Crick type base pairing formed by 2-substi-

tuted poly(A) and poly(U), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **78**, 7309–7313 (1981).
888. *Lu C. T., Varughese K. I., Kartha G.* The crystal structure of ammonium adenylyl-3′,5′-uridine tetrahydrate, Abstracts, Summer Meeting of American Crystallographic Association Series 2, **8**. 33 (1980).
889. *Hingerty B., Subramanian E., Stellman S. D., Sato T., Broyde S. B., Langridge R.* The crystal and molecular structure of a calcium salt of guanylyl-3′,5′-cytidine (GpC), Acta Crystallogr., B, **32**, 2998–3013 (1976).
890. *Rosenberg J. M., Seeman N. C., Day R. O., Rich A.* RNA double helices generated from crystal structures of double helical dinucleoside phosphates, Biochem. Biophys. Res. Commun., **69**, 979–987 (1976).
891. *Seeman N. C., Sussman J. L., Berman H. M., Kim S.-H.* Nucleic acid conformation: Crystal structure of a naturally occurring dinucleoside phosphate (UpA), Nature New Biol., **233**, 90–92 (1971).
892. *Fuller W., Wilkins M. H. F., Hamilton H. R., Arnott S.* The molecular configuration of deoxyribonucleic acid. IV. X-Ray diffraction study of the A-form, J. Mol. Biol., **12**, 60–80 (1965).
892a. *Calladine C. R.* Mechanism of sequence-dependent stacking of bases in B-DNA, J. Mol. Biol., **161**, 343–352 (1982).
892b. *Dickerson R. E.* Base sequence and helix structure variation in B- and A-DNA, J. Mol. Biol., **166**, 419–441 (1983).
893. *Conner B. N., Takano T., Tanaka S., Itakura K., Dickerson R. E.* The molecular structure of d(^{I}CpCpGpG), a fragment of right-handed double helical A-DNA, Nature, 295, 294–299 (1982).
893a. *Wang H.-J., Fujii S., Boom J. H. van, Rich A.* Molecular structure of the octamer d(GGCCGGCC): modified A-DNA, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **79**, 3968–3972 (1982).
894. *Shakked Z., Rabinovich D., Cruse W. B. T., Egert E., Kennard O., Sala G., Salisbury S. A., Viswamitra M. A.* Crystalline A-DNA: The X-ray analysis of the fragment d(G—G—T—A—T—A—C—C), Proc. Roy. Soc. London Ser. B, **231**, 479–487 (1981).
894a. *Shakked Z., Kennard O.* The A-form of DNA. In: A. McPherson and F. Jurnak, eds., Structural Biology, John Wiley and Sons, New York, 1983.
895. *Zimmerman S. B., Pheiffer B. H.* A direct demonstration that the ethanol-induced transition of DNA is between the A and B forms: an X-ray diffraction study, J. Mol. Biol., **135**, 1023–1027 (1979).
896. *Holbrook S. R., Sussman J. L., Kim S.-H.* Absence of correlation between base-pair sequence and RNA-conformation, Science, **212**, 1275–1277 (1981).
897. *Schellman J. A.* Flexibility of DNA, Biopolymers, **13**, 217–226 1974.
898. *Millar D. P., Robbins R. J., Zewail A. H.* Direct observation of the torsional dynamics of DNA and RNA by picosecond spectroscopy, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **77**, 5593–5597 (1980).
899. *Dickerson R. E., Drew H. R.* Structure of a B-DNA dodecamer. II. Influence of base sequence on helix structure, J. Mol. Biol., **149**, 761–786 (1981).
899a. *Drew H. R., Wing R. M., Takano T., Broka C., Tanaka S., Itakura K., Dickerson R. E.* Structure of B-DNA dodecamer: conformation and dynamics, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), **78**, 2179–2183 (1981).
899b. *Kabsch W., Sander C., Trifonov E. N.* The ten helical twist angles of B-DNA, Nucl. Acid Res., **10**, 1097–1104 (1982).
900. *Klug A., Jack A., Viswamitra M. A., Kennard O., Shakked Z., Steitz T. A.* A hypothesis on a specific sequence-dependent conformation of DNA and its relation to the binding of the *lac*-repressor protein, J. Mol. Biol., **131**, 669–680 (1979).

900a. *Viswamitra M. A., Shakked Z., Jones P. G., Sheldrick G. M., Salisbury S. A., Kennard O.* Structure of the deoxytetranucleotide d-pApTpApT and a sequence-dependent model for poly(dA–dT), Biopolymers, **21**, 513–533 (1982).
901. *Hosur R. V., Govil G., Hosur M. V., Viswamitra M. A.* Sequence effect in structures of the dinucleotides d-pApT and d-pTpA, J. Mol. Struct., **72**, 261–267 (1981).
902. *Wilson H. R., Al-Mukhtar J.* Structure of thymidylyl-3′,5′-deoxyadenosine, Nature, **263**, 171–172 (1976).
902a. *Radwan M. M., Wilson H. R.* Fiber and molecular structure of thymidylyl-3′,5′-deoxyadenosine, Int. J. Biol. Macromol., **4**, 145–149 (1982).
903. *Shindo H., Zimmerman S. B.* Sequence-dependent variations in the backbone geometry of a synthetic DNA fibre, Nature, **283**, 690–691 (1980).
904. *Shindo H., Simpson R. T., Cohen J. S.* An alternating conformation characterizes phosphodiester backbone of poly a(A–T) in solution, J. Biol. Chem., **254**, 8125–8128 (1979).
905. *Patel D. J., Canuel L. L., Pohl F. M.* "Alternating B-DNA" conformation for the oligo (dG-dC) duplex in high-salt solution, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **76**, 2508–2511 (1979).
906. *Schefler I. E., Elson E. L., Baldwin R. L.* Helix formation by d(A–T) oligomers. I. Hairpin and straight-chain helices, J. Mol. Biol., **36**, 291–304 (1968).
907. *Lutter L. C.* Deoxyribonuclease I produces staggered cuts in the DNA of chromatin, J. Mol. Biol., **117**, 53–69 (1977).
908. *Riggs A. D., Lin S.-Y. Wells R. D. lac* repressor binding to synthetic DNAs of defined nucleotide sequence, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **69**, 761–764 (1972).
909. *Peck L. J., Wang J. C.* Sequence dependence of the helical repeat of DNA in solution, Nature, **292**, 375–378 (1981).
910. *Rhodes D., Klug A.* Sequence-dependent helical periodicity of DNA, Nature, **292**, 378–380 (1981).
910a. *Strauss F., Gaillard C., Prunell A.* Helical periodicity of DNA, poly(dA)·poly(dT) and poly(dA–dT)·poly(dA–dT) in solution, Eur. J. Biochem., **118**, 215–222 (1981).
911. *Brahms J., Pilet J., Lan T.-T. P., Hill L. R.* Direct evidence of the C-like form of sodium deoxyribonucleate, Proc. Nat. Acad Sci. USA, **70**, 3352–3355 (1973).
911a. *Rhodes N. J., Mahendrasingam A., Pigram W. J., Fuller W., Brahms J., Vergne J., Warren R. A. J.* The C conformation in a low salt form of sodium DNA. Nature, **296**, 267–269 (1982).
912. *Zimmerman S. B., Pheiffer B. H.* A RNA·DNA hybrid that can adopt two conformations: An X-ray diffraction study of poly(A)·poly(dT) in concentrated solution or in fibers, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **78**, 78–82 (1981).
913. *Arnott S., Bond P. J.* Structures for poly(U)·poly(A)·poly(U) triple stranded helices, Nature New Biol., **244**, 99–101 (1973).
913a. *Wang A. H.-J., Fujii S., Boom J. H. van, Marel G. A. van, Boeckel S. A. A. van, Rich A.* Molecular structure of r(GCG)d(TATACGC): A DNA-RNA hybrid helix joined to double helical DNA, Nature, **299**, 601–604 (1982).
914. *Pohl F. M., Jovin T. M.* Salt-induced co-operative conformational change of a synthetic DNA: Equilibrium and kinetic studies with poly d(G–C), J. Mol. Biol., **67**, 375–396 (1972).
915. *Pohl F. M.* Polymorphism of a synthetic DNA in solution, Nature, **260**, 365–366 (1976).
916. *Davies D. R., Zimmerman S. B.* A new twist for DNA? Nature, **283**, 11–12 (1980).
917. *Wang A. H.-J., Quigley G. J., Kolpak F. J., Marel G. van der, Boom J. H. van*

Rich A. Left-handed double helical DNA: Variations in the backbone conformation, Science, **211**, 171–176 (1980).

918. *Drew H. R., Dickerson R. E., Itakura K.* A salt-induced conformational change in crystals of the synthetic DNA tetramer d(CpGpCpG), J. Mol. Biol., **125**, 535–543 (1978).

919. *Crawford J. L., Kolpak F. J., Wang A. H.-J., Quigley G. J., Boom J. H. van, Marel G. van der, Rich A.* The tetramer d(CpGpCpG) crystallizes as a left-handed double helix, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **77**, 4016–4020 (1980).

920. *Drew H. R., Dickerson R. E.* Conformation and dynamics in a Z'-DNA tetramer, J. Mol. Biol., **152**, 723–736 (1981).

921. *Mitra C. K., Sarma M. H., Sarma R. H.* Left-handed deoxyribonucleic acid double helix in solution, Biochemistry, **20**, 2036–2041 (1981).

922. *Behe M., Zimmerman S. B., Felsenfeld G.* Changes in the helical repeat of poly(dG–m^5dC)·poly(dG–m^5dC) and poly(dG–dC)·poly(dG–dC) associated with the B-Z transition, Nature, **293**, 233–235 (1981).

923. *Neumann J. M., Guschlbauer W.,* Tran-Dinh S. Conformation and flexibility of GpC and CpG in neutral aqueous solutions using ^{1}H nuclear-magnetic-resonance and spin-lattice-relaxation time measurements, Eur. J. Biochem., **100**, 141–148 (1979).

924. *Saenger W., Landmann H., Lezius A. G.* X-Ray diffraction studies on fibers of poly d(A–s^4T)·poly d(A–s^4T), Jerus. Sympos. Quant. Chem. Biochem., **5**, 457–467 (1973).

924a. *Sande J. H. van de, Jovin T. M.* Z*DNA, the left-handed helical form of poly[d(G–C)] in $MgCl_2$-ethanol, is biologically active, EMBO J., **1**, 115–120 (1982).

925. *Santella R. M., Grunberger D., Weinstein I. B., Rich A.* Induction of the Z conformation of poly(dG–dC)·poly(dG–dC) by binding of N-2-acetylaminofluorene to guanine residues, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **78**, 1451–1455 (1981).

925a. *Nickol J., Behe M., Felsenfeld G.* Effect of the B-Z transition in poly(dG–m^5dC)·poly(dG–m^5dC) on nucleosome formation, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), **79**, 1771–1775 (1982).

926. *Nordheim A., Pardue M. L., Lafer E. M., Möller A., Stollar D., Rich A.* Antibodies to left-handed Z-DNA bind to interband regions of *Drosophila* polytene chromosomes, Nature, **294**, 417–422 (1981).

927. *Behe M., Felsenfeld G.* Effects on methylation on a synthetic polynucleotide: The B-Z transition in poly(dG–m^5C)·poly(dG–m^5C), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **78**, 1619–1623 (1981).

928. *Razin A., Riggs A. D.* DNA methylation and gene function, Science, **210**, 604–610 (1980).

929. *Klysik J., Stirdivant S. M., Larson J. E., Hart P. A., Wells R. D.* Left-handed DNA in restriction fragments and a recombinant plasmid, Nature, **290**, 672–677 (1981).

929a. *Singleton C. K., Klysik K., Stirdivant S. M., Wells R. D.* Lefthanded Z-DNA is induced by supercoiling in physiological ionic conditions, Nature, **299**, 312–316 (1982).

930. *Prescott B., Gamache R., Livramento J., Thomas G. J., Jr.* Raman studies of nucleic acids. XII. Conformations of oligonucleotides and deuterated polynucleotides, Biopolymers, **13**, 1821–1845 (1974).

931. *Leng M., Felsenfeld G.* A study of polyadenylic acid at neutral pH, J. Mol. Biol., **15**, 455–466 (1966).

932. *Eisenberg H., Felsenfeld G.* Studies on the temperature-dependent conformation and phase separation of polyriboadenylic acid solutions at neutral pH, J. Mol. Biol., **30**, 17–37 (1967).
933. *Achter E. K., Felsenfeld G.* The conformation of single-strand polynucleotides in solution: Sedimentation studies of apurinic acid, Biopolymers, **10**, 1625–1634 (1971).
934. *Edmonds M., Winters M. A.* Polyadenylate polymerases, Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., **17**, 149–179 (1976).
935. *Ahlquist P., Kaesberg P.* Determination of the length distribution of poly(A) at the 3'-terminus of the virion RNAs of EMC virus, poliovirus, rhinovirus, RAV-61 and CPMV and of mouse globin mRNA, Nucl. Acids Res., **7**, 1195–1204 (1978).
936. *Akinrimisi E. O., Sander C., Ts'o P. O. P.* Properties of helical polycytidylic acid, Biochemistry, **2**, 340–344 (1963).
937. *Fasman G. D., Lindblow C., Grossman L.* The helical conformation of polycytidylic acid: Studies on the forces involved, Biochemistry, **3**, 1015–1021 (1964).
938. *Adler A., Grossman L., Fasman G. D.* Single-stranded oligomers and polymers of cytidylic and 2'-deoxycytidylic acids: comparative optical rotatory studies, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **57**, 423–430 (1967).
939. *Guschlbauer W.* Protonated polynucleotide structures. I. The therminal denaturation of polycytidylic acid in solution, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **57**, 1441–1448 (1967).
940. *Mahler H. R., Green G.* Comparative study of polyribonucleotides in aqueous and glycol solutions, Biochemistry, **9**, 368–387 (1970).
941. *Gulik A., Inoue H., Luzzati V.* Conformation of single-stranded polynucleotides: Small-angle X-ray scattering and spectroscopic study of polyribocytidylic acid in water and in water–alcohol solutions, J. Mol. Biol., **53**, 221–238 (1970).
942. *Yang J. T., Samejima T.* Optical rotatory dispersion and circular dichroism of nucleic acids, Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., **9**, 223–300 (1976).
943. *Borah B., Wood J. L.* The cytidinium–cytidine complex: Infrared and Raman spectroscopic studies, J. Mol. Struct., **30**, 13–30 (1976).
944. *Marsh R. E., Bierstedt R., Eichhorn E. L.* The crystal structure of cytosine-5-acetic acid, Acta Crystallogr., **15**, 310–316 (1962).
945. *Kistenmacher T. J., Rossi M., Marzilli L. G.* A model for the interrelationship between asymmetric interbase hydrogen bonding and base–base stacking in hemiprotonated polyribocytidylic acid: Crystal structure of 1-methylcytosine hemihydroiodide hemihydrate, Biopolymers, **17**, 2581–2585 (1978).
946. *Alderfer J., Tazawa I., Tazawa S., Ts'o P. O. P.* Comparative studies on polydeoxyribocytidylate (dC), polyribocytidylate (rC) and poly-2'-O-methylribocytidylate (mC) and polydeoxyriboinosinate (dI), polyriboinosinate (rI) and poly-2'-O-methylriboinosinate (mI), Biophys. J., **15**, 29a (1975).
947. *Leslie A. G. W., Arnott S.* Structure of single-stranded polyribonucleotide poly(2'-O-methylcytidylic acid), J. Mol. Biol., **119**, 399–414 (1978).
948. *Stellman S. D., Broyde S. B., Wartell M.* Influence of ribose-2'-O-methylation on GpC conformation by classical potential energy calculations, **15**, 1951–1964 (1976).
949. *Stellman S. D., Hingerty B., Langridge R.* Conformation of a rare nucleoside in the anticodon loop of tRNAs: Potential energy calculations for 2'-O-methyl cytidine, Biopolymers, **14**, 2049–2060 (1975).
950. *Hingerty B., Bond P. J., Langridge R., Rottman F.* Conformation of 2'-O-methyl

cytidine, a modified furanose component of ribonucleic acids, Boichem. Biophys. Res. Commun., **61**, 875–881 (1974).

950a. *Broido M. S., Kearns D. R.* ^{1}H NMR evidence for a left-handed helical structure of poly(ribocytidylic acid) in neutral solution, J. Amer. Chem. Soc., **104**, 5207–5216 (1982).

951. *Scovell W. M.* Structural and conformational studies of polyribonucleic acid in neutral and acid solution, Biopolymers, **17**, 969–984 (1978).

952. *Brahms J., Michelson A. M., Holde K. E. Van.* Adenylate oligomers in single- and double-stranded conformation, J. Mol. Biol., **15**, 467–488.

953. *Witz J., Luzzati V.* La structure des acides polyadenylique et polyuridylique en solution: étude par diffusion centrale des rayons X, J. Mol. Biol., **11**, 620–630 (1965).

954. *Holcomb D. N., Tinoco I.* Jr. Conformation of polyriboadenylic acid: pH and temperature dependence, Biopolymers, **3**, 121–133 (1965).

955. *Thiyagarajan P., Ponnuswamy P. K.* Conformational characteristics of the RNA subunit ApA from energy minimization studies, Biopolymers, **17**, 2143–2158 (1978).

956. *Olson W. K.* The spatial configuration of ordered polynucleotide chins. II. The poly(rA) helix, Nucl. Acids Res., **2**, 2055–2068 (1975).

957. *Saenger W., Riecke J., Suck D.* A structural model for the polyadenylic acid single helix, J. Mol. Biol., **93**, 529–534 (1975).

958. *Olsthoorn C. S. M., Bostelaar L. J., Boom J. H. van, Altona C.* Conformational characteristics of the trinucleoside diphosphate dApdApdA and its constituents from nuclear magnetic resonance and circular dichroism studies, Eur. J. Biochem., **112**, 95–100 (1980).

959. *Kahana Z. E., Erlanger B. F.* Immunochemical study of the structure of poly(adenylic acid), Biochemistry, **19**, 320–324 (1980).

960. *Pinder J. C., Staynov D. Z., Gratzer W. B.* Properties of RNA in formamide, Biochemistry, **13**, 5367–5373 (1974).

961. *Strauss J. H. Jr., Kelly R. B., Sinsheimer R. L.* Denaturation of DNA with dimethyl sulfoxide, Biopolymers, **6**, 793–807 (1968).

962. *Morgan R. S., Byrne R.* "Alcaline" polyadenylic acid, J. Mol. Biol., **1**, 188–189 (1959).

963. *Zimmerman S. B., Davies D. R., Navia M. A.* An ordered single-stranded structure for polyadenylic acid in denaturating solvents. An X-ray fiber diffraction and model building study, J. Mol. Biol., **116**, 317–330 (1977).

964. *Kim S.-H., Sussman J. L.* π-Turn is a conformational pattern in RNA loops and bends, Nature, **260**, 645–646 (1976).

965. *Fresco J. R.* Polynucleotides. II. The X-ray diffraction patterns of solutions of the randomly coiled and helical forms of polyriboadenylic acid, J. Mol. Biol., **1**, 106–110 (1959).

966. *Zimmerman S. B., Coleman N. F.* An ordered precipitate of polyadenylic acid formed by freezing at acids pH: Comparison of X-ray diffraction and other properties of the precipitate with those of fibers or direct acid-precipitates, Biopolymers, **11**, 1943–1960 (1972).

967. *Finch J. T., Klug A.* Two double helical forms of polyriboadenylic acid and the pH-dependent transition between them, J. Mol. Biol., **46**, 597–598 (1969).

967a. *Lerner D. B., Kearns D. R.* Proton and phosphorus NMR investigation of the conformational states of acid polyadenylic double helix, Biopolymers, **20**, 803–816 (1981).

968. *Suck D., Manor P. C., Saenger W.* The structure of a trinucleoside diphosphate:

Adenylyl-(3',5')-adenylyl-(3',5')-adenosihexahydrate. Acta Crystallogr. B, **32**, 1727–1737 (1976).
969. *Love M.J., Schellman J.A.* Solvent effects on dinucleotide conformation, J. Mol. Biol., **65**, 91–109 (1972).
970. *Wood D.J., Hrusca F.E., Ogilvie K.K.* Proton magnetic resonance studies of 2'-deoxytimidine, its 3'- and 5'-monophosphates and 2'-deoxythymidylyl-(3',5')--2'-deoxythymidine in aqueous solution, Can. J. Chem., **52**, 3353–3366 (1974).
971. *Lipsett M.N.* Evidence for helical structure in polyuridylic acid, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **46**, 445–446 (1960).
972. *Thrierr J.C., Dourlent M., Leng M.* A study of polyuridylic acid, J. Mol. Biol., **58**, 815–830 (1971).
973. *Millar D.B., Mackenzie M.* The properties of the helix and coil forms of polyribouridylic acid and its halogenated analogs, Biochim. Biophys. Acta, **204**. 82–90 (1970).
974. *Zimmerman S.B.* The polyuridylic acid complex with polyamines: An X-ray fiber diffraction observation, J. Mol. Biol., **101**, 563–565 (1976).
975. *Saenger W., Mazumdar S.K., Suck D., Manor P.C.* Parallel and antiparallel homopolymer nucleic acid double helices. In: Structure and Conformation of Nucleic Acids and Protein–Nucleic Acid Interactions (M. Sundaralingam and S.T. Rao, eds.), pp. 537–555, Univ. Park Press, Baltimore, 1974.
976. *Arnott S., Chandrasekaran R., Leslie A.G.W., Puigjaner L.C., Saenger W.* Structure of poly(2-thiouridylic acid) duplex, J. Mol. Biol., **149**,507–520 (1981).
977. *Szer W.* Interaction of polyribothymidylic acid with metal ions and aliphatic amines, Acta Biochim. Polon., **3**, 251–266 (1966).
978. *Guschlbauer W., Chantot J.F.* Guanosine revisited. A short review of gel formation by guanosine and its derivatives. In: Proceedings of the Conference of Synthesis. Structure and Chemistry of the tRNAs and Their Components (M. Wiewiorowski, ed.), pp. 96–114, Polish Acad. of Science, Dymaczewo near Poznan, 1976.
979. *Pinnavaia T.J., Miles H.T., Becker E.D.* Self-assembled 5'-guanosine monophosphate. Nuclear magnetic resonance for a regular, ordered structure and slow chemical exchange, J. Amer. Chem. Soc., **97**, 7198–7200 (1975).
980. *Muarayama W., Nagashima N., Shimizu Y.* The crystal and molecular structure of guanosine-5'-phosphate trihydrate, Acta Crystallogr., B, **25**, 2236–2245 (1969).
981. *Thewalt U., Bugg C.E., Marsh R.E.* The crystal structure of guanosine dihydrate and inosine dihydrate, Acta Crystallogr., B, **26**, 1089–1101 (1970).
982. *Gellert M., Lipsett M.N., Davies D.R.* Helix formation by guanylic acid, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **48**, 2013–2018 (1962).
983. *Sasisekharan V., Zimmerman S.B., Davies D.R.* The structure of helical 5'-guanosine monophosphate, J. Mol. Biol., **92**, 171–179 (1975).
984. *Tougard P., Chantot J.-F., Guschlbauer W.* Nucleoside conformations. X. An X-ray fiber diffraction study of the gels of guanosine nucleosides, Biochim. Biophys. Acta, **308**, 9–16 (1973).
985. *Zimmerman S.B.* X-ray study by fiber diffraction methods of a self-aggregate of guanosine-5'-phosphate with the same helical parameters as poly r(G). J. Mol. Biol., **106**, 663–672 (1976).
986. *Chantot J.F., Guschlbauer W.* Mechanism of gel formation by guanine nucleosides, Jerus. Sympos. Quant. Chem. Biochem., **4**, 205–214 (1972).
987. *Borzo M., Delletier C., Laszlo P., Paris A.* ^{1}H, ^{23}Na, and ^{31}P NMP studies of self-assembly of the 5'-guanosine monophosphate dianion in neutral aqueous solution in the presence of sodium cations, J. Amer. Chem. Soc., **102**, 1124–1134

(1980).
988. *Pinnavaia T.J., Marshall C.L., Mettler C.M., Fisk C.L., Miles H.T., Becker E.D.* Alkali metal ion specificity in the solution ordering of a nucleotide, 5'-guanosine monophosphate, J. Amer. Chem. Soc., **100**, 3625–3627 (1978).
989. *Hilgenfeld R., Saenger W.* Structural studies of ionophores and their complexes with cation, Top. Curr. Chem., **101**, 1–82 (1981).
990. *Thiele D., Guschlbauer W.* The structure of polyinosinic acid, Biophysik, **9**, 261–277 (1973).
991. *Sarkar P.K., Yang J.T.* Optical activity of 5'-guanylic acid gel, Biochem. Biophys. Res. Commun., **20**, 346–351 (1965).
992. *Zimmerman S.B., Cohen G.H., Davies D.R.* X-Ray fiber diffraction and model-building study of polyguanylic acid and polyinosinic acid, J. Mol. Biol., **92**, 181–192 (1975).
993. *Arnott S., Chandrasekaran R., Marttila C.M.* Structures for polyinosinic acid and polyguanylic acid, Biochem. J., **141**, 537–543 (1974).
994. *Rich A.* The molecular structure of polyinosinic acid, Biochim. Biophys. Acta, **29**, 502–509 (1958).
995. *Souleil C., Panijel J.* Immunochemistry of polyribonucleotides. Study of polyriboinosinic and polyriboguanylic acids, Biochemistry, **7**, 7–13 (1968).
996. *Howard F.B., Frazier J., Miles H.T.* Stable and metastable forms of poly(G), Biopolymers, **16**, 791–809 (1977).
997. *Zimmerman S.B.* An "acid" structure for polyriboguanylic acid observed by X-ray diffraction, Biopolymers, **14**, 889–890 (1975).
998. *Dugaiczyk A., Robberson D.L., Ullrich A.* Single-stranded double- and triple-stranded structures. Biochemistry, **19**, 5869–5873 (1980).
999. *Meselson W., Stahl F.W.* The replication of DNA in *Escherichia coli*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **44**, 671–682 (1958).
1000. *Pohlland W.F., Roberts G.W.* Topological considerations in the theory of replication of DNA, J. Math. Biol., **6**, 383–402 (1978).
1001. *Fisher L.M.* DNA supercoiling by DNA gyrase, Nature, **294**, 607–610 (1981).
1002. *Bates R.H.T., Lewitt R.M., Rowe C.H., Day J.P., Rodley G.A.* On the structure of DNA, J. Roy. Soc. N.Z., **7**, 273–301 (1977).
1003. *Sasisekharan V., Pattabiraman N.* Double stranded polynucleotides: two typical alternative conformations for nucleic acid, Curr. Sci., **45**, 779–783 (1976).
1004. *Sasisekharan V.* Gupta Goutam. On the alternative structure of DNA: Role of *syn* conformation of the base, Curr. Sci., **49**, 43–48 (1980).
1004a. *Górski F.* A comparison of the Watson–Crick DNA structural model with the new "side by side" model, Folia Biol. (Krakow), **28**, 211–224 (1980).
1005. *Rodley G.A., Bates R.H.T., Arnott S.* Is DNA really a double helix? Trends Biochem. Sci., **5**, 231–234 (1980).
1006. *Stettler U.H., Weber H., Koller Th., Weissmann Ch.* Preparation and characterization of form V DNA, the douplex DNA resulting from association of complementary, circular single-stranded DNA, J. Mol. Bol., **131**, 21–40 (1979).
1007. *Crick F.H.C., Wang J.C., Bauer W.R.* Is DNA really a double helix? J. Mol. Biol., **129**, 446–461 (1979).
1008. *Noll M.* Internal structure of the chromatin subunit, Nucl. Acids Res., **1**, 1573–1578 (1974).
1009. *Crick F.H.C., Klug A.* Kinky helix, Nature, **255**, 530–553 (1975).
1010. *Pack G.R., Muskavitch M.A., Loew G.* Kinked DNA. Energetics and conditions favoring its formation, Biochim. Biophys. Acta, **478**, 9–22 (1977).

1011. *Vasilescu D., Broch H., Carbol D.* Kinked helices in nucleic acids – A molecular orbital investigation, Int. J. Quant. Chem. Quant. Biol. Sympos., **5**, 345–354 (1978).
1012. *Sobell H. M., Tsai C.-C. Gilbert S. G., Jain S. C., Sakore T. D.* Organization of DNA in chromatin, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, **73**, 3068–3072 (1976).
1013. *Sobell H. M., Tsai C.-C., Jain S. C., Gilbert S. G.* Vizualization of drug-nucleic acid interactions at atomic resolution. III. Unifying structural concepts in understanding drug – DNA interactions and their broader implications in understanding protein – DNA interactions, J. Mol. Biol., **114**, 333–365 (1977).
1014. *Lozansky E. D., Sobell H. M., Lessen M.* Does DNA have two structures in solution that coexist at equilibrium? In: Stereodynamics of Molecular Structure (R. H. Sarma, ed), pp. 265–270, Pergamon Press, New York, 1979.
1014a. *Englander S. W., Kallenbach N. R., Heeger A. J., Krumhanse J. A., Litwin S.* Nature of the open state in long polynucleotide double helices: Possibility of solution excitations, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), **77**, 7222–7226 (1980).
1015. *Selsing E., Wells R. D., Alden C. J., Arnott S.* Bent DNA: Visualization of a base-paired and stacked A – B conformational junction, J. Biol. Chem., **254**, 5417–5422 (1979).
1016. *Selsing E., Wells R. D.* Polynucleotide block polymers consisting of a DNA·RNA hybrid joined to a DNA·DNA duplex, J. Biol. Chem., **254**, 5410–5416 (1979).
1016a. *Roberts J. W.* Transcription termination and its control in *E. coli.* In: R. Losick and M. Chamberlin, eds., RNA Polimerase, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p. 247–272, 1976.
1016b. *Selsing E., Wells R. D., Early T. A., Kearns D. R.* Two contiguous conformations in a nucleic acid complex, Nature, **275**, 249–250 (1978).
1017. *Wang J. C., Jacobsen J. H., Saucier J.-M.* Physicochemical studies on interactions between DNA and RNA polymerase. Unwinding of the DNA helix by *Escherichia coli* RNA polymerase, Nucl. Acids Res., **4**, 1225–1241 (1977).
1018. *Scherer G. E. F., Walkinshaw M. D., Arnott S.* A computer aided oligonucleotide analysis provides a model sequence for RNA polymerase promoter region in *E. coli*, Nucl. Acids Res., **5**, 3759–3773 (1978).
1019. *Broyde S. B., Stellman S. D., Wartell R. M.* The A and B conformations of DNA and RNA subunits, Potential energy calculations for dGpdC, Biopolymers, **14**, 2625–2637 (1975).
1020. *Fujii S., Tomita K.-I.* Conformational analysis of polynucleotides. I. The favorable left-handed helical model for the poly(8,2′-S-cycloadenylic acid) with *high-anti* conformation, Nucl. Acids Res., **3**, 1973–1984 (1976).
1021. *Olson W. K., Dasika R. D.* Spatial configuration of ordered polynucleotide chains, 3. Polycyclonucleotides, J. Amer. Chem. Soc., **98**, 5371–5380 (1976).
1022. *Olson W. K.* Spatial configuration of ordered polynucleotide chains: A novel double helix, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **74**, 1775–1779 (1977).
1023. *Uesugi S., Tezuka T., Ikehara M.* Polynucleotides. XXX. Synthesis and properties of oligonucleotides of cyclouridine phosphate. Hybridization with the oligomer of S-cycloadenosine phosphate to form left-handed helical complexes, J. Amer. Chem. Soc., **98**, 969–973 (1976).
1024. *Ikehara M., Tezuka T.* Synthesis of cyclouridine oligonucleotides forming a double stranded complex of left-handedness with cycloadenosite oligonucleotides, J. Amer. Chem. Soc., **95**, 4054–4056 (1973).
1025. *Sarma R. H., Dhingra M. M., Feldmann R. J.* The diverse spatial configurations of DNA. Evidence for a vertically stabilized double helix. In: Stereodynamics of

Molecular Systems (R. H. Sarma, ed.), pp. 251–264, Pergamon Press, New York, 1979.
1026. *Mitra C. K., Dhingra M. M., Sarma R. H.* Experimental support for a right-handed vertical double helix, Biopolymers, **19**, 1435–1450 (1980).
1027. *Soll D., Abelson J. N., Schimmel P. R.* (eds.). Transfer DNA: Structure, Properties, and Recognition, Cold Spring Harbor Monograph, Series 9A, 1980.
1028. *Altmann S.* (*ed.*). Transfer RNA, MIT Press, Cambridge, 1978.
1029. *Goddard J. P.* The structure and functions of transfer RNA, Prog. Biophys. Mol. Biol., **32**, 233–308 (1977).
1030. *Kim S.-H.* Three-dimensional structure of transfer RNA, Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., **17**, 181–216 (1976).
1031. *Kim S.-H.* Three-dimensional structure of transfer RNA and its functional implications, Adv. Enzymol., **46**, 279–315 (1978).
1032. *Kim S.-H.* Transfer RNA: Crystal structure. In: Topics in Molecular and Structural Biology (S. Neidle and W. Fuller, eds.), Vol. 1, pp. 83–112, 1981.
1033. *Rich A., Kim S.-H.* The three-dimensional structure of transfer RNA, Sci. Amer., **238**, 52–62 (1978).
1034. *Rich A., RajBhandary U. L.* Transfer RNA: Molecular structure, sequence, and properties. Annu. Rev. Biochem., **45**, 805–860 (1976).
1035. *Clark B. F. C.* Correlation of biological activities with structural features of transfer RNA, Proc. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., **20**, 1–19 (1977).
1036. *Sigler P. B.* An analysis of the structure of RNA, Annu. Rev. Biophys. Bioeng., **4**, 477–527 (1973).
1037. *Singhal R. P., Fallis P. M.* Structure, function, and evolution of transfer RNAs (with appendix giving complete sequences of 178 tRNAs), Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., **23**, 227–290 (1979).
1038. *Баев А. А., Векстерн Т. Б.* Транспортные рибонуклеиновые кислоты. Структурно-функциональные аспекты. Молек. биол., 1977, **11**, 1220–1233.
1039. *Schimmel P. R., Redfield A. G.* Transfer RNA in solution: Selected topics, Annu. Rev. Biophys. Bioeng., **9**, 181–221 (1980).
1040. *Patel D. J.* High resolution NMR studies of the structure and dynamics of tRNA in solution, Annu. Rev. Phys. Chem., **29**, 337–362 (1978).
1041. *Sprinzl M., Gauss D. H.* Compilation of tRNA sequences, Nucl. Acids Res., **10**, r1–r55 (1982).
1042. *Celis J. E.* Collection of mutant tRNA sequences, Nucl. Acids Res., **6**, r21–r27 (1979).
1043. *Kim S.-H., Quigley G. J., Suddath F. L., McPherson A., Sneden D., Kim J. J., Weinzierl J., Rich A.* Three-dimensional structure of yeast phenylalanine transfer RNA: Folding of the polynucleotide chain, Science, **179**, 285–288 (1973).
1044. *Cramer F.* Three-dimensional structure of tRNA, Prog. Nucl. Acis Res. Mol. Biol., **11**, 391–421 (1971).
1045. *Levitt M.* Detailed molecular model for transfer ribonucleic acid, Nature, **224**, 759–763 (1969).
1046. *Sussman J. L., Holbrook S. R., Warrant R. W., Church G. M., Kim S.-H.* Crystal structure of yeast phenylalanune tRNA. I. Crystallographic refinement, J. Mol. Biol., **123**, 607–630 (1978).
1047. *Hingerty B., Brown R. S., Jack A.* Further refinement of the structure of yeast $tRNA^{Phe}$, J. Mol. Biol., **124**, 523–534 (1978).
1048. *Moras D., Comarmond M. B., Fischer J., Weiss R., Thierry J. C., Ebel J. P., Giegé R.* Crystal structure of yeast $tRNA^{Asp}$, Nature, **288**, 669–674 (1980).

1049. *Schevitz R. W., Podjanry A. D., Krishnamachari N., Hughes J. J., Sigler P. B., Sussman J. L.* Crystal structure of a eukaryotic initiator tRNA, Nature, **278,** 188–190 (1979).
1050. *Woo N. H., Roe B. A., Rich A.* Three-dimensional structure of *E. coli* initiator $tRNA^{fMet}$, Nature, **286,** 346–351 (1980).
1051. *Wright H. T., Manor P. C., Beurling K., Karpel R. L., Fresco J.* The structure of baker's yeast $tRNA^{Gly}$: A second tRNA conformation. In: Transfer RNA: Structure, Properties, and Recognition (D. Söll, J. N. Abelson, and P. R. Schimmel, eds.), Cold Spring Harbor Monograph, Series 9A, pp. 145–160, 1979.
1052. *Kim S.-H.* Symmetry recognition hypothesis model for tRNA binding to aminoacyl-tRNA synthetase, Nature, **256,** 679–681 (1975).
1053. *Kim S.-H., Sussman J. L., Suddath F. L., Quigley G. J., McPherson A., Wang A. H. J., Seeman N. C., Rich A.* The general structure of transfer RNA molecules, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **71,** 4970–4974 (1974).
1054. *Klug A., Ladner J., Robertus J. D.* The structural giometry of co-ordinated base change in transfer RNA, J. Mol. Biol., **89,** 511–516 (1974).
1055. *Sundaralingam M.* The structure, conformation, and interaction of tRNA. In: Transfer RNA: Structure, Properties, and Recognition (D. Söll, J. N. Abelson, and R. P. Schimmel, eds.), Cold Spring Harbor Monograph, Series 9A, pp. 115–132 (1979).
1056. *Erdmann V. A., Sprinzl M., Pongs O.* The involvement of 5S RNA in the binding of tRNA to ribosomes, Biochem. Biophys. Res. Commun., **54,** 942–946 (1973).
1056a. *Pace B., Matthews E. A., Johnson K. D., Cantor C. R., Pace N. R.* Conserved 5S rRNA complement to tRNA is not required for protein synthesis, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, **79,** 36–40 (1982).
1057. *Rich A., Quigley G. J., Wang A. H. J.* Conformational flexibility of the polynucleotide chain, In: Stereodynamics of Molecular Systems (R. H. Sarma, ed.), pp. 315–330, Pergamon Press, New York, 1979.
1058. *Stout C. D., Mizuno H., Rubin J., Brennan T., Rao S. T., Sundaralingam.* Atomic coordinates and molecular conformation of yeast phenylalanyl tRNA. An independent investigation, Nucl. Acids Res., **4,** 1111–1123 (1976).
1059. *Kitamura K., Wakahara A., Hakoshima T., Mizuno H., Tomita K.-I.* Classifications of nucleotide conformations observed in yeast phenylalanine tRNA. Application of cluster analysis, Nucl. Acids Res., **5,** s373–s376 (1978).
1060. *Sundaralingam M., Mizuno H., Stout S. D., Rao S. T., Liebman M., Yathindra N.* Mechanism of chain folding on nucleic acids, The (ω', ω) plot and its correlation to the nucleotide geometry in yeast $tRNA^{Phe}$, Nucl. Acids Res., **3,** 2471–2484 (1976).
1061. *Srinivasan A. R., Yathindra N.*, A novel representation of the conformational structure of transfer RNAs. Correlation of the folding patterns of the polynucleotide chain with the base sequence and the nucleotide backbone torsions, Nucl. Acids Res., **4,** 3969–3979 (1977).
1062. *Srinivasan A. R., Olson W. K.* Yeast $tRNA^{Phe}$ conformational wheels: A novel probe of the monoclinic and orthorhombic models, Nucl. Acids Res., **8,** 2307–2329 (1980).
1063. *Perahia D., Pullman B., Vasilescu D., Cornillon R., Broch H.* A molecular orbital investigation of the conformation of transfer RNA, Biochim. Biophys. Acta, **478,** 244–259 (1977).
1064. *Tabor C. W., Tabor H.* 1,4-Diaminobutane(putrescine), spermidine, and spermine, Annu. Rev. Biochem., **45,** 285–306 (1976).
1065. *Sakai T. T., Cohen S. S.* Effects of polyamines on the structure and reactivity of tRNA, Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., **17,** 15–42 (1976).

1066. *Fresco J. R., Adams A., Ascione R., Henley D., Lindahl T.* Tertiary structure in transfer ribonucleic acids, Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol., **31,** 527–537 (1966).
1067. *Stein A., Crothers D. M.* Equilibrium binding of magnesium (II) by *Escherichia coli* $tRNA^{fMet}$, Biochemistry, **15,** 157–160 (1976).
1068. *Bina-Stein M., Stein A.* Allosteric interpretation of Mg^{2+} binding to the denaturable *Escherichia coli* $tRNA_2^{Glu}$. Biochemistry, **15,** 3912–3917 (1976).
1069. *Schreier A. A., Schimmel P. R.* Interaction of manganese with fragments, complementary fragment recombinations, and whole molecules of yeast phenylalanine specific transfer RNA, J. Mol. Biol., **86,** 601–620 (1974).
1070. *Danchin A., Gueron M.* Cooperative binding of manganese (II) to transfer RNA, Eur. J. Biochem., **16,** 532–536 (1970).
1071. *Karpel R. L., Miller N. S., Lesk A. M., Fresco J. R.* Stabilization of the native tertiary structure of yeast $tRNA_3^{Leu}$ by cationic metal complexes, J. Mol. Biol., **97,** 519–532 (1975).
1072. *Jones C., Kearns D.* Investigation of the structure of yeast $tRNA^{Phe}$ by nuclear magnetic resonance: Paramagnetic rare earth ion probes of structure, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, **71,** 4137–4240 (1974).
1073. *Wolfson J., Kearns D.* Europium as a fluorescent probe of transfer RNA structure, Biochemistry, **14,** 1436–1444 (1975).
1074. *Linch D. C., Schimmel P. R.* Cooperative binding of magnesium to transfer ribonucleic acid studied by a fluorescent probe, Biochemistry, **13,** 1841–1852 (1974).
1075. *Rialdi G., Levy J., Biltonen R.* Thermodynamic studies of transfer ribonucleic acids. I. Magnesium binding to yeast phenylalanine transfer ribonucleic acid, Biochemistry, **11,** 2472–2479 (1972).
1076. *Crothers D. M., Cole P. E.* Conformational changes of tRNA. In: Transfer RNA (S. Altman, ed.), pp. 196–247, MIT Press, Cambridge, 1978.
1077. *Jack A., Ladner J. E., Rhodes D., Brown R. S., Klug A.* A crystallographic study of metal-binding to yeast phenylalanine transfer RNA, J. Mol. Biol., **111,** 315–328 (1977).
1078. *Holbrook S. R., Sussman J. L., Warrant R. W., Church G. M., Kim S.-H.* RNA–ligand interactions: (I) Magnesium binding sites in yeast $tRNA^{Phe}$, Nucl. Acids Res., **8,** 2811–2820 (1977).
1079. *Quigley G. J., Teeter M. M., Rich A.* Structural analysis of spermine and magnesium ion binding to yeast phenylalanine transfer RNA, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75,** 64–68 (1978).
1080. *Bolton P. H., Kearns D. R.* Effect of magnesium and polyamines on the structure of yeast $tRNA^{Phe}$, Biochim. Biophys. Acta, **477,** 10–19 (1977).
1081. *Uhlenbeck O. C.* Complementary oligonucleotide binding to transfer RNA, J. Mol. Biol., **65,** 25–41 (1972).
1082. *Eisinger J., Feuer B., Yamane T.* Codon–anticodon binding in $tRNA^{Phe}$, Nature New Biol., **231,** 127–128 (1971).
1083. *Alden C. J., Arnott S.* Nucleotide conformations in codon–anticodon interactions, Biochem, Biophys. Res. Commun., **53,** 806–811 (1973).
1084. *Prinz H., Maelicke A., Cramer F.* Unfolding of yeast transfer ribonucleic acid species caused by addition of organic solvents and studied by circular dichroism, Biochemistry, **13,** 1322–1326 (1974).
1085. *Wright H. T.* A new mechanism for the hydrolytic editing function of aminoacyl-tRNA synthetases, kinetic specificity for the tRNA substrate, FEBS Lett., **118,** 165–171 (1980).

1086. *Gale E.F., Cundliffe F., Reynolds P.E., Richmond M.H., Waring M.J.* The Molecular Basis of Antibiotic Action, Wiley, London, 1972.
1087. *Corcoran J.W., Hahn F.E.* (eds.) (1974). Antibiotics, III. Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumour Agents, Springer-Verlag, Berlin, 1974.
1088. *Hartmann G., Behr W., Beissner K.-A., Honikel H., Sippel A.* Antibiotics as inhibitors of nucleic acid and protein biosynthesis, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., **7**, 693–701 (1968).
1089. *Waring M.J.* DNA modification and cancer, Annu. Rev. Biochem., **50**, 159–192 (1981).
1090. *Berman H.M., Young P.R.* The interaction of intercalating drugs with nucleic acids, Annu. Rev. Biophys. Bioeng., **10**, 87–114 (1981).
1091. *Heidelberger C.* Chemical mutagenesis, Annu. Rev. Biochem., **44**, 78–121 (1975).
1092. *Lerman L.S.* Structural considerations in the interaction of DNA and acridines, J. Mol. Biol., **3**, 18–30 (1961).
1093. *Fuller W., Waring M.* A molecular model for the interaction of ethidium bromide with deoxyribonucleic acid, Ber. Bunsenges. Phys. Chem., **68**, 805–809 (1964).
1094. *Neville D.M., Davies D.R.* The interaction of acridine dyes with DNA: An X-ray diffraction and optical investigation, J. Mol. Biol., **17**, 57–74 (1966).
1095. *Porumb H.* The solution spectroscopy of drugs and the drug–nucleic acid interactions, Prog. Biophys. Mol. Biol., **34**, 175–195 (1978).
1096. *Li H.J., Crothers D.M.* Relaxation studies of the proflavine–DNA complex: the kinetics of an intercalation reaction, J. Mol. Biol., **39**, 461–477 71969).
1097. *Wakelin L.P.G., Waring M.J.* Kinetics of drug–DNA interaction. Dependence of the binding mechanism on structure of the ligand. J. Mol. Biol., **144**, 183–214 (1980).
1098. *Cairns J.* The application of autoradiography to the study of DNA viruses, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **27**, 311–318 (1962).
1099. *Bond P.J., Langridge R., Jennette K.W., Lippard S.J.* X-Ray fiber diffraction evidence for the neighbor exlusion binding of a platinum metallointercalation reagent to DNA, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, **72**, 4825–4829 (1975).
1100. *Arnott S., Bond P.J., Chandrasekaran R.* Visualization of an unwound DNA duplex, Nature, **287**, 561–563 (1980).
1101. *Waring M.J., Wakelin L.P.G.* Echinomycin: A bifunctional intercalating antibiotic, Nature, **252**, 653–657 (1974).
1102. *Vismamitra M.A., Kennard O., Cruse W.B.T., Egert E., Sheldric G.M., Jones P.G., Waring M.J., Wakelin L.P.G., Olsen R.K.* Structure of TANDEM and its implication for bifunctional intercalation into DNA, Nature, **289**, 817–819 (1981).
1103. *Waring M.J.* Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs: evidence of molecular models involving intercalation, J. Mol. Biol., **54**, 247–279 (1970).
1104. *Neidle S.* The molecular basis for the action of some DNA-binding drugs, Prog. Medic. Chem., **16**, 151–221 (1979).
1105. *Sobell H.M.* Structural and dynamic aspects of drug intercalation into DNA and RNA. In: R.H. Sarma, ed., Nucleic Acid Geometry and Dynamics, pp. 289–323, Pergamon Press, New York, 1980.
1106. *Sobell H.M.* The stereochemistry of actinomycin binding to DNA and its implications in molecular biology, Prog. Nucl. Acid Res. Mol., Biol., **13**, 153–190 (1973).
1107. *Shieh H.S., Berman H.M., Dabrow M., Neidle S.* The structure of drug-

deoxydinucleoside phosphate complex. Generalized conformational behavior of intercalation complexes with RNA and DNA fragments, Nucl. Acids Res., **8**, 85–97 (1980).

1108. *Neidle S., Taylor G., Sanderson M.* A 1:2 crystalline complex of ApA::proflavine: A model for binding to single-stranded regions in RNA, Nucl. Acids Res., **5**, 4417–4422 (1978).

1109. *Westhof E., Sundaralingam M.* X-ray structure of a cytidylyl-3',5'-adenosine-proflavine complex: A self-paired parallelchain double helical dimer with an intercalated acridine, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, **7**, 1852–1856 (1980).

1110. *Seeman N.C., Day R.O., Rich A.* Nucleic acid–mutagen interactions: Crystal structure of adenylyl-3',5'-uridine plus 9-aminoacridine, Nature, **253**, 324–326 (1975).

1111. *Krugh T.R., Reinhardt C.G.* Evidence for sequence preferences in the intercalative binding of ethidium bromide to dinucleoside monophosphates, J. Mol. Biol., **97**, 133–162 (1975).

1112. *Patel D.J., Canuel L.L.* Ethidium bromide·(dC—dG—dC—dG)$_2$ complex in solution: Intercalation and sequence specificity of drug binding at the tetranucleotide duplex level, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **73**, 3343–3347 (1976).

1113. *Patel D.J.* Mutagen–nucleic acid complexes at the polynucleotide duplex level in solution: Intercalation of proflavine into poly d(A–T) and the melting transition of the complex, Biopolymers, **16**, 2739–2754 (1977).

1114. *Ornstein R.L., Rein R.* Energetics of intercalation specificity. I. Backbone unwinding, Biopolymers, **18**, 1277–1291 (1979).

1115. *Nuss M.E., Marsh F.J., Kollman P.A.* Theoretical studies of drug-dinucleotide interactions. Empirical energy function calculations on the interaction of ethidium, 9-aminoacridine, and proflavine cations with the base-paired dinucleotides GpC and CpG, J. Amer. Chem. Soc., **101**, 825–833 (1979).

1116. *Miller K.J., Pycior J.F.* Interaction of molecules with nucleic acids. II. Two pairs of families of intercalation sites, unwinding angles, and the neighbor-exclusion principle, Biopolymers, **18**, 2683–2719 (1979).

1117. *Broyde S., Hingerty B.* Conformational origin of the pyrimidine-(3',5')-purine base sequence preference for intercalation into RNAs, Biopolymers, **18**, 2905–2910 (1971).

1118. *Dean P.M., Wakelin L.P.G.* Electrostatic components of drugreceptor recognition. I. Structural and sequence analogues of DNA polynucleotides, Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, **209**, 453–471 (1980).

1118a. *Miller K.J., Brodzinsky R., Hall S.* Interactions of molecules with nucleic acids. IV. Binding energies and conformations of acridine and phenanthridine compounds in the two principal and in several unconstrained dimer-duplex intercalation sites, Biopolymers, **19**, 2091–2122 (1980).

1119. *Tsai C.-C., Jain S.C., Sobell H.M.* Visualization of drug-nucleic acid interactions at atomic resolution. I. Structure of an ethidium/dinucleoside monophosphate crystalline complex, ethidium: 5-iodouridylyl(3',5')adenosine, J. Mol. Biol., **114**, 301–305 (1977).

1120. *Berman H.M., Stallings W., Carrell H.L., Glusker J.P., Neidle S., Taylor G., Achari A.* Molecular and crystal structure of an intercalation complex: Proflavine–cytidylyl-(3',5')-guanosine, Biopolymers, **18**, 2405–2429 (1979).

1121. *Berman H.M., Neidle S.* Modelling of drug–nucleic acid interactions. Intercalation geometry of oligonucleotides. In: Stereodynamics of Molecular Systems (R.H. Sarma, ed.), pp. 367–382, Pergamon Press, New York, 1979.

1122. *Berman H. M., Neidle S., Stodola R. K.* Drug–nucleic acid interactions: Conformational flexibility at the intercalation site, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, **75**, 828–832 (1978).
1123. *Quigley G. J., Wang A. H.-J., Ughetto G., Marel G van der., Bloom J. H. van, Rich A.* Molecular structure of an anti-cancer drug–DNA complex: Daunomycin plus d(CpGpTpApCpG), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **77**, 7204–7208 (1980).
1124. *Gabbay E. J., Grier D., Fingerle R. E., Reimer R., Levy R., Pearce S. W., Wilson W. D.* Interaction specificity of the anthracyclines with deoxyribonucleic acid, Biochemistry, **15**, 2062–2070 (1976).
1125. *Nuss M. E., James T. L., Apple M. A., Kollman P. A.* An NMR study of the interaction of daunomycin with dinucleotides and dinucleoside phosphates, Biochem. Biophys. Acta, **609**, 136–147 (1980).
1126. *Phillips D. R., Roberts G. C. K.* Proton nuclear magnetic resonance study of the self-complementary hexanucleotide $d(pTpA)_3$ and its interaction with daunomycin, Biochemistry, **19**, 4795–4801 (1980).
1127. *Henry D. W.* Structure-activity relationships among daunorubicin and adriamycin analogs, Cancer Treat. Rep., **63**, 845–854 (1979).
1128. *Zunino F., Di Marco A., Zaccara A.* Molecular structural effects involved in the interaction of antracyclines with DNA, Chem.-Biol. Interact., **24**, 217–225 (1979).
1129. *Wang J. C.* The degree of unwinding of the DNA helix by ethidium I. Titration of twisted PM2 DNA molecules in alkaline cesium chloride density gradients, J. Mol. Biol., **89**, 783–801 (1974).
1130. *Alden C. J., Arnott S.* Stereochemical model for proflavine intercalation in A-DNA, Nucl. Acids Res., **4**, 3855–3861 (1977).
1131. *Alden C. J., Arnott S.* Visualization of planar drug intercalation in B-DNA, Nucl. Acids Res., **2**, 1701–1717 (1975).
1132. *Reddy B. S., Seshadri T. P., Sakore T. D., Sobell H. M.* Visualization of drug–nucleic acid interactions at atomic resolution. V. Structures of two aminoacridine-dinucleoside monophosphate crystalline complexes, proflavine-5-iodocytidylyl(3'-5')guanosine and acridine orange–5-iodocytidylyl(3'-5')-guanosine, J. Mol. Biol., **135**, 787–812 (1979).
1133. *Patel D. J.* Peptide antibiotic–oligonucleotide interactions. Nuclear magnetic resonance investigations of complex formation between actinomycin D and d-ApTpGpCpApT in aqueous solution, Biochemistry, **13**, 2396–2402 (1974).
1134. *Crothers D. M., Dattagupta N., Hogan M.* DNA structure and its distortion by drugs. In: Stereodynamics of Molecular Systems (R. H. Sarma, ed.), pp. 383–395, Pergamon Press, New York, 1979.
1135. *Hogan M., Dattagupta N., Crothers D. M.* Transmission of allosteric effects in DNA, Nature, **278**, 521–524 (1979).
1136. *Sobell H. M.* How actinomycin binds to DNA, Sci. Amer., **231**(2), 82–91 (1974).
1137. *Müller W., Crothers D. M.* Studies of the binding of actinomycin and related compounds to DNA, J. Mol. Biol., **35**, 251–290 (1968).
1138. *Jain S. C., Sobell H. M.* Stereochemistry of actinomycin binding to DNA. I. Refinement and further structural details of the actinomycin–deoxyguanosine crystalline complex, J. Mol. Biol., **68**, 1–20 (1972).
1139. *Sobell H. M., Jain S. C.* Stereochemistry of actinomycin binding to DNA. II. Detailed molecular model of actinomycin–DNA complex and its implications, J. Mol. Biol., **68**, 21–34 (1972).
1140. *Sibell H. M.* Symmetry in protein–nucleic acid interaction and its genetic implications, Adv. Genet., **17**, 411–490 (1973).

1141. *Wang A. H.-J., Nathans J., van der Marel G.,* van Boom J. H., *Rich A.* Molecular structure of a double helical DNA fragment intercalator complex between deoxy CpG and a terpyridine platinum compound, Nature, **276**, 471–474 (1978).
1142. *Wang A. H.-J., Quigley G. J., Rich A.* Atomic resolution analysis of a 2:1 complex of CpG and acridine orange, Nucl. Acids Res., **6**, 3879–3890 (1979).
1143. *Jain S. C., Tsai C.-C., Sobell H. M.* Visualization of drug–nucleic acid interactions at atomic resolution. II. Structure of an ethidium/dinucleoside monophosphate crystalline complex, ethidium: 5-iodocytidylyl(3′-5′)guanosine, J. Mol. Biol., **114**, 317–331 (1977).
1144. *Sakore T. D., Reddy B. S., Sobell H. M.* Visualization of drug–nucleic acid interaction at atomic resolution. IV. Structure of an amino-acridine–dinucleoside monophosphate crystalline complex, 9-aminoacridine: 5-iodocytidylyl(3′-5′)guanosine, J. Mol. Biol., **135**, 763–785 (1979).
1145. *Jain S. C., Bhandary K. K., Sobell H. M.* Visualization of drug–nucleic acid interactions at atomic resolution. VI. Structure of two drug–dinucleoside monophosphate crystalline complexes, ellipticine–5-iodo-cytidylyl(3′-5′)-guanosine and 3,5,6,8-tetramethyl-N-methyl phenanthrolinium–5-iodocytidylyl(3′-5′)guanosine, J. Mol. Biol., **135**, 813–840 (1979).
1146. *Kuntz I. D., Jr., Kauzmann W.* Hydration of proteins and polypeptides, Adv. Protein Chem., **28**, 239–345 (1974).
1147. *Tanford C.* Protein denaturation, Adv. Protein. Chem., **23**, 121–282 (1968).
1148. *Hopfinger A. J.* Intermolecular Interactions and Biomolecular Organization, pp. 159–169, Wiley, New York, 1977.
1149. *Texter J.* Nucleic acid–water interactions, Prog. Biophys. Mol. Biol., **33**, 83–97 (1978).
1150. *Hanlon S., Brudno S., Wolf B.* Structural transitions of deoxyribonucleic acid in aqueous electrolyte solutions. I. Reference spectra of conformational limits, Biochemistry, **14**, 1648–1660 (1975).
1151. *Wolf B., Hanlon S.* Structural transitions of deoxyribonucleic acid in aqueous electrolyte solutions, II. The role of hydration, Biochemistry, **14**, 1661–1670 (1975).
1152. *Cohen G., Eisenberg H.* Deoxyribonucleate solutions: Sedimentation in a density gradient, partial specific volumes, density and refractive index measurements, and preferential interactions, Biopolymers, **6**, 1077–1100 (1968).
1153. *Hearst J. E., Vinograd J.* The net hydration of deoxyribonucleic acid, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, **47**, 825–830 (1961).
1154. *Tunis M.-J. B., Hearst J. E.* On the hydration of DNA. I. Preferential hydration and stability of DNA in concentrated trifluoracetate solution, Biopolymers, **6**, 1325–1344 (1968).
1155. *Tunis M.-J. B., Hearst J. E.* On the hydration of DNA. II. Base composition dependence of the net hydration of DNA, Biopolymers, **6**, 1345–1353 (1968).
1156. *Hearst J. E.* Determination of the dominant factors which infulence the net hydration of native sodium deoxyribonucleate, Biopolymers, **3**, 57–68 (1965).
1157. *Falk M., Hartman K. A., Jr., Lord R. C.* Hydration of deoxyribonucleic acid. I. A gravimetric study, J. Amer. Chem. Soc., **84**, 3843–3846 (1962).
1158. *Falk M., Hartman K. A., Jr., Lord R. C.* Hydration of deoxyribonucleic acid. II. An infrared study. J. Amer. Chem. Soc., **85**, 387–391.
1159. *Falk M., Hartman K. A., Jr., Lord R. C.* Hydration of deoxyribonucleic acid. III. A spectroscopic study of the effect of hydration on the structure of deoxyribonucleic acid. J. Amer. Chem. Soc., **85**, 391–394 (1963).

1160. *Falk M., Poole A. G., Goymour C. G.* Infrared study of the state of water in the hydration shell of DNA, Can. J. Chem., **48**, 1536–1542 (1970).
1161. *North A. C. T., Rich A.* X-Ray diffraction studies of bacterial viruses, Nature, **191**, 1242–1245 (1961).
1162. *Tunis-Schneider M.-J. B., Maestre M. F.* Circular dichroism spectra of oriented and unoriented deoxyribonucleic acid films–A preliminary study, J. Mol. Biol., **52**, 521–541 (1970).
1163. *Bram S.* The secondary structure of DNA in solution and in nucleohistone, J. Mol. Biol., **58**, 277–288 (1971).
1164. *Suwalsky M., Traub W.* A comparative X-ray study of a nucleoprotamine and DNA complexes with polylysine and polyarginine, Biopolymers, **11**, 2223–2231 (1972).
1165. *Minyat E. E., Ivanov V. I., Kritzyn A. M., Minchenkova L. E., Schylokina A. K.* Spermine and spermidine-induced B to A transition of DNA in solution, J. Mol. Biol., **128**, 397–409 (1978).
1166. *Huse Y., Mitsui Y., Iitaka Y., Miyaki K.* Preliminary X-ray studies of the interaction of salmon sperm DNA with spermine, J. Mol. Biol., **122**, 43–53 (1978).
1167. *Liquori A. M., Constantino L., Crescenzi V., Elia V., Giglio E., Puliti R., De Santis Savino M., Vitagliamo V.* Complexes between DNA and polymines: A molecular model, J. Mol. Biol., **24**, 113–122 (1967).
1168. *Drew H. R., Dickerson R. E.* Structure of a DNA dodecamer. III. Geometry of hydration, J. Mol. Biol., **151**, 535–556 (1981).
1169. *Lee B., Richards F. M.* The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility, J. Mol. Biol., **55**, 379–400 (1971).
1170. *Chothia C.* Structural invariants in protein folding, Nature, **254**, 304–308 (1975).
1171. *Thiyagarajan P., Ponnuswamy P. K.* Solvent accessibility study on $tRNA^{Phe}$, Biopolymers, **18**, 2233–2247 (1979).
1172. *Alden C. J., Kim S.-H.* Solvent-accessible surfaces of nucleic acids, J. Mol. Biol., **132**, 411–434 (1979).
1173. *Goldblum A., Perahia D., Pullman A.* Hydration scheme of the complementary base-pairs of DNA, FEBS Lett., **91**, 213–215 (1978).
1174. *Pullman B.* Molecular orbital approach to hydration studies of nucleic acids and proteins. In: Structure and Conformation of Nucleic Acids and Protein–Nucleic Acid Interactions (M. Sundaralingam and S. T. Rao, eds.), pp. 457–484, Univ. Park Press, Baltimore, 1975.
1175. *Perahia D., Jhon M. S., Pullman B.* Theoretical study of the hydration of B-DNA, Biochim. Biophys. Acta, **474**, 349–362 (1977).
1176. *Kim K., Jhon S.* Theoretical study of hydration of RNA, Biochim. Biophys. Acta, **565**, 131–147 (1979).
1177. *Clemehti E., Corongiu G.* Interaction of water with DNA single helix in the A conformation, Biopolymers, **18**, 2431–2450 (1979).
1178. *Clementi E., Corongiu G.* A theoretical study on the water structure for nucleic acids bases and base pairs in solution at T = 300 K, J. Chem. Phys., **72**, 3979–3992 (1980).
1179. *Clementi E., Corongiu G.* Interaction of water with DNA single and double helix in the A and B conformation, Gazz. Chim. Ital., **109**, 201–205 (1979).
1180. *Gorongiu G., Clementi E.* Simulations of the solvent structure for macromolecules. I. Solvation of B-DNA double helix at T = 300 K, Biopolymers, **20**, 551–571 (1981).
1181. *Jacobson B.* On the interpretation of dielectric constants of aqueous

macromolecular solutions. Hydration of macromolecules, J. Amer. Chem. Soc., **77**, 2919–2926 (1955).
1182. *Klotz I. M.* Rtle of water structure in macromolecules, Fed. Proc., **24**, S-24–s-33 (1965).
1183. *Jeffrey G. A.* Water structure in organic hydrates, Acc. Chem. Res., **2**, 344–352 (1969).
1183a. *Kopka M. L., Fratini A. V., Drew H. R., Dickerson R. E.* Ordered water structure around a B-DNA dodecamer, A quantitative study, J. Mol. Biol., **163**, 129–146 (1982).
1184. *Neidle S., Berman H. M., Shieh H. S.* Highly structured water network in crystals of a deoxynucleoside–drug complex, Nature, **288**, 129–133 (1980).
1185. *Saenger W.* Circular hydrogen bonds, Nature, **279**, 343–344 (1979).
1186. *Saenger W., Lindner K.* OH clusters with homodromic circular arrangement of hydrogen bonds, Angew, Chem. Int. Ed. Engl., **19**, 398–399 (1979).
1187. *Lesyng B., Saenger W.* Theoretical investigations on circular and chain-like hydrogen bonded structures found in two crystal forms of α-cyclodextrin hexahydrate, Biochim. Biophys. Acta, **678**, 408–413 (1981).
1188. *Saenger W., Betzel Ch., Hingerty B., Brown G. M.* Filp-flop O—H···H—O hydrogen bonds in partially disordered systems, Nature, **296**, 581–583 (1982).
1189. *Young T.-S., Kim S.-H., Modrich P., Beth A., Jay E.* Preliminary X-ray diffraction studies of EcoRI restriction endonuclease–DNA complex, J. Mol. Biol., **145**, 607–610 (1981).
1190. *McPherson A., Jurnak F., Wang A., Kolpak F., Rich A.* The structure of a DNA unwinding protein and its complexes with oligodeoxynucleotides by X-ray diffraction, Biophys. J., **32**, 155–173 (1980).
1190a. *Brayer G. D., McPherson A.* Refined structure of the gene 5 DNA binding protein from bacteriophage fd, J. Mol. Biol., submited for publication, 1983.
1191. *Giegé R., Lorber B., Ebel J.-P., Moras D., Thierry J.-C.* Cristallisation du complexe formé entre l'aspartate–tRNA de levure et son aminoacyl-tRNA synthétase spécifique, Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, Ser. D, **291**, 393–396 (1980).
1192. *Hippel P. H. von, McGhee J. D.* DNA–protein interactions, Annu. Rev. Biochem., **41**, 231–300 (1972).
1193. *Sundaralingam M., Rao S. T.* (eds). Structure and Conformation of Nucleic Acids and Protein–Nucleic Acid Interactions, Univ. Park Press, Baltimore, 1975.
1194. *Vogel H. J.* (ed.). Nucleic Acid–Protein Recognition, Academic Press, New York, 1977.
1195. *Hélène C., Maurizot J.-C.* Interactions of oligopeptides with nucleic acids, CRC Crit. Rev. Biochem., **10**, 213–258 (1981).
1196. *Lancelot G., Mayer R., Hélène C.* Conformational study of the dipeptide arginy-lglutamic acid and of its complex with nucleic bases, J. Amer. Chem. Soc., **101**, 1569–1576 (1979).
1197. *Брусков В. И., Бушуев В. Н.* Исследование методом протонного магнитного резонанса комплексообразования между нуклеозидами и соединениями, моделирующими аминокислотные остатки белков, в диметилсульфоксиде. Биофизика, 1977, **22**, 26–31.
1197a. *Lancelot G., Mayer R.* The specific interaction of guanine with carboxylate ions in water, FEBS Lett., **130**, 7–11 (1981).
1198. *Bruskov V.* Specificity of interaction of nucleic acid bases with hydrogen bond forming amino acids, Stud. Biophys. (Berlin), **67**, S. 43–44 and microfiche 2/27–34 (1978).

1199. *Lancelot G., Hélène C.* Selective recognition of nucleic acids by proteins: The specificity of guanine interaction with carboxylic acids, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **74**, 4872–4875 (1977).
1200. *Sellini H., Maurizot J.-C., Dimicoli J. L., Hélène C.* Hydrogen bonding of amino acid side chains to nucleic acid bases, FEBS Lett., **30**, 219–224 (1973).
1201. *Lancelot G.* Hydrogen bonding of adenine derivatives to tyrosine side chains, Biophys. J., **17**, 243–254 (1977).
1202. *Gresh N., Pullman B.* A theoretical study of the interaction of guanine and cytosine with specific amino acid side chains, Biochim. Biophys. Acta, **608**, 47–53 (1980).
1203. *Брусков В. И.* Об узнавании оснований нуклеиновых кислот аминокислотами и пептидами с помощью водородных связей. Молек. биол., 1975, **9**, 34–39.
1204. *Seeman N. C., Rosenberg J. M., Rich A.* Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **73**, 804–808 (1976).
1205. *Rich A., Seeman N. C., Rosenberg J. M.* Protein recognition of base-pairs in a double helix. In: Nucleic Acid–Protein Recognition (H. J. Vogel, ed.), pp. 361–374, Academic Press, New York, 1977.
1206. *Rein R., Garduno R., Egan J. T., Columbano S., Coeckelenbergh Y., Macelroy R. D.* Elements of a DNA–polypeptide recongition code: Electrostatic potential around the double helix, and a stereospecific model for purine recognition, Biosystems, **9**, 131–137 (1977).
1207. *Chothia C.* Conformation of twisted β-pleated sheets in proteins, J. Mol. Biol., **75**, 295–302 (1973).
1208. *Church G. M., Sussman J. L., Kim S.-H.* Secondary structural complementarity between DNA and proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 1458–1462 (1977).
1209. *Chou P. J., Adler A. J., Fasman G. D.* Conformational prediction and circular dichroism studies on the *lac* repressor, J. Mol. Biol., **96**, 29–45 (1975).
1209a. *Ribeiro A. A., Wemmer D., Bray R. P., Jardetsky O.* A folded structure for the lac-repressor headpiece, Biochem Biophys. Res. Commun., **99**, 668-674 (1981).
1210. *Gursky G. V., Tumanyan V. G., Zasedatelev A. S., Zhuse A. L., Grokhovsky S. L., Gottikh B. R.* A code controlling specific binding of proteins to double-helical DNA and RNA, In: Nucleic Acid-Protein Recognition (H. J. Vogel, ed.), pp. 189–217, Academic Press, New York, 1977.
1211. *Sobell H. M.* Symmetry in nucleic acid structure and its role in protein–nucleic acid interactions, Annu. Rev. Biophys. Bioeng., **5**, 307–335 (1976).
1212. *Tamura C., Yoshikama M., Sato S., Hata T.* Crystal structure of cytidine-salicylic acid complex, Chem. Lett. (Japan), 1221–1224, 1973.
1213. *Hata T., Yoshikawa M., Sato S., Tamura C.* 1 : 1 Cytidine–N-carbobenzoxyglutamic acid dihydrate, Acta Crystallogr., B, **31**, 312–314 (1975).
1214. *Ohki M., Takenaka A., Shimanouchi H., Sasada Y.* Complexes between nucleotide base and amino acid. IV. Crystal and molecular structure of cytosine: N,N,-Phthaloyl-DL-glutamic acid complex dihydrate, Bull. Chem. Soc. Japan, **53**, 2724–2730 (1980).
1215. *Ohki M., Takenaka A., Shimanouchi H., Sasada Y.* Complexes between nucleotide base and amino acid. II. Crystal structure of 5-bromocytosine: N-tosyl-L-glutamic acid, Bull. Chem. Soc. Japan, **49**, 3493–3497 (1976).
1216. *Ohki M., Takenaka A., Shimanouchi H., Sasada Y.* Complexes between nucleotide base and amino acid. III. Crystal structure of 5-bromocytosine: phthaloyl-DL-glutamic acid complex hemihydrate, Bull. Chem. Soc. Japan, **50**, 90–96 (1977).

1217. *Suck D., Saenger W., Rohde W.* X-Ray structure of thymidine–5′-carboxylic acid, an inhibitor of thymidine and thymidylate kinase: Preferred nucleobase–carboxylic acid hydrogen bonding scheme, Biochim. Biophys. Acta, **361**, 1–10 (1974).

1218. *Narayanan P., Berman H.M., Rousseau R.* Model compounds for protein nucleic acid interactions: 3. Synthesis and structure of a nucleoside dipeptide, N-(9-β-D-ribofuranosylpurin-6-yl) glycyl-L-alanine sesquihydrate, J. Amer. Chem. Soc., **98**, 8472–8475 (1976).

1219. *Kaneda T., Tanaka J.* The crystal structure of the intermolecular complex between 9-ethyladenine and indole, Bull. Chem. Soc. Japan, **49**, 1799–1804 (1976).

1220. *Ohki M., Takenaka A., Shimanouchi H., Sasada Y.* 3-(9-Adenyl) propionyltryptamine monohydrate, Acta Crystallogr., B, **33**, 2954–2956 (1977).

1221. *Ohki M., Takenaka A., Shimanouchi H., Sasada Y.* Crystal and molecular structure of 3-(adenin-9-yl)propiontryptamide, Bull. Chem. Soc. Japan., **50**, 2573–2578 (1977).

1222. *Morita F.* Molecular complex of tryptophan with ATP or its analogs, Biochim, Biophys. Acta, **343**, 674–681 (1974).

1223. *Herriott J.R., Camerman A., Deranleau D.D.* Crystal structure of 1-(2-indol-3-ylethyl)-3-carbamidepyridinium chloride, an intramolecular model of the nicotinamide adenine dinucleotide-tryptophan charge-transfer complex, J. Amer. Chem. Soc., **96**, 1585–1589 (1974).

1224. *Ishida T., Inoue M.* An X-ray evidence for the charge-transfer interaction between adenine and indole rings: Crystal structure of 1,9-dimethyladenine–indole-3-acetic acid trihydrate complex, Biochem. Biophys. Res. Commun., **99**, 149–154 (1981).

1225. *Ash R.P., Herriot J.R., Deranleau D.D.* Crystal structure of the ion pair 1-methyl-3-carbamidopyridinium N-acetyl-L-tryptophanate, a model for 1-substituted nicotinamide–protein charge-transfer complexes, J. Amer. Chem. Soc., **99**, 4471–4475 (1977).

1226. *Inoue M., Shibata M., Ishida T.* X-Ray crystal structure of 7,8-dimethylisoalloxazine-10-acetic acid: tyramine (1 : 1) tetrahydrate complex. A model for flavin coenzyme–tyrosine residue charge transfer complexes in flavoproteins, Biochem. Biophys. Res. Commun., **93**, 415–419 (1980).

1227. *Ishida T., Inoue M., Fujiwara T., Tomita K-I.* X-Ray crystal structure of the 7,8-dimethylisoalloxazine-10-acetic acid–tryptamine complex. A model for flavin–indole charge-transfer complexes, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 358–360, 1979.

1228. *Ishida T., Tomita K.-I., Inoue M.* An X-ray study on the interaction between indole ring and pyridine coenzymes: Crystal structure of 1-methyl-3-carbamoylpyridinium: indole-3-acetic acid (1 : 1) monohydrate charge-transfer complex, Arch. Biochem. Biophys., **200**, 492–502 (1980).

1229. *Slifkin M.A.* Charge transfer interactions of purines and pyrimidines. In: Physico-Chemical Properties of Nucleic Acids (J. Duchesne, ed.), pp. 67–98, Academic Press, New York, 1973.

1230. *Berman H.M., Hamilton W.C., Rousseau R.J.* Crystal structure of an antiviral agent, 5-[N-(L-phenylalaynyl)amino]uridine, Biochemistry, **12**, 1809–1814 (1973).

1230a. *Takimoto M., Takenaka A., Sasada Y.* Elementary patterns in protein–nucleic acid interaction. II. Crystal structure of 3-(adenin-9-yl)propionamide, Bull. Chem. Soc. Japan, **54**, 16 1635–1639 (1981).

1231. *Ohki M., Takenaka A., Shimanouchi H., Sasada Y.* 3-(9-Adenyl) propionyltyramine dihydrate, Acta Crystallogr., B, **33**, 2956–2958 (1977).
1232. *Narayanan P., Berman H. M.* Model compounds for protein nucleic acid interactions. IV. Crystal structure of a nucleoside peptide with anti-viral poperties: 5-[N-(L-leucil)amino]uridine. Acta Crystallogr., B, **33**, 2047–2051 (1977).
1233. *Furberg S., Solbakk J.* On the stereochemistry of the interaction between nucleic acids and basic protein side chains, Acta Chem. Scand., B, **28**, 481–483 (1974).
1234. *Woo N. H., Seeman N. C., Rich A.* Crystal structure of putrescine diphosphate: A model system for amine–nucleic acid interactions, Biopolymers, **18**, 539—552 (1979).
1235. *Saenger W., Wagner K. G.* An X-ray study of the hydrogen bonding in the crystalline L-arginine phosphate monohydrate complex, Acta Crystallogr., B, **28**, 2237–2244 (1972).
1236. *Leng M., Felsenfeld G.* The preferential interactions of polylysine and polyarginine with specific base sequences in DNA, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 56, 1325–1332 (1966).
1237. *Subirana J. A., Chiva M., Mayer R.* X-Ray diffraction studies of complexes of DNA with lysine and with lysine-containing peptides. In: Biomolecular Structure, Conformation. Function and Evolution, I (R. Srinivasan, N. Yathindra, and E. Subramanian, eds.), pp. 431–440, Pergamon Press, New York, 1980.
1238. *Suau P., Subirana J. A.* X-Ray diffraction studies of nucleoprotamine structure, J. Mol. Biol., **117**, 909–926 (1977).
1239. *Tsuboi M.* Helical complexes of poly-L-lysine and nucleic acids. In: Conformation of Biopolymers (G. H. Ramachandran, ed.), Vol. II, pp. 689–702, Academic Press, New York, 1967.
1240. *Campos J. L., Subirana J. A., Ayami J., Mayer R., Giralt E., Pedroso E.* The conformational versatility of DNA in the presense of basic peptides, Stud. Biophys., **81**, 3–14 (1980).
1241. *Prescott B., Chou C. H., Thomas G. J., Jr.*, A Raman spectroscopic study of complexes of polylysine with deoxiribonucleic acid and polyriboadenylic acid, J. Phys. Chem., **80**, 1164–1171 (1976).
1242. *Haynes M., Garrett R. A., Gratzer W. B.* Structure of nucleic acid–poly base complexes, Biochemistry, **22**, 4410–4416 (1970).
1243. *Feughelman M., Langridge R., Seeds W. E., Stokes A. R., Wilson H. R., Hooper C. W., Wilkins M. H. F., Barclay R. K., Hamilton L. D.* Molecular structure of deoxyribose nucleic acid and protein, Nature, **175**, 834–838 (1955).
1244. *Wilkins M. H. F.* Physical studies of the molecular structure of deoxyribose nucleic acid and nucleoprotein, Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol., **21**, 75–90 (1956).
1245. *Liquier J., Pinot-Lafaix M., Taillandier E., Brahms J.* Infrared linear dichroism investigations of deoxiribonucleic acid complexes with poly(L-arginine) and poly(L-lysine),Biochemistry, **14**, 4191–4197 (1975).
1246. *Ong E. C., Snell C., Fasman G. D.*, Chromatin models. The ionic strength dependence of model hystone–DNA interactions: Circular dichroism studies of lysine–leucine polypeptide–DNA complexes, Biochemistry, **15**, 468–486 (1976).
1247. *Zimmer Ch., Burckhardt G., Luck G.* Similarity of the conformational changes of DNA in the complex with poly-L-histidine and in the presence of polyethylenglycol, Stud. Biophys., **40**, 57–62 (1973).
1248. *Standke K.-H., Brunnert H.* The estimation of affinity constants for the binding of model peptides to DNA by equilibrium dialysis, Nucl. Acids Res., **2**, 1839–1849 (1975).

1249 *Brown P. E.* The interaction of basic dipeptide methyl esters with DNA, Biochim. Biophys. Acta, **213**, 282–287 (1970).
1250. *Durand M., Maurizot J.-C., Borazan H. N., Hélène C.* Interaction of aromatic residues of proteins with nucleic acids. Cicrular dichroism studies of the binding of oligopeptides to poly(adenylic acid), Biochemistry, **14**, 563-570 (1975).
1251. *Gabbay E. J., Sanford K., Baxter C. S., Kapicak L.* Specific interaction of peptides with nucleic acids, Evidence for a "selective bookmark" recognition hypothesis, Biochemistry, **12**, 4021–4029 (1973).
1251a. *Pörschke D., Ronnenberg J.* The reaction of aromatic peptides with double helical DNA. Quantitative characterization of a two-step reaction scheme, Biophys. Chem., **13**, 283–290 (1981).
1252. *Warrant R. W., Kim S.-H.* α-Helix–double helix interaction shown in the structure of a protamine-transfer RNA complex and a nucleoprotamine model, Nature, **271**, 130–135 (1978).
1253. *Inoue S., Fuke M.* An electron microscope study of deoxyribonucleoprotamines, Biochim. Biophys. Acta, **204**, (1970).
1254. *Bazett-Jones D. P., Ottensmeyer F. P.* A model for the structure of nucleoprotamine, J. Ultrastruct. Res., **67**, 255–266 (1979).
1255. *Chandrasekhar K., McPherson A., Jr., Adams M. J., Rossman M. G.* Conformation of coenzyme fragments when bound to lactate dehydrogenase, J. Mol. Biol., **76**, 503–518 (1973).
1256. *Moras D., Olsen K. W., Sabesan M. N., Buehner M., Ford G. C., Rossman M. G.* Studies of aymmetry in the three-dimensional structure of lobster D-glyceraldehyde–3-phosphate dehoydrogenase, J. Biol. Chem., **250**, 9137–9162 (1975).
1257. *Webb L. E., Hill E. J., Banaszak L. J.* Conformation of nicotinamide adenine dinucleotide bound to cytoplasmatic malate dehydrogenase, Biochemistry, **12**, 5101–5109 (1973).
1258. *Nordström B., Brändén C.-I.* The binding of nucleotides to horse liver alcohol dehydrogenase. In: Structure and Conformation of Nucleic Acids and Protein–Nucleic Acid Interactions (M. Sundaralingam and S. T. Rao, eds.), pp. 387–395, Univ. Park Press, Baltimore 1975.
1259. *Matthews D. A., Alden R. A., Freer S. T., Xuong N.-H., Kraut J.* Dihydrofolate reductase from *Lactobacillus casei*, Stereochemistry of NADPH binding, J. Biol. Chem., **254**, 4144–4151 (1979).
1260. *Montheilet C., Blow D. M.*, Binding of tyrosine, adenosine triphosphate and analogues to crystalline tyrosyl transfer RNA synthetase, J. Mol. Biol., **122**, 407–417 (1978).
1261. *Morikawa K., Cour T. F. M. La Cour, Nyborg J., Rasmussen K. M., Miller D. L., Clark B. F. C.* High resolution X-ray crystallographic analysis of a modified from of the elongation factor Tu: Guanosinediphosphate complex, J. Mol. Biol., **125**, 325–338 (1978).
1262. *Shohan M., Steitz T.A.* Crystallographic studies and model building of ATP at the active site of hexokinase, J. Mol. Biol., **140**, 1–14 (1980).
1263. *Richards F. M., Wyckoff H. W.* Ribonuclease-S. In: Atlas of Molecular Structures in Biology (D. C. Phillips and F. M. Richards, eds.), Vol. 1, Oxford Press, London, 1973.
1264. *Wodak S. Y., Liu M. Y., Wyckoff H. W.* The structure of cytidylyl(2′,5′)adenosine when bound to pancreatic ribonuclease S, J. Mol. Biol., **116**, 855–875 (1977).
1265. *Cotton F. A., Hazen E. A., Legg M. J.* Staphylococcal nuclease: Proposed mechanism of action based on structure of enzyme–thymidine 3′,5′-biphos-

phate–calcium ion complex at 1,5 Å resolution, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **76**, 2551–2555 (1979).
1266. *Stubbs G., Warren S., Holmes K. C.* Structure of RNA and RNA binding site in tobacco mosaic virus from 4 Å map calculated from X-ray fibre diagrams, Nature, **267**, 216–221 (1977).
1267. *Stubbs G., Stauffacher C.* Protein–RNA interactions in tobacco mosaic virus, Biophys. J., **32**, 244–246 (1980).
1268. *Holmes K. C.* Protein–RNA interactions during the assembly of tobacco mosaic virus, Trends Biochem. Sci., **5**, 4–7 (1980).
1269. *Raw S. T., Rossmann M. G.* Comparison of super-secondary structures in proteins, J. Mol. Biol., **76**, 241–256 (1973).
1270. *Rossmann M. G., Liljas A., Brändén C.*-H., *Banaszak L. J.* Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases. In: The Enzymes, Vol. XI, pp. 61–102, Academic Press, New York, 1975.
1271. *Buehner M.* The architecture of the coenzyme binding domain in dehydrogenases as revealed by X-ray structure analysis. In: Protein–Ligand Interactions (H. Sund and G. Blauer, eds.), pp. 78–96, de Gruyter, Berlin, 1975.
1272. *Павловский А. Г., Падюкова Н. Ш., Карпейский М. Я.* Структура кристаллических комплексов рибонуклеазы с 8-замещенными пуриновыми нуклеотидами. ДАН, 1978, **242**, 961–964.
1272a. *Heinemann U., Saenger W.* Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease T_1-2′-guanilic acid complex: an X-ray study, Nature, **299** (1982).
1273. *Hol W. G. J., Duijenen P. T. van, Berendsen H. C.* The α-helix dipole and the properties of proteins, Nature, **273**, 443–446 (1978).
1274. *Harrison S. C.* Virus crystallography comes of age, Nature, **286**, 558–559 (1980).
1275. *Bloomer A. C., Champness J. N., Bricogne G., Staden R., Klug A.* Protein disk of tobacco mosaic virus at 2,8 Å resolution showing the interactions within and between subunits, Nature, **276**, 362–368 (1978).
1276. *Zimmer Ch.* Effects of the antibiotics netropsin and distamycin A on the structure and function of nucleic acids, Proc. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., **15**, (1975).
1277. *Berman H. M., Neidle S., Zimmer Ch., Thrum H.* Netropsin, a NDA-binding oligopeptide. Structural and binding studies, Biochim. Biophys. Acta, **561**, 124–131 (1979).
1278. *Anderson W. F., Ohledorf D. H., Takeda Y., Matthews B. W.* Structure of the *cro* repressor from bacteriophage λ and its interaction with DNA, Nature, **290**, 754–758 (1981).
1279. *Ptashne M., Jeffrey A., Johnson A. D.*, Maurer R., *Meyer B. J., Pabo C. O., Roberts T. M., Sauer R. T.* How the λ repressor and *cro* work, Cell, **19**, (1980).
1279a. *Matthews B. W., Ohlendorf D. H., Anderson W. F., Fisher R. G., Takeda Y.* How does *cro* repressor recognize its DNA target sites? Trends Biochem. Sci., **8**, 25–29 (1983).
1279b. *Pabo C. O., Lewis M.* The operator-binding domain of repressor: structure and DNA recognition, Nature, **298**, 443–447 (1982).
1279c. *Ptashne M., Johnson A. D., Pabo C. O.* A genetic switch in a bacterial virus, Sci. Amer., **247**(5), 106–120 (1982).
1279d. *Matthews B. W., Ohlendorf D. H., Anderson W. F., Takeda Y.* Structure of DNA-binding region of *lac* repressor inferred from its homology wito *cro* repressor, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **79**, 1428–1432 (1982).
1280. *McKay D. B., Steitz T. A.* Structure of catabolite gene activator protein at 2,9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA, Nature, **290**, 744–749 (1981).
1281. *Gupta G., Bansal M., Sasisekharan V.* Conformational flexibility of DNA:

Polymorphism and handedness, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 77, 6486–6490 (1980).
1281a. *Albiser G., Premilat S.* A critical analysis of a left-handed double helix model for B-DNA fiber, Nucl. Acids Res., **10**, 4027–4034 (1982).
1281b. *Salemme F. R.* A model for catabolite activator protein binding to supercoiled DNA, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **79**, 5263–5267 (1982).
1281c. *Steitz T. A., Ohlendorf D. H., McKay D. B., Anderson W. F., Matthews B. W.* Structural similarity in the DNA-binding domains of catabolite gene activator and *cro* repressor proteins, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **79**, 3097–3100 (1982).
1282. *Kornberg A.* DNA Replication, p. 485, Freeman, San Francisco, 1980.
1283. *Day L. A.* Circular dichroism and ultraviolet absorption of a deoxyribonucleic acid binding protein of filamentous bacteriophage, Biochemistry, **12**, 2529–5359 (1973).
1284. *Coleman J. E., Anderson R. A., Ratcliffe R. G., Armitage I. M.* Structure of gene 5 protein–oligodeoxynucleotide complexes as determined by ^{1}H, ^{19}F and ^{31}P nuclear magnetic resonance, Biochemistry, **15**, 5419–5430 (1976).
1285. *Coleman J. E., Oakley H. L.* Physical chemical studies of the structure and function of DNA binding (helix-destabilizing) proteins, CRC Crit. Rev. Biochem., **7**, 247–289 (1980).
1286. *Alberts B., Frey L., Delius H.* Isolation and characterization of gene 5 protein of filamentous bacterial viruses, J. Mol. Biol., **68**, 139–152 (1972).
1287. *Torbet J., Gray K. M., Gray C. W., Marvin D. A., Siegrist H.* Structure of fd DNA–gene 5 protein complex in solution. A neutron smallangle scattering study, J. Mol. Biol., **146**, 305–320 (1981).
1288. *Blace C. C. F., Oatley S. J.* Protein–DNA and protein–hormone interactions in prealbumin: A model of the thyroid hormone nuclear receptor? Nature, **268**, 115–120 (1977).
1289. *Schulz G. E., Schirmer H.* Principles of Protein Structure, Springer Verlag, New York, 1979.
1289a. *Gierer A.* Model for DNA and protein interactions and the function of the operator, Nature, **212**, 1480–1481 (1966).
1289b. *Jovin T. M.* Recognition mechanisms of DNA-specific enzymes, Annu. Rev. Biochem., **45**, 889–920 (1976).
1289c. *Lilley D. M. J.* Hairpin-loop formation by inverted repeats in supercoiled DNA is a local and transmissible property, Nucl. Acids Res., **9**, 1271–1289 (1981).
1289d. *Panayotatos N., Wells R. D.* Cruciform structures in supercoiled DNA, Nature, **289**, 466–470 (1981).
1289e. *Lim V. I., Mazanov A. L.* Tertiary structure for palindromic regions of DNA, FEBS Lett., **88**, 118–123 (1978).
1289f. *Stasiak A., Klopotowski T.* Four stranded DNA structure and DNA methylation in the mechanism of action of restriction endonucleases, J. Theor. Biol., **80**, 65–82 (1979).
1289g. *Momany F. A., McGuire R. F., Burgess A. W., Scheraga H. A.* Energy parameters in polypeptides. VII. Geometric parameters, partial atomic charges, nonbonded interactions, hydrogen bond interactions, and intrinsic torsional potentials for the naturally occurring amino acids, J. Phys. Chem., **79**, 2361–2381 (1975).
1290. *Rich A.* A hypothesis concerning the folding of DNA, Pontificiae Academiae Scientiarium Scripta Varia (Roma), **22**, 271–284 (1962).
1291. *Richards K. E., Williams R. C., Calendar R.* Mode of DNA packing within bacteriophage heads, J. Mol. Biol., **78**, 255–259 (1973).
1292. *Virrankoski-Castodeza V., Fraser M. J., Parish J. H.* Condensed DNA structures derived from bacteriophage heads, J. Gen. Virol., **58**, 181–190 (1981).

1293. *Earnshaw W. C., King J., Harrison S. C., Eiserling F. A.* The structural organization of DNA packaged within the heads of T4 wild-type, isometric and giant bacteriophages, Cell, **14**, 559–568 (1978).
1294. *Earnshaw W. C., Harrison S. C,* DNA arrangement in isometric phage heads, Nature, **268**, 598–602 (1977).
1295. *Lerman L. S.* The polymer and salt-induced condensation of DNA. In: Physico-Chemical Properties of Nucleic Acids (J. Duchesne, ed.), Vol. III, pp. 59–76, Academic Press, New York, 1973.
1296. *Maniatis T., Venable J. H., Lerman L. S.* The structure of ψ-DNA, J. Mol. Biol., **84**, 37–64 (1974).
1296a. *Huey R., Mohr S. C.* Condensed states of nuclei acids. III. ψ(+) and ψ(−) conformational transitions of DNA induced by ethanol and salt, Biopolymers, **20**, 2533–2552 (1981).
1297. *Scruggs R. L., Ross P. D.* Viscosity study of DNA, Biopolymers, **2**, 593–609 (1964).
1298. *Shapiro J. T., Leng M., Felsenfeld G.* Deoxyribonucleic acid–polylysine complexes. Structure and nucleotide specificity, Biochemistry, **8**, 3219–3232 (1969).
1299. *Gosule L. C., Schellman J. A.* Compact form of DNA induced by spermine, Nature, **259**, 333–335 (1976).
1300. *Laemmli U. K.* Characterization of DNA condensates induced by poly(ethylene oxide) and polylysine, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 4288–4292 (1976).
1301. *Olins D. E., Olins A. L.* Model nucleohistones: The interaction of F1 and F2a1 histones with native T7 DNA, J. Mol. Biol., **57**, 437–455 (1971).
1302. *Girod J. C., Johnson W. C., Jr., Huntington S. K., Maestre M. F.* Conformation of deoxyribonucleic acid in alcohol solution, Biochemistry, **12**, 5092–5101 (1973).
1303. *Lang D.* Regular superstructures of purified DNA in ethanolic solution, J. Mol. Biol., 78, 247–254 (1973).
1304. *Lang D., Taylor T. N., Dobyan D. C., Gray D. M.* Dehydrated circular DNA: Electron microscopy of ethanol-condensed molecules, J. Mol. Biol., **106**, 97–107 (1976).
1305. *Eickbush T. H., Mondrianakis E. N.* The compaction of DNA helices into either continuous supercoils or folded-fiber rods and toroids, Cell, **13**, 295–306 (1978).
1306. *Allison S. A., Herr J. C., Schurr J. M.* Structure of viral φ29 DNA condensed by simple triamines: A light-scattering and electron-microscopy study, Biopolymers, **20**, 469–488 (1981).
1307. *Keller A.* Polymer crystals, Rep. Prog. Phys., **31**, 623–704 (1968).
1308. *Wunderlich R.* Macromolecular Physics. Vol. I, Crystal Structure, Morphology, Defects, Academic Press, New York, 1973.
1309. *Eisenberg H.* Hydrodynamic and thermodynamic studies, In: Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry (P. O. P. Ts'o, ed.), Vol. II, Academic Press, New York, 1974.
1310. *Грагеров А. И., Миркин С. М.* Влияние сверхспирализации ДНК на основные генетические процессы у прокариот. Молек. биол., 1980, **14**, 8–34.
1311. *Campbell A. M.* Straightening out the supercoil, Trends Biochem. Sci., **3**, 104–108 (1978).
1312. *Broda P.* Plasmids, Freeman, San Francisco, 1979. [Имеется перевод: Брода П. Плазмиды.–М.: Мир, 1982.]
1313. *Worcel A., Burgi E.* On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*., J. Mol. Biol., **71**, 127–147 (1972).
1314. *Lehninger A. L.* Biochemistry, p. 644, Worth, New York, 1970.

1314a. *Hübscher U., Lutz H., Kornberg A.* Novel histone H2A-like proteins of *Escherichia coli*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **77**, 5097–5101 (1980).
1315. *Pardon J. F., Wilkins M. H. F.* A super-coli model for nucleohistone, J. Mol. Biol., **68**, 115–124 (1972).
1316. *Oudet P., Gross-Bellard M., Chambon P.* Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit, Cell, **4**, 281–300 (1975).
1317. *Olins A. L., Olins D. E.* Spheroid chromatin units (ν-bodies), Science, **183**, 330–332 (1974).
1318. *Kornberg R. D.* Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA, Science, **184**, 868–871 (1974).
1319. *Kornberg R. D.* Structure of chromatin, Annu. Rev. Biochem., **46**, 931–954 (1977).
1320. *Baldwin J. P., Boseley P. G., Bradbury E. M.* The subunit structure of the eukaryotic chromosome, Nature, **253**, 245–249 (1975).
1321. *Germond J. E., Hirt B., Oudet P., Gross-Bellard M., Chambon P.* Folding of the DNA double helix in chromatin-like structure from simian virus 40, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 1843–1847 (1975).
1322. *Rindt K.-P., Nover L.* Chromatin structure and function, Biol. Zentralbl., **99**. 641–673 (1980).
1323. *Isenberg I.* Histones, Annu. Rev. Biochem., **48**, 159–191 (1979).
1324. *Lilley D. M., Pardon J. F.* Structure and function of chromatin, Annu. Rev. Genet., **13**, 197–233 (1979).
1325. *Felsenfeld G.* Chromatin, Nature, **271**, 115–122 (1978).
1326. *McChee J. D., Felsenfeld G.* Nucleosome structure, Annu. Rev. Biochem., **49**, 1115–1156 (1980).
1327. *Kornberg R. D., Klug A.* The nucleosome, Sci. Amer., **244**, 48–60 (1981).
1328. *Klug A., Rhodes D., Smith J., Finch J. T., Thomas J. O.* A low resolution structure for the histone core of the nucleosome, Nature, **287**, 509–516 (1980).
1329. *Azorin F., Martinez A. B., Subirana J. A.* Organization of nucleosomes and spacer DNA in chromatin fibers, Int. J. Biol. Macromol., **2**, 81–92 (1980).
1330. *Mirzabekov A. D.* Nucleosome structure and its dynamic transitions, Quart. Rev. Biophys., **13**(2), 255–295 (1980).
1331. *Dubochet J., Noll M.* Nucleosome arcs and helices, Science, **202**, 280–286 (1978).
1332. *Finch J. T., Lutter L. C., Rhodes D., Brown R. S., Bushton B., Levitt M., Klug A.* Structure of nucleosome core particles of chromatin, Nature, **269**, 29–36 (1977).
1333. *Finch J. T., Lewit-Bentley A., Bentley G. A., Roth M., Timmins P. A.* Neutron diffraction from crystals of nucleosome core particles, Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B, **290**, 635–638 (1980).
1334. *Weintraub H., Worcel A., Alberts B.* A model for chromatin based on two symmetrically paired half-nucleosomes, Cell, **9**, 409–417 (1976).
1335. *Lutter L. C.* Precise location of DNAse I cutting sites in the nucleosome core determined by high resolution gel electrophoresis, Nucl. Acids Res., **6**, 41–56 (1979).
1336. *Manning G. S.* The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides, Quant. Rev. Biophys., **11**, 179–246 (1978).
1337. *Harrington R. E.* Opticohydrodynamic properties of high-molecularweight DNA. III. The effects of NaCl concentration, Biopolymers, **17**, 919–939 (1978).
1338. *Sussman J. L., Trifonov E. N.* Possibility of nonkinked packing of DNA in chromatin, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75**, 103–107 (1978).
1339. *Mirzabekov A. D., Shick V. V., Belyavsky A. V., Bavykin S. G.* Primary orga-

nization of nucleosome core particle of chromatin: Sequence of histone arrangement along DNA, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75**, 4185–4188 (1978).
1340. *Mirzabekov A. D., Rich A.* Asymmetric lateral distribution of unshielded phosphate groups in nucleosomal DNA and its role in DNA bending, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **76**, 1118–1121 (1979).
1341. *Thoma F., Koller Th., Klug A.* Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin, J. Cell Biol., **83**, 403–427 (1979).
1342. *Finch J. T., Klug A.* Solenoidal model for superstructure in chromatin, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **73**, 1897–1901 (1976).
1343. *Worcel A., Benyajati C.* Higher order coiling of DNA in chromatin, Cell, **12**, 83–100 (1977).
1344. *Boulikas T., Wiseman J. M., Garrard W.* Points of contact between histone H1 and the histone octamer, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **77**, 127–131 (1980).
1345. *Ring D., Cole R. D.* Chemical cross-linking of H1 histone to the nucleosomal histone, J. Biol. Chem., **254**, 11688–11695 (1979).
1346. *Sperling L., Klug A.* X-Ray studies on "native" chromatin, J. Mol Biol., 112, 253–263 (1977).
1347. *Worcel A., Strogatz S., Riley D.* Structure of chromatin and the linking number of DNA, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **78**, 1461–1465 (1981).
1348. *Laemmli U. K., Cheng S. M., Adolph K. W., Paulson J. R., Brown J. A., Baumbach W. R.* Metaphase chromosome structure: The role of nonhistone proteins, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **42**, 351–360 (1977).
1349. *Crick F. H. C.* Split genes and RNA splicing, Science, **204**, 264–271 (1979).
1349a. *Smith G. R.* DNA supercoiling: Another level for regulating gene expression, Cell, **24**, 599–600 (1981).
1350. *Kornberg A.* DNA Replication, Freeman, San Francisco, 1980.
1351. *Гражеров А. И., Миркин С. М.* Влияние сверхспирализации ДНК на основные генетические процессы у прокариот. Молек. биол., 1980, **14**, 8–34.
1352. *Champoux J. J.* Proteins that affect DNA conformation, Annu. Rev. Biochem., **47**, 449–479 (1978).
1353. *Bauer W. R.* Structure and reactions of closed duplex DNA, Annu. Rev. Biophys. Bioeng., **7**, 287–313 (1978).
1354. *Bauer W., Vinograd J.* Circular DNA. In: Basic Principles of Nucleic Acid Chemistry (P. O. P. Ts'o, ed.), Vol. II, pp. 265–303, Academic Press, New York, 1974.
1355. *Wang J. C.* DNA: Bihelical structure, supercoiling and relaxation, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **43**, 29–33 (1979).
1356. *Lin L. F., Depew R. E., Wang J. W.* Knotted single-stranded DNA rings: A novel topological isomer of circular single-stranded DNA formed by treatment with *Escherichia coli* ω protein, J. Mol. Biol., **106**, 439–452 (1976).
1357. *Gellert M., Mizuuchi K., O'Dea M. H., Nach H. A.* DNA gyrase: An enzyme that introduces superhelical turns into DNA, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **73**, 3872–3876 (1976).
1358. *Cozzarelli N. R.*, DNA gyrase and the supercoiling of DNA, Science, **207**, 953–960 (1980).
1359. *White J. H.* Self-linking and the Gauss integral in higher dimensions, Amer. J. Math., **91**, 693–728 (1969).
1360. *Fuller F. B.* The writhing number of a space curve, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **68**, 815–819 (1971).

1361. *Crick F. H. C.* Linking numbers and nucleosomes, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **73**, 2639–2643 (1976).
1362. *Bauer W. R., Crick F. H. C., White J. H.*, Supercoiled DNA, Sci. Amer., **243**, (1), 100–113 (1980).
1363. *Vinograd J., Lebowitz J., Watson R.* Early and late helix–coil transitions in closed circular DNA. The number of superhelical turns in polyoma DMA, J. Mol. Biol., **33**, 173–197 (1968).
1364. *Bauer W., Vinograd J.* The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. I. The superhelix density of SV40 DNA in the presence and absence of dye, J. Mol. Biol., **33**, 141–171 (1968).
1365. *Keller W.* Determination of the number of superhelical turns in simian virus 40 DNA by gel electrophoresis, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 4876–4880 (1975).
1366. *Hudson B., Vinograd J.* Sedimentation velocity properties of complex mitochondria DNA, Nature, **221**, 332–337 (1969).
1367. *Nass M. M. K.* Reversible generation of circular dimer and higher multiple forms of mitochondrial DNA, Nature, **223**, 1124–1129 (1969).
1368. *Nass M. M. K.* Mitochondrial DNA: Advances, problems and goals, Science, **165**, 25–35 (1969).
1369. *Campbell A. M.* The effect of DNA secondary structure on tertiary structure, Biochem. J., **159**, 615–620 (1976).
1370. *Campbell A. M.* Conformational analysis of DNA from PM2 bacteriophage, Biochem. J., **155**, 101–105 (1976).
1371. *Vollenveiler H. J., Koller Th., Parello J., Sogo J. M.* Superstructure of linear duplex DNA, proc. Nat. Acad. Sci. USA, **73**, 4125–4129 (1976).
1372. *Hsieh T.-S., Wang J. C.* Thermodynamic properties of superhelical DNAs, Biochemistry, **14**, 527–535 (1975).
1373. *Engberg J., Klenow H.* Palindromic arrangement of specific genes in lower eukaryotes, Trends Biochem. Sci., **2**, 183–185 (1977).
1374. *Engberg J., Anderson P., Leick V., Collins J.* Free ribosomal DNA molecules from *Tetrahymena pyriformis* GL are giant palindromes, J. Mol. Biol., **104**, 455–470 (1976).
1375. *Wang J. C.* Superhelical DNA, Trends Biochem. Sci., **5**, 219–221 (1980).
1376. *Keller E.* SCHAKAL, a Plotting Program for Computers, Institut für Anorganische Chemie der Universität Freiburg, 7800 Freiburg, FRG, 1980.
1377. *Johnson C. K.* ORTEP, Oak Ridge Thermal Ellipsoids Plot Program, Oak Ridge National Laboratory Report, ORNL–3794, Oak Ridge, Tennessee (USA) (1965).

Предметный указатель

Аденилаткиназа 439
Аденин 23, 24
– гипермодифицированный 201
Аденозин 12, 23, 34
Аденозиндифосфат (ADP) 25, 227
– в комплексе с калием 227
–––– кобальтом 235
–––– лактатдегидрогеназой 436
– места протонирования 126
Аденозиндифосфатрибоза (ADP-рибоза) 436
Аденозинмонофосфат циклический (cAMP) 12, 25, 188, 191, 455, 457
Аденозинтрифосфат (ATP) 12, 25, 212
– в комплексе с гексокиназой 437
–––– кобальтом 235, 236
–––– натрием 212
– гидролиз 104
– связывание магния 215
8-азааденозин 12
Азануклеотиды 207–208
6-азауридин 209–210
Аксиальные заместители 72
Актиномицин D 390–392
Алкогольдегидрогеназа 92, 436, 439
Аминокислоты ароматические, стэкинг с основаниями 425, 431
– взаимодействие с нуклеотидами 423–428
––– основаниями 414, 416, 424–425, 446
––– парами оснований 416–418
– интеркаляция 218, 431, 432
– распределение заряда 417
– связывание с фосфатом 414, 426–427
– структура 415
Аномерный эффект 110. *См. также* Гош-эффект
Антибиотики 216
Антидромные структуры 408, 409
Антикодон 176, 354, 355, 371
Антикорреляции принцип 181
1-β-D-арабинозиладенин 12
Арабинозилцитозин 196
Арабинонуклеозиды 193, 196
Арабинофуранозиладенин 12
Атомные орбитали 98–99
N-ацетилцитидин 198, 203

Белки, биосинтез *см.* Трансляция
– взаимодействие с нуклеиновыми кислотами 402, 413
––– нуклеотидами 435
Белок, активирующий катаболизм 455–458
– гена 5 фага fd 458–461
Бесселя функция 44
Бидентатные комплексы 235–239
«Бок о бок» модель ДНК 344–345
Бороздки двойной спирали *см.* Желобки
8-бромаденозин 92
8-бромгуанозин 34, 92
8-бромуридин 147
Брэгга закон 43

Вандерваальсовы взаимодействия 158
– радиусы 51
π-Взаимодействия в связи P—O 103. *См. также* π-Связи
Видарабин 196
Виртуальной связи концепция 115
Вирус табачной мозаики (BTM) 437, 447–448
Вирусные РНК 260
Витамин B_{12} 197
Вода и нуклеиновые кислоты 393
– льдоподобная 157
Водные нити в гидратной оболочке ДНК 403, 405
Водородные связи 40, 48, 122, 123, 134–137
–– в бороздках двойной спирали 418–419
––– гидратной оболочке ДНК 403–411
–––– ДНК и электроотрицательность 145, 146
––– парах оснований 40, 122, 137, 143–149
––– циклодекстринах 408–411

-- внутримолекулярные 196
-- гомо- и гетеродромные 409
-- с участием серы 204
--- фосфатом 426
--- NH_2-группой оснований 425
-- «третичные» 360
-- циклические 407–410
-- электростатическая природа 150
-- C—H ... O_5 96–97
Волокна ДНК в хроматине 477–482
– определение структуры 56
-- получение 56–57
Вращательный потенциал 53

Галогензамещенные нуклеозиды 193
– нуклеотиды 92. *См. также* по названиям
Гексокиназа 437
Генетический код 171–172, 175
Гетеродромные структуры 408–409
Гибриды ДНК–РНК 280, 300–302
Гидратация ApU, GpC 267
– A- и B-ДНК 405–406
– ДНК теоретическая 402
– олигонуклеотидов 404–407
– переходы форм ДНК 396, 406–407
– структуры типа «айсберг» 404. *См. также* Вода льдоподобная
Гидратные оболочки в молекулах нуклеиновых кислот 393–396, 400–407
Гидролиз ATP 104
– фосфодиэфиров 191–192
Гидрофобные силы 156–157
Гидрофобный карман 438
Гипермодифицированные основания 371. *См. также* Аденин гипермодифицированный
Гиперхромизм 63, 161
Гиперхромный эффект 161
Гиреровские деревья 424, 492
Гистон H1 472, 478, 480, 482, 483
Гистоновый октамер 473, 475–477
Гистоны 471–472
– в хроматине 478–482. *См. также* Гистоновый октамер
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа 436, 438, 439
Гомодромные структуры 408–409
Гомополимеры 319
Гош-эффект 78, 109–110, 112, 200
Гуанин 23, 24
– узнавание рибонуклеазой T1 445–446
Гуанозин 23
– образование геля 339
– предпочтительная ориентация 93–94

Дауномицин 385–387
Двойная связь в основаниях 66
– спираль «вертикальная» 351–352
-- взаимодействие с аминокислотами 421
---- β-слоем 421–422, 450, 452–454
---- α-спиралью белков 422. 450. 452–454
-- гомополимеров *см.* Гомополимеры; ДНК, полинуклеотиды; Поликсантиловая кислота
-- желобки 39, 245, 255
-- левая 324. *См. также* B-ДНК левая, Z-ДНК
-- мини 267, 371
-- неэквивалентные цепи 265
-- нуклеация 160, 162
-- параллельная и антипараллельная ориентация цепей 319, 320
-- параметры 250, 252, 255. *См. также* Z-ДНК, параметры
-- переход спираль–клубок 63, 162
-- плавление 163
-- поликсантиловой кислоты 337
-- РНК 261
-- смещение центра пар оснований от оси 38, 252–253
-- торсионные углы 106–107, 250
-- энергетический профиль образования 160, 162
-- poly(AH^+)·poly(AH^+) 328
-- poly(G), poly(GH^+) 341–342
-- poly(s^2U) 334–337
-- poly(U) 334–337
-- poly(X) 334
Дегидрогеназы 216. *См. также* по названиям
– комплексы с NAD^+ 436–437, 438, 439
Дезоксиаденозин 24
Дезоксирибоза 84
Дезоксирибонуклеиновая кислота *см.* ДНК
Дель Ре метод 53
Дигидроуридин 206
Дигидрофолатредуктаза 436, 440, 447
Димеры тимина 205, 206
Диметилфосфат, конформационная карта 110
Динуклеозидфосфаты
ApU, GpC 267
d(GpC), GpC 380
d(TpA) 290
$UpAH^+$ 269–271
Дипольный момент оснований 124
-- α-спирали 447
Дисперсионные силы 52, 156–158
Дисперсия оптического вращения 63
Длины связей в нуклеотидах 68
ДНК 21
– беспорядочные колебания в структуре 348
– бусины, нити с бусинами 407, 467

– в волокнах 244, 245
–– хроматине 481
–– хромосомах 16, 19, 469–482
– взаимодействие с синтетическими полипептидами 428–431
––– *cro*-репрессором 450, 452–454
––– λ-репрессором 454
– водородные связи 134–138
– гибкость 349
– гибриды с РНК 280, 300–302
– гипотетические спиральные структуры 343–345
– двойная спираль 13–15, 241, 272, 349, 351, 474–476. *См. также* по названиям форм ДНК
– доступность для растворителя 398–402
– и белки, взаимодействие 402, 413
––– связывающиеся с ней 450, 458
––– соотношение в хромосомах 471
– изгибы 280, 476, 439
– изломы 343, 346–351
– интеркаляция 375
– количество у разных видов 16
– кольцевая 483–486, 489–492
– комплекс с белком, активирующим катаболизм 455–458
––– гена 5 фага fd 458–459, 460–461
––– нетропсином 450, 451
––– полиаргинином и полилизином 428–431
––– преальбумином 462
– конденсация 464
– конденсированная в хроматине 481
– кривые плавления 163, 169
– линкерная в хроматине 480
– микрокристаллы 467
– модель «бок о бок» 343–345
– нормальные колебания 348
– осаждение спиртом 465–466
– палочкообразные структуры 467
– параметры спирали 245, 250–251
– переход спираль–клубок 162
– персистентная длина 281
– площадь поверхности 400
– полиморфизм, полиморфные модификации 241, 272
– расплетающие белки 458–459
– сателлитная 246–247
– сверхспиральная 464–466, 475–476, 483–492
– связывание с металлами 220, 231
––– Lys—X—Lys 431, 432
– семейства 246, 247
– синтетическая 241
– содержание G + C 247
––– и T_m 166
– спейсеры 480
– спектр КД 397
–– поглощения 163
– состав, его влияние на структуру (модуляции последовательности) 242–243, 245–247, 272–273, 283–284
– стабильность 163, 167. *См. также* B-ДНК, стабилизация; Z-ДНК, факторы стабилизации
– структура в волокнах 244, 245
––– растворе 258
–– зависимость от природы катионов 247
– структурные модуляции 272–273
– температура плавления 161–169
– типы структуры 245
––– и содержание G + C 247
––– влияние связывания с белками 431
– топологические проблемы 317, 483
– тороидальные структуры 467
– уровни структурной организации 464
– фага T2 272, 299–300, 377
– фазовая диаграмма 248
– формы 241. *См. также* по названиям
– электростатический потенциал 256–257
– A 60, 241, 244, 245, 250–253, 255, 273–280
– A′ 241, 244, 250, 252
– B 241, 244, 245, 251, 253, 272, 280–291
–– в растворе 257, 397
–– гидратация 403, 404, 406
–– комплекс с протамином 429
–– коиформационные параметры 251, 253, 255
–– левая 115, 455–457
–– переход из левой в правую 115
–– правая 115, 119
–– рентгенограмма 60
–– с чередованием конформаций 246, 291
–– стабилизация 397, 403
– B′ 292
– C 60, 244, 245, 251, 272, 292–296, 396
– C′ 241, 244, 245
– C″ 241, 244, 245
– D 60, 241, 243, 251, 253, 272, 296–300
– E 241, 245
– L 388
– S 245
– T 272, 299–300
– Z 241, 244, 245, 304–318
–– биологическое значение 316–318
–– в растворе 311–312
––– хромосомах 317–318
–– взаимодействие с растворителем 313–314
–– влияние на сверхспирализацию 489
–– желобки 310–311
–– и топология плазмид 317
–– рентгенограмма 60
–– структурные параметры 307

-- стэкинг оснований 308–310
-- теоретическое предсказание 116, 118
-- транскрипция 318
-- факторы стабилизации 315–316
-- экспериментальные данные 304–307, 315–316
--- χ/δ-диаграмма 309
- Z′, Z_I, Z_{II} 312–314
- α-B′ 241, 244
- β-B′ 241, 244
- ψ 465

Желобки двойной спирали 39, 245, 255
--- и гидратация 400–402, 403, 404–407
--- в A- и B-ДНК 255–257
---- Z-ДНК 310–311
--- образование водородных связей 418–419
--- РНК 261, 262
Жесткие лиганды 222
- нуклеотиды 97–98, 114, 433–434
Жесткой сферы потенциал 52

Заместители аксиальные, экваториальные 72
Заполнения коэффициент 49
Зацепления порядок 486–490

Изинга линейная модель образования спирали 161
Изгибы ДНК 280, 476, 349
Изломы в ДНК 343, 346–351
-- тРНК 360, 361, 371
Изогуанина таутомеризация 132
Изодесмический процесс 153, 154
Изоморфизм пар оснований 37, 177
Изоморфное замещение 54–55
2′,3′-O-изопропилидин 181, 182
ИК-спектры ДНК 63, 396
Инвариантные нуклеотиды тРНК 355
Интеркаляторы 382–383
Интеркаляция 375
- аминокислот в кристаллах пуромицина 218
- в L-ДНК 388
- двухстадийное связывание 376–377
- дауномицина 385
- и раскручивание ДНК 378, 381, 385
- изменение конформации сахара 381
- конформационные параметры комплексов 382–383
- модели 381, 385, 387
- нарушения дальнего порядка 385
- оснований в тРНК 361
- принцип исключения ближайших мест связывания 377
- соединений платины 231, 232, 389
- стереохимия 379

Инфракрасная абсорбционная спектроскопия *см.* ИК-спектры

Калладина правила 272–273, 281
Карплюса формула 61
Катенаны ДНК 491
Катионы *см.* Металлов ионы
- взаимодействие с ДНК 397
- и структура ДНК 247
«Качание» оснований 175–177. *См. также* Оснований спаривание нестандартное
Кинетин 12, 20
Кинки 343. *См. также* Изломы
«Клеверный лист» 354
«Книжной закладки» модель 431, 432
Кобальт, комплексы с ADP и ATP 235–236, 437
Кодон 175
Конденсация ДНК 464–467
Конформации сахара основные 69
-- и природа заместителей 78, 79
-- *эндо-экзо* 71, 77, 78, 185, 190, 193
-- *син-анти* 29, 33, 35, 84, 92–94, 178, 196, 216
--- в гуанозине 93–94, 307, 309
---- L-ДНК 388
---- левой спирали ДНК 305–306
--- профили энергии 90
--- равновесие 79, 87, 90, 189–190
--- факторы, влияющие на их соотношение 92
- фиксированная 178–185
- фуранозы, энергетическая карта 76
- O_4-*эндо*–O_4-*экзо* 71–73, 77
Конфигурационные взаимодействия возмущенных молекулярных орбиталей (КВВМО) 54, 72, 89, 95, 113
Конформационное пространство 113
Конформационные изменения нуклеотидов в комплексах с белками 434
- карты модельных соединений 110–111
-- нуклеозидов 88–89
- круги для нуклеозидов 70
--- тРНК 105, 365
- параметры ДНК и РНК 250–251
-- B-ДНК 286, 287
-- комплексов интеркаляторов с ДНК 382–383
Конформация *высокая-анти* 34, 91, 178, 182, 207–208, 351, 352
- конверта 30
- предпочтительная у нуклеотидов 120
- относительно связи C_4—C_5 35–36, 62, 94–97
Кооперативность образования и разрушения двойной спирали 160–161
- связывание ионов металлов с тРНК 368
Координационное связывание ионов метал-

лов с ди- и трифосфатами 232
––––– основаниями 229–230
– число 228
Корреляция торсионных углов в нуклеотидах 113, 278
–––– тРНК 364
Коферменты 185, 211. *См. также* по названиям
Кристаллография макромолекул 54
– прямые методы 47
Круговой дихроизм (КД) 61, 63
Кручение (T_w) в сверхспирали ДНК 486
Кьюозин 202

Лазерная рамановская спектроскопия 61
Лактатдегидрогеназа 436, 439
Левые двойные спирали 324. *См. также* Z-ДНК, B-ДНК левая
Леннард-Джонса потенциал 52
Лиганды жесткие 222
Лондона дисперсия *см.* Дисперсионные силы

Магний (Mg^{2+}) и гидролиз АТР 104
– комплексы с ди- и трифосфатами 232–233
– связывание с тРНК 104
Макроэргические соединения *см.* Фосфаты, богатые энергией
Малатдегидрогеназа 436, 439
6-меркаптопурин 204
Металлов ионы избирательность связывания 229–230
–– координационные изомеры 233–236
–– места координационного связывания 222–223, 224–225
–– связывание и протонирование 229
––– с атомами азота оснований 223
–––– гидроксильной группой сахаров 223
–––– кетогруппой оснований 223, 226
–––– нуклеиновыми кислотами 220
–––– пирофосфатом 236–237
–––– тиокетогруппами 226
–––– тРНК 367–370
–––– фосфатной группой 223
7-метилгуанозин 202
6-метилурндин 34
2′,3′-О-метоксиметиленуридин 181
Микрокристаллы ДНК 467
Мини-спираль 267, 371
Минорные основания 198–199
– нуклеозиды (нуклеотиды) в тРНК 198–199; 354–355. *См. также* Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды; Модифицированные основания
Модельные системы из белков с нуклеиновыми кислотами 423
Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды 178
– основания 127–128, 132, 200
– сахара 193
Мутации 148, 173–175

Натрия координационное связывание 256, 268–269, 332
Неоднозначное соответствие оснований *см.* «Качание» оснований
Нетропсин 450–451
Не-уотсон-криковские пары оснований 174
Неэквивалентные цепи двойной спирали 265
Никотинамидадениндинуклеотнд *см.* NAD^+
Номенклатура нуклеиновых кислот 21
– Λ/Δ/эндо/экзо 236–239
Нуклеаза микрококковая 472
– стафилококковая 437, 440–441, 444
Нуклеиновые кислоты *см.* ДНК, РНК
–– взаимодействие с белками 413, 435
–– взаимодействне с α-спиралью и β-слоем белков 421–423, 452–453, 454–459
–– модельные системы с полнпептидами 428
–– номенклатура 21
Нуклеозидднфосфаты 211. *См. также* Пирофосфатная группа и по названиям
– связывание с металлами 232
Нуклеозидтрифосфаты 211. *См. также* по названиям
– связывание с металлами 212, 232
Нуклеозид-2′,3′,О-циклофосфаты 185–186, 188–192
Нуклеозид-3′,5′,О-циклофосфаты 187, 188, 190–192
Нуклеозидфосфотиоаты 208–211
Нуклеозиды 24
– галогензамещенные 193
– минорные в тРНК 198, 354
– конформация 70
–– фиксированная 178–185
Нуклеосомы 471–482
Нуклеотиды 11–13, 24
– взаимодействие с аминокислотами 423–428
– длины связей 68
– «жесткие» 97–98, 114, 433–434
– комплексы с ферментами *см.* по названиям ферментов
– конформация *см.* Нуклеозиды, конформация
–– предпочтительная 120
– конформационные изменения в комплексах с белками 434, 436–437
– открытая конфигурация 434
– связывание с металлами 230. *См. также* Координационное связывание ионов металлов с основаниями
– связывающиеся с ними домены бел-

ков 435, 438, 439
– физические свойства 122
– циклические 186–187. *См. также* Аденозинмонофосфат циклический
– p*K* *см.* p*K* оснований
Нумерация атомов 26
NAD^+ 12, 25, 211, 215–216, 434, 435, 436
– в комплексе с дегидрогеназами 435, 436, 438, 440
––– пируватом в лактатдегидрогеназе 437, 442–443
––– литием (Li^+) 212–213, 443, 438
– конформация 212
–– в комплексах с ферментами 92, 436
n/h-зависимость для полинуклеотидов 114–117

Оверхаузера эффект 62
Олигодезоксинуклеотиды 404–407
Олигонуклеотиды
ApU 267–269
$Ap^-AH^+pAH^+$ (ApApA) 328–330, 331
GpC 267–269
$UpAH^+$ 96, 269–271
– параметры спирали 260, 278, 286, 287
– структурные параметры 106, 107, 286
Олигорибонуклеотиды 267, 269
Осмия связывание с нуклеозидами 226
Основания 24
– ассоциация 143–150
– взаимодействие с аминокислотами 414–418, 424–426, 446
––– пептидной группой 425–426
– водородная связь C—H ... O_5' 96–97
– геометрия 65
– дипольные моменты 124
– длина связей 68
– интеркаляция в тРНК 361
– ковалентные связи с сахаром 178–185
– модифицированные, p*K* 127–129
– плотность заряда 122
– протонирование 69, 124–125
– связывание металлов 220
– спаривание 37, 143, 320, 357–358
– стэкинг 134, 285
– таутомерия. таутомерные формы 65, 122
Оператор 450–455

Палиндромные последовательности 423–424, 453, 455, 492
Параметры спирали 37, 245
Пары оснований 139
–– в гомополимерах 320, 334, 337
––– тРНК 356–361
–– взаимодействие с аминокислотами 417–418
–– геометрический изоморфизм 141
–– несимметричные 320, 334
–– не-уотсон-криковские 174
––– и мутации 175
–– перекрывание 257, 285, 289
–– смещение от оси спирали 38, 39, 252–253, 255
–– стабнльность *см.* Основания, ассоциация
–– таутомерия и мутацин 171
–– угол наклона 252–253
––– *пропеллера*, *пропеллерный* поворот (Θ_P) 38, 39, 141
–– уотсон-криковское 15, 138–139, 141–142, 143, 145, 261, 264
–– хугстеновские 141–143, 145, 261, 264, 265–266, 292, 293
–– электронная комплементарность 150
–– энергия взаимодействия 150
–– образование (спаривание оснований) 37, 143
Паттерсона метод *см.* «Тяжелых атомов» метод
Перекручивание ДНК 475
Перекрывание пар оснований 285
Переход форм ДНК 243, 296
––– в гибрндах ДНК–РНК 302
––– и гидратация 395, 396, 406–407
––– между семействами 246
––– A–B 243, 247, 248
––– B–*Z* 304, 314–318
Пептидная группа, взаимодействие с основаниями 425–426
Петли 167, 168, 170, 171
– свободная энергия $\Delta G_{полн}$ 170
Пирофосфатная группа 100, 102–104, 211
Плавление ДНК 161–169
Плавления температура (T_m) 161–169
–– зависимость от ионной силы 163–165
–– и связывание пептидов 428, 431
––– содержание GC-пар 166
Платина 232
– в антибиотиках 234
– интеркаляция в ДНК 388, 389
– координационное связывание 231, 234
Плотность заряда (распределение заряда) в аминокислотах 417
––– нуклеозидах и фосфате 122
– сверхвитков 489
π-Повороты 362–364, 271, 327
Полиамины, связывание с тРНК 367
––– B-ДНК 397–398
Поликсантиловой кислоты двойная спираль 337
Полиморфизм ДНК 241
Полинуклеотиды 106, 116, 250–253, 426. *См. также* ДНК, РНК
– зависимость *n/h* 114–117
Полуинвариантные нуклеотиды тРНК 355
Полуэмпирический потенциал 53
Последовательность оснований в ДНК

239, 249, 250
---- специфичность связывания катионов 256, 267–269
---- и гомология репрессорных белков 455
---- зависимость структуры от нее 243, 272–273, 283–284
----- стэкинга 158–160
Потенциал жесткой сферы 52
Преальбумин, взаимодействне с ДНК 462
Пропеллер 38. *См. также* Угол пропеллера
Пространственная группа 43, 45
Протамины в комплексе с ДНК 429
---- тРНК 431, 433
Протонирование и координационное связывание металлов 229, 230
– оснований 69
– ADP 126
Прототропная таутомернзация 129, 130
Профлавин 380–381
Псевдовращение, величина изгиба (τ_m) 69
– фазовый угол *P* 71, 75, 76
Псевдовращения цикл 31–33
-- энергетическая карта 76
Пуромицин 12, 216–218
p*K* 124–129
poly(A) 324–327

Райзинг W_r 486–488
Рамка считывания 371
Расплетающие белки 458–459
Рентгеновская дифракция на волокнах 57, 58–59, 60, 245
---- для гибридов poly(I)·poly(C) 301
----- гомополимеров 321–329, 339, 341
----- A-ДНК 273
----- B-ДНК 280
----- C-ДНК 292
----- D-ДНК 296
----- L-ДНК 388
----- T-ДНК 300
----- S-ДНК *см.* Z-ДНК
----- Z-ДНК 306
– кристаллография *см.* Кристаллография
Рентгеноструктурный анализ 42–60, 276
cro-Репрессор 450, 452–454
λ-Репрессор 454, 458
Рибоза, планарная конфигурация 181, 812, 185
– структура 84
Рибонуклеаза A 188, 194–195, 437
– S 437, 440, 441, 445
– T_1 445–446
Рибонуклеазы (РНКазы) 185, 441, 444–445
Рибонуклеиновая кислота *см.* РНК
РНК 21, 241, 244, 250, 251, 255–256, 261, 403
– двойная спираль типов A и A′ 241, 244, 261, 262–264
--- хугстеновского типа 265
– желобки 261
– конформационные параметры 250–251
– неэквивалентные цепи двойной спнрали 265
– параметры спирали 252, 261
– раскрытие пар 169–171
– свободная энергия 168
– связывание с металлами 221
– семейства 246
– структура в волокнах 241, 245
– структурный консерватизм 241, 249
– транспортная *см.* тРНК
– тройная спираль 261, 264–265
Роданаза 439
Россмана домен 435, 438

Самосогласованного поля метод 53, 54, 73
Сателлитная ДНК 246–247
Сахара p*K* в нуклеотидах 125
– геометрия связей 65, 70. *См. также* Фураноза, геометрня связей
– конформации 69
-- антикорреляция в B-ДНК 281, 289
-- в месте (A–B)-контакта в ДНК 349, 350
--- тРНК 361
--- циклических нуклеотидах 188–190
-- изменения при интеркаляции 381
-- ориентация заместителей 72
-- причины 73, 75, 77
-- *син-анти* 84
-- твист 30
-- типы 30–31, 69
-- определение методом ЯМР 62, 188
– плотность заряда 106. *См. также* Фураноза, плотность заряда
– связывание с металлами 223
– структура 65–73
– энергия 60. *См. также* Фураноза, энергия
Сверхвитков плотность 489
Сверхспираль ДНК 492
π-Связи 98, 100, 102. *См. также* π-Взаимодействие в связи P—O
Сдвиг рамки считывания 371
Седиментации коэффициент 378
Сера как акцептор водородной связи 204
Симметрия в комплексах белков с нуклеиновыми кислотами 422, 423, 453–457
-- кóре нуклеосомы 473–475, 476
-- полинуклеотидных комплексах 138–141
-- тРНК 356–357
– спирали 242–243
Семейства природных ДНК и РНК 246

– двойных спиралей типа A 250, 247–255
–––– B 245, 247–259
–––– Z 312
Слоевой линни номер 57
β-Слой 421–422, 450, 452–454
Слэтера–Кирквуда уравнение 52
Смещение пар оснований от оси 38, 39, 252–253
Соединение спиралей A- и B-типа 349–351
Солевые мостики 426
Соленоидальная структура хроматина 478, 480
Спаривание оснований в гомополимерах 320
–– нестандартное в тРНК 357–358. *См. также* «Качание» оснований
Спектроскопические методы 41, 61. *См. также* ИК-спектры, УФ-спектры
Спермин, связывание с ДНК 398
––– тРНК 370
Спин-решеточная релаксация 61
Спираль двойная *см.* Двойная спираль
–– модель *Изинга* 161
–– образование по механизму «застежка–молния» 160
– одноцепочечная 154, 319–321, 330
– параметры 37
–– A-типа 278, 279
–– для олигонуклеотидов 260, 278, 286, 287
––– ДНК и РНК 245, 250–253, 286, 288
––– Z-ДНК 307
– симметрия 242
– трехцепочечная (тройная) 261, 264–265, 292
– четырехцепочечная 319, 339, 492
α-Спираль белка 420
–– взаимодействие с двойной спиралью нуклеиновых кислот 422–423, 453, 458
–––– B-ДНК 422, 450, 452–454
–––– одноцепочечной РНК 447
–––– фосфатами 447
Спиральные молекулы 44, 58–59
Стабилизации энергия ДНК 403
– Z-ДНК, факторы, влияющие на нее 315
Стабильности матрица B-ДНК 167
Стандартные отклонения в геометрии связей 50, 67, 68
Структурная амплитуда F_{hkl} 43
Структурные характеристики ДНК 255
Структурный фактор 44
Стэкинг оснований 134, 151–160, 258, 360
–– в двойной спирали 308–310
––– тРНК 362–364
–– и аминокислот 125
–––– ароматических 425, 431
–– силы, стабилизирующие его 156
– фосфат–основание 361, 363, 364
S—N-взаимодействия 265–266, 334, 336

Таутомерия (таутомеризация) 63, 129, 131, 171
– изогуанозина 132
– определенне методом ЯМР 130
Таутомерные формы оснований 65, 122, 174
––– и мутации 173, 175
––– енольная и иминоформа 129–130, 173
––– модифицированных 32
Твист-конформация сахарного кольца 30
Тепловое двнжение 49
Термодинамика образования пар оснований 143
– стэкинга оснований 153
Тетрагидрофуран 69
Тетраметилцитозин 69
Тиминовые димеры 205, 206
Тиокетогруппа (C—S-группа) 204–206
2-тиокетозамещение 334
4-тиоуридин 86, 206
Тиофосфатная группа 211
Тирозил-тРНК–синтетаза 147, 437
Топоизомеразы 484, 491
Топологическая изомеризация ДНК 190
– проблема в кольцевых ДНК 483
Топологических витков число 489
Тороидальные структуры ДНК 467
Торсионные углы 27–29
–– в нуклеозидах 70
––– олигонуклеотидах 106–107, 279
––– пирофосфатной группе 103
––– полинуклеотидах 106–107, 250–251
––– тРНК 105
–– зависимость χ от δ 288–289
––––– Z-ДНК 309
––––– тРНК 365
–– корреляция 113–114, 278
Трансверсии 175
Транскрипция 482–483
– терминаторы 351
Трансляция 171
Трансэтерификация 185, 194
Третичная структура сверхспирализованной ДНК 492
Тридентатные хелаты 238–239
Триплет(ы) 176
тРНК 354
– антикодон 371
– взаимодействие оснований 357–361
– гипермодифицнрованные основания 201, 371
– зависимость χ, δ, α, ζ 364–366. *См. также* тРНК, конформационный круг
– изломы 360–361, 371
– инвариантные и полуинвариантные нук-

леотиды 355
– интеркаляция оснований 361
– и пуромицин 216–217
– «качание» оснований 175–177, 357–360
– «клеверный лист» 354, 356
– комплекс с протамином 431–432
– конформационный круг 105, 364–365
– конформация сахара 361
– минорные нуклеозиды 198–199, 200, 354
– π-повороты 362–364
– связывание металлов 367–370
–– полиаминов 367
–– спермина 370
– стереохимические корреляции 341
– структура 354–374
– стэкинг фосфат–основание 364
– третичная структура 356
– узнавание мРНК 175
– Г-форма 355, 356–357
Тройные спирали 261, 264, 292
«Тяжелых атомов» метод 47, 54–55

Угол двугранный 27, 28
– валентный О—Р—О 102–103
– крена θ_R 38, 39
– наклона θ_I 38, 39
– падения θ_{hkl} 43
– пропеллера θ_P 38, 39, 281, 284
– валентный О—Р—О 102–103
– спирального вращения 37, 38, 245, 252–253
– χ 29, 33–35, 86, 88, 89, 91
Узнавание нуклеиново-белковое 435
Уотсон-криковские пары оснований 15, 141–143, 150, 176
Уридин 34
Уридин-5′-фосфат 208
УФ-спектры 63, 397

Фага Т2 ДНК 272, 296, 299–300
Фазовая диаграмма 248
– проблема 46
Фазовый угол *P* 31–32
Фиксированная конформация нуклеозида 178–185
Флаводоксин 439
Фосфатная группа 98–101, 124–127
–– в В-ДНК с чередованием конформаций 291
––– Z-ДНК 310
–– взаимодействие с аминокислотами 416
–– плотность заряда 123
–– полная энергия связей 100
–– стэкинг с основаниями в тРНК 363, 364
–– p*K* 126–127
Фосфаты, богатые энергией 102–104
– гидролиз 191–192
Фосфоглицераткиназа 439
Фосфор, атомные орбитали 98–99
Фосфотиоаты 208–211
Фосфоэфирная связь Р—О 100–102
Фураноза (фуранозное кольцо) 69, 71–83, 85
– геометрия связей 82
– плотность заряда 123
– энергия 73–76

Химическнй сдвиг δ 61
Хиральность 209
Хроматин 19, 471–472, 477–482, 483
Хромосомиая ДНК бактериальная 469
–– у эукариот 469–471
Хугстеновские пары оснований 265
Хюккеля метод 54, 72, 123

Цвиттерионы 269, 328
Циклические нуклеотиды 185. *См. также* Аденозинмонофосфат циклический
Циклодекстрнны 408–411
Цилиндрнческие координаты 39
Цнтидин 14
Цитидил-(2′,5′)-аденозин 437, 440
Цитокинины 200–201

Шаг спирали 37, 57
–– ДНК 245
–– РНК 261
Шпильки 167, 168, 170, 334

Энергия вращения вокруг гликозидной связи 97
– запасание путем сверхспирализации 486
– изменение в цикле псевдовращения 75
– потенциальная, расчеты 41, 51, 66, 73, 97, 110–114
– связей 135
–– полная в фосфатной группе 100
– фураноз 73–76
Экваториальные заместители 72
Электронная комплементарность 150
– плотность 43–44, 47–48, 56
–– разностная 47
Электроотрицательность и конформация сахара 78–79
–– свойства водородных связей в ДНК 145, 146
Электростатические кулоновские взаимодействия 52
Электростатический потенциал в ДНК 256–257
Элементарная ячейка кристалла 42–43
Эукариотическая хромосомная ДНК 469–471
Эфирные связи Р—О и С—О 104–112

Ядерный магнитный резонанс 61–63

Оглавление

Предисловие редактора перевода 5
Предисловие 9

Глава 1. Почему мы изучаем структуру нуклеотидов и нуклеиновых кислот? 11

Глава 2. Термины, необходимые для описания структуры нуклеиновых кислот 21
2.1. Основания, нуклеозиды, нуклеотиды и нуклеиновые кислоты: номенклатура и символы 21
2.2. Система нумерации атомов 26
2.3. Торсионные углы и интервалы их значений 27
2.4. Определение торсионных углов в нуклеотидах 29
2.5. Конформация сахарного кольца. Цикл псевдовращения . . . 30
2.6. *Син/анти*-конформация. Вращение вокруг гликозидной связи 33
2.7. Ориентация относительно связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ 35
2.8. Параметры спирали. Система водородных связей между основаниями 37
Краткое содержание 40

Глава 3. Методы: рентгеновская кристаллография, расчеты потенциальной энергии и спектроскопия 41
3.1. Анализ кристаллической структуры малых молекул 41
3.2. Расчеты потенциальной энергии 51
3.3. Кристаллография макромолекул 54
3.4. Определение структуры волокон 56
3.5. Спектроскопические методы 61
Краткое содержание 63

Глава 4. Структура и конформационные свойства осиований, фураиозиых сахаров и фосфатиых групп 65
4.1. Геометрия оснований 65
4.2. Основные конформации сахара 69
4.3. Факторы, влияющие на конформацию фуранозы 78
4.4. Длины связей и валентные углы в фуранозах 82
4.5. Конформации *син* и *анти* 84
4.6. *Высокая-анти* (– *ск*)-конформация 91
4.7. Факторы, влияющие на соотношение между *син-* и *анти-*

конформерами. Исключительное положение гуанозина . . . 92
4.8. Ориентация относительно связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ 94
4.9. Факторы, влияющие на ориентацию относительно связи $C_{4'}$—$C_{5'}$ 96
4.10. «Жесткий нуклеотид» 97
4.11. Фосфомоно-, фосфодиэфирные группы и пирофосфатная связь. Характер связи и геометрия 98
4.12. Ориентация относительно эфирных связей С—О и Р—О 104
4.13. Корреляция между торсионными углами в нуклеотидах и нуклеиновых кислотах 113
4.14. Спираль или неспиральная структура, а если спираль, то какая именно? 114
Краткое содержание 118

Глава 5. Физические свойства нуклеотидов: плотность заряда, p*K*, спектры и таутомеризация 122
5.1. Плотность заряда 122
5.2. p*K* оснований, сахаров и фосфатных групп. Места нуклеофильной атаки 124
5.3. Таутомерия оснований 129
Краткое содержание 133

Глава 6. Силы, стабилизирующие ассоциаты оснований: водородные связи и стэкинг-взаимодействие 134
6.1. Свойства водородных связей 134
6.2. Типы водородных связей между основаниями: симметрия полинуклеотидных комплексов 137
6.3. Детальная геометрия уотсон-криковских и хугстеновских пар оснований 141
6.4. Образование пар оснований с точки зрения термодинамики, кинетики и законов квантовой химии: электронная комплементарность 143
6.5. Вертикальные взаимодействия между основаниями 151
6.6. Термодинамика стэкинг-взаимодействия 153
6.7. Силы, стабилизирующие стэкинг оснований: гидрофобные связи и лондоновские дисперсионные силы 156
6.8. Образование и разрушение двойной спирали происходят кооперативно 160
6.9. Таутомерия пар оснований и «качание»: структурные аспекты спонтанных мутаций и генетический код 171
Краткое содержание 177

Глава 7. Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды; нуклеозиддифосфаты и нуклеозидтрифосфаты; кофермеиты и антибиотики 178
7.1. Ковалентные связи между основанием и сахаром, фиксирующие их в определенной конформации; эталоны для спектроскопических методов 178
7.2. Циклические нуклеотиды 185
7.3. Нуклеозиды с модифицированным сахаром: галогензамещенные, арабино- и α-нуклеозиды 193
7.4. Модифицированные основания: алкилирование аминогрупп (цитокинины) и эндоциклических атомов азота, тиокетоза-

мещение, дигидроуридин, тиминовые димеры, азануклеозиды 200
7.5. Хиральный атом фосфора в нуклеозидфосфотиоатах . . . 208
7.6. Пирофосфатная группа в составе нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфатов, а также нуклеотидных коферментов 211
7.7. Нуклеозидные антибиотики: пуромицин 216
Краткое содержание 218

Глава 8. Связывание ионов металлов с нуклеиновыми кислотами . . . 220
8.1. Влияние связывания ионов металлов на биологические свойства нуклеиновых кислот 220
8.2. Способы связывания ионов металлов с нуклеотидами и предпочтительные места координационного связывания . . . 222
8.3. Координационное связывание платины 231
8.4. Координационное связывание ионов металлов с нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфатами: номенклатура геометрии бидентатных Λ/Δ и тридентатных Λ/Δ/*эндо*/*экзо* хелатов . . 232
Краткое содержание 239

Глава 9. Полиморфизм ДНК и структурный консерватизм РНК. Классификация A-, B- и Z-типов двойных спиралей 240
9.1. Полиморфизм двойных спиралей 241
9.2. Два семейства правых полинуклеотидных спиралей: A и B 247
Краткое содержание 259

Глава 10. Структура РНК 260
10.1. Двойные спирали A-РНК и A′-РНК сходны между собой 261
10.2. В тройных спиралях РНК одновременно образуются уотсон-криковские и хугстеновские пары 261
10.3. Двойная спираль с параллельными цепями и хугстеновскими парами, образованная poly(U) и 2-замещенным poly(A) . . . 265
10.4. Двойные мини-спирали, образованные ApU и GpC 267
10.5. Повороты и изгибы в структуре $UpAH^+$ 269
Краткое содержание 271

Глава 11. Структура ДНК 272
11.1. A-ДНК, единственная представительница A-семейства. Три кристаллических олигонуклеотида A-типа: d(CCGG), d(GGTATACC) и d(GGCCGGCC) 273
11.2. B-форма полимерных молекул ДНК и додекануклеотида d(CGCGAATTCGCG). Знакомство с двойными спиралями B-семейства 280
11.3. «B-ДНК с чередованием конформаций» и тетрануклеотид d(pATAT); d(TpA)–динуклеозидфосфат, образующий спиралеподобную структуру 284
11.4. Уникальная конформационно жесткая двойная спираль poly(dA)·poly(dT) и ее переход в тройную спираль 292
11.5. Двойная спираль C-типа у природных ДНК и синтетических полинуклеотидов 292
11.6. D-форму образуют только ДНК, содержащие участки с чередующейся A,T-последовательностью, и ДНК фага T2 296
11.7. Гибриды ДНК–РНК образуют только двойные спирали типа A- и A′-РНК. Полимеры и олигомер r(GCG)d(TATACGC).

B-спираль poly(A)·poly(dT) 300
Краткое содержание 303

Глава 12. Левые комплементарные двойные спирали – абсурд? Нет, это семейство Z-ДНК 304
12.1. Кристаллические структуры oligo(dC—dG) – левые двойные спирали 305
12.2. Экстраполяция структурных данных по олигонуклеотидам на случай полинуклеотидов. Z-семейство ДНК: Z-, Z_I-, Z_{II} и Z'-ДНК 312
12.3. Левая спираль Z-ДНК в волокнах трех полидезоксинуклеотидов с чередующейся последовательностью 315
12.4. Факторы, стабилизирующие Z-ДНК 315
12.5. Имеют ли Z-ДНК биологическое значение? 316
Краткое содержание 318

Глава 13. Структура синтетических гомополимеров 319
13.1. Правые одноцепочечные спирали со стэкинг-взаимодействием оснований, обнаруженные у полинуклеотида poly(C) и у его O_2'-метилированного аналога 321
13.2. Одноцепочечные спирали poly(A) 9-го и 2-го порядков с основаниями «внутри» и «снаружи» 324
13.3. Двойная спираль poly(AH^+)·poly(AH^+) с параллельными цепями, образующаяся при кислых pH. Спираль, поворот и стэкинг пар в димере $ApAH^+pAH^+$ 328
13.4. Одноцепочечная спираль poly(dT) без стэкинга и с вывернутыми «наружу» основаниями, построенная по данным о структуре дезоксидинуклеотида 330
13.5. Антипараллельные двойные спирали A-типа у полинуклеотидов poly(U), poly(s^2U) и poly(X) 334
13.6. «Липкий» гуанозин. Структура гелей из гуанозина и гуаниловой кислоты. Четырехцепочечные спирали poly(G) и poly(I) 337
Краткое содержание 342

Глава 14. Гипотезы и спекуляции: модель «бок о бок», ДНК с изломами и «вертикальная» двойная спираль 343
14.1. Можно ли считать модель «бок о бок» альтернативой двойной спирали? 343
14.2. Может ли цепь ДНК сворачиваться путем образования изломов? 346
14.3. $\varkappa$- и β-изломы ДНК: «дыхание» со скоростью звука . . . 348
14.4. Изгибы ДНК в месте соединения спиралей A- и B-типа 349
14.5. «Вертикальная» двойная спираль в случае полинуклеотидов с *высокой-анти*-конформацией 351
Краткое содержание 353

Глава 15. тРНК – сокровищница стереохимической информации 354
15.1. Первичная и вторичная структура тРНК. «Клеверный лист»
15.2. Свертывание «клеверного листа» в третичную структуру. Г-форма 356
15.3. Стабилизация вторичной и третичной структуры тРНК гори-

зонтальными и вертикальными взаимодействиями между основаниями 357
15.4. Изменение конформации сахара, π-поворот и петля со стэкингом «фосфат—основание»: наиболее важные структурные особенности 361
15.5. Некоторые стереохимические корреляции, затрагивающие торсионные углы χ, δ и α, ζ 364
15.6. Связывание с тРНК катионов металлов и полиаминов . . . 367
15.7. Структура антикодона такова, что он может быстро узнавать кодон, образуя с ним двойную мини-спираль 371
15.8. «Оплавленная архитектура» дрожжевой $тРНК^{Gly}$ 372
Краткое содержание 374

Глава 16. Интеркаляция 375
16.1. Основные особенности интеркаляции в двойные спирали ДНК и РНК 375
16.2. Стереохимия интеркаляции в ДНК- и РНК-динуклеозидфосфаты 379
16.3. Улучшение модели интеркаляции. Комплекс дауномицина с олигонуклеотидом d(CpGpTpApCpG) 385
16.4. Экстраполяция моделей интеркаляции на случай ДНК в A- и B-формах 387
16.5. Полностью раскрученная L-ДНК, образующаяся при связывании с платиносодержащим лекарственным препаратом в условиях насыщения. Структура «веревочной лестницы» . . . 388
16.6. Актиномицин D—интеркалятор, специфически связывающийся с последовательностью GpC 389
Краткое содержание 392

Глава 17. Вода и нуклеиновые кислоты 393
17.1. Экспериментальные доказательства существования первичных и вторичных гидратных оболочек двойных спиралей ДНК 393
17.2. Разные состояния гидратации A-, B- и C-ДНК 396
17.3. Доступная молекулам растворителя поверхность A- и B-ДНК 398
17.4. Теоретические построения 402
17.5. Характер гидратации тетрамера A-ДНК и додекамера B-ДНК в кристаллах и A → B-переход 404
17.6. Водные пентагоны в кристаллах интеркаляционного комплекса динуклеозидфосфата. Общее представление о циклических водородных связях и «флип-флоп»-механизме 407
Краткое содержание 411

Глава 18. Взаимодействия между белками и нуклеиновыми кислотами 413
18.1. Общие соображения относительно нуклеиново-белковых взаимодействий 414
18.2. Модельные системы из компонентов белков и нуклеиновых кислот 423
18.3. Модельные системы из нуклеиновых кислот и синтетических полипептидов или протаминов 428
18.4. При связывании с белками нуклеотиды и одноцепочечные нуклеиновые кислоты приобретают вытянутую форму . . . 433

18.5. Природа нуклеотидно-белкового и нуклеиново-белкового узнавания 435
18.6. Белки, связывающиеся с двойными спиралями и одноцепочечными ДНК 450
18.7. Взаимодействие преальбумина с ДНК. Гипотетическая модель 462
Краткое содержание 463

Глава 19. Более высокие уровни структурной организации ДНК 464
19.1. Конденсация ДНК с образованием ψ-формы, сверхспиралей, бус, палочкообразных и тороидальных структур 464
19.2. Ламеллярные микрокристаллы фрагментированной ДНК . . . 467
19.3. В клетках ДНК организована в хромосомы 469
19.4. Структура нуклеосомной кор-частицы 472
19.5. Структурная организация нуклеосом в волокнах диаметром 100 и 300 Å. Суперсверхспираль, или соленоид 477
19.6. Организация хроматина в хромосоме; транскрипция 482
19.7. Топологические проблемы кольцевых замкнутых сверхспиральных ДНК 483
Краткое содержание 492
Литература 495
Предметный указатель 570

Монография

Вольфрам Зенгер

ПРИНЦИПЫ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Научный редактор: Н. Н. Шафрановская
Мл. научн. редакторы: Н. Ю. Плавинская, З. В. Соллертинская
Художник В. Е. Карпов
Художественный редактор Л. М. Карпов
Технический редактор А. Л. Гулина
Корректор Н. В. Андреева

ИБ № 5719

Сдано в набор 6.05.86. Подписано к печати 30.03.87. Формат 60 × 90$^{1}/_{16}$. Бумага офсетная № 1. Гарнитура таймс. Печать офсетная. Объем 18,25 бум. л. Усл. печ. л. 36,50. Усл. кр. отт. 73,00. Уч.-изд. л. 42,26. Изд. № 4/4312. Тираж 3400 экз. Зак. 509. Цена 6 руб.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»
129820, ГСП, Москва И-110, 1-й Рижский пер., 2.

Можайский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
г. Можайск, ул. Мира, 93.