

ДИНАМИКА И МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕТЕРОГЕКСАМЕРНЫХ КОЛЬЦЕВЫХ КОМПЛЕКСОВ БЕЛКОВ TIR49a/b С ДВУХНИТЕВОЙ ДНК

© А. С. Афанасьева,^{1, 2, 3, *} А. П. Якимов,^{2, 3} М. Ю. Григорьев,⁴ М. Г. Петухов^{2, 3}

¹Кафедра биофизики С.-Петербургского политехнического университета Петра Великого, 195251,

²Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, 188300,

³Институт нанобиотехнологий С.-Петербургского политехнического университета
Петра Великого, 195251,

⁴Лаборатория молекулярной биологии эукариот Университета Поля Сабатье,
Тулуза, Франция, F-31062;

* электронный адрес: arina.afan@gmail.com

Эволюционно-высококонсервативные белки TIR49a и TIR49b, принадлежащие к суперсемейству AAA⁺ ДНК-зависимых АТФаз, вовлечены во многие внутриклеточные процессы, такие как ремоделирование хроматина, регуляция транскрипции и клеточного деления во время митоза, поддержание стабильности генома, биогенез snoRNP, а также в образование активного комплекса теломеразы и ДНК. Показано, что эти белки принимают активное участие в сложных сетях белок-белковых взаимодействий и, несмотря на структурное сходство, в некоторых случаях выполняют противоположные функции. Несмотря на разнообразие проявляемых активностей, механизмы действия этих белков пока мало изучены. В настоящей работе с помощью методов молекулярного докинга впервые получены комплексы кольцевых гетерогексамерных структур белков TIR49a/b с короткими фрагментами двухнитевой ДНК (днДНК, 20 пар оснований различного GC-состава) в центральном канале и с помощью методов молекулярной динамики (МД) в периодическом водном боксе изучены конформационная динамика и механизмы геликазной активности этих белков. Было показано следующее: 1) взаимодействие с положительно заряженными белковыми петлями в центральном канале кольцевого гексамерного комплекса исследуемых белков приводит к раскручиванию спирали ДНК; 2) это раскручивание происходит только внутри гексамерного кольца, в то время как концы, находящиеся снаружи, в течение 50 нс МД сохраняют начальную конформацию классической В-формы; 3) присутствие АТФ в комплексе с белками TIR49a/b влияет на динамику и конечную структуру днДНК, приводя к разрыву части комплементарных связей в GC-бедных последовательностях ДНК.

Ключевые слова: молекулярная динамика, TIR49, структурные изменения, двухнитевая ДНК, гексамерный комплекс.

Высококонсервативные белки TIR49 принадлежат к суперсемейству AAA⁺-АТФаз, имеющих Р-петлю и связанных с разнообразными клеточными функциями, одной из которых является участие в механизмах клеточного деления и дифференцировки (Jha, Dutta, 2009). Они необходимы для жизнедеятельности дрожжей и высших эукариот и вовлечены в сложную сеть белок-белковых взаимодействий. Несмотря на высокий уровень структурного сходства, они проявляют противоположные активности во время регуляции транскрипции генов и эмбрионального развития. Общим свойством этих белков является способность перестраивать белки и (или) нуклеиновые кислоты с помощью их разворачивания и разборки (Gribun et al., 2008; Cheung et al., 2010; Huen et al., 2010). AAA⁺-белки содержат консервативные домены, способные к связыванию и гидролизу АТФ в олигомерном состоянии от димеров до додекамеров (Ikura et al., 2000). Связывание и гидролиз АТФ вызывают конформацион-

ные изменения, необходимые для транслокации или реконфигурации субстратов.

Белки TIR49a и TIR49b формируют таксономическую группу, свойства которой отличаются от других членов широкого семейства белков AAA⁺, и это может свидетельствовать о том, что указанные белки обладают уникальными свойствами, пока неизученными (Ammelburg et al., 2006). Эти белки вовлечены во множество клеточных процессов, таких как перестройка хроматина, репарация двухнитевых разрывов ДНК, регуляция транскрипции, поддержание стабильности генома, биогенезис snoRNA, сборка теломераз и клеточное деление во время митоза (Jha, Dutta, 2009). Они также играют важную роль в канцерогенезе (Huber et al., 2008). Каким образом пара этих консервативных белков принимает участие в таком большом диапазоне биологических процессов, остается в значительной степени неизвестным.

Неполная пространственная структура олигомерного комплекса белка TIR49a определена методами рентгеноструктурного анализа (Matias et al., 2006). Кристаллическая структура мономера белка человека TIR49a показала, что свернутый белок имеет три структурных домена — D1, D2 и D3. Структура содержит типичный AAA⁺-модуль, который образован двумя областями доменов D1 и D3. При этом домен D1 содержит Р-петлю, а центр связывания АТФ и состоит из типичного пятичленного β-листа, расположенного между α-спиралями. Конформация домена D3 также подобна многим другим белкам группы AAA⁺ и состоит из связки α-спиралей. В этой кристаллической структуре белок TIR49 находится в комплексе с АДФ, что позволяет прояснить механизмы связывания и гидролиза АТФ этими белками. Недавно были получены похожие неполные кристаллические структуры гексамерного кольцевого комплекса белков TIR49b, а также смешанного комплекса белков TIR49a/TIR49b с удаленным доменом D2 (Gribun et al., 2008; Petukhov et al., 2012).

АТФазная активность — это одно из ключевых свойств белков семейства TIR49. Однако, несмотря на присутствие всех важных структурных мотивов, характерных для «классических» представителей суперсемейства АТФаз AAA⁺, скорость гидролиза АТФ в белках TIR49 необычно мала (Parin et al., 2010; Afanasyeva et al., 2014). Механизм гидролиза АТФ в этих белках предполагает протекание нуклеофильной атаки активированных молекул воды на γ-фосфат АТФ и образование 5-координированного переходного состояния (Afanasyeva et al., 2014). Отрицательный заряд, накапливающийся вблизи γ-фосфата, компенсируется зарядом иона Mg²⁺ и зарядами доноров водородных связей (из боковых цепей аминокислотных остатков в активном сайте белка). Поэтому активные сайты этих АТФаз включают в себя аминокислотные остатки, способные к нуклеофильной активации воды, электрофильные группы, способные стабилизировать отрицательно заряженное переходное состояние, а также группы, осуществляющие координацию иона Mg²⁺, который является необходимым кофактором. Активные сайты этих АТФаз, как правило, содержат один или несколько «сенсоров», которые могут участвовать в реакции с АТФ, однако основная их функция заключается в получении информации о наличии или отсутствии γ-фосфата и в передаче сигнала к пространственно удаленным сайтам белка путем ряда конформационных перестроек.

Наши предварительные результаты показывают, что TIR49b человека и его дрожжевой ортолог Rvb2p кооперативно связывают ДНК в мономерном состоянии (Parin et al., 2010). Белки TIR49a/TIR49b имеют структурное сходство с бактериальным белком RuvB, гексамерные комплексы которого участвуют в процессе миграции структур Холлидея во время гомологичной рекомбинации и являются нуклеотидзависимыми АТФазами (Putnam et al., 2001; Hishida et al., 2004). Похожий механизм действия и у белков SV40 LTag (large tumor antigen), которые также являются членами семейства AAA⁺ и участвуют в процессе репликации вирусной ДНК. Эти белки формируют комплексы из двух гексамерных колец с длинным положительно заряженным внутренним каналом, в котором могут связываться как с одонитевыми, так и с двухнитевыми ДНК (онДНК и днДНК соответственно) (Li et al., 2003). Структура центральных каналов в RuvB и SV40 LTag напоминает структуру внутренних каналов гексамеров TIR49a/b. Поэтому цель настоящего

исследования состоит в том, чтобы установить взаимоотношение между связыванием ДНК белками TIR49, их олигомеризацией и АТФ-зависимой моторной деятельностью.

В нашей предыдущей работе мы показали, что диаметр центрального канала гексамерного кольца белков семейства TIR49 имеет достаточный размер (~2.4 нм — диаметр, измеренный относительно крайних точек на главной цепи белковых петель, расположенных внутри центрального канала) для связывания днДНК в классической В-форме (диаметр днДНК в классической В-форме 2.03 нм) (Petukhov et al., 2013). С помощью молекулярного докинга мы получили низкоэнергетическую структуру гексамерного комплекса TIR49a с коротким фрагментом днДНК (20 пар оснований) в центральном канале без стерических перекрытий с белковыми петлями, при этом днДНК расположена под наклоном ~12° относительно центральной оси гексамера. Межмолекулярный интерфейс взаимодействия с ДНК формируется за счет положительно заряженных подвижных петель белка.

Прояснение механизмов действия и различных биологических активностей белков TIR49 в живой клетке имело бы большое значение для фундаментальных биологических аспектов жизнедеятельности клетки, включая патологические изменения нормальных фенотипов. В настоящей работе с помощью методов молекулярного моделирования и молекулярной динамики мы предприняли попытку прояснить механизмы гидролиза АТФ в отсутствие и присутствии ДНК в гексамерных комплексах белков семейства TIR49.

Материал и методика

Полноатомные регуляризованные пространственные структуры комплексов TIR49a/b с фрагментом днДНК в центральном канале гексамерного кольца были получены на основе кристаллических структур белков семейства TIR49 (коды PDB: 2C9O и 3UK6) и структуры TIR49b человека, полученного с помощью моделирования по гомологии, как это описано ранее (Petukhov et al., 2012). Конформации неструктурированных петель рассчитывали с использованием стандартных протоколов моделирования петель ICM-Pro на основе Монте-Карло-минимизации конформационной энергии подвижных остатков петли с фиксированными концами. Во время минимизации энергии варьировали только стандартные торсионные углы аминокислот. Использовали стандартный для ICM набор энергетических параметров (потенциал ECEPP/3) для ван-дер-ваальсовых, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Положение короткого фрагмента днДНК в центральном канале гексамера было получено ранее с помощью методов молекулярного докинга (Petukhov et al., 2013).

Полученные таким образом пространственные структуры использовали в дальнейшем в качестве исходных конформаций для моделирования молекулярной динамики гексамеров TIR49a/b отдельно и в комплексе с ДНК и АТФ. В работе использовали стандартные методы и программное обеспечение для молекулярной динамики (МД) в периодическом водном боксе, а также написанные нами программы для обработки полученных траекторий МД. Расчеты МД проводили с использованием программного пакета AMBER 12 на высокопроизводительном много-

процессорном кластере Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (Москва), а также с использованием недавно появившейся технологии высокопроизводительных параллельных вычислений на графических картах, поддерживающих стандарт CUDA. Расчеты молекулярной динамики включали в себя несколько стандартных шагов, таких как: 1) создание файлов топологии исследуемых белков и их лигандов и подготовка исходных данных для запуска AMBER с помощью встроенного модуля LEaP; 2) создание модели гидратации комплекса АТФ—днДНК—TIP49a/b в периодическом водном боксе с минимальным расстоянием от поверхности белка до границ бокса 1 нм; 3) термодинамическое уравнивание системы и окружающего растворителя; 4) расчет молекулярной динамики при постоянной температуре с использованием силового поля AMBER ff99bsc0, дополненного для расчетов аминокислот и ДНК, и модели молекулы воды типа TIP3P (Lindorff-Larsen et al., 2010). Термодинамически уравновешенную систему использовали далее для моделирования молекулярной динамики при 37 °C длительностью 50 нс с шагом 2 фс. Текущее состояние системы сохраняли для последующего анализа через каждые 10 пс времени молекулярной динамики. Для расчетов электростатических взаимодействий использовали алгоритм PME-Switch с ограничением расстояния взаимодействия до 1.5 нм (как это реализовано в пакете программ AMBER). Для расчета температуры использовали алгоритм V-rescale (Bussi et al., 2007), а для расчета давления — алгоритм Парринелло—Рахмана (Parrinello, 1981; Nosé, Klein, 2006).

Геометрические параметры подвижной ДНК рассчитывали с помощью широко используемого программного пакета 3DNA, специально предназначенного для анализа структуры нуклеиновых кислот (Olson, 2003). 3DNA может обрабатывать структуры антипараллельных и параллельных двойных спиралей, одноцепочечных нуклеиновых кислот и других сложных мотивов третичной структуры ДНК и РНК. Процедура анализа включает в себя идентификацию и категоризацию всех комплементарных взаимодействий и классификацию параметров двойной спирали соответствующих пар оснований. Программа использует стандартную номенклатуру описания геометрии пар нуклеиновых кислот и точную матричную схему расчета локальных конформационных параметров и позволяет восстанавливать структуру ДНК на основе этих параметров. Кроме того, эта программа позволяет генерировать модель регулярной спирали на основе данных рентгеновских дифракционных измерений для различных повторяющихся последовательностей. Мы адаптировали 3DNA для расчета изменения основных локальных параметров цепи ДНК в ходе молекулярной динамики, таких как расстояние между соседними парами оснований в цепи ДНК вдоль главной оси (h) и угол поворота пары оснований ДНК относительно главной оси (ω_{DNA}). Число пар оснований, приходящихся на спиральный виток (N_{sub}), рассчитывали как $360^\circ/\omega_{\text{DNA}}$, значение шага спирали затем рассчитывали как $h \times N_{\text{sub}}$. Программа 3DNA рассчитывает локальные параметры h и ω_{DNA} для каждой пары баз, на основе которых мы вычисляли средние значения в нескольких зонах по длине ДНК с различной степенью растяжения (для более растянутой центральной части ДНК и менее растянутых концевых участков).

Обработку данных осуществляли с помощью специально созданной программы на языке сценариев `bash` в несколько шагов. На первом шаге из файла траектории

молекулярной динамики были перезаписаны PDB-файлы структуры ДНК, усредненной по десяти шагам молекулярной динамики через каждые 100 пс (чтобы избежать влияния случайных структурных колебаний, возникающих в ходе молекулярной динамики), с использованием стандартной утилиты `srrtgraj` из пакета AMBER. Затем для каждой структуры ДНК выполняли расчеты параметров ДНК с помощью программы 3DNA, после чего использовали выходные данные 3DNA для расчета шага спирали и числа пар оснований, приходящихся на оборот спирали.

Результаты и обсуждение

Динамика фрагментов днДНК в гетерогексамерных комплексах TIP49. В этой работе на основе имеющихся кристаллических структур исследуемых белков мы построили полноатомную модель гетерогексамерного комплекса TIP49a/b с чередующимися протомерами TIP49a и TIP49b, поместив днДНК с различным GC-составом в центральном канале, образованном гексамерным кольцом. Затем методом последовательных минимизаций энергии мы получили низкоэнергетическую структуру комплекса без каких-либо стерических затруднений (см. раздел «Материал и методика»). Для полученного комплекса мы провели несколько расчетов молекулярной динамики в периодическом водном боксе для ДНК с различным нуклеотидным составом («GCGC...», «ATAT...» и «ACAC...»).

В процессе молекулярной динамики мы наблюдали существенные структурные изменения фрагмента днДНК. Центральный участок ДНК-спирали, расположенный внутри канала, сформированного гексамерным кольцом, значительно удлинился (рис. 1), в то время как концевые участки ДНК, выступающие за пределы канала, сохранили начальную В-форму. Степень удлинения всего ДНК-фрагмента со 100%-ным содержанием GC-пар относительно небольшая (отношение длин растянутой формы к начальной форме 7.93 : 6.69 нм, что составляет примерно 1.2 от начальной длины), в то время как шаг спирали для центрального участка ДНК увеличился почти в 2 раза (с 3.24 для В-формы до 6.19 нм для растянутой конформации). Согласно данным, приведенным в исследовании механизмов растяжения ДНК (Lebrun, Lavery, 1996), максимальная степень растяжения днДНК со 100%-ным GC-составом составляет ~1.7 от первоначальной длины до начала разрыва комплементарных связей между основаниями. В нашем случае небольшое удлинение фрагмента днДНК является результатом частичного раскручивания спирали ДНК. Анализ полученных траекторий МД показал, что этот процесс происходит в основном в результате взаимодействия фосфатных цепей ДНК с боковыми цепями остатков белковых петель, расположенных внутри гексамерного кольца, богатых положительно заряженными остатками аргинина и лизина. Процесс раскручивания ДНК начинается с участка, расположенного напротив АТФ-связывающих сайтов белка. При этом петли белков, расположенные вблизи днДНК, проникают между ее фосфатными цепями со стороны большой бороздки и раздвигают цепи. Это сопровождается рядом перестроек боковых цепей аминокислотных остатков в петлях без значительных изменений конформации главной цепи. На рис. 2 приведены структуры ДНК-фрагментов с одной из белковых петель в разные моменты МД, показан поворот остатка аргинина (R339 в TIP49a или R334 в

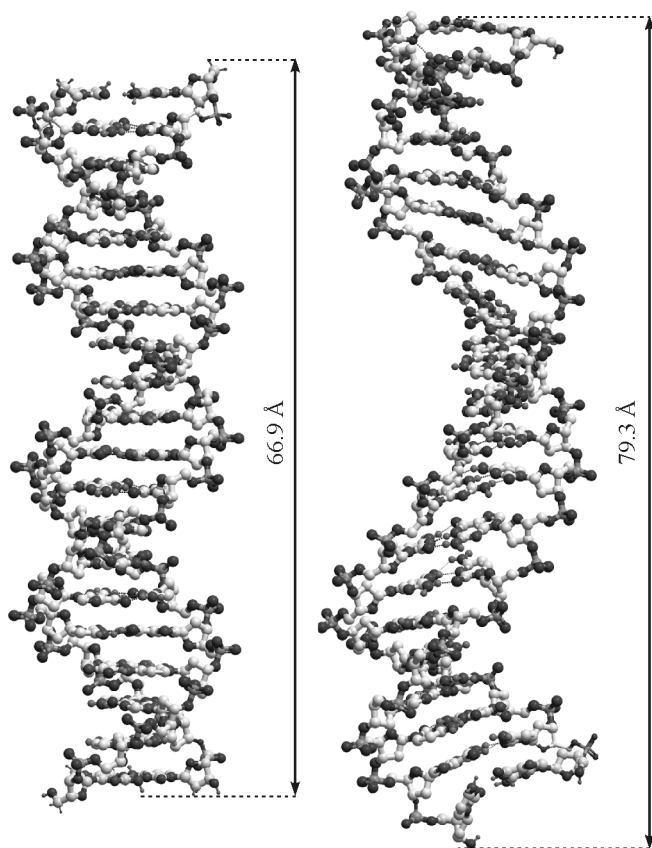


Рис. 1. Сравнение структуры ДНК-фрагмента после 50-наносекундной молекулярной динамики с начальной конформацией.

ТР49b) с образованием сети водородных связей. Боковые цепи окружающих остатков в петлях также изменяют конформацию, при этом происходит образование водородной связи между E342 и R339, а кроме того, E343 образует контакт с фосфатной цепью ДНК. Конечная структура ДНК напоминает структуру, полученную путем растяжения ДНК за 5'-5'-концы (Lebrun, Lavery, 1996). Необходимо отметить, что, согласно данным этой работы, растяжения за 3', 5'- и 3'—5'-концы приводят к различным конечным структурам днДНК.

Анализ водородных связей днДНК — белкового интерфейса, формирующегося в процессе моделирования

МД, показал, что ключевые остатки, образующие наиболее стабильные водородные связи с ДНК, это аргинины (R339 в ТР49а или R334 в ТР49b). В табл. 1 приведен список наиболее стабильных водородных связей между белком и ДНК, данные приведены по уменьшению величины заселенности водородных связей (доля от общего времени МД, когда соответствующая водородная связь существует). Интересно, что самые стабильные взаимодействия (по значению их заселенности) образуют R339 и R334 из различных субъединиц гексамера ТР49а/б. В основном происходит взаимодействие с фосфатной цепью ДНК, только аргинин из субъединицы А взаимодействует непосредственно с основаниями ДНК G11 из цепи I и G29 из цепи II, поскольку петля из субъединицы А расположена напротив большой бороздки ДНК.

Мы также исследовали изменение структурных характеристик днДНК в процессе МД, чтобы понять, как происходит процесс раскручивания спирали ДНК. На рис. 3, а показано изменение шага спирали, усредненное по трем участкам ДНК (центральный участок, расположенный внутри гексамерного канала: пары оснований с 6-й по 5-ю и концевые участки по 5 пар оснований, расположенные за пределами гексамерного кольца). Шаг спирали начальной структуры ДНК равен 3.24 нм (классическая В-форма), в процессе динамики шаг спирали центральной части днДНК увеличивается до 6.14 ± 0.54 нм, при этом примерно до 20 нс молекулярной динамики значение шага спирали равномерно возрастает, а затем достигает равновесного значения, и мы наблюдаем на графике флуктуации около среднего значения. Но за время моделирования МД шаг спирали хвостовых участков незначительно отклоняется от начального (среднее значение в течение всего времени динамики 3.56 ± 0.23 и 3.72 ± 0.52 нм для первого и второго концевых участков соответственно), что свидетельствует об устойчивости конформации участков ДНК, не взаимодействующих с белком. На рис. 3, б—г показаны основные структурные характеристики центрального (растянутого) участка ДНК: угол поворота пар оснований относительно главной оси ДНК (характеризует скрученность спирали), расстояние между соседними парами оснований вдоль главной оси ДНК и количество пар оснований, приходящихся на один виток спирали. Видно, что все характеристики претерпевают значительные изменения в процессе динамики, однако спиральный подъ-

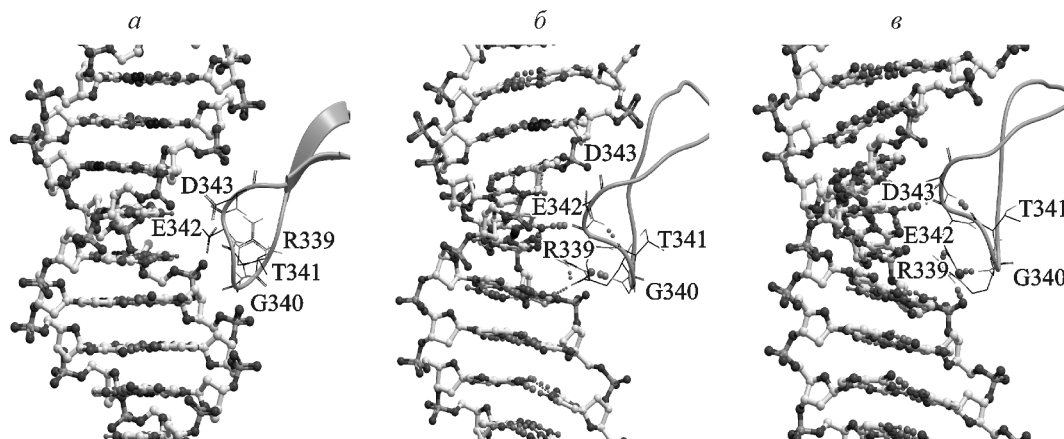


Рис. 2. Конформационные перестройки боковых остатков белковых петель в результате взаимодействия с ДНК в процессе молекулярной динамики в моменты 0 (а), 15 (б) и 30 (в) нс.

Таблица 1

**Параметры наиболее стабильных водородных связей, формирующихся между ДНК и белком
в процессе молекулярной динамики**

Донор водородной связи (белок)				Акцептор водородной связи (ДНК)			Длина водородной связи, нм	Заселенность, %
номер остатка	субъединица	донор	водород донорской группы	номер основания	акцептор	структурная часть нуклеотида		
R334	B	NH1	H12	29	O2P	Фосфат	0.283	92.84
R339	E	»	»	13	O1P	»	0.293	85.67
R334	B	NH2	H22	29	O2P	»	0.299	85.12
R339	E	»	»	13	»	»	0.293	85.12
	A	»	H21	11	O6	Основание	0.288	81.25
R334	D	NH1	H12	14	O1P	Фосфат	0.282	80.26
	D	NH2	H22	14	»	»	0.305	68.83
	F	NH1	H12	12	O2P	»	0.290	67.88
	D	NH2	H22	13	O3'	»	0.304	59.11
R339	A	»	»	29	O6	Основание	0.291	56.56
R334	B	»	»	29	O5'	Фосфат	0.308	49.49
R339	A	NE	HE	11	N7	Основание	0.316	38.15
R334	F	NH2	H22	12	O2P	Фосфат	0.299	37.26
R339	A	NH1	H12	29	O6	Основание	0.309	32.55
	E	»	»	13	O2P	Фосфат	0.317	32.03
	E	»	»	12	O3'	»	0.321	30.19
	A	NE	HE	11	O6	Основание	0.317	26.74
	C	NH2	H21	31	O2P	Фосфат	0.285	23.33
	E	»	H22	12	O3'	»	0.328	19.98
R334	B	»	H21	30	O2P	»	0.286	18.84
R339	C	NE	HE	31	»	»	0.303	15.43
	C	»	»	31	O1P	»	0.307	10.91
	E	NH2	H22	13	»	»	0.329	10.67
	A	»	H21	30	N4	Основание	0.319	10.54
	B	NE	HE	30	O2P	Фосфат	0.318	9.47

ем изменяется в меньшей степени по сравнению со значением скрученности, особенно на фоне тепловых флуктуаций значения спирального подъема. График изменения шага спирали (рис. 3, а) похож на инвертированный график спиральной скрученности (рис. 3, в). Таким образом, основные структурные изменения ДНК связаны с уменьшением скрученности спирали ДНК, т. е. наблюдается раскручивание днДНК.

Динамика комплекса TP49a/b—днДНК с АТФ в АТФ-связывающих сайтах белка. Была проведена серия экспериментов по молекулярной динамике комплекса смешанного гетерогексамера TP49a/b с фрагментами днДНК как в присутствии, так и в отсутствие АТФ в АТФ-связывающем сайте. Результаты этих вычислительных экспериментов показали, что присутствие АТФ в комплексе сильно влияет на динамику связанного в центральном канале смешанного гетерогексамера TP49a/b—днДНК (рис. 4). В частности, для днДНК со 100 %-ным АТ-составом (повторяющийся мотив 'АТАТ') наблюдается разрыв части водородных связей между основаниями, ведущий к потере спаренного состояния на ограниченном участке ДНК (7—10-я пары оснований), при этом в комплексах без АТФ в этом случае наблюдается только раскручивание спирали ДНК с сохранением

сопряженного состояния оснований ДНК. Можно предположить, что такие структурные изменения являются результатом электростатического эффекта от присутствия АТФ в комплексе — дополнительный отрицательный заряд приводит к локальному отрицательному смещению электростатического потенциала на протон-донорных группах ДНК оснований. Этот эффект приводит к ослаблению и разрушению водородных связей между парами оснований ДНК в том месте центрального канала, где сдвиг потенциала максимальный. В результате разрыва комплементарных связей потерявшие спаренное состояние основания проникают друг под другом, образуя взаимодействия ароматических колец азотистых оснований. Расчеты электростатического потенциала в точке, расположенной на центральной оси центрального канала в наиболее электроотрицательной зоне, показали, что в исследуемом гексамерном комплексе в отсутствие АТФ значение электростатического потенциала в АТФ-связывающих сайтах около -5.9 ккал/е, а в присутствии АТФ это значение уменьшается до -9.0 ккал/е. Этот сдвиг электростатического потенциала на -3.1 ккал/е может объяснить наблюдаемую разницу в динамике днДНК в центральном канале смешанного гетерогексамера TP49a/b.

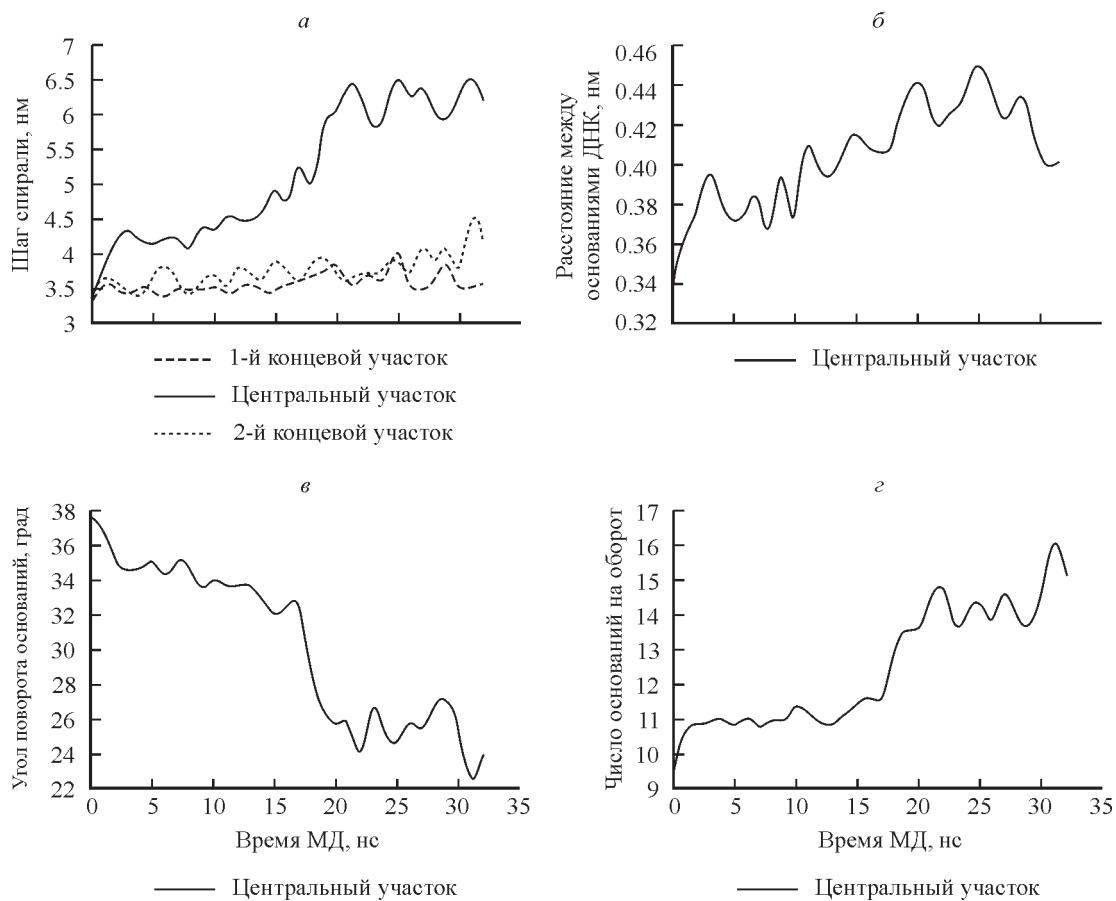


Рис. 3. Изменение основных структурных характеристик ДНК в процессе молекулярной динамики.

a — шаг спирали для различных участков ДНК; *б* — расстояние между соседними парами оснований ДНК для центрального участка; *в* — угол скрученности спирали относительно главной оси ДНК; *г* — число пар оснований, приходящихся на один оборот спирали.

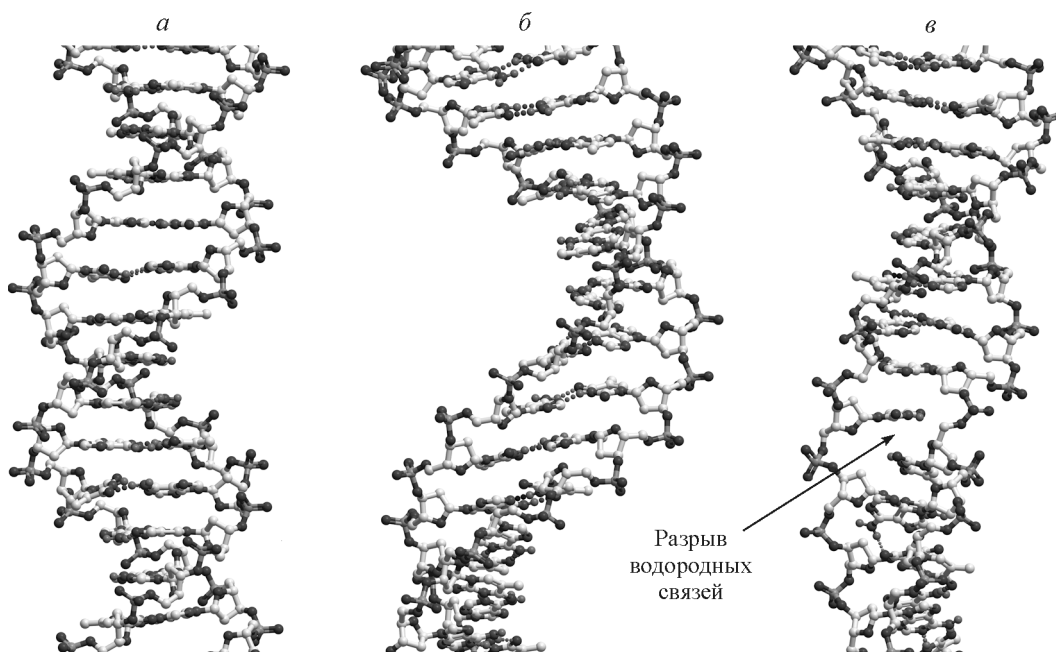


Рис. 4. Различия конечной структуры ДНК после 50-наносекундной молекулярной динамики в присутствии или в отсутствие АТФ в составе белкового комплекса.

a — начальная структура ДНК; *б* — после МД без АТФ; *в* — после МД в присутствии АТФ.

Таблица 2

Сравнение структурных параметров растянутой ДНК в различных формах

Форма ДНК	Спиральный угол, град	Сдвиг соседних нуклеотидов вдоль главной оси ДНК (h), нм	Число пар нуклеотидов, приходящихся на виток спирали (N _{sub})	Шаг спирали ДНК, нм
B-форма	37.21	0.341	9.67	3.30
TIP49a/b	25.36	0.425	14.47	6.14
RecA ^a	30.61	0.338	11.76	3.98
N-форма ^b	19.25	0.510	18.61	9.50
S-форма ^b	28.72	0.511	12.59	6.43
3'—3'-растяжение ^b	21.76	0.596	16.54	9.86
5'—5'-растяжение ^b	19.87	0.488	18.11	8.84

^a Структура двухнитевой ДНК в комплексе с филаментом RecA (Chen et al., 2008), код в базе данных кристаллических структур PDB: 3СМХ; ^b N- и S-формы растянутой ДНК из работы, посвященной изучению механизмов гомологического распознавания однострессовой и двухнитевой ДНК в комплексах с филаментом RecA (Nishinaka et al., 1998); ^c структуры растянутых за 3'—3'- и 5'—5'-концы дндНК GC-состава (Lebrun, Lavery, 1996).

В случае дндНК со 100 %-ным GC-составом также наблюдается разрыв части водородных связей между основаниями нуклеиновых кислот, однако электростатическое влияние АТФ недостаточно для полного разрыва комплементарных связей между GC-парами и не приводит к потере спаренного состояния оснований. В результате структура дндНК в присутствии АТФ в комплексе удлиняется в меньшей степени, чем ДНК с высоким содержанием АТ-пар.

Заключение. Мы исследовали конформационную стабильность гетерогексамерного комплекса TIP49a/b с помощью 50-наносекундного моделирования МД и сравнили структурные характеристики полученной в результате динамики структуры ДНК в комплексе с TIP49 (той части ДНК, которая подверглась частичному раскручиванию в результате взаимодействия с положительно заряженными остатками белковых петель в центральном канале гексамерного кольца) с другими формами растянутых ДНК. Эти формы известны из исследований процессов гомологической рекомбинации в комплексах RecA с онДНК и дндНК (Nishinaka et al., 1998; Chen et al., 2008), а также из исследования механизмов экстремального растяжения ДНК (Lebrun, Lavery, 1996). Белки RecA образуют филаменты на дндНК в присутствии АТФ, при этом частично раскручивают и растягивают спираль ДНК. Полученная нами структура по основным геометрическим параметрам ближе всего к так называемой S-форме дндНК (Nishinaka et al., 1998). Согласно данным этой работы, S-форма ДНК соответствует неактивному состоянию филамента RecA в комплексе с АДФ (табл. 2).

Важным результатом оказалось то, что присутствие АТФ в составе комплекса оказывает значительное влияние на структурные изменения в ДНК, приводя к разрыву некоторых комплементарных связей между основаниями ДНК, особенно в случае дндНК с высоким содержанием АТ-пар, что может играть значительную роль в механизмах геликазной активности этих белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-34-00023). Расчеты молекулярной динамики осуществляли с использованием многопроцессорного кластера Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (Москва).

Список литературы

- Afanasyeva A., Hirtreiter A., Schreiber A., Grohmann D., Pobegalov G., McKay A. R., Tsaneva I., Petukhov M., Kas E., Grigoriev M., Werner F. 2014. Lytic water dynamics reveal evolutionarily conserved mechanisms of ATP hydrolysis by TIP49 AAA+ ATPases. *Structure*. 22 : 549—559.
- Ammelburg M., Frickey T., Lupas A. N. 2006. Classification of AAA+ proteins. *J. Struct. Biol.* 156 : 2—11.
- Bussi G., Donadio D., Parrinello M. 2007. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 126 : 014101.
- Chen Z., Yang H., Pavletich N. P. 2008. Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature*. 453 : 489—494.
- Cheung K. L., Huen J., Houry W. A., Ortega J. 2010. Comparison of the multiple oligomeric structures observed for the Rvb1 and Rvb2 proteins. *Biochem. Cell Biol.* 88 : 77—88.
- Gribun A., Cheung K. L., Huen J., Ortega J., Houry W. A. 2008. Yeast Rvb1 and Rvb2 are ATP-dependent DNA helicases that form a heterohexameric complex. *J. Mol. Biol.* 376 : 1320—1333.
- Hishida T., Han Y.-W., Fujimoto S., Iwasaki H., Shinagawa H. 2004. Direct evidence that a conserved arginine in RuvB AAA+ ATPase acts as an allosteric effector for the ATPase activity of the adjacent subunit in a hexamer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 101 : 9573—9577.
- Huber O., Menard L., Haurie V., Nicou A., Taras D., Rosenbaum J. 2008. Pontin and reptin, two related ATPases with multiple roles in cancer. *Cancer Res.* 68 : 6873—6876.
- Huen J., Kakiyama Y., Uguw F., Cheung K. L., Ortega J., Houry W. A. 2010. Rvb1-Rvb2 : essential ATP-dependent helicases for critical complexes. *Biochem. Cell Biol.* 88 : 29—40.
- Ikura T., Ogryzko V. V., Grigoriev M., Groisman R., Wang J., Horikoshi M., Scully R., Qin J., Nakatani Y. 2000. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell*. 102 : 463—473.
- Jha S., Dutta A. 2009. RVB1/RVB2: running rings around molecular biology. *Mol. Cell*. 34 : 521—533.
- Lebrun A., Lavery R. 1996. Modelling extreme stretching of DNA. *Nucleic Acids Res.* 24 : 2260—2267.
- Li D., Zhao R., Lilyestrom W., Gai D., Zhang R., DeCaprio J. A., Fanning E., Jochimiak A., Szakonyi G., Chen X. S. 2003. Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen. *Nature*. 423 : 512—518.
- Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K., Maragakis P., Klepeis J. L., Dror R. O., Shaw D. E. 2010. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins*. 78 : 1950—1958.

Lu X. J., Olson W. K. 2003. 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures. *Nucleic Acids Res.* 31 : 5108—5121.

Matias P. M., Gorynia S., Donner P., Carrondo M. A. 2006. Crystal structure of the human AAA⁺ protein RuvBL1. *J. Biol. Chem.* 281 : 38 918—38 929.

Nishinaka T., Shinohara A., Ito Y., Yokoyama S., Shibata T. 1998. Base pair switching by interconversion of sugar puckers in DNA extended by proteins of RecA-family: a model for homology search in homologous genetic recombination. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95 : 11 071—11 076.

Nosé S., Klein M. L. 2006. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. *Mol. Phys.* 50 : 1055—1076.

Papin C., Humbert O., Kalashnikova A., Eckert K., Morera S., Kas E., Grigoriev M. 2010. 3'- to 5'-DNA unwinding by TIP49b proteins. *FEBS J.* 277 : 2705—2714.

Parrinello M. 1981. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Physics.* 52 : 71—82.

Petukhov M., Dagkessamanskaja A., Bommer M., Barrett T., Tsaneva I., Yakimov A., Queval R., Shvetsov A., Khodorkovskiy M., Kas E., Grigoriev M. 2012. Large-scale conformational flexibility determines the properties of AAA⁺TIP49 ATPases. *Structure.* 20 : 1321—1331.

Petukhov M., Ilatovskiy A., Artamonova T., Afanasieva A., Yakimov A., Khodorkovskiy M., Kas E., Grigoriev M. 2013. Dynamics of the dsDNA/TIP49a hexameric complexes. *FEBS J.* 280 : 156.

Putnam C. D., Clancy S. B., Tsuruta H., Gonzalez S., Wetmur J. G., Tainer J. A. 2001. Structure and mechanism of the RuvB Holliday junction branch migration motor. *J. Mol. Biol.* 311 : 297—310.

Поступила 25 V 2015

DYNAMICS AND MECHANISMS OF INTERACTION OF HETERO-HEXAMERIC TIP49a/b COMPLEXES WITH DS-DNA

A. S. Afanasyeva,^{1, 2, 3, *} A. P. Yakimov,^{2, 3} M. Yu. Grigoriev,⁴ M. G. Petukhov^{2, 3}

¹ Department of Biophysics, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251,

² Petersburg Nuclear Physics Institute B. P. Konstantinov NRC «Kurchatov Institute», Gatchina, 188300,

³ Institute of Nanobiotechnology, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251,

and ⁴ Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote,

F-31000 Toulouse, France;

* e-mail: arina.afan@gmail.com

Evolutionary conserved TIP49a and TIP49b ATPases belong to the AAA⁺ superfamily of DNA-dependent ATPases that are involved in many cellular processes such as chromatin remodeling, regulation of transcription and cell division during mitosis, the maintenance of genome stability, snoRNP biogenesis, and participate in the formation of active form of telomerase. These proteins are involved in the complex networks of protein-protein interactions and, in spite of high structural similarity, in some cases, can perform opposite functions. Despite of the variety of their different activities, the exact mechanisms of action of TIP49a and TIP49b are still poorly understood. In this paper, by means of molecular docking approaches we first modeled the structures of hetero-hexameric TIP49 complexes with short ds-DNA fragments (20 base pairs with different GC content) within the central channel of hexameric ring. Using molecular dynamics simulations in the periodic water box (MD) we investigated conformational dynamics and mechanisms of DNA unwinding activity of these proteins. We shown that: a) the interaction between the positively charged protein loops and DNA within the central channel of protein ring leads to the partial unwinding of the DNA helix; b) DNA unwinding occurs only in the region within the protein ring, while the terminal parts of DNA outside the protein complex remain in its initial b-form conformation; c) the presence of ATP in the active sites of protein complex affects both the dynamics and the structure of DNA, leading to the breakage of some complementary bonds in AT-rich DNA sequences.

Key words: molecular dynamics, TIP49, structural changes of DNA, hexameric complex.