

## A-DNA

V. I. IVANOV

*Being discovered more than 40 years ago, the A form of DNA is beginning to unravel its biological secrets.*

**Открытая более 40 лет назад А-форма двойной спирали ДНК начинает раскрывать свои биологические секреты.**

## А-ДНК

В. И. ИВАНОВ

Московский физико-технический институт

### ВВЕДЕНИЕ

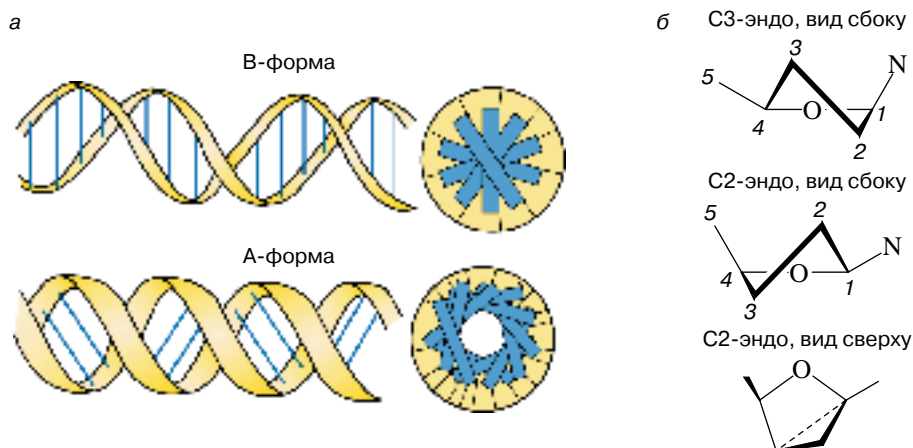
Модель двойной спирали ДНК Уотсона и Крика (так называемая В-форма ДНК) была построена в 1953 году. Она наглядно продемонстрировала, как устроены гены и как они удваиваются при делении клетки. Так возникла новая область науки — молекулярная биология. Менее известно, что еще до открытия двойной спирали Розалинда Франклин из Лондонского королевского колледжа получила экспериментальные свидетельства существования весьма упорядоченной структуры в ориентированных вытягиванием и подсушенных волокнах ДНК. Эта структура, пространственное строение которой тогда еще не было установлено, получила название А-формы ДНК. Биологи мало интересовались А-формой, считая ее небольшим искажением модели Уотсона—Крика для В-ДНК. К тому же А-ДНК возникала при малой влажности, то есть не при физиологических условиях — ведь в клетке воды много.

Но если не ограничиваться теми параметрами А-ДНК, которые обычно приведены в учебниках: 11 пар на виток, наклон пары к оси спирали  $70^\circ$ , диаметр спирали около  $20 \text{ \AA}$ , что действительно близко к В-ДНК: 10 пар на виток,  $90^\circ$ , диаметр  $20 \text{ \AA}$  соответственно, то А-ДНК существенно отличается по своей структуре от уотсон-криковской В-ДНК (рис. 1). Дело в том, что пары оснований в А-форме очень сильно отодвинуты от оси спирали к периферии молекулы — почти на половину радиуса; сдвиг достигает  $4\text{--}5 \text{ \AA}$ . В В-ДНК он близок к нулю, поэтому А-ДНК при взгляде сверху (вдоль оси спирали) выглядит как труба (рис. 1, а). Столь яркое различие В- и А-форм не позволяет считать А-форму некоторым искажением В-формы и заставляет задумываться о биологической роли А-ДНК.

Между тем кристаллографы выяснили молекулярную механику, ответственную за “дыру” в центре спирали А-формы. Оказалось, что пятиугольное сахарное кольцо дезоксирибозы имеет разные конфигурации в В- и А-ДНК и играет роль переключателя с двумя устойчивыми состояниями: С2-эндо — у В-формы и С3-эндо — у А-формы (рис. 1, б). При переключении из первого состояния во второе пары оснований скачком отодвигаются от оси двойной спирали, поскольку сахарные кольца непосредственно соединены с основаниями ДНК.

### А-СЕМЕЙСТВО И В-СЕМЕЙСТВО

Дальнейшие исследования структур двойной спирали в растворе, а также теоретические расчеты показали, что на самом деле существуют не просто



**Рис. 1.** а – схематическое изображение А- и В-формы ДНК. Синим цветом обозначены пары оснований. Справа – вид вдоль оси спирали; слева – вид перпендикулярно оси спирали. Обратите внимание на большое отверстие в центре А-ДНК из-за того, что в А-форме пары оснований отодвинуты от оси спирали; б – две устойчивые конфигурации сахарного кольца ДНК. Сахар С3'-эндо встречается в А-форме, С2'-эндо – в В-форме. Цифры – нумерация атомов сахарного кольца – пентозы. N – атом азота основания, соединенный гликозильной связью с сахаром – дезоксирибозой

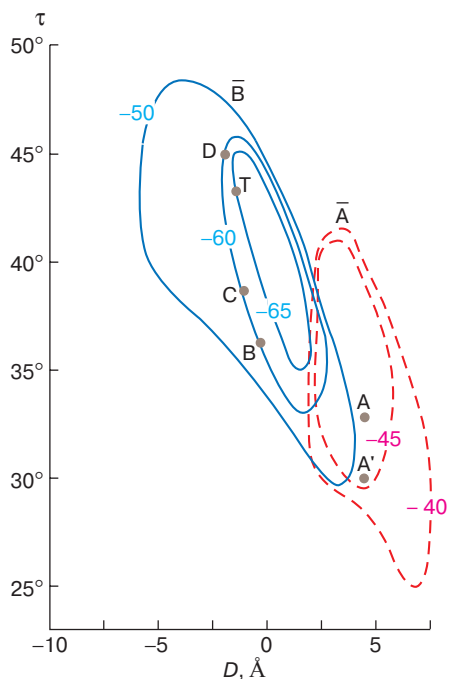
две формы (А и В), но два обширных семейства форм: А- и В-семейство. Структуры в пределах каждого из семейств в зависимости от условий (например, концентрации соли, температуры) могут иметь разное число пар, приходящихся на виток спирали, разный наклон пар оснований к оси спирали и т.д. Но все формы А-семейства характеризуются большим расстоянием пар оснований от оси спирали.

Взаимоотношение форм А- и В-семейств лучше всего видно на так называемой конформационной карте, представленной на рис. 2. Карта для двойной спирали ДНК была впервые построена В.Б. Журкиным, Ю.П. Лысовым и автором этой статьи с помощью компьютерного теоретического расчета возможных допустимых спиралей ДНК, то есть таких, у которых атомы не “налезают” друг на друга. Конформационная карта аналогична рельефной географической карте, только вместо параллелей у нас будут величины углов поворота между соседними парами оснований двойной спирали, вместо меридианов – расстояния пар оснований от оси спирали, а вместо уровней равной высоты рельефа – уровни равной энергии двойной спирали в расчете на одну пару оснований.

На рис. 2 видны овальные области – овраги: северо-западный овраг содержит энергетически допустимые формы В-семейства; юго-восточный – формы А-семейства. Внутренние овалы в каждом из оврагов охватывают формы, самые выгодные энергетически. Внешние овалы включают в себя формы менее выгодные, но все же допустимые. Части карты вне оврагов пусты, здесь спирали ДНК вообще не могут существовать, так как имеют слишком невыгодную энергию. Мы видим, что найденные в эксперименте формы (точки на карте) находятся либо на дне оврагов, либо поблизости. Классичес-

кая В-форма – с углом поворота между парами  $\tau = 36^\circ$  (получается делением полного витка  $360^\circ$  на 10 пар, приходящихся в В-форме на виток). Расстояние пар от оси в В-форме  $D = 0 \text{ \AA}$ . Глядя на карту (рис. 2), видно, что В-форма находится вблизи южного конца самой глубокой части В-оврага. Наиболее тугозакрученные формы В-семейства с  $\tau = 45^\circ$  расположены у северного края дна В-оврага. Что касается А-семейства, то его овраг заполнен известными А-спиралями лишь в южной части. Это означает, что могут быть открыты и новые, более закрученные формы А-семейства. И действительно, такие участки А-спирали обнаружены в последние годы в кристаллах коротких (6–10 пар оснований) образцов ДНК. Обратите внимание на западную границу А-оврага. Она строго вертикальна и расположена вдоль линии со значением  $D = 2,5 \text{ \AA}$  (рис. 2). Поскольку параметр  $D$  – это расстояние пар оснований от оси спирали, то не может существовать никаких форм А-семейства (в том числе еще неоткрытых в эксперименте) с парами в центре спирали, как, например, в В-форме ( $D = 0 \text{ \AA}$ ).

На основе сказанного выше уместно рассмотреть проблему соотношения теории и эксперимента. Мы видим, что теория и эксперимент дополняют друг друга. И в самом деле, эксперимент (кристаллографический) открыл В- и А-формы ДНК. Теория (здесь это компьютерный конформационный анализ) только утверждает, чего не может быть. В данном случае не могут реально существовать двойные спирали с параметрами вне оврагов карты  $\{D, \tau\}$  из-за того, что возникают недопустимо тесные контакты атомов ДНК друг с другом. На первый взгляд может показаться, что это говорит о примате эксперимента над теорией, которая только что-то запрещает. Но вспомним: во всех обнаруженных в



**Рис. 2.** Области существования форм В- и А-семейств по результатам компьютерного моделирования. Ордината – угол поворота между соседними парами оснований  $\tau$ . Абсцисса – расстояние пар от оси спирали  $D$ . В В-форме, у которой ось спирали проходит в центре тяжести пары, величину  $D$  принимают равной нулю. Поэтому в зависимости от того, в какую сторону от оси спирали сдвинуты пары, величина  $D$  может быть как положительной (например, все формы А-семейства), так и отрицательной. Черта над буквами А и В на карте обозначает, что мы имеем дело со всем семейством А- или В-форм, а не с конкретной А- или В-формой. Линии овалов – границы областей равной энергии: сплошные – для форм В-семейства, пунктир – для форм А-семейства. Цифры у линий – энергия в ккал/моль согласно расчетам. Имеет значение лишь их относительная величина. Точки внутри областей – оврагов (В, С, Т, D, А, А') относятся к различным формам В- и А-семейств, обнаруженным в рентгеноструктурных исследованиях ориентированных волокон ДНК и РНК. Обратите внимание на левую вертикальную границу оврага А-форм. Она означает, что во всех формах А-семейства пары оснований сдвинуты от оси спирали на значительное расстояние

эксперименте формах А-семейства пары оснований сильно отодвинуты от оси. Сколько бы такого рода форм ни было обнаружено, всегда найдутся скептики, которые скажут: “Кто знает, может быть, в будущих экспериментах мы найдем А-формы (то есть с сахаром 3-эндо), пары оснований которых будут расположены вблизи оси спирали?” Однако теория утверждает, что такого быть не может, так как западная граница форм А-семейства на карте  $\{D, \tau\}$  не приближается к оси спирали ближе, чем на 2,0 Å.

Расчеты показывают, что вдоль дна оврагов карты  $\{D, \tau\}$  энергия меняется слабо. Это означает, что

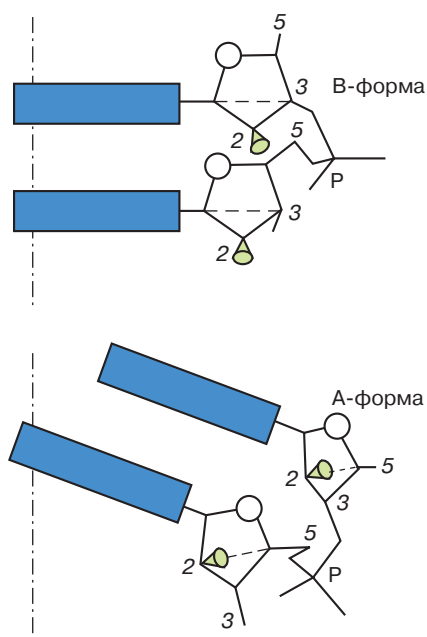
даже небольшое воздействие может менять конформацию спирали в пределах В- и А-семейств. В частности, даже тепловое движение при физиологических температурах приводит к флуктуациям угла закрутки двойной спирали  $\tau$  на  $5^\circ$ , что почти охватывает все протяжение дна оврага для В-семейства. Этот результат также подтверждается экспериментом. Такой вывод коренным образом меняет представление о двойной спирали ДНК как о жесткой структуре, содержащей 10 пар на виток в В-форме и 11 пар в А-форме. Итак, теория и эксперимент, взаимно дополняя друг друга, позволяют исследовать природу вещей. Как говорил М.В. Ломоносов, “согласие всех причин есть самый общий закон природы”.

### А-ФОРМА НАЧИНАЕТ ИНТЕРЕСОВАТЬ БИОЛОГОВ

Как всегда, открытие было неожиданным. Занимаясь рутинной работой, кристаллографы начали интересоваться РНК. Хотя РНК, как правило, представляет собой одну нить, эта нить, навиваясь сама на себя, может образовывать короткие участки двойной спирали. Стали исследовать двуспиральную РНК. Оказалось, что двойная спираль из цепей РНК имеет структуру А-формы и, что замечательно, даже при 100%-ной влажности, при которой ДНК всегда в В-форме! Итак, спирали РНК – второй важнейшей нуклеиновой кислоты существуют в А-форме при физиологических условиях. Это открытие сразу поставило А-конформацию в ряд биологически значимых. Интересен вопрос, почему ДНК может принимать в зависимости от влажности и В- и А-форму, а РНК – только А-форму? Ответ дает рис. 3. Дело в том, что дополнительная 2'-ОН-группа рибозы создает пространственные затруднения именно в структуре В-, но не А-формы.

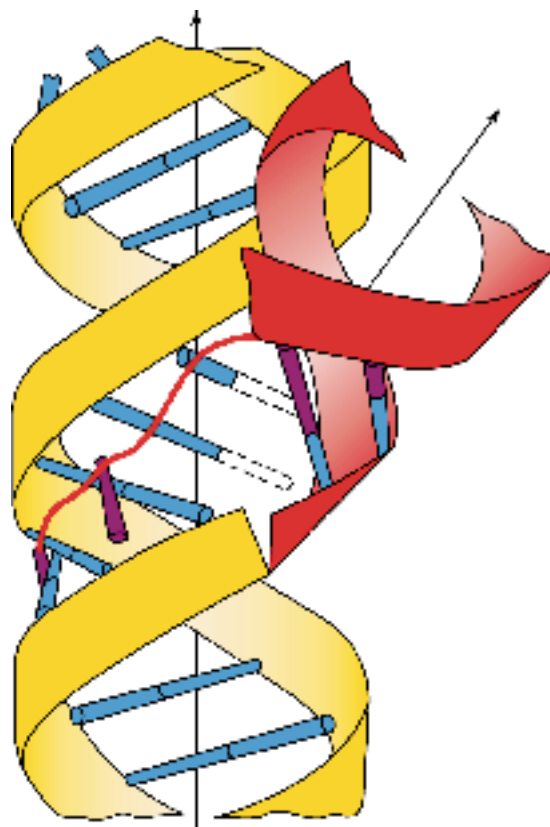
Однако нас все-таки больше интересует А-ДНК. Играет ли она биологическую роль? Двуспиральные РНК – это А-форма, а какую форму имеет гибрид из одной нити РНК и одной нити ДНК? Вопрос не праздный, он имеет и биологический интерес. Известно, что репликация ДНК начинается с синтеза короткой РНК (потом она удаляется). Эта РНК образует гибридную двойную спираль с одной из расплетенных нитей ДНК. Какова будет ее форма? Поскольку цепь ДНК может принимать обе формы: А и В, в то время как цепь РНК – только А-форму, естественно ожидать, что цепь РНК заставит цепь ДНК также принять А-форму.

Гибрид РНК–ДНК должен возникать и в процессе транскрипции, то есть при считывании РНК по ДНК гена. Развивая эту идею, В.Л. Флорентьев и автор статьи продемонстрировали на молекулярных моделях, что извлечение оснований наружу из двуспиральной ДНК для спаривания с основаниями растущей цепи РНК осуществить легче, если прилежащий участок ДНК-матрицы находится в А-форме



**Рис. 3.** Пространственная структура соседних звеньев одной полинуклеотидной цепи в В- и А-формах. Штрихпунктир слева – ось спирали. Прямоугольники – азотистые основания. Пунктир в пятичленном сахарном кольце – линия сгиба для С2-эндо (В-семейство) и С3-эндо (А-семейство). Цифры – нумерация атомов сахара. Отметим, что заместитель в положении 2 большего размера, чем водород, не помещается в тесном пространстве, угловленном для него в В-форме. В А-форме этот заместитель “смотрит” наружу и тем самым не имеет тесных контактов. Поэтому двойная спираль РНК, содержащая в положении 2 группу ОН, может быть только в А-форме

(рис. 4). Недавно В.Б. Журкин предложил модифицировать эту модель в том отношении, что основания растущей цепи РНК взаимодействуют не с одной нитью ДНК, а сразу с двумя, образуя так называемый параллельный триплекс с А-подобной геометрией нитей. Правда, следует сказать, что наличие А-формы или подобной ей конформации при работе РНК-полимеразы пока не доказано. Но зато это доказано в 1993 году методом кристаллографии для другого матричного фермента – обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вызывающего СПИД. Известно, что этот фермент синтезирует не только нить ДНК по матрице РНК, но также и нить РНК по двуспиральной ДНК, то есть может работать как обычная РНК-полимераза. Сотрудники Национального института здоровья (США) закристаллизовали этот белок в комплексе с участком его связывания на ДНК из 19 пар оснований. В расшифрованной пространственной структуре такого комплекса четко видно, что половина ДНК находится в А-форме, а другая половина – в В-форме, так что между ними возникает В/А-граница.



**Рис. 4.** Гипотетическая модель для взаиморасположения матрицы ДНК и гибридного участка ДНК–РНК при работе РНК-полимеразы. Вертикальная спираль – участок матрицы ДНК в А-форме; Короткая наклонная спираль справа от матрицы ДНК – гибрид РНК–ДНК. Синие цилиндры символизируют основания ДНК, сиреневые – РНК. Поэтому цилиндры, состоящие из сиреневых и синих половинок, относятся к гибриду РНК–ДНК. А-подобная спираль ДНК–РНК состоит из двух пар и продолжена за пределы этой величины, чтобы показать взаимное расположение спиралей матрицы ДНК и гибрида ДНК–РНК

Это открытие доказало, что биологическая роль А-ДНК далее не может быть проигнорирована.

Еще раньше, в 1991 году, А-ДНК была обнаружена в биологическом объекте, где ее возникновения никто не ожидал даже теоретически (в отличие от рассмотренных выше процессов матричного синтеза). Известно, что в неблагоприятных условиях некоторые бактерии превращаются в споры. В таком неактивном состоянии они могут находиться сколь угодно долго, пока не появятся подходящие условия для размножения. В этом состоянии их ДНК окутана так называемыми споровыми белками. С. Мор из Бостонского университета (США) и его коллеги, используя оптические методы, убедительно показали, что ДНК при этом находится в А-форме. Спрашивается, зачем? (В биологии такой вопрос

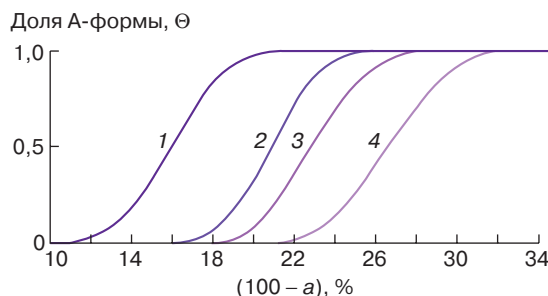
правомерен.) Оказывается, незадолго до этого исследования было обнаружено, что ДНК в спорах гораздо устойчивее к поражающему действию ультрафиолетового излучения, чем та же ДНК в бактериях, активно размножающихся. Почти в то же самое время выяснили, что А-ДНК примерно в 10 раз более устойчива к поражающему действию ультрафиолетового излучения, чем В-ДНК. Концы сходятся с концами: споровые белки превращают ДНК бактерии из В- в А-форму, чтобы защитить ДНК. Это один из немногих примеров, где биологическая роль А-формы проступает особенно явно. Есть и другие примеры, когда А-ДНК была найдена в биологических структурах или процессах. Их количество все возрастает.

### А-ЛЮБИВЫЕ И В-ЛЮБИВЫЕ УЧАСТКИ ДНК

Коль скоро А-ДНК биологически значима и ее роль вряд ли ограничивается частными примерами, приведенными в предыдущем разделе, закономерен вопрос: как способность ДНК превращаться из В- в А-форму зависит от последовательности нуклеотидных пар в ее цепях? Конечно, этот вопрос можно задавать независимо от того, имеет ли биологическое значение А-ДНК, но выяснение, какие последовательности способствуют, а какие препятствуют В-А-переходу в ДНК, интересно прежде всего именно для биологии. Конечная цель заключается в том, чтобы для любой заданной последовательности оснований ДНК предсказать ее способность к В-А-переходу. К счастью, несколько лет назад появилась возможность количественно решить эту задачу — стало возможно получать образцы ДНК нужной нам длины (10–20 пар оснований) и требуемой нуклеотидной последовательности. Так как в А-форму переходит двойная спираль ДНК, то нужно иметь две комплементарные друг другу нити заданной длины. Отдельная нить имеет направление, которое принято обозначать стрелкой, смотрящей от 5'- к 3'-положению дезоксирибозы. Таким образом, наши образцы (их принято называть дуплексами) можно представить схематически в виде  $\longleftrightarrow$ .

Здесь необходимо рассказать, как получать А-ДНК в растворе. Кристаллографы установили, что ДНК переходит в А-форму с понижением относительной влажности. Можно понизить ее в растворе, добавляя неэлектролит, например этанол, хорошо смешивающийся с водой. Таким образом, можно В-ДНК перевести в А-ДНК. Не будем останавливаться на том, как это можно зарегистрировать. Можно, например, использовать то, что А-форма вращает плоскость поляризации света в ближнем ультрафиолете намного сильнее, чем В-форма. Таким образом можно строить кривые В-А-перехода, представляющие собой увеличение доли А-ДНК по мере уменьшения влажности (рис. 5).

Видно, что короткие фрагменты с разными нуклеотидными последовательностями сильно различа-



**Рис. 5.** Профили В-А-перехода коротких двойных спиралей (10 пар оснований), построенные по изменению оптической активности (круговой дихроизм), с ростом концентрации трифторэтанола. По горизонтальной оси вместо процентов трифторэтанола отложены соответствующие им значения  $(100 - a)\%$ , где  $a$  — относительная влажность. По вертикальной — рост доли А-формы,  $\Theta$ . Синтетические фрагменты ДНК: 1 — CCCCCGGGGG, 2 — ATACCGTTAT, 3 — GCTACGTAGC, 4 — CCAAGCTTGG. Изображена только одна нить в направлении 5  $\rightarrow$  3. На самом деле фрагменты — двойные спирали. Легче всего переходит в А-форму спираль 1 с максимальным количеством нуклеотидов, составляющих последовательность CCC

ются по способности переходить в А-форму. Например, дуплекс CCCCCGGGGG/CCCCCGGGGG переходит в А-форму намного легче, чем другие ДНК-дуплексы. Мы назвали такие ДНК А-любивыми.

### ДЕСЯТИРИЧНЫЙ КОД В-А-ПЕРЕХОДА

Зададимся вопросом: какие параметры, зависящие от последовательности пар оснований в ДНК-дуплексах, могли бы отвечать за ту или иную легкость к В-А-переходу? Сначала поговорим о другом переходе, давно и хорошо изученном конформационном переходе в ДНК, при котором нити двойной спирали разделяются (например, при повышении температуры). Там параметрами являются температуры плавления (или соответствующие им свободные энергии) АТ- и ГЦ-пар. Аденин и тимин в комплементарной паре образуют две водородные связи, цитозин и гуанин — три. Поэтому АТ-богатые ДНК плавятся легче; ГС-богатые более тугоплавки. В переходе из В- в А-форму пары оснований не разрываются. Они только смещаются друг относительно друга (см. рис. 1). Поэтому естественно предположить, что положение кривой В-А-перехода будет определяться той легкостью или трудностью, с какой данная пара смещается относительно соседней. Сколько вариантов соседствующих пар имеется в ДНК? (Чтобы не путать термин “пара” с “парой соседствующих пар”, используем термин “контакт”, то есть промежуток между соседними парами.) Таких промежутков — контактов ровно 10 типов:

AA/TT AC/GT AG/CT AT/AT CA/TG  
CC/GG CG/CG GA/TC GC/GC TA/AT.

Косой чертой разделены комплементарные антипараллельные нити соседствующих пар (контактов). Итак, простейшая реалистичная модель В–А-перехода определяется десятью параметрами – разностью свободной энергии А- и В-форм ДНК для каждого из приведенных ближайших соседей. Эти энергетические параметры можно определить из кривых В–А-перехода (наподобие тех, что приведены на рис. 4), имея достаточный набор разных ДНК-дуплексов. Получим следующие значения разности свободной энергии при физиологических условиях (100%-ной относительной влажности) А- и В-форм соответствующего контакта в ккал/моль:

	АТ/АТ 0,58	
	ТА/ТА 0,73	
АС/ГТ 0,13	СС/ГГ 0,19	АГ/СТ 0,33
СА/ТГ 1,04	АА/ТТ 0,97	ГА/ТС 0,98
	СГ/СГ 0,52	
	ГС/ГС 0,73	

Это десятичный код ближайших соседей (контактов), управляющий В–А-переходом в ДНК. Контакты собраны в пять групп. Далее при обсуждении особенностей этого десятиричного кода объясним, почему такая группировка удобна. Однако вопрос о том, есть ли в этом более глубокий смысл, остается открытым.

Обсудим закономерности данного кода контактов, управляющего В–А-переходом.

1. Все 10 параметров положительны. Это значит, что ДНК с какой угодно последовательностью пар оснований при физиологических условиях принадлежит семейству В-форм.

2. Имеются два особых контакта СС/ГГ и АА/ТТ, которые главным образом определяют способность участка ДНК превращаться в А-форму. В то время как разность свободных энергий А- и В-форм ДНК со случайной последовательностью равна примерно 0,6 ккал/моль контактов, эта энергия для контакта СС/ГГ равна всего 0,2 ккал/моль, а для контакта АА/ТТ она в 5 раз больше, составляя примерно 1 ккал/моль. Мы назвали данные контакты особыми, потому что лишь они способны образовывать протяженные А-любивые (в первом случае) и В-любивые (во втором) участки в ДНК. Хотя есть и другие А-любивые контакты (например, АС/ГТ) и В-любивые (ГА/ТС), из них невозможно соорудить протяженный участок (неважно, А- или В-любивый), потому что они будут в основном компенсировать друг друга.

3. Для всех контактов выполняется следующее правило:

$$CC + AA \approx AC + CA \approx AG + GA \approx AT + TA \approx \\ \approx CG + GC \approx 1,2 \text{ ккал/моль.}$$

Поэтому мы собрали контакты в пять групп, (здесь и далее мы используем обозначение контакта только по одной нити ДНК в направлении 5' → 3'; комплементарная ей нить определяется однозначно).

4. Существует энергетическая комплементарность внутри приведенных пар контактов: первый из них – А-любивый, второй – В-любивый. Из описанных свойств кода контактов следует, что А- и В-любивые контакты эффективно гасят друг друга, так что ДНК, вообще говоря, должна выглядеть довольно гомогенной в отношении В–А-перехода, и это действительно так. Этот факт, однако, не относится к А-любивым контактам СС и В-любивым контактам АА, которые могут образовывать протяженные А- и В-любивые участки в молекуле ДНК.

Свойства десятиричного кода контактов, охарактеризованные в пунктах 2–4, показывают, что он с хорошим приближением может рассматриваться как квазитроичный, то есть с тремя типами контактов: АА, СС и остальные восемь – ХУ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биология А-ДНК – часть общей проблемы биологической роли различных структурных форм этой молекулы, таких, как левозакрученная Z-форма, а также более сложных, пространственных конструкций. К последним относятся крестообразная структура, различного рода тройные и даже четверные спирали. Такого рода конформации сейчас принято называть необычными структурами, то есть альтернативными по отношению к В-форме ДНК. Все такие структуры, включая А-форму, имеют более высокую энергию при физиологических условиях относительно В-ДНК.

Подобно тому как химические реакции не могут быть поняты без учета высокоэнергетических (возбужденных) электронных состояний, так и биологические функции ДНК не могут быть до конца изучены без учета ее высокоэнергетических конформационных состояний (необычных структур).

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Фаворова О.О. Сохранение ДНК в ряду поколений: Репликация ДНК // Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 4. С. 11–23.
2. Иванов В.И., Минченкова Л.Е. А-форма ДНК: В поисках биологической роли // Молекуляр. биология. 1994. Т. 28. С. 1258–1271.
3. Иванов В.И. Метаморфозы двойной спирали // Химия и жизнь. 1980. № 2. С. 36–44.

\* \* \*

Валерий Иванович Иванов, доктор физико-математических наук, профессор Московского физико-технического института, главный научный сотрудник Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, академик РАЕН. Автор открытия и более 100 научных работ в областях фотосинтеза, вирусологии, энзимологии, структуры и функций нуклеиновых кислот.