

исследовать термодинамику и кинетику редупликационных и биосинтетических процессов, а также термодинамику и кинетику денатурации нуклеиновых кислот. Важным разделом биофизики является физика мутагенеза — спонтанного, химического и радиационного.

§ 8.2. СТРУКТУРА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Далеко не всегда связь между структурой молекулы и ее функцией проста и очевидна. Мы видели, что для белков проблему установления такой связи еще никак нельзя считать решенной. Иначе обстоит дело с нуклеиновыми кислотами, в частности с ДНК. Здесь по крайней мере одна важнейшая функция — *редупликация* ДНК была качественно объяснена сразу же после открытия вторичной структуры.

Вторичная структура ДНК была установлена методом рентгенографии в работах Франклин, Крика, Уотсона и Уилкинза [29—32]. Ориентированные волокна литиевой соли

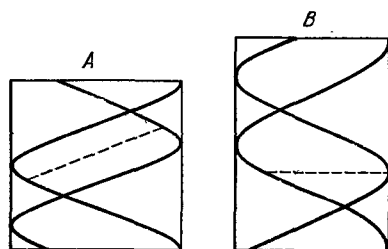


Рис. 8.1. Схема строения А- и В-форм ДНК.

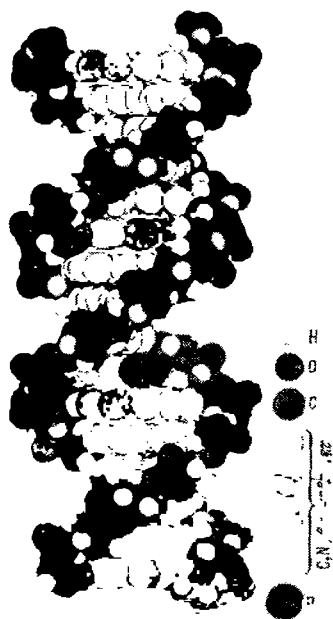


Рис. 8.2. Молекулярная модель В-формы ДНК.

нативной ДНК дали рентгенограммы, содержащие до 100 рефлексов (см. рис. 5.8). Крестообразное расположение рефлексов показывает, что структура является спиральной.

Расшифровка рентгенограмм и применение молекулярных моделей раскрыли двуспиральную структуру ДНК. Дезоксирибонуклеиновая кислота может кристаллизоваться в различных двуспиральных формах. При низкой относительной влажности (до 70%) ДНК кристаллизуется в моноклинной А-форме с параметрами решетки $a = 40,4 \text{ \AA}$, $b = 22,07 \text{ \AA}$, $\beta = 97,1^\circ$. При

большой влажности реализуется гексагональная *B*-форма, для которой $a = 46 \text{ \AA}$. Обе формы натриевой соли ДНК из тимуса теленка показаны на рис. 8.1, а на рис. 8.2 — молекулярная модель *B*-формы. Позднее была открыта *C*-форма [33], получающаяся при низкой влажности.

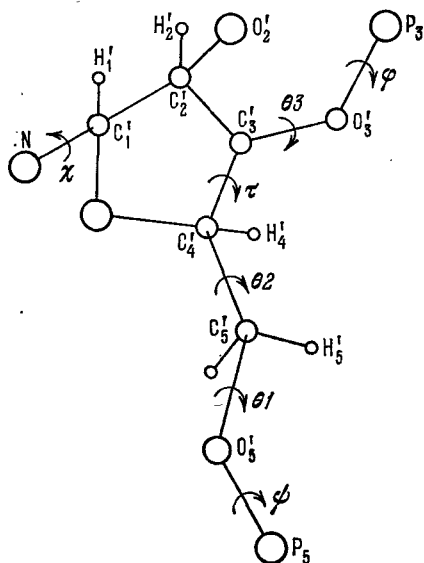


Рис. 8.3. Конформация полинуклеотидной цепи и обозначения углов поворота.

В табл. 8.1 приведены геометрические характеристики *A*-, *B*- и *C*-форм ДНК [34]. Они различаются значениями проекции остатка на ось спирали, углами поворота между соседними парами оснований и наклоном плоскости пар к оси спирали.

Особой *T*-формой обладает ДНК фага Т 2 [35]. Эта ДНК содержит вместо цитозина оксиметилцитозин, причем 70% всех оксиметилцитозинов глюкозилированы, а 5% диглюкозилированы. При низкой влажности глюкозилированная ДНК фага имеет *T*-форму с шагом спирали 27,2—28,2 \AA и числом пар оснований на виток 8,0—8,3.

Конформация полинуклеотидной цепи определяется шестью углами поворота (рис. 8.3). Они отсчитываются следующим образом: если смотреть вдоль связи, вокруг которой проис-

Таблица 8.1
Геометрия ДНК в различных формах¹⁾

Соль ДНК	Влажность, %	Число нуклеотидов на виток спирали	Шаг спирали, \AA	Трансляция на нуклеотид, \AA	Поворот на нуклеотид, град	φ , град	ψ , град
Натриевая, <i>A</i> -форма	75	11	28,15	2,55	32,7	20	16
Натриевая, <i>B</i> -форма	92	10	34,6	3,36	36	—	—
Литиевая, <i>B</i> -форма	66	10	33,7	3,37	36	2	5
Литиевая, <i>C</i> -форма	66	9,3	31,0	3,32	39	6	10

¹⁾ φ — угол между перпендикуляром к оси спирали и плоскостью оснований, ψ — диэдрический угол между плоскостями оснований пары.

ходит вращение, то дальняя связь вращается по часовой стрелке относительно ближней (рис. 8.4). Угол, отвечающий *цис*-положению связей, принимается равным нулю. Сопоставление структур полинуклеотидов и нуклеотидов позволяет найти те значения углов, которые встречаются в природе. Существенную роль в определении углов играют и расчеты наивыгоднейших конформаций.

Конформация полинуклеотидной цепи в большой степени зависит от конформации рибозы (дезоксирибозы). В кристаллах нуклеозидов и нуклеотидов, а также полинуклеотидов, рибоза встречается в четырех конформациях, различающихся тем, какой из атомов пятичленного цикла C_2' или C_3' выведен из плоскости остальных четырех атомов. Перечислим эти конформации:

C_2' -эндо, C_3' -эндо, C_2' -экзо, C_3' -экзо. Если атом C_2' или C_3' находится по ту же сторону от плоскости, что и атом C_5' , то такое смещение называют *эндо*-смещением. В противном случае говорят об *экзо*-смещении. C_2' -эндо- и C_3' -эндо-конформации встречаются наиболее часто. C_2' -эндо-конформации рибозы фигурируют в *B*-форме и *S*-форме ДНК; в *A*-форме ДНК, в двуспиральной РНК и поли-*A* рибоза находится в C_3' -эндо-конформации. Смещение атомов C_2' и C_3' от плоскости, образованной другими атомами, не превышает 0,6 Å.

Существуют две преимущественные конформации (*анти* и *син*) для вращения вокруг гликозидной связи, соединяющей атом N_9 пурина (или N_1 пиримидина) с атомом C_1 рибозы. *Анти*-конформация отвечает наиболее растянутой форме нуклеотида и встречается в большинстве исследованных нуклеотидов и нуклеозидов, а также в полинуклеотидах. *Син*-конформация обнаружена в кристаллах дезоксигуанозина и в некоторых минорных нуклеотидах, встречающихся в тРНК. Стерически разрешенные области значений угла χ (см. рис. 8.3) разнятся для C_2' -эндо- и C_3' -эндо-конформаций сахара.

Имеются три энергетически благоприятные конформации при вращении вокруг $C_4'-C_5'$ -связи, отвечающие значениям угла θ 2 60, 180, 300°, тогда как существует лишь одна конформация, отвечающая вращению вокруг $C_5'-O_5'$, а именно $\theta 1 \approx 180^\circ$. Последняя соответствует наиболее растянутой конформации полинуклеотидной цепи. Для угла $\theta 3$ стерически разрешены все значения углов в пределах от 210 до 260°. Конформации относительно связей $O_3'-P-O_5'$ во всех без исключения полинуклеотидах и фосфорных диэфирах — *гош-гош* или *гош-транс*, причем углы ϕ и ψ равны 60, 60 и 300, 300° для *гош-гош*-конформации,

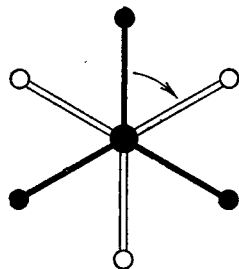


Рис. 8.4. Направление поворота.

а также 180, 300°, 60, 180° для *гош* — *транс*-конформации. В полинуклеотидах встречается лишь *гош*-300°, а не *гош*-60° конформация. Существенно, что наиболее растянутая *транс* — *транс*-конформация в полинуклеотидах отсутствует.

Т а б л и ц а 8.2

Конформации полинуклеотидов и нуклеиновых кислот

Конформация	ψ , град	θ_1 , град	θ_2 , град	τ , град	θ_3 , град	ϕ , град
1	285	170	60	80	210	280
2	285	170	60	150	210	280
3	285	170	175	150	210	280
4	285	170	175	80	210	280
5	285	170	175	80	210	210
6	285	170	175	150	210	210
ДНК-В	281	212	58	130	147	282
ДНК-С	315	143	48	168	211	212
ДНК-А	283	167	67	76	221	279
РНК-11	282	165	74	95	216	273
Поли-А	285	168	69	83	216	293
РНК-10	257	188	88	80	203	285
Динуклеотид А-2'-р-5'-У	313	170	57 (У) 45 (А)	84 (У) 184 (А)	244	232

Согласно расчетам Сундаралингама шесть преимущественных конформаций полинуклеотидов характеризуются углами, приведенными в табл. 8.2. Там же указан угол поворота вокруг связи C_3-C_4 , определяющий смещение из плоскости атомов C_3' и C_2' рибозы.

Двойная спираль обычной ДНК состоит из двух взаимно переплетенных полинуклеотидных цепей, азотистые основания которых попарно соединены водородными связями. Аденин (А) одной цепи связан с тиминном (Т) другой, а гуанин (Г) с цитозином (Ц). Схемы этих пар (*уотсон-криковские пары*) показаны на рис. 8.5. Таким образом, две цепи ДНК взаимно комплементарны, т. е. имеется однозначное соответствие между их нуклеотидами. Это соответствие раскрывает смысл правил Чаргаффа (см. стр. 89).

Специфическая структура двуспиральной ДНК характеризуется широкой и узкой спиральными бороздками, выемками на поверхности макромолекулы.

Очевидно, что имеются две возможности организации двойной спирали — из параллельных и антипараллельных цепей (рис. 8.6). Вторая модель следует из рентгенографических данных. Однозначное доказательство антипараллельности получено биохимическим методом [39]. Возможен редупликационный синтез

ДНК *in vitro* (см. § 8.8). Для этого необходимы смесь нуклеозидтрифосфатов (НТФ) всех четырех типов, фермент ДНК-полимераза и нативная ДНК в качестве затравки для матричного

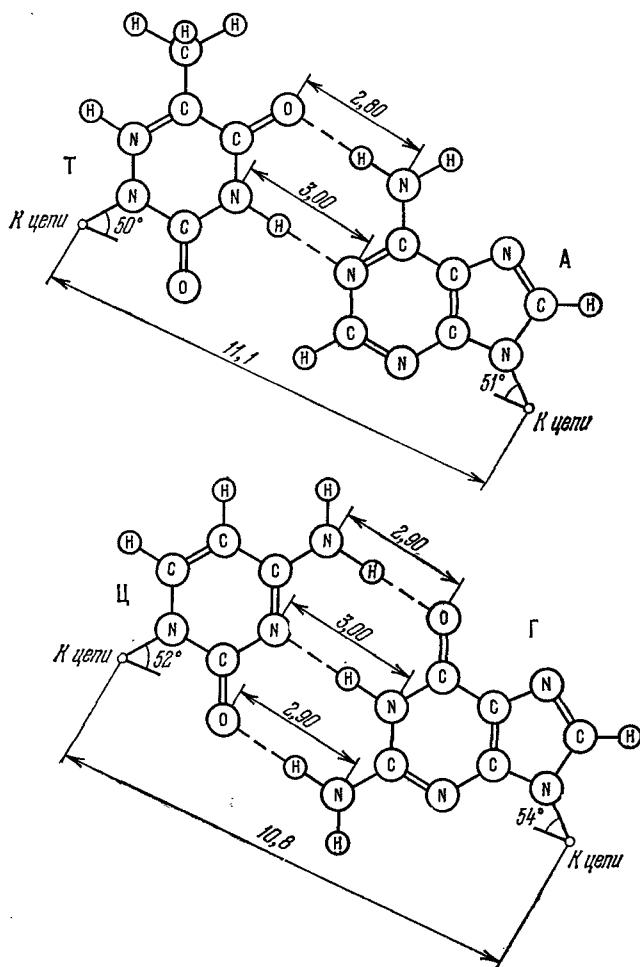


Рис. 8.5. Пары А—Т и Г—Ц

синтеза ДНК, идентичной исходной. В опытах Джосса один из четырех НТФ содержал P^{32} в фосфате, соединенном с дезоксирибозой в 5'-положении (рис. 8.7). Синтезированную ДНК расщепляли с помощью ферментов до 3'-дезоксирибонуклеотидов так, чтобы меченый атом Р оказывался в положении 3' ближайшего

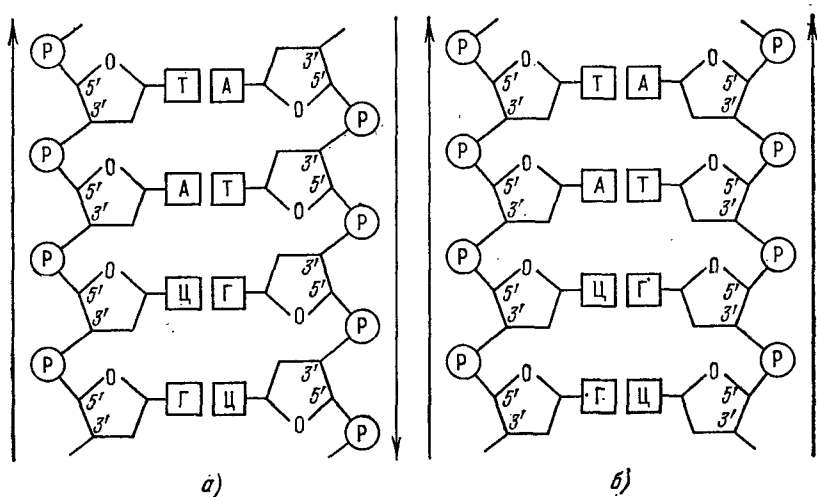


Рис. 8.6. Двойные спирали, построенные из антипараллельных (а) и параллельных (б) цепей.

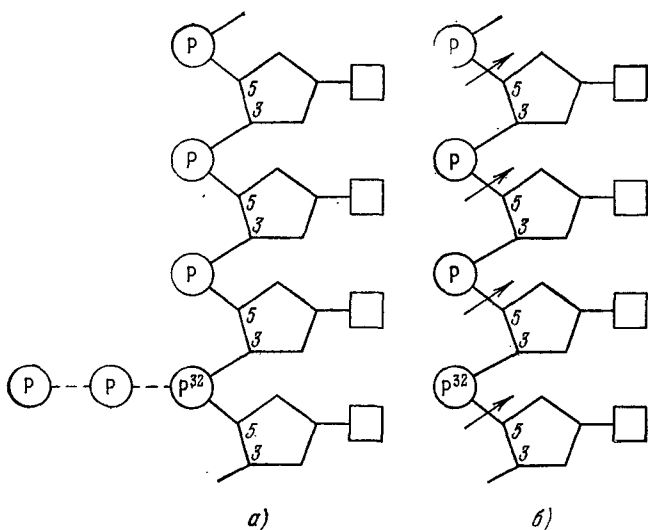


Рис. 8.7. Синтез цепи ДНК, меченной P^{32} , и ее расщепление.

нуклеотида (см. рис. 8.7). Образовывались четыре разных 3'-дезоксинуклеотида, которые разделяли электрофорезом на бумаге. Определяя их радиоактивность, можно было установить, как часто Р³² связывается с другими нуклеотидами. Опыты были проделаны со всеми четырьмя НТФ и, тем самым, были исследованы все 16 возможных комбинаций. Полученные результаты приведены в табл. 8.3.

Таблица 8.3

Относительное содержание различных сочетаний соседних нуклеотидов в препарате, полученном с заправкой — нативной ДНК из тимуса теленка [39]

Меченый трифосфат	Выделенный 3'-дезоксирибонуклеотид			
	ТФ	АФ	ЦФ	ГФ
АТФ	ТФА 0,053	АФА 0,089	ЦФА 0,080	ГФА 0,064
ТТФ	ТФТ 0,087	АФТ 0,073	ЦФТ 0,067	ГФТ 0,056
ГТФ	ТФГ 0,076	АФГ 0,072	ЦФГ 0,016	ГФГ 0,050
ЦТФ	ТФЦ 0,067	АФЦ 0,052	ЦФЦ 0,054	ГФЦ 0,044
Итого	0,283	0,286	0,217	0,214

Естественно, что правила Чаргаффа соблюдаются. Одинаковыми греческими буквами обозначены сочетания, содержание которых должно быть равным, если цепи антипараллельны, одинаковыми латинскими буквами — если цепи параллельны. В самом деле, в первом случае (см. рис. 8.6) должны быть равны, например, содержания комбинаций АФЦ и ГФТ, а во втором — АФЦ и ТФГ, так как разрезаемые с помощью фермента связи с Р³² расположены в этих случаях по-разному. Мы видим, что цепи антипараллельны.

Двуспиральная структура позволяет качественно объяснить редупликацию ДНК и ее конвариантный характер. По мысли Крика и Уотсона, при редупликации двойная спираль сначала

разделяется вследствие разрыва водородных связей и раскручивания двойной спирали. Каждая из двух образовавшихся цепей служит матрицей для сборки новой цепи. Мономеры соединяются с матрицей, образуя уотсон-кривовские пары А—Т, Т—А, Г—Ц и Ц—Г. Одновременно происходит поликонденсация нуклеотидов, и в результате образуются две двойные спирали, тождественные первоначальной. Если случайно включился неподходящий нуклеотид, то при дальнейшем удвоении он оказывается уже законно занимающим свое место и редуцируется. Такая *полуконсервативная модель* (новая спираль содержит одну старую и одну новую цепь) действительно подтверждается опытом (см. § 8.8).

Структура ДНК наблюдается с помощью электронного микроскопа. На рис. 8.8 и 8.9 приведены электронные микрофотографии нативной ДНК. Из фага Т2 были выделены нативные молекулы длиной до 49 мк, а из *E. coli* — до 400 мк, что соответствует молекулярному весу порядка 10^9 . Вся ДНК фаговой частицы является одной молекулой.

Исследование рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами дает результаты, хорошо согласующиеся с двуспиральной структурой ДНК [40]. Растворы нативной ДНК очень вязки. Однако это не означает, что вся макромолекула ДНК является жестким стержнем. Данные, полученные методами рассеяния света, седиментации, вискозиметрии, динамического двойного лучепреломления, показывают, что двойная спираль нативной ДНК свернута в рыхлый клубок [41]. Характеристическая вязкость $[\eta]$ ДНК пропорциональна примерно первой степени молекулярного веса M , что отвечает рыхлому клубку. Зависимость $[\eta]$ от M имеет вид (в 0,15 М NaCl) [42]

$$\left. \begin{aligned} [\eta] &= 6,9 \cdot 10^{-4} M^{0,7}, & \text{если } 2 \cdot 10^6 < M < 130 \cdot 10^6, \\ [\eta] &= 1,05 \cdot 10^{-7} M^{1,32}, & \text{если } M < 2 \cdot 10^6. \end{aligned} \right\} (8,1)$$

Исследование двойного лучепреломления в потоке позволяет определить термодинамическую гибкость нативной ДНК (см. стр. 131). Гибкость характеризуется *персистентной длиной* примерно прямолинейного участка. В 0,15 М растворе персистентная длина ДНК равна 500 Å, в 0,0014 М растворе — 800 Å, т. е. гибкость уменьшается с уменьшением ионной силы [43]. Длине 500 Å отвечает примерно 150 мономерных звеньев. По-видимому, макромолекулу нативной ДНК нельзя считать зигзагообразной, состоящей из строго прямолинейных участков. Скорее она имеет «червеобразную» форму с непрерывно меняющейся кривизной. Персистентная длина есть условная величина, выражающая длину прямолинейного участка при замене червеобразной цепи зигзагообразной. •

Рис. 8.8. Электронная микрофотография замкнутой двойной спирали ДНК из фага λ . Увеличение 44 000.



Рис. 8.9. Электронная микрофотография ДНК из фага T2. Увеличение 80 000.

Доти показал, что плотность ДНК (приблизительно равная $1,7 \text{ г/см}^3$) линейно растет с увеличением содержания Г + Ц (м. в. А + Т = 247, Г + Ц = 273). Вместе с тем эти пары занимают примерно равные объемы в двойной спирали. На каждый процент увеличения содержания Г + Ц приходится возрастание плотности на $0,00103 \text{ г/см}^3$. Эти результаты получены методом седиментации в градиенте плотности (см. стр. 153).

При нагревании, изменении рН и т. д. происходит денатурация ДНК — переход двойная спираль \rightarrow два клубка (см. § 8.4).

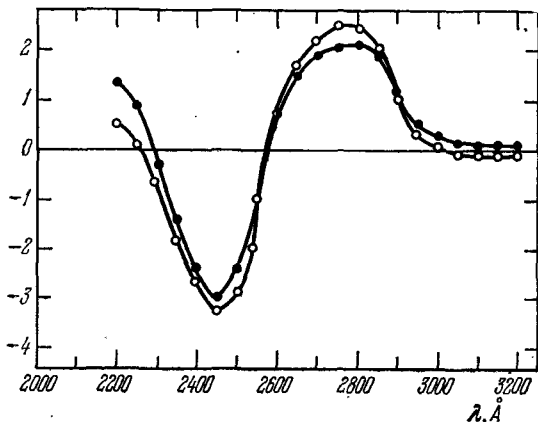


Рис. 8.10. Спектры кругового дихроизма раствора натриевой соли ДНК из тимуса телянка (светлые кружки) и пленки той же ДНК (зачерненные кружки).

По оси ординат отложены величины $\epsilon_L - \epsilon_D$ в л/моль · см.

Спирализация ДНК отчетливо проявляется в ее спектральных свойствах — в эффекте гипохромизма в области собственного поглощения азотистых оснований при 2600 Å (см. стр. 288—290). Интенсивность полосы поглощения 2600 Å у двуспиральной нуклеиновой кислоты значительно меньше, чем у денатурированной формы. Степени спиральности ДНК и РНК определяются по гипохромному эффекту без труда.

В работе [34] было проведено детальное исследование КД ориентированных и неориентированных пленок ДНК при различных значениях влажности и концентрации солей. Спектры КД натриевой и литиевой солей ДНК при относительной влажности (о. в.) $\geq 92\%$ такие же, как для растворов, и отвечают В-форме ДНК. При о. в. от 75 до 66% пленки с 3% Na^+ дают измененный спектр КД, совпадающий со спектром раствора А-формы. Литиевая соль ДНК при низкой о. в. дает спектр, типичный для С-формы. На рис. 8.10 показаны спектры кругового дихроизма

раствора натриевой соли ДНК из тимуса теленка и пленки той же ДНК при о. в. 92%. Таким образом, КД пленок позволяет судить о вторичной структуре ДНК. В работе [34] построена теория КД для ориентированных пленок, обладающих и линейным дихроизмом (ЛД). Анализ КД и ЛД позволяет определить ориентацию оптических переходов в молекуле ДНК. Получены данные о возможном наличии $\pi\pi^*$ -перехода с $\lambda < 2400 \text{ \AA}$ (вероятно, при $\lambda = 2250 \text{ \AA}$). С помощью КД наблюдаются конформационные изменения нуклеиновых кислот в растворе. Двухспиральные участки РНК и гибридные двойные спирали ДНК—РНК фигурируют в *A*-форме, ДНК в головках бактериофага — в более компактной *C*-форме, ДНК в растворе — в *B*-форме. Под действием одновалентных катионов, нейтрализующих фосфатные группы, происходит переход *B*-формы в *C*-форму ДНК. В водно-метанольных растворах этот переход облегчается. Этанол вызывает кооперативный переход $B \rightarrow A$ [44].

Двухспиральные участки нуклеиновых кислот моделируются синтетическими полинуклеотидами. В 0,1 *M* растворе NaCl Поли-А образует двойную спираль с Поли-У, причем наибольший гипохромизм, т. е. наибольшая степень спирализации, наблюдается при составе смеси полинуклеотидов 1:1 [45]. В присутствии двухвалентных катионов в $1,2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ растворе MgCl_2 максимальный гипохромизм отвечает соотношению Поли-У: Поли-А = 2:1, т. е. образуется тройная спираль. Ионы Mg^{++} , по-видимому, компенсируют заряды фосфатных групп, что уменьшает электростатическое отталкивание цепей.

Изучение смесей Поли-У и сополимеров Поли-АУ различного состава позволило раскрыть природу дефектных участков в двойной спирали [42]. Аденин комплементарен урацилу и поэтому связывается с ним; аналогичная связь У с У не возникает. При взаимодействии Поли-У с Поли-АУ имеются две возможные структуры, показанные на рис. 8.11. Либо в тех местах, где против У расположен У, нет водородных связей, но спираль остается спиралью (рис. 8.11, а), либо неспаренные группы вытесняются из спирали и образуют *петли* (рис. 8.11, б). Эти две структуры различаются соотношением Поли-У и Поли-АУ одинаковой степени полимеризации в системе с максимальным гипохромизмом, т. е. в двойной спирали. Для фрагментов спиралей, изображенных на рис. 8.11, а, соотношение Поли-АУ: Поли-У составляет $10:10 \equiv 1:1$, на рис. 8.11, б — $6:10 \equiv 3:5$. Эксперимент

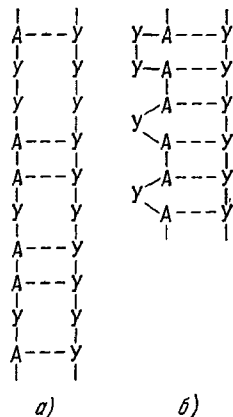


Рис. 8.11. Возможные вторичные структуры комплексов Поли-У с Поли-АУ.

однозначно свидетельствует в пользу второй возможности [45] (см. также [6]). Рассмотрение структуры типа б с помощью молекулярной модели показывает, что петли не мешают организации двойной спирали; происходит лишь небольшое сближение фосфатных групп — расстояние между ними уменьшается с 7 до 6 Å. Можно думать, что и в нативной ДНК случайное включение неподходящего нуклеотида (т. е. мутация) вызывает образование петли.



Рис. 8.12. Модель структуры РНК.

а) при высокой ионной силе раствора, б) при низкой ионной силе, в) денатурированная РНК.

В работе [46] исследовалась двуспиральная Поли-дезоксигИЦ (И — инозин). Рентгенограммы Na-соли при 75% о.в. и спектры КД указывают на необычную конформацию спирали — возможно левую, в отличие от всех известных двойных спиралей, с восемью мономерами на каждый оборот. Не исключено, однако, что здесь фигурирует

все же правая спираль, но в иной конформации. Недавно было показано, что вывод о левой спирали ошибочен [193]. Вирусная РНК и рибосомальная РНК не кристаллизуются. В растворе все эти виды РНК обнаруживают значительно меньшую вязкость, чем ДНК, и большие скорости седиментации.

Способность РНК к денатурации (выражающейся, в частности, в увеличении интенсивности полос поглощения λ 2600 Å), большая компактность клубков ($[\eta]$ примерно пропорциональна $M^{1/2}$), вид спектров КД свидетельствуют о частично спиральной структуре нативной РНК. Денатурационная стабильность РНК возрастает с содержанием Г + Ц. Дотги и сотрудники предложили для РНК структуру «морской звезды» с «лучами», построенными из двуспиральных участков с дефектами (см. [6, 47]). Подобная структура позволяет объяснить наблюдаемый высокий процент спиральных участков — до 77% в рРНК и даже до 88% в РНК из ВТМ. Спирин описывает структуру высокомолекулярной РНК с помощью модели, показанной на рис. 8.12 [48]. Структура одноцепочечная, при высокой ионной силе она имеет вид компактного клубка, при низкой — компактного

стержнеобразного образования, при денатурации — статистического клубка. Такая модель согласуется с результатами исследования РНК в растворе.

Структура низкомолекулярных транспортных РНК (тРНК), также частично двуспиральных, описана ниже (см. § 9.4).

Недавно было открыто возникновение третичной структуры двунитчатой ДНК в растворе в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ) [49]. Условия ее образования: комнатная температура, 0,25—0,5 *M* раствор NaCl, молекулярный вес ПЭГ 20 000, его концентрация больше 80 мг/мл, молекулярный вес ДНК $1,4 \cdot 10^6$, ее концентрация около 10 мкг/мл. ДНК приобретает форму тора. Этой форме соответствует уменьшение интенсивности полосы 2600 Å и появление интенсивного минимума КД в области 2600—2700 Å. Торы наблюдаются в электронном микроскопе, их диаметры варьируют в пределах от 800 до 1400 Å. Таким образом, установлен специфический конформационный переход ДНК, являющийся обратимым. Возможно, что он имеет биологически-функциональное значение.

§ 8.3. ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ

Структура двойной спирали ДНК задается, согласно первоначальным предположениям, водородными связями, фиксирующими уотсон-криковские пары (см. рис. 8.5). Определяющая роль трех водородных связей в Г—Ц и двух в А—Т представляется естественной и согласуется с данными рентгеноструктурного анализа. Однако подлинное выяснение природы взаимодействий в двойной спирали требует специальных теоретических и экспериментальных исследований. Количественные данные об этих взаимодействиях получаются путем квантовомеханических расчетов и прямых физических исследований простых моделей.

Свободные азотистые основания образуют водородно-связанные пурин-пиримидиновые комплексы в твердом состоянии. Это было впервые установлено Хугстином [50], получившим такой комплекс при совместной кристаллизации 9-метиладенина с 1-метилтиминном (МА—МТ). Атомы азота N_1 в тимине и N_9 в аденине заблокированы метильными группами с тем, чтобы избежать образования дополнительных водородных связей. Результаты рентгенографического исследования кристалла МА—МТ показали, что структура комплекса отлична от уотсон-криковской (рис. 8.13, ср. рис. 8.5). Атом N_1 (МТ) образует водородную связь с имидазольным азотом N_7 . Аналогичная хугстиновская структура была установлена для комплекса 9-этиладенина с 1-метилурацилом (ЭА—МУ) [51]. Возможно, что хугстиновская структура более стабильна, чем уотсон-криковская уже в растворе. Другая возможность состоит в том, что