

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

тип комплекса, реализуемого в кристалле, определяется кристаллической упаковкой. Данные инфракрасной и ЯМР-спектроскопии растворов действительно показывают, что пурин-пиримидиновые комплексы образуются, но не позволяют определить их структуру [52—57]. Примечательно, что в растворах возникают водородные связи в парах А — У, А — Т и Г — Ц, но не в парах Г — У, А — Г и А — Ц. Соответственно не удается получить из раствора кристаллы с некомплементарными парами.

В кристаллическом комплексе 9-этилгуанина с 1-метилцитозинном (ЭГ — МЦ) установлена уотсон-криковская структура с тремя водородными связями (рис. 8.14) [58]. Аналогичное строение имеет комплекс 9-этилгуанина с 1-метил-5-фторцитозинном

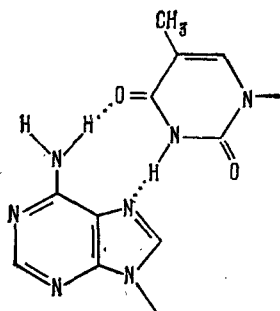


Рис. 8.13. Структура комплекса МА—МТ.

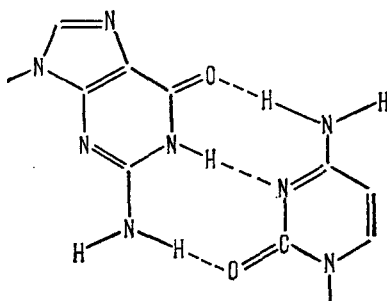


Рис. 8.14. Структура комплекса ЭГ—МЦ.

[59]. Структура комплекса 9-этилгуанина с 1-метил-5-бромцитозинном характеризуется несколько иной упаковкой пар в кристалле [59]. Более близкая к ДНК система дезоксигуанозин-5-Вг-дезокситидин также содержит три водородных связи между основаниями [60].

Сильный мутаген — бромурацил (метилированный) изучался в парах с этиладенином [61] и метиладенином [62]. Интересно, что в этих двух случаях были получены различные результаты. В первой паре образуются водородные связи O_2-N_6 и N_3-N_7 , во второй паре O_4-N_6 и N_3-N_7 . Эти результаты показывают, что азотистые основания способны не только к таутомерии, но и к образованию разнотипных водородных связей (дальнейшие подробности см. в обзорах [63, 64]).

Квантовохимические расчеты взаимодействий в пурин-пиримидиновых парах были проведены с учетом монополь-монопольных сил, сил взаимодействия монополей с индуцированными диполями и дисперсионных сил [65, 66] (см. также [6]). Расчеты показали большую устойчивость хугстиновской структуры по

сравнению с уотсон-криковской для пар А — Т и А — У и устойчивость уотсон-криковской структуры для пары Г — Ц.

Очевидно, что в двойной спирали структура комплементарной пары оснований не может определяться исключительно ее свойствами в изолированном состоянии. Наряду с «горизонтальными» взаимодействиями в паре существуют и «вертикальные» взаимодействия соседних неспаренных оснований (см. далее). Стабилизуется структура, оптимальная для двойной спирали как целостной системы. Вместе с тем возможность образования водородных связей между различными атомами, по-видимому, существенна для мутагенеза (см. § 9.9).

Теоретические расчеты взаимодействий в двойной спирали проводились в ряде работ, начиная с работы Де-Во и Тиноко [67] (см. также [6]). Важная идея работы [67] состояла в выявлении роли вертикальных взаимодействий между параллельными азотистыми основаниями («stacking»). Известно, что между плоскими π -электронными циклами, расположенными параллельно друг другу, реализуются значительные дисперсионные взаимодействия (см. стр. 195). Поэтому молекулы красителей оказываются способными образовывать полимеры в растворе (так называемые полимеры Шайбе), обладающие своеобразными оптическими свойствами. Эти свойства связаны с экситонным механизмом передачи энергии возбуждения. В ДНК и в упорядоченных двуспиральных полинуклеотидах достаточно плотная параллельная упаковка оснований проявляется, в частности, в эффекте гипохромизма (см. § 5.4).

В работе Де-Во и Тиноко вычислялись энергии ван-дер-ваальсовых — диполь-дипольных, индукционных и дисперсионных взаимодействий (как горизонтальных, так и вертикальных). Дипольные моменты аденина и тимина направлены в их паре почти антипараллельно, и диполь-дипольное взаимодействие приводит к отталкиванию. Напротив, в паре гуанин — цитозин оно создает значительное притяжение. Суммарные энергии ван-дер-ваальсовых взаимодействий в парах А — Т и Г — Ц (горизонтальных взаимодействий), вычисленные при диэлектрической проницаемости, равной единице, равны соответственно 0,2 и 3,9 ккал/моль. В реальной среде эти энергии, видимо, в несколько раз меньше, так как эффективная диэлектрическая проницаемость варьирует в пределах 2—5. Таким образом, отдельная пара стабилизируется преимущественно водородными связями. Более строгий расчет, рассматривающий взаимодействие монополей, а не диполей, дает, однако, для уотсон-криковских пар А — Т и Г — Ц значительно большие энергии притяжения, равные соответственно —5,5 и —19,2 ккал/моль [65].

В последующих работах наряду с «монополярными» вычислениями ван-дер-ваальсовых взаимодействий [68, 69] учитывались

и силы отталкивания [70], оцениваемые с помощью атом — атом потенциалов Китайгородского (см. стр. 124). Разработан полуэмпирический метод расчета энергии горизонтальных и вертикальных взаимодействий, вычисляемых в приближении атом — атом взаимодействий. Определяется сумма энергий электростатических, поляризационных взаимодействий и энергии отталкивания на малых расстояниях, π -электронные заряды вычисляются по методу Хюккеля, σ -электронные — по методу Дель Ре [71]. Во всех расчетах применялись параметры, найденные в работе [72]. Поляризационная энергия находится как сумма энергий поляризации всех атомов основания в электрическом поле остальных атомов. Дисперсионная энергия и энергия отталкивания вычисляются с помощью модифицированной функции Бэкингема (см. стр. 124)

$$U(r) = Be^{-qr} - Ar^{-6}; \quad (8,2)$$

здесь A , B и q — полуэмпирические параметры, характеризующие взаимодействие в данной паре. Параметры A находятся из приближенной формулы Лондона, q — из графика, построенного на основе данных для инертных газов. Параметр B выражается формулой

$$B_{mn} = 6A_{mn} \frac{\exp(q_{mn}\rho_{mn})}{q_{mn}^7 \rho_{mn}^7}, \quad (8,3)$$

где q_{mn} — константа для данной пары атомов, ρ_{mn} — абсцисса минимума на кривой зависимости U от межатомного расстояния. Предполагается, что $\rho_{mn} = \rho_m + \rho_n$, где ρ_m и ρ_n — равновесные радиусы атомов. Вычисление энергии взаимодействия слоев в кристалле графита для различных расстояний между ними дало значение ρ для углерода в состоянии sp^2 -гибридизации, равное 1,86 Å. Исходя из этого значения, были определены ρ для других атомов. Для водорода, участвующего в водородной связи, $\rho = 0,4$ Å, три атома Н метильной группы рассматривались как один с $\rho = 1,9$ Å [73].

Контролем эффективности такого метода служат расчеты энергий ряда молекулярных кристаллов и их сравнение с экспериментальными значениями теплот сублимации. Для нафталина найдено 18,1 ккал/моль (17,3, 17,03), для антрацена 24,4 (23,54, 23,35, 24,4, 23,9), для *n*-бензохинона 14,1 (15,0), для пиразина 14,4 (13,45), для имидазола 20,2 (20,4) ккал/моль. (В скобках указаны данные, полученные на опыте.)

В табл. 8.4 сопоставлены энергии взаимодействий, вычисленные в ряде работ.

В табл. 8.5 приведены результаты расчетов энергий взаимодействия оснований в триплетях, полученные в работе [71] (см. также расчеты Клавери [70]). Согласно этим данным наименее

стабильные участки двойной спирали ДНК должны содержать чередующиеся А и Т в обеих цепях, а наиболее стабильные — чередующиеся Г и Ц. Обе таблицы показывают, что последовательность нуклеотидов существенно сказывается на взаимодействиях.

Т а б л и ц а 8.4

Энергии взаимодействия соседних пар оснований
в двойной спирали (ккал/моль)¹⁾

Соседние пары оснований	а	б	в	г	д	е
$\begin{array}{l} \uparrow \text{Г} - \text{Ц} \downarrow \\ \uparrow \text{Г} - \text{Ц} \downarrow \end{array}$	-22,8	-15,42	-7,20	-1,26	-8,72	-9,5
$\begin{array}{l} \uparrow \text{Ц} - \text{Г} \downarrow \\ \uparrow \text{Г} - \text{Ц} \downarrow \end{array}$	-39,6	-22,66	-10,96	-4,99	-13,50	-15,0
$\begin{array}{l} \uparrow \text{Г} - \text{Ц} \downarrow \\ \uparrow \text{Ц} - \text{Г} \downarrow \end{array}$	-11,4	-16,08	-15,18	-9,80	-16,01	-15,5
$\begin{array}{l} \uparrow \text{А} - \text{Т} \downarrow \\ \uparrow \text{А} - \text{Т} \downarrow \end{array}$	-1,0	-14,98	-8,32	-4,08	-9,76	-12,8
$\begin{array}{l} \uparrow \text{Т} - \text{А} \downarrow \\ \uparrow \text{А} - \text{Т} \downarrow \end{array}$	-10,4	-10,26	-7,28	-2,52	-8,64	-11,7
$\begin{array}{l} \uparrow \text{А} - \text{Т} \downarrow \\ \uparrow \text{Т} - \text{А} \downarrow \end{array}$	-3,2	-13,28	-7,22	-4,48	-7,97	-11,9
$\begin{array}{l} \uparrow \text{А} - \text{Т} \downarrow \\ \uparrow \text{Г} - \text{Ц} \downarrow \end{array}$	-14,8	-20,32	-8,04	-3,50	-9,63	-12,3
$\begin{array}{l} \uparrow \text{Г} - \text{Ц} \downarrow \\ \uparrow \text{А} - \text{Т} \downarrow \end{array}$	-22,4	-13,90	-11,36	-6,04	-12,69	-13,6
$\begin{array}{l} \uparrow \text{А} - \text{Т} \downarrow \\ \uparrow \text{Ц} - \text{Г} \downarrow \end{array}$	-15,6	-14,88	-11,16	-7,25	-12,05	-13,8
$\begin{array}{l} \uparrow \text{Ц} - \text{Г} \downarrow \\ \uparrow \text{А} - \text{Т} \downarrow \end{array}$	-14,4	-14,24	-7,52	-2,41	-9,09	-12,1

¹⁾ Стрелки указывают на направление сахарофосфатной цепи от атома C'_3 дезоксирибозы к атому C'_5 . а — приближение молекулярных точечных диполей [67], б — приближение монополей и молекулярной поляризуемости [68], в — приближение монополей и поляризуемостей связей [69], г — то же, что и в, но с учетом энергии отталкивания [70], д — то же, что и в, но с учетом энергии обменного взаимодействия [74], е — по данным [73] без учета поляризационной энергии.

Дальнейшее усовершенствование этих расчетов важно как для определения вероятностей возникновения различных точечных мутаций, так и для определения взаимодействия кодона с

Энергии взаимодействия оснований в триплетях (в ккал/моль пар оснований)

Триплет	$\begin{array}{c} \uparrow \Gamma - \Pi \\ \Pi - \Gamma \\ \Gamma - \Pi \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \Pi - \Gamma \\ \Gamma - \Pi \\ \text{А} - \text{Т} \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \Pi - \Gamma \\ \Gamma - \Pi \\ \text{Т} - \text{А} \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \text{Т} - \text{А} \\ \Gamma - \Pi \\ \Pi - \Gamma \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \text{А} - \text{Т} \\ \Gamma - \Pi \\ \Pi - \Gamma \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \text{Т} - \text{А} \\ \Gamma - \Pi \\ \text{Т} - \text{А} \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \text{А} - \text{Т} \\ \Gamma - \Pi \\ \text{Т} - \text{А} \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \text{Т} - \text{А} \\ \Gamma - \Pi \\ \text{А} - \text{Т} \end{array} \downarrow$
Энергия	-42,0	-40,5	-40,3	-40,1	-40,1	-38,6	-38,5	-38,4
Триплет	$\begin{array}{c} \uparrow \Gamma - \Pi \\ \Pi - \Gamma \\ \Pi - \Gamma \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \text{А} - \text{Т} \\ \Gamma - \Pi \\ \text{А} - \text{Т} \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \Pi - \Gamma \\ \Pi - \Gamma \\ \Gamma - \Pi \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \Gamma - \Pi \\ \Gamma - \Pi \\ \text{А} - \text{Т} \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \Gamma - \Pi \\ \Gamma - \Pi \\ \text{Т} - \text{А} \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \text{А} - \text{Т} \\ \Gamma - \Pi \\ \Gamma - \Pi \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \text{Т} - \text{А} \\ \Gamma - \Pi \\ \Gamma - \Pi \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \Gamma - \Pi \\ \Gamma - \Pi \\ \Gamma - \Pi \end{array} \downarrow$
Энергия	-38,4	-38,3	-38,3	-36,8	-36,7	-36,3	-36,2	-34,4
Триплет	$\begin{array}{c} \uparrow \Gamma - \Pi \\ \text{А} - \text{Т} \\ \Pi - \Gamma \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \Gamma - \Pi \\ \text{А} - \text{Т} \\ \text{А} - \text{Т} \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \Gamma - \Pi \\ \text{А} - \text{Т} \\ \Gamma - \Pi \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \text{А} - \text{Т} \\ \text{А} - \text{Т} \\ \Pi - \Gamma \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \Pi - \Gamma \\ \text{А} - \text{Т} \\ \Pi - \Gamma \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \Gamma - \Pi \\ \text{А} - \text{Т} \\ \Pi - \text{А} \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \text{Т} - \text{А} \\ \text{А} - \text{Т} \\ \Pi - \Gamma \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \text{А} - \text{Т} \\ \text{А} - \text{Т} \\ \Gamma - \Pi \end{array} \downarrow$
Энергия	-23,2	-22,5	-22,4	-22,3	-22,1	-22,1	-21,9	-21,7
Триплет	$\begin{array}{c} \uparrow \text{А} - \text{Т} \\ \text{А} - \text{Т} \\ \text{А} - \text{Т} \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \Pi - \Gamma \\ \text{А} - \text{Т} \\ \Gamma - \Pi \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \Pi - \Gamma \\ \text{А} - \text{Т} \\ \text{А} - \text{Т} \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \text{Т} - \text{А} \\ \text{Т} - \text{А} \\ \text{А} - \text{Т} \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \text{Т} - \text{А} \\ \text{А} - \text{Т} \\ \Gamma - \Pi \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \text{А} - \text{Т} \\ \text{Т} - \text{А} \\ \text{Т} - \text{А} \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \Pi - \Gamma \\ \text{А} - \text{Т} \\ \text{Т} - \text{А} \end{array} \downarrow$	$\begin{array}{c} \uparrow \text{А} - \text{Т} \\ \text{Т} - \text{А} \\ \text{А} - \text{Т} \end{array} \downarrow$
Энергия	-21,7	-21,7	-21,5	-21,3	-21,3	-21,1	-21,0	-21,7

антикодоном (см. гл. 9). Следует подчеркнуть, однако, что в функционировании нуклеиновых кислот кинетические факторы играют, вероятно, более важную роль, чем термодинамические.

§ 8.4. ТЕРМОДИНАМИКА ПЕРЕХОДОВ СПИРАЛЬ — КЛУБОК

Денатурация нуклеиновых кислот сводится к разрушению двойной спирали. По-видимому, в клетке только тРНК обладают фиксированной третичной структурой.

Нагревание раствора нативной ДНК при некоторых значениях рН и ионной силы вызывает разделение двойной спирали на две цепи, сворачивающиеся в статистические клубки. При этом значительно уменьшаются вязкость и оптическая активность, исчезает гипохромизм, т. е. возрастает интенсивность полосы поглощения в области 2600 Å (см. стр. 498) [75]. Разделение на две цепи непосредственно доказывается центрифугированием ДНК, содержащей N^{15} , в градиенте плотности CsCl (см. стр. 153). Клетки *E. coli*, выращенные в среде, содержащей N^{15} , переносились в среду с обычным N^{14} . При делении клеток образывались редуцированные двойные спирали, в которых одна цепь содержала N^{15} , другая — N^{14} . До денатурации наблюдался один пик плотности 1,717 г/см³, отвечающий двойным спиральям N^{15} — N^{14} . После денатурации появляются два пика, а именно: 1,740 и 1,724 г/см³, отвечающие однонитевым клубкам соответственно с N^{15} и N^{14} . Плотность повышается, так как клубки более компактны, чем спираль [76]. Прямые определения молекулярного веса ДНК показывают, что при денатурации он уменьшается вдвое [75, 77]. Образование клубков при денатурации непосредственно наблюдается в электронном микроскопе (рис. 8.15).

Как и в случае полиаминокислот (см. § 4.5), переход спираль — клубок может рассматриваться как плавление спирали. Простейшая модель для изучения этих процессов — синтетический гомополинуклеотид, содержащий комплементарные пары только одного сорта, например Поли-А — Поли-У. Такая двойная спираль плавится при 65°C в 0,15 М растворе NaCl при рН 7,0. Интенсивность полос поглощения при 2600 Å увеличивается на 34%, а удельное вращение $[\alpha]_D$ убывает на 275°.

Как и следует ожидать, температура плавления ДНК возрастает с увеличением относительного содержания Г — Ц — эти нуклеотиды связаны сильнее, чем А — Т (см. § 8.3). Зависимость $T_{пл}$ от содержания Г — Ц линейна [78]. Экстраполяция этой прямой дает предельные значения $T_{пл} = 69^\circ\text{C}$ для Поли-АТ и 110°C для Поли-ГЦ, хорошо согласующиеся с экспериментальными значениями для соответствующих синтетических полинуклеотидов (65 и 104°C). Температура плавления ДНК растет