

### § 8.8. ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК С МАЛЫМИ МОЛЕКУЛАМИ

Исследование взаимодействий ДНК (и РНК) с малыми молекулами важно для познания структуры ДНК и возможных ее изменений. Малые молекулы ряда соединений существенно влияют на биологическую функцию ДНК в качестве мутагенов (например, акридиновые красители, см. стр. 529) и ингибиторов транскрипции (например, актиномицин и другие антибиотики). Установлено, что это влияние определяется способностью антибиотиков образовывать медленно диссоциирующие комплексы с ДНК [135—137]. Ингибирование транскрипции (см. стр. 565) создается как затруднениями для расплетания ДНК [89], так и практической необратимостью образования комплексов типа ДНК — актиномицин. Акридиновые красители (АК), имеющие примерно такую же константу связывания с ДНК, как и актиномицин при низкой ионной силе, и увеличивающие  $T_{пл}$  ДНК примерно на ту же величину [88], практически не влияют на транскрипцию [138]. Время диссоциации комплекса ДНК — профлавицина составляет по порядку величины  $10^{-3}$  сек, время диссоциации комплекса ДНК — актиномицин — 260 сек.

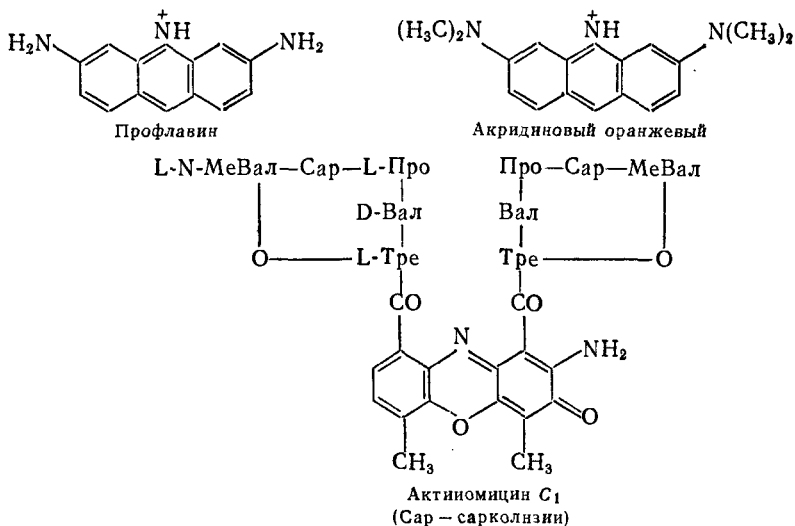
Связывание актиномицина и АК идет ступенчато, через ряд промежуточных форм. Комплексообразование меняет конформацию ДНК. Рентгенографическое исследование показало, что ДНК в комплексе с профлавином имеет больший шаг спирали, чем у свободной ДНК и частично раскручивается [139]. Опыты со сверхскрученной (supercoiled) кольцевой ДНК показали, что в присутствии АК и актиномицина она раскручивается [140, 141]. В такой ДНК основная правая спираль закручена в правую спираль более высокого порядка. Раскручивание сверхскрученной ДНК при образовании комплекса приводит вследствие топологических особенностей кольцевой структуры самой ДНК к изменениям геометрии всей макромолекулы. Установлено существование критической концентрации лиганда, отвечающей полному раскручиванию сверхспирали; дальнейшее добавление красителя вызывает закручивание ДНК в обратном направлении с образованием левой сверхспирали. Эти факты обнаруживаются методом седиментации.

Пространственная модель комплекса должна учитывать раскручивание ДНК и его особенности. Лерман предложил модель *интеркаляции*, согласно которой молекулы АК прослаиваются между парами оснований ДНК, вступая с ними в вертикальное взаимодействие [142]. Для такой интеркаляции необходимо раскручивание сахар-фосфатных остовов обеих цепей ДНК, что создает между парами оснований свободное пространство, достаточное для включения молекулы красителя. Ван-дер-ваальсова «толщина» этой молекулы составляет 3,4 А. Модель Лермана

объясняет раскручивание, но детальный количественный анализ показал, что увеличение шага спирали ДНК, требуемое такой моделью, слишком велико. Модифицированная модель интеркаляции предполагает поворот пар оснований на  $24^\circ$  [126]. Тем самым и сахаро-фосфатный остов поворачивается на  $24^\circ$ , что показано экспериментально [143].

Однако раскручивание ДНК объясняют и модели «внешнего присоединения». Неплоские молекулы без сопряженных связей (например, стероид иредиамин) также вызывают раскручивание, равно как и ряд антибиотиков. Угол поворота пар оснований в комплексе с этидиумбромидом равен  $12^\circ$ , с профлавином ( $8,4 \pm 2,4$ ) $^\circ$ , с дауномицином ( $5,2 \pm 1,4$ ) $^\circ$ , с ногаломицином ( $8,1 \pm 2,3$ ) $^\circ$ , с актиномицином ( $11,4 \pm 3,0$ ) $^\circ$  [141].

Изменение шага спирали ДНК вызывают также ионы металлов и некоторые белки, в том числе гистоны [144]. Изменение шага спирали ДНК в комплексах с АК и актиномицином, однако, значительно больше, что не вызывает удивления, так как для упаковки массивного органического катиона необходимы дополнительные геометрические условия. Приводим формулы некоторых лигандов



Модели «внешнего присоединения» были детально разработаны Гурским [145]. Предполагается, что АК или актиномицин располагаются в узкой бороздке на поверхности двойной спирали ДНК. Молекула профлавина погружена в эту бороздку таким образом, что на внешней поверхности ДНК располагаются кольцевой азот акридинового кольца и аминогруппы, несущие

положительные заряды. Они взаимодействуют с атомами кислорода фосфатных групп посредством водородных и электростатических связей. Диэтил- или диметиламиногруппы в положениях 2 и 8 образуют только электростатические связи. Эти взаимодействия стягивают фосфатные группы двух цепей и вызывают раскручивание спирали. Хромофорное кольцо актиномицина образует водородные связи с 2-аминогруппой гуанина, а амиды пептидных колец — с фосфатными группами. Пептидные кольца актиномицина расположены в узкой бороздке ДНК на разных сторонах хромофорного кольца симметрично; соответствующая ось симметрии второго порядка совпадает с такой же осью ДНК и направлена перпендикулярно к длинной оси хромофора. Эта теоретическая модель отчасти подтверждается рентгенографическими исследованиями комплекса актиномицина с дезоксигуанозином [146]. Другая модель «внешнего присоединения», ранее предложенная в работе [147], таких подтверждений не имеет.

И модель Лермана, и модель Гурского согласуются с рядом фактов [145, 148—150], но обе они встречаются и с трудностями при объяснении некоторых экспериментальных данных [145, 150, 151]. Однозначный выбор модели пока затруднителен.

Крозерс сообщил о получении кристаллического комплекса актиномицина с коротким олигомером, содержащим пять пар оснований [152]. Олигомер имеет лишь одно связывающее место для антибиотика. Исследование таких комплексов методами рентгеноструктурного анализа и ЯМР обещает установление структуры комплексов ДНК с АК и актиномицином.

Изучение связывания малых молекул макромолекулой ДНК требует построения теории одномерной адсорбции на полимере. Если связывающие места независимы друг от друга, то изотерма адсорбции совпадает с изотермой Лэнгмюра

$$y = \frac{Kan}{1 + Ka}, \quad (8,57)$$

где  $y$  — количество связанного лиганда в расчете на мономер,  $K$  — константа связывания,  $n$  — число связывающих мест в молекуле ДНК,  $a$  — активность лиганда. Такую зависимость [153] следует считать скорее исключением. При кооперативной адсорбции связанные молекулы образуют «неидеальный газ». В модели Крозерса [154] каждая молекула лиганда занимает  $m$  звеньев подряд, т. е. мы имеем дело с «неидеальным газом с отталкиванием». Эта модель объясняет экспериментальные кривые адсорбции акридиновых красителей на ДНК с помощью одной константы связывания.

В работе [155] модель Крозерса была обобщена. В ней учтено, что макроскопическая константа связывания может зависеть от расстояния между ближайшими соседними лигандами.

Анализ экспериментальных изотерм адсорбции позволяет получить сведения о форме этой зависимости.

Крозерс провел также численные расчеты изотерм адсорбции для гетерополимеров с различными последовательностями оснований [154]. В работах [156] рассмотрена адсорбция на неоднородной линии и поверхности.

Строгое решение задачи для гетерополимера со связывающими местами двух сортов (пары  $A - T$  и  $G - C$ ) дано в работе [157]. Статистическая сумма для такой системы имеет вид

$$Z = \sum_{q=0}^n a^q Z_q, \quad (8,58)$$

где  $Z_q$  — статистическая сумма для полимера, связавшего  $q$  молекул лиганда,  $n$  — максимальное число адсорбируемых молекул. Для гомополимера

$$Z_q = \frac{(N - mq + q)!}{(N - mq)! q!} \exp\left(-\frac{\Delta Fq}{RT}\right); \quad (8,59)$$

здесь  $N$  — число связывающих мест (нуклеотидных пар) в полимере,  $m$  — число мест, занимаемых одной молекулой лиганда,  $\Delta F = RT \ln K$ . Предэкспоненциальный множитель есть число способов расположения отрезков длины  $m$  на одномерной решетке.

Предположим, что константы связывания молекул равны  $K_A$  или  $K_G$  в зависимости от того, какая из пар ( $A - T$  или  $G - C$ ) находится на расстоянии  $l$  звеньев от левого края лиганда. В определенном положении в молекуле лиганда имеется группа, узонающая нуклеотидную пару. Пронумеруем связывающие места слева направо. Связывающее место  $j$  занято лигандом, если начало последнего находится в местах  $j, j - 1, \dots, j - m + 1$ . Каждой такой ситуации отвечает вклад в статистическую сумму  $b_j^1, b_j^2, \dots, b_j^m$  соответственно; при незанятом месте  $j$  получаем вклад  $b_j^0$ . Имеем

$$\left. \begin{aligned} b_j^0 &= 1 \cdot b_{j-1}^0 + 0 \cdot b_{j-1}^1 + \dots + 1 \cdot b_{j-1}^m, \\ b_j^1 &= s_{j+1} b_{j-1}^0 + 0 \cdot b_{j-1}^1 + \dots + s_{j+1} b_{j-1}^m, \\ &\dots \dots \dots \\ b_j^m &= 0 \cdot b_{j-1}^0 + 0 \cdot b_{j-1}^1 + \dots + 1 \cdot b_{j-1}^{m-1} + 0 \cdot b_{j-1}^m, \end{aligned} \right\} \quad (8,60)$$

где  $s_j = s_A = K_A a$ , если в месте  $j$  находится пара  $A - T$ , и  $s_j = s_G = K_G a$ , если в нем расположена пара  $G - C$ . Сумма (8,58) принимает форму

$$Z_N = b_{N-m+1}^0 + b_{N-m+1}^1 + \dots + b_{N-m+1}^m. \quad (8,61)$$

Из двух последних соотношений следует, что

$$Z_N = Z_{N-1} + s_{N-m+1} Z_{N-m}. \quad (8,62)$$

Для числа сорбированных молекул на пару оснований получаем

$$y = N^{-1} \left\{ s_A \frac{\partial}{\partial s_A} (\ln Z_N) + s_\Gamma \frac{\partial}{\partial s_\Gamma} (\ln Z_N) \right\}. \quad (8,63)$$

Величина  $y$ , будучи интегральной характеристикой, мало зависит от последовательности пар А—Т и Г—Ц. Для случайной последовательности

$$y = s_A \frac{\partial}{\partial s_A} \langle N^{-1} \ln Z_N \rangle + s_\Gamma \frac{\partial}{\partial s_\Gamma} \langle N^{-1} \ln Z_N \rangle. \quad (8,64)$$

Угловые скобки означают усреднение по всем возможным последовательностям. Имеем

$$N^{-1} \ln Z_N = N^{-1} \sum_{j=1}^{N-m+1} \ln(1 + w_j), \quad (8,65)$$

где

$$w_j = b_j^1 / (b_j^0 + b_j^2 + \dots + b_j^m).$$

Вместе с тем

$$\left. \begin{aligned} w_j &= \frac{s_{j+1}}{\prod_{i=0}^{j-1} (1 + w_{j-i})}, \quad \text{если } m+1 \leq j \leq N-m+1, \\ w_j &= \frac{s_{j+1}}{\prod_{i=1}^{j-1} (1 + w_i)}, \quad \text{если } 2 \leq j \leq m, \\ w_1 &= s_1. \end{aligned} \right\} \quad (8,66)$$

Усреднение  $\ln Z_N$  производится с помощью функции [158]

$$C_N(t) = N^{-1} \left\langle \sum_{j=1}^{N-m+1} \ln(t + w_j) \right\rangle. \quad (8,67)$$

Ясно, что  $C_N(1) = N^{-1} \langle \ln Z_N \rangle$ . При  $m = 2$  получается [157, 158]

$$\begin{aligned} \left[ \frac{N}{N-1} \right] C_N(t) &= x_A C_{N-1} \left[ \frac{(t + s_A)}{t} \right] + x_\Gamma C_{N-1} \left[ \frac{(t + s_\Gamma)}{t} \right] - \\ &- C_{N-1}(1) + \frac{2}{(N-1)} C_2(t) + \frac{(N-2)}{(N-1)} \ln t, \end{aligned} \quad (8,68)$$

где

$$C_2(t) = 1/2 \{ x_A \ln(t + s_A) + x_\Gamma \ln(t + s_\Gamma) \},$$

$x_A, x_\Gamma = 1 - x_A$  — доли пар А—Т и Г—Ц. При  $N \rightarrow \infty$  (8,68) принимает вид

$$C_\infty(t) = x_A C_\infty[(t + s_A)/t] + x_\Gamma C_\infty[(t + s_\Gamma)/t] - C_\infty(1) + \ln t. \quad (8,69)$$

Из (8,63), (8,64), (8,68) и (8,69) можно найти точное решение задачи при  $m = 2$ . При  $m > 2$  можно оценить  $C_\infty(1)$  приближенно. Расчет дает [157] для случая связывания лиганда только одним типом центров ( $s_A = 0$ )

$$\left[ 1 + \frac{y}{x_\Gamma - y[1 - x_\Gamma(m-1)]} \right]^{x_\Gamma(m-1)} \frac{y}{x_\Gamma - y[1 + x_\Gamma(m-1)]} = s_\Gamma. \quad (8,70)$$

Если  $x_\Gamma$  мало, то эта изотерма с точностью до членов первого порядка малости обращается в изотерму Лэнгмюра  $y/(x_\Gamma - y) = x_\Gamma a$ . Если  $x_\Gamma \rightarrow 1$ , изотерма (8,70) превращается в изотерму для гомополимера. Формула (8,70) совпадает с вычисленной по Крозерсу тем лучше, чем больше  $m$ . Расчеты проводятся с помощью ЭВМ. Однако для нахождения основных параметров из экспериментальной изотермы достаточно рассмотреть асимптотические зависимости при  $a \rightarrow 0$  и  $a \rightarrow \infty$ . Имеем

$$\left. \begin{aligned} \lim_{y \rightarrow 0} (y/a) &= \langle Z_1 \rangle / NZ_0, \\ \lim_{y \rightarrow 0} \frac{\partial (y/a)}{\partial y} &= \frac{\langle 2Z_2 - Z_1^2 \rangle / Z_0}{\langle Z_1 \rangle} \end{aligned} \right\}. \quad (8,71)$$

где  $Z_1$  и  $Z_2$  — статистические суммы для полимера, на котором адсорбированы один и два лиганда. Усреднение проводится по всем возможным последовательностям пар А — Т и Г — Ц. Статистическую сумму  $Z_2$  можно представить в виде

$$\frac{Z_2}{Z_0} = 1/2 \left[ \frac{Z_1^2}{Z_0^2} - \sum_{\xi=1}^{\nu} \sum_{\eta=1}^{\nu} \Phi_{\xi\eta} K_\xi K_\eta \right], \quad (8,72)$$

где  $\nu$  — число комплексов различного типа, образуемых молекулами лиганда на полимере,  $K_\xi$  и  $K_\eta$  — константы связывания. Здесь в  $Z_1^2$  учитывается число потенциально возможных микросостояний для двух адсорбированных лигандов.  $\Phi_{\xi\eta}$  есть общее число микросостояний с константами  $K_\xi$ ,  $K_\eta$ , не реализуемых вследствие того, что каждый адсорбированный лиганд занимает некоторое число мест, способных связать второй лиганд.

Допустим, что  $\nu = 2$  и имеются две константы  $K_A$  и  $K_\Gamma$ . Из (8,71) и (8,72) следует

$$\lim_{y \rightarrow 0} \frac{\partial (y/a)}{\partial y} = \frac{\langle \Phi_{AA} \rangle K_A^2 + 2 \langle \Phi_{A\Gamma} \rangle K_A K_\Gamma + \langle \Phi_{\Gamma\Gamma} \rangle K_\Gamma^2}{\langle Z_1 \rangle / Z_0}. \quad (8,73)$$

Пронумеруем последовательно все возможные способы связывания одной молекулы лиганда, приписав каждому месту связывания индекс  $i$  ( $i = 1, 2, \dots, N - m + 1$ ). Имеем

$$Z_1 = (N - m + 1)(K_A x_A + K_\Gamma x_\Gamma) Z_0. \quad (8,74)$$

Для средних значений чисел  $\Phi_{\xi\eta}$  получим

$$\langle \Phi_{\xi\eta} \rangle = \sum_{i=1}^{N-m+1} \langle \Phi_{\xi\eta}^i \rangle, \quad (8.75)$$

где  $\langle \Phi_{\xi\eta}^i \rangle$  — среднее число связывающих мест с константой связывания  $K_\eta$ , недоступных для связывания второго лиганда вследствие того, что первый лиганд адсорбирован на  $i$ -м месте с константой связывания  $K_\xi$ . Имеем

$$\langle \Phi_{\xi\eta} \rangle = x_\xi (N - m + 1) \delta_{\xi\eta} + x_\xi x_\eta (m - 1) (2N - 3m + 2), \quad (8.76)$$

где  $\delta_{\xi\eta}$  — символ Кронекера. Окончательно получим

$$\left. \begin{aligned} \lim_{y \rightarrow 0} (y/a) &= \frac{N - m + 1}{N} (x_A K_A + x_T K_T), \\ \lim_{y \rightarrow 0} \frac{\partial (y/a)}{\partial y} &= - \frac{x_A K_A^2 + x_T K_T^2}{x_A K_A + x_T K_T} - \\ &\quad - \left( 2 - \frac{m}{N - m + 1} \right) (m - 1) (x_A K_A + x_T K_T). \end{aligned} \right\} \quad (8.77)$$

Формулы очевидным образом упрощаются при  $N \rightarrow \infty$ ;

$$\left. \begin{aligned} \lim_{y \rightarrow 0} (y/a) &= x_A K_A + x_T K_T, \\ \lim_{y \rightarrow 0} \frac{\partial (y/a)}{\partial y} &= - \frac{x_A K_A^2 + x_T K_T^2}{x_A K_A + x_T K_T} - (2m - 2) (x_A K_A + x_T K_T). \end{aligned} \right\} \quad (8.78)$$

Если концентрация свободного лиганда очень велика, то на полимере реализуется максимально плотная упаковка адсорбированных молекул. Значения  $y_{\max}$  можно определить, исходя из геометрических свойств такой упаковки.

Если для всех возможных положений лиганда на полимере  $K$  отличны от нуля, то  $y_{\max} = m^{-1}$ .

Допустим, что лиганд связывается только с парами одного типа. Пусть молекула лиганда на расстоянии  $l \leq [1/2m]$  от левого конца имеет группу, узнающую пару  $\Gamma - \Pi$ . Здесь  $[1/2m]$  — целое число,  $1/2m - 1 < [1/2m] \leq 1/2m$ . Будем мысленно присоединять молекулы лиганда, начиная с левого конца, так, чтобы узнающая группа каждого последующего лиганда приходилась на ближайшую пару  $\Gamma - \Pi$ , расположенную на расстоянии, большем или равном  $l$  от правого конца предыдущего лиганда. Это дает плотную упаковку. При случайном расположении пар  $\Gamma - \Pi$  их средняя доля, непосредственно занятая связанными молекулами, равна  $y[1 + x_T(m - 1)]$ . Незанятыми могут остаться лишь те пары  $\Gamma - \Pi$ , которые отстоят от правых концов связанных молекул лиганда на  $1, 2, \dots, l - 1$  пар. Вероятность  $w_i$  обнаружить  $i$

незанятых пар равна

$$\left. \begin{aligned} w_i &= W^{-1} x_{\Gamma} (1 - x_{\Gamma})^i, & 1 \leq i \leq l - 2, \\ w_i &= W^{-1} (1 - x_{\Gamma})^{l-1}, & i = l - 1, \end{aligned} \right\} \quad (8,79)$$

где

$$W = \sum_{i=1}^{l-1} w_i.$$

Общая доля незанятых пар  $\Gamma - \text{Ц}$  равна  $y_{\max} = \sum_{i=1}^{l-1} i x_{\Gamma} w_i$ . Поскольку каждая пара  $\Gamma - \text{Ц}$  может быть либо занята, либо свободна, получаем

$$y_{\max} = \frac{x_{\Gamma}}{1 + x_{\Gamma}(m-1) + (1-x_{\Gamma})[1 - (1-x_{\Gamma})^{l-1}]}. \quad (8,80)$$

Если  $[1/2m] < l \leq m$ , то

$$y_{\max} = \frac{x_{\Gamma}}{1 + x_{\Gamma}(m-1) + (1-x_{\Gamma})[1 - (1-x_{\Gamma})^{m-l}]}. \quad (8,81)$$

Если  $l = 1$  или  $l = m$ , то  $y_{\max} = x_{\Gamma} / [1 + x_{\Gamma}(m-1)]$ , что согласуется с приближенной формулой (8,57). В общем случае  $y_{\max}$  зависит от положения узнающей группы в молекуле лиганда.

В случае гомополимера или адсорбции лиганда, независимой от природы мономеров, изотерму адсорбции можно получить в аналитическом виде [154, 155]. Согласно [154] имеем

$$\left(1 + \frac{y}{1-ym}\right)^{m-1} \frac{y}{1-ym} = Ka. \quad (8,82)$$

Однако эта формула не учитывает взаимодействия между молекулами лиганда — непосредственного или в результате вызванного ими изменения структуры полимера. Комбинаторный расчет такого кооперативного связывания проведен в работе [157].

Изложенная теория позволяет интерпретировать результаты эксперимента. Антибиотики типа актиномицина (см. стр. 529) ад-

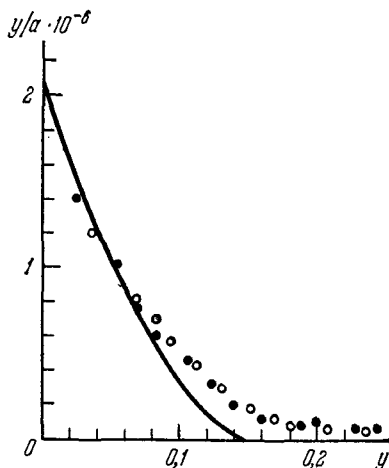


Рис. 8.26. Изотерма адсорбции актиномицина на ДНК.



сорбируются на ДНК и поли-Г — Ц, но не поли-А — Т [158—160]. Типичная изотерма адсорбции актиномицина на ДНК из тимуса представлена на рис. 8.26. Из начального наклона и пересечения кривой с осью ординат можно определить  $K$  и  $m$  (т. е. размер участка ДНК, занимаемого одной молекулой лиганда). Теоретическая изотерма адсорбции, рассчитанная по формуле (8.70), представлена сплошной кривой на рис. 8.26. Совпадение кривой (8.70) с опытной в области малых  $y$  получается при  $m = 5$  и  $K = 5 \cdot 10^6$  л/моль пар оснований. Та же оценка  $m$  сохраняется для ДНК из Т-четных фагов, в которых последовательность оснований близка к случайной, Мюллер и Крозерс [161] получили аналогичную оценку  $m$  из данных, относящихся к ДНК с неслучайной последовательностью. Это показывает, что среднее число пар Г — Ц, занимаемых одной молекулой актиномицина, по-видимому, близко к величине, найденной для полимера со случайной последовательностью. Значение  $m = 5$  согласуется с вандер-ваальсовыми размерами молекулы актиномицина.

Изотерма адсорбции профлавина на ДНК согласуется с теоретическим расчетом, учитывающим взаимодействие адсорбированных молекул. При малых  $y$  имеем  $m = 3$ ,  $K = 16 \cdot 10^6$  л/моль. В области значений  $0,2 \leq y \leq 0,33$   $m$  в среднем убывает до 2, а  $K$  до  $1,6 \cdot 10^6$  л/моль.

### § 8.7. РЕДУПЛИКАЦИЯ ДНК

В принципе возможны три механизма редупликации ДНК [162]: консервативный с сохранением исходной двойной спирали и созданием новой дочерней спирали, полуконсервативный (см. стр. 496) и дисперсный с равномерным распределением исходного материала между четырьмя цепями двух дочерних двойных спиралей (см. [6]). Месельсон и Сталь изучали редупликацию ДНК при делении клеток *E. coli* с помощью меченых атомов и седиментации в градиенте плотности CsCl [76]. Была получена популяция клеток, меченных  $N^{15}$ . В период интерфазы митоза эти клетки переносились в среду, содержащую  $N^{14}$  (но не  $N^{15}$ ), и в ней делились. Из исходной популяции «детей» и «внуков» извлекалась ДНК и определялась ее плотность и радиоактивность. Исходная ДНК имела наибольшую плотность и была мечена  $N^{15}$ . ДНК «детей» оказалась меченой наполовину и ее плотность равнялась среднему арифметическому плотностей  $N^{15}$ -ДНК и  $N^{14}$ -ДНК. Наконец, ДНК «внуков» разделились при седиментации на две зоны — на зону с ДНК, меченную  $N^{14}$ , и зону ДНК, содержащую оба типа ДНК. Эти результаты точно согласуются с полуконсервативным механизмом.