

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.

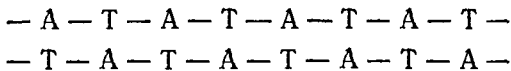
## § 8.7. РЕДУПЛИКАЦИЯ ДНК

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.

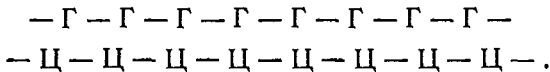
Отвлекаясь от вопроса о структуре хромосом высших организмов, укажем, что, пользуясь методом автордиографии, Тейлор нашел, что их хромосомы в целом редуплицируются также полуконсервативно, и предложил модель, связывающую редупликацию хромосом с редупликацией ДНК [163] (см. также [6]).

Методом автордиографии была изучена редупликация кольцеобразной двойной спирали ДНК — единственной хромосомы *E. coli*. Включение тритиевой метки идет последовательно от нуклеотида к нуклеотиду. Хромосома редуплицируется, начиная с некоторого локуса [164] (см. также [6]).

Корнберг провел редупликационный матричный синтез ДНК *in vitro* [165, 166]. Инкубационная смесь содержала трифосфаты всех четырех дезоксирибонуклеозидов (ТТФ, ЦТФ, ГТФ, АТФ), ионы  $Mg^{++}$  ( $6 \cdot 10^{-3}M$ ), полимеризующий фермент, выделенный из *E. coli*, и нативную ДНК (из тимуса теленка) в качестве затравки; рН равнялось 7,5. В такой полной системе ДНК редуплицируется. Реакция не идет в отсутствие хотя бы одной из компонент или при предварительной обработке затравочной ДНК дезоксирибонуклеазой — ферментом, разрушающим ДНК. С помощью нуклеотидов, меченных  $P^{32}$ , показано, что синтез цепи ДНК поликонденсационный — при включении одного нуклеотида в цепь выделяется одна молекула пирофосфата  $H_2P_2O_7$ . Согласно закону действия масс реакция тормозится при добавлении избытка пирофосфата. Если его количество в 100 раз превышает общее количество трифосфатов, скорость реакции уменьшается вдвое. Позднее, пользуясь улучшенной ферментной системой, Корнберг редуплицировал этим методом ДНК фага  $\phi X 174$ . Вновь полученная ДНК оказалась обладающей инфицирующим действием — при ее введении в бактериальную клетку синтезировались частицы фага [167]. С помощью ДНК-полимеразы удается синтезировать и двойные спирали из синтетических полидезоксирибонуклеотидов



и



В дальнейшем было установлено, что полимеразы Корнберга являются скорее репаразой — медленно действующим ферментом, заполняющим бреши в полинуклеотидных блоках. *In vivo* работает истинная полимеразы. Мы еще мало знаем об этих ферментах.

Статистико-термодинамическое рассмотрение редупликации ДНК проведено в работах [168, 169] (см. также [6]). Изменение свободной энергии при образовании двух двойных спиралей из одной исходной двойной спирали и нуклеозидтрифосфатов можно представить в виде

$$\Delta F = N(2E_1 + \bar{E}_2) - T \Delta S, \quad (8,83)$$

где  $N$  — число нуклеотидов в цепи,  $E_1$  — энергия, выделяемая при включении одного нуклеотида в цепь,  $\bar{E}_2$  — среднее значение энергии, выделяемой в результате взаимодействий, стабилизирующих уотсон-криковскую пару.  $\bar{E}_2$  зависит от относительного содержания  $\alpha$  пар Г — Ц:

$$\bar{E}_2 = \alpha E_{ГЦ} + (1 - \alpha) E_{АТ}. \quad (8,84)$$

Изменение энтропии определяется заменой нуклеозидтрифосфата (НТФ) на пирофосфат (ФФ) в растворе и утратой нуклеотидом, включившимся в двойную спираль, вращательных и поступательных степеней свободы. Этот последний фактор запишем в виде  $k \ln q$ . В целом

$$\Delta S = 2Nk \ln \left( q \frac{\bar{x}_{НТФ}}{x_{ФФ}} \right), \quad (8,85)$$

где  $x_{ФФ}$  — концентрация ФФ в растворе,  $\bar{x}_{НТФ}$  — средняя концентрация НТФ, равная  $(x_{Г}^{\alpha} x_{Ц}^{\alpha} x_{А}^{1-\alpha} x_{Т}^{1-\alpha})^{1/2}$ ,  $x_{Г}$ ,  $x_{Ц}$ ,  $x_{А}$ ,  $x_{Т}$  — концентрации соответствующих НТФ. Если они равны друг другу, то  $\bar{x}_{НТФ} = x_{Г} = x_{Ц} = x_{А} = x_{Т} = 1/4 x_{НТФ}$ . Условие редупликации имеет вид

$$2E_1 + \bar{E}_2 + 2kT \ln \left( q \frac{\bar{x}_{НТФ}}{x_{ФФ}} \right) \geq 0. \quad (8,86)$$

Величины  $E_1$  и  $\bar{E}_2$  равны примерно 4 и 5 ккал/моль. Величина  $q$  равна  $Z'_1 Z_2 / Z_1 Z'_2$ , где  $Z_1$  и  $Z'_1$  — статистические суммы для НТФ в растворе и для НТФ, присоединенного к матрице водородными связями,  $Z_2$  и  $Z'_2$  — статистические суммы для ФФ в растворе и ФФ, входящего в НТФ и присоединенного к матрице.

Оценка дает  $q \sim 10^{-2}$ . При 300°К условие редупликации (8,86) выполняется, пока  $x_{ФФ} / \bar{x}_{НТФ}$  не превысит 400. В клетках и в системах Корнберга это отношение много меньше. Условие (8,86) выполняется, и редупликации, если она не идет, препятствуют, видимо, не термодинамические, но кинетические причины или нехватка НТФ.

Аналогичное рассмотрение денатурации приводит к значению разности свободных энергий разделенных цепей и двойной спирали, равному

$$\Delta F' = N\bar{E}_2 - 2NkT \ln q', \quad (8,87)$$

где  $q'$  характеризует изменение собственной энтропии цепи, проходящееся на один нуклеотид. Условие денатурации есть  $\Delta F' \leq 0$ ,  $q'$  можно приравнять числу конформаций звена одиночной цепи. В звене содержится пять единичных связей, вращению вокруг каждой из них отвечают две-три конформации.  $q'$  равно по порядку величины 10—100. Из (8,87) следует, что температура денатурации

$$T_{\text{пл}} = \frac{\bar{E}_2}{2k \ln q'} = \frac{E_{\text{АТ}}}{2k \ln q'} + \alpha \frac{E_{\text{ГЦ}} - E_{\text{АТ}}}{2kT \ln q'}. \quad (8,88)$$

Экспериментальная зависимость  $T_{\text{пл}}$  (в градусах Кельвина) от  $\alpha$

$$T_{\text{пл}} = 342 + 41\alpha$$

получается при  $E_{\text{АТ}} = 4,7$ ,  $E_{\text{ГЦ}} = 5,3$  ккал/моль и  $q' = 32$ .

Эти грубые расчеты не учитывают роли противоионов (см. стр. 524) и, конечно, строгого количественного значения не имеют. Однако они позволяют оценить порядок величин  $\Delta H$  и  $\Delta S$ .

Очевидно, что судьба двойной спирали зависит от соотношения  $\Delta F$  и  $\Delta F'$ . Если  $\Delta F < \Delta F'$  и  $\Delta F \leq 0$ , то возможна редупликация. Если  $\Delta F' < \Delta F$  и  $\Delta F' \leq 0$ , то происходит денатурация. Если  $\Delta F = \Delta F' \leq 0$ , то оба процесса равновероятны, и, наконец, при  $\Delta F > 0$ ,  $\Delta F' > 0$  двойная спираль остается без изменений.

Статистическая механика редупликации [168, 169] (см. также [6]) исходит из модели Изинга (см. стр. 137). Первое предположение состояло в том, что происходит расплетание спирали на обоих концах. На звеньях освободившихся цепей сорбируются НТФ. Нуклеотидная связь новой цепи возникает, если на любых двух соседних звеньях матрицы сорбируются нуклеотиды, пригодные для образования уотсон-криковской пары. Исследование полученной при этих предположениях статистической суммы позволяет найти зависимость степени редупликации от концентрации НТФ. В силу условия кооперативности (требования надлежащего соседства сорбированных НТФ) редупликация должна идти при критическом значении  $\bar{x}_{\text{НТФ}}/x_{\text{ФФ}}$  по принципу «все или ничего», как фазовый переход. Это справедливо, конечно, лишь при очень больших  $N$ ; при  $N \sim 10^2$  получается лишь S-образность. В рамках той же теории мы приходим к грубому описанию денатурационного перехода.

Однако ряд данных показывает, что НТФ сорбируется на звеньях освободившихся цепей не случайным образом. Синтез новой цепи осуществляется путем последовательного присоединения НТФ к 3-нуклеозидному концу растущей цепи [171]. Следовательно, процесс «антипараллелен» — редупликация происходит на первом конце одной цепи и втором — другой [172]. Такой процесс также кооперативен, так как следующий НТФ

может присоединиться, только если предыдущее место уже занято НТФ. Статистическая сумма системы имеет вид [169] (см. также [6])

$$Z = \sum_{r=0}^{N-1} \sum_{i=0}^r \sum_{p=0}^{N-1-r} \sum_{l=0}^p b_1^{r+p} b_2^{i+l} + b_1^N \sum_{r'=0}^N \sum_{r''=0}^N b_2^{r'+r''}. \quad (8,89)$$

Здесь  $b_1 = \exp(-\bar{E}_2/kT + 2 \ln q)$ ,  $b_2 = a_3/a_2$ ,  $a_2 = \exp(-F_2/kT)$ ,  $a_3 = \exp[-(F_1 - F_3)/kT]$ ,  $F_2 = -kT \ln q$ ,  $F_1 = -\bar{E}_2 - kT \ln(\bar{x}_{\text{НТФ}} Z'_1/Z_1)$ ,  $F_3 = -E_1 - kT \ln(x_{\text{фФ}} Z'_2/Z_2)$ . Первое слагаемое в (8.89) относится к состояниям, в которых цепи еще не разделились и удерживаются вместе хотя бы одной водородной связью. В качестве произвольного промежуточного состояния взято состояние, в котором с одного конца разорвано  $r$  связей между основаниями и выросла новая цепь из  $i$  нуклеотидов, а с другого конца разорвалось  $p$  связей и выросла цепь из  $l$  нуклеотидов. Второе слагаемое относится к состояниям, в которых все связи между основаниями разорваны и синтез идет на одиночных цепях ДНК. Промежуточным считается состояние, в котором на одной цепи выросла новая цепь из  $r'$ , а на другой — из  $r''$  нуклеотидов. Сложное суммирование упрощается, если учесть, что при невысоких температурах, когда денатурация термодинамически невыгодна,  $b_1 < 1$ . Редупликация идет лишь при  $b_1 b_2^2 \geq 1$ . Можно пренебречь в интересующей нас области температур членами порядка  $b_1^N$  и  $b_1^N b_2^N$ . Тогда

$$Z \approx \frac{1}{(1-b_1)^2 (1-b_1 b_2)^2} + \frac{(b_1 b_2^2)^N b_2^2}{(1-b_2)^2}, \quad (8,90)$$

Среднее число присоединившихся нуклеотидов равно

$$2\bar{r} = \frac{\partial \ln Z}{\partial \ln b_2}. \quad (8,91)$$

Если  $b_1 b_2^2 < 1$ ; то  $2\bar{r} \approx \frac{2b_1 b_2}{1-b_1 b_2}$ , и если  $b_1$  мало, то мало и  $\bar{r}$ . Если  $b_1 b_2^2 > 1$ , то  $2\bar{r} \approx 2N - \frac{2}{b_2 - 1}$ , т. е.  $\bar{r} \approx N$  — редупликация идет до конца. Условие редупликации есть  $b_1 b_2^2 = 1$ . Оно совпадает с (8,86). В точке перехода  $\bar{r}$  равно не  $1/2 N$ , а примерно  $1/5 N$ . Это объясняется ролью промежуточных состояний при неполном разделении цепей, когда синтез новых цепей менее выгоден, так как разрыв данной пары оснований может привести к росту лишь одной цепи. Переход по-прежнему очень резок только при  $N \gg 1$ .

Статистико-термодинамическая теория редупликации не противоречит опыту, но не имеет и прямых подтверждений, так как

не исследовалось влияние  $x_{\text{фф}}$  на синтез ДНК *in vitro*. Вместе с тем теория эта груба, поскольку она не учитывает роли протониеонов и рН среды.

Ряд фактов действительно показывает, что редупликация требует расплетания исходной двойной спирали. Репликативный синтез идет с неизменным участием ДНК-полимеразы, которая по-видимому, перемещается вдоль двойной спирали, расплетая ее и синтезируя новые цепи (модель «застежка-молния»). Бактериофаг  $\phi X 174$  содержит не двуспиральную, а односпиральную, однонитевую ДНК. Синсхеймер показал, что размножение этого фага идет через репликативную стадию, в которой ДНК фага становится двуспиральной [173]. Следовательно, в данном случае редуплицируется именно двойная спираль. Это относится и к РНК вирусов, при редупликации которых возникает промежуточная двуспиральная структура [174]. Одноцепочечная ДНК фага  $\phi X 174$  кольцеобразна. В упомянутых выше опытах Корнберга (см. стр. 537) эта ДНК служила затравкой. ДНК-полимераза строила на ней новую цепь, не замкнутую в кольцо. Между тем только кольцевая ДНК биологически активна, т. е. обладает инфекционностью. Корнберг воспользовался другим ферментом — лигазой (препарат Лемана — Оливера) для замыкания новой цепи. Новые цепи строились не с тиминном, а с бромурацилом. Для выделения синтетической ДНК препарат кратковременно обрабатывался ДНКазой так, чтобы примерно у половины молекул в кольце происходил один разрыв. В результате получалась смесь, содержащая в равных количествах матричные кольца, синтетические кольца, матричные и синтетические незамкнутые ДНК, а также двойные кольца без разрывов. Методом седиментации в градиенте плотности выделялись синтетические кольца, содержавшие тяжелый бромурацил. Эти кольца оказались способными инфицировать клетки *E. coli*. Ранее Синсхеймер показал, что замена одного из 5500 нуклеотидов ДНК из фага  $\phi X 174$  приводит к утрате инфекционности. Следовательно, синтез Корнберга был абсолютно точен. Далее удалось получить и синтетические двойные кольца — репликативную форму [167].

Кинетика редупликации ДНК представляет значительно больший интерес, чем термодинамика. Термодинамические условия редупликации несомненно реализованы в делящейся клетке. Исследование кинетики может дать сведения о работе полимеразы — еще очень мало изученного белка.

Расплетание двойной спирали ДНК при одновременной редупликации (а также при синтезе мРНК, см. стр. 565) должно происходить не так, как при денатурации. Выигрыш свободной энергии при образовании новых цепей обуславливает появление значительного вращающего момента. Эта проблема рассматривалась в [120, 175—177]. Автор работы [177] исходит из того, что

полимераза, перемещающаяся вдоль двойной спирали, создает локальные условия, нарушающие баланс взаимодействий между цепями. Предположительно она препятствует гидрофобным взаимодействиям оснований. Соответствующая модель показана на рис. 8.27. Количественная теория процесса, однако, еще не построена.

Элементарная модель для изучения кинетики редупликации ДНК — одномерная матрица, на которой сорбируются НТФ, причем с одного конца идет необратимая поликонденсация. Анализ такой модели, учитывающей необходимость энергии активации для адсорбции и десорбции НТФ (разрыв водородных связей с водой при адсорбции и с матрицей при десорбции), проведен в работе [178] (см. также [6]). Грубые оценки показывают, что диффузия к матрице НТФ из раствора протекает быстрее процессов на матрице и скорость синтеза лимитируется не сорбцией и десорбцией, а ферментативным процессом. В согласии с опытом теория показывает, что синтез должен идти без индукционного периода.

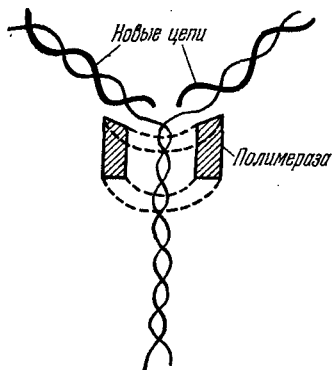


Рис. 8.27. Модель расплетания двойной спирали ДНК при редупликации.

Другая кооперативная модель, предполагающая, что соединение нуклеотидов происходит в любом месте матрицы, где две или большее число

соседних ячеек заняты сорбированными нуклеотидами, противоречат опыту, так как дает заметный индукционный период.

Более строгое рассмотрение линейного матричного синтеза было проведено в последующих работах [179—184]. Изложим работу [184].

Рассмотрим одномерную матрицу из  $m$  ячеек. Центр роста (полимераза) входит в первую ячейку и уходит из  $m$ -й. Синтез необратим, т. е. процесс перемещения центра от  $i-1$ -й к  $i$ -й ячейке протекает вдали от равновесия. Константа скорости роста  $k_r$  для любой ячейки одинакова, константа скорости иницирования  $k_0$  много меньше  $k_r$ . Уход центра роста из  $m$ -й ячейки происходит быстро и не лимитирует процесс. Задача сводится к рассмотрению необратимого блуждания в одномерной системе. Кинетические уравнения имеют вид

$$\left. \begin{aligned} \dot{N}_1 &= k_0 - k_r N_1, \\ \dot{N}_i &= k_r N_{i-1} - k_r N_i, \\ \dot{N}_m &= k_r N_{m-1} \end{aligned} \right\} \quad (8,92)$$

где  $i = 2, 3, \dots, m-1$ , а  $N_i$  — вероятность того, что фермент находится в  $i$ -й ячейке. Ищем среднечисленную степень полимеризации

$$\langle i(t) \rangle = \frac{\sum_{i=1}^m i N_i(t)}{\sum_{i=1}^m N_i(t)} \quad (8,93)$$

при начальных условиях  $N_1(0) = \dots = N_m(0) = 0$ . Решение системы (8,92) с помощью преобразования Лапласа — Карсона имеет вид

$$N_i(t) = \frac{k_0}{k_r} \sum_{l=i}^{\infty} f(l), \quad i = 1, \dots, m-1,$$

$$N_m(t) = k_0 t \sum_{l=m-2}^{\infty} f(l) - (m-1) \frac{k_0}{k_r} \sum_{l=m-1}^{\infty} f(l), \quad (8,94)$$

где

$$f(l) = (k_r t)^l \frac{\exp(-k_r t)}{l!}.$$

Получаем

$$2k_2 t \langle i \rangle = \left[ 2k_r t \sum_{l=0}^{m-3} f(l) + (k_r t)^2 \sum_{l=0}^{m-4} f(l) + \right. \\ \left. + 2mk_r t \sum_{m-2}^{\infty} f(l) - m(m-1) \sum_{m-1}^{\infty} f(l) \right]. \quad (8,95)$$

При  $k_r t \ll 1$  имеем  $N_i \rightarrow 0$ ,  $N_m \rightarrow 0$ ,  $\langle i \rangle \rightarrow 1$ , т. е. синтеза нет. При  $k_r t \gg 1$  находим  $N_i \rightarrow k_0/k_r$ ,  $N_m \rightarrow k_0 t$ ,  $\langle i \rangle \rightarrow m$ , т. е. синтез идет нацело. Эти результаты совпадают с полученными в работах [179, 180].

Константа скорости  $k_r = \omega k_i$ , где  $\omega$  — вероятность того, что ячейка, находящаяся перед центром роста, содержит адсорбированный мономер, а  $k_i$  — константа скорости его включения в растущую цепь. Так как процесс не лимитируется диффузией [178, 184],  $\omega$  имеет равновесное значение и выражается изотермой Ленгмюра

$$\omega = \frac{Ka}{1 + Ka}, \quad (8,96)$$

где  $K = \exp(-E/kT)$ ,  $a = \exp(\mu/kT)$ ,  $E$  — энергия сорбции,  $a$  — абсолютная активность НТФ в растворе,  $\mu$  — химический



потенциал НТФ. Так как  $\mu = \mu^0 + kT \ln(\gamma c)$ ,  $a = A c$ ,  $A = \gamma \exp(\mu^0/kT)$ , где  $\gamma$  — коэффициент активности,  $c$  — концентрация НТФ,  $\mu^0$  — стандартный химический потенциал. При  $\omega \ll \ll 1$   $Ka \ll 1$  и

$$\omega = Ka = Ac \exp(-E/kT), \quad (8,97)$$

$$k_r = k_i A c \exp(-E/kT). \quad (8,98)$$

Необходимо резкое увеличение  $c$ , чтобы перейти от малого к большому значению  $\langle i \rangle$ . Такое увеличение вряд ли происходит во время деления клетки. С другой стороны, зависимость  $\langle i \rangle$  от  $E$  оказывается S-образной, и достаточно малого изменения  $E$  для полного синтеза, что может определяться кооперативностью процесса — взаимодействием соседних нуклеотидов на матрице. При малых значениях  $\omega$  уравнения (8,97) и (8,98) справедливы и в этом случае.

Приведенная трактовка эквивалентна рассмотрению, основанному на теории абсолютных скоростей реакций (см. стр. 354). Константу скорости реакции  $i$ -мера, включающего в цепь сразу два нуклеотида, можно записать в виде

$$k = \frac{kT}{h} \omega. \quad (8,99)$$

Экспериментальные значения для скорости синтеза ДНК равны для *E. coli*  $1,8 \cdot 10^3$ , для клеток лимфомы мышей 200 мономеров на звено в 1 сек. Это отвечает  $\omega = 2,8 \cdot 10^{-10}$  и  $3,1 \cdot 10^{-11}$ .

Свободная энергия активации  $F^\ddagger$  выражается через константу равновесия активированного комплекса  $i$ -мера с двумя нуклеотидами

$$F^\ddagger = -RT \ln K^\ddagger,$$

где

$$K^\ddagger = \frac{\omega}{[i] \bar{c}^2}.$$

Концентрация  $i$ -мера  $[i]$  и  $\bar{c}$  выражаются в безразмерных единицах ( $\bar{c}$  — число молекул НТФ в клетке). Оценки дают  $F^\ddagger$  для *E. coli* 13,0 ккал/моль, для мыши 9,3 ккал/моль. Следует подчеркнуть, что в этом расчете энергия активации относится только к адсорбции НТФ, но не к включению в цепь. Теория также не учитывает ряда факторов: гетерогенности матрицы, кооперативности процесса, влияния растворителя. Тем не менее, она дает разумное полуколичественное описание матричного синтеза и применима также к синтезу РНК на ДНК и к синтезу белка на мРНК.

Ферментативный синтез полинуклеотидов может идти и без матрицы. В этом случае полимер получается после длительного

латентного периода, продолжительность которого убывает с ростом концентрации фермента [185]. Так идет, например, синтез Поли-А — Т. Если в качестве затравки введен олигомер, то лаг-период быстро убывает с его длиной. По-видимому, даже короткие олигомеры могут служить матрицами для растущего полимера, если он соскальзывает с матрицы [186, 187]. Это было доказано в работе [188], посвященной синтезу Поли-А — Т на олигомерах. Теория такого синтеза, исходящая из скольжения новых цепей, развита в [189]. Рис. 8.28 поясняет модель. Ищем

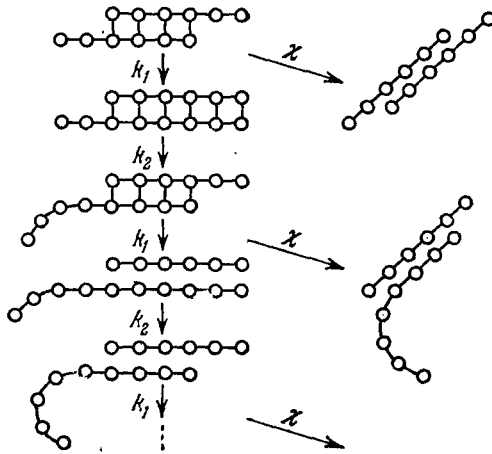


Рис. 8.28. Схема синтеза полинуклеотида на олигонуклеotide.

время  $\tau$ , нужное для построения цепи из  $N$  звеньев на матрице из  $n$  звеньев ( $n < N$ ). Необходимо учесть также возможность полного ухода новой цепи с матрицы, в результате чего синтез прекращается. Пусть в момент  $t = 0$  растущая цепь достигла размеров матрицы  $n$  и сдвигается на одну пару связей. Система может перейти из этого состояния в состояние  $i$ , отвечающее дальнейшему росту цепи и ее скольжению. Константа скорости  $k$  такого процесса дается выражением

$$1/k = 1/k_1 + 1/k_2, \quad (8,100)$$

где  $k_1$  характеризует рост цепи,  $k_2$  — скольжение. Кроме того, система может перейти в состояние  $i'$  отделения цепи от матрицы, характеризуемого константой скорости  $\chi$ . Обозначим число субсистем в состоянии  $i$  через  $m_i(t)$ , в состоянии  $i'$  через

$m'_i(t)$ . Кинетические уравнения записываются следующим образом:

$$\left. \begin{aligned} \dot{m}_0 &= -(k + \chi) m_0, \\ \dot{m}_i &= k m_{i-1} - (k + \chi) m_i, \\ \dot{m}_{i'} &= \chi m_{i-1}, \\ m_i(0) &= m_{i'}(0) = 0. \end{aligned} \right\} \quad (8,101)$$

Решения этих уравнений имеют вид

$$\left. \begin{aligned} m_i(t) &= m_0(0) [(kt)^i / i!] \exp[-(k + \chi)t], \quad i \geq 0, \\ m_{i'}(t) &= m_0(0) \chi \int_0^t [(kt)^{i-1} / (i-1)!] \exp[-(k + \chi)t] dt, \quad i \geq 1. \end{aligned} \right\} \quad (8,102)$$

Вероятность найти субсистему в состоянии  $i$  есть

$$\omega_i = A m_i. \quad (8,103)$$

Коэффициент пропорциональности  $A$  находится из условия нормировки

$$\sum_{i=0}^{\infty} (\omega_i + \omega'_{i+1}) = 1.$$

Состояния  $i$  и  $(i+1)'$  отвечают цепям, длины которых на  $i$  пар связей больше  $n$ . В состоянии  $i$  цепь связана с матрицей, в состоянии  $(i+1)'$  она сошла с нее. Получаем  $A = m_0(0)^{-1}$ . Средняя длина растущей цепи равна

$$\begin{aligned} \bar{l} &= \sum_{i=0}^{\infty} i (\omega_i + \omega'_{i+1}) = \sum_{i=0}^{\infty} i [(kt)^i / i!] \exp[-(k + \chi)t] + \\ &+ \chi \int_0^t \sum_{i=0}^{\infty} i [(kt)^i / i!] \exp[-(k + \chi)t] dt = \frac{k}{\chi} [1 - \exp(-\chi t)], \end{aligned} \quad (8,104)$$

и при  $t \rightarrow \infty$  получим  $\bar{l} \rightarrow k/\chi$ . Для времени, в течение которого  $\bar{l}$  становится равным  $N - n$ , имеем

$$t_{N-n} = \frac{1}{\chi} \ln [1 - \chi/k (N - n)]^{-1}, \quad (8,105)$$

для среднего времени роста цепи длиной  $n$  —

$$t_n = n/k_1 + 1/k_2. \quad (8,106)$$

Время  $\tau_N$  равно сумме  $t_n + t_{N-n}$ . Если  $N \gg n$ , то

$$\tau_N = \frac{1}{\chi} \ln [1 - \chi N/k]^{-1}. \quad (8,107)$$

Наблюдаемая сильная зависимость  $\tau_N$  от  $n$  определяется тем, что  $\chi$  должно убывать с увеличением  $n$ . Из опыта следует, что  $\chi$  резко убывает в области между  $n = 4$  и  $n = 5$ . Это означает, что  $n = 4$  есть критический размер матрицы, при котором новая цепь может, по-видимому, образовывать с матрицей двойную спираль. Оценки параметров дают  $N/k \sim 1$  мин,  $k_1 \sim \sim 30 N \text{ мин}^{-1}$ ,  $k_2 \sim N \text{ мин}^{-1}$ .

Новая ДНК синтезируется *in vitro* всегда в направлении  $5' \rightarrow 3'$ . Вместе с тем имеются данные, указывающие, что *in vivo* редуплицируются обе цепи — одна в направлении  $5' \rightarrow 3'$ , другая в направлении  $3' \rightarrow 5'$ . Оказаки и сотрудники [190] предложили выход из этого противоречия, допустив существование

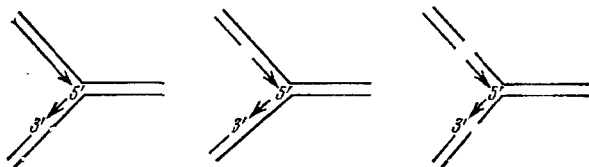


Рис. 8.29. Возможные схемы редупликации ДНК по Оказаки.

прерывного механизма редупликационного синтеза. Короткие участки новой ДНК синтезируются на одной или на обеих цепях в точке репликации, всегда в направлении  $5' \rightarrow 3'$  (рис. 8.29). Далее участки соединяются, образуя новые цепи. Если модель правильна, то последние реплицированные участки одной или обеих дочерних цепей могут быть отделены. Селективное и временное ингибирование фермента, катализирующего образование фосфодиэфирных связей между цепями ДНК, должно приводить к накоплению новых коротких цепей.

Эти предсказания подтверждены экспериментальными исследованиями, показавшими, что меченный тритием тимидин incorporates в короткие цепи [190, 191], которые лишь позднее объединяются в длинные.

Вернер исследовал репликацию, пользуясь меченым тиминном, а не тимидином, и показал, что тимин используется бактериями для репликации, а тимидин — для репарационного синтеза [192]. Вернер предлагает измененную модель: ДНК непрерывно реплицируется в развилке двойной спирали посредством одновременного удлинения обеих новых цепей. Преимущественное использование тимина показывает, что процесс репликации отличен от репарационного синтеза. Короткие цепи, найденные Оказаки, возникают под действием специфических нуклеаз. Однако схема Вернера не подтвердилась.

Точный механизм редупликации ДНК пока нельзя считать установленным. Репликация *in vivo* начинается на определенной стадии развития клетки с участием регуляторных факторов, по-видимому, связанных с клеточной мембраной.

### Литература

1. O. Avery, C. McLeod, M. McCarty, J. Exp. Med. **79**, 137 (1944).
2. Е. М. Крепс, Вестник АН СССР, № 10, 84 (1970).
3. Э. Коссовер, Молекулярная биохимия, «Мир», 1964.
4. Д. Уотсон, Молекулярная биология гена, «Мир», 1967.
5. К. Анфинсен, Молекулярные основы эволюции, ИЛ, 1962.
6. М. В. Волькенштейн, Молекулы и жизнь. Введение в молекулярную биофизику, «Наука», 1965. (Дополненные издания: Moleküle und Leben, Thieme, 1969; Molecules and Life, Plenum Press, 1970.)
7. С. Е. Бреслер, Молекулярная биология, «Наука», 1973.
8. Д. Хаггис, Д. Михн, А. Мюир, К. Робертс, П. Уокер, Введение в молекулярную биологию, «Мир», 1967.
9. В. Браун, Генетика бактерий, «Наука», 1968.
10. Д. Кендрью, Нить жизни, «Мир», 1968.
11. У. Хэйс, Генетика бактерий и бактериофагов, «Мир», 1965.
12. Г. Мендель, Опыты над растительными гибридами, «Наука», 1965.
13. Н. В. Тимофеев-Ресовский, Цитология **2**, 45 (1960).
14. В. П. Эфроимсон, Введение в медицинскую генетику, Медгиз, 1964.
15. Н. К. Кольцов, Организация клетки, Биомедгиз, 1936; Бюлл. МОИП **70**, № 4, 75 (1963).
16. Д. Бидл, в сб. «Химические основы наследственности», ИЛ, 1960.
17. M. Delbrück, N. Timofeev-Resovsky, K. Zimmer, Nachr. Biologie Ges. Wiss., Göttingen **1**, 189 (1935).
18. Э. Шредингер, Что такое жизнь с точки зрения физики? ИЛ, 1947; Атомиздат, 1972.
19. Д. Уотсон, Двойная спираль, «Мир», 1969.
20. J. Lederberg, E. Tatum, Cold Spring Harbor Symposia **11**, 113 (1946).
21. Ф. Жакоб, Э. Вольман, Пол и генетика бактерий, ИЛ, 1962.
22. Д. Дэвидсон, Биохимия нуклеиновых кислот, «Мир», 1968.
23. F. Griffith, J. Hyg. Cambridge **27**, 113 (1928).
24. H. Fraenkel-Conrat, J. Amer. Chem. Soc. **78**, 882 (1956).
25. A. Gierer, G. Schramm, Nature **177**, 702 (1956).
26. Г. Френкель-Конрат, В. Сингер, Р. Вильямс, в сб. «Химические основы наследственности», ИЛ, 1960.
27. Ф. Гартман, в сб. «Химические основы наследственности», ИЛ, 1960.
28. Г. Стент, Молекулярная биология вирусов и бактерий, «Мир», 1965.
29. R. Franklin, R. Gosling, Nature **171**, 156, 740 (1953).
30. J. Watson, F. Crick, Nature **171**, 737, 964 (1953).
31. M. Wilkins, A. Stokes, H. Wilson, Nature **172**, 759 (1953).
32. F. Crick, Sci. Amer. Oktober, 1954.
33. D. Marvin, M. Spencer, M. Wilkins, J. Mol. Biol. **3**, 547 (1961).
34. M. Tunis-Schneider, M. Maestre, J. Mol. Biol. **52**, 521 (1970).
35. Т. Д. Мокульская, Биофизика **11**, 528 (1966).
36. M. Sundaralngam, Biopolymers **7**, 821 (1969).
37. A. Lakshminaraynam, V. Sasisekharan, Biopolymers **8**, 475, 489, 505 (1969).
38. S. Arnott, Progr. Biophys. Mol. Biol. **21**, 265 (1970).
39. Д. Джосс, Труды 5-го Международного биохим. конгресса, Симпозиум 1, Изд-во АН СССР, 1962.