

современной молекулярной биологией. Лишь в редких случаях информация об этих процессах достаточна для формулировки физических задач. Однако физико-математическое исследование поведения эукариот (*митоз, мейоз*) и онтогенеза развивается и служит важным источником идей для теоретической биологии. Мы познакомимся с этими направлениями исследований в последних главах книги.

§ 7.2. Структура нуклеиновых кислот

Далеко не всегда связь между структурой молекулы и ее функциональными свойствами проста и очевидна. Мы видели, как сложно установление такой связи для белков. 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 (1952). Ориентированные волокна литиевой соли нативной ДНК дали рентгенограммы, содержащие до 100 рефлексов (см. рис. 5.5). Крестообразное расположение рефлексов сразу показывает, что структура является спиральной.

Нативная ДНК построена в виде *двойной спирали*, состоящей из двух взаимно перевитых полинуклеотидных цепей, азотистые основания которых попарно соединены водородными связями. Аденин (А) одной цепи связан с тимином (Т) другой, а гуанин (Г) — с цитозином (Ц). Схемы этих пар (*уотсон-криковские па-*

Т а б л и ц а 7.1. Геометрия ДНК в различных формах

Соль ДНК	Влажность, %	Число звеньев на виток спирали	Шаг спирали, нм	Перемещение на один нуклеотид, нм	Поворот на нуклеотид, град	Φ_1 , град	Φ_2 , град
Na, А-форма	75	11	2,82	0,255	32,7	20	16
Na, В-форма	92	10	3,46	0,346	36	—	—
Li, В-форма	66	10	3,37	0,337	36	2	5
Li, С-форма	66	9,3	3,10	0,332	39	6	10

Здесь Φ_1 — угол между перпендикуляром к оси спирали и плоскостью оснований, Φ_2 — двугранный угол между плоскостями оснований пары.

ры) показаны на рис. 7.1, молекулярная модель двойной спирали (В-форма, см. далее) — на рис. 7.2. Таким образом, две цепи ДНК в двойной спирали взаимно комплементарны, т. е. имеется однозначное соответствие между их нуклеотидами: Т соответствует А и Г соответствует Ц. Это соответствие раскрывает смысл правил Чаргаффа (с. 39).

ДНК может кристаллизоваться в различных двуспиральных формах. При низкой относительной влажности (до 70%) ДНК кристаллизуется в моноклинной А-форме с параметрами решетки $a = 4,04$ нм, $b = 2,207$ нм, $\beta = 97,1^\circ$. При большей влажности реализуется гексагональная В-форма, для которой $a = 4,6$ нм.

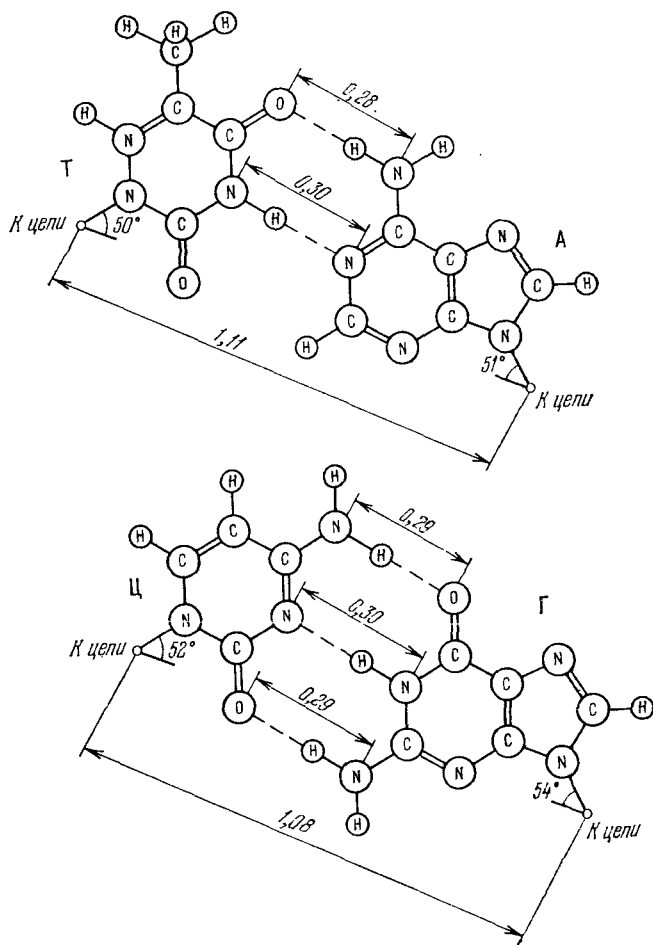


Рис. 7.1. Пары АТ и ГЦ

Сбе формы Na-соли ДНК показаны схематически на рис. 7.3. Позднее была открыта С-форма. В табл. 7.1 приведены характеристики А-, В-, С-форм ДНК. Они различаются значениями шага двойной спирали, углами поворота между соседними парами оснований и наклоном плоскости пар к оси спирали.

Конформация полинуклеотидной цепи определяется набором углов поворота, показанных на рис. 7.4. Углы отсчитываются

следующим образом: если смотреть вдоль связи, вокруг которой происходит вращение, то дальняя связь вращается по часовой

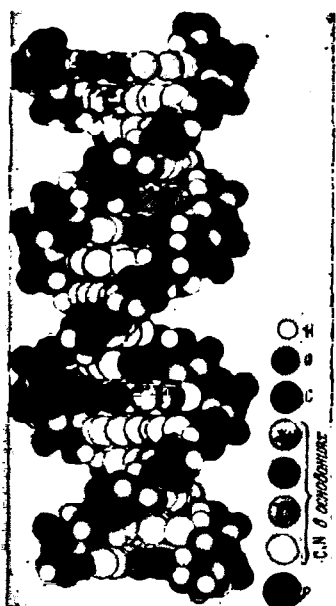


Рис. 7.2. Молекулярная модель В-формы ДНК

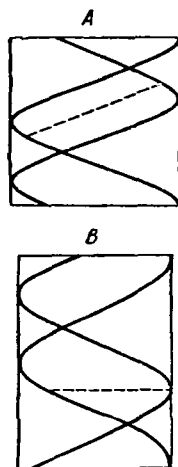


Рис. 7.3. Схема строения А- и В-форм Na-соли ДНК

стрелке относительно ближней. Отсчет производится от *цис*-положения связей (рис. 7.5). В табл. 7.2 приведены значения углов поворота для трех конформаций ДНК.

Конформация полинуклеотидной цепи зависит от конформации сахара — рибозы или дезоксирибозы. Сахар встречается в четырех конформациях, различающихся тем, какой из атомов

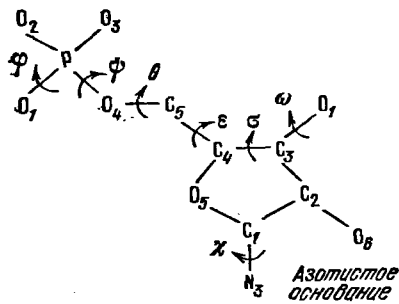


Рис. 7.4. Углы поворота в звене полинуклеотидной цепи

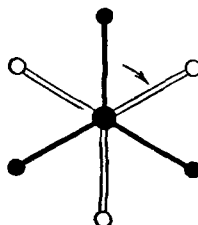


Рис. 7.5. Направление поворота

пятичленного цикла, C_2 или C_3 (рис. 7.4), выведен из плоскости остальных четырех атомов. Если атом C_2 (или C_3) находится по ту же сторону от плоскости, что и C_5 , то конформация име-

Т а б л и ц а 7.2. Конформации ДНК

Форма	ψ , град.	θ , град.	ϵ , град.	σ , град.	ω , град.	ϕ , град.
A	283	167	67	76	221	279
B	281	212	58	130	147	282
C	315	143	48	168	211	212

руется *эндо*, в противоположном случае — *экзо*. Возможны, следовательно, C_2 -эндо-, C_3 -эндо-, C_2 -экзо- и C_3 -экзо-формы. Первые две встречаются чаще.

Теоретические расчеты конформаций полинуклеотидных цепей и двойных спиралей не просты, так как эти конформации зависят от многих углов. Конформационно лабильна и группа рибозы или дезоксирибозы. Соответственно проводятся расчеты с «жестким» и «мягким» сахаром.

Эксперимент (диффузное рассеяние рентгеновских лучей, КД и т. д.) и теория показали, что следует говорить не об отдельных конформациях A, B, C ДНК, но о конформационных семействах A и B. C-форма, а также T- и D-формы сходны с B-формой и относятся к B-семейству. Двойная спираль оказывается структурой, способной к непрерывному изменению конформации. В пределах семейств A и B конформации меняются некооперативно, вероятно, путем плавного изменения параметров спирали. Напротив, переход от одного семейства к другому, $A \rightarrow B$, происходит резко, кооперативно и сопровождается скачкообразным изменением конформации сахара от 3-эндо к 2-эндо. Показано, что для заданного расположения азотистых оснований существует ограниченное число конформаций сахарофосфатного остова регулярной двойной спирали (Иванов и сотрудники).

Сведения о конформационной структуре нуклеиновых кислот получаются непосредственно из данных рентгеноструктурного анализа монокристаллов олигонуклеотидов. На рис. 7.6 показаны структуры двух форм ДНК — W- и Z.

Двойная спираль ДНК в любой возможной ее конформации характеризуется широкой и узкой спиральными бороздками, выемками на поверхности макромолекулы.

Двойные спирали ДНК в A-, B- и C-формах — правые. Позднее Рич и сотрудники открыли левую двойную спираль ДНК. Так как она зигзагообразна, эта форма была названа Z-формой. Впервые Z-форма была получена для дуспиральных гексамеров ГЦ:



Z-формы образуются цепями из чередующихся пуринов и пиримидинов. ДНК стабилизуется в Z-форме при высокой концентрации соли или в результате бромирования или метилирования.

Дальнейшая работа состояла в поиске Z-формы в природе. Были получены антитела кролика к коротким бромированным двойным спиральям, построенным из чередующихся Г и Ц. С помощью этих антител удалось обнаружить Z-ДНК в политенных

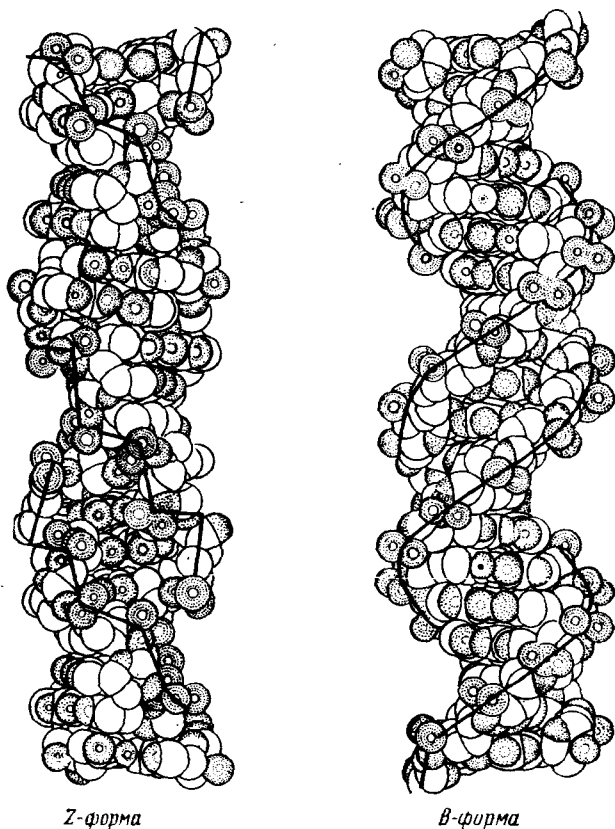


Рис. 7.6. Z- и B-формы ДНК

хромосомах личинок плодовой мушки. Антитела к Z-форме связываются такими хромосомами в определенных местах. Работа с синтетическими ДНК показала, что последовательности пуринов — пиримидин могут испытывать переходы от правой B-формы к левой Z-форме, в зависимости от концентрации соли или химической модификации — от метилирования. Такие переходы обратимы. Метилирование и деметилирование, по-видимому, существенны для контроля активности генов. Есть основания думать, что Z-ДНК играет некоторую регуляторную роль.

Антигены, связывающие антитела к Z-ДНК, оказались содержащимися в организмах мышей, больных волчанкой. Есть предположение о важной роли Z-ДНК в аутоиммунных заболеваниях.

Ряд фактов свидетельствует о конформационных превращениях ДНК, существенных, по-видимому, для ее функционирования, для взаимодействия с ферментами (полимеразы), для регуляции действия генов и т. д. (см. § 8.3 и 8.8).

Конформационная динамика ДНК исследована в ряде теоретических работ (Иванов, Журкин и др.). Определены диапазоны тепловых флуктуаций угла спирального вращения, изучена

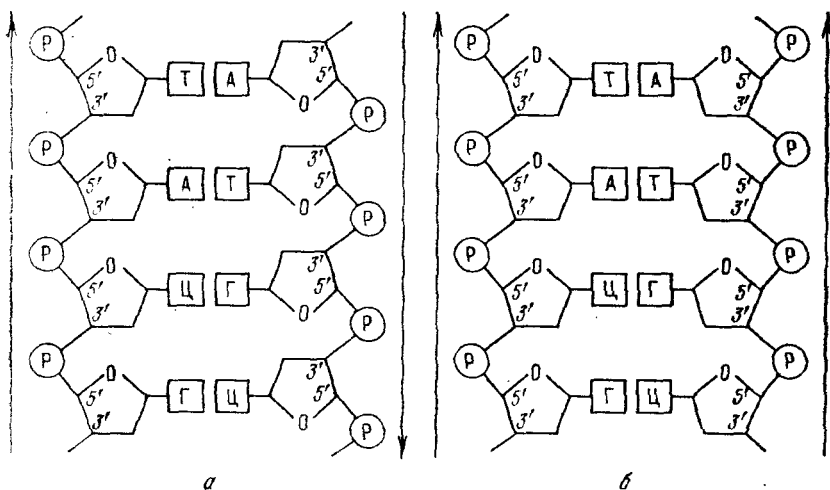


Рис. 7.7. Схемы двойных спиралей, построенных из антипараллельных (а) и параллельных (б) цепей

гибкость двойной спирали в зависимости от ее первичной и вторичной структур. На основе этих расчетов получены модели нуклеосом — участков хромосом, в которых ДНК «намотана» на гистоны и негистоновые белки (см. с. 294). Эти модели в общем согласуются с опытом.

Очевидно, что имеются две возможности организации двойной спирали — из параллельных и антипараллельных цепей (рис. 7.7). Справедливость второй модели доказана рентгенографическими и биохимическими данными. Цепи в двойной спирали антипараллельны.

Специфическая двуспиральная структура ДНК непосредственно объясняет важные факты — репликацию ДНК при митозе и метаболическую устойчивость ДНК. По мысли Крика и Уотсона, при репликации двойная спираль сначала разделяется вследствие разрыва водородных связей и раскручивания цепей. Каждая из них служит матрицей для сборки новой цепи, комплементарной к матрице. Мономеры новой цепи соединяются с матрицей, об-

разу уотсон-криковские пары АТ, ТА, ГЦ и ЦГ. Одновременно происходит поликонденсация нуклеозидтрифосфатов и в результате образуются две двойные спирали, тождественные первоначальной. Такая полуконсервативная модель (новая спираль содержит одну старую и одну новую цепь) действительно подтверждается опытом (см. § 7.7). Ошибки при репликации являются точечными мутациями (§ 8.7). Двойная спираль подобна однородному кристаллу, азотистые основания в ней плотно упакованы и прочно связаны слабыми взаимодействиями (§ 7.3). Этим объясняется метаболическая устойчивость ДНК, высокая сохранность генов. В свое время Шредингер задавался вопросом о причинах такой сохранности вещества, построенного из легких атомов С, Н, N, O, P. Открытие двойной спирали ответило на этот вопрос.

ДНК — самые большие молекулы, известные науке. Из фага Т2 были выделены кольцевые двуспиральные молекулы ДНК длиной до 49 мкм, а из *E. coli* — до 400 мкм, что соответствует м.м. порядка 10^9 . На рис. 7.8 и 7.9 показаны фотографии молекул ДНК, полученные в электронном микроскопе.

Растворы нативной ДНК очень вязки. Однако это не означает, что вся макромолекула является двуспиральным жестким стержнем. ДНК свернута в очень рыхлый клубок, так как жесткость ее велика — персистентная длина ДНК (см. с. 77) в 0,15 М NaCl равна 50 нм, в 0,0014 М NaCl — 80 нм. Длина 50 нм отвечает примерно 150 нуклеотидным звеньям.

Плотность ДНК, приблизительно равная $1,7 \text{ г/см}^3$, линейно растет с увеличением содержания Г+Ц-пар (м. м. А+Т = 247, Г+Ц = 273). Вместе с тем АТ- и ГЦ-пары занимают примерно одинаковые объемы в двойной спирали. На каждый процент ГЦ приходится возрастающее плотности на $0,00103 \text{ г/см}^3$.

При нагревании, изменении рН и т. д. происходит денатурация ДНК — переход двойная спираль — два клубка (§ 7.4, 7.5). За этим переходом удобно следить по спектру поглощения ДНК (в области 260 нм) и по КД. Двойная спираль обладает в этой области значительным гипохромизмом — интенсивность поглощения у спирализованной нуклеиновой кислоты значительно меньше, чем у денатурированной, клубкообразной.

Круговой дихроизм (КД) ориентированных и неориентированных пленок ДНК меняется при изменении влажности и ионной силы. Спектры КД Na- и Li-солей ДНК при относительной влажности (о. в.) $\geq 92\%$ те же, что у растворов и отвечают В-форме. При о. в. от 75 до 66% пленки с 3% Na⁺ дают спектр КД, отвечающий А-форме. КД позволяет судить о конформационных свойствах ДНК в растворах и в пленках. Весьма интересны исследования анизотропии КД и оптической активности макромолекул ДНК, ориентированных в потоке (с.158).

Указанными методами обнаруживаются двуспиральные участки в молекулах РНК, в которых нет комплементарных цепей и для которых не соблюдается правило Чаргаффа. Двуспиральные



Рис. 7.8. Электронная микрофотография кольцевой двойной спирали ДНК из фага λ . Увеличение 44 000



Рис. 7.9. Электронная микрофотография ДНК из фага T2. Увеличение 80 000

участки нуклеиновых кислот моделируются синтетическими полинуклеотидами. В 0,1 М NaCl поли-А образует двойную спираль с поли-У, причем наибольший гипохромизм, т. е. наибольшая степень двуспиральности, наблюдается при составе смеси полинуклеотидов 1 : 1. В присутствии двухвалентных катионов,

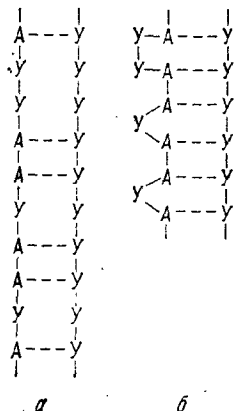


Рис. 7.10. Возможные вторичные структуры комплексов поли-У с поли-АУ

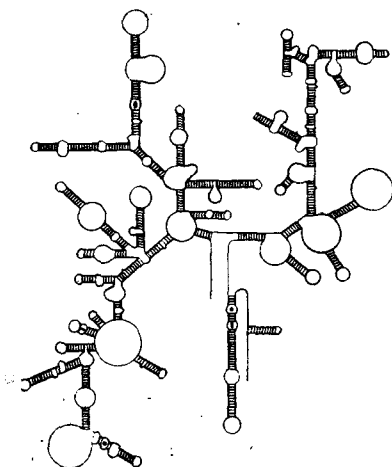


Рис. 7.11. Схема вторичной структуры одной из рибосомных РНК *E. coli*. Показаны двуспиральные участки и петли

в $1,2 \times 10^{-2}$ М растворе $MgCl_2$ максимальный гипохромизм отвечает соотношению поли-У : поли-А = 2 : 1, т. е. образуется тройная спираль. Катионы необходимы для спирализации, так как они компенсируют заряды фосфатных групп и, тем самым, уменьшают электростатическое отталкивание цепей.

Изучение смесей поли-У и сополимеров поли-АУ различного состава позволило установить природу дефектных участков в двойной спирали. Аденин А комплементарен У и связывается с ним, У с У не связывается. При взаимодействии поли-У с поли-АУ возможны две структуры, показанные на рис. 7.10. Либо в тех местах, где против У расположен У, нет водородных связей, но спираль остается спиралью (рис. 7.10, а), либо неспаренные нуклеотиды вытесняются из спирали и образуют *петли* (рис. 7.10, б). Эти две структуры различаются соотношением поли-У : поли-АУ одинаковой степени полимеризации в системе с максимальным гипохромизмом, т. е. в двойной спирали. Для структуры а это соотношение составляет 10 : 10, для структуры б — 6 : 10. Опыт однозначно свидетельствует в пользу второй возможности — образуются петли.

Все типы РНК характеризуются как наличием протяженных петель, так и двуспиральных участков, образующих «шпильки».

На рис. 7.11 показана структура одной из РНК. Спаривание оснований происходит лишь в двуспиральных участках. Денатурационная стабильность РНК также растет с содержанием ГЦ-пар.

Особенно детально изучены сравнительно малые молекулы тРНК. Они также содержат двуспиральные участки. О них рассказано в § 8.4.

Недавно было установлено, что РНК может функционировать в качестве катализатора, подобно ферменту. Оказалось, что ферменты рибонуклеазы Р содержат 80% РНК, которая и выполняет основную функцию. В других случаях была обнаружена ферментативная активность РНК и в отсутствие белка. Не подлежит сомнению, что это связано со значительной конформационной гибкостью и со сложной третичной структурой РНК. Надо думать, что эти, еще далеко недостаточно изученные, явления существенны для регуляции генов. Вполне возможно, что в клетках функционируют и другие, еще не выявленные виды РНК.

Двойная спираль ДНК замыкается в кольцо в клетках бактерий (например, в *E. coli*), в частицах бактериофагов и т. д. Можно рассматривать ДНК — кольцевую или незамкнутую — на основе модели упругого стержня, характеризуемого двумя энергетическими параметрами — жесткостью на изгиб оси и жесткостью на кручение (см. с. 256). Персистентная длина ДНК велика (с. 228) — двойная спираль обладает высокой жесткостью на изгиб.

§ 7.3. Внутримолекулярные взаимодействия в двойной спирали

Структура двойной спирали ДНК и двуспиральных участков РНК определяется слабыми взаимодействиями — водородными связями, электростатическими и дисперсионными силами.

Свободные азотистые основания образуют водородно связанные комплексы в твердом состоянии. Структуры таких комплексов в ряде случаев установлены. Найдены структуры, отличные от структуры Уотсона — Крика. На рис. 7.12 показано строение пары 9-метиладенин — 1-метилтимин (МА — МТ). Атомы азота N₁ в Т и N₉ в А заблокированы метильными группами для того, чтобы избежать образования дополнительных водородных связей. Мы видим, что атом N₁ МТ образует водородную связь с имидазольным азотом МА. Эта структура отлична от структуры Уотсона — Крика. Возможности образования водородных связей между различными атомами азотистых оснований ДНК, а также таутомерия азотистых оснований существенны для мутагенеза. Сильный мутаген — бромурацил (метилированный) изучался в парах с этиладенином и метиладенином. Интересно, что в этих двух близких случаях получаются разные структуры. В первой паре образуются водородные связи O₂—N₆ и N₃—N₇, во второй O₄—N₆ и N₃—N₇.