

Здесь x — доля пар АТ в полимере, K — истинная константа ассоциации. Параметр ψ учитывает уменьшение числа возможных положений на полимере для второй молекулы лиганда вследствие присутствия первой молекулы. Связывание последовательных лигандов происходит не независимо. Значения параметра ψ показаны на рис. 7.25 (а) $l_{AT} = 0, l_{GC} = 0; \psi = 2(\alpha - 1)$; б) $l_{AT} = 1, l_{GC} = 0; \psi = 2(\alpha - 1)x$; в) $l_{AT} = 1, l_{GC} = 1; \psi = 2(\alpha - 2)x(1 - x)$; г) $l_{AT} = 2, l_{GC} = 0; \psi = 2x + 2(\alpha - 2)x^2; \dots$; д) $l_{AT} = \alpha, l_{GC} = 0; \psi = 2 \sum_{i=1}^{\alpha-1} x^i; \dots$).

Таким образом, например, в случае гомополимера, когда связывание не зависит от отношения АТ/ГЦ, получаем

$$K_{\text{эф}} = K(2\alpha - 1), \quad n_{\text{эф}} = \frac{1}{2\alpha - 1}, \quad r_{\text{max}} = \frac{1}{\alpha}. \quad (7.46)$$

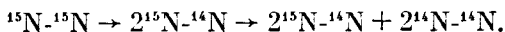
Различие между $n_{\text{эф}}$ и r_{max} количественно объясняется на основе принятой модели. Длина лиганда α может быть определена из экспериментальных значений $n_{\text{эф}}$ и r_{max} . Из изотерм связывания этидиумбромида, спермина, актиномицина и петропсина двойной спиралью ДНК получены значения α , равные соответственно 2, 4, 5 и 5 парам оснований. Эти значения близки к ожидаемым на основе молекулярных размеров лигандов.

Меньшие молекулы типа акридиновых красителей либо прослаиваются между парами оснований в двойной спирали ДНК (модель *интеркаляции* Лермана), либо располагаются в узкой бороздке на поверхности двойной спирали (модель Гурского). По-видимому, встречаются как одни, так и другие комплексы. Эти вопросы обсуждаются далее на с. 290—292.

§ 7.7. Редупликация ДНК

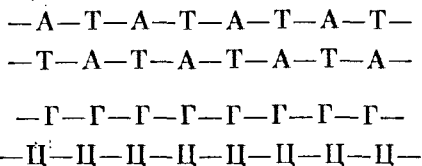
При делении клеток генетический материал удваивается, происходит редупликация двойной спирали ДНК. В принципе возможны три механизма редупликации: *консервативный* с сохранением исходной двойной спирали и построением дочерней двойной спирали, тождественной исходной; *полуконсервативный*, при котором две дочерних двойных спирали содержат каждая по одной новой и по одной старой цепи; и, наконец, *дисперсный* механизм с распределением исходного материала между четырьмя цепями двух дочерних двойных спиралей. Месельсон и Сталь (1958) изучали редупликацию ДНК при делении клеток *E. coli* с помощью меченых атомов и седиментации в градиенте плотности CsCl. Была получена популяция клеток, меченных ^{15}N . Эти клетки переносились в среду, содержащую ^{14}N , но не ^{15}N , и в ней делились. Из исходной популяции, из популяций «детей» и «внуков» извлекались молекулы ДНК и определялись их плотность и радиоактивность. Исходная ДНК, меченная ^{15}N , имела наибольшую плотность, ДНК «детей» оказалась меченой наполовину и ее плотность равнялась среднему арифметическому плотностей ^{15}N -ДНК и ^{14}N -ДНК. Наконец, ДНК «внуков» разделилась при седиментации на две зоны — зону с ДНК, тождественной дочерней, меченной наполовину, и на зону с немеченой

ДНК. Схематически это можно представить так:



Эти результаты согласуются с полуконсервативным механизмом. Он подтверждается и другими данными.

Редупликацию ДНК удалось наблюдать *in vitro* (Корнберг, 1960). Бралась инкубационная смесь, содержащая все четыре нуклеозидтрифосфата (АТФ, ГТФ, ТТФ, ЦТФ), ионы Mg^{2+} (6×10^{-3} М), полимеризующий фермент, выделенный из клеток *E. coli*, и нативную ДНК (из тимуса теленка) в качестве матричной затравки; рН 7,5. В такой системе ДНК редулицируется — получают молекулы, тождественные затравочным. Процесс не идет в отсутствие одной из компонент или при предварительной обработке затравочной ДНК дезоксирибонуклеазой — ферментом, разрушающим ДНК. С помощью нуклеотидов, меченных ^{32}P , показано, что синтез ДНК является поликонденсацией мономеров — при включении одного нуклеотида в цепь выделяется одна молекула пиродифосфата $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$. Согласно закону действия масс, реакция тормозится при добавлении избытка пиродифосфата. Если его количество в 100 раз превышает общее количество трифосфатов, скорость реакции уменьшается вдвое. Вновь полученная ДНК обладает биологическими свойствами исходной. Так, при синтезе с затравкой ДНК фага ϕX174 получается ДНК, имеющая инфицирующее действие — синтезируются частицы фага. С помощью полимеризующего фермента ДНК-полимеразы удастся получать синтетические полидезоксирибонуклеотиды, образующие двойные спирали при наличии комплементарности:



Изменение свободной энергии при образовании двух двойных спиралей из одной исходной двойной спирали и нуклеозидтрифосфатов можно представить в виде

$$\Delta G = N(2E_1 + \bar{E}_2) - T\Delta S, \quad (7.47)$$

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. Энергия \bar{E}_2 зависит от относительного содержания x пар ГЦ:

$$\bar{E}_2 = xE_{\text{ГЦ}} + (1-x)E_{\text{АТ}}. \quad (7.48)$$

Изменение энтропии ΔS определяется заменой нуклеозидтрифосфата (НТФ) на пиродифосфат (ФФ) в растворе и утратой нуклеотидом, включившимся в двойную спираль, вращательных и по-

ступательных степеней свободы. Этот последний фактор запишем в виде $\kappa \ln q$. В целом

$$\Delta S = -2N\kappa \ln \left(q \frac{c_{\text{НТФ}}}{c_{\text{ФФ}}} \right), \quad (7.49)$$

где $c_{\text{ФФ}}$ — концентрация ФФ в растворе, $\bar{c}_{\text{НТФ}}$ — средняя концентрация НТФ, равная $(c_A^{(1-x)} c_T^{(1-x)} c_G^x c_C^x)^{1/2}$, c_A , c_T , c_G , c_C — концентрации соответствующих НТФ. Если они равны друг другу, то $\bar{c}_{\text{НТФ}} = 1/4 c_{\text{НТФ}} = c_A = c_T = c_G = c_C$. Условие редупликации состоит в выделении свободной энергии

$$2E_1 + \bar{E}_2 + 2\kappa T \ln \left(q \frac{\bar{c}_{\text{НТФ}}}{c_{\text{ФФ}}} \right) \geq 0. \quad (7.50)$$

Величины E_1 и \bar{E}_2 равны примерно 16 и 20 кДж/моль. Величина $q = Z_1' Z_2 / Z_1 Z_2'$, 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 (7.50) выполняется, пока $c_{\text{ФФ}}/c_{\text{НТФ}}$ не превысит 400. В клетках и в системах для синтеза это отношение много меньше. Условие (7.50) выполняется, если хватает количества НТФ. Редупликации, если она не идет, могут препятствовать не термодинамические, но кинетические причины.

Аналогичное рассмотрение денатурации (§ 7.4) приводит к значению разности свободных энергий разделенных цепей и двойной спирали, равному

$$\Delta G' = N\bar{E}_2 - 2N\kappa T \ln q', \quad (7.51)$$

где q' характеризует изменение собственной энтропии цепи, происходящее на один нуклеотид. Можно приравнять q' числу конформаций звена одиночной цепи. В звене содержится пять единичных связей, вращению вокруг каждой из них отвечают две — три конформации. Порядок величины q' 10—100. Из (7.51) следует, что температура перехода спираль — клубки равна

$$T_{\text{пл}} = \frac{\bar{E}_2}{2\kappa \ln q'} = \frac{E_{\text{АТ}}}{2\kappa \ln q'} + x \frac{E_{\text{ГЦ}} - E_{\text{АТ}}}{2\kappa \ln q'}. \quad (7.52)$$

Экспериментальная зависимость $T_{\text{пл}}$ (в К) от x

$$T_{\text{пл}} = 342 + 41x$$

получается при $E_{\text{АТ}} = 19,7$, $E_{\text{ГЦ}} = 22,3$ кДж/моль и $q' = 32$.

Эти грубые расчеты пригодны лишь для оценок порядков величин $\Delta \bar{H}$ и ΔS .

Редупликация требует, конечно, расплетания исходной двойной спирали. Репликативный синтез идет с непрременным участием ДНК-полимеразы, которая, по-видимому, перемещается вдоль

двойной спирали, расплетая ее и синтезируя новые цепи (модель «застежки-молнии»). Бактериофаг $\phi X174$ содержит не двуспиральную, а однонитчатую ДНК. Установлено, однако, что размножение этого фага идет через репликативную стадию, в которой ДНК становится двуспиральной. И в этом случае реплицируется именно двойная спираль. Это относится и к РНК вирусов, при редупликации которых возникает промежуточная двуспиральная структура. Однонитчатая ДНК фага $\phi X174$ кольцеобразна, как и двуспиральные ДНК других фагов и бактерий. В упомянутых выше опытах Корнберга (с. 249) эта ДНК служила затравкой. Между тем только кольцевая ДНК биологически активна, т. е. обладает инфекционностью. Корнберг воспользовался другим ферментом — *лигазой* для замыкания новой цепи. Новые цепи строились не с тиминном, а с бромурацилом. Для выделения синтетической ДНК препарат кратковременно обрабатывался ДНК-азой так, чтобы примерно у половины молекул происходил один разрыв в кольце. 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, содержащие бромурацил. Эти кольца оказались способными инфицировать клетки *E. coli*. Ранее было установлено, что замена уже одного из 5500 нуклеотидов ДНК из фага $\phi X174$ приводит к утрате инфекционности. Следовательно, синтез Корнберга абсолютно точен.

По-видимому, расплетание двойной спирали ДНК при одновременной редупликации (а также при транскрипции — при синтезе мРНК, см. § 8.3) должно происходить не так, как при денатурации. Выигрыш свободной энергии при образовании новых цепей обуславливает появление значительного вращающего момента. Полимераза, перемещающаяся вдоль двойной спирали, создает локальные условия, нарушающие баланс взаимодействий между цепями. Предположительно она препятствует гидрофобным взаимодействиям оснований.

Элементарная модель для рассмотрения кинетики редупликации ДНК — одномерная матрица, на которой сорбируются НТФ, причем с одного конца идет практически необратимая их поликонденсация. Грубые оценки показывают, что диффузия НТФ из раствора к матрице протекает быстрее процессов на матрице и скорость синтеза лимитируется ферментативным процессом. В согласии с опытом расчет показывает, что синтез должен идти без индукционного периода.

Проведем теоретическое рассмотрение, следуя модели Манилова (1969). Имеем матрицу из N ячеек. Центр роста (полимераза) перемещается от первой до N -й ячейки. Синтез необратим, т. е. перемещение полимеразы от $i-1$ -й к i -й ячейке происходит вдали от равновесия. Константа скорости роста k_r для любой ячейки одна и та же, константа скорости иницирования k_0 много меньше k_r . Уход полимеразы из N -й ячейки происходит быстро и не лимитирует процесс. Задача сводится к рассмотрению необратимого блуждания в одномерной системе. Кинетические уравнения имеют

$$\begin{aligned} \dot{w}_1 &= k_0 - k_r w_1, \\ \dot{w}_i &= k_r w_{i-1} - k_r w_i, \\ \dot{w}_N &= k_r w_{N-1}, \end{aligned} \quad (7.53)$$

где $i = 2, 3, \dots, N-1$, w_i — вероятность того, что фермент находится в i -й ячейке. Среднечисленная степень полимеризации равна

$$\bar{n}(t) = \sum_{i=1}^N i w_i(t) \left[\sum_{i=1}^N w_i(t) \right]^{-1}. \quad (7.54)$$

При начальных условиях $w_1(0) = \dots = w_N(0) = 0$. Решение системы (7.53) с помощью преобразования Лапласа — Карсона имеет вид

$$\begin{aligned} w_i(t) &= \frac{k_0}{k_r} \sum_{j=1}^{\infty} f(j), \quad i = 1, 2, \dots, N-1, \\ w_N(t) &= k_0 t \sum_{j=N-2}^{\infty} f(j) - (N-1) \frac{k_0}{k_r} \sum_{j=N-1}^{\infty} f(j), \\ f(j) &= (k_r t)^j \frac{\exp(-k_r t)}{j!}. \end{aligned} \quad (7.55)$$

Получаем

$$2k_r \bar{n}(t) = 2k_r t \sum_{j=0}^{N-3} f(j) + (k_r t)^2 \sum_{j=0}^{N-4} f(j) + 2Nk_r t \sum_{j=2}^{\infty} f(j) - N(N-1) \sum_{j=1}^{\infty} f(j). \quad (7.56)$$

При $k_r t \ll 1$ вероятность $w_i \rightarrow 0$, $w_N \rightarrow 0$, $\bar{n} \rightarrow 1$, т. е. синтез нет. При $k_r t \gg 1$ находим $w_i \rightarrow k_0/k_r$, $w_N \rightarrow k_0 t$, $\bar{n} \rightarrow N$, т. е. синтез идет до конца. Константа скорости $k_r = p k_t$, где p — вероятность того, что ячейка, находящаяся перед центром роста, содержит адсорбированный мономер, а k_t — константа скорости его включения в растущую цепь. Так как процесс не лимитируется диффузией, p имеет равновесное значение и выражается изотермой Ленгмюра (ср. с. 209)

$$p = a/(K + a), \quad (7.57)$$

где $K = \exp(E/kT)$, E — энергия сорбции, $a = \exp(\mu/kT)$ — абсолютная активность НТФ в растворе, μ — химический потенциал НТФ. Так как $\mu = \mu^0 + kT \ln(\gamma c)$, $a = A c$, $A = \gamma \exp(\mu^0/kT)$, где γ — коэффициент активности, c — концентрация НТФ, μ^0 — стандартный химический потенциал. При $p \ll 1$ величина $a/K \ll 1$ и

$$p = a/K = A c \exp(-E/kT), \quad (7.58)$$

$$k_r = k_t A c \exp(-E/kt). \quad (7.59)$$

Необходимо резкое увеличение c , чтобы перейти от малого к большому значению \bar{n} . Такое увеличение вряд ли происходит во время деления клетки. С другой стороны, зависимость \bar{n} от E оказывается S-образной и достаточно малого изменения E для полного синтеза, что может определяться кооперативностью процесса — взаимодействием соседних нуклеотидов на матрице.

Приведенная трактовка эквивалентна рассмотрению, основанному на теории абсолютных скоростей реакций (см. с. 174). Константу скорости реакции i -мера, включающего в цепь сразу два нуклеотида, можно записать в виде

$$k = \frac{\kappa T}{h} p. \quad (7.60)$$

Экспериментальные значения для скорости синтеза ДНК равны для *E. coli* $1,8 \cdot 10^8$, для клеток лимфомы мышей $2 \cdot 10^2$ мономеров в секунду. Отсюда следует для *E. coli* $p = 2,8 \cdot 10^{-10}$, для лимфомы мышей $p = 3,1 \cdot 10^{-11}$. Оценка свободной энергии активации, относящейся к адсорбции НТФ, но не к включению нуклеотида в цепь, дает для *E. coli* $G^+ = 54,5$, для мыши $34,9$ кДж/моль. Эти величины находятся через константу равновесия активированного комплекса n -мера с двумя нуклеотидами:

$$G^+ = -RT \ln K^+ = -RT \ln (p/\bar{n}c^2). \quad (7.61)$$

Изложенная теория, конечно, является упрощенной, она не учитывает ни гетерогенности матрицы, ни кооперативности процесса. Тем не менее, она дает разумное полуколичественное описание матричного синтеза.

Ферментативный синтез полинуклеотидов может идти и без матрицы. В этом случае полимер получается после латентного периода, продолжительность которого убывает с ростом концентрации фермента. Так идет, например, синтез поли-АТ. Если в качестве затравки введен олигомер, то лаг-период быстро убывает с его длиной. Даже короткие олигомеры могут служить матрицами для растущего полимера, который с матрицы соскальзывает. Соответствующая кинетическая теория позволяет получить зависимость времени синтеза полимера от его длины и от скорости отделения цепи от матрицы, на которой она растет. Эта скорость резко убывает при длине олигомера, превышающей 4 нуклеотида. По-видимому, это критический размер матрицы, при котором новая цепь может образовывать с матрицей двойную спираль.

Новая ДНК синтезируется *in vitro* всегда в направлении $5' \rightarrow 3'$. Вместе с тем, имеются данные, указывающие, что *in vivo* редуцируются обе цепи — одна в направлении $5' \rightarrow 3'$, другая в направлении $3' \rightarrow 5'$. Оказки (1968) объяснил это прерывным механизмом редуцированного синтеза. Короткие отрезки новой ДНК синтезируются на одной или на обеих цепях в точке репликации, всегда в направлении $5' \rightarrow 3'$ (рис. 7.26).

Далее эти отрезки соединяются, образуя новые цепи. Если модель правильна, то последние реплицированные участки одной или обеих дочерних цепей могут быть отделены. Временное селективное ингибирование фермента, катализирующего накопление фос-

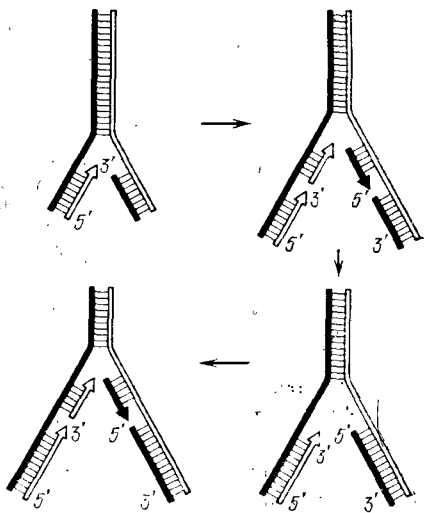


Рис. 7.26. Схема репликации ДНК по Оказки

Фодииэфирных связей между цепями ДНК, должно приводить к накоплению новых коротких цепей. Эти предсказания подтверждаются экспериментами, показавшими, что меченный три-тимидин включается в короткие цепи, которые лишь позднее объединяются в длинные.

Точный механизм репликации ДНК *in vivo* тем не менее нельзя считать установленным. Репликация *in vivo* начинается на определенной стадии развития клетки с участием факторов, по-видимому, связанных с клеточной мембраной (модель *реплика*).

§ 7.8. Топология ДНК

Как указано в гл. 3, имеется далеко идущая аналогия между броуновским движением частицы и полимерной цепью. Различие сводится к тому, что в полимерной цепи невозможны самопересечения, так как нельзя пространственно совместить два разных атома. Это обстоятельство находит свое выражение в объемных эффектах (§ 3.5). Той же телесностью полимерной цепи определяются особенности поведения кольцевых полимеров, в частности кольцевой формы ДНК.

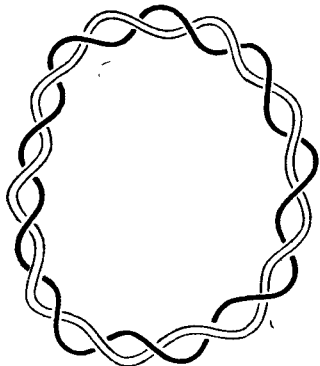


Рис. 7.27. Кольцевая замкнутая форма ДНК

Кольцевая замкнутая (КЗ) форма типична для ДНК простейших, а также для цитоплазматической ДНК животных. Большинство вирусных ДНК в ходе заражения клеток проходят стадию КЗ-формы. Эта форма представлена на рис. 7.27. Как легко видеть, каждая из двух комплементарных цепей двойной спирали замкнута, и в результате цепи оказываются зацепленными. В КЗ-форме ДНК возникают топологические ограничения, состоящие в том, что порядок зацепления двух комплементарных цепей строго ограничен.

Эти ограничения, конечно, исчезают при разрыве хотя бы одной из цепей.

КЗ-форма характеризуется *порядком зацепления* — топологическим инвариантом. Порядок зацепления двух комплементарных цепей Lk — алгебраическое число пересечений одной цепью поверхности, натянутой на вторую цепь. В случае, изображенном на рис. 7.27, $Lk = 9$; в реальных случаях Lk имеет порядок 10^2 . Величина

$$\tau = Lk - N/\gamma_0 \quad (7.62)$$

называется *числом супервитков* КЗ ДНК. Здесь N — число пар оснований в ДНК, γ_0 — число пар оснований, приходящихся на один виток двойной спирали линейной ДНК. В обычной В-форме ДНК $\gamma_0 = 10$. Если $\tau \neq 0$, КЗ ДНК находится в суперспирализиро-