

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.

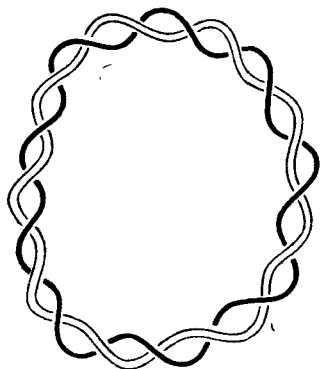


Рис. 7.27. Кольцевая замкнутая форма ДНК

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.

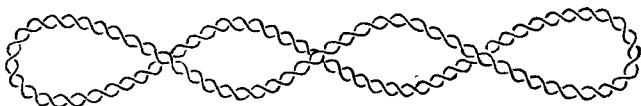
КЗ-форма характеризуется *порядком зацепления* — топологическим инвариантом. Порядок зацепления двух комплементарных цепей Lk — алгебраическое число пересечений одной цепью поверхности, натянутой на вторую цепь. В случае, изображенном на рис. 7.27, $Lk = 9$; в реальных случаях Lk имеет порядок 10^2 .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

ванной форме. Величина τ всегда отрицательна, отрицательна и плотность супервитков, определяемая как $\sigma = 10\tau/N$. Опытные значения $-\sigma$ — от 0,03 до 0,10. Суперспиральная ДНК в КЗ-форме показана на рис. 7.28. Установлено, что отрицательная суперспирализация необходима для нормального функционирования

Рис. 7.28. Суперспиральная КЗ-форма ДНК



КЗ ДНК в клетке. Без суперспирализации не происходит репликация ДНК. В клетках существует специальный фермент (*ДНК-гираза*), создающий указанную отрицательную суперспирализацию. При такой суперспирализации в ДНК облегчается образование расплетенных участков, в которых комплементарные цепи не закручены относительно друг друга. Наличие расплетенных участков уменьшает напряжение в двойной спирали и повышает ее средство к РНК-полимеразе и т. д.

Число витков суперспирали определяется различными способами — косвенно по связыванию лигандов и непосредственно методом гель-электрофореза. Этот метод очень чувствителен, он позволяет определить молекулы, у которых τ разнятся всего лишь на единицу.

В связи с открытием и изучением КЗ ДНК приобрела значительную актуальность так называемая *теория узлов и зацеплений* (ТУЗ). В ТУЗ разработаны методы расчета статистических интегралов для замкнутых цепей. В этих случаях область интегрирования должна ограничиваться лишь той частью фазового пространства, которая отвечает топологически эквивалентным состояниям системы. Для этой цели были развиты численные, машинные методы, использующие классификацию возможных узлов и зацеплений.

Величина Lk является инвариантом при конформационных перестройках КЗ ДНК, при которых сохраняется непрерывность обеих нитей ДНК. Информацию о конформационных и энергетических свойствах КЗ ДНК дают опыты, в которых Lk изменяется. Такие изменения происходят под действием особых ферментов — топоизомераз. Некоторые из них изменяют топологию КЗ ДНК путем разрыва и воссоединения одной из нитей двойной спирали. С помощью гель-электрофореза удалось установить получающееся в этих условиях распределение молекул КЗ ДНК по величине Lk . Максимум равновесного распределения всегда отвечает $\tau = 0$. Распределение нормальное, для $N \geq 3000$ справедлива эмпирическая формула

$$P(\tau) \sim \exp(-1000 \tau^2/N).$$

Из этих опытов найдена зависимость свободной энергии КЗ ДНК от числа витков суперспирали:

$$G \approx -RT \ln P(\tau) \approx 1000 RT \tau^2/N.$$

Из тех же данных на основе теоретических соображений впервые определена жесткость двойной спирали ДНК на кручение — торсионная жесткость. Она оказалась равной

$$g = 0,036 RT,$$

что отвечает среднеквадратичной амплитуде тепловых флуктуаций в значении угла φ между соседними парами оснований, равной 5° . К близким значениям приводят данные по кинетике деполаризации красителя, связанного с ДНК.

Что касается жесткости двойной спирали ДНК на изгиб, то она может быть охарактеризована величиной персистентной длины, равной 57 ± 10 нм.

Сверхспиральная ДНК обладает высокой устойчивостью, ее температура плавления повышена и интервал плавления расширен. Примечательна независимость ширины этого интервала от относительной устойчивости пар АТ и ГЦ. Это было показано в опытах, в которых плавление сверхспиральной ДНК изучалось в присутствии 3 М бромида тетраэтиламмония и в присутствии 7,3 М NaClO_4 . В первом случае температура плавления для АТ-и ГЦ-пар совпадает ($T_{\text{ГЦ}} - T_{\text{АТ}} \approx 0^\circ\text{C}$), во втором — сильно различается ($T_{\text{ГЦ}} - T_{\text{АТ}} \approx 56^\circ\text{C}$). Однако кривые плавления сверхспиральной ДНК в обоих случаях одинаковы. Теория, трактующая цепи ДНК как тонкие ленты, объясняет эти эффекты.

На рис. 7.29 показано разделение молекул ДНК, отличающихся числом сверхвитков, методом гель-электрофореза. Это ДНК плазмиды (см. с. 268), содержащей 1683 пары нуклеотидов.

В ДНК существуют *палиндромные участки* — перевертыши, одинаково читаемые с обоих концов (пример такого палиндрома в языке: ПИЛВИНООНИВЛИП).

Как показали Вологодский, Франк-Каменецкий, Аншелевич и Лукашин, в сверхспиральных ДНК в палиндромных участках возможно возникновение крестообразных структур, подобных изображенной на рис. 7.30. Это теоретическое предсказание было далее подтверждено экспериментально.

Отрицательная сверхспирализация, наряду с крестообразными структурами, стабилизирует и Z-форму ДНК.

Хромосомная ДНК, как правило, сверхспирализована. Как это было впервые показано в лаборатории Георгиева в 1982 г. (Лучник и Бакаев), сверхспирализация ДНК играет важную роль в биологической активности генома. Различные нуклеотидные последовательности в молекуле ДНК конкурируют за упругие витки и энергию сверхспирализации, поглощая их в конформационных переходах. Было установлено напряженное состояние ДНК в транскрипционно-активном хроматине вируса SV40. Конформационные изменения, связанные с этими напряжениями, имеют прямое значение для регуляции генов. Сверхспирализация генома изменяется при дифференцировке, старении и злокачественной трансформации клеток.