

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

А. В. СИВОЛОБ

ФІЗИКА ДНК

Навчальний посібник

Рекомендовано
Міністерством освіти і науки, молоді та спорту України
як навчальний посібник
для студентів медико-біологічних спеціальностей
вищих навчальних закладів



УДК 577.2:577.213/.215(075.8)
ББК 28.07+28.041.10я73
С34

Рецензенти:

д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН України Д. М. Говорун,
д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН України О. І. Корнелюк
(Ін-т молекулярної біології і генетики НАН України),
д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН України С. О. Костерін
(Ін-т біохімії ім. О. В. Палладіна)

*Рекомендовано вченою радою
Навчально-наукового центру "Інститут біології"
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
(протокол № 3 від 11 жовтня 2010 року)*

Сиволоб, А. В.

С34 Фізика ДНК : навчальний посібник / А. В. Сиволоб. – К. : Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2011. – 335 с. [16] окр. с. іл.
ISBN 978-966-439-468-3

Викладено сучасні уявлення про фізичні властивості молекули ДНК: принципи її структурної організації, механізми стабільності та структурних перетворень ДНК, полімерні й поліелектролітні властивості. Описано особливості циркулярних молекул ДНК, механізми взаємодії ДНК з іншими молекулами, її надмолекулярну організацію та структурну динаміку у складі хроматину. Основну увагу приділено теоретичним концепціям, які пояснюють властивості ДНК, і принципам описання й аналізу різних аспектів її фізичної поведінки. Наведено приклади експериментальних результатів, отриманих головним чином останніми роками, які ілюструють теоретичні положення.

Для студентів біологічних факультетів університетів, а також для аспірантів і науковців, які цікавляться молекулярною біологією та біофізикою.

УДК 577.2:577.213/.215(075.8)
ББК 28.07+28.041.10я73

Гриф надано Міністерством освіти і науки України
(лист №1/11-899 від 02.02.11)

ISBN 978-966-439-468-3

© Сиволоб А. В., 2011
© Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ВПЦ "Київський університет", 2011

ЗМІСТ

Від автора.....	7
Вступ.....	8
Розділ 1. ДНК як молекулярна конструкція.....	11
1.1. Хімічна будова нуклеїнових кислот.....	11
1.1.1. Азотисті основи.....	11
1.1.2. Нуклеозиди й нуклеотиди.....	12
1.1.3. Полінуклеотидний ланцюг.....	15
1.2. Подвійна спіраль.....	17
1.2.1. Спарювання та стекінг азотистих основ.....	18
1.2.2. Конформаційні параметри подвійної спіралі.....	20
1.3. Структурні форми ДНК.....	26
1.3.1. А- і В-родина форм ДНК.....	26
1.3.2. Z-форма ДНК.....	29
1.3.3. Хрестоподібна форма ДНК.....	30
1.3.4. Потрійні спіралі.....	31
1.3.5. Квадруплекси.....	32
1.3.6. Чотириланцюгові з'єднання (four-way junctions).....	33
1.4. Структурно-динамічний поліморфізм В-ДНК.....	34
Розділ 2. Стабільність	
і структурні перебудови подвійної спіралі.....	46
2.1. Енергетика і класифікація міжмолекулярних взаємодій.....	46
2.1.1. Вільна енергія.....	46
2.1.2. Рівновага утворення комплексів молекул у розчині.....	51
2.1.3. Взаємодії Ван дер Ваальса.....	53
2.1.4. Електростатичні (іонні) взаємодії.....	55
2.1.5. Водневий зв'язок.....	55
2.1.6. Гідрофобні взаємодії.....	57
2.2. Взаємодії, що стабілізують подвійну спіраль.....	60
2.2.1. Енергетичний баланс подвійної спіралі.....	60
2.2.2. Термостабільність подвійної спіралі.....	61
2.2.3. Залежність стабільності подвійної спіралі	
від послідовності пар основ.....	65
2.2.4. Стекінг-взаємодії чи водневі зв'язки?.....	68
2.3. Перехід спіраль–клубок.....	70
2.4. Два типи структурних переходів.....	75
2.5. Кінетика конформаційних перетворень.....	79
2.5.1. Основи хімічної кінетики.....	80
2.5.2. Кінетика денатурації та ренатурації ДНК.....	84

Розділ 3. ДНК як поліелектроліт	92
3.1. Електростатика системи рухливих зарядів	92
3.2. Спрощена теорія поліелектролітів.....	95
3.3. Рівняння Пуассона – Больцмана для зарядженого циліндра.....	100
3.4. Конденсація протиіонів навкруг ДНК	105
3.5. Вплив іонного оточення на фізичні властивості ДНК	108
3.5.1. Механізм взаємодії позитивно заряджених лігандів із ДНК.....	108
3.5.2. Вплив іонної сили на вигин ДНК.....	109
3.5.3. Вплив іонної сили на стабільність подвійної спіралі.....	110
Розділ 4. Полімерні та механічні властивості ДНК	116
4.1. Вільно-зчеплений ланцюг	116
4.2. Еластичний стрижень	120
4.3. Черв'якоподібний ланцюг.....	122
4.4. Персистентна довжина ДНК.....	126
4.4.1. Зв'язок персистентної довжини з жорсткістю щодо вигину.....	126
4.4.2. Залежність персистентної довжини від іонної сили.....	127
4.4.3. Динамічна та статична персистентна довжина.....	129
4.5. Циклізація молекул ДНК	130
4.6. Механічна деформація окремих молекул ДНК зовнішньою силою.....	132
4.6.1. Наноманіпуляції з молекулами ДНК.....	132
4.6.2. Розтягнення та надрозтягнення ДНК.....	134
4.6.3. Закручування молекули ДНК.....	136
4.7. Компактизація ДНК.....	139
Розділ 5. Циркулярна ДНК	148
5.1. Топологія циркулярної ДНК	148
5.1.1. Число зачеплень.....	149
5.1.2. Твіст	150
5.1.3. Центральне рівняння топології циркулярної ДНК.....	152
5.1.4. Визначення райзингу.....	153
5.1.5. Райзинг регулярних спіральних конфігурацій.....	155

5.2. Надспіралізація	158
5.2.1. Позитивна та негативна надспіралізація	158
5.2.2. Приготування та розділення топоізомерів	160
5.2.3. Виникнення надспіралізації <i>in vivo</i>	162
5.3. ДНК-топоізомерази	163
5.3.1. Топоізомерази I	164
5.3.2. Топоізомерази II	165
5.4. Енергетика надспіралізації	167
5.4.1. Рівноважний розподіл топоізомерів та енергія надспіралізації	167
5.4.2. Надспіралізація мініциклів	169
5.4.3. Надспіралізація циркулярних плазмід	173
5.5. Залежні від надспіралізації структурні переходи	176
Розділ 6. Взаємодії ДНК з іншими молекулами	187
6.1. Термодинаміка взаємодії лігандів з ДНК	187
6.1.1. Енергетичний ефект одного акту зв'язування	187
6.1.2. Константа зв'язування	188
6.1.3. Залежність константи зв'язування від температури	190
6.1.4. Залежність константи зв'язування від іонної сили	192
6.1.5. Ізотерма зв'язування ліганду з лінійним полімером	193
6.1.6. Кооперативне зв'язування	196
6.1.7. Експериментальне визначення ізотерми зв'язування	201
6.1.8. Вплив зв'язування лігандів на стабільність ДНК	202
6.2. Гідратація ДНК	204
6.3. Взаємодія ДНК з олігокатіонами	207
6.4. Взаємодія органічних лігандів з маленьким жолобком	210
6.5. Інтеркаляція	212
6.5.1. Механізми інтеркаляції	212
6.5.2. Взаємодія інтеркаляторів з циркулярною ДНК	216
Розділ 7. Взаємодії ДНК з білками	227
7.1. Загальні принципи структурної організації білків	227

7.2. Структурна класифікація білків, що взаємодіють з ДНК	232
7.2.1. Взаємодія білків з великим жолобком	232
7.2.2. Взаємодія білків з маленьким жолобком	236
7.2.3. Ферменти, що взаємодіють з ДНК	238
7.3. Енергетика взаємодій і механізми білково-нуклеїнового впізнання	240
7.3.1. Контакти між ДНК і білками	240
7.3.2. Термодинаміка зв'язування білків і роль води в білково-нуклеїнових взаємодіях	243
7.3.3. Термодинаміка зв'язування та структурні перебудови білків при специфічних взаємодіях із ДНК	245
7.3.4. Механізми білково-нуклеїнового впізнання	250
7.4. Кооперативні ефекти в білково-нуклеїнових взаємодіях	253
7.4.1. Кооперативне зв'язування білків з ДНК	254
7.4.2. Взаємодія між білками, зв'язаними на відстані: утворення петлі ДНК	259
7.4.3. Вплив надспіралізації ДНК на її взаємодії з білками	264
7.5. Кінетика білково-нуклеїнових взаємодій	266
Розділ 8. ДНК у хроматині	279
8.1. Нуклеосома	280
8.1.1. Структура нуклеосоми: загальний огляд	280
8.1.2. Структура ДНК у нуклеосомі	284
8.1.3. Стабільність нуклеосоми	290
8.2. Конформаційна рухливість нуклеосоми за фізіологічних умов	295
8.2.1. Тимчасове розгортання кінцевих ділянок нуклеосомної ДНК	295
8.2.2. Конформаційна рухливість нуклеосоми в циркулярних ДНК	297
8.2.3. Зміна хіральності нуклеосоми: реверсома	303
8.3. Структура й динаміка хроматинової фібрили	306
8.4. Позиціювання нуклеосом	312
8.4.1. Феномен позиціювання нуклеосом	312
8.4.2. АТР-залежне ремодельовання хроматину	318
Предметний покажчик	329

ВІД АВТОРА

Пропоноване видання знайомить студентів біологічних факультетів із сучасними уявленнями про фізичні властивості молекули ДНК. Книга передбачає обізнаність читача з основами біохімії, біофізики та молекулярної біології, а також на елементарному рівні – з математикою, фізикою та фізичною хімією.

Незважаючи на те, що фізичні властивості ДНК зумовлюють її біологічні функції як носія спадкової інформації та лежать в основі всіх молекулярних процесів, до яких залучена ДНК, ці властивості іноді не зовсім усвідомлюються багатьма біологами. Відповідно, основну увагу зосереджено на теоретичних концепціях, які пояснюють особливості головної інформаційної молекули живих систем, і на принципах описання та аналізу різноманітних аспектів фізичної поведінки ДНК. Як приклади, що ілюструють теоретичні положення, наведено деякі експериментальні результати, отримані головним чином останніми роками. Численні фізико-хімічні експериментальні техніки, за винятком деяких найсучасніших, описано в багатьох інших підручниках і на сторінках цього видання не розглядаються.

Сподіваюся, що видання буде корисним не тільки для студентів і аспірантів, а й для науковців, як біологів, так і фізиків і хіміків, які цікавляться молекулярною біологією та біофізикою.

Щиро дякую рецензентам цієї книги Д. М. Говоруну, О. І. Корнелюку й С. О. Костеріну за ретельний аналіз і обговорення рукопису та корисні зауваження.

А. В. Сиволоб

ВСТУП

Дезоксирибонуклеїнова кислота – ДНК – є полімерною молекулою, мономерами якої виступають нуклеотиди чотирьох типів: два полінуклеотидні ланцюги закручуються один навкруг одного в подвійну спіраль. З установлення в 1953 р. Уотсоном і Кріком (James Watson, Francis Crick) цього добре відомого сьогодні факту розпочалася сучасна молекулярна біологія – структура подвійної спіралі відразу вказувала на те, яким чином ДНК виконує роль носія спадкової інформації. З того моменту стало зрозумілим, що ДНК є "головною" біологічною макромолекулою. Справді, саме навколо неї – заради її збереження та реалізації записаної в ній інформації, її відновлення у двох ідентичних копіях при реплікації та передачі нащадкам – розгортається все розмаїття фізіологічних процесів у всіх живих системах.

Пропоновану книгу присвячено ДНК як фізичному об'єкту. По-перше, це надзвичайно цікавий об'єкт. По-друге, саме фізичні властивості молекули ДНК визначають ті біологічні функції, які вона виконує, і без розуміння цих властивостей неможливо усвідомити молекулярні механізми процесів збереження та реалізації генетичної інформації.

У першому розділі розглянуто структуру ДНК: основні принципи просторової організації, способи її описування, структурний поліморфізм і залежність структури від послідовності нуклеотидів. Насправді, хоча так прийнято, ДНК не зовсім коректно називати *молекулою* – подвійна спіраль є нековалентним комплексом двох молекул – двох полінуклеотидних ланцюгів. Фізичним механізмам стабілізації та дестабілізації цього комплексу, міжмолекулярним взаємодіям, від яких залежить цілісність подвійної спіралі, механізмам руйнування та інших структурних перетворень ДНК присвячено розділ 2. У цьому ж розділі наведено адресовані студентам-біологам необхідні (і мінімальні) загальні відомості щодо фізики міжмолекулярних взаємодій, термодинаміки, статистичної фізики та кінетики.

Усупереч своїй назві, ДНК не є *кислотою* – як хімічна сполука вона являє собою сіль того чи іншого металу. У водному розчині відбувається дисоціація на неорганічні катіони та гігантський поліаніон із негативно зарядженою поверхнею. Властивості цього поліаніона та нетривіальний характер його взаємодії з катіонами, а також відповідні наслідки для структури, стабільності та взаємодії ДНК з іншими молекулами, розглядаються в розділі 3.

Хоча подвійна спіраль відрізняється достатньо жорсткою структурою, вона є водночас досить еластичною і здатною до різноманітних деформацій. Розділ 4 присвячено полімерним властивостям ДНК: механізмам гнучкості та еластичності, особливостям утворення довгою молекулою ДНК невпорядкованого клубка, загальним механізмам компактизації такого клубка, характеру відповіді полімеру на зовнішні механічні впливи. Описано також закономірності утворення полімерною молекулою ДНК замкненого кільця – це питання стосується також і наступного розділу.

Насправді лінійна молекула ДНК є лабораторним артефактом – у живих системах ДНК існує й функціонує у вигляді або циркулярних ковалентно замкнених молекул, або петель, кінці яких зафіксовані на скелетних клітинних структурах. Результатом таких обмежень, що накладаються на кінці, є низка унікальних особливостей, яким важко знайти інші аналоги в молекулярному світі. Топологія, енергетика та конформаційна рухливість циркулярної ДНК розглядаються в розділі 5.

У живих системах ДНК ніколи не існує сама по собі, завжди взаємодіючи з великою кількістю інших молекул. Останні три розділи й присвячено таким взаємодіям. У розділі 6 розглянуто загальні закономірності міжмолекулярних взаємодій за участю ДНК, а також механізми зв'язування з ДНК різноманітних молекул малого розміру, від молекул води до олігопептидів. У розділі 7 висвітлено механізми взаємодії ДНК з білками, у тому числі з такими, що специфічно впізнають певні елементи послідовності нуклеотидів. Розділ 8 присвячено фізичним аспектам існування та функціонування ДНК у складі хроматину – складного білково-нуклеїнового комплексу в ядрах еукаріотичних клітин.

Кожен розділ закінчується набором задач, які пропонуються для самостійного опрацювання. Розв'язання цих задач має допомогти з'ясувати певні деталі й глибше зрозуміти викладений у розділі матеріал.

З метою полегшення сприйняття кількість посилань на оригінальні роботи в тексті зведено до мінімуму. Перелік рекомендованої літератури наведено наприкінці кожного розділу, при цьому зазначено конкретне коло питань, до якого відносяться певні джерела. Перелік літератури, наведений нижче, є загальним до матеріалу книги в цілому.

Атомні координати структур макромолекул, якими проілюстровано книгу, отримано з Банку даних білкових структур (PDB – Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/>), коди PDB наведено в підписах до рисунків. Зображення структур створено за допомогою програм PyMOL (DeLano Scientific LLC, США, <http://www.pymol.org/>) та UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>). Для конформаційного аналізу ДНК і створення ідеалізованих структур подвійної спіралі використано програмний пакет 3DNA (Lu, X. -J., Olson, W. K. 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures // Nucl. Acids Res. – 2003. – Vol. 31. – P. 5108–5121; <http://rutchem.rutgers.edu/~olson/3DNA>).

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Загальна

Зенгер, В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот / В. Зенгер. – М. : Мир, 1987.

Bloomfield, V. A. Nucleic acids: structures, properties and functions / V. A. Bloomfield, D. M. Crothers, I. Tinoco. – Sausalito, CA, USA : University Science Books, 2000.

Neidle, S. Principles of nucleic acid structure / S. Neidle. – London : Elsevier, 2008.

Sinden, R. R. DNA structure and function / R. R. Sinden. – San Diego, CA, USA : Academic Press, 1994.

Науково-популярна, історична та класична

Уотсон, Дж. Д. Двойная спираль. Воспоминания об открытии структуры ДНК / Дж. Д. Уотсон. – М. : Регулярная и хаотическая динамика, 2001.

Франк-Каменецкий, М. Д. Век ДНК / М. Д. Франк-Каменецкий. – М.: КДУ, 2004.

Франк-Каменецкий, М. Д. Королева живой клетки: от структуры ДНК к биотехнологической революции / М. Д. Франк-Каменецкий. – М. : АСТ-Пресс, 2010.

Olby, R. The path to the double helix / R. Olby. – London : Macmillan Press, 1974.

Franklin, R. E. Molecular configuration in sodium thymonucleate / R. E. Franklin, R. Gosling // Nature. – 1953. – Vol. 171. – P. 740–741.

Watson, J. D. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid / J. D. Watson, F. H. C. Crick // Nature. – 1953. – Vol. 171. – P. 737–738.

Wilkins, M. H. F. Molecular structure of desoxyribose nucleic acids / M. H. F. Wilkins, A. R. Stocker, H. R. Wilson // Nature. – 1953. – Vol. 171. – P. 738–740.

Розділ 1

ДНК ЯК МОЛЕКУЛЯРНА КОНСТРУКЦІЯ

Молекула нуклеїнової кислоти – полімер, мономерними одиницями якого є нуклеотиди. Нуклеотид, у свою чергу, містить три хімічні компоненти – азотисту основу, пентозний цукор, залишок фосфорної кислоти. Ковалентний зв'язок між певними групами цукру та фосфатного залишку з'єднує сусідні нуклеотиди (які розрізняються між собою за типом азотистої основи) у складі полімерного ланцюга. У молекулі ДНК зазвичай два такі полінуклеотидні ланцюги об'єднуються в подвійну спіраль – дволанцюгову структуру (дуплекс), стабільність якої визначається нековалентними взаємодіями між азотистими основами. Просторова структура подвійної спіралі залежить від послідовності нуклеотидів (азотистих основ) і зовнішніх умов.

1.1. ХІМІЧНА БУДОВА НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

1.1.1. Азотисті основи

Азотисті основи – це гетероциклічні сполуки (рис. 1.1), у кільцях яких містяться карбон і азот, а всі зв'язки мають характер частково подвійних. До складу ДНК входять два типи азотистих основ: пурини (загальне скорочене позначення R) – аденін (A) і гуанін (G); та піримідини (Y) – тимін (T) і цитозин (C). Загальне позначення для основи будь-якого типу (якщо тип основи є невідомим або неважливим у конкретному випадку) – N.

Крім наведених на рис. 1.1 стандартних основ, у складі природних ДНК зустрічаються також ковалентно модифіковані: 5-метилцитозин (5mC, найпоширеніша модифікація в ДНК еукаріотів) – метильна група приєднана до п'ятого атома кільця замість атома гідрогену; N4-метилцитозин; N6-метиладенін. Молекули РНК (рибонуклеїнової кислоти) замість тиміну містять урацил (U), що відрізняється

від свого аналогу в ДНК відсутністю метильної групи при п'ятому атомі кільця (рис. 1.1). Крім того, у РНК (передусім це стосується транспортних РНК) зустрічається велика кількість так званих неканонічних (модифікованих) азотистих основ.

Оскільки всі зв'язки в кільці – частково подвійні, навколо них неможливе обертання, і азотисті основи є *планарними* – усі атоми кільця лежать практично в одній площині. Зрозуміло, що при цьому є можливими коливальні варіації довжини зв'язків кільця та валентних кутів, проте відсутність обертальних рухів робить азотисті основи конформаційно жорсткими конструкціями. Приєднані до кільця (екзоциклічні) аміногрупи, а також метильна група тиміну (рис. 1.1) обертаються з досить високими швидкостями, залучення аміногруп до водневих зв'язків (підпдрозд. 1.2.1) суттєво гальмує таке обертання.

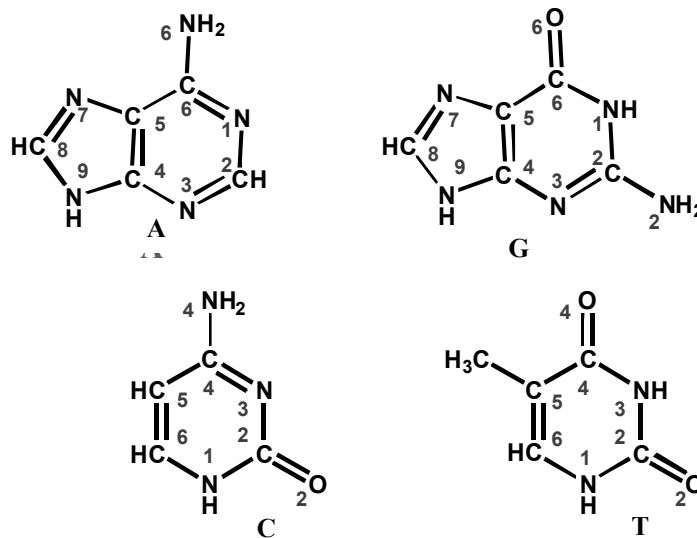


Рис. 1.1. Пуринові (А, G) і піримідинові (С, Т) азотисті основи, що входять до складу ДНК. Наведено стандартну нумерацію атомів

Атоми азоту кільця та екзоциклічні атоми оксигену є акцепторами, а NH₂-групи – донорами водневого зв'язку (підпдрозд. 2.1.5), відповідно, ці групи здатні взаємодіяти з водою. Разом із тим, площина кільця є гідрофобною (підпдрозд. 2.1.6) і кристали азотистих основ погано розчиняються у воді.

1.1.2. Нуклеозиди й нуклеотиди

Пентозний цукор, що входить до складу ДНК (рис. 1.2), називають *дезоксирибозою*, сполуку азотистої основи та пентози – *нуклеозидом* (залежно від типу азотистої основи: аденозин, гуанозин, цитидин, тимідин). Певний атом азоту гетероциклу основи (N1 піримідинів, N9 пуринів) приєднується у складі нуклеозиду до карбону

пентозного цукру *глікозидним* зв'язком (рис. 1.3). Цей атом пентози позначається як С1' (символ "'" прийнято додавати, щоб відрізнити атоми фуранозного кільця пентози від атомів азотистої основи). Інші С'-атомі пентози нумеруються далі за порядком їхнього розташування (рис. 1.2; 1.3). Пентоза, у складі якої ОН-група розташована не тільки при 3'- (як на рис. 1.2), а також і при 2'-атомі (замість одного з атомів гідрогену), називається *рибозою* і входить до складу РНК.

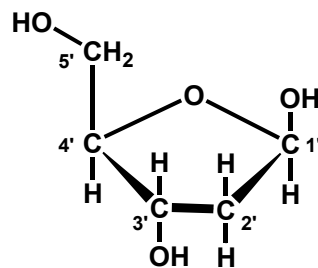


Рис. 1.2. Дезоксирибоза.
Наведено стандартну нумерацію атомів

Фосфорилювання нуклеозиду по ОН-групі при 5'-атомі пентози (або іноді по інших ОН-групах цукру) приводить до утворення нуклеотиду (рис. 1.3). Таким чином, нуклеотид є нуклеозидфосфатом або нуклеозидмонофосфатом (NMP). Нуклеозид-5'-фосфат позначають також як рN, а нуклеозид-3'-фосфат (фосфатний залишок приєднаний до 3'-атому пентози) – як Np.

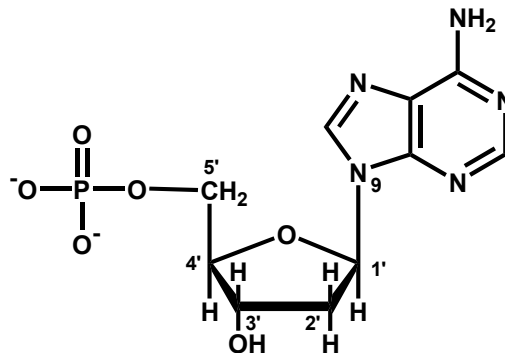


Рис. 1.3. Нуклеотид (дезоксіаденозинмонофосфат, АМР).
Зображено стан іонізації фосфату при рН > 6

На відміну від азотистих основ, пентози та фосфатні залишки добре взаємодіють з водою. Крім того, пентоза не містить подвійних зв'язків, тому навколо зв'язків у її складі можливе обертання. Оскільки атоми пентози утворюють кільце,

п'ять кутів обертання не є незалежними – для однозначного опису конформації п'ятичленного кільця достатньо двох параметрів. Планарна конформація кільця енергетично не вигідна через стеричні обмеження. У складі нуклеїнових кислот переважно зустрічаються дві конформації, схематично показані на рис. 1.4. Конформація *C2'-ендо* ($C2'$ -атом виходить у бік $C5'$ -атому з площини, що задана атомами $C4'-O-C1'$) є переважною для дезоксирибози за фізіологічних умов. При цьому $C3'$ -атом може виходити з тієї самої площини в протилежний бік (бути в положенні *C3'-екзо*). Узагалі, конформація пентози не є фіксованою: реалізується динамічна рівновага (у більш широких межах – для нуклеотидів, у вузьких – для впорядкованих полінуклеотидних ланцюгів) навкруг переважної конформації. Крім того, зміна зовнішніх умов може привести до того, що переважною стає інша конформація – *C3'-ендо* (рис. 1.4). Саме вона є основною для рибози у складі полірибонуклеотидних ланцюгів: поява OH -групи замість гідрогену при $C2'$ -атомі робить конформацію *C2'-ендо* неможливою.

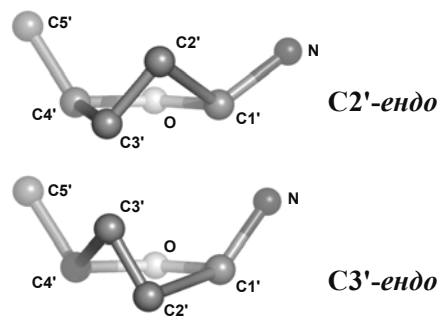


Рис. 1.4. Дві переважні конформації пентозного кільця у складі нуклеїнових кислот

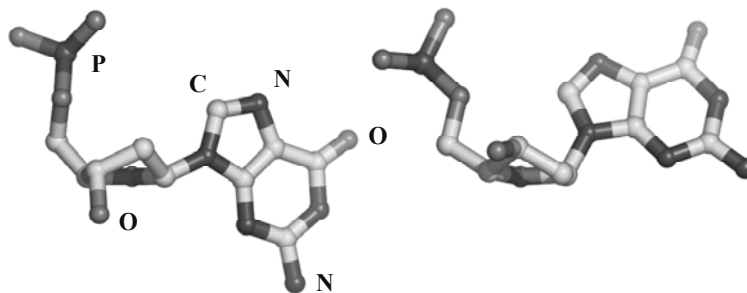


Рис. 1.5. Нуклеотид із конформаціями дезоксирибози *C2'-ендо* (ліворуч) і *C3'-ендо* (праворуч). Атоми гідрогену не показано

Перемикання між двома конформаціями суттєво змінює загальну просторову геометрію нуклеотиду (рис. 1.5) і тому лежить в основі перетворень між структурними формами нуклеїнових кислот (підрозд. 1.3).

Крім обертання навколо хімічних зв'язків пентозного кільця, конформація нуклеотиду залежить від набору інших кутів обертання у рухливій частині молекули: навколо всіх зв'язків за винятком зв'язків усередині азотистої основи (див. рис. 1.7 нижче).

1.1.3. Полінуклеотидний ланцюг

Дві хімічні групи – OH-група при 3'-атомі пентози одного нуклеотиду й фосфат при 5'-атомі іншого – використовуються для утворення *фосфодієфірного зв'язку* між нуклеотидами (рис 1.6). Отже, полінуклеотидний ланцюг має напрямок: на одному його кінці залишається 5'-фосфат (5'-кінець), на іншому – 3'-OH група (3'-кінець). Послідовності нуклеотидів прийнято записувати у напрямку $5' \rightarrow 3'$, у тому ж напрямку відбувається синтез усіх нуклеїнових кислот. Слід також розуміти, що конформаційні особливості ланцюга залежать від напрямку, в якому містяться сусідні нуклеотиди. Наприклад, послідовність СА (її також можна записати як рСрА або СрА) має інші особливості, ніж послідовність АС. Загалом у складі ланцюга може бути 16 типів таких динуклеотидних контактів (16 можливих комбінацій із чотирьох по два).

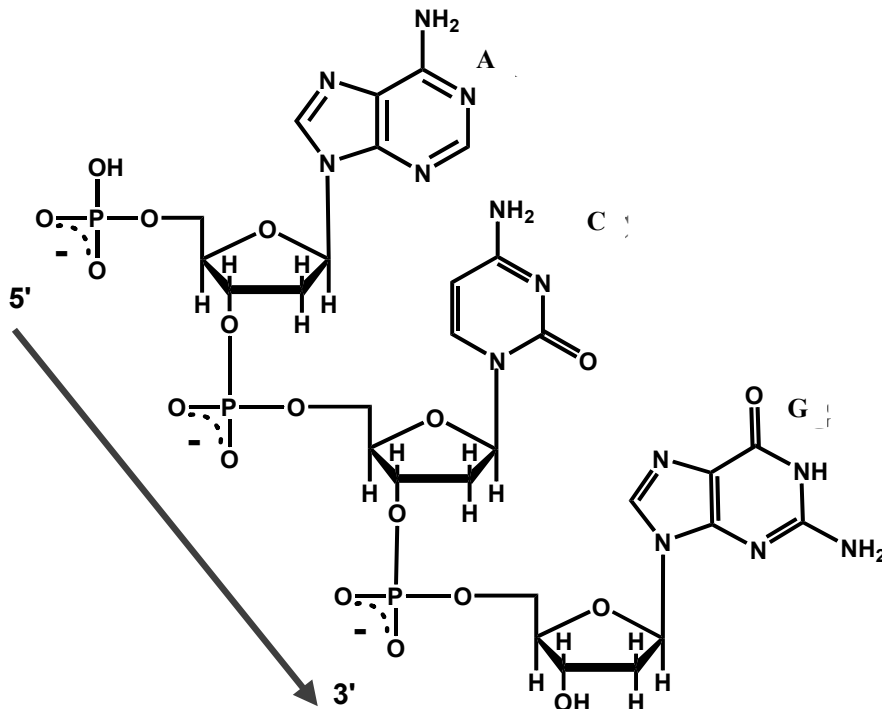


Рис. 1.6. Полінуклеотидний ланцюг

Полярний остов полінуклеотидного ланцюга являє собою фосфатні залишки (кожен з яких несе на собі один негативний заряд при нейтральних рН) і пентози, що чергуються, – *цукрофосфатний остов*. Від цього остова відходять азотисті основи як бокові залишки. Конформацію ланцюга визначають сім кутів обертання, асоційованих з кожним нуклеотидом, що показані на рис. 1.7 (плюс додатковий параметр, від якого залежить конформація пентози): шість кутів визначають конформацію цукрофосфатного остова, кут χ – орієнтацію азотистої основи відносно цукру.

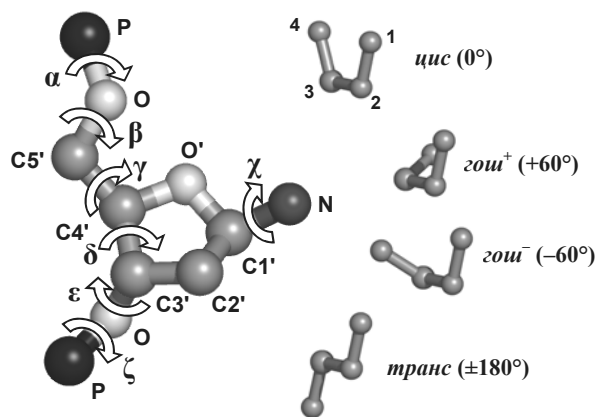


Рис. 1.7. Кути обертання (за номенклатурою IUPAC), що визначають конформацію нуклеотиду в складі полінуклеотидного ланцюга.

Праворуч показано кілька конформацій, що відповідають різним значенням кута обертання навколо зв'язку між атомами 2 і 3: у *цис*-конформації кут дорівнює 0° , позитивне значення кута відповідає обертанню атома 4 відносно атома 1 за годинниковою стрілкою, якщо дивитись у напрямку від атома 2 на атом 3

Велика кількість зв'язків, навколо яких можливе обертання, робить цукрофосфатний остов досить гнучким, проте не будь-які значення кутів обертання є припустимими. Для кожного кута реалізуються лише значення в певних виділених достатньо вузьких діапазонах – обертальні ізомери, число яких зазвичай не перевищує трьох. У складі одноланцюгових полінуклеотидів їхня кількість для кута α дорівнює 1, β – 3, γ – 3, δ – 2, ϵ – 3, ζ – 2, χ – 2, тобто загалом кожен нуклеотид може мати $1 \times 3 \times 3 \times 2 \times 3 \times 2 \times 2 = 216$ конформацій. У регулярних жорстких структурах нуклеїнових кислот реалізується один ізомер для кожного кута і спостерігається наступна тенденція (див. рис. 1.7): кут α приблизно відповідає конформації *gauche⁻*, β – *транс*, γ – *gauche⁺*, ϵ – *транс*, ζ – *gauche⁻*. Кут δ є одним із п'яти кутів обертання, які визначають конформацію п'ятичленного кільця цукру.

Для кута обертання навколо глікозидного зв'язку (χ) роль атомів 1–4 на рис. 1.7 відіграють атоми O'–C1'–N–C4 для пуринів та O'–C1'–N–C2 для піримідинів. Для цього кута існує два діапазони значень, які позначаються як *син* ($\chi \sim 45^\circ \pm 45^\circ$) та *анти* ($\chi \sim -135^\circ \pm 45^\circ$). У *син*-конформації шестичленне кільце пуринів і атом O2 піримідинів наближаються до пентозного кільця цукру, що створює стеричні обмеження. Відповідно, переважною є зазвичай анти-конформація нуклеотиду (зображена на рис. 1.5). Переважне значення кута χ суттєво залежить від конформації пентози: конформація C2'-ендо передбачає менші стеричні обмеження для кута χ , ніж конформація C3'-ендо. Відповідно, перша конформація пентози дозволяє ширший діапазон значень для кута χ та менші енергетичні витрати на реалізацію син-конформації. У складі регулярних полінуклеотидних структур нуклеотиди мають здебільшого анти-конформацію: значення кута χ приблизно дорівнює -160° для В-форми ДНК (де реалізується C2'-ендо-конформація пентози) і -100° для А-форми (C3'-ендо); *син*-конформація властива для частини нуклеотидів у складі Z-форми ДНК (підрозд. 1.3).

1.2. ПОДВІЙНА СПІРАЛЬ

На ранніх етапах структурних досліджень нуклеїнових кислот велику роль відіграв метод дифракції рентгенівських променів на фібрилах ДНК, який дозволив установити загальні риси структури подвійної спіралі. Детальну інформацію (просторові координати кожного атома) отримують за допомогою рентгеноструктурного аналізу кристалів або двовимірного ЯМР у розчині порівняно невеликих фрагментів ДНК: на рис. 1.8 зображено структуру додекамеру Дікерсона (Richard Dickerson) – одного з перших фрагментів ДНК, отриманих у кристалічному вигляді.

Молекула ДНК найчастіше існує у вигляді стабільної дволанцюгової структури (дуплекса), яка утворюється за рахунок нековалентних взаємодій. Два полінуклеотидні ланцюги (не тільки ДНК, а також РНК або гібридні) об'єднуються в дуплекс за жорсткої умови: певні азотисті основи повинні стояти одна напроти одної – А напроти Т (або U), G напроти C. Цей *принцип комплементарності*, сформульований Уотсоном і Кріком, зумовлений утворенням специфічних водневих зв'язків між названими основами: два зв'язки в парі А-Т, три в парі G-C. Два ланцюги дуплекса спрямовані в різні боки (є *антипаралельними*), спіралью закручені один навколо одного цукрофосфатні остови розташовані зовні, пари основ – щільно упаковані всередині цієї структури (рис. 1.8).

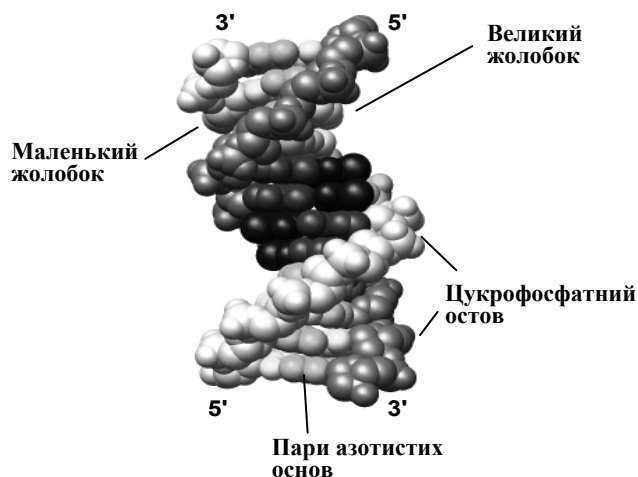


Рис. 1.8. Приклад подвійної спіралі ДНК:
кристалічна структура додекамера
 $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ (код PDB 355D)

1.2.1. Спарювання та стекінг азотистих основ

Певні хімічні групи азотистих основ є донорами (NH_2 - і NH -групи) і акцепторами (атоми O і N) водневого зв'язку (підпдрозд. 2.1.5). В антипаралельних подвійних спіралях ДНК (а також у регулярних подвійних спіралях РНК та гібридних спіралях РНК-ДНК) завжди реалізується так звана схема спарювання Уотсона – Кріка – система комплементарних водневих зв'язків у парах А-Т і G-С, зображених на рис. 1.9. Геометрія кожної пари дозволяє залучати будь-яку послідовність пар основ до регулярної подвійної спіралі: відстань між $\text{C1}'$ -атомами для двох пар є практично однаковою (рис. 1.9) і становить близько 11\AA – зовнішній діаметр подвійної спіралі з урахуванням цукрофосфатних остовів приблизно вдвічі більший – ~ 2 нм. Як показано на цьому ж рисунку, певні донорні й акцепторні групи залишаються не залученими до уотсон-кріківського спарювання: у складі дуплекса ці групи опиняються в жолобках – великому й маленькому (major/minor groove) – що утворюються на поверхні спіралі між двома цукрофосфатними остовами (рис. 1.8; визначення великого та маленького жолобків наведено в наступному підрозділі). Донорні та акцепторні групи в жолобках залучаються до водневих зв'язків із водою, іншими молекулами, зокрема білками, а також у окремих випадках – до спарювання з основами третього полінуклеотидного ланцюга в потрійних спіралях (підрозд. 1.3).

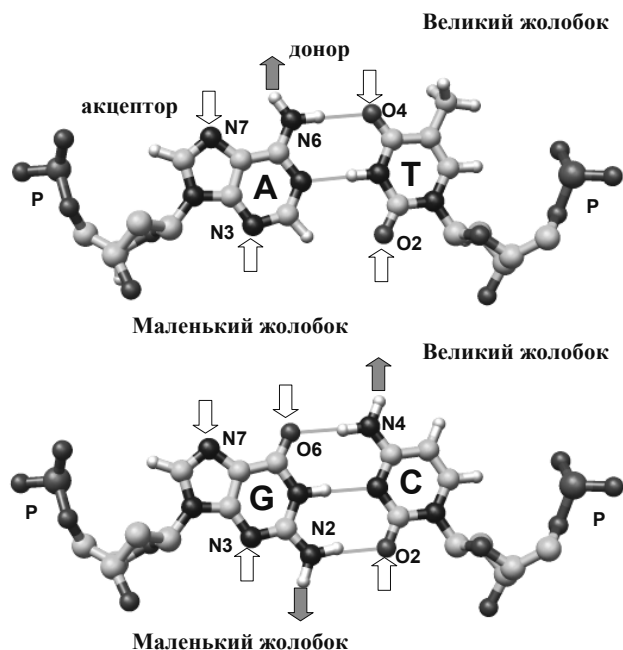


Рис. 1.9. Комплементарні пари основ, приєднаних до цукрофосфатного остова, у складі ДНК (див. також рис. 1.1). Показано уотсон-кріківські водневі зв'язки між основами та донори й акцептори водневого зв'язку, які містяться в жолобках подвійної спіралі

Насправді, оскільки азотисті основи містять більше донорів і акцепторів водневих зв'язків, ніж залучено до утворення комплементарних пар, схема спарювання Уотсона – Кріка не є єдиною можливою (хоча саме вона завжди реалізується в регулярних подвійних спіралях). Велика кількість пар основ, стабілізованих водневими зв'язками за іншими схемами, зустрічається в нуклеїнових кислотах, що не відрізняються однорідністю своєї структури. Насамперед, це стосується РНК зі складною просторовою організацією, зокрема рибосомних і транспортних РНК.

Комплементарні водневі зв'язки, які є умовою утворення подвійної спіралі, виконують надзвичайно важливу біологічну роль, забезпечуючи механізм реплікації ДНК та експресії генетичної інформації. Однак водневі зв'язки не є головним фактором стабілізації просторової структури дуплекса. Окремі азотисті основи або нуклеотиди у водному розчині не взаємодіють між собою за рахунок водневих зв'язків. Замість цього вони утворюють стосоподібні агрегати – планарні азотисті основи укладаються одна на одну, взаємно захищаючи свої гідрофобні площини від контакту з водою. Аналогічно, усередині подвійної спіралі також формується стопка (stack) щільно укладених приблизно планарних пар основ (відстань між площинами пар становить близько 3,35 Å), захищена на поверхні спіралі закрученими

один навкруг одного полярними цукрофосфатними остовами (рис. 1.8). Взаємодії між основами у складі стосу – *стекинг-взаємодії* – мають, крім гідрофобного ефекту, ще один важливий компонент – вандерваальсові контакти, які й забезпечують щільність упаковки стосу. Детальніше взаємодії, що стабілізують подвійну спіраль, розглядаються в розділі 2.

Ефективність стекинг-взаємодій залежить від типу контактуючих пар основ, а також від їхньої взаємної орієнтації та порядку розташування в ланцюгах дуплекса – типу динуклеотидного контакту вздовж осі подвійної спіралі. Замість 16 типів динуклеотидних контактів у одноланцюговій нуклеїновій кислоті, у подвійній спіралі залишається 10 – унаслідок комплементарності ланцюгів певні контакти є взаємоеквівалентними. Наприклад, контакт АГ в одному ланцюзі автоматично означає, що в комплементарному ланцюзі реалізується контакт СТ – слід пам'ятати, що ланцюги є антипаралельними, і що послідовність нуклеотидів записується у напрямку 5' → 3' (усі динуклеотидні контакти подвійної спіралі перелічені нижче в табл. 1.3). Для певних контактів (наприклад, пурин-піримідинових порівняно з піримідин-пуриновими) стекинг-взаємодії є більш ефективними.

1.2.2. Конформаційні параметри подвійної спіралі

Як і для будь-якого іншого полімеру, конформаційна рухливість нуклеїнових кислот реалізується завдяки зміні кутів обертання навколо ковалентних зв'язків (див. рис. 1.7). Дозволені обертання навколо різних зв'язків приводять врешті-решт до зміни взаємної орієнтації основ і пар основ. Саме набором параметрів, котрі описують такі відносні орієнтації, прийнято характеризувати конформації подвійних спіралей (номенклатура параметрів рекомендована спеціальною нарадою ЕМВО – European Molecular Biology Organization).

Кожну азотисту основу однієї пари можна розглядати як тверде тіло (азотиста основа має незмінну конформацію). Для однозначного опису взаємної орієнтації основ у межах однієї пари достатньо шести параметрів: трьох зсувів однієї основи відносно іншої вздовж осей деякої декартової системи координат і трьох ейлерових кутів – кутів обертання однієї основи відносно іншої навколо кожної з трьох осей. Після того, як взаємну орієнтацію основ визначено, пару основ можна розглядати як жорсткий блок, орієнтація якого відносно сусідньої пари також визначається шістьма параметрами.

Локальну декартову систему координат (координатну тріаду), яка відповідає кожній парі основ, показано на рис. 1.10. Два ланцюги, яким належать основи пари, позначаються як ланцюги I та II (довільно, але за ланцюг I береться той, для якого записується послідовність нуклеотидів у напрямку від 5'- до 3'-кінця; абсолютні значення описаних нижче параметрів не залежать від нумерації ланцюгів). Вісь у є паралельною до лінії, що з'єднує два С1'-атоми, центр цієї лінії зміщується до перетину з лінією між атомами С8 пурину та С6 піримідину й береться за поча-

ток відліку. Позитивний напрямок осі y – від ланцюга II до ланцюга I. Перпендикулярна вісь z (нормаль до пари основ) спрямована на наступну (y напрямку 5'-3' по першому ланцюгу) пару основ. Напрямок осі x обирається за правилами утворення правої декартової системи координат: жолобок, на який вона спрямована, позначається як "великий" (терміни "великий/маленький жолобок" не обов'язково мають буквально значення, підрозд. 1.3).

Аналогічно, локальна система координат відповідає кожній основі однієї пари (рис. 1.10). Вісь y збігається з лінією, що з'єднує атоми C4-N1 пурину або N3-C6 піримідину; центр лінії є початком відліку; позитивний напрямок y – від ланцюга II до ланцюга I. Позитивний напрямок осі z для обох основ збігається з напрямком 5'-3' по першому ланцюгу, вісь x доповнює систему координат.

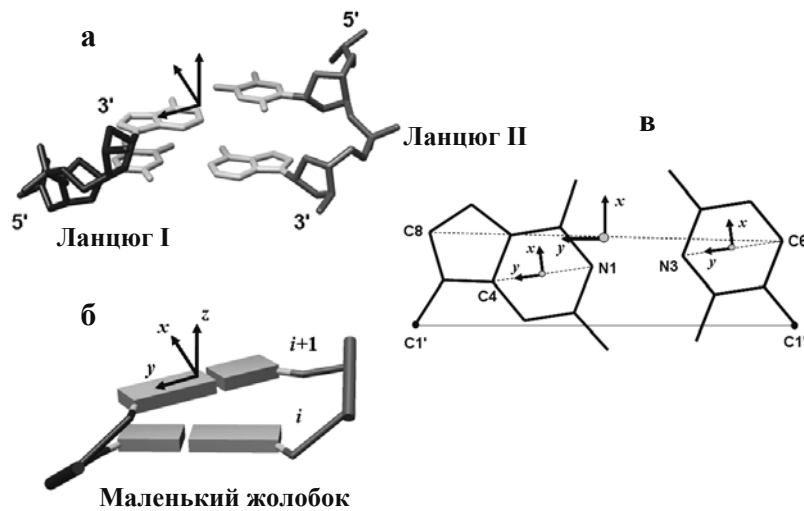


Рис. 1.10. Дві пари основ у молекулі ДНК і локальна декартова система координат, пов'язана з однією з них (а, б).

Частини а і б мають однакову орієнтацію та масштаб, розрізняючись тільки рівнем схематичності. в – Визначення локальних систем координат для пари основ і кожної основи пари (вісь Z перпендикулярна до площини рисунка та спрямована до глядача)

Щоб описати конфігурацію пари основ, із двох локальних систем координат основ шляхом усереднення одиничних векторів уздовж осей будується усереднена координатна система, для якої обчислюються конформаційні параметри пари (рис. 1.11): *шир* (shear, S_x) є мірою зсуву однієї основи відносно іншої вздовж осі x , *стретч* (stretch, S_y) – уздовж осі y , *стегер* (stagger, S_z) – уздовж z ; *бакл* (buckle, κ) є кутом обертю однієї основи відносно іншої навколо осі x , *пропелер* (propeller, ω) – навколо осі y , *опенінг* (opening, σ) – навколо осі z .

Для "ідеальної" уотсон-кріківської пари всі шість параметрів можна вважати такими, що дорівнюють нулю. У реальних кристалах ДНК (практично незалежно від структурної форми подвійної спіралі) п'ять параметрів є в середньому близькими до нуля, і тільки середнє значення пропелера дорівнює приблизно -11° (для АТ-пари зазвичай реалізується дещо більше, для GC-пари – менше абсолютне значення пропелера). Крім того, усі параметри варіюють у дуже вузьких межах навкруг середнього значення – за винятком бакла та пропелера, для яких варіації помітніші. Із шести параметрів пари три – шир, стретч і опенінг – використовуються для ідентифікації типів пар основ: значне відхилення їхніх значень від нуля вказує на відмінний від уотсон-кріківського тип спарювання й дозволяє встановити цей тип (що часто є важливим для аналізу структур РНК). Інші три параметри – бакл, пропелер та стегер – просто описують відхилення від ідеального планарного розташування основ у межах пари.

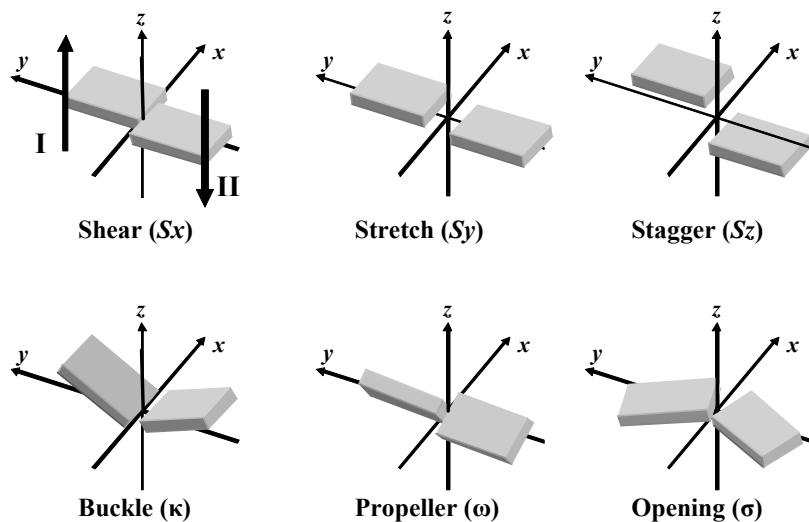


Рис. 1.11. Шість параметрів, що описують конформацію пари основ. Пара основ орієнтована до глядача маленьким жолобком (як на рис. 1.10, б). Для першої пари позначено полінуклеотидні ланцюги

Аналогічно, шість параметрів, графічно представлених на рис. 1.12, характеризують конформацію динуклеотидного кроку – двох сусідніх пар основ:

- *шифт* (shift, Dx) – зміщення вздовж осі x – характеризує зсув другої пари основ відносно першої (у порядку нумерації по першому ланцюгу) у напрямку одного із жолобків (позитивне значення відповідає зсуву у великий жолобок, при зміні нумерації ланцюгів шифт змінює знак);

- *слайд* (slide, Dy) – зміщення вздовж осі y – характеризує зсув у напрямку цукрофосфатного остова (позитивне значення відповідає зсуву в напрямку першого ланцюга, знак слайда не залежить від нумерації ланцюгів);
- *райз* (rise, Dz) – зміщення вздовж осі z – характеризує відстань між парами основ уздовж нормалі до першої пари;
- *тилт* (tilt, τ) – кут обертання другої пари відносно першої навколо осі x – характеризує локальний вигин у напрямку цукрофосфатного остова (позитивне значення відповідає вигину в бік другого ланцюга, при зміні нумерації ланцюгів тилт змінює знак);
- *рол* (roll, ρ) – кут обертання навколо осі y – характеризує локальний вигин подвійної спіралі в напрямку одного із жолобків (позитивне значення відповідає вигину в бік великого жолобка, знак рола не залежить від нумерації ланцюгів);
- *твіст* (twist, Ω) – кут обертання другої пари навколо нормалі до першої, який характеризує ступінь спірального закручення (позитивне значення відповідає правій спіралі, негативне – лівій).

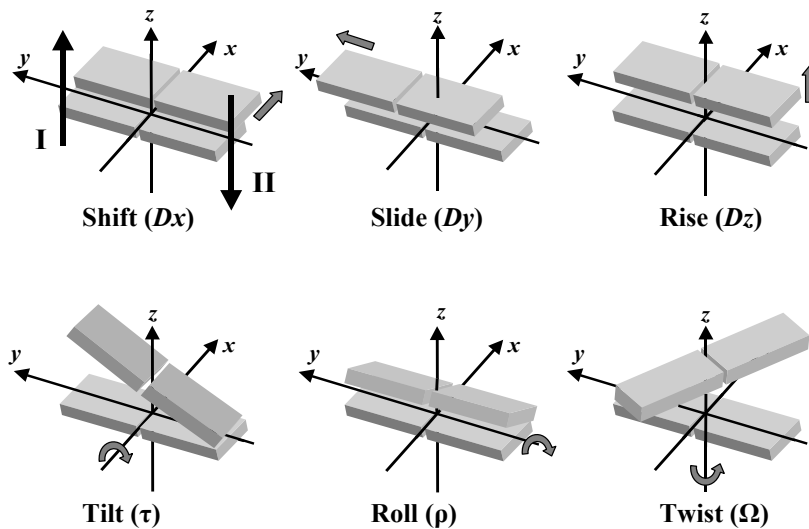


Рис. 1.12. Шість параметрів, що описують конформацію двох сусідніх пар основ.

Пари основ орієнтовані до глядача маленьким жолобком (як на рис. 1.10, б).

Для першої структури позначено полінуклеотидні ланцюги.

Стрілочками позначено позитивний напрямок зміни параметрів

(для кутів – обертання за годинниковою стрілкою, якщо дивитись уздовж позитивного напрямку осі)

Серед трьох перелічених конформаційних кутів твіст описує ступінь торсійного закручення подвійної спіралі, а тилт і рол – її вигину. Сумарний локальний кут вигину між двома парами основ $\Gamma = (\tau^2 + \rho^2)^{1/2}$, конкретний напрямок вигину визначається співвідношенням між ролом і тилтом.

Представлений на рис. 1.11, 1.12 набір 12 параметрів однозначно характеризує конформацію будь-якої подвійної спіралі. Інакше кажучи, ці параметри використовуються не тільки для аналізу структур нуклеїнових кислот, а й для розв'язання зворотної задачі – побудови структури за значеннями конформаційних параметрів (які можуть бути однаковими чи варіювати вздовж певного фрагмента подвійної спіралі).

Крім наведених шести параметрів динуклеотидного кроку часто використовують також так звані *спіральні конформаційні параметри*, що відображають розташування пари основ *відносно осі подвійної спіралі*. Графічне зображення спіральних параметрів є цілком подібним до зображеного на рис. 1.12, якщо під віссю z розуміти вісь спіралі, а під осями x та y – проекції відповідних локальних осей пари (рис. 1.10, *в*) на перпендикулярну до осі z площину. Спіральні параметри позначаються як:

- x -зміщення (x -displacement, dx) – зсув пари основ уздовж осі x , тобто в напрямку одного із жолобків відносно осі спіралі;
- y -зміщення (y -displacement, dy);
- спіральний райз (helical rise, h або dz) – відстань між сусідніми парами основ уздовж осі спіралі;
- уклін (inclination, η) – кут оберту пари навколо осі x ;
- тїп (tip, θ) – кут оберту навколо осі y ;
- спіральний твіст (helical twist, Ω_h) – кут, на який треба повернути пару основ навколо осі спіралі, щоб її орієнтація збіглася з такою сусідньої пари.

Отже, спіральні параметри чисельно описують регулярність (періодичність) подвійної спіралі та/або відхилення даної пари основ від такої регулярності, тоді як параметри динуклеотидного кроку характеризують взаємну геометрію сусідніх пар основ. Якщо, наприклад, райз практично завжди (для спіралей різного типу) є близьким до відстані найближчого (щільного вандерваальсового) контакту (3,35 Å), спіральний райз (приблизно проекція райза на вісь подвійної спіралі) може суттєво варіювати, відображаючи загальне повздовжнє скорочення/подовження дуплекса. Зрозуміло, що спіральні параметри відрізняються від аналогічних параметрів динуклеотидного кроку тоді, коли нормаль до пари основ не збігається з віссю подвійної спіралі – якщо пари основ перпендикулярні до осі спіралі, райз не відрізняється від спірального райза, твіст – від спірального твіста і т. д. Два набори параметрів (спіральні

та параметри кроку) є повністю взаємозамінними: один набір можна отримати з іншого без втрати структурної інформації. Наприклад, виконуються наступні співвідношення для кутів із двох наборів:

$$\theta/\eta = -\tau/\rho$$

$$2 \cos \Omega_h = \cos \Omega (1 + \cos \Gamma) + \cos \Gamma - 1,$$

з яких видно, зокрема, що $\Omega_h = \Omega$ за відсутності вигину спіралі (коли $\Gamma = 0$).

Рисунок 1.13 ілюструє простий приклад впливу зміни параметрів на загальну структуру подвійної спіралі та співвідношення між двома наборами параметрів. Перша структура на цьому рисунку (крайня ліворуч) приблизно відповідає В-формі ДНК (див. наступний підрозділ) – спіральний твіст і спіральний райз для неї дорівнюють твісту та райзу відповідно. Уведення негативного слайда на кожному кроці приводить до зсуву пар основ уздовж спіральної осі X . Той самий наслідок (але менш помітний), а також збільшення спірального твіста, значний нахил пар основ відносно осі спіралі (inclination) і зменшення спірального райза спостерігається при введенні на кожному кроці позитивного рола. Зміна обох параметрів підсилює і x -зміщення, і зменшення спірального райза – стає очевидним значне скорочення спіралі. Ця остання структура приблизно відповідає А-формі ДНК.

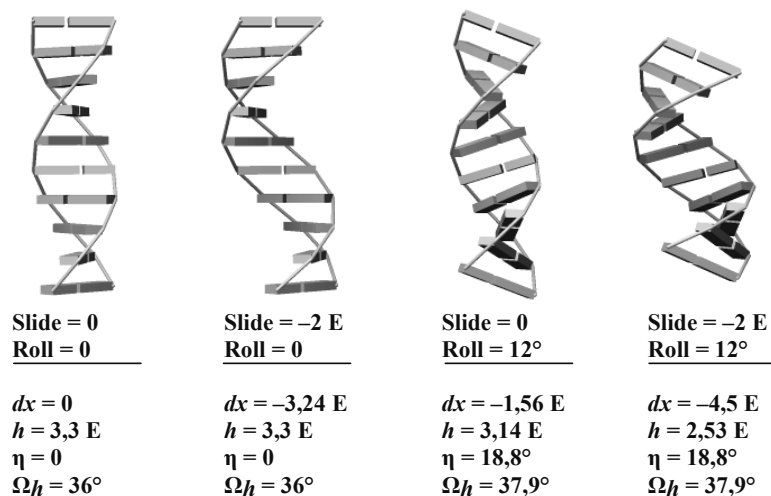


Рис. 1.13. Чотири моделі подвійної спіралі довжиною 10 пар основ, що розрізняються за значеннями двох параметрів динуклеотидного кроку (усі параметри є однаковими для кожного кроку). Для всіх моделей усі параметри пар основ, а також шифт і тилт дорівнюють нулю, райз 3,3 Å, твіст 36°.

Під рискою – спіральні конформаційні параметри (dy та θ для всіх структур залишаються нульовими)

1.3. СТРУКТУРНІ ФОРМИ ДНК

1.3.1. А- і В-родина форм ДНК

ДНК із майже будь-якою послідовністю пар основ може існувати у двох структурних формах, що позначаються як А і В. Усереднені параметри двох форм у кристалах ДНК наведено в табл. 1.1, структури показано на рис. 1.14.

Таблиця 1.1. Порівняння між А- і В-формами подвійних спіралей ДНК у кристалах

Параметр	Позначення	А-ДНК	В-ДНК
<i>Параметри пар основ</i>			
Buckle (град)	κ	-0,1 (7,8)	0,5 (6,7)
Propeller (град)	ω	-11,8 (4,1)	-11,4 (5,3)
Opening (град)	σ	0,6 (2,8)	0,6 (3,1)
Shear (Å)	S_x	0,01 (0,23)	0,00 (0,21)
Stretch (Å)	S_y	-0,18 (0,10)	-0,15 (0,12)
Stagger (Å)	S_z	0,02 (0,25)	0,09 (0,19)
<i>Параметри динуклеотидних кроків</i>			
Tilt (град)	τ	0,1 (2,8)	-0,1 (2,5)
Roll (град)	ρ	8,0 (3,9)	0,6 (5,2)
Twist (град)	Ω	31,1 (3,7)	36,0 (6,8)
Shift (Å)	D_x	0,00 (0,54)	-0,02 (0,45)
Slide (Å)	D_y	-1,53 (0,34)	0,23 (0,81)
Rise (Å)	D_z	3,32 (0,20)	3,32 (0,19)
<i>Спіральні параметри</i>			
Inclination (град)	η	14,7 (7,3)	2,1 (9,2)
Tip (град)	θ	-0,1 (5,2)	0,0 (4,3)
Helical twist (град)	Ω_h	32,5 (3,8)	36,5 (6,6)
x-displacement (Å)	dx	-4,17 (1,22)	0,05 (1,28)
y-displacement (Å)	dy	0,01 (0,89)	0,02 (0,87)
Helical rise (Å)	h	2,83 (0,36)	3,29 (0,21)

Для кожного параметра представлено середні значення та стандартні відхилення (у дужках) (за Olson *et al.*, 2001).

Обидві спіралі є *правими*: спіраль називають правою, коли точка, що рухається по ланцюгу й пересувається вздовж осі спіралі вперед, одночасно обертається навколо осі за *годинниковою стрілкою*; якщо обертання при русі вперед здійснюється проти годинникової стрілки, спіраль називають лівою. Основні відмінності між двома формами ДНК зумовлені різною конформацією цукру – С3'-ендо в А-ДНК і С2'-ендо в В-ДНК. Унаслідок цього в А-формі порівняно з В-формою:

- скорочується відстань між сусідніми фосфатними залишками – 5,9 Å для А-форми проти 7 Å для В-форми;

- зменшується ступінь правої спіральної закрутки – для А-форми, порівняно з В-формою, значення твіста зменшується, тобто кількість пар на виток спіралі ($360^\circ/\Omega$) зростає від 10 до 11 (ці значення реалізуються в кристалах, у розчині спіральна періодичність В-ДНК становить $\sim 10,5$ пар основ на виток);

- кожна пара основ суттєво нахилиється до осі спіралі, тоді як у В-формі пари майже перпендикулярні до осі;

- унаслідок нахилу в А-формі скорочується відстань між сусідніми парами основ уздовж осі спіралі (спіральный райз), і спіраль скорочується;

- кожна пара суттєво зсунута до периферії спіралі в А-формі (зсув у бік маленького жолобка), вісь спіралі проходить майже через центр пари в В-формі.

- "великий" і "маленький" жолобки є справді великим і маленьким для В-форми (ширина жолобків становить відповідно 11,7 Å та 5,7 Å), в А-формі їхні відносні розміри міняються місцями – ширина великого жолобка дорівнює 2,7 Å, маленького – 11 Å.

Крім того, є різниця й у конформаційній рухливості двох форм: А-форма більш однорідна за своєю структурою, В-форма допускає ширші варіації параметрів залежно від послідовності (підрозд. 1.4). Узагалі, частіше кажуть не про форми ДНК, а про А- і В-родина структурних форм.

За фізіологічних умов у розчині ДНК існує виключно у В-формі, перехід в А-форму здійснюється за досить екстремальних умов *in vitro* – при зниженні вологості у фібрилах і зниженні активності води (полярності розчинника) у розчині: наприклад, у присутності 80 % етанолу за низької іонної сили. Підвищення концентрації солі сприяє В–А переходу – він відбувається за нижчих концентрацій спирту. Зафіксувати такий перехід у розчині можна, зокрема, завдяки суттєвим змінам у спектрах кругового дихроїзму, які супроводжують структурне перетворення. В–А перехід відбувається при зміні складу розчинника кооперативно (розділ 2), раптовим стрибком: усі дезоксирибози мають майже одночасно змінити свою конформацію. Ефективність структурного переходу залежить від послідовності пар основ: наприклад, В–А перехід є найлегшим для динуклеотидного контакту GG/CC, найважчим – для контакту AA/TT.

Екстремальність умов, за яких ДНК переходить в А-форму не означає, що ця форма не є фізіологічною. По-перше, через те, що рибоза не може набувати *C2'-ендо*-конформації, усі подвійні спіралі РНК за фізіологічних умов існують в А-формі. З тієї ж причини А-форми набувають гібридні подвійні спіралі РНК-ДНК, які тимчасово виникають, наприклад, під час транскрипції. Крім того, ДНК може переходити в А-форму або наближену до неї в комплексах з білками. Зокрема, це стосується подвійної спіралі в оточенні активного центру ДНК-полімерази під час реплікації: структурно однорідна А-форма є кращим субстратом для ферменту, який каталізує однакову хімічну операцію синтезу, використовуючи різні нуклеотиди й будуючи на матричному ланцюзі різноманітні послідовності пар основ.

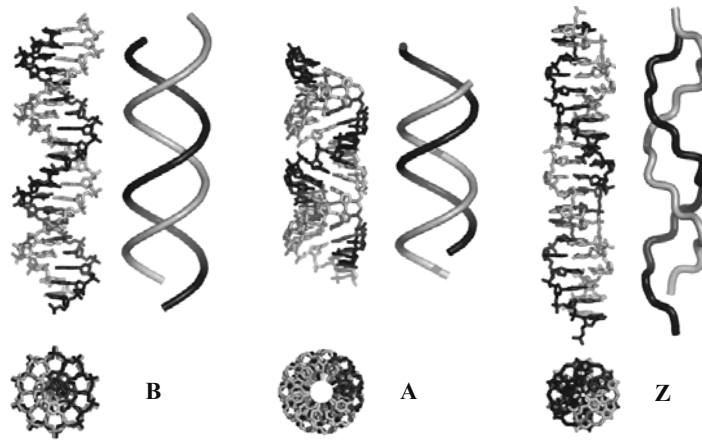


Рис. 1.14. Фрагмент ДНК довжиною 20 пар основ у трьох ідеалізованих регулярних структурних формах. Для кожної структури показано дві проекції та загальний хід основних ланцюгів

Варто згадати ще кілька специфічних структурних форм ДНК, які належать до В-родини:

- **С-форма** реалізується в розчинах з високою іонною силою (3 М NaCl), структурний перехід В–С є поступовим (некооперативним). Подвійна спіраль у С-формі більш закручена порівняно з "канонічною" В-формою (9,3 пар основ на виток), пари основ мають певний нахил до осі спіралі та дещо зміщені від осі в напрямку великого жолобка;
- синтетичний полімер poly(dA)·poly(dT) (один ланцюг гомопуриновий, інший – гомопіримідиновий, літера "d" вказує, що ланцюги складаються з дезоксирибонуклеотидів) формує спіраль із 10 пар основ на виток як у фібрилах, так і в розчині (**В'-форма**), що свідчить про її високу конформаційну жорсткість. Спіраль також характеризується суттєво підвищеною жорсткістю щодо вигину;

• **D-форма** (за своїми параметрами нагадує С-форму) є характерною для синтетичного полімеру poly(dAdT) (*альтернуюча* послідовність, тобто А і Т чергуються по ланцюгу) в умовах, коли звичайна В-ДНК переходить в А-форму. Для альтернуючих послідовностей poly(dAdT) А-форма неможлива.

1.3.2. Z-форма ДНК

Це регулярна форма подвійної спіралі, яка може реалізуватись тільки для деяких альтернуючих пурин-піримідинових послідовностей – у першу чергу poly(dGdC) (рис. 1.14; 1.15), а також poly(dAdC·dGdT) і деяких інших. Назва цієї форми пов'язана з тим, що лінія, яка з'єднує фосфатні залишки у складі Z-форми, нагадує зигзаг. Найвražаюча особливість цієї форми ДНК полягає в тому, що це – *ліва спіраль* із приблизно 12 парами основ на виток. Більш коректним було б сказати, що на один виток спіралі припадає 6 динуклеотидів GpC, кожен із яких (а не пара основ, як у А- і В-формах) є структурною одиницею, що періодично повторюється: кут спірального обертання такої одиниці відносно попередньої навколо осі спіралі становить близько -60° . Конформаційні параметри сусідніх динуклеотидних кроків GpC (усередині структурної одиниці) і CpG (між двома одиницями) суттєво різняться (рис. 1.15, табл. 1.2). Як видно з рис. 1.15, звичайний стекінг між основами одного ланцюга спостерігається тільки всередині кроку GpC, у кроці CpG реалізується стекінг між цитозинами протилежних ланцюгів, а гуаніни взагалі не контактують один з одним.

Крім того, гуанозинам і цитидинам притаманна різна конформація в складі Z-форми. Цитидини (як і всі нуклеозиди в складі А- та В-форми) мають "стандартну" для подвійних спіралей анти-конформацію щодо кута обертання навколо глікозидного зв'язка (кут $\chi \sim -155^\circ$), їхня дезоксирибоза перебуває в конформації 2'-ендо. Гуанозини у складі Z-форми знаходяться в син-конформації ($\chi \sim +65^\circ$), а конформація їхніх цукрів варіює від 2'-ендо до 2'-екзо.

Таблиця 1.2. Параметри динуклеотидних кроків у Z-формі ДНК

Параметр	Позначення	Динуклеотиди GpC	Динуклеотиди CpG
Tilt (град)	τ	0	0
Roll (град)	ρ	-5,13	5,51
Twist (град)	Ω	-51,36	-8,7
Shift (Å)	D_x	0	0
Slide (Å)	D_y	-1,9	5,73
Rise (Å)	D_z	3,57	3,61

Альтернуючі послідовності G і C є в природних ДНК, але кооперативний перехід у Z-форму відбувається *in vitro* (реєструється за допомогою спектроскопії кругового дихроїзму) в умовах, які є дуже далекими від фізіологічних – при високих концентраціях солі. Poly(dGdC) переходить у Z-форму при 2,5 М NaCl або 0,7 М MgCl₂ (указано концентрації напівпереходу – точки, коли перетворення відбулося на 50 %). В–Z перехід значно полегшується для метильованої форми полімеру: Z-форма реалізується для poly(dGd5mC) при 0,7 М NaCl або 6 мМ MgCl₂. Біологічне значення Z-форми залишається не зовсім зрозумілим, хоча знайдені білки, що мають високу спорідненість саме до неї, тобто можуть індукувати В–Z перехід *in vivo* (див. рис. 1, кольор. вст., 7.17). Крім того, перехід oligo(dGdC)-треків у Z-форму може індукуватися за фізіологічних умов негативною надспіралізацією в циркулярній ДНК, і такі переходи зафіксовані *in vivo* (розділи 5; 7).

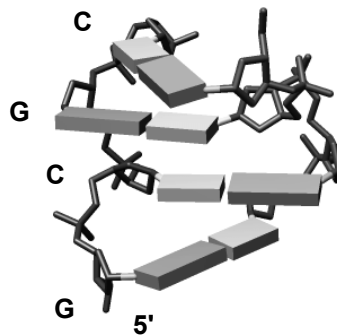


Рис. 1.15. Чотири пари основ у складі poly(dGdC) у Z-формі. Подвійна спіраль орієнтована великим жолобком до глядача

1.3.3. Хрестоподібна форма ДНК

Ще одним незвичним станом молекули, який може виникати в умовах негативної надспіралізації, є хрестоподібна форма ДНК (рис. 1.16) на ділянках паліндромних послідовностей (таких, що читаються однаково по обох ланцюгах у напрямку 5'-3').

Як показано на рис. 1.16, унаслідок комплементарності двох "половин" паліндрому в межах кожного ланцюга у хрестоподібному стані формуються дві шпильки. Конформаційні обмеження на вершині та в основі шпильок унеможливають збереження там спарених азотистих основ. Оскільки таке локальне руйнування подвійної спіралі енергетично не вигідне за фізіологічних умов, утворення хрестоподібної конформації є неможливим у вільній лінійній молекулі ДНК: хрест (точніше, одноланцюгові ділянки) має бути стабілізований деякими додатковими факторами, і енергетично не вигідна негативна надспіралізація, яку частково знімає локальне розкручування подвійної спіралі – один із них (розділ 5).

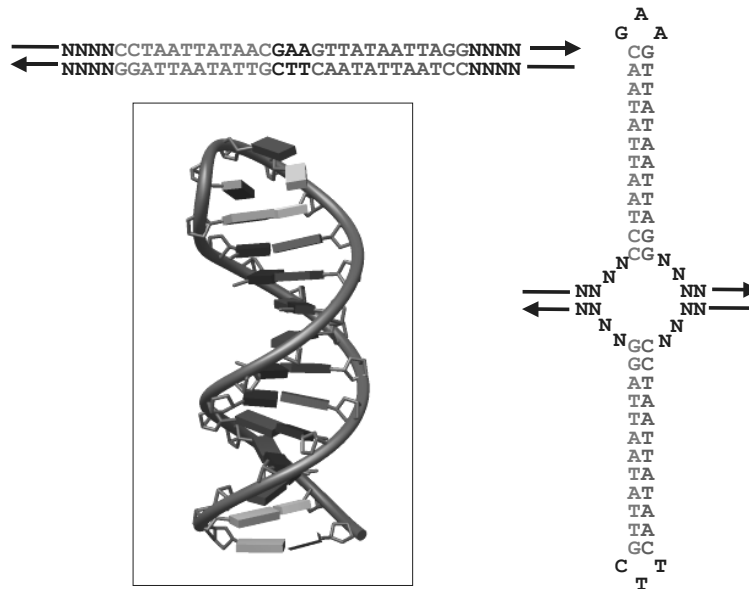


Рис. 1.16. Паліндромна ділянка у стані звичайної подвійної спіралі та в хрестоподібній конформації. На вставці: структура верхньої шпильки (код PDB 1JVE)

1.3.4. Потрійні спіралі

Уже згадуваний у підпідрозд. 1.3.1 синтетичний полімер poly(dA)·poly(dT) може за певних умов перебудовуватись у потрійну спіраль, коли гомополіпіримідиновий ланцюг poly(dT) укладається у великий жолобок дуплекса poly(dA)·poly(dT), розташовуючись паралельно до гомопуринового ланцюга poly(dA). Використовуючи донорні та акцепторні групи аденіну у великому жолобку (див. рис. 1.9), тиміни третього ланцюга утворюють з ними два так звані *хугстинівські* (Karst Hoogsteen) водневі зв'язки (рис. 1.17, в). Схема спарювання за Хугстином, яка передбачає залучення N7 і (NH₂)6/O6 пуринів до утворення водневих зв'язків, часто зустрічається також у молекулах РНК зі складною просторовою структурою.

Потрійна спіраль може бути сформована й у звичайній молекулі ДНК між двома ділянками гомопуринових-гомопіримідинових треків, причому піримідиновий ланцюг має бути збагаченим на цитозин (рис. 1.17): піримідиновий ланцюг (залишаючи одноланцюгову петлю) укладається у великий жолобок подвійної спіралі паралельно до пуринового ланцюга дуплекса, утворюючи хугстинівські пари з пуринами. Цитозин у складі третього ланцюга має бути протонуваним по атому N3 (рис. 1.17, в): формування триплекса полегшується при кислих значеннях рН (рН ~ 4 для лінійної ДНК). Відповідно, потрійна спіраль, що стабілізується протонами H⁺, називається *H-формою* ДНК.

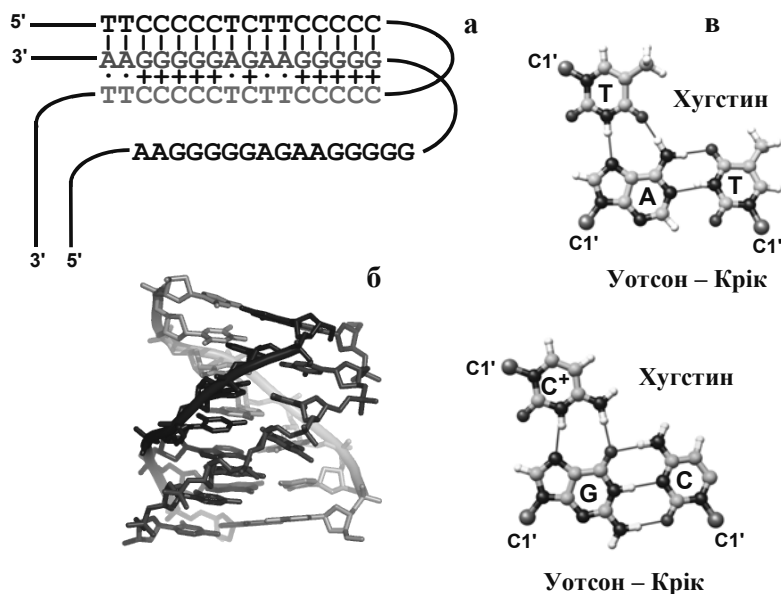


Рис. 1.17. Схема утворення Н-форми ДНК (а), структура фрагмента триплекса (б, код PDB 177D) та основні тріади, що реалізуються у складі потрійної спіралі (в). Цитозин перебуває в іонізованій зарядженій формі C^+ (атом N3 захоплює протон). На частині а уотсон-кріківські пари позначено рисками, хугстинівські – крапками, хугстинівські за участю протонованих цитозинів – символом +

Оскільки утворення Н-форми пов'язане з локальним розкрученням подвійної спіралі, В-Н перехід значно полегшується (знову) в умовах негативної надспіралізації в циркулярній ДНК, коли такий перехід (і пов'язане з ним протонування цитозинів) стає можливим і при нейтральних рН. У циркулярній ДНК можливе також рН-незалежне утворення триплексів на треках poly(dA)·poly(dT) і формування так званої *Н-форми – потрійної спіралі, що складається з двох ланцюгів, збагачених на пурин, та одного – на піримідин. Такий триплекс може бути стабілізований тріадами С-G·G, Т-A·T, С-G·A⁺.

1.3.5. Квадруплекси

На кінцях ДНК еукаріотичних хромосом розташовані теломери, які складаються з невеличких елементів послідовності (у хребетних – GGTTAG), що багатократно тандемно повторюються. Причому значна частина теломерної ділянки перебуває в одноланцюговому стані (одноланцюговий 3'-кінець, що виступає).

Послідовності такого типу можуть утворювати за фізіологічних умов *in vitro* внутрішньоланцюгові квадруплекси (тетраплекси), у складі яких кілька (частіше три) гуанінові тетради стабілізовані водневими зв'язками (рис. 1.18).

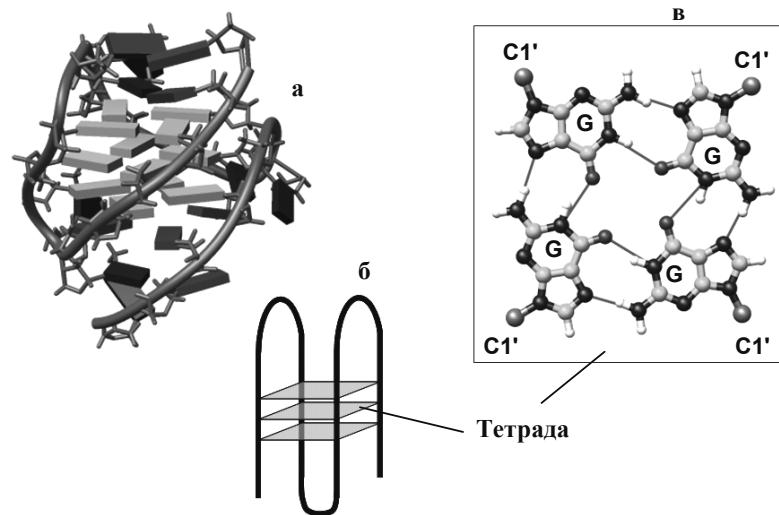


Рис. 1.18. Структура внутрішньоланцюгового теломерного квадруплекса AAAG(GGTTAG)₃GGAA (а, код PDB 2HY9), одна з можливих топологій квадруплекса (б) та одна з трьох гуанінових тетрад у його складі (в)

Структури такого типу можуть містити два, три або чотири ланцюги (наприклад, тетраланцюгова спіраль із чотирьох ланцюгів poly(dG)) і мати різну топологію. Послідовності, котрі потенційно здатні до утворення квадруплексів, досить широко представлені в геномах, і можлива функціональна роль цих структур активно обговорюється. Однак питання щодо утворення квадруплексів *in vivo* залишається відкритим.

1.3.6. Чотириланцюгові з'єднання

Чотириланцюгові з'єднання (four-way junctions) – точки розгалуження, від яких відходять чотири подвійні спіралі (рис. 1.19). Такі з'єднання – структури Холідея (Robin Holliday) – є інтермедіатами, що виникають під час рекомбінаційних процесів внаслідок взаємного обміну ланцюгами між двома дуплексами.

За низької іонної сили з'єднання існує у вигляді квадратної структури, коли чотири дуплекси спрямовані на кути квадрата. Саме така структура стабілізується білками, що беруть участь у рекомбінації. Наявність двовалентних катіонів

(у разі відсутності цих специфічних білків) індукує формування так званої Х-подібної структури, де два ланцюги входять до складу двох суцільних дуплексів, а два інші – здійснюють обмін між дуплексами (рис. 1.19). Х-подібна структура може існувати у вигляді двох конформерів залежно від вибору пари суцільних ланцюгів. Оскільки два конформери зазвичай розрізняються за енергією стекингу в зоні з'єднання, конформаційна рівновага, як правило, зсунута в бік одного з них. Під час гомологічної рекомбінації, коли два дуплекси є гомологічними за своєю послідовністю, точка розгалуження не фіксована, а здійснює переміщення на досить великі відстані.

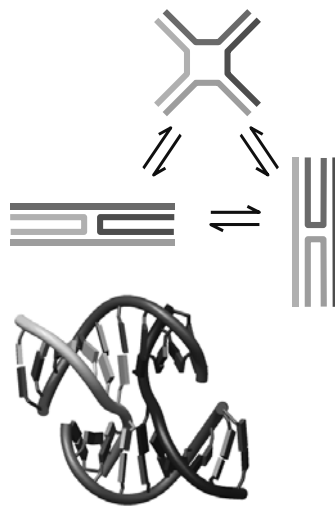


Рис. 1.19. Чотириланцюгове з'єднання у вигляді квадратної структури та двох Х-подібних конформерів.
Унизу: кристалічна структура одного з конформерів (код PDB 467D)

1.4. СТРУКТУРНО-ДИНАМІЧНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ В-ДНК

Як було зауважено в попередньому підрозділі, В-форма є основним станом подвійної спіралі ДНК за фізіологічних умов (далі під ДНК будемо в більшості випадків розуміти саме цю її структурну форму).

Структурні параметри ДНК у розчині можуть дещо відрізнятись від таких у кристалах (наведених у табл. 1.1). Наприклад, середній кут твіста Ω за фізіологічних умов (37 °С, 150 мМ NaCl) відповідає спіральній періодичності $\sim 10,5$ пар основ/виток (залежно від послідовності, про що йтиметься нижче) проти 10,0 пар

основ/виток у кристалах. При цьому кут твіста, який можна з високою точністю визначити в розчині за змінами топологічних характеристик циркулярної ДНК (розділ 5), досить суттєво залежить від температури та іонної сили розчину. Ця залежність підпорядковується емпіричним рівнянням

$$\Omega = \Omega^0 - \tau \Delta t, \quad (1.1a)$$

$$\Omega = \Omega^0 + \rho \lg([X^+]/[X^+]^0), \quad (1.1б)$$

де Ω^0 – кут твіста за певної референтної температури/концентрації солі; τ – коефіцієнт термічного розкручування; $\Delta t = t - t_0$, t – температура, t_0 – референтна температура; ρ – коефіцієнт залежного від іонної сили закручування; $[X^+]$ – молярна концентрація катіона X^+ і $[X^+]^0$ – його референтна концентрація. Коефіцієнт термічного розкручування (може трохи варіювати залежно від послідовності) $\tau \sim 0,012^\circ/\text{C}$ – на таку величину зменшується середній кут твіста при зростанні температури на 1°C . Значення коефіцієнта ρ залежить від типу катіона. Так, для Na^+ $\rho = 0,16^\circ$ (на стільки зростає кут твіста при підвищенні молярної концентрації катіона в 10 разів). Близькі значення має цей коефіцієнт для інших моновалентних катіонів, суттєво вищі – для бівалентних, які значно ефективніше сприяють закручуванню подвійної спіралі. Від типу присутніх у розчині аніонів ρ не залежить – тільки катіони взаємодіють з негативно зарядженою ДНК (розділ 3).

Структура В-форми ДНК не є абсолютно регулярною вздовж осі подвійної спіралі. Конформаційні особливості та особливості стекінгу в різних контактах між парами основ приводять до суттєвої залежності локальної конформації дуплекса від послідовності – можна сказати, що, крім генетичної, послідовність пар основ несе інформацію про структурні особливості ДНК. Залежність конформації ДНК від послідовності ілюструє табл. 1.3, де наведено значення параметрів 10 можливих динуклеотидних кроків у кристалах білково-нуклеїнових комплексів. Ці значення є середніми для певного типу контакту між парами основ у 92 кристалічних структурах, де не спостерігається значних деформацій ДНК. Тобто, хоча вплив білків на конформацію ДНК у цих комплексах безумовно має місце, ці данні є непоганим наближенням до структурних параметрів вільної ДНК у розчині за фізіологічних умов.

Аналізуючи значення параметрів для різних кроків, можна зробити наступні висновки:

- різні типи контактів несуттєво різняться між собою за райзом, середнє значення якого варіює в інтервалі у $0,15 \text{ \AA}$ – щільна упаковка пар основ практично не залежить від послідовності;
- до інших двох параметрів, що несуттєво розрізняються для різних кроків, належать шифт (діапазон варіації середніх значень становить $0,4 \text{ \AA}$) та тилт (різниця між середніми значеннями становить максимум 2°);

• ще три конформаційні параметри, навпаки, досить суттєво залежать від типу контакту між парами основ: середнє значення твіста варіює для різних кроків на інтервалі в 9°: ступінь локальної спіральної закрутки ДНК суттєво змінюється залежно від послідовності пар основ; рол варіює в діапазоні 5°, слайд – трохи більше 1 Å.

Таблиця 1.3. Параметри динуклеотидних кроків у кристалах білково-нуклеїнових комплексів

Крок	Shift (Å)	Slide (Å)	Rise (Å)	Tilt (°)	Roll (°)	Twist (°)
AA/TT	-0,03 (0,57)	-0,08 (0,45)	3,27 (0,22)	-1,4 (3,3)	0,7 (5,4)	35,1 (3,9)
AT	0,00 (0,57)	-0,59 (0,31)	3,31 (0,21)	0,0 (2,5)	1,1 (4,9)	29,3 (4,5)
TA	0,00 (0,52)	0,05 (0,71)	3,42 (0,24)	0,0 (2,7)	3,3 (6,6)	37,8 (5,5)
GG/CC	0,05 (0,76)	-0,22 (0,64)	3,42 (0,24)	-0,1 (3,7)	3,6 (4,5)	32,9 (5,2)
GC	0,00 (0,61)	-0,38 (0,56)	3,40 (0,24)	0,0 (3,9)	0,3 (4,6)	33,6 (4,7)
CG	0,00 (0,87)	0,41 (0,56)	3,39 (0,27)	0,0 (4,2)	5,4 (5,2)	36,1 (5,5)
AG/CT	0,09 (0,69)	-0,25 (0,41)	3,34 (0,23)	-1,7 (3,3)	4,5 (3,4)	31,9 (4,5)
GA/TC	-0,28 (0,46)	0,09 (0,70)	3,37 (0,26)	-1,5 (3,8)	1,9 (5,3)	36,3 (4,4)
AC/GT	0,13 (0,59)	-0,58 (0,41)	3,36 (0,23)	-0,1 (3,1)	0,7 (3,9)	31,5 (4,2)
CA/TG	0,09 (0,55)	0,53 (0,89)	3,33 (0,26)	0,5 (3,7)	4,7 (5,1)	37,3 (6,5)
Середнє*	0,00 (0,64)	-0,09 (0,69)	3,36 (0,25)	0,00 (3,6)	2,7 (5,2)	34,2 (5,5)

Для кожного параметра представлено середні значення та стандартні відхилення (у дужках) (за Olson et al., 2001).

*Середні значення є зваженими на загальну кількість контактів кожного типу в базі даних.

Значне абсолютне значення рола (а іноді й тилта) на даному кроці зумовлює локальний вигин подвійної спіралі (вигнутий стан є рівноважним, тобто енергетично вигідним для такого контакту). Якщо динуклеотидні кроки, де реалізується значний ненульовий рол, узгоджені "за фазою" вздовж спіралі, це може зумовити суттєвий перманентний (так званий внутрішній) вигин деякої ділянки ДНК (рис. 1.20) – саме така вигнута конформація буде мати місце в розчині, що можна зафіксувати за зниженням рухливості ДНК під час гель-електрофорезу.

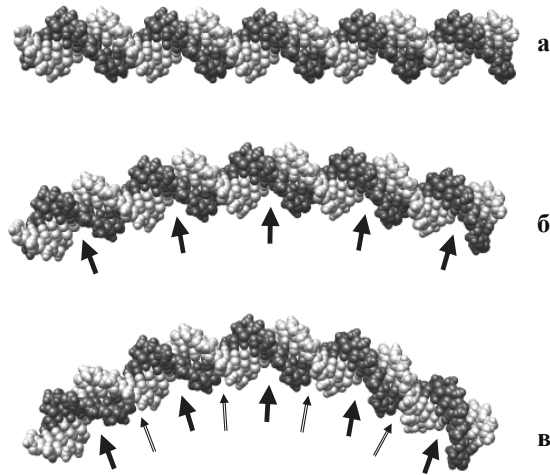


Рис. 1.20. Три фрагменти ДНК однакової довжини з нульовим тилтом на кожному динуклеотидному кроці: прямий (*a*, значення рола скрізь дорівнює нулю) та два вигнутих. У складі фрагмента *б* реалізується позитивний рол (вигин у великий жолобок) на п'яти динуклеотидних кроках, розділених цілим числом витків спіралі (позначено стрілками). У фрагменті *в* ці локальні вигини доповнюються вигинами у маленький жолобок (негативний рол), які між собою розділені цілим числом витків, а від будь-якої точки вигину у великий жолобок відстоять на ціле плюс $\frac{1}{2}$ число витків

Слід зауважити, що серед інших параметрів саме значення рола в білково-нуклеїнових комплексах, імовірно, найбільшим чином відхиляються від рівноважних значень цього кута для вільної ДНК у розчині (порівн. середні значення в табл. 1.1 і 1.3) унаслідок деформацій подвійної спіралі при взаємодіях із білками.

У табл. 1.3 наведено також стандартні відхилення конформаційних параметрів, які показують, наскільки легко значення параметра може відхилитися від переважного середнього значення, тобто стандартні відхилення є мірою *конформаційної рухливості* контакту даного типу (рис. 1.21). Серед шести конформаційних параметрів два – твіст і рол – найбільшою мірою (іншими словами – з найменшими енергетичними витратами) здатні відхилитися від своїх рівноважних значень. Таке відхилення відповідає двом головним типам деформації подвійної спіралі – торсійне закручування / розкручування (зміна твіста) і вигин (зміна рола). При цьому подвійна спіраль характеризується *анізотропією щодо вигину* – переважний внесок саме рола, а не тилта, у вигин ДНК приводить до того, що подвійна спіраль значно легше вигинається в бік жолобків, ніж у бік цукрофосфатного остова (що є цілком зрозумілим інтуїтивно).

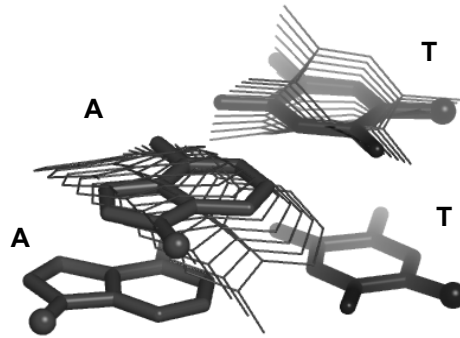


Рис. 1.21. Конформаційна рухливість динуклеотидного кроку AA/TT: рівноважна конформація кроку (товстіші зв'язки) і можливі відхилення від неї (показано рухи однієї пари основ відносно іншої). Кульками позначено C1'-атоми. (За Olson *et al.*, 1998)

Конформаційна рухливість (ширина розподілу всіх конформаційних параметрів за винятком райза) залежить від типу контакту. При цьому параметри не є незалежними один від одного – їхні зміни взаємно пов'язані. Так, однією з найчіткіших кореляцій є негативна кореляція між твістом і ролом: підвищення одного кута зазвичай супроводжується зниженням іншого, інакше кажучи, вигин у великий жолобок часто супроводжується розкручуванням спіралі, а вигин у маленький – закручуванням. Характер самої цієї кореляції також залежить від послідовності: деякі контакти (CA/TG, AG/CT, GG/CC) легше змінюють твіст, ніж рол, а деякі (TA, AA/TT, GA/TC) – навпаки. Позитивно скорельовані між собою тилт і шифт: тісний контакт між парами основ при вигині в бік цукрофосфатного остова зумовлює зсув однієї пари основ щодо іншої. Приклад складнішої кореляції – між ролом і слайдом – показано на рис. 1.22. На цьому рисунку зображено доступні сегменти конформаційного простору (на перетині 6-вимірного простору площиною слайд-рол) для всіх 10 контактів.

Загалом здатність динуклеотидного контакту до конформаційних змін залежить від ефективності стекинг-взаємодій між даними парами основ, кількості водневих зв'язків у парах і типу екзоциклічних груп у жолобках. Усе це визначає доступний конформаційний простір та енергію, яку необхідно витратити на деформацію. Загалом спостерігається така тенденція: піримідин-пуринові (YR) динуклеотидні кроки є найбільш конформаційно рухливими, пурин-піримідинові (RY) – найменш, кроки RR/YY перебувають у проміжному положенні. Серед кроків одного класу рухливішими є кроки, збагачені на АТ-пари: скажімо, для YR-контактів рухливість щодо твіста й рола знижується в ряду TA > CA/TG > CG.

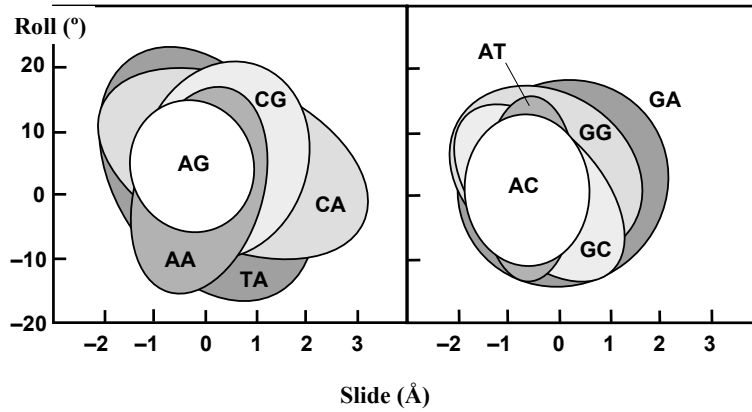


Рис. 1.22. Усередині еліпсів – доступні для кожного з 10 контактів значення двох конформаційних параметрів ДНК для кристалів білково-нуклеїнових комплексів. (за Olson *et al.*, 1998)

Характер залежності конформації ДНК від послідовності є насправді більш складним: конформаційні особливості визначаються не тільки найближчими сусідами – типом контакту між парами основ, але певною мірою і контекстом послідовності, де даний контакт розташований. Отже, на сьогодні неможливо точно передбачити деталі структури ДНК, виходячи з її послідовності. Залежні від послідовності особливості структури подвійної спіралі та потенціал щодо конформаційних змін – основа механізму специфічного впізнання послідовностей ДНК білками (розділ 7).

ЗАДАЧІ

1.1. Користуючись даними табл. 1.3 і визначеннями конформаційних параметрів у підпідрозд. 1.2.2, запишіть послідовно середні значення кутів рола та тилта для фрагмента ДНК GAACCTACCG.

1.2. Користуючись даними табл. 1.3, створіть послідовність пар основ, яка повинна мати суттєвий перманентний вигин приблизно в одній площині.

1.3. Нехай частка GC-пар у випадковій послідовності ДНК дорівнює f . Знайдіть загальний вигляд виразів для розрахунку: (а) частки кожного з чотирьох нуклеотидів; (б) частки (імовірності) кожного з 16 динуклеотидів для окремих полінуклеотидних ланцюгів; (в) імовірності кожного з 10 динуклеотидних контактів у подвійній спіралі.

1.4. Використовуючи логіку розв'язання попередньої задачі, знайдіть, чому дорівнює ймовірність зустріти в подвійній спіралі випадкової послідовності фрагменти NGATCN, YGATCR, GGATCC, GGTGG.

1.5. На сайті PDB (див. посилання у Вступі) завантажте структуру, наприклад, додекамера Дікерсона (код 355D, файл 355d.pdb). Відкрийте файл з розширенням .pdb у текстовому редакторі, щоб зрозуміти основні принципи його будови. Відкрийте цей файл у будь-якій програмі для візуалізації pdb-файлів (існує велика кількість таких загальнодоступних програм, дві з них згадуються у Вступі). Уважно роздивіться структуру, створіть кілька зображень у різних проекціях і форматах.

1.6. Установіть на свій комп'ютер програмний пакет 3DNA (посилання у Вступі), ознайомтеся з інструкціями до пакету. Проаналізуйте pdb-файл із попередньої задачі – отримайте конформаційні параметри для кожного динуклеотидного кроку фрагмента ДНК. Створіть графіки залежності шести параметрів від позиції вздовж фрагмента та проаналізуйте їх (які параметри варіюють більше, які менше, де спостерігаються найбільші вигини й закручення подвійної спіралі тощо).

1.7. Знайдіть в Інтернеті базу даних структур нуклеїнових кислот (NDB – Nucleic Acid Database, <http://ndbserver.rutgers.edu/>). Ознайомтеся з нею, роздивіться кілька структур, проаналізуйте їх за допомогою пакета 3DNA.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Загальна

Arnott, S. The geometry of nucleic acids / S. Arnott // Prog. Biophys. Mol. Biol. – 1970. – Vol. 21. – P. 265–319.

Calladine, C. R. Understanding DNA / C. R. Calladine, H. R. Drew, B. Luisi [et al.]. – London : Academic Press, 2004.

Dickerson, R. E. DNA structure from A to Z / R. E. Dickerson // Methods Enzymol. – 1992. – Vol. 211. – P. 67–111.

Ghosh, A. A glossary of DNA structures from A to Z / A. Ghosh, M. Bansal // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. – 2003. – Vol. 59. – P. 620–626.

Topics in nucleic acid structure / ed. S. Neidle. – London : Macmillan Press, 1982.

Компоненти нуклеїнових кислот, їхня конформація, спарювання та стекінг азотистих основ

Altona, C. Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides. A new description using the concept of pseudorotation / C. Altona, M. Sundaralingam // J. Amer. Chem. Soc. – 1972. – Vol. 94. – P. 8205–8212.

Gould, I. R. Theoretical investigation of the hydrogen bond strengths in guanine-cytosine and adenine-thymine base pairs / I. R. Gould, P. A. Kollman // J. Amer. Chem. Soc. – 1994. – Vol. 116. – P. 2493–2499.

Harvey, S. C. Ribose puckering: structure, dynamics, energetics, and the pseudorotation cycle / S. C. Harvey, M. Prabhakaran // J. Amer. Chem. Soc. – 1986. – Vol. 108. – P. 6128–6136.

Jeffrey, G. A. Hydrogen bonding in biological structures / G. A. Jeffrey, W. Saenger. – Berlin : Springer, 1991.

Packer, M. J. Sequence-dependent DNA structure: the role of the sugar-phosphate backbone / M. J. Packer, C. A. Hunter // J. Mol. Biol. – 1998. – Vol. 280. – P. 407–420.

Schneider, B. Conformations of the sugar-phosphate backbone in helical DNA crystal structures / B. Schneider, S. Neidle, H. M. Berman // Biopolymers. – 1997. – Vol. 42. – P. 113–124.

Šponer, J. Electronic properties, hydrogen bonding, stacking, and cation binding of DNA and RNA bases / J. Šponer, J. Leszczynski, P. Hobza // Biopolymers. – 2001. – Vol. 61. – P. 3–31.

Sundaralingam, M. Stereochemistry of nucleic acids and their constituents. IV. Allowed and preferred conformations of nucleosides, nucleoside mono-, di-, tri-, tetraphosphates, nucleic acids and polynucleotides / M. Sundaralingam // Biopolymers. – 1969. – Vol. 7. – P. 821–860.

Конформаційні параметри подвійної спіралі

Babcock, M. S. Nucleic acid structure analysis. Mathematics for local Cartesian and helical structure parameters that are truly comparable between structures / M. S. Babcock, E. P. D. Pednault, W. K. Olson // J. Mol. Biol. – 1994. – Vol. 237. – P. 125–156.

Dickerson, R. E. Definition and nomenclature of nucleic acid structure parameters, "The Cambridge Accord" / R. E. Dickerson, M. Bansal, C. R. Calladine [et al.] // EMBO J. – 1988. – Vol. 8. – P. 1–4.

El Hassan M. A. The assessment of the geometry of dinucleotide steps in double-helical DNA; a new local calculation scheme / M. A. el Hassan, C. R. Calladine // J. Mol. Biol. – 1995. – Vol. 251. – P. 648–664.

Olson, W. K. A standard reference frame for the description of nucleic acid base-pair geometry / W. K. Olson, M. Bansal, S. K. Burley [et al.] // J. Mol. Biol. – 2001. – Vol. 313. – P. 229–237.

Розрахунок конформаційних параметрів

Lavery, R. The definition of generalized helicoidal parameters and of axis curvature for irregular nucleic acids / R. Lavery, H. Sklenar // J. Biomol. Struct. Dynamics. – 1988. – Vol. 6. – P. 63–91.

Lavery, R. Defining the structure of irregular nucleic acids: conventions and principles / R. Lavery, H. Sklenar // J. Biomol. Struct. Dynamics. – 1989. – Vol. 6. – P. 655–667.

Lu, X. -J. Structure and conformation of helical nucleic acids: analysis program (SCHNAaP) / X. -J. Lu, M. A. el Hassan, C. A. Hunter // J. Mol. Biol. – 1997. Vol. 273. – P. 668–680.

Lu, X. -J. Structure and conformation of helical nucleic acids: rebuilding program (SCHNArP) / X. -J. Lu, M. A. el Hassan, C. A. Hunter // J. Mol. Biol. – 1997. Vol. 273. – P. 681–691.

Lu, X. -J. 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures / X. -J. Lu, W. K. Olson // Nucl. Acids Res. – 2003. – Vol. 31. – P. 5108–5121.

A- і B-структурні форми ДНК

Berman, H. M. Crystal studies of B-DNA: The answers and the questions / H. M. Berman // Biopolymers. – 1997. – Vol. 44. – P. 23–44.

Calladine, C. R. A base centered explanation of the B- to A-transition in DNA / C. R. Calladine, H. R. Drew // J. Mol. Biol. – 1984. – Vol. 178. – P. 773–781.

Campos, J. L. Overview of the structure of all-AT oligonucleotides: organization in helices and packing interactions / J. L. Campos, N. Valls, L. Urpi [et al.] // *Biophysical J.* – 2006. – Vol. 91. – P. 892–903.

Drew, H. R. Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics / H. R. Drew, R. M. Wing, T. Takano [et al.] // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1981. – Vol. 78. – P. 2179–2183.

Egli, M. X-ray crystallographic analysis of the hydration of A- and B-form DNA at atomic resolution / M. Egli, V. Tereshko, M. Teplova [et al.] // *Biopolymers.* – 1998. – Vol. 48. – P. 234–252.

Ivanov, V. I. The B to A transition of DNA in solution / V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, E. E. Minyat [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1974. – Vol. 87. – P. 817–833.

Ng, H. -L. DNA structure from A to B / H. -L. Ng, R. E. Dickerson // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98. – P. 6986–6989.

Vargason, J. M. A crystallographic map of the transition from B-DNA to A-DNA / J. M. Vargason, K. Henderson, P. S. Ho // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2001. – vol. 98. – P. 7265–7270.

Wahl, M. C. Crystal structures of A-DNA duplexes / M. C. Wahl, M. Sundaralingam // *Biopolymers.* – 1997. – Vol. 44. – P. 45–63.

Yanagi, K. Analysis of local helix geometry in three B-DNA decamers and eight dodecamers / K. Yanagi, G. G. Prive, R. E. Dickerson // *J. Mol. Biol.* – 1991. – Vol. 217. – P. 201–214.

Z-форма

Behe, M. Effects of methylation on a synthetic polynucleotide: The B–Z transition in poly(dG–m5dC):poly(dG–m5dC) / M. Behe, G. Felsenfeld // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1981. – Vol. 78. – P. 1619–1623.

Jovin, T. M. The transition between B-DNA and Z-DNA / T. M. Jovin, D. M. Soumpasis // *Ann. Rev. Phys. Chem.* – 1987. – Vol. 38. – P. 521–560.

Egli, M. Structure of the pure-spermine form of Z-DNA (magnesium free) at 1-Å resolution / M. Egli, L. D. Williams, Q. Gao [et al.] // *Biochemistry.* – 1991. Vol. 30. – P. 11388–11402.

Pohl, F. M. Salt-induced co-operative conformational change of a synthetic DNA: equilibrium and kinetic studies with poly (dG–dC) / F. M. Pohl, T. M. Jovin // *J. Mol. Biol.* – 1972. – Vol. 67. – P. 375–396.

Rich, A. The chemistry and biology of left-handed Z-DNA / A. Rich, A. Nordheim, A. H. -J. Wang // *Ann. Rev. Biochem.* – 1984. – Vol. 53. – P. 791–846.

Rich, A. Timeline: Z-DNA: the long road to biological function / A. Rich, S. Zhang // *Nature Rev. Genet.* – 2003. – Vol. 4. – P. 566–572.

Wang, A. H. -J. Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution / A. H. -J. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak [et al.] // *Nature.* – 1979. – Vol. 282. – P. 680–686.

Ha, S. C. Crystal structure of a junction between B-DNA and Z-DNA reveals two extruded bases / S. C. Ha, K. Lowenhaupt, A. Rich [et al.] // *Nature.* – 2005. – Vol. 437. – P. 1183–1186.

Неканонічні форми ДНК

Burge, S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure / S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2006. Vol. 34. – P. 5402–5415.

Fox, K. R. An extra dimension in nucleic acid sequence recognition / K. R. Fox, T. Brown // *Quart. Rev. Biophys.* – 2005. – Vol. 38. – P. 311–320.

Lilley, D. M. J. Structures of helical junctions in nucleic acids / D. M. J. Lilley // *Quart. Rev. Biophys.* – 2000. – Vol. 33. P. 109–159.

Mirkin, S. M. H-DNA and related structures / S. M. Mirkin, M. D. Frank-Kamenetskii // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 1994. – Vol. 23. – P. 541–576.

Williamson, J. R. G-quartet structures in telomeric DNA / S. M. Mirkin // *Ann. Rev. Biophys.* – 1994. – Vol. 23. – P. 703–730.

Структурний поліморфізм В-ДНК

Anderson, P. Supercoiling in closed circular DNA: dependence upon ion type and concentration / P. Anderson, W. Bauer // *Biochemistry.* – 1978. – Vol. 17. – P. 594–601.

Calladine, C. R. Mechanics of sequence-dependent stacking of bases in B-DNA / C. R. Calladine // *J. Mol. Biol.* – 1982. – Vol. 161. – P. 343–352.

Calladine, C. R. The principles of sequence-dependent flexure of DNA / C. R. Calladine, H. R. Drew // *J. Mol. Boil.* – 1986. – Vol. 192. – P. 907–918.

Crothers, D. M. Intrinsically bent DNA / D. M. Crothers, T. E. Haran, J. G. Nadeau / D. M. Crothers // *J. Biol. Chem.* – 1990. – Vol. 265. – P. 7093–7096.

Depew, R. E. Conformational fluctuations of DNA helix / R. E. Depew, J. C. Wang // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1975. – Vol. 72. – P. 4275–4279.

El Hassan, M. A. Propeller-twisting of base-pairs and the conformational mobility of dinucleotide steps in DNA / M. A. el Hassan, C. R. Calladine // *J. Mol. Biol.* – 1996. – Vol. 259. – P. 95–103.

El Hassan, M. A. Conformational characteristics of DNA: empirical classifications and a hypothesis for the conformational behaviour of dinucleotide steps / M. A. el Hassan, C. R. Calladine // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* – 1997. – Vol. 355. P. 43–100.

Gorin, A. B-DNA twisting correlates with base-pair morphology / A. Gorin, V. B. Zhurkin, W. K. Olson // *J. Mol. Biol.* – 1995. – Vol. 247. – P. 34–48.

Goodsell, D. S. Bending and curvature calculations in B-DNA / Goodsell, D. S., R. E. Dickerson // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – Vol. 22. – P. 5497–5503.

Hunter, C. A. Sequence dependent DNA structure; the role of base stacking interactions / C. A. Hunter // *J. Mol. Biol.* – 1993. – Vol. 230. – P. 1–30.

Marini, J. C. Bent helical structure in kinetoplast DNA / J. C. Marini, S. D. Levene, D. M. Crothers [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1982. – Vol. 79. – P. 7664–7668.

Olson, W. K. DNA sequence-dependent deformability deduced from protein-DNA crystal complexes / W. K. Olson, A.A. Gorin, X. -J. Lu [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1998. – Vol. 95. – P. 11163–11168.

Olson, W. K. Modeling DNA deformations / W. K. Olson, V. B. Zhurkin // *Curr. Op. Struct. Biol.* – 2000. – Vol. 10. – P. 286–297.

Pulleyblank, D. E. Action of nicking-closing enzyme on supercoiled and non-supercoiled closed circular DNA: formation of a Boltzmann distribution of topological isomers / D. E. Pulleyblank, M. Shure, D. Tang [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1975. – Vol. 72. – P. 4280–4284.

Wang, J. C. Helical repeat of DNA in solution / J. C. Wang // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1979. – Vol. 76. – P. 200–203.

Розділ 2

СТАБІЛЬНІСТЬ І СТРУКТУРНІ ПЕРЕБУДОВИ ПОДВІЙНОЇ СПІРАЛІ

Подвійна спіраль ДНК є, по суті, міжмолекулярним комплексом двох полі-нуклеотидних ланцюгів, який стабілізується нековалентними взаємодіями. Тимчасове розходження ланцюгів – необхідна умова здійснення найважливіших процесів за участю ДНК – транскрипції та реплікації. У цьому розділі розглядаються фізичні механізми стабілізації дуплекса й особливості процесу його руйнування/відновлення (тобто де- і ренатурації) та переходів між різними структурними формами ДНК. Перший підрозділ присвячено загальному огляду міжмолекулярних взаємодій, а також основам термодинаміки та статистичної фізики, які є необхідними для розуміння питань, що розглядатимуться далі як в цьому, так і в інших розділах книги.

2.1. ЕНЕРГЕТИКА І КЛАСИФІКАЦІЯ МІЖМОЛЕКУЛЯРНИХ ВЗАЄМОДІЙ

2.1.1. Вільна енергія

Розглянемо приклад внутрішньомолекулярної рівноваги у спрощеній моделі полімерного ланцюга: мономерні елементи, зображені як кульки на рис. 2.1, з'єднані гнучкими перемичками. Нехай мономери при цьому є інертними – не здатними до взаємодій між собою. Унаслідок теплового руху ланцюг буде постійно змінювати свою конформацію, тобто буде реалізована так звана форма неупорядкованого клубка. На рис. 2.1 цей стан неупорядкованого клубка зображено як стан 1 ліворуч (представлено кілька з великого числа W_1 можливих конформацій ланцюга). Певний компактний стан 2 (праворуч) може бути реалізований значно меншою кількістю W_2 конформацій. Відношення ймовірності f_2 знайти ланцюг у стані 2 до ймовірності f_1 стану 1 (константа рівноваги K між станами 2 і 1), очевидно, визначається відношенням кількості відповідних конформацій:

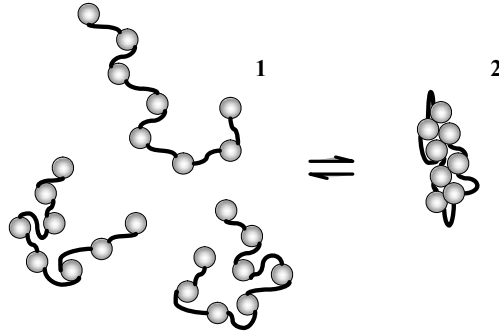


Рис. 2.1. Клубок (1) і компактний стан (2) полімерного ланцюга

$$K = \frac{f_2}{f_1} = \frac{W_2}{W_1}$$

Оскільки $W_2 \ll W_1$, рівновага зсунута ліворуч – у бік клубка. Отже, за інших однакових умов, імовірність знайти будь-яку систему в певному стані визначається кількістю мікростанів (конфігурацій системи), якими цей стан реалізується. Чим більшою є ця кількість (у нашому прикладі W_1 і W_2), тим менш упорядкованим є даний стан системи: зрозуміло, що ступінь упорядкованості значно зростає для стану 2.

Нехай тепер мономери здатні взаємодіяти один із одним таким чином, що при утворенні контакту між ними в навколишнє середовище виділяється тепло (знижується внутрішня енергія нашої системи). Як відомо з термодинаміки, усі процеси, за інших однакових умов, відбуваються в напрямку виділення тепла. Імовірність певного стану системи визначається відношенням внутрішньої енергії E до міри середньої кінетичної енергії теплового руху $k_B T$ (k_B – константа Больцмана (Ludwig Boltzmann), T – абсолютна температура; середня кінетична енергія руху частинки у тривимірному просторі дорівнює $3/2 k_B T$). А саме, імовірність є пропорційною величині $\exp(-E/k_B T)$: зниження внутрішньої енергії відповідає експоненціальному зростанню імовірності (принцип Больцмана). Якщо зниження внутрішньої енергії при компактизації ланцюга значне, то це може змінити конформаційну рівновагу на користь стану 2. Таким чином, для більш загального випадку маємо тепер записати:

$$K = \frac{f_2}{f_1} = \frac{W_2 \exp(-E_2 / k_B T)}{W_1 \exp(-E_1 / k_B T)}$$

або, позначивши

$$S = k_B \ln W \quad (2.1)$$

і

$$G = E - TS, \quad (2.2)$$

маємо для константи рівноваги:

$$K = \frac{f_2}{f_1} = \frac{\exp\left(-\frac{E_2 - TS_2}{k_B T}\right)}{\exp\left(-\frac{E_1 - TS_1}{k_B T}\right)} = \frac{\exp\left(-\frac{G_2}{k_B T}\right)}{\exp\left(-\frac{G_1}{k_B T}\right)} = \exp\left(-\frac{\Delta G}{k_B T}\right) \quad (2.3)$$

де

$$\Delta G = G_2 - G_1.$$

Отримане співвідношення має універсальне значення і є узагальненням принципу Больцмана для випадку, коли треба враховувати кількість мікростанів. У рівн. (2.1)–(2.3) величина S , що залежить від цієї кількості, є мірою не-впорядкованості системи й називається *ентропією*. Величина G , яка визначається рівн. (2.2), називається *вільною енергією*. Саме від неї в загальному випадку залежить імовірність перебування системи в певному стані i , відповідно, напрямку, у якому відбувається той чи інший процес.

Визначена рівн. (2.2) термодинамічна функція точніше називається вільною енергією Гельмгольца (Hermann von Helmholtz). Внутрішня енергія E в цьому співвідношенні визначається енергією взаємодії між елементами системи, енергією взаємодії елементів системи з полями сил, кінетичною енергією руху елементів – усіма внесками, зміна яких приводить до виділення/поглинання тепла. Якщо об'єм V системи може змінюватись, і система здійснює роботу з розширення проти зовнішнього тиску p , термодинамічна функція, котра визначає імовірність певного стану системи, набуває ще одного додаткового члена й називається вільною енергією Гіббса (Josiah Willard Gibbs):

$$G = H - TS, \quad (2.4)$$

де $H = E + pV$ – *ентальпія*. Оскільки об'єм систем, які розглядаються в цій книзі, практично не змінюється (водні розчини, що моделюють умови в клітинах), надалі будемо вважати, що $H \equiv E$, і обидва визначення вільної енергії є еквівалентними.

Наступні твердження, які базуються на рівн. (2.1)–(2.4), виконуються для будь-яких систем:

- Зміна стану системи відбувається у напрямку зниження вільної енергії, або: процес може відбуватися спонтанно тільки тоді, коли він супроводжується зниженням вільної енергії.

- Рівноважний стан, що може бути стабільним скільки завгодно довго, відповідає мінімуму вільної енергії.

- Зміна вільної енергії залежить від двох внесків: зміна ентальпії (внутрішньої енергії), яка супроводжується виділенням/поглинанням тепла; зміна ентропії, що характеризує зростання впорядкованості/невпорядкованості в системі. При цьому величина ентропійного внеску зростає з температурою (рівн. (2.2); (2.4)), тобто за високих температур переважними завжди стають менш упорядковані стани.

Слід зробити також кілька інших важливих зауважень:

- Вільна енергія є величиною відносною: має сенс тільки *різниця* між вільними енергіями різних станів *тієї самої* системи.

- Різниця між вільними енергіями двох станів системи вказує тільки на напрямок перетворення одного стану на інший і *нічого* не говорить про те, наскільки швидко та яким шляхом буде відбуватися цей процес. Інакше кажучи, стан з меншою величиною вільної енергії неодмінно має бути реалізованим, однак може виявитися, що на це потрібен дуже тривалий час, а тому практично даний процес не спостерігається.

- Енергія взаємодії між елементами системи (атомами, молекулами) не обов'язково залежить тільки від ентальпійної складової, як у простому прикладі на рис. 2.1. Насправді вільна енергія взаємодій може мати суттєву ентропійну складову або навіть залежати тільки від ентропійних ефектів. Тоді ентропія в розглянутому на рис. 2.1 прикладі – це тільки конформаційна ентропія.

- Оскільки стабільному (рівноважному) стану відповідає мінімум вільної енергії, умову рівноваги за постійної температури, виходячи з рівн. (2.4), можна записати як

$$dG = dH - TdS = 0 \quad (2.5)$$

(нескінченно маленька зміна функції дорівнює нулю в точці мінімуму / максимуму), звідки обернена температура визначається як швидкість зростання ентропії (невпорядкованості) рівноважної системи при підвищенні ентальпії

$$\frac{dS}{dH} = \frac{1}{T}$$

(термін "швидкість" тут і в багатьох випадках далі не має жодного відношення до змін у часі, а використовується в математичному сенсі – як характеристика величини зміни тієї чи іншої функції при нескінченно маленькій зміні аргументу). При зростанні внутрішньої енергії кількість мікростанів системи зростає (чим вища енергія, тим більшою кількістю способів її можна розкласти по мікростанах) – температура є завжди позитивною величиною.

• Зміна вільної енергії рівноважного стану при зміні температури (виходячи знову з рівн. (2.4)) дорівнює

$$dG = dH - TdS - SdT,$$

звідки, ураховуючи умову рівноваги (2.5), ентропія зі зворотним знаком є швидкістю зміни вільної енергії по температурі

$$\frac{dG}{dT} = -S,$$

а

$$\frac{dH}{dT} = T \frac{dS}{dT}.$$

Величина

$$C_p = \frac{dH}{dT} = T \frac{dS}{dT} = \frac{dS}{d(\ln T)} \quad (2.6a)$$

називається *теплоємністю* (при постійному тиску, на що вказує індекс p). Теплоємність визначає швидкість зміни внутрішньої енергії за температурою (кількість тепла, що поглинається / виділяється при зростанні температури на 1 градус), яка є еквівалентною швидкості зміни ентропії за логарифмом температури. Відповідно до рівн. (2.6a), якщо в деякому процесі різниця теплоємностей між двома станами $\Delta C_p = 0$, то різниці ентальпій ΔH і ентропій ΔS між цими станами є константами, які не залежать від температури. Якщо ж ΔC_p є незалежною від температури ненульовою константою, ентальпія є лінійною функцією температури, а ентропія – логарифма температури. Тоді рівн. (2.6a) можна представити у вигляді:

$$\Delta H = \text{const} + \Delta C_p T = \Delta H_0 + \Delta C_p (T - T_0), \quad (2.6b)$$

$$\Delta S = \text{const} + \Delta C_p \ln T = \Delta S_0 + \Delta C_p \ln(T / T_0),$$

де ΔH_0 і ΔS_0 – різниці ентальпії та ентропії між двома станами за деякої референтної температури T_0 .

Сформульовані вище закономірності та співвідношення можуть бути використані для дослідження властивостей різноманітних систем. Зокрема, досить часто питання полягає в тому, як знайти рівноважний стан системи, що складається

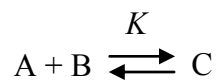
з N елементів, причому кожен із них може існувати в n мікростанах з різними значеннями вільної енергії. У такому випадку загальну вільну енергію системи слід записати таким чином:

$$G = N_1 G_1 + N_2 G_2 \dots + N_n G_n - k_B T \ln \frac{N!}{N_1! N_2! \dots N_n!},$$

де перші n доданків є просто сумою вільних енергій елементів системи (N_i елементів знаходяться у стані з енергією G_i), а останній член – неспецифічний ентропійний внесок у вільну енергію (внесок так званої *ентропії змішування*). Поява цього останнього внеску зумовлена тим, що кожній сумі перших доданків відповідає різна кількість варіантів розподілу N елементів по n класах (тобто способів реалізації даного стану системи): чим більше таких варіантів, тим вище ймовірність певного стану. Величина під логарифмом дорівнює кількості способів (у даному випадку еквівалентній W у рівн. (2.1)), яким можна розподілити N елементів по n класах із даною кількістю елементів у кожному класі. Процедура пошуку рівноважного стану системи зводиться до того, щоб знайти такі значення змінних N_i , які мінімізують вільну енергію. Саме такого типу процедура буде досить часто застосовуватись далі для опису різноманітних молекулярних і міжмолекулярних систем.

2.1.2. Рівновага утворення комплексів молекул у розчині

Перш ніж перейти до розгляду типів взаємодій між атомами та молекулами, розглянемо ще один простий приклад рівноваги – цього разу міжмолекулярної. Нехай у розчині певного об'єму є молекули двох типів (A і B), які здатні утворити між собою комплекс C:



(літерою K тут знову позначена константа рівноваги, у цьому випадку – для процесу утворення / дисоціації комплексів).

Ентропійна частина вільної енергії кожного компонента містить складову, що залежить від концентрації. Наприклад, вільну енергію G_A одного моля компонента A (тут ідеться про *кількість* речовини, а не про її *концентрацію*) можна записати як

$$G_A = G_A^0 + RT \ln[A], \quad (2.7)$$

де G_A^0 – стандартна вільна енергія; R – універсальна газова стала, котра є константою Больцмана в перерахунку на моль речовини: $R = k_B N_{AV}$, N_{AV} – число Авогадро (Amedeo Avogadro); квадратними дужками позначена молярна концентрація А. Вільну енергію G_A називають також *хімічним потенціалом*. Зміст рівн. (2.7) дуже простий: G_A^0 є вільною енергією 1 моля компонента А при його концентарції 1 М (1 моль/л). Зростання концентрації приводить до зниження ентропії: йдеться знову про ентропію змішування – чим більше молекул на одиницю об'єму (заповненого розчинником), тим менше доступних місць розташування для кожної з цих молекул. Інакше кажучи, тим меншою є кількість мікростанів (порівн. з визначенням ентропії в попередньому підпідрозділі) і, відповідно, тим вище вільна енергія. Стандартна вільна енергія містить усі внески (ентальпійні та ентропійні), незалежні від концентрації: кінетичну енергію руху молекул, внутрішню енергію взаємодії атомів у молекулі, енергію взаємодії молекул з розчинником тощо. Записавши аналогічні вирази для компонентів В і С, знайдемо різницю $\Delta G = G_C - G_A - G_B$ між вільними енергіями одного моля С й сумою енергій вільних компонентів (по одному молю кожного) для будь-яких концентрацій:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C]}{[A][B]}, \quad (2.8)$$

де ΔG^0 – різниця між відповідними стандартними вільними енергіями, [А] і [В] – концентрації *вільних* компонентів у дисоційованому стані. Процес зміни концентрацій у системі буде продовжуватись до моменту досягнення рівноваги – такого співвідношення між концентраціями, коли вільна енергія комплексу дорівнюватиме сумарній енергії вільних компонентів А і В, тобто виконається умова $\Delta G = 0$. (Можна показати, що *загальна вільна енергія розчину* буде мінімальною, коли ця умова виконується.) Оскільки ΔG^0 – константа, яка залежить від природи компонентів (ця величина, власне, визначається в основному енергією взаємодій між А і В у складі комплексу), співвідношення концентрацій під логарифмом у рівн. (2.8) також є константним за рівноважних умов. Саме це співвідношення і є в даному прикладі константою рівноваги, яка залежить тільки від різниці стандартних вільних енергій:

$$K = \frac{[C]}{[A][B]} = \exp\left(-\frac{\Delta G^0}{RT}\right). \quad (2.9)$$

Отже, якщо при утворенні комплексу вільна енергія знижується ($\Delta G^0 < 0$), це сприяє взаємодії між компонентами. У випадку, що розглядається, константу K називають також *константою асоціації*, або *константою зв'язування* (обернена

величина – константа дисоціації), а величину ΔG^0 , відповідно, стандартною вільною енергією зв'язування. Обидві константні величини є мірою спорідненості компонентів, що утворюють комплекс: чим негативнішою є енергія зв'язування (чим більше енергетично вигідних взаємодій реалізується між компонентами), тим вище значення K , і тим стабільнішим є комплекс. Слід також зауважити, що ефективність утворення комплексу, під якою можна розуміти, наприклад, частку компонента А у складі комплексу $[C]/([C] + [A])$, залежить від концентрацій компонентів. Рівняння (2.9) є однією з форм запису відомого закону діючих мас, або принципу Ле Шательє (Henry Le Chatelier), згідно з яким додавання в систему одного з компонентів зсуває рівновагу в протилежний бік.

2.1.3. Взаємодії Ван дер Ваальса

Одним із типів нековалентних взаємодій, які відповідають за утворення комплексів між двома молекулами, є взаємодії Ван дер Ваальса (Johannes Van der Waals). Розподіл електронної щільності в межах навіть неполяризованої молекули рівномірний лише в середньому. У кожний момент часу внаслідок флуктуацій щільності виникають локальні неоднорідності, тобто парціальні заряди різного знаку, і молекула являє собою тимчасовий диполь. При наближенні іншої молекули такий тимчасовий диполь першої молекули індукує диполь у межах другої молекули й виникає притягання електричної природи. Квантова механіка свідчить, що енергія пари молекул, електронні системи яких поляризовані, є нижчою за енергію пари неполяризованих молекул. У результаті всі молекули та атоми на близьких відстанях притягуються один до одного.

Вандерваальсові взаємодії між неполяризованими молекулами називають *дисперсійними*, або взаємодіями Лондона (Fritz London). Такі взаємодії, які реалізуються між будь-якими молекулами та атомами незалежно від їхньої природи, є короткодійними: енергія взаємодій швидко знижується з відстанню r між молекулами чи атомами (пропорційно $1/r^6$). Практично, вандерваальсові взаємодії є суттєвими при безпосередньому контакті між молекулами (атомами, хімічними групами). Слід також зауважити, що під енергією взаємодії в даному разі слід розуміти саме внутрішню енергію.

Слова "безпосередній контакт" означають, що існує певна оптимальна величина r_0 – відстань, на якій енергія взаємодій є мінімальною. При подальшому зниженні r притягання між молекулами змінюється відштовхуванням: електронні оболонки різних молекул (уже насичені валентними електронами) не можуть проникати одна в одну (відповідно до принципу заборони Паулі (Wolfgang Pauli), на одній орбіталі не може бути розташовано більше двох електронів). Величина r_0 характеризує розмір кожного атома (вандерваальсів радіус), який використову-

ється при будіванні молекулярних моделей. Усе сказане ілюструє так званий потенціал Леннард-Джонса (John Lennard-Jones) – формула, що описує енергію лондонівських взаємодій (графічно представлена на рис. 2.2):

$$E = E_0 \left[\left(r_m / r \right)^{12} - \left(r_m / r \right)^6 \right].$$

Перший член у квадратних дужках (у 12 степені) приблизно описує відштовхування на надто близьких відстанях (зниження відстані r призводить до різкого зростання енергії), другий член з негативним знаком – притягання (зниження r призводить до зниження енергії). На відстані r_m енергія дорівнює нулю, на відстані r_0 є мінімальною (рис. 2.2).

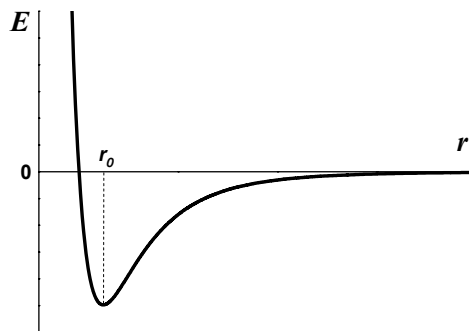


Рис. 2.2. Потенціал Леннард-Джонса – залежність енергії дисперсійних взаємодій між двома атомами від відстані між ними

Взаємна непроникність атомів (стеричні обмеження) має велике значення для структури біополімерів: серед великої кількості конформацій можливі лише ті, для яких не спостерігається проникнення однієї частини ланцюга в іншу (два атоми не можуть займати одну область простору).

Іншими двома типами вандерваальсових взаємодій є взаємодії між двома поляризованими молекулами (постійними диполями) – *орієнтаційні* (або диполь-дипольні), які дещо ефективніші (залежать від $1/r^3$), і взаємодії між неполяризованою молекулою та постійним диполем – *індукційні* (або взаємодії типу диполь-індукований диполь, залежать від $1/r^6$).

Вандерваальсові взаємодії є найслабшими серед усіх нековалентних взаємодій. Для порівняння: величина RT при 27 °С становить 0,6 ккал/моль; типові значення енергії вандерваальсових взаємодій (на відстані r_0) варіюють у межах 0,1–0,5 ккал/моль. Проте для макромолекул, в яких (або між якими) реалізується велика кількість міжатомних контактів, вандерваальсові взаємодії стають суттєвим фактором стабілізації структури.

2.1.4. Електростатичні (іонні) взаємодії

Певні хімічні групи в біологічних макромолекулах здатні іонізуватися – набувати постійного негативного чи позитивного заряду, втрачаючи чи захоплюючи протон. Взаємодія між такими зарядами підпорядковується добре відомому закону Кулона (Charles de Coulomb), а саме: вільна енергія взаємодії двох зарядів q_1 і q_2 залежить від відстані між зарядами r як

$$G = \frac{q_1 q_2}{\epsilon r}, \quad (2.10)$$

де ϵ – діелектрична проникність середовища, яка характеризує його полярність. Поляризованість молекул води (кожна молекула є постійним диполем, див. підпдрозд. 2.1.5) приводить до досить великого значення проникності ($\epsilon \approx 80$ за кімнатних температур).

Висока діелектрична проникність води свідчить про те, що електростатичні взаємодії в ній пов'язані насамперед з упорядкованістю диполів води навкруг зарядів і зміною цієї впорядкованості при наближенні чи віддаленні зарядів. Іншими словами, електростатичні взаємодії мають ентропійну природу – при наближенні (взаємній нейтралізації) різнойменних зарядів ступінь упорядкованості диполів води знижується і, відповідно, зростає ентропія та знижується вільна енергія.

Найвагоміші електростатичні взаємодії для макромолекул, на поверхні яких сконцентрована велика кількість заряджених груп, тобто передусім для нуклеїнових кислот. Про електростатику ДНК, ключовим моментом якої є взаємодія фосфатних залишків із неорганічними іонами протилежного знаку, ітиметься в наступному розділі.

2.1.5. Водневий зв'язок

Розглянемо дві молекули води (рис. 2.3). Через високу електронегативність оксигену (здатність відтягувати на себе електронну щільність) молекула води є поляризованою, тобто на її атомах присутні парціальні електричні заряди (приблизно – $2/3$ заряду електрона на оксигені, $+1/3$ на кожному гідрогені). Відповідно, дві молекули будуть взаємодіяти одна з одною електростатично. Але тут є ще дві важливі обставини: 1) атом гідрогену має лише один електрон, який відтягнутий на оксиген у молекулі води; 2) атом оксигену містить на зовнішньому шарі дві неподілені пари електронів, які не залучені до утворення ковалентного зв'язку. У результаті "слабка" електронна оболонка гідрогену "продавлюється" атомом оксигену другої молекули; його неподілена пара електронів частково узагальнюється з гідрогеном, електрон якого відтягнутий "власним" оксигеном. Взаємодія такого типу

називається водневим зв'язком, який являє собою дещо середнє між електростатичною взаємодією (притягання парціальних зарядів) і ковалентним зв'язком (часткове узагальнення пари електронів між двома атомами). Іншими словами, водневий зв'язок утворюється між атомом гідрогену, приєднаним до електронегативного атому з частковим негативним зарядом δ^- (ця група "віддає" протон і називається *донором* водневого зв'язку) і електронегативним атомом іншої хімічної групи та молекули (*акцептором*), який містить неподілену пару електронів:



Уздовж періоду в таблиці Менделєєва електронегативність зростає зліва направо: наприклад, у ряду $C < N < O < F$. Відповідно, у такому ж ряду зростає сила водневого зв'язку – група СН за певних умов (при наближенні до неї акцептора) може виступати донором водневого зв'язку, але значно слабшого, ніж хімічна група, у складі якої атом гідрогену приєднаний до більш електронегативного атому. Хоча в біополімерах взаємодії, які можна кваліфікувати як водневі зв'язки за участю груп СН, зустрічаються досить часто й можуть давати суттєвий внесок у стабілізацію просторової структури, далі в цій книзі під водневим зв'язком будемо розуміти міцний водневий зв'язок. Типові пари хімічних груп, що утворюють такі міцні водневі зв'язки в макромолекулах:

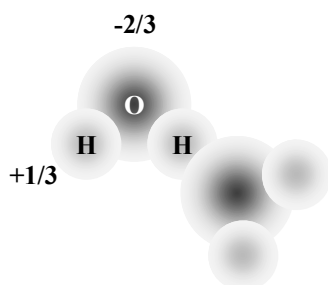


Рис. 2.3. Дві молекули води, зв'язані водневим зв'язком

Дві властивості водневого зв'язку є наслідком його природи:

1. Водневий зв'язок є дуже вигідним енергетично: його енергію (утворення водневого зв'язку супроводжується виділенням тепла, тобто він має ентальпійну природу) можна оцінити приблизно в 5 ккал/моль (порівн. з енергією теплового руху $RT = 0,6$ ккал/моль за кімнатної температури).

2. На відміну від електростатичних взаємодій, але так само, як ковалентний зв'язок, водневий зв'язок є чутливим до взаємної орієнтації донора та акцептора. Особливо це стосується напрямку донорної групи: ковалентний зв'язок D–H має бути спрямованим на акцепторний атом (іншими словами, водневий зв'язок продовжує напрям зв'язку D–H, припустиме відхилення в напрямі двох зв'язків становить 20–30°).

Друга властивість означає, що водневі зв'язки утворюються тільки тоді, коли між донорними та акцепторними групами є чітка просторова відповідність: саме вона лежить в основі комплементарного спарювання між ланцюгами ДНК. Узагалі, водневий зв'язок часто є найсуттєвішим фактором у визначенні специфічності міжмолекулярних взаємодій – міжмолекулярному впізнанні.

Перша властивість також потребує уточнень. Якщо взаємодія між донором і акцептором відбувається у водному середовищі, то рівн. (2.11) має бути переписане таким чином:



Як бачимо, кількість водневих зв'язків є однаковою ліворуч і праворуч (ентальпія системи не змінюється), різною може бути лише ентропія лівого та правого станів. Якщо донор і акцептор – маленькі молекули, то переважним буде лівий стан (велика кількість молекул води робить його менш упорядкованим): маленькі полярні молекули розчиняються у воді, оскільки добре з нею взаємодіють. Якщо донор і акцептор належать макромолекулі, переважним може стати (не обов'язково) правий стан: пара молекул води може вільніше рухатися, що збільшує ентропію системи. Отже, водневі зв'язки у водному середовищі мають ентропійну природу. Зрозуміло, що в неполярному середовищі (де немає конкуренції з водою) водневий зв'язок буде значно стабільнішим.

2.1.6. Гідрофобні взаємодії

Саме те, що молекули води міцно взаємодіють одна з одною за рахунок водневих зв'язків, і те, що ці зв'язки є можливими лише в разі певної взаємної орієнтації молекул води, зумовлює так званий гідрофобний ефект при зануренні у воду *неполярних* молекул. неполярність молекули означає, що вона не здатна утворювати водневі зв'язки. А молекули води не тільки здатні, а прагнуть обов'язково їх утворити (енергія зв'язку є високою, дуже невигідно його втратити). Єдиний вихід для молекул води – утворити зв'язки між собою. При цьому неполярна поверхня ство-

рює перешкоди: ОН-група верхньої молекули (рис. 2.4) "дивиться" на неполярну (гідрофобну) поверхню і не може бути задіяною в утворенні водневого зв'язку. Інакше кажучи, не всі орієнтації молекул води сумісні зі збереженням максимальної кількості водневих зв'язків. За збереження водневих зв'язків молекулам води доводиться платити зростанням упорядкованості – вони формують поблизу гідрофобної поверхні, як схематично показано на рис. 2.4, упорядкований кригоподібний кластер. Таким чином, за рахунок зниження ентропії занурення гідрофобної молекули у водне оточення є дуже не вигідним енергетично.

Якщо додати ще одну таку гідрофобну поверхню, у системи буде дуже простий вихід: злипання поверхонь супроводжується визволенням молекул води, тобто зростанням ентропії. Отже, гідрофобні взаємодії – наближення двох неполярних молекул з метою витіснити воду з інтерфейсу між ними – мають цілком ентропійну природу. Зрозуміло, що величина гідрофобного ефекту (енергетичний вигравш від визволення води) є пропорційною площі гідрофобної поверхні.

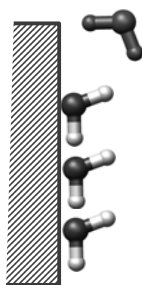


Рис. 2.4. Кластер молекул води біля гідрофобної поверхні. Верхня молекула займає не вигідну мало ймовірну орієнтацію відносно поверхні

Гідрофобний ефект суттєво залежить від температури – описаний вище механізм цілком справедливий лише для кімнатних температур. Найголовнішою енергетичною рисою гідрофобного ефекту є *значне підвищення теплоємності* при зануренні у воду неполярної молекули. Ця висока теплоємність пов'язана з утворенням кригоподібних упорядкованих кластерів, де між молекулами води утворюються міцні (та ентальпійно вигідні) водневі зв'язки. Зростання температури приводить до ефективного поглинання тепла – плавлення такого кластеру. Результатом високої теплоємності є різка залежність як ентальпії, так і ентропії гідрофобних взаємодій від температури (див. рівн. (2.6)). Типову залежність від температури зміни обох внесків у вільну енергію при перенесенні неполярної молекули у воду з неполярного розчинника зображено на рис. 2.5.

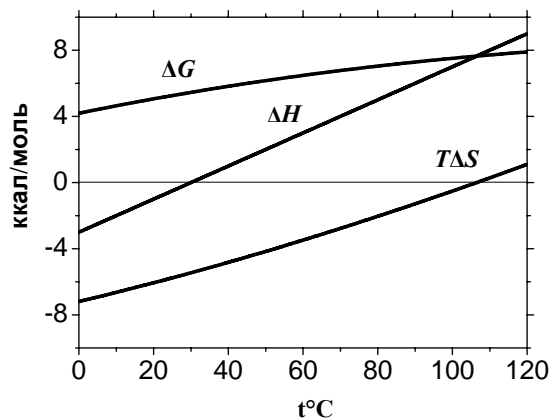


Рис. 2.5. Типова залежність від температури зміни вільної енергії та двох її компонентів при перенесенні неполярної молекули з неполярного розчинника у воду

За низьких температур ентальпія перенесення є негативною (утворення вигідних водневих зв'язків у кластері води), але також негативною (невигідною) є ентропія (зростання впорядкованості у кластері). У діапазоні кімнатних температур ентальпія перенесення близька до нуля (водневі зв'язки в кластері мало відрізняються від таких у рідкій воді поза кластером), і позитивне значення вільної енергії практично повністю зумовлене ентропійним внеском. За високих температур водневі зв'язки в кластері руйнуються (ентальпія перенесення стає позитивною), але й не вигідний ентропійний ефект знижується за абсолютною величиною – як у кластері, так і поза ним зростає рухливість молекул води. Загалом вільна енергія перенесення, хоча й не так різко, як її окремі складові, зростає з температурою (саме цим зростанням гідрофобного ефекту пояснюється добре відоме зниження розчинності у воді неполярних молекул газів при підвищенні температури). Отже, й ефективність гідрофобних взаємодій (на відміну від усіх інших нековалентних взаємодій) *підвищується* при зростанні температури (зрозуміло, що знаки всіх термодинамічних функцій на рис. 2.5 слід змінити на протилежні, щоб трактувати їх як енергетичні ефекти гідрофобних взаємодій).

2.2. ВЗАЄМОДІЇ, ЩО СТАБІЛІЗУЮТЬ ПОДВІЙНУ СПІРАЛЬ

2.2.1. Енергетичний баланс подвійної спіралі

Структурна інформація, представлена в розд. 1, указує, що є дві сили, які можуть стабілізувати подвійну спіраль: водневі зв'язки в комплементарних парах основ і стекінг-взаємодії між сусідніми парами основ. Щодо останніх зауважимо, що їхня фізична природа є досить складною. Зрозуміло, що є три компоненти, які дають внесок у загальну енергію стекінгу: 1) гідрофобний ефект від витіснення води з інтерфейсу між неполярними площинами пар основ; 2) дисперсійні взаємодії; 3) електростатичні взаємодії між парціальними зарядами, які мають місце внаслідок суттєвої неоднорідності електронної щільності в гетероциклах. Питання про відносний внесок усіх трьох факторів у загальну енергію стекінгу залишається дискусійним, проте важливість стекінг-взаємодій у стабілізації подвійної спіралі не підлягає сумніву.

Що ж стосується комплементарних водневих зв'язків, то їхня роль у стабілізації дуплекса здається очевидною лише на перший погляд. За даними квантово-хімічних розрахунків, які підтверджуються експериментальними даними, отриманими для азотистих основ у газовій фазі, енергія утворення комплементарних пар основ у *вакуумі* становить відповідно ~ -12 та -23 ккал/моль для АТ- і GC-пари. Проте такі високі значення енергії стабілізації можуть стосуватися тільки подвійної спіралі, що перебуває в особливих умовах (наприклад, в оточенні активного центру ДНК-полімерази, де відсутня вода): слід пам'ятати, що при руйнуванні подвійної спіралі у *водному розчині* групи азотистих основ, які були залучені до водневих зв'язків між собою, обов'язково утворюють практично такі самі зв'язки з молекулами води (див. рівн. (2.12)). З іншого боку, відсутність комплементарності між двома ланцюгами є несумісною з утворенням подвійної спіралі, і водневі зв'язки, таким чином, і у водному розчині мають бути дуже важливими для стабілізації дуплекса. Цей підрозділ присвячено, зокрема, з'ясуванню цього протиріччя.

Поряд із названими факторами існують ще дві сили, які вочевидь *протидіють* утворенню подвійної спіралі: 1) конформаційна ентропія, що знижується при формуванні більш жорсткої, порівняно з одноланцюговим станом, конструкції дуплекса; 2) електростатичне розштовхування між зарядженими фосфатними залишками, яке значно зростає при об'єднанні двох ланцюгів у єдину структуру. Отже, різницю вільних енергій між дво- та одноланцюговими станами ДНК можна записати як

$$\Delta G = \Delta G_{st} + \Delta G_{bp} + \Delta G_{el} - T\Delta S_{conf}, \quad (2.13)$$

де ΔG_{st} , ΔG_{bp} , ΔG_{el} – вільні енергії відповідно стекінгу, водневих зв'язків у парах основ і електростатичних взаємодій, ΔS_{conf} – конформаційна ентропія (зрозуміло, що інші три внески у вільну енергію можуть містити свої ентропійні компоненти). Перші два внески є негативними (стабілізуючими – принаймні, будемо так поки що вважати), два останні – позитивними (дестабілізуючими). Отже, загальна стабільність дуплекса (знак і абсолютна величина ΔG) визначається балансом стабілізуючих і дестабілізуючих факторів, які, у свою чергу, залежать від зовнішніх умов. Наприклад, подвійна спіраль є стабільною в діапазоні рН між 5 і 9. При рН < 5,

коли починається протонування компонентів нуклеїнових кислот, неспарені азотисті основи захоплюють більше протонів, ніж пари основ, і це приводить до дестабілізації дуплекса. При $pH > 9$ відбувається депротонування гуаніну й тиміну, що виключає утворення нормальних водневих зв'язків і підвищує електростатичне розштовхування (повна денатурація спостерігається зазвичай при $pH \sim 11$).

Другим важливим фактором, який суттєво впливає на стабільність подвійної спіралі, є іонна сила розчину. Зрозуміло, що підвищення концентрації солі (а отже, і катіонів, котрі взаємодіють з негативно зарядженими фосфатами) знижує електростатичне розштовхування (третій внесок у рівн. (2.13)), і, відповідно, приводить до стабілізації спіралі. Механізми цього впливу іонної сили розглядаються в розд. 3, а тепер лише зазначимо, що ΔG_{el} є лінійною функцією логарифма концентрації катіонів.

Дестабілізація спіралі при зниженні концентрації солі проявляється в тому, що дуплекс руйнується (розплавляється) при нижчій температурі – ще одного фактора, який впливає на баланс вільної енергії. Власне, так звана температура плавлення (за якої половина пар основ ДНК перебуває в зруйнованому стані) дуже часто використовується як міра стабільності.

2.2.2. Термостабільність подвійної спіралі

Об'єднавши ентальпійні та ентропійні компоненти всіх членів у правій частині рівн. (2.13), запишемо різницю вільних енергій між спіральним і неспіральним (нерозплавленим і розплавленим) станами пари основ у стандартній формі (рівн. (2.4)):

$$\Delta G = \Delta H_0 - T\Delta S_0, \quad (2.14)$$

де ΔH_0 та ΔS_0 – стандартні ентальпія та ентропія плавлення відповідно.

При температурі плавлення T_m вільні енергії розплавленого та нерозплавленого стану однакові, тобто $\Delta G = 0$, і

$$T_m = \frac{\Delta H_0}{\Delta S_0}. \quad (2.15)$$

Експериментально температуру плавлення визначають зазвичай за допомогою спектрофотометрії: унаслідок зміни електронних конфігурацій гетероциклів при укладанні їх у стос усередині подвійної спіралі, суттєво знижується ефективність поглинання світла азотистими основами (максимум поглинання при 260 нм), тобто при утворенні подвійної спіралі спостерігається гіпохромний (зниження поглинання), а при її руйнуванні – гіперхромний ефект. Залежність оптичної густини розчину ДНК від температури має вигляд S-подібної кривої, при цьому оптична густина є мірою частки пар основ у розплавленому стані. Температура, за якої відносно зростання оптичної щільності є вдвічі меншим максимального (точка напівпереходу), визначається як T_m .

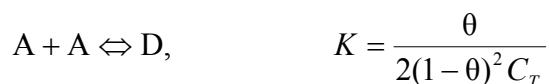
Рівняння (2.15) є справедливим, коли йдеться про плавлення високополімерної ДНК: при $T = T_m$ половина пар основ знаходиться в розплавлених ділянках, і процес денатурації можна розглядати як внутрішньомолекулярний структурний перехід у подвійній спіралі. Такий перехід є високо кооперативним (підрозд. 2.3) – довжина спіральних і неспіральних ділянок досить велика. Тобто, короткі фрагменти ДНК руйнуються за принципом "усе або нічого": при $T = T_m$ половина дуплексів перебувають у дисоційованому стані – перехід стає бімолекулярним. Для фрагментів ДНК, довжина яких не перевищує ~ 300 пар основ, температура плавлення залежить від концентрації ДНК (за принципом Ле Шательє – зниження концентрації сприяє дисоціації). Рівновага двох полінуклеотидних ланцюгів А і В та їхнього комплексу D має такий вигляд (див. рівн. (2.9)):



де K – залежна від температури константа рівноваги, θ – частка ланцюгів у складі дуплекса, C_T – загальна концентрація ланцюгів (однакові загальні концентрації ланцюгів А і В дорівнюють $C_T/2$, концентрація дуплекса $[D] = \theta C_T/2$, концентрації вільних ланцюгів А і В дорівнюють $(1-\theta)C_T/2$). При $T = T_m$ $\theta = 0,5$, константа рівноваги $K_m = 4/C_T$. Ураховуючи, що $\Delta G = -RT \ln K$ (рівн. (2.9)),

$$T_m = \frac{\Delta H_0}{\Delta S_0 + R \ln(C_T / 4)} \quad (2.16)$$

(у цьому випадку ΔH_0 та ΔS_0 відносяться вже до дуплекса загалом, а не до пари основ). У разі, коли два ланцюги є самокомплементарними (наприклад, для полінуклеотидів poly(AT)·poly(AT)), рівновага має вигляд



де C_T – загальна концентрація ланцюгів А, і замість $C_T/4$ у рівн. (2.16) слід підставити C_T .

Як видно з рівн. (2.16), величина $1/T_m$ є лінійною функцією логарифма концентрації C_T , тобто з експериментальної концентраційної залежності можна легко визначити термодинамічні функції ΔH_0 та ΔS_0 . Ці величини можна виміряти також безпосередньо за допомогою диференційної скануючої калориметрії – методу, що дозволяє слідкувати за зміною теплоємності при підвищенні температури в процесі денатурації (рис. 2.6). Відповідні зазначені на рисунку інтегрування кривої дають різниці ентальпії та ентропії між станами після й до денатурації.

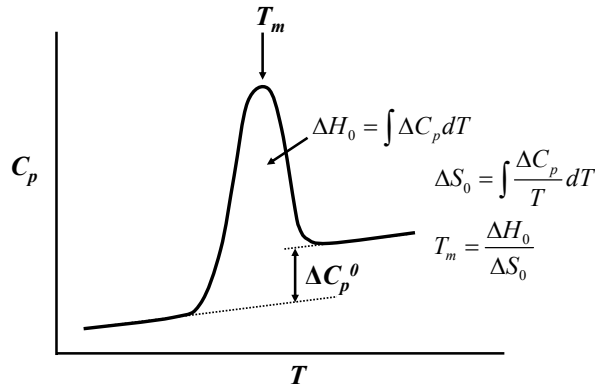


Рис. 2.6. Схема типової зміни теплоємності при денатурації макромолекули: положення піка визначає температуру плавлення, площа під піком – різницю ентальпій між станами до та після денатурації, відстань між базовими лініями дорівнює різниці теплоємностей між станами

Крива на рис. 2.6 є типовою для плавлення білків: після денатурації теплоємність вища порівняно з нативним станом за рахунок експонування гідрофобних груп до води (підпдрозд. 2.1.6). Що стосується денатурації ДНК, довгий час вважалось, що різниця теплоємностей нативного та денатурованого станів є близькою до нуля – чутливість мікрокалориметрів не дозволяла надійно оцінити цю величину. Відповідно, ΔH_0 і ΔS_0 розглядались як такі, що не залежать від температури, а ΔG – як лінійна функція температури (за рівн. (2.14)). Проте тепер зрозуміло: як і для білків, теплоємність при денатурації ДНК зростає (відповідно, при утворенні подвійної спіралі – знижується). Різниця теплоємності між нативним і розплавленим станами ДНК становить $\Delta C_p = -65 \pm 20$ кал/моль·град (на одну пару основ).

Численні калориметричні та спектрофотометричні експерименти вказують на те, що при температурі плавлення величина ΔS_0 для полімерної ДНК практично не залежить ані від послідовності пар основ, ані від іонної сили розчину, дорівнюючи $\Delta S_0 = -24,85 \pm 1,74$ кал/моль·град (на одну пару основ). Відповідно, скориставшись рівн. (2.14), (2.15) у припущенні, що ΔS_0 не залежить від температури, вільну енергію спірального стану відносно неспірального за певної температури T можна записати як

$$\Delta G = \Delta S_0 (T_m - T). \quad (2.17a)$$

Це рівняння є справедливим у деякому діапазоні температур в оточенні температури плавлення, а саме тоді, коли ΔS_0 можна приблизно вважати незалежною від температури. Насправді, оскільки зміна теплоємності при денатурації не дорівнює нулю, слід підставити в рівн. (2.14) вирази (2.6б), вважаючи, що T_0 у цих виразах дорівнює T_m , а ΔH_0 , аналогічно до ΔS_0 , – різниця ентальпій між спіральним і розплавленим станами при температурі плавлення. Тоді, використовуючи рівн. (2.15), різницю вільних енергій між двома станами можна записати у вигляді

$$\Delta G = \Delta S_0 (T_m - T) - \Delta C_p \left(T_m - T + T \ln \frac{T}{T_m} \right). \quad (2.17б)$$

Отже, визначивши T_m та скориставшись наведеними вище значеннями ΔS_0 і ΔC_p , можна обчислити ΔG за будь-якої температури (рис. 2.7).

Як видно з рис. 2.7, урахування ненульової різниці теплоємностей між нативним і розплавленим станами ДНК приводить до вигину залежності різниці вільних енергій від температури. При цьому в будь-якому досить вузькому діапазоні температур цілком можливо вважати ΔH та ΔS константами – такими, що мають певні значення, дещо відмінні від ΔH_0 та ΔS_0 . Крім того, при порівнянні *відносних* стабільностей деяких молекул ДНК можна користуватись (як це зроблено в підпідрозд. 2.2.3) спрощеною лінійною екстраполяцією (рівн. (2.17а)), розуміючи при цьому, що абсолютна стабільність за низької температури є дещо нижчою – значення вільної енергії подвійної спіралі є менш негативними.

Повернемось до різниці ентропій ΔS_0 між спіральним і розплавленим станами ДНК, яка варта додаткових коментарів. По-перше, як буде показано в розд. 3, електростатичний компонент вільної енергії в рівн. (2.13) є цілком ентропійним, тобто його можна записати як $\Delta G_{el} = -T\Delta S_{el}$ – цей внесок, який залежить від іонної сили, є складовою ΔS_0 . Але, хоча саме ΔS_{el} зумовлює залежність T_m від іонної сили, варіації абсолютної величини цього внеску при зміні концентрації солі від 10 мМ до 1 М повністю вкладаються в указаний вище діапазон ΔS_0 (див. коментар до рівн. (2.19) у наступному підпідрозд. і розд. 3).

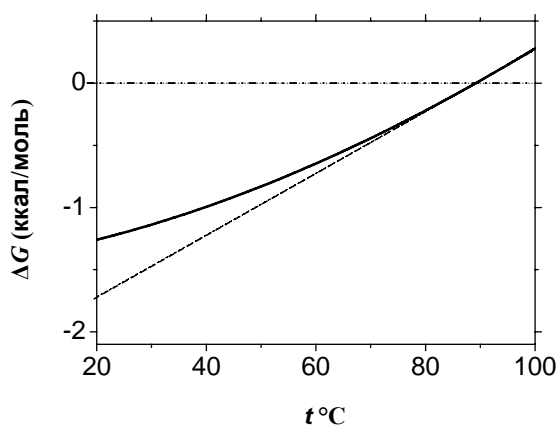


Рис. 2.7. Залежність різниці вільних енергій між спіральним та розплавленим станами ДНК (на одну пару основ) від температури за рівняннями 2.17а (пряма лінія) і 2.17б. Прийнято значення $\Delta H_0 = -9$ ккал/моль ($T_m = 362,17$ К)

По-друге, цікаво було б оцінити внесок від конформаційної ентропії у ΔS_0 . Як зазначено в підпідрозд. 1.1.3 (див. рис. 1.7), цукрофосфатний остов може мати ~216 конформацій на кожен нуклеотид у складі одноланцюгового полінуклеотиду, на два нуклеотиди у двох ланцюгах $216 \times 216 = 46\,656$ конформацій. Фіксація пари

основ у складі дуплекса залишає тільки одну конформацію, тобто, за рівн. (2.1), зміна конформаційної ентропії становить $\Delta S_{conf} = R \ln(1/46\,656) = -21,4$ кал/моль·град. Ця (зрозуміло, дуже спрощена) оцінка вказує, що саме зміна конформаційної ентропії є основним внеском у ΔS_0 . Зрозуміло також, що конформаційна ентропія цукрофосфатного остова (як і електростатична енергія, зумовлена фосфатними залишками) не повинна суттєво залежати від послідовності пар основ.

Конформаційна ентропія є основною ентропійною складовою вільної енергії за високих температур – в області температури плавлення. Зниження температури приводить до зростання різниці ентропій між спіральним і розплавленим станами: згідно з рівн. (2.6б) при згаданому вище значенні ΔC_p ΔS зростає до ~ -15 кал/моль·град при 37°C та до ~ -11 кал/моль·град при 20°C . Позитивний (тобто енергетично вигідний) внесок в ентропію подвійної спіралі щодо одноланцюгового стану, який є близьким до нуля за високих температур і зростає при зниженні температури, зумовлений, найвірогідніше, гідрофобними взаємодіями (див. також рис. 2.5). Це вказує на важливість гідрофобного внеску в загальну вільну енергію стекінгу між парами основ – висновок, що підтверджується рядом прямих розрахунків енергії стекінг-взаємодій.

Стабілізуючі внески у вільну енергію подвійної спіралі, очевидно, мають залежати від типу динуклеотидного контакту (ΔG_{st}) і типу пари основ (ΔG_{bp}). Досить давно було встановлено, що температура плавлення є лінійною функцією GC-складу ДНК, підвищуючись при зростанні частки GC-пар. Перша наївна інтерпретація цього факту могла б полягати в тому, що водневі зв'язки є визначальним фактором підтримання структури ДНК: підвищення їхньої кількості (три зв'язки в GC-парі проти двох у AT-парі) стабілізує подвійну спіраль. Але відразу ж було з'ясовано, що полімери однакового нуклеотидного складу (наприклад, poly(A)·poly(T) і poly(AT)·poly(AT)) мають різні температури плавлення, тобто стабільність дуплекса залежить не від вмісту, а від *послідовності* пар основ.

2.2.3. Залежність стабільності подвійної спіралі від послідовності пар основ

Ця залежність задовільно описується в рамках моделі найближчих сусідів: коли стабільність ДНК певної послідовності визначається тільки відносними кількостями десяти типів динуклеотидних контактів, кожен із яких характеризується своїми термодинамічними параметрами. Іншими словами, вільна енергія подвійної спіралі (на одну пару основ) і температура плавлення дорівнюють

$$\Delta G = \frac{\sum_{i=1}^{10} n_i \Delta G_i}{N}, \quad T_m = \frac{\sum_{i=1}^{10} n_i (T_m)_i}{N}, \quad (2.18)$$

де n_i – кількість динуклеотидних контактів одного з десяти типів у послідовності з N пар основ, ΔG_i та $(T_m)_i$ – відповідно загальна вільна енергія спірального стану контакту даного типу й асоційована "температура плавлення" для цього контакту. За винятком контактів AA/TT і GG/CC у гомополімерах poly(A)·poly(T) та poly(G)·poly(C), неможливо отримати послідовність, яка б складалася з динуклеотидів одного типу. Але визначивши T_m для певного набору полімерів відомої послідовності, можна розв'язати систему рівнянь типу рівн. (2.18) відносно десяти значень $(T_m)_i$ і, відповідно, отримати значення ΔG_i для кожного контакту для будь-якої температури (за рівн. (2.17) або визначивши окремо ΔH_0 і ΔS_0).

Узгоджені для кількох незалежних експериментів значення ΔG для 10 типів контактів при 37°C та двох іонних силах наведено в табл. 2.1 (за даними SantaLucia (1998)). Слід зауважити, що ці значення отримано шляхом лінійної екстраполяції за рівн. (2.17а) – їх слід сприймати як відносні (див. попередній підпідрозд.).

Таблиця 2.1. Вільна енергія спірального стану для динуклеотидних контактів у складі полімерної ДНК при 37°C

Тип контакту	ΔG (ккал/моль)	
	1 M NaCl	0,1 M NaCl
AA/TT	-1,20	-0,80
AT	-1,08	-0,68
TA	-0,78	-0,38
GG/CC	-2,04	-1,64
GC	-2,44	-2,04
CG	-2,37	-1,97
AG/CT	-1,48	-1,08
GA/TC	-1,50	-1,10
AC/GT	-1,64	-1,24
CA/TG	-1,65	-1,25

Залежність вільних енергій від концентрації солі визначається емпіричним рівнянням

$$\Delta G([\text{Na}^+]) = \Delta G(1 \text{ M}) - B \ln[\text{Na}^+], \quad (2.19)$$

де $[\text{Na}^+]$ – молярна концентрація Na^+ , енергія виражається в ккал/моль на одну пару основ, а коефіцієнт B зазвичай варіює від 0,175 до 0,2 (далі в цьому підпідрозділі при оцінках узято $B = 0,175$ згідно із SantaLucia, 1998). Як уже відмічалось, залежність ΔG від іонної сили повністю визначається ентропійним електростатичним компонентом (відповідно, ΔH_0 не залежить від іонної сили),

тобто розділивши рівн. (2.19) на 310,15 К і помноживши на 1000, отримаємо залежність ΔS_0 від іонної сили в кал/моль·град: при зміні концентрації солі від 1 М до 10 мМ ΔS_0 змінюється на 2,6 кал/моль·град, що дозволяє вважати її константною величиною при застосуванні рівн. (2.17). Середнє значення $\Delta S_0 = -24,85 \pm 1,74$ кал/моль·град найкраще відповідає, напевно, 0,1 М NaCl (середнє для зазначеного діапазону іонної сили в логарифмічній шкалі). Інакше кажучи, скориставшись значеннями ΔG для 0,1 М NaCl з табл. 2.1 і рівнянням (2.4), можна розрахувати ΔH_0 для кожного динуклеотидного кроку: середнє значення $\Delta H_0 \approx -9$ ккал/моль (відповідне значення $-T\Delta S_0 = 7,7$ ккал/моль).

Користуючись табл. 2.1, рівн. (2.14), (2.17а), (2.19) і взявши згадане вище константне значення ΔS_0 , можна розрахувати температуру плавлення та інші термодинамічні характеристики будь-якої послідовності ДНК за будь-якої концентрації солі. Слід зауважити, що йдеться про високополімерну ДНК: передбачення температури плавлення коротких олігонуклеотидів (важливе у практичному плані завдання при, зокрема, підборі праймерів для полімеразної ланцюгової реакції) потребує додатково враховувати кінцеві ефекти (просту процедуру, що дозволяє це зробити, застосовуючи параметри з табл. 2.1, описано в роботі SantaLucia (1998)).

На рис. 2.8 представлено два приклади результатів розрахунку температури плавлення полімерної ДНК як функції частки GC-пар (вважаючи послідовність випадковою) та іонної сили. Обидві залежності практично відтворюють відомі експериментальні результати щодо впливу GC-складу та концентрації солі на термостабільність ДНК.

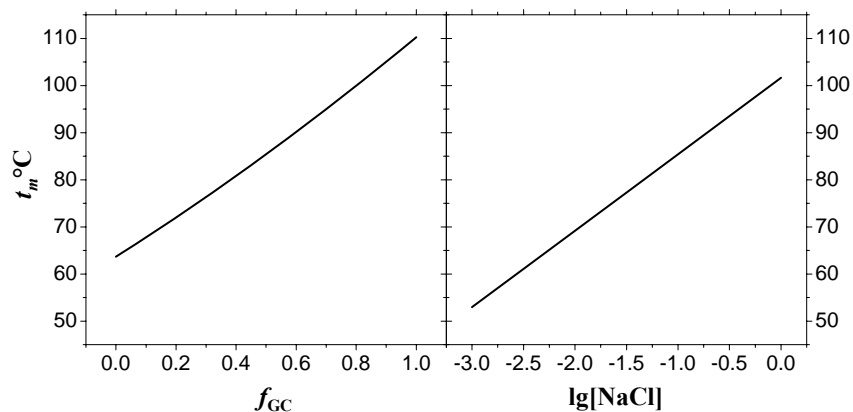


Рис. 2.8. Розраховані за даними табл. 2.1 залежності температури плавлення ДНК з випадковою послідовністю від частки GC-пар f_{GC} у 0,1 М NaCl і від логарифма молярної концентрації солі для ДНК із $f_{GC} = 0,5$ (див. також задачу 2.6)

Отже, інформація щодо відносної вільної енергії окремих динуклеотидних кроків є необхідною та достатньою для задовільного опису впливу послідовності подвійної спіралі на її стабільність. Про взаємодії, від яких залежить цей вплив, дізнаємося з наступного підрозділу.

2.2.4. Стекінг-взаємодії чи водневі зв'язки?

Відповідь на це запитання було нещодавно отримано в елегантних експериментах групи М. Франк-Каменецького, в яких досліджувалась конформаційна рівновага молекул ДНК, що містять нік (nick) – одноланцюговий розріз (рис. 2.9). Стекінг-взаємодії між парами основ по обидва боки від ніка стабілізують звичайну структуру подвійної спіралі (ліворуч на рис. 2.9), але наявність розрізу дозволяє молекулі певний час існувати у вигнутій конформації з порушеними стекінг-взаємодіями в межах одного динуклеотидного контакту (праворуч на рис. 2.9). Переходи між двома формами відбуваються дуже швидко, і чим більше часу загалом молекула проводить у вигнутій конформації, тим більше вона гальмується у процесі гель-електрофорезу. Ступінь гальмування дозволяє визначити константу рівноваги, а отже, і різницю вільних енергій між двома формами ΔG_{step} . Експерименти проводились за різних температур та іонних сил на різних молекулах ДНК, які були сконструйовані рекомбінантними методами таким чином, що по обидва боки від ніка "підставлялись" усі можливі динуклеотидні контакти. Значення ΔG_{step} для всіх контактів у 0,1 М NaCl при 37 °C наведено в табл. 2.2.



Рис. 2.9. Конформаційна рівновага в нікованій подвійній спіралі

**Таблиця 2.2. Вільна енергія "стекингу"
для динуклеотидних контактів при 37°C в 0,1 М NaCl**

Тип контакту	ΔG_{step} (ккал/моль)	Тип контакту	ΔG_{step} (ккал/моль)
AA/TT	-1,49	CG	-1,29
AT	-1,72	AG/CT	-1,44
TA	-0,57	GA/TC	-1,81
GG/CC	-1,82	AC/GT	-2,19
GC	-2,55	CA/TG	-0,93

За даними Protozanova *et al.* (2004), Yakovchuk *et al.* (2006).

Слово "стекинг" у назві таблиці поставлено в лапки, оскільки зрозуміло, що різниця вільних енергій між двома формами (рис. 2.9) містить не тільки енергію власне стекинг-взаємодій, а також і електростатичний компонент (збільшується відстань між фосфатами у вигнутій формі), і компонент, пов'язаний зі змінами конформаційної ентропії. Але ця вільна енергія не містить внеску водневих зв'язків, які не руйнуються при конформаційній рівновазі в нікованій молекулі. Більш того, характер залежності ΔG_{step} від іонної сили й температури практично збігається (за нахилом цих залежностей) із відповідними залежностями загальної вільної енергії ΔG . Можна вважати, що $\Delta G_{step} \approx \Delta G_{st} + \Delta G_{el} - T\Delta S_{conf}$ містить усі внески у вільну енергію, крім ΔG_{bp} (рівн. (2.13)).

Результати описаного експерименту приводять до двох важливих висновків:

- Хоча значення ΔG_{step} не дорівнюють енергії стекингу (містять додаткові компоненти), вони (оскільки ці додаткові компоненти не залежать від послідовності) характеризують залежність енергії стекингу від типу динуклеотидного контакту. Спостерігаються ті самі закономірності, що були відмічені при аналізі залежної від послідовності конформаційної рухливості ДНК у підрозд. 1.4: ефективність стекинг-взаємодій зростає в ряду $YR < RR/YY < RY$ і є вищою для GC-збагачених кроків порівняно з AT-збагаченими.

- Порівняння значень ΔG_{step} із загальною вільною енергією ΔG дозволяє оцінити енергетичні внески від формування комплементарних пар основ: виявляється, що в 0,1 М NaCl при 37 °C вільні енергії ΔG_{bp} дорівнюють +0,64 ккал/моль для AT-пари та +0,12 ккал/моль для GC-пари. Ці значення практично не залежать ні від температури, ні від іонної сили.

Отже, вільна енергія утворення GC-пари є близькою до нуля (водневі зв'язки основ із водою при розходженні ланцюгів приблизно такі самі, як і в подвійній спіралі), енергія AT-пари є навіть дестабілізуючою (хоча й незначною). Іншими словами, у водному оточенні комплементарні *водневі зв'язки не дають жодного внеску у стабілізацію дуплекса, і єдиним фактором стабілізації є стекинг-взаємодії*.

Роль комплементарних водневих зв'язків між основами полягає в тому, що вони є необхідною передумовою утворення стабільного стосу. Донорні й акцепторні групи азотистих основ прагнуть утворити водневі зв'язки (енергія водневого зв'язку надто висока, щоб його втрачати). Опиняючись усередині неполярного стосу, ці групи стають недоступними для води, і єдиний шанс зберегти водневі зв'язки – утворити їх з відповідними групами іншої основи. А це можливо лише за умови комплементарності. Відповідно, за відсутності комплементарності стекинг-взаємодії стають недостатніми, щоб подолати надто не вигідний ефект втрати водневого зв'язку з водою: вигідніше буде зберегти цей зв'язок, а отже, порушити стос і саму подвійну спіраль. Інакше, *відсутність водневих зв'язків* у некомплементарній парі суттєво *дестабілізує* дуплекс, а їхня *присутність* у комплементарній – практично *не впливає* на стабільність.

2.3. ПЕРЕХІД СПІРАЛЬ–КЛУБОК

У попередньому підрозділі розглянуто різницю вільних енергій між спіральним і розплавленим станами пари основ. Ця величина, визначаючи термостабільність дуплекса (температуру плавлення), є недостатньою, щоб описати процес денатурації – характер залежності частки спіральних / розплавлених пар основ від температури. Експеримент свідчить, що цей процес відбувається в досить вузькому температурному інтервалі, що вказує на високу *кооперативність* структурного переходу спіраль–клубок, оскільки велика кількість пар основ руйнується *одночасно*. Кооперативність означає, що вільна енергія пари основ залежить від стану сусідніх пар.

Для з'ясування головних особливостей процесу денатурації розглянемо класичну модель Зімма – Брегга (Bruno Zimm, J.K. Bragg): нескінченно довгий гомополімер (усі динуклеотидні контакти однакові), який складається з N пар основ; кожна пара може існувати у двох станах – спіральному та неспіральному; пари основ розподілені по n спіральних і n неспіральних ділянках (рис. 2.10). Точніше, визначимо n як половину кількості меж між ділянками двох типів, тобто $n = 0$, коли всі пари основ перебувають в одному із двох станів.



Рис. 2.10. Спіральні та розплавлені ділянки ДНК під час процесу її денатурації

Запишемо загальну вільну енергію такої системи, обравши її шкалу таким чином, що вільну енергію неспіральної пари (оточеної також неспіральними парами) візьмемо за нуль:

$$G = N_h G_h + n G_b - k_B T \ln \frac{N_h!}{n!(N_h - n)!} \frac{N_c!}{n!(N_c - n)!}, \quad (2.20)$$

де N_h – кількість пар у спіральному стані, $N_c = N - N_h$ – кількість неспіральних пар, G_h – вільна енергія пари у спіральному стані відносно неспірального (збігається з ΔG у попередньому підрозділі), G_b – енергія двох меж між спіральною та неспіральною ділянками. Саме цей останній параметр визначає кооперативність системи – модель є загальною, і випадок відсутності кооперативності відповідає $G_b = 0$. По-іншому, але цілком еквівалентно, величину G_b можна інтерпретувати як вільну енергію *ініціації* розплавленої ділянки (див. нижче). Останній член рівн. (2.20) є внеском від ентропії змішування спіральних і неспіральних ділянок: її необхідно врахувати, оскільки для різних співвідношень N_h , N_c та n буде різною кількість способів, якими таке співвідношення можна отримати (кількість мікростанів). Перший дріб під логарифмом – кількість способів розподілити N_h спіральних пар по n спіральних ділянках (кількість сполучень). Кожному з цих способів відповідає кількість способів розподілити N_c (ця величина не є незалежною змінною й однозначно визначається N_h) по n ділянках (другий дріб) – загалом під логарифмом стоїть число мікростанів, яким можна реалізувати стан системи з даною комбінацією N_h та n (порівн. з визначенням ентропії в рівн. (2.1)).

Скориставшись формулою Стірлінга (James Stirling) $P! = P \ln P - P$, яка з високою точністю виконується для великих P (тобто для факторіалів у рівн. (2.20)), і позначивши частку спіральних пар як $\theta = N_h/N$ (і, відповідно, $(1 - \theta) = N_c/N$), $\varphi = n/N$, а також $g = G/Nk_B T$, $g_h = G_h/k_B T$, $g_b = G_b/k_B T$ (тобто виразивши вільну енергію в одиницях $k_B T$ на одну пару основ), перепишемо рівн. (2.20) у такому вигляді:

$$g = \theta g_h + \varphi g_b + \theta \ln \frac{\theta - \varphi}{\theta} + (1 - \theta) \ln \frac{1 - \theta - \varphi}{1 - \theta} + \varphi \ln \frac{\varphi^2}{(\theta - \varphi)(1 - \theta - \varphi)}.$$

Таким чином, вільна енергія системи є функцією двох змінних θ і φ . Щоб знайти рівноважні значення цих змінних (такі, що відповідають мінімуму вільної енергії), застосуємо процедуру мінімізації останнього співвідношення – запишемо частинні похідні від g по θ та φ :

$$\frac{\partial g}{\partial \theta} = g_h + \ln \frac{\theta - \varphi}{\theta} \frac{1 - \theta}{1 - \theta - \varphi}, \quad (2.21)$$

$$\frac{\partial g}{\partial \varphi} = g_b + \ln \frac{\varphi^2}{(\theta - \varphi)(1 - \theta - \varphi)}$$

і знайдемо такі значення θ і ϕ , за яких обидві похідні дорівнюють нулю (умова екстремуму функції). Розв'язок цієї системи рівнянь відносно θ має вигляд:

$$\theta = \frac{1}{2} + \frac{s-1}{2\sqrt{(s-1)^2 + 4s\sigma}}, \quad (2.22)$$

де $s = \exp(-g_h)$ – константа рівноваги між спіральним на неспіральним станами, $\sigma = \exp(-g_b)$ – параметр кооперативності.

З'ясуємо спочатку поведінку частки спіральних пар основ як функції s у двох граничних випадках (s визначається просто температурою за рівн. (2.17), де $\Delta G = RTg_h$). Перший випадок відповідає відсутності кооперативності: $\sigma = 1$, $g_b = 0$. Тоді за рівн. (2.22)

$$\theta = \frac{s}{s+1}$$

частка спіральних пар основ дуже повільно зростає при підвищенні s (рис. 2.11) (тобто при зменшенні g_h , коли температура знижується), напівперехід ($\theta = 1/2$) відбувається в точці, що відповідає температурі плавлення: $s = 1$, $g_h = 0$ (вільна енергія спірального стану змінює знак). Але практично в цьому випадку стовідсотково спіральний стан є таким, що його важко досягти (як і стовідсотково розплавлений – $s = 0$ відповідає $g_h = +\infty$).

Другий граничний випадок – абсолютна кооперативність: $\sigma = 0$, $g_b = +\infty$ (енергія меж є нескінченно високою). Тоді за рівн. (2.22)

$$\theta = 0 \text{ при } s < 1, \quad \theta = 1 \text{ при } s > 1,$$

тобто при $s = 1$ (при температурі плавлення) відбувається раптовий стрибок θ від 0 до 1 (рис. 2.11) – перехід за законом "усе або нічого".

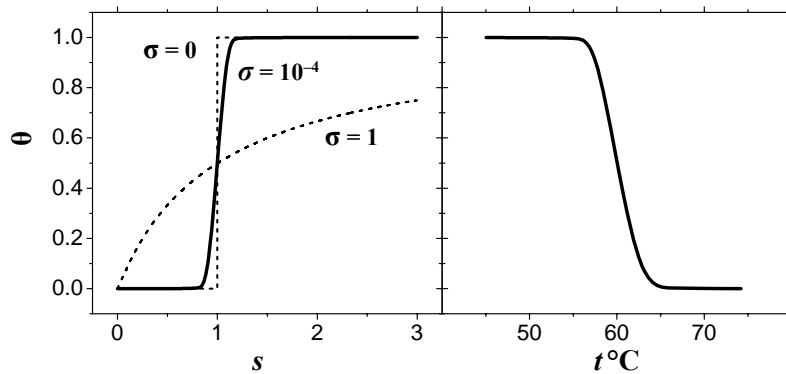


Рис. 2.11. Залежності частки пар основ у спіральному стані від параметра s (за рівн. (2.22)) для трьох значень параметра кооперативності та від температури для $\sigma = 10^{-4}$

Насправді для ДНК параметр кооперативності $\sigma \sim 10^{-4} - 10^{-5}$ (енергія меж $G_b \sim 5-7$ ккал/моль), і структурний перехід відбувається *майже* за законом "усе або нічого" в дуже вузькому температурному інтервалі (рис. 2.11)). Розв'язок системи рівнянь (2.21) відносно ϕ (яке пропонується знайти самостійно – задача 2.8) указує, що при кооперативному переході кількість спіральних / неспіральних ділянок сягає максимуму при температурі плавлення. Відповідно, у цій точці довжина таких ділянок є мінімальною та становить ~ 300 пар основ при $\sigma = 10^{-5}$.

Причиною деякого розширення зони переходу при $\sigma > 0$ є внесок від ентропії змішування в загальну вільну енергію системи. Енергія меж є не вигідною (але не нескінченно не вигідною), що зумовлює тенденцію мінімізувати їхню кількість – саме тому й відбувається об'єднання пар основ одного типу на одній ділянці. Але чим більшою є кількість ділянок, тим вища ентропія змішування: результатом є певний компроміс між цими протилежними тенденціями.

Отже, денатурація ДНК являє собою висококооперативний структурний перехід, що відбувається у вузькому діапазоні температур. Така властивість є дуже важливою для забезпечення структурної та функціональної надійності: досить жорстка конструкція подвійної спіралі витримує зміни зовнішніх умов у широкому діапазоні без порушень своєї цілісності – до певної межі, за якою відбувається руйнування структури як цілого. Можна сказати, що нативна структура ДНК являє собою тверде тіло (кристал), яке, цілком подібно до інших твердих тіл, плавиться у вузькому температурному діапазоні.

Фактором, що визначає високу кооперативність переходу спіраль–клубок, є висока вільна енергія меж між спіральними та неспіральними ділянками, яка має два основні внески. Один внесок у цю енергію – додаткова втрата вигідної енергії стекингу одного контакту при виникненні розплавленої ділянки: для n послідовних розплавлених пар основ руйнується $n + 1$ динуклеотидних контактів. Але цей внесок порівняно невеликий: при 37°C він дорівнює енергіям контактів, наведеним у табл. 2.1, а в діапазоні плавлення – близький до нуля. Суттєвішим є внесок від конформаційної ентропії: усередині розплавленої ділянки полінуклеотидний ланцюг "програє" енергію взаємодій, що стабілізують подвійну спіраль, але "виграє" конформаційну ентропію за рахунок підвищення рухливості (власне, баланс між цими факторами й визначає, спіральний чи неспіральний стан буде переважним); на межі між двома ділянками *стабілізуючі взаємодії втрачено*, а повної свободи рухів граничного нуклеотиду немає – їх має суттєво обмежувати сусідня жорстка спіральна ділянка. Таким чином, енергія двох меж точно дорівнює енергетичній витраті на руйнування однієї пари основ усередині спіральної ділянки – ініціації процесу плавлення.

Більш повна теорія плавлення ДНК ураховує також залежність конформаційної ентропії неспіральних ділянок від їхньої довжини: одна велика розплавлена зона є ентропійно вигіднішою (оскільки більш рухлива), ніж дві маленькі, що містять таку саму кількість пар основ. У результаті короткі ділянки мають тенденцію "зливатися", що додатково підвищує ступінь кооперативності.

Незважаючи на високу енергетичну вартість ініціації плавлення, така подія, хоча й рідко, спонтанно відбувається в ДНК і за низьких температур – спостерігається розкриття пар або так зване "дихання" подвійної спіралі (рис. 2.12). За результатами ЯМР-досліджень обміну залучених до комплементарних водневих зв'язків імінопротонів G і T (див. рис. 1.1; 1.9), частоти розкриття пар за кімнатних температур варіюють від 10^{-5} (в середньому одна пара розкрита на 100 тис. пар основ) до 10^{-6} для АТ-пари та від 10^{-6} до 10^{-7} для GC-пари (залежно від зовнішніх умов і контексту послідовності). Ця внутрішня властивість подвійної спіралі використовується низкою ферментів, які здійснюють модифікації та репарацію азотистих основ – взаємодії з ферментом стабілізують відкритий стан, і основа розміщується в активному центрі (рис. 2.12).

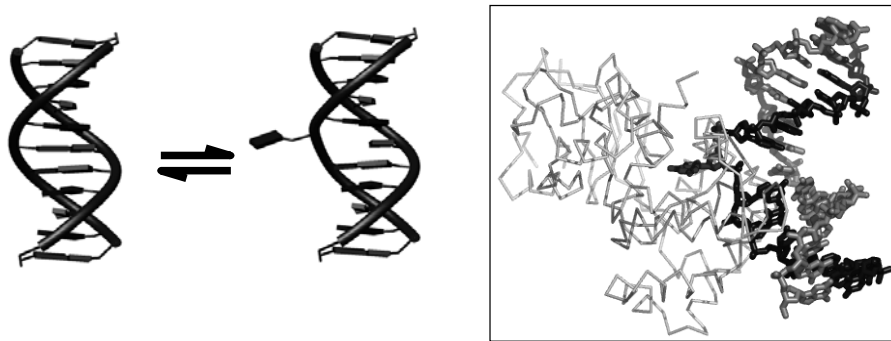


Рис. 2.12. Схема спонтанного розкриття пар основ ДНК.
На вставці – структура комплексу ДНК з ферментом репарації 8-оксогуанінін-глікозилазою (код PDB 1EBM). Видно азотисту основу в активному центрі ферменту, для білка показано тільки загальний хід поліпептидного ланцюга

Теорії денатурації гетерополімерів, які можуть бути застосовані для розрахунку кривої плавлення ДНК, виходячи з її послідовності (на жаль, неможливо розв'язати зворотну задачу), беруть до уваги передусім залежність константи рівноваги s від типу динуклеотидного контакту. Особливістю гетерополімеру є наявність ділянок нижчої (перш за все, АТ-збагачених) і вищої стабільності, які виплавляються при різних температурах – "де тонко, там і рветься". При цьому для гетерополімеру є менш вагомим внесок від ентропії змішування, оскільки меншим є кількість мікростанів для даної комбінації N_h і n : меншою є ймовірність того, що два розподіли пар по ділянках з тими самими значеннями N_h і n мають однакову енергію – зазвичай ділянки у двох розподілах будуть розрізнятися за послідовністю. Але сама наявність гетерогенності за стабільністю зумовлює чергування ділянок різного типу вздовж дуплекса.

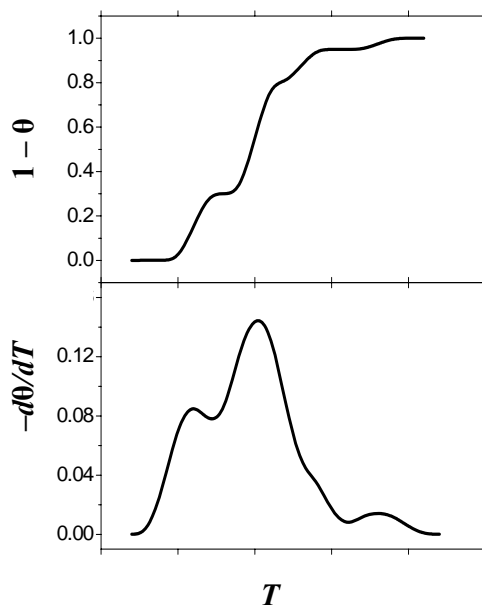


Рис. 2.13. Схематичне зображення кривої плавлення ДНК певної послідовності (угорі, $(1 - \theta)$ – частка неспіральных пар основ) і відповідна диференційна крива – похідна від першої кривої за температурою (унизу)

Оскільки різні ділянки гетерополімеру плавляться за дещо різних температур, крива плавлення має тонку структуру – містить "сходинки", які значно краще проявляються у вигляді піків на диференційній кривій (рис. 2.13). Зрозуміло, що йдеться про гомогенний препарат однакових за послідовністю фрагментів. Для фрагментів ДНК довжиною понад 100 тис. пар основ сходинки розмиваються, і спостерігається плавний перехід у дещо ширшому порівняно з гомополімером температурному діапазоні.

2.4. ДВА ТИПИ СТРУКТУРНИХ ПЕРЕХОДІВ

Плавлення ДНК є прикладом різкого *стрибкоподібного кооперативного* переходу. Структурними перетвореннями подібного типу, які також відбуваються стрибком у вузькому діапазоні умов, є переходи між родинами структурних форм ДНК – В–А перехід, В–Z перехід альтернуючого полімеру

poly(GC)·poly(GC) (див. рис. 1, кольор. вст.). Для опису цих переходів можна застосувати такий самий формалізм, який використано в попередньому підрозділі для плавлення ДНК – тільки роль температури, котра визначає константу рівноваги між двома станами пари основ, буде відігравати концентрація спирту та/або солі. Цікаво, що висока вільна енергія межі, яка зумовлює кооперативний характер В–Z переходу, напевно зумовлена розкриттям пари основ у точці стиковки лівої та правої спіралей (рис. 1, кольор. вст.).

При обговоренні конформаційної рухливості В-ДНК у підрозд. 1.4 згадувався вплив іонної сили та температури на кут твіста. Це приклад також структурного перетворення, але зовсім іншого типу – *поступового*, коли подвійна спіраль негайно реагує на мінімальну зміну зовнішнього фактора. Фундаментальні розбіжності між цими двома типами структурних переходів ілюструє рис. 2.14.

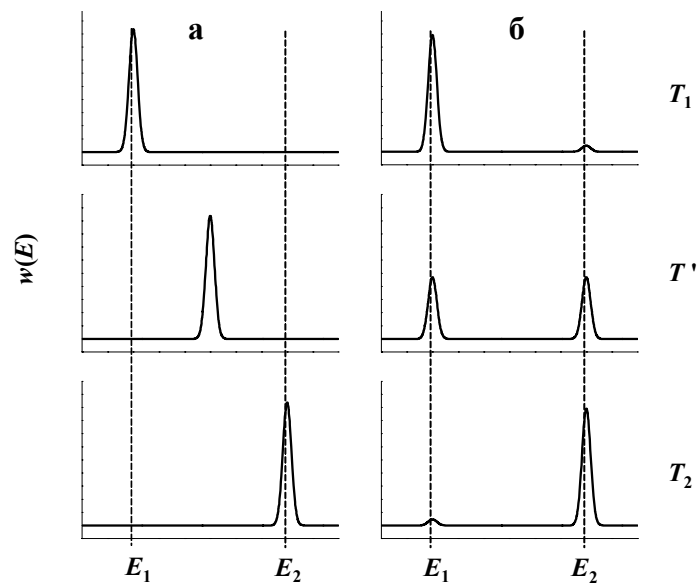


Рис. 2.14. Розподіл молекул за внутрішньою енергією (кількість молекул w як функція E) при поступовому (а) і різкому кооперативному (б) структурних переходах на початку переходу (T_1), у кінці (T_2) і за проміжної температури T'
Адаптовано за Фінкельштейном, Птициним (2007)

Розглянемо спочатку поступові перетворення (рис. 2.14, *a*). За деякої температури T_1 (роль температури може відігравати й будь-який інший зовнішній фактор) реалізується структурний стан з певною внутрішньою енергією E_1 , який відповідає мінімуму вільної енергії: у великому ансамблі молекул спостерігається розподіл за внутрішньою енергією E з максимумом при E_1 . Підвищення температури приводить до зміни балансу внесків у вільну енергію – відбувається "адаптація" структури під нові умови й реалізується новий стан з іншою внутрішньою енергією E , який знову відповідає мінімуму вільної енергії. При зміні температури від T_1 до T_2 пік розподілу просто пересувається вздовж осі абсцис, при цьому послідовно *реалізуються всі структурні стани* з енергіями від E_1 до E_2 , кожен з яких відповідає мінімуму вільної енергії.

При різких переходах ситуація змінюється кардинально (рис. 2.14, *б*; 2.15). Тут знову при температурах T_1 і T_2 реалізуються два стани з мінімальними вільними енергіями та відповідними внутрішніми енергіями E_1 і E_2 . Але при всіх проміжних температурах між T_1 і T_2 *жоден із проміжних станів* з енергіями між E_1 та E_2 *не може бути реалізованим*: зростання температури приводить до зміни відносних внесків двох станів – "перекачування" молекул з одного стану в інший. Система при цьому здійснює стрибок з одного значення внутрішньої енергії до іншого. Причиною такої поведінки є те, що всі стани з енергіями між E_1 і E_2 характеризуються вільними енергіями, вищими за вільні енергії обох станів E_1 та E_2 . Це означає, що обом станам відповідають локальні мінімуми вільної енергії, розділені енергетичним бар'єром, і розподіл молекул по двом станам за даної температури визначається різницею між цими локальними мінімумами. При цьому, наприклад при температурі T_1 , з дуже низькою ймовірністю, але присутній стан з енергією E_2 – як у випадку розкриття пар основ за низьких температур.

На рис. 2.15 схематично зображено термодинамічні характеристики подвійної спіралі, які додатково ілюструють описану поведінку системи при кооперативному плавленні. Різні структурні стани подвійної спіралі можна охарактеризувати лінійною щільністю ρ нуклеотидів (кількість нуклеотидів на одиницю довжини вздовж осі дуплекса). При певному високому значенні ρ внутрішня енергія мінімальна – стан щільної упаковки пар основ у стосі. Зростання щільності обмежене крутою енергетичною стінкою – подальше стиснення є практично неможливим (порівн. з потенціалом Леннард-Джонса на рис. 2.2). Зменшення щільності приводить до порушення вигідних взаємодій між нуклеотидами – E повільно зростає, а за дуже низької щільності знову має місце енергетична стінка, яка відповідає неможливості розвести мономерні одиниці, з'єднані ковалентними зв'язками.

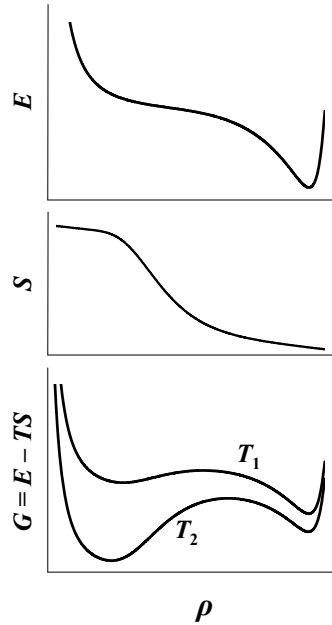


Рис. 2.15. Схема зміни термодинамічних характеристик при переході спіраль–клубок у ДНК: залежність внутрішньої енергії E , ентропії S і вільних енергій G при двох температурах від лінійної щільності нуклеотидів ρ

Ентропія системи весь час зростає при зниженні щільності (менше щільність – вище конформаційна свобода), проте нерівномірно. Спочатку зростання повільне – щільність знижується не настільки, щоб дозволити велику свободу рухів: визволення певної кількості поодиноких пар основ мало що дає для зростання ентропії. У результаті вільна енергія зростає – це відповідає високим енергетичним витратам на ініціацію розплавленої ділянки. Коли ж визволяється помітна кількість пар основ *одночасно* (у складі досить довгих неспіральных ділянок), ентропія зростає дуже швидко. Після цього її зростання знову вповільнюється – після визволення більшої частини нуклеотидів в одноланцюговий стан конформаційна ентропія вже не має куди зростати.

Результатом такої поведінки є наявність двох локальних мінімумів вільної енергії, розділених максимумом у зоні переходу. Зміна температури (відповідно, і ентропійного внеску) змінює співвідношення між двома мінімумами вільної енергії. Але система завжди обирає один із двох станів – і *тільки* з двох: стани з проміжними значеннями ρ практично не реалізуються.

Стрибок внутрішньої енергії при кооперативних переходах у ДНК нагадує такий самий ефект при *фазових переходах першого роду* в макроскопічних тривимірних системах, наприклад, перехід між кригою та рідким станом води. Там теж відбувається різке перетворення одного стану в інший без проміжних форм, і в точці переходу спостерігається співіснування двох фаз. Однак є суттєва відмінність між макроскопічним об'єктом і подвійною спіраллю: у тривимірній системі площа межі між двома фазами залежить від їхнього об'єму; у ДНК межа є контактом між двома парами основ незалежно від довжини ділянок певного типу – у цьому сенсі ДНК є одновимірною системою. Оскільки площа поділу фаз залежить від об'єму частинок фази, тривимірна система прагне мінімізувати енергетично не вигідну поверхню поділу (незважаючи на ентропійно вигідне перемішування фаз) – у системі виникає чітка (і одна) межа поділу фаз, дві фази не перемішуються одна з одною. Перетворення однієї фази в іншу відбувається дійсно стрибком при зміні зовнішніх умов – це істинний фазовий перехід першого роду. Оскільки в одновимірній системі розмір межі не залежить від розміру фази, переважним стає ентропійний виграш від перемішування фаз – чергування ділянок двох типів. Це дещо "розмиває" зону переходу й робить неможливим повний поділ фаз однією межею. Отже, істинний фазовий перехід першого роду в одновимірній системі є неможливим – твердження, відоме як *теорема Ландау* (сформульована й доведена Львом Ландау для одновимірних систем, які не мають жодного стосунку до ДНК). Таким чином, кооперативні структурні перетворення в ДНК *подібні* до фазових переходів (що й дозволяє називати денатурацію дуплекса плавленням), але не повністю їм тотожні.

2.5. КІНЕТИКА КОНФОРМАЦІЙНИХ ПЕРЕТВОРЕНЬ

Досі розглядалася термодинаміка структурних переходів у ДНК, яка, оперуючи різницями вільних енергій між двома станами, здатна чітко передбачити рівноважне співвідношення між імовірностями реалізації цих станів. Але знання про різницю вільних енергій є недостатнім, щоб відповісти на питання про те, яким шляхом, а відповідно наскільки швидко, установлюється така рівновага. Кінетика, досліджуючи швидкості процесів, дозволяє з'ясувати подібні питання. Можна запропонувати таку аналогію: якщо нам відома різниця у висоті між двома точками на певному ландшафті, то можемо точно сказати, що потік води буде прямувати зверху вниз. Але для визначення шляху цього потоку (а отже,

і його швидкості) треба знати всі особливості ландшафту в багатьох інших точках. Тільки на відміну від топографії, яка спочатку вивчає особливості ландшафту, кінетика діє навпаки: передусім вивчається швидкість процесу, яка й дозволяє робити висновки про певний енергетичний ландшафт.

2.5.1. Основи хімічної кінетики

Перш за все слід з'ясувати, що означають слова "швидко" й "повільно" в молекулярному світі, тобто яка шкала часу має бути обрана. Єдиним джерелом енергії для будь-яких молекулярних процесів є середня кінетична енергія теплових коливань $k_B T$, тобто коли молекула здійснює коливання, їхню частоту ν можна оцінити за рівнянням $k_B T = h\nu$, де h – постійна Планка (Max Planck). За кімнатної температури (300 К) $\nu = 6,25 \cdot 10^{12} \text{ c}^{-1}$. Отже, будь-який молекулярний процес не може відбуватися швидше, ніж за час, що дорівнює періоду коливань $\tau_0 = 1/\nu = 1,6 \cdot 10^{-13} \text{ c}$. Цей час, за який може здійснитись деяка подія, називають зазвичай часом елементарного кроку, а $1/\tau_0$ є, відповідно, швидкістю елементарного кроку.

Наведена оцінка часу елементарного кроку справедлива для газової фази, де молекули можуть рухатися з високими швидкостями, що визначаються енергією теплових коливань. У більш в'язкому середовищі – водному розчині – рух молекул суттєво гальмується, і для часу елементарного кроку мономолекулярних процесів (таких, що не залежать від трансляційної дифузії кількох молекул) слід узяти час обертальної кореляції – час, що характеризує обертальну дифузію. Для сферичної частинки цей час можна оцінити за рівнянням

$$\tau_0 = \frac{3\eta V}{k_B T}$$

де η – в'язкість розчинника, V – об'єм молекули (або її елемента, який бере участь у даному процесі). Для молекули води $\tau_0 \sim 1$ пс. Для молекул розміром з нуклеотид або пару нуклеотидів час елементарного кроку (обертальної кореляції) зазвичай оцінюється в ~ 1 нс.

Швидкість багатьох молекулярних подій визначається саме дифузією, але велика кількість процесів за участю молекул відбувається за значно довший час. Відповідь на запитання "чому?" дає теорія проміжних станів Ейрінга (Henry Eyring). Теорія виходить із того, що для багатьох процесів на шляху перетворення молекули з форми А у форму В існує проміжний метастабільний стан – інтермедіат X^\ddagger (рис. 2.16). Вихідна й кінцева форми знаходяться у локальних мінімумах вільної енергії (оскільки вони взагалі стабільні). Інакше кажучи, навіть якщо стан В міститься нижче на шкалі вільної енергії, систему (електронну систему молекули,

її конформацію тощо) необхідно спочатку "збудити", активувати, відхиливши від рівноважного стабільного стану А, після чого вона автоматично "впаде" в стан В, оскільки він має нижчу вільну енергію.

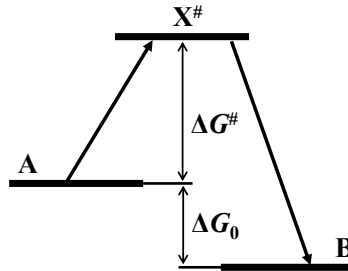


Рис. 2.16. Схема процесу перетворення молекулярної форми А у форму В

Отже, енергія інтермедіатного стану неодмінно є вищою, ніж енергія обох стабільних форм: наявність інтермедіату створює на шляху процесу енергетичний бар'єр ΔG^\ddagger , величина якого називається *вільною енергією активації* (на рис. 2.16 – різниця вільних енергій між інтермедіатом і станом А).

За принципом Больцмана, імовірність для молекули потрапити зі стану А в інтермедіатний стан визначається енергією активації, і кількість таких молекул

$$n^\ddagger = n_A \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{k_B T}\right)$$

де n_A – кількість молекул у стані А (зрозуміло, що кількості молекул тут і далі можна замінити концентраціями). За час елементарного кроку всі ці молекули перетворяться на форму В, після чого розпочнеться новий акт установаження квазірівноваги між станом А та інтермедіатом. Далі нова порція молекул перетвориться у форму В. Швидкість процесу зростання кількості молекул у формі В дорівнює відношенню квазірівноважної кількості інтермедіатів до часу елементарного кроку:

$$\frac{dn_B}{dt} = \frac{n^\ddagger}{\tau_0} = \tau_0^{-1} n_A \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{k_B T}\right). \quad (2.23)$$

Величина

$$k_1 = k_0 \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{k_B T}\right), \quad (2.24)$$

де $k_0 = \tau_0^{-1}$, називається *константою швидкості* (позначається зазвичай з індексом 1 для реакції, що розглядається як пряма) і має розмірність с^{-1} . Так само визначається константа швидкості оберненої реакції k_{-1} , тільки вільна енергія активації в цьому випадку (див. рис. 2.16) становить $\Delta G^\ddagger - \Delta G_0$ (якщо ΔG_0 визначена як різниця між станом В та А). Відповідно, відношення констант швидкості дорівнює константі рівноваги (див. рівн. (2.3); (2.9))

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \exp(-\Delta G_0 / RT) = K \quad (2.25)$$

(якщо розраховувати термодинамічні величини на моль речовини, а не на одну молекулу, як у рівн. (2.23); (2.24)), і це співвідношення є справедливим для процесів за участю будь-якої кількості молекул.

Зокрема, для бімолекулярних процесів усі наведені вище міркування зберігають свою силу. Відміна полягає лише в тому, що швидкість елементарного кроку тепер має залежати від частоти співударів двох молекул: під час зіткнення дві молекули перетворюються на квазікомплекс, і далі ефективність перетворення у справжній комплекс (або в іншу сполуку в разі хімічних реакцій) залежить від вільної енергії активації, тобто відбувається за схемою, наведеною на рис. 2.16. Отже, для бімолекулярної реакції між молекулами А1 і А2, замінивши кількості молекул їхніми концентраціями, замість концентрації C_A у рівн. (2.23) слід записати добуток $C_{A1}C_{A2}$, а замість k_0 у рівн. (2.23) і (2.24) – так звану бімолекулярну константу швидкості співударів, яка визначається швидкістю трансляційної дифузії та для сферичних частинок має вигляд

$$k_b = 4 \cdot 10^{-3} \pi r_0 (D_{A1} + D_{A2}) N_{AV}, \quad (2.26)$$

де r_0 – сума радіусів частинок (відстань мінімального наближення) (см), D – коефіцієнти дифузії ($\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$). Тоді розмірність цієї константи й константи швидкості k_1 становитиме $\text{М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$.

Як і будь-яка вільна енергія, ΔG^\ddagger має дві складові – ентальпійну та ентропійну (за рівн. (2.4)), тобто за рівн. (2.24)

$$\ln k_1 = \ln k_0 + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT}, \quad (2.27)$$

де ΔS^\ddagger і ΔH^\ddagger – ентропія та ентальпія активації відповідно. Остання величина визначає нахил лінійної залежності логарифма константи швидкості від оберненої температури ($\ln k_0$ змінюється з температурою дуже повільно і практично не впливає на характер температурної залежності константи швидкості). Саме з такої

залежності – графіка Арреніуса (Svante Arrhenius) – величину ΔH^\ddagger визначають експериментально, часто позначаючи її через E_a і називаючи просто енергією активації. Слід розуміти, що *енергія активації* та *вільна енергія активації* – різні величини. Енергія активації тотожна ентальпії активації: її позитивне значення свідчить про деформації, розриви зв'язків, напруження у проміжному стані – усі зміни, що супроводжуються поглинанням тепла. Ентропія активації характеризує міру ймовірності реалізації даного інтермедіатного стану: її негативне значення (яке гальмує реакцію) свідчить, наприклад, про те, що молекула має прийняти у проміжному стані певну конформацію – одну або кілька з великого набору можливих.

Повернемося до мономолекулярного процесу на рис. 2.16. Якщо в загальному випадку процес відбувається в обох напрямках (концентрація В збільшується у прямому процесі та зменшується у зворотному), загальну швидкість зміни в часі t концентрації В C_B слід записати як (виходячи з рівн. (2.23)–(2.25))

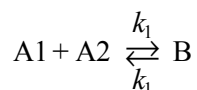
$$\frac{dC_B}{dt} = k_1 C_A - k_{-1} C_B = k_1 C_0 - (k_1 + k_{-1}) C_B, \quad (2.28)$$

де $C_0 = C_A + C_B$. Із початковою умовою $C_B = 0$ при $t = 0$ розв'язок цього рівняння має такий вигляд:

$$C_B = \frac{k_1 C_0 \{1 - \exp[-(k_1 + k_{-1})t]\}}{k_1 + k_{-1}}. \quad (2.29)$$

Суму констант швидкості часто позначають як $k_1 + k_{-1} = 1/\tau$, а τ називають часом релаксації (характеристичним часом досягнення рівноваги). Реєстрація експериментальної залежності C_B від t та підгонка під цю залежність рівн. (2.29) дозволяє визначити константи швидкості.

Для бімолекулярної реакції (зокрема асоціації двох молекул у комплекс)



швидкість зміни концентрації продукту (аналогічно до рівн. (2.28))

$$\frac{dC_B}{dt} = k_1 C_{A_1} C_{A_2} - k_{-1} C_B. \quad (2.30)$$

Розв'язок цього диференційного рівняння, яке можна легко отримати, є досить громіздким. Тому розглянемо лише два важливі особливі випадки. Перший часто створюється штучно в кінетичних експериментах: один із субстратів реакції береться

у великому надлишку, наприклад, А1. Тоді його вільну концентрацію C_{A1} , яка практично не змінюється в ході реакції, можна замінити на загальну концентрацію цього компоненту C_{A1}^0 . Рівняння стає еквівалентним рівнянню для швидкості мономолекулярної реакції (2.27), де замість k_1 стоїть $k_1 C_{A1}^0$, тобто розв'язок має вигляд:

$$C_B = \frac{k_1 (C_{A1}^0)^2 \{1 - \exp[-(k_1 C_{A1}^0 + k_{-1})t]\}}{k_1 C_{A1}^0 + k_{-1}}. \quad (2.31)$$

Другий випадок також досить часто зустрічається: реакція є необоротною ($k_{-1} = 0$). Розглянемо при цьому ситуацію, коли компоненти А1 і А2 присутні в суміші в однакових загальних концентраціях C_0 . Відповідно, однаковими є й концентрації вільних компонентів (C), а концентрація продукту $C_B = C_0 - C$. Отже, рівн. (2.30) можна переписати у вигляді швидкості зниження концентрації C :

$$\frac{dC}{dt} = -k_1 C^2,$$

а розв'язок є дуже простим:

$$C = \frac{C_0}{1 + k_1 C_0 t}. \quad (2.32)$$

2.5.2. Кінетика денатурації та ренатурації ДНК

Для процесу денатурації подвійної спіралі можна приблизно ототожнити вільну енергію активації з енергією меж (або ініціації розплавленої ділянки), яка обговорювалась у підрозділі 2.3: вилучення однієї пари основ із подвійної спіралі, власне, і є енергетично не вигідним інтермедіатом між спіральним і неспіральним станами. У складі цього інтермедіату вже втрачено ентальпійно вигідні контакти із сусідами по спіралі, але конформація ще залишається "замороженою" – конформаційна ентропія майже не змінюється. При об'єднанні двох ланцюгів у спіраль, навпаки, у складі інтермедіату втрачається конформаційна ентропія, тоді як ентальпія не змінюється – вона ще не знизилася завдяки вигідним контактам. Таким чином, вільноенергетичний бар'єр має різну природу при русі в цих двох протилежних напрямках: при утворенні спіралі бар'єр має бути переважно ентропійним (ентропія активації – гальмування конформаційного руху за відсутності ентальпійно вигідних взаємодій), а при руйнуванні – переважно ентальпійним (втрата ентальпійно вигідних взаємодій за відсутності зростання конформаційної свободи).

Висоту бар'єра вільної енергії для подовження неспіральної ділянки на одну пару основ тоді можна приблизно оцінити як величину ентальпії пари в неспіральному стані відносно спірального, тобто $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger = +9$ ккал/моль при 37°C , для одного нуклеотиду ця величина становить $+4,5$ ккал/моль. Відповідний бар'єр "з іншого боку" має дорівнювати приблизно величині $\Delta G^\ddagger = -T\Delta S^\ddagger = -T\Delta S_0 = +3,8$ ккал/моль для нуклеотиду в спіральному стані відносно неспірального (див. підпідрозд. 2.2.3). Висота цього другого бар'єра гальмує швидкість відповідної реакції незалежно від температури: константа швидкості помножується на фактор $\exp(\Delta S^\ddagger/R) \sim 2 \cdot 10^{-3}$ (рівн. (2.24), (2.27)). Для зворотної реакції з ентальпійним бар'єром швидкість залежить від температури. Зрозуміло, що різниця висоти двох бар'єрів дорівнює різниці вільних енергій між двома станами. При температурі плавлення дві константи швидкості є однаковими – різниця вільних енергій дорівнює нулю, тобто висоти обох бар'єрів однакові. Отже, при температурі, близькій до температури плавлення, для обох реакцій константа швидкості елементарного кроку має бути помноженою на $\sim 2 \cdot 10^{-3}$. Використовуючи наведену в підпідрозд. 2.5.1 оцінку часу обертальної кореляції ($\tau_0 \sim 1$ нс) і рівн. (2.24), можна оцінити константу швидкості як $\sim 2 \cdot 10^6 \text{ c}^{-1}$, що відповідає характеристичному часу $\sim 0,5$ мкс на нуклеотид або ~ 1 мкс на пару основ. Певна річ, ця оцінка є надто спрощеною, але вона непогано узгоджується з експериментом.

Кінетичні дослідження процесів денатурації / ренатурації ДНК зазвичай проводять методом температурного стрибка – різко змінюють температуру, після чого слідкують за зміною в часі певних спектральних характеристик. У повній відповідності з наведеними загальними міркуваннями, кінетичні експерименти з дволанцюговими олігонуклеотидами та спіральними шпильками в коротких одноланцюгових олігонуклеотидах свідчать про досить високу позитивну ентальпію активації для процесу денатурації подвійної спіралі. При формуванні ж спіралі швидкість реакції слабо залежить від температури, що вказує на близькість до нуля ентальпії активації (рівн. (2.27)). У деяких випадках навіть спостерігається негативне значення ентальпії активації, що може вказувати на не повну відсутність ентальпійно вигідних взаємодій у складі інтермедіату. Експериментально визначені константи швидкості утворення / руйнування короткої шпильки поблизу від температури плавлення дорівнюють 10^4 – 10^5 c^{-1} , характеристичний час на розплітання п'яти пар основ оцінюється з цих експериментів і експериментів на дволанцюгових олігонуклеотидах у ~ 10 мкс, тобто ~ 2 мкс на пару основ.

Якщо взяти останню величину як час, потрібний для зростання неспіральної ділянки на одну пару основ за високої температури, то можна було б очікувати, що для повного розплітання полімерної ДНК довжиною 100 тис. пар основ потрібно ~ 200 мс – це у випадку, коли зростання неспіральної ділянки відбувається з однієї точки. Насправді (підрозділ 2.3) таких точок багато, тобто повне плавлення має відбутися ще швидше. Проте експериментальні дослідження кінетики денатурації полімерної ДНК указують, що повне розходження ланцюгів у ДНК такої довжини відбувається за час від 1 до 20 хв.

Кінетика денатурації полімерної ДНК є досить складною: експериментальна константа швидкості виявляється залежною від часу розплітання – початкова швидкість знижується в ~20 разів наприкінці процесу. При цьому ця прикінцева швидкість залежить від висоти температурного стрибка (знижується при зростанні кінцевої температури, тобто зростанні ступеня остаточної денатурації), а також знижується при зростанні довжини ДНК і в'язкості розчинника. Усі ці факти легко зрозуміти, якщо взяти до уваги, що розплітання подвійної спіралі має супроводжуватись обертанням двох кінців один відносно одного (рис. 2.17). Такому обертанню спіральної ділянки навколо своєї осі протидіють сили тертя з розчинником, але вони не є суттєвими для дуплекса діаметром 2 нм – початкове обертання здійснюється зі швидкістю ~200 обертів за секунду. При подовженні неспіральної ділянки одноланцюгові клубки, що мають обертатися разом із фланкуючими їх дво-спіральними ділянками, зростають в об'ємі (див. розд. 4), і сили тертя цих клубків із розчинником суттєво гальмують обертання. Зрозуміло, що таке гальмування буде зростати при збільшенні в'язкості та кількості розплавлених ділянок за рахунок підвищення кінцевої температури експерименту або загальної довжини ДНК. Слід також зауважити, що, як видно з рис. 2.17, повне розходження ланцюгів ДНК буде неможливим за будь-яких умов, якщо зафіксувати кінці молекули (детальніше подібні ефекти розглядаються у розд. 5).

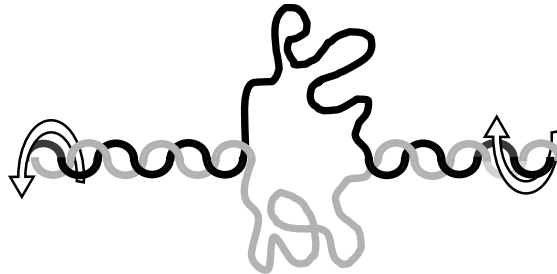


Рис. 2.17. Схема розплітання подвійної спіралі

Дослідження кінетики ренатурації ДНК, яка перед тим була повністю денатурована, є засобом вивчення загальних рис організації геномів, ефективності гібридизації різнорідних ДНК тощо. Наприклад, якщо здійснювати ренатурацію тотального препарату фрагментів геномної ДНК еукаріотичного організму, то реакція реасоціації ланцюгів буде точно підпорядкована рівнянню (2.32), котре можна переписати як

$$1 - C / C_0 = \frac{kC_0t}{1 + kC_0t},$$

де k – константа швидкості ренатурації. Частку ланцюгів, що піддалися ренатурації у момент часу t , (ліва частина рівняння, визначають за гіпохромним ефектом) відкладають як функцію C_0t (загальна концентрація ланцюгів C_0 відома), що показано на рис. 2.18. Точка напівреасоціації відповідає значенню $C_0t = k^{-1}$. Як видно з графіка, реакція відбувається в три етапи, ніби є три популяції фрагментів ДНК із суттєво різними константами швидкості. Насправді підвищення k еквівалентне підвищенню загальної концентрації фрагментів даного типу: найдовше реасоціюють фрагменти, загальна концентрація яких є досить високою часткою C_0 , але кожен з яких представлений у геномі однією копією. Найшвидше реасоціюють фрагменти, послідовності яких багато разів повторюються в геномі, проміжна сходинка – це так звані послідовності, що помірно повторюються.

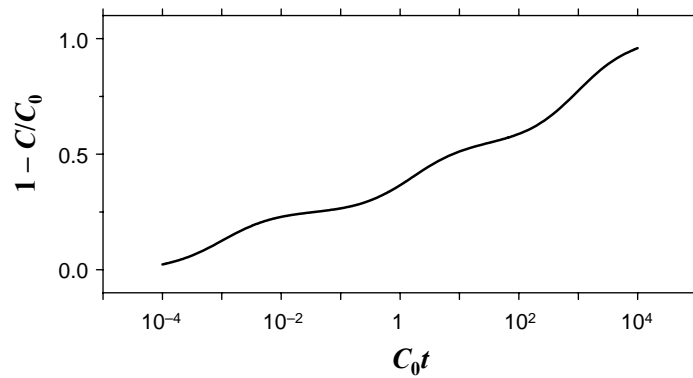


Рис. 2.18. Типова картина кінетики ренатурації
тотальної ДНК еукаріотичного геному

ЗАДАЧІ

2.1. Макромолекула знаходиться в рівновазі між двома структурними формами. Константа рівноваги не залежить від температури. Чому дорівнює різниця ентальпій ΔH між двома формами?

2.2. Макромолекула перебуває в рівновазі між двома структурними формами. Залежність константи рівноваги K від температури T підпорядкована емпіричному рівнянню $K = a \exp(b/T)$, де a і b – емпіричні константи. Знайдіть вирази для різниць вільної енергії, ентальпії та ентропії між двома станами через ці константи.

2.3. Користуючись рівнянням (2.10), розрахуйте енергію в одиницях $k_B T$ взаємодії двох елементарних зарядів (кожен дорівнює заряду електрона за абсолютною величиною), розташованих на відстані 5 \AA один від одного у водному розчині.

2.4. Мономер полімерної молекули може бути в 200 різноманітних конформаціях. Розрахуйте зміну ентропії та відповідного ентропійного внеску у вільну енергію (на одну мономерну одиницю при $27 \text{ }^\circ\text{C}$) при утворенні полімером чітко визначеної структури, у складі якої кожен мономер реалізує одну конформацію.

2.5. Вважаючи, що при утворенні подвійної спіралі зміна ентальпії $\Delta H_0 = -9$ ккал/моль, а ентропії $\Delta S_0 = -25$ ккал/моль·град (на одну пару основ), розрахуйте за рівн. (2.16) температуру плавлення в $^\circ\text{C}$ фрагмента ДНК довжиною 15 пар основ при загальній концентрації ДНК 1 мкг/мл . Візьміть 330 як молекулярну вагу одного нуклеотиду.

2.6. Користуючись даними табл. 2.1 і рівняннями (2.17а), (2.18), (2.19), а також розв'язком задачі 1.3 (в), розрахуйте температуру плавлення високополімерної ДНК випадкової послідовності з часткою GC-пар $0, 20, 40, 60, 80, 100 \%$ у 10 mM NaCl . Побудуйте графік залежності температури плавлення від частки GC-пар.

2.7. Користуючись поясненнями в тексті, отримайте вираз (2.22) із рівняння (2.20).

2.8. Розв'яжіть систему рівнянь (2.21) щодо питомої кількості спіральних/неспіральних ділянок ϕ (прирівнявши обидві похідні до нуля). Проаналізуйте отриманий розв'язок для граничних випадків $\sigma = 1$ та $\sigma = 0$. Побудуйте графік залежності ϕ від s для $\sigma = 10^{-4}$. Скільком парам основ за даного σ дорівнює середня довжина спіральних/не спіральних ділянок при температурі плавлення?

2.9. Нехай макромолекула може перебувати у двох упорядкованих структурних станах А і В, перехід з одного стану в інший є можливим через невпорядкований стан. Вільна енергія станів А і В відносно невпорядкованого стану дорівнює $-10 k_B T$ та $-15 k_B T$ відповідно. Користуючись рівняннями підпідрозд. 2.5.1, розрахуйте константи швидкості прямого та зворотного переходів між двома станами й константу рівноваги. Час елементарного кроку візьміть за 100 нс . Побудуйте графік залежності частки молекул у стані В від часу, якщо в нульовий момент часу всі молекули перебували у стані А.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Загальна

- Готлиб, Ю. Я.* Физическая кинетика макромолекул / Ю. Я. Готлиб, А. А. Даринский, Ю. Е. Светлов. – Л. : Химия, 1986.
- Кантор, Ч.* Биофизическая химия : в 3 т. / Ч. Кантор, П. Шиммел, – М. : Мир, 1984.
- Сердюк, И.* Методы в молекулярной биофизике: структура, функция, динамика : в 2 т. / И. Сердюк, Н. Заккаи, Дж. Заккаи. – М. : КДУ, 2009.
- Тэнфорд, Ч.* Физическая химия полимеров / Ч. Тэнфорд. – М. : Химия, 1965.
- Финкельштейн, А. В.* Физика белка : курс лекций / А. В. Финкельштейн, О. Б. Птицын. – М. : КДУ, 2007.
- Bloomfield, V. A.* Physical chemistry of nucleic acids / V. A. Bloomfield, D. M. Crothers, I. Tinoco. – N.Y. : Harper and Row, 1974.
- Computational studies of RNA and DNA / eds. J. Šponer, F. Lankaš. – Dordrecht, Netherlands : Springer, 2006.
- Dill, K. A.* The meaning of hydrophobicity / K. A. Dill // Science. – 1990. – Vol. 250. – P. 297–298.
- Gill, S. J.* An equation of state describing hydrophobic interactions / S. J. Gill, I. Wadso // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1976. – Vol. 73. – P. 2955–2958.
- Jeffrey, G. A.* Hydrogen bonding in biological structures / G. A. Jeffrey, W. Saenger. – Berlin : Springer, 1991.
- Molecular driving forces / eds. K. A. Dill, S. Brombert. – New York : Garland Sci., 2003.

Взаємодії, що стабілізують подвійну спіраль

- Cieplak, P.* Calculation of the free energy of association of nucleic acid bases in vacuo and water solutions / P. Cieplak, P. A. Kollman // J. Am. Chem. Soc. – 1988. – Vol. 110. – P. 3734–3739.
- Danilov, V. I.* Nature of the stacking of nucleic acid bases in water: a Monte Carlo simulation / V. I. Danilov, I. S. Tolokh // J. Biomol. Struct. Dyn. – 1984. – Vol. 2. – P. 119–130.
- Friedman, R. A.* A free energy analysis of nucleic acid base stacking in aqueous solution / R. A. Friedman, B. Honig // Biophys. J. – 1995. – Vol. 69. – P. 1528–1535.
- Luo, R.* The physical basis of nucleic acid base stacking in water / R. Luo, H. S. R. Gilson, M. J. Potter [et al.] // Biophys. J. – 2001. – Vol. 80. – P. 140–148.
- Protozanova, E.* Stacked-unstacked equilibrium at the nick site of DNA / E. Protozanova P. Yakovchuk, M. D. Frank-Kamenetskii // J. Mol. Biol. – 2004. – Vol. 342. – P. 775–785.
- Šponer, J.* Electronic properties, hydrogen bonding, stacking, and cation binding of DNA and RNA bases / J. Šponer, J. Leszczynski, P. Hobza // Biopolymers. – 2001. – Vol. 61. – P. 3–31.

Sukhodub L. F. Interaction and hydration of nucleic acid bases in vacuum. Experimental study / L. F. Sukhodub // Chem. Rev. – 1987. – Vol. 87. – P. 589–606.

Yakovchuk, P. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix / P. Yakovchuk, E. Protozanova, M. D. Frank-Kamenetskii // Nucleic Acids Res. – 2006. – Vol. 34. – P. 564–574.

Термостабільність ДНК

Chalikian, T. V. A more unified picture for the thermodynamics of nucleic acid duplex melting: a characterization by calorimetric and volumetric techniques / T. V. Chalikian, J. Volker, G. E. Plum [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1999. – Vol. 96. – P. 7853–7858.

Frank-Kamenetskii, M. D. Simplification of the empirical relationship between melting temperature of DNA, its GC content and concentration of sodium ions in solution / M. D. Frank-Kamenetskii // Biopolymers. – 1971. – Vol. 10. – P. 2623–2624.

Huguet, J. M. Single-molecule derivation of salt dependent base-pair free energies in DNA / J. M. Huguet, C. V. Bizarro, N. Forns [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – Vol. 107. – P. 15431–15436.

Jelesarov, I. The energetics of HMG box interaction with DNA: thermodynamic description of the target DNA duplexes / I. Jelesarov, C. Crane-Robinson, P. L. Privalov // J. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 294. – P. 981–995.

SantaLucia, J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics / J. SantaLucia // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1998. – Vol. 95. – P. 1460–1465.

Rouzina, I. Heat capacity effects on the melting of DNA / I. Rouzina, V. A. Bloomfield // Biophys. J. – 1999. Vol. 77. – P. 3242–3255.

Williams, M. C. Entropy and heat capacity of DNA melting from temperature dependence of single molecule stretching / M. C. Williams, J. R. Wenner, I. Rousina [et al.] // Biophys. J. – 2001. – Vol. 80. – P. 1932–1939.

Структурні переходи в ДНК

Веденов, А. А. Переход спираль-клубок в ДНК / А. А. Веденов, А. М. Дыхне, М. Д. Франк-Каменецкий // Успехи физ. наук – 1971. – Т. 105. – С. 479–519.

Гроссберг, А. Ю. Статистическая физика макромолекул / А. Ю. Гроссберг, А. П. Хохлов. – М. : Наука, 1989.

Cao, C. Dynamic opening of DNA during the enzymatic search for a damaged base / C. Cao, Y. L. Jiang, J. T. Stivers [et al.] // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2004. – Vol. 11. – P. 1230–1236.

Gueron, M. Studies of base pair kinetics by NMR measurement of proton exchange / M. Gueron, J. L. Leroy // Methods Enzymol. – 1995. – Vol. 261. – P. 383–413.

Ivanov, V. I. The B to A transition of DNA in solution / V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, E. E. Minyat, [et al.] // J. Mol. Biol. – 1974. – Vol. 87. – P. 817–833.

Krueger, A. Sequence-dependent base pair opening in DNA double helix / A. Krueger, E. Protozanova, M. D. Frank-Kamenetskii // Biophys. J. – 2006. – Vol. 90. – P. 3091–3099.

Lubchenko, Yu. L. Fine structure of DNA melting curves / Yu. L. Lubchenko, M. D. Frank-Kamenetskii, A. V. Vologodskii [et al.] // Biopolymers. – 1976. – Vol. 15. – P. 1019–1036.

Peck, L. J. Energetics of B-to-Z transition in DNA / L. J. Peck, J. C. Wang // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1983. – Vol. 80. – P. 6206–6210.

Vologodskii, A. V. Allowance for heterogeneous stacking in the DNA helix-coil transition theory / A. V. Vologodskii, B. R. Amirikyan, Y. L. Lyubchenko [et al.] // J. Biomol. Struct. Dyn. – 1984. – Vol. 2. – P. 131–148.

Wartell, R. M. Thermal denaturation of DNA molecules: comparison of theory with experiments / R. M. Wartell, A. S. Benight // Phys. Rep. – 1985. – Vol. 126. – P. 67–107.

Zimm, B. H. Theory of "melting" of the helical form in double chains of the DNA type / B. H. Zimm // J. Chem. Phys. – 1960. – Vol. 33. – P. 1349–1356.

Zimm, B. H. Theory of the phase transition between helix and random coil in polypeptide chains / B. H. Zimm, J. K. Bragg // J. Chem. Phys. – 1959. – Vol. 31. – P. 526–535.

Кінетика структурних перетворень ДНК

Craig, M. E. Relaxation kinetics of dimer formation by self complementary oligonucleotides / M. E. Craig, D. M. Crothers, P. Doty // J. Mol. Biol. – 1971. – Vol. 62. – P. 383–401.

Nelson, J. W. Comparison of the kinetics of ribooligonucleotide, deoxyribooligonucleotide, and hybrid oligonucleotide double-strand formation by temperature-jump kinetics / J. W. Nelson, I. Tinoco // Biochemistry. – 1982. – Vol. 21. – P. 5289–5295.

Record, M. T. Kinetics of the helix-coil transition in DNA / M. T. Record, B. H. Zimm // Biopolymers. – 1972. – Vol. 11. – P. 1435–1484.

Scheffler, I. E. Helix formation by dAT oligomers. I. Hairpin and straight-chain helices / I. E. Scheffler, E. L. Elson, R. L. Baldwin // J. Mol. Biol. – 1968. – Vol. 36. – P. 291–304.

Wetmur, J. G. Kinetics of renaturation of DNA / J. G. Wetmur, N. Davidson // J. Mol. Biol. – 1968. – Vol. 31. – P. 349–370.

Розділ 3

ДНК ЯК ПОЛІЕЛЕКТРОЛІТ

Молекула ДНК, завдяки іонізованим фосфатним залишкам, являє собою поліаніон із надзвичайно високою щільністю зарядів – два негативні заряди на 3,4 Å вздовж осі подвійної спіралі або на ~ 2 нм² її поверхні. Електростатична компонента вільної енергії ДНК, що згадувалась у попередньому розділі, є не тільки (і не стільки) енергією розштовхування між фосфатами, а являє собою загальну вільну енергію системи зарядів на фосфатах і на рухливих неорганічних катіонах – протиіонах. Висока щільність заряду полііона має нетривіальні наслідки щодо характеру його взаємодії з протиіонами, який, у свою чергу, зумовлює цікаві фізичні механізми впливу електростатики ДНК на її структуру, стабільність та взаємодію з іншими молекулами.

3.1. ЕЛЕКТРОСТАТИКА СИСТЕМИ РУХЛИВИХ ЗАРЯДІВ

За фундаментальним співвідношенням електростатики – рівнянням Пуассона (Siméon Poisson) – електростатичний потенціал Ψ у даній точці простору визначається об'ємною щільністю заряду ρ в цій точці:

$$\nabla^2 \Psi = -\frac{4\pi}{\varepsilon} \rho, \quad (3.1)$$

де ε – діелектрична проникність середовища (рівняння записане в системі СГСЕ). У лівій частині рівняння стоїть лапласіан – диференційний оператор Лапласа (Pierre de Laplace), вигляд якого залежить від системи координат, що застосовується, – у декартовій системі $\nabla^2 \Psi = \frac{d^2 \Psi}{dx^2} + \frac{d^2 \Psi}{dy^2} + \frac{d^2 \Psi}{dz^2}$. За рівнянням (3.1), якщо в середовищі знаходиться заряджене тіло та немає інших

зарядів, потенціал в усіх точках простору поза цим тілом визначається тією умовою, що лапласіан потенціалу дорівнює нулю. Якщо інші заряди присутні, то вони створюють своє електростатичне поле, і результуючий потенціал залежить від щільності заряду.

У випадку, коли заряджене (наприклад, негативно) тіло занурене в розчин електроліту (під електролітом будемо скрізь розуміти одноосновну 1–1 сіль типу NaCl), негативний потенціал, що створюється тілом у кожній точці простору, приводить до перерозподілу іонів: локальна концентрація протиіонів (катіонів) має зростати відносно середньої концентрації по розчину (за відсутності зарядженого тіла або на нескінченному віддаленні від нього), концентрація коіонів (аніонів) – знижуватись. Результуюча локальна щільність зарядів, таким чином, відрізняється від нуля (зрозуміло, що в цілому розчин є електронейтральним). Енергія взаємодії заряду $q = -ze$ ($z = \pm 1$ для катіонів та аніонів відповідно, e – заряд електрона) з полем, яке характеризується потенціалом Ψ , дорівнює $q\Psi$. За принципом Больцмана об'ємна щільність іонів (кількість частинок на одиницю об'єму) даного типу в точці з потенціалом Ψ дорівнює $n_0 \exp(-q\Psi/k_B T)$, де n_0 – середня по розчину об'ємна щільність іонів (однакова для катіонів та аніонів). Тобто

$$\begin{aligned} -\rho &= e(n_+ - n_-), \\ n_+ &= n_0 \exp(e\Psi/k_B T), \quad n_- = n_0 \exp(-e\Psi/k_B T), \end{aligned} \quad (3.2)$$

де n_+ і n_- – об'ємні щільності катіонів та аніонів відповідно. Підстановка цих співвідношень у рівн. (3.1) перетворює рівняння Пуассона на так зване *рівняння Пуассона – Больцмана*, яке є базовим для електростатики розчинів електролітів.

Уведемо кілька важливих величин, що часто використовуються:

- безрозмірний редукований потенціал $f = e\Psi/k_B T$;
- довжина Б'єррума (Niels Bjerrum) B – відстань між двома елементарними зарядами, на якій електростатична енергія їхньої взаємодії дорівнює тепловій енергії $k_B T$ (див. рівн. (2.10)), $B = e^2 / \epsilon k_B T$; для води при 27°C $B = 7,14 \text{ \AA}$.
- параметр Дебая – Хюккеля (Petrus Debye, Erich Hückel) κ^2 , який має розмірність оберненого квадрата довжини (величину $1/\kappa$ називають дебайвським радіусом) і який пропорційний іонній силі; для одноосновної солі $\kappa^2 = 8\pi V n_0$ або для водних розчинів при 27°C $\kappa^2 = 10,824 C \text{ нм}^{-2}$, якщо C – концентрація солі в молях на літр.

Використовуючи ці величини, після підстановки (3.2) у рівн. (3.1), помноживши ліву та праву частини на заряд електрона й розділивши на $k_B T$, отримаємо рівняння Пуассона – Больцмана у вигляді:

$$\nabla^2 f = \frac{1}{2} \kappa^2 [\exp(f) - \exp(-f)]. \quad (3.3)$$

Рівняння (3.3) легко узагальнюється для випадку присутності в розчині суміші іонів будь-якого типу: тоді права частина рівняння виглядає як $4\pi V$, помножене на суму експоненціальних членів типу $z_i n_i \exp(z_i f)$, де z_i – заряд іона типу i з урахуванням знаку (в одиницях елементарного заряду), n_i – середня по розчину об'ємна щільність цього іона.

Рішення диференційного рівняння (3.3) із двома граничними умовами (на поверхні зарядженого тіла та на нескінченній відстані від нього, див. нижче, а також підрозд. 3.3) дозволяє знайти значення потенціалу (а отже, і локальні концентрації іонів) у будь-якій точці. На жаль, таке рішення можна отримати тільки чисельно (що за наявності звичайного комп'ютера не становить жодних проблем) – розв'язати рівн. (3.3) в аналітичному вигляді неможливо навіть для найпростішого випадку, коли заряджене тіло являє собою точковий заряд.

Чисельні розрахунки є дуже важливим інструментом, проте різноманітні спрощені підходи, які дають приблизні та обмежені певними умовами оцінки, мають ту перевагу, що дозволяють легше зрозуміти фізичні механізми тих чи інших явищ і процесів. Найуживаніше спрощення рівняння Пуассона – Больцмана виходить із припущення, що енергія взаємодії іона з електростатичним полем є набагато меншою за теплову енергію: $|e\psi| \ll k_B T$ і, відповідно, $f \ll 1$. Це припущення є справедливим, якщо потенціал створюється невеличким зарядом – роль зарядженого тіла виконує елементарний точковий заряд, котрий розглядають як так званий центральний іон (без втрати загальності вважатимемо його аніоном). У такому випадку можна розкласти експоненти у рівн. (3.3) у степеневий ряд в оточенні $f = 0$, задовольнившись тільки першими двома членами: $\exp(\pm f) \approx 1 \pm f$. Тоді рівн. (3.3) перетворюється на відоме рівняння теорії електролітів – *рівняння Дебая – Хюккеля*:

$$\frac{d^2 f}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{df}{dr} = \kappa^2 f ,$$

де в лівій частині записано лапласіан у сферичній системі координат – оточення центрального іона вважається ізотропним, тобто потенціал залежить тільки від відстані r від центрального іона. У загальному випадку присутності в розчині суміші іонів будь-якого типу рівняння має такий самий вигляд, але тоді $\kappa^2 = 4\pi V \sum z_i^2 n_i = 10,824 J \text{ нм}^{-2}$, де $J = \frac{1}{2} \sum z_i^2 C_i$ (підсумовування здійснюється по всіх типах іонів, n_i та C_i – їхні середні об'ємні щільності та молярні концентрації). Величину J називають *іонною силою* – зрозуміло, що для одноосновної солі вона дорівнює просто молярній концентрації цієї солі, тому досить часто, і зокрема в цьому посібнику, терміни "іонна сила" та "концентрація солі" використовуються як синоніми.

З граничними умовами $\Psi \rightarrow 0$ при $r \rightarrow \infty$ та $\Psi \rightarrow e/\epsilon r$ при $r \rightarrow 0$ (у точці, де міститься центральний іон, інших іонів немає, і потенціал дорівнює добре відомому потенціалу точкового заряду в однорідному середовищі) розв'язання рівняння Дебая – Хюккеля має такий вигляд:

$$f = \frac{B}{r} \exp(-kr), \quad \Psi = \frac{e}{\epsilon r} \exp(-kr). \quad (3.4)$$

Отже, за рахунок того, що заряджене тіло (центральний іон) оточене рухливими іонами, електростатичний потенціал знижується з відстанню значно швидше, ніж це спостерігалось б за відсутності таких рухливих іонів (потенціал в однорідному середовищі помножується на фактор, що експоненціально зменшується з відстанню) – відбувається екранування центрального заряду іонною атмосферою, яка характеризується дебайвським радіусом $1/k$. Слід звернути увагу, що в разі нескінченно низької іонної сили ($k \rightarrow 0$), як цього й можна очікувати інтуїтивно, екранування зникає і потенціал просто дорівнює своєму значенню в однорідному середовищі, яке не містить інших зарядів. Така проста й зрозуміла поведінка іонного оточення змінюється радикально для високозаряджених поліелектролітів.

3.2. СПРОЩЕНА ТЕОРІЯ ПОЛІЕЛЕКТРОЛІТІВ

Теорія поліелектролітів, відома як теорія конденсації, в остаточному вигляді сформульована Меннінгом (Gerald Manning). Вона базується на спрощенні Дебая – Хюккеля й дозволяє зрозуміти незвичайний характер взаємодії полііона з оточуючими його протиіонами. ДНК у межах цієї теорії моделюється безтілесною низкою $N \gg 1$ негативних точкових зарядів (фосфатів), відділених один від одного відстанню b (рис. 3.1). Низка міститься в розчині одноосновної солі, і протиіони здатні зв'язуватися з фосфатами, у результаті чого сумарний заряд на кожному фосфаті $q = e(1 - \theta)$, де θ – ступінь зв'язування (кількість зв'язаних протиіонів на один фосфат). Відразу слід зауважити, що термін "зв'язування" в даному випадку не передбачає обов'язкового близького контакту між протиіоном та фосфатом (див. нижче). Кожен заряд створює на відстані r електростатичний потенціал, підпорядкований рівн. (3.4), тобто $\Psi = q \exp(-kr)/\epsilon r$.

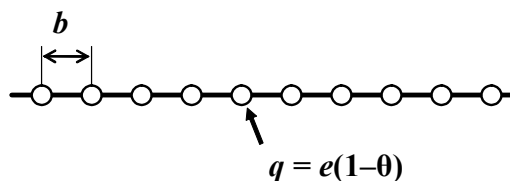


Рис. 3.1. Спрощена модель ДНК як низки негативних зарядів q

Вільна енергія такої системи (яку будемо відраховувати від стану незарядженого полііона) очевидно має два внески, які визначають рівноважне значення θ . Перший внесок – це електростатичне розштовхування між однойменними зарядами q : енергія взаємодії між зарядами має знижуватись при зростанні θ . Але при зв'язуванні протіонів створюється їхня висока локальна концентрація поблизу від полііона – розчин електроліту стає неоднорідним щодо концентрації, більш упорядкованим. Отже, другий внесок у вільну енергію – від ентропії змішування (підпдрозд. 2.1.2) неорганічних іонів – сприяє зниженню θ і рівномірнішому розподілу іонів по об'єму розчину. Сума двох внесків, які позначимо відповідно як G_{rep} та G_{mix} , за рівноважного значення θ (яке відповідає мінімуму цієї суми) і буде оцінкою електростатичного внеску в загальну вільну енергію ДНК, що його було позначено як G_{el} у рівн. (2.13).

Енергія розштовхування між зарядами полііона дорівнює сумі всіх попарних електростатичних взаємодій між його зарядами за рівн. (3.4):

$$G_{rep} = \frac{e^2(1-\theta)}{\epsilon} \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \frac{\exp(-kr_{ij})}{r_{ij}},$$

де підсумовування здійснюється по всім парам зарядів i, j , розділених відстанню r_{ij} . Подвійна сума містить $N-1$ членів, для яких $r = b$, $N-2$ членів із $r = 2b$ і т.д. Згрупувавши їх, можна позбутися подвійного підсумовування:

$$G_{rep} = \frac{e^2(1-\theta)^2}{\epsilon b} \sum_{i=1}^{N-1} (N-i) \frac{\exp(-ikb)}{i} \approx \frac{Ne^2(1-\theta)^2}{\epsilon b} \sum_{i=1}^N \frac{\exp(-ikb)}{i},$$

де остання рівність виконується з високою точністю, оскільки N – велике число. Позначивши в останній сумі $\exp(-kb) = x$ і взявши похідну від суми за x , знайдемо за відомою формулою суму отриманої геометричної прогресії (вважаючи її нескінченною). Узавши тепер інтеграл від цього виразу за x від 0 до x , можна знайти вихідну суму. Вона дорівнює $-\ln(1 - \exp(-kb))$, а за низької іонної сили (до $C \sim 0,1$ М) можна розкласти $\exp(-kb)$ у ряд, залишивши два

перші члени, і вважати, що сума $\approx -\ln(\kappa b)$. Підставивши цей вираз в останнє рівняння та розділивши ліву і праву частини на $Nk_B T$, отримаємо енергію розштовхування в одиницях $k_B T$ на один фосфат:

$$g_{rep} = -\xi(1-\theta)^2 \ln(\kappa b), \quad (3.5)$$

де $\xi = B/b$. Ця остання величина – міра лінійної щільності заряду поліелектроліту, яка вказує, у скільки разів відстань між сусідніми зарядами є меншою від б'єррумової довжини. Для подвійної спіралі ДНК $b = 1,7 \text{ \AA}$ (два заряди на кожні $3,4 \text{ \AA}$ уздовж осі спіралі) і $\xi = 4,2$. Як і очікувалось на підставі загальних міркувань, енергія розштовхування є позитивною (оскільки $\kappa b < 1$) і вона зменшується при зростанні іонної сили (тобто зростанні κ) і ступеня зв'язування протиіонів θ .

Протиіони, які перебувають у зв'язаному стані навкруг полііона, створюють там певну локальну молярну концентрацію C_{loc} , і хімічний потенціал (вільна енергія) в одиницях $k_B T$ одного такого протиіона $g_{loc} = g^0 + \ln C_{loc}$, де g^0 – стандартний хімічний потенціал (за рівн. (2.7)). У випадку незарядженого полііона (стан, від якого відраховуємо вільну енергію) або на великому віддаленні від нього концентрація протиіонів просто дорівнює середній концентрації по розчину C , і відповідний хімічний потенціал $g_0 = g^0 + \ln C$. Отже, різниця хімічних потенціалів $g_{loc} - g_0$, помножена на θ (оскільки розраховуємо вільну енергію на один фосфат), дасть зміну вільної енергії при переміщенні θ протиіонів з області з концентрацією C в область з концентрацією C_{loc} – внесок від ентропії змішування в загальну вільну енергію системи:

$$g_{mix} = \theta \ln \frac{C_{loc}}{C}. \quad (3.6)$$

Локальна молярна концентрація створюється θ протиіонами, розміщеними в певному циліндричному об'ємі навкруг полііона (низка фосфатів збігається з віссю циліндра, висота якого дорівнює b), тобто

$$C_{loc} = \theta / V_p, \quad (3.7)$$

де V_p – об'єм, при потраплянні в який протиіон вважається зв'язаним. Оскільки йдеться про молярну концентрацію, цей об'єм треба вимірювати в літрах та множити на число Авогадро (розрахувати на моль фосфатів). Іншими словами, V_p має розмірність л/моль. Отже,

$$g_{mix} = \theta \ln \frac{\theta}{V_p C}. \quad (3.8)$$

Таким чином, позитивний внесок від ентропії змішування, як і g_{rep} , знижується при зростанні іонної сили, але, на відміну від g_{rep} , зростає при збільшенні θ .

Щоб знайти рівноважне значення ступеня зв'язування θ , треба мінімізувати суму двох внесків у вільну енергію: продиференціювати суму правих частин рівн. (3.5) і (3.8) за θ і встановити значення змінної, яке перетворює похідну на нуль. Похідна має такий вигляд:

$$\frac{d(g_{rep} + g_{mix})}{d\theta} = 1 + 2\xi(1 - \theta) \ln Ab + \ln \frac{\theta}{V_p} + \xi(1 - \theta) \ln C - \ln C, \quad (3.9)$$

де у правій частині згруповано члени, що залежать від іонної сили (враховуючи, що $\kappa = AC^{1/2}$, $A = 3,29 \text{ nm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1/2}$, див. визначення κ у попередньому підпідрозділі). Коли концентрація солі C наближається до нуля (тут і далі мається на увазі концентрація доданої солі – при $C = 0$, виходячи з умови електронейтральності, загальна кількість протиіонів у розчині дорівнює кількості фосфатів), $\ln C \rightarrow -\infty$, і сума двох останніх членів може дорівнювати нулю тільки за однієї умови:

$$\theta = 1 - \xi^{-1}. \quad (3.10)$$

Отже, поведінка системи, що розглядається, кардинально залежить від величини ξ . При $\xi = 1$ $\theta = 0$, коли $C \rightarrow 0$, – виконується закон діючих мас, що є справедливим для будь-яких систем, де здійснюється рівноважна взаємодія між компонентами, яка описується рівняннями типу рівн. (2.9). При $\xi < 1$ розв'язання (3.10) узагалі не має фізичного сенсу: розглядати полііон як єдину систему зарядів вже не варто, оскільки відстань між зарядами полііона перевищує б'єрррмову довжину, і всі ці заряди взаємодіють з протиіонами незалежно один від одного. Але при $\xi > 1$ спостерігається **порушення закону діючих мас**: ступінь зв'язування протиіонів не залежить від їхньої загальної концентрації в розчині, і, що ще цікавіше, зберігає високе значення, коли ця концентрація є нескінченно низькою. Підставивши в рівн. (3.10) значення ξ для ДНК, отримаємо рівноважне значення $\theta = 0,76$.

Підставивши вираз для рівноважного θ (за якого сума двох останніх членів у рівн. (3.9) дорівнює нулю) в інші члени рівн. (3.9), можна знайти об'єм V_p , при якому дорівнює нулю сума перших трьох членів у правій частині цього рівняння (щоб уся похідна дорівнювала нулю). $V_p = eA^2b^2(1 - \xi^{-1}) = 0,646 \text{ л/моль}$ (тут e – основа натурального логарифма). Цей об'єм відповідає шару товщиною $\approx 7 \text{ \AA}$ навкруг подвійної спіралі ДНК (навколо циліндра з радіусом 10 \AA) – "зв'язування" протиіонів є делокалізованим. Інакше кажучи, зв'язування в

даному випадку означає проникнення протиіонів у певний простір навкруг полііона, де вони можуть вільно рухатись. За рівн. (3.7), (3.10) локальна концентрація протиіонів у шарі об'єму V_p $C_{loc} = 1,18 \text{ М}$ – і це в тому числі у випадку, коли загальна концентрація $C \rightarrow 0!$

Таку незвичайну взаємодію протиіонів з високо зарядженим поліелектролітом – делокалізоване зв'язування, що зумовлює створення високої локальної концентрації протиіонів навкруг полііона, причому ця концентрація не залежить від середньої концентрації протиіонів по розчину, – називають *конденсацією*.

Підстановка (3.10) у рівн. (3.5), (3.8) дає рівноважне значення загальної електростатичної вільної енергії поліелектроліту:

$$g_{rep} = -\xi^{-1} \ln kb = -\xi^{-1} \ln Ab - (2\xi)^{-1} \ln C,$$

$$g_{mix} = (1 - \xi^{-1}) \ln \frac{C_{loc}}{C}, \quad (3.11)$$

$$g_{el} = g_{rep} + g_{mix} = (1 - \xi^{-1}) \ln C_{loc} - \xi^{-1} \ln Ab - [1 - (2\xi)^{-1}] \ln C.$$

Для ДНК ($\xi = 4,2$) $g_{el} = 0,26 - 0,88 \ln C$. Отже, електростатична вільна енергія лінійно залежить від логарифма концентрації солі (знижуючись при зростанні іонної сили), що відразу пояснює саме такий характер емпіричної залежності, яку було наведено в попередньому розділі (рівн. (2.19)). За рівняннями (3.11), при зростанні концентрації солі C від $0,01 \text{ М}$ до $0,1 \text{ М}$ рівноважне значення g_{rep} знижується від $0,69$ до $0,41$, а g_{mix} – від $3,64$ до $1,89$, тобто внесок від ентропії змішування протиіонів у загальну електростатичну вільну енергію становить понад 80% .

Теорія конденсації передбачає наступний фізичний механізм дестабілізації подвійної спіралі ДНК за рахунок електростатичних взаємодій. Висока щільність негативного заряду на поверхні дуплекса зумовлює створення навкруг ДНК атмосфери протиіонів з високою локальною концентрацією, за рахунок чого ефективний негативний заряд на фосфатах суттєво знижується – енергетично невигідне електростатичне розштовхування практично зникає. Але за це системі доводиться платити енергетично невигідним ентропійним внеском у вільну енергію, викликаним великою різницею між концентрацією протиіонів поблизу від ДНК і на віддаленні від неї. Зрозуміло, що ця ентропійна компонента знижується при підвищенні загальної концентрації солі – коли концентрація на віддаленні від ДНК наближається до локальної. Отже, електростатичний дестабілізуючий внесок зумовлений головним чином не розштовхуванням між фосфатами (якого практично немає у присутності протиіонів), а ентропійно невигідним утворенням шару протиіонів навкруг поліелектроліту.

Оскільки теорія Меннінга базується на суттєвих спрощеннях, виникає питання, наскільки адекватно вона описує поведінку системи ДНК–протиіони. Зокрема, як буде показано в наступному підрозділі, на поверхні такого високо зарядженого поліелектроліту, як ДНК, створюється досить великий електростатичний потенціал, а це означає, що спрощення Дебая – Хюккеля не виправдовується. Але незважаючи на це, принципові висновки теорії конденсації зберігають свою силу й для більш реалістичних моделей.

3.3. РІВНЯННЯ ПУАССОНА – БОЛЬЦМАНА ДЛЯ ЗАРЯДЖЕНОГО ЦИЛІНДРА

Більш реалістичною, порівняно з низкою точкових зарядів, моделлю ДНК як поліелектроліту є рівномірно заряджений по поверхні циліндр із радіусом $a = 1$ нм та поверхневою щільністю зарядів $\sigma = e/(2\pi ab)$, де e – заряд електрона, b – висота ділянки циліндра, що містить один елементарний заряд (тобто це та сама величина b , що використовувалась у попередньому підрозділі). У цьому випадку зручно скористатись циліндричною системою координат. Якщо розглядати ділянку довгого циліндра, віддалену від його кінців, і вважати простір навколо циліндра ізотропним, електростатичний потенціал буде залежати тільки від однієї координати – відстані r від осі циліндра. Виходячи з рівн. (3.3), для циліндра запишемо рівняння Пуассона – Больцмана у вигляді:

$$\frac{1}{r} \frac{df}{dr} + \frac{d^2 f}{dr^2} = \kappa^2 \text{sh}(f), \quad (3.12)$$

де в лівій частині записано лапласіан у циліндричній системі координат, а гіперболічний синус $\text{sh}(f) = \frac{1}{2} [\exp(f) - \exp(-f)]$.

Розв'язання цього диференційного рівняння другого порядку потребує двох граничних умов. Одна з них є очевидною: напруженість електричного поля дорівнює нулю на нескінченно великій відстані від осі циліндра. Друга умова визначається необхідністю неперервності напруженості електричного поля циліндра зі внутрішнього та зовнішнього боку на його поверхні – напруженість поля на поверхні не може залежати від щільності протиіонів, а визначається (з обох боків) лише поверхневою щільністю заряду самого циліндра. За законами електростатики, напруженість поля дорівнює градієнту потенціалу,

і на поверхні циліндра $d\Psi/dr = -4\pi\sigma/\epsilon$. Підставивши наведений вище вираз для σ , помноживши обидві частини на заряд електрона та розділивши на $k_B T$, отримаємо граничні умови для рівн. (3.12):

$$\left. \frac{df}{dr} \right|_{r=a} = -\frac{2\xi}{a}, \quad \left. \frac{df}{dr} \right|_{r=\infty} = 0, \quad (3.13)$$

де знову $\xi = B/b$.

Розв'язок рівняння (3.12) з граничними умовами (3.13) може бути знайдено чисельними методами як залежність потенціалу f від відстані r від осі циліндра за певної концентрації солі (значення κ). Аналіз цього розв'язку для потенціалу f_a на поверхні циліндра дозволяє дослідити поведінку функції $S_a = \frac{1}{2} (\kappa a)^2 \text{ch}(f_a) = 2\pi B a^2 (n_+ + n_-)_a$, де гіперболічний косинус $\text{ch}(f_a) = \frac{1}{2} [\exp(f) + \exp(-f)]$, $(n_+ + n_-)_a$ – сума об'ємних щільностей (див. рівн. (3.2)) проти- та коіонів на поверхні циліндра (рис. 3.2).

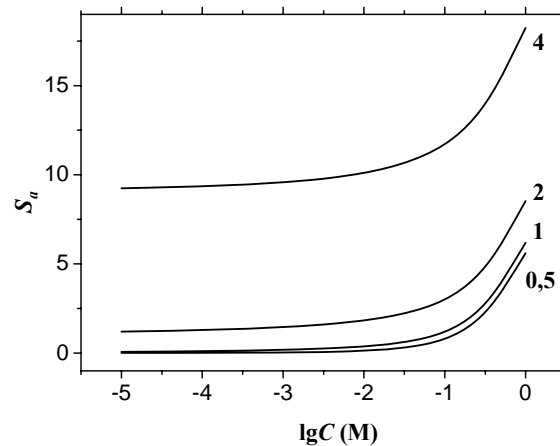


Рис. 3.2. Величина S_a , пропорційна концентрації іонів на поверхні зарядженого циліндра, як функція логарифма молярної концентрації солі. Цифрами біля кривих указано значення ξ

Виявляється, що S_a (яка є прямо пропорційною сумарній концентрації іонів на поверхні циліндра) при $C \rightarrow 0$ наближається до 0, якщо $\xi \leq 1$, і до $(\xi - 1)^2$, якщо $\xi > 1$. Тобто підтверджується принциповий висновок теорії конденсації про те, що для високо заряджених полііонів локальна концентрація протиіонів в найближ-

чому оточенні полііона (які є основним компонентом суми $(n_+ + n_-)_a$, див. рис. 3.3) зберігає високе значення навіть при нескінченно низьких іонних силах. При цьому локальна концентрація на поверхні слабо залежить від іонної сили при $C < 0,1$. Як показано на рис. 3.3, загальна концентрація іонної атмосфери також слабо залежить від іонної сили.

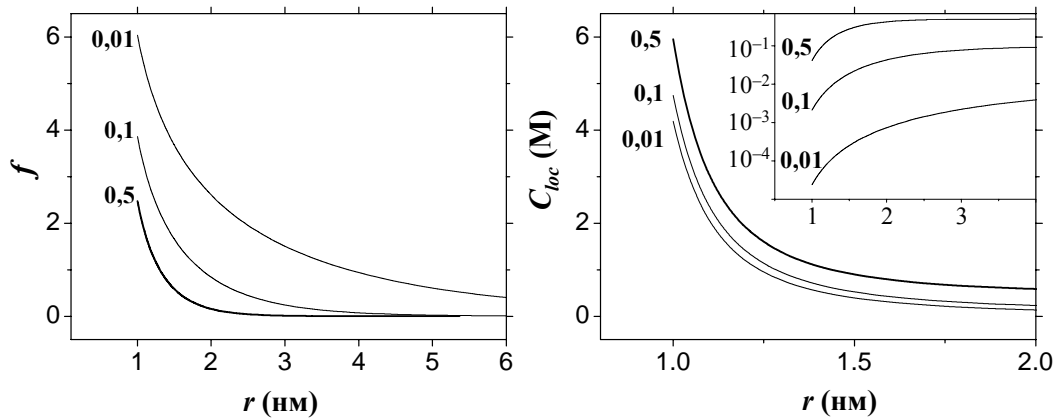


Рис. 3.3. Залежність редукованого потенціалу f і локальної молярної концентрації протиіонів від відстані від осі циліндра з лінійною щільністю зарядів $\xi = 4,2$. Середні концентрації солі (у молях на літр) на віддаленні від циліндра вказано біля кривих. На вставці: залежність локальної молярної концентрації коіонів (у логарифмічній шкалі) від r

Загальна вільна енергія системи циліндр–рухливі іони по відношенню до незарядженого циліндра (у рівноважному стані) може розглядатись як робота по заряджанню циліндра та іонної атмосфери навкруг нього. Ця енергія може бути також записана у вигляді інтегралу по відстані від осі циліндра від певних функцій потенціалу (в одиницях $k_B T$ на один фосфат):

$$g_{el} = (4\xi)^{-1} \int_0^{\infty} \left[(df/dr)^2 + 2\kappa^2 f \operatorname{sh}(f) - 2\kappa^2 (\operatorname{ch}(f) - 1) \right] r dr. \quad (3.14)$$

Три підінтегральні члени в рівнянні (3.14) мають ясний фізичний сенс. Перший член є аналогом енергії електростатичного розштовхування у попередньому підрозділі – це енергія електростатичного поля полііона, яка визначається

квадратом напруженості поля. Цей внесок був би єдиним внеском в енергію, якщо циліндр знаходився би в однорідному середовищі без інших зарядів. Його можна також переписати у вигляді:

$$g_{rep} = \int_V [(df/dr)^2 / 8\pi B] dV ,$$

де елемент об'єму (на один заряд поліелектроліту) $dV = 2\pi br dr$, тобто інтегрування по об'єму V замінюється на інтегрування по відстані r у рівн. (3.14).

Другий підінтегральний член у рівн. (3.14) є внеском від ентропії іонної атмосфери навкруг поліелектроліту (ентропії змішування іонів), яка визначається різницею у концентраціях іонів біля поверхні та в розчині на віддаленні від циліндра. Користуючись рівн. (3.2) та визначеннями редукованого потенціалу і параметру κ , цей член можна переписати як

$$g_{mix} = \int_V [n_+ \ln(n_+ / n_0) + n_- \ln(n_- / n_0)] dV ,$$

де $n_+ = n_0 \exp(f)$ та $n_- = n_0 \exp(-f)$ – щільності відповідно проти- та коіонів у елементі об'єму dV (порівн. рівн. 3.6).

Третій підінтегральний член у рівн. (3.14) є внеском (порівняно невеликим, див. нижче) від осмотичного тиску іонної атмосфери – осмотичний тиск створюється надлишком іонів у іонній атмосфері по відношенню до середньої концентрації іонів у розчині:

$$g_{osm} = - \int_V (n_+ + n_- - 2n_0) dV .$$

Величина $-g_{osm}$ чисельно дорівнює надлишковій (по відношенню до середньої по розчину) кількості іонів (в основному протиіонів), які містяться в іонній атмосфері циліндра на один фосфат. Аналіз рівняння Пуассона – Больцмана вказує, що при $C \rightarrow 0$ ця кількість, яку називають кількістю *термодинамічно зв'язаних* іонів, дорівнює $1 - (2\xi)^{-1}$.

Якщо після розв'язання рівн. (3.12) радіальний розподіл потенціалу є відомим, усі вказані енергетичні внески можуть бути розраховані шляхом чисельного інтегрування. Результат залежно від іонної сили розчину наведено на рис. 3.4.

Очевидно, що основний внесок у вільну енергію системи (що знову повністю узгоджується з висновками теорії конденсації) дає ентропія змішування протиіонів.

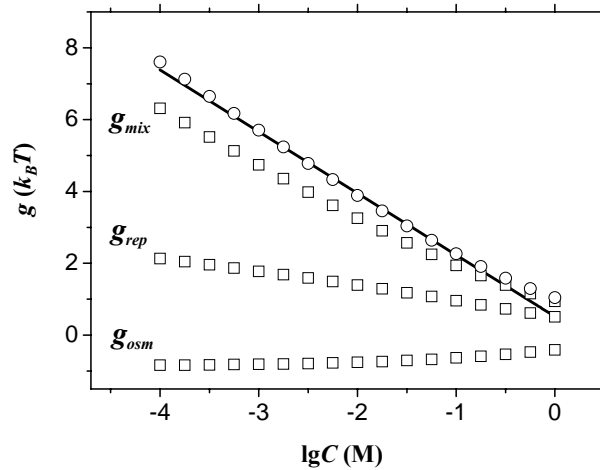


Рис. 3.4. Залежність загальної електростатичної вільної енергії ДНК як зарядженого циліндра ($\circ - g_{el}$ на один фосфат, представлено також лінійну апроксимацію залежності) та її окремих внесків (позначено біля кривих) від логарифма молярної концентрації солі

Так само, як передбачає теорія конденсації, електростатична вільна енергія майже лінійно залежить від логарифма концентрації солі. Негативний нахил залежності

$$-\frac{dg_{el}}{d \ln C} = 1 - (2\xi)^{-1}(1 + \delta) \quad (3.15)$$

дорівнює кількості термодинамічно зв'язаних іонів і при цьому слабо, але залежить від концентрації солі. Величина δ описує відхилення від "ідеальності": вона дорівнює нулю при $C \rightarrow 0$ і дещо зростає при підвищенні іонної сили. Загалом при $C \leq 0,1$ М непоганою апроксимацією є рівняння

$$g_{el} \approx -(1 - (2\xi)^{-1}) \ln C, \quad (3.16)$$

яке практично збігається з рівн. (3.11). Отже, незважаючи на суттєві відмінності в деталях, обидві теорії поліелектролітних властивостей ДНК, розглянуті в цьому та попередньому підрозділах, приводять до майже ідентичних висновків.

3.4. КОНДЕНСАЦІЯ ПРОТИІОНІВ НАВКРУГ ДНК

Модель рівномірно зарядженого циліндра очевидно базується на цілому ряді спрощень: вона не враховує конкретного розподілу дискретних фосфатних залишків по поверхні подвійної спіралі, дискретності та розміру неорганічних іонів, а також розглядає воду як однорідне середовище. Більш реалістичні методи розрахунків дозволяють узяти до уваги всі ці фактори. Зокрема, рівняння Пуассона – Больцмана може бути розв'язане для моделі, яка враховує всі структурні особливості поверхні ДНК.

Іншим підходом для розрахунку розподілу іонів навкруг ДНК є так званий *метод Монте-Карло*. При розрахунках за методом Монте-Карло задаються конкретні просторові координати фосфатних залишків фрагмента ДНК певної довжини та випадкові координати іонів різного знаку (за умови загальної електронейтральності) у деякому об'ємі навкруг ДНК – чим більшим буде об'єм такої "комірки", тим точнішим кінцевий результат. Зрозуміло, що загальна кількість іонів визначає певну іонну силу розчину. Для цієї випадкової конфігурації розраховують загальну енергію U_1 попарних електростатичних взаємодій між усіма зарядами в комірці за законом Кулона. На наступному кроці іони випадковим чином (використовується генератор випадкових чисел) змінюють свої просторові координати. Нова енергія взаємодій U_2 порівнюється з попередньою: якщо $P = \exp[-(U_2 - U_1)/k_B T] > 1$ (тобто $U_2 < U_1$) приймається нова конфігурація системи; якщо $U_2 > U_1$ – нова конфігурація приймається у випадку $P > n$ і відхиляється, коли $P < n$, де n – випадкове число від 0 до 1. Після цього здійснюється нове випробування зі зміщенням іонів від прийнятої конфігурації. Через достатньо велику кількість таких кроків енергія U знижується, після чого починає осцилювати навколо певного рівноважного значення. Усі рівноважні конфігурації запам'ятовуються та аналізуються статистичними методами.

У методі *молекулярної динаміки* також розглядається комірка, яка містить макромолекулу (наприклад, ДНК), певну кількість іонів і молекул води. Для всіх молекул задаються координати кожного атома, виходячи зі структурних даних. Усі атоми здатні рухатись відповідно до другого закону Ньютона (Isaac Newton), згідно з яким сила дорівнює добутку маси на прискорення:

$$\mathbf{F}_i = m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2},$$

де m_i – маса атома, \mathbf{r}_i – вектор у тривимірному просторі, що задає координати атома, \mathbf{F}_i – сила, яка діє на i -й атом і визначається його взаємодіями з іншими атомами:

$$\mathbf{F}_i = -\left(\mathbf{i} \frac{dU}{dx} + \mathbf{j} \frac{dU}{dy} + \mathbf{k} \frac{dU}{dz} \right),$$

де U – потенціальна енергія взаємодії i -го атома з усіма іншими атомами, яка враховує всі типи міжатомних взаємодій, \mathbf{i} , \mathbf{j} , \mathbf{k} – одиничні вектори вздовж осей декартової системи координат. Розв'язання системи таких рівнянь для всіх атомів дозволяє отримати траєкторії та швидкості руху атомів залежно від часу t . Врешті-решт система сягає рівноважного стану, навкруг якого осцилює, і всі усереднені характеристики можуть бути розраховані. Метод молекулярної динаміки (як і метод Монте-Карло) широко використовується для вивчення структурної динаміки макромолекул (деякі приклади наведено в наступних розділах).

Результати більш детальних розрахунків загалом свідчать, що модель рівномірно зарядженого циліндра досить точно описує розподіл іонів навколо подвійної спіралі при іонних силах $\leq 0,1$ М, тобто в тому числі за приблизно фізіологічних умов. Проте цілком зрозуміло, що такі розрахунки дозволяють з'ясувати тонкі деталі організації атмосфери конденсованих протиіонів.

Зокрема, за результатами розрахунків молекулярної динаміки, радіальний розподіл протиіонів навкруг ДНК характеризується досить чіткою шаруватою структурою: частота присутності протиіонів як функція відстані від поверхні дуплекса, зменшуючись з відстанню (на кшталт залежностей на рис. 3.3), має вигляд згасаючих коливань. Така поведінка є прямим наслідком урахування реального розміру іонів – за високої локальної концентрації протиіони мають тенденцію розміщуватись навкруг ДНК циліндричними шарами, товщина яких приблизно відповідає діаметру іонів. Цікаво, що параметри цієї шаруватої іонної атмосфери практично збігаються з оцінками теорії Меннінга: радіус, на якому проявляється "шарувата структура", становить ~ 9 Å, кількість протиіонів на один фосфат у її складі дорівнює 0,76. Теорію конденсації підтверджує також той факт, що в комп'ютерних експериментах протиіони в оточенні ДНК досить швидко дифундують. Пряме зв'язування іонів із негативно зарядженими сайтами на поверхні подвійної спіралі також фіксується, але на дуже маленький проміжок часу: середній інтервал, протягом якого іон залишається зв'язаним, становить від 100 до 400 пс (максимально 1 нс) для Na^+ і <70 пс для K^+ .

Феномен конденсації протиіонів підтверджується також експериментально. Результати рентгенівського розсіювання під малими кутами свідчать про наявність атмосфери із делокалізовано зв'язаних протиіонів, причому характер розподілу іонів добре узгоджується з рівнянням Пуассона – Больцмана для зарядженого циліндра.

В ЯМР-експериментах вивчалась швидкість квадрупольної релаксації ядер ^{23}Na у присутності ДНК – ця швидкість залежить від зовнішнього електростатичного поля, в якому опиняється ядро. Як свідчать результати цих досліджень, іони Na^+ практично не піддаються дегідратації та не іммобілізуються молекулою ДНК (спостерігається делокалізована взаємодія). Усі іони розчину при цьому можна розділити на дві популяції, і на підставі такої моделі двох станів на один фосфатний залишок припадає $\sim 0,75$ іонів, поведінка яких змінюється у присутності ДНК. Ця остання величина, яка збігається з величиною θ у підрозд. 3.2, *не залежить* від загальної концентрації солі. Однак експерименти такого типу виявляють деяку невелику різницю в спорідненостях до ДНК певних іонів, яка відображає, імовірно, деякі невеликі внески від неелектростатичних взаємодій. Одновалентні катіони розташовуються за спорідненістю до ДНК у ряд $\text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+ > \text{Na}^+$. Слід зауважити, що конденсація протиіонів навколо ДНК не виключає, а, навпаки, передбачає тимчасове фізичне зв'язування протиіонів із фосфатними залишками та іншими елементами поверхні – висока локальна концентрація створює сприятливі умови для такого зв'язування. Проте за результатами ЯМР-експериментів із ^{23}Na проникнення іона Na^+ у маленький жолобок являє собою дуже рідку подію – 1 : 1000 порівняно з частотою проникнення туди молекул води, хоча, щойно опинившись у маленькому жолобку, іон може провести там до 50 нс.

Отже, виходячи з матеріалу двох попередніх підрозділів, можна сформулювати наступні основні положення щодо особливостей і фізичних механізмів поведінки системи, що включає ДНК та неорганічний електроліт.

- Для молекули ДНК спостерігається феномен *конденсації* протиіонів – створення іонної атмосфери з високою локальною концентрацією, яка слабо залежить від загальної іонної сили розчину і залишається високою навіть у випадку, коли іонна сила прямує до нуля.

- Фізичний механізм конденсації полягає в тому, що протиіони "прагнуть" нейтралізувати негативні заряди фосфатних залишків, розташованих на поверхні ДНК з високою щільністю. Унаслідок цього *енергія електростатичного розитовхування між однойменними зарядами фосфатів суттєво знижується*, але за ціну *підвищення ентропійної компоненти вільної енергії*, зумовленої утворенням концентрованої іонної атмосфери.

- *Головний внесок* у зумовлену електростатичними взаємодіями частину вільної енергії ДНК дає саме цей *ентропійний член*, який визначається різницею концентрацій протиіонів у найближчому оточенні ДНК і на віддалі від неї. Зростання іонної сили приводить до часткового вирівнювання цих концентрацій, а отже, до зниження невідгідного ентропійного члена вільної енергії. У результаті електростатична вільна енергія ДНК практично лінійно знижується при зростанні логарифма загальної концентрації солі у розчині.

3.5. ВПЛИВ ІОННОГО ОТОЧЕННЯ НА ФІЗИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДНК

Зумовлена електростатичними взаємодіями залежність різноманітних властивостей ДНК від іонної сили повністю описується в рамках уявлень про конденсацію протиіонів навкруг ДНК. Нижче розглянуто три головні ефекти, два з яких обговорюються також у наступних розділах.

3.5.1. Механізм взаємодії позитивно заряджених лігандів із ДНК

Цей механізм є безпосереднім наслідком феномену конденсації протиіонів. Оскільки навкруг ДНК формується ентропійно не вигідна іонна атмосфера, зв'язування будь-якого позитивно-зарядженого ліганду, майже ніяк не змінивши ступеня нейтралізації фосфатів, приведе до визволення певної порції конденсованих протиіонів у зовнішній розчин, тобто до зростання неупорядкованості (ентропії) у системі (рис. 2, кольор. вст.). Отже, електростатичне зв'язування такого ліганду з нуклеїновою кислотою має цілком ентропійну природу. Енергетичний вигравш від зв'язування (спорідненість ліганду до ДНК) є тим більшим, чим меншою є концентрація солі в розчині, тобто різниця між концентрацією катіонів поблизу від ДНК і на віддалі від неї. Відповідно, підвищення іонної сили, як добре відомо, приводить до зниження спорідненості та врешті-решт – до дисоціації комплексу.

У межах теорії конденсації можна вважати, що $Z(1 - (2\xi)^{-1})$ протиіонів звільнюється з іонної атмосфери у відповідь на зв'язування ліганду із зарядом Z (в одиницях елементарного позитивного заряду). Іншими словами, що вільна енергія ДНК при зв'язуванні змінюється на величину $-Zg_{el}$, де g_{el} підпорядковане приблизному співвідношенню (3.16). Інакше кажучи, внесок електростатичних взаємодій у загальний енергетичний вигравш від зв'язування (який визначає спорідненість ліганду до ДНК) становить $-Zg_{el}$ одиниць $k_B T$, і цей внесок є прямо пропорційним логарифму концентрації солі. Численні експерименти повністю підтверджують саме такий характер залежності спорідненості від іонної сили. Електростатичний внесок у загальну енергію взаємодій лігандів із ДНК розглядається також у 6 та 7 розділах.

3.5.2. Вплив іонної сили на вигин ДНК

Досі в неявному вигляді припускалося, що молекула ДНК є прямою – зокрема, саме прямий циліндр аналізувався в підрозд. 3.3. Але рівняння Пуассона – Больцмана, як і інші підходи, може бути застосованим і для вигнутого циліндра. У цьому випадку має бути зміненим як вигляд лапласіана, так і граничні умови на поверхні циліндра: лінійна щільність заряду (величина ξ) не змінюється при вигині, але зростає поверхнева щільність із внутрішнього боку вигину (нижня частина молекули на рис. 3.5) і знижується на протилежному боці подвійної спіралі. Відповідно, відбувається перерозподіл іонної атмосфери, що пов'язано з додатковими ентропійними витратами – електростатичний внесок у жорсткість ДНК щодо вигину зумовлений саме такими витратами. А оскільки локальна концентрація протиіонів у складі іонної атмосфери практично не залежить від іонної сили розчину, цей внесок від перерозподілу протиіонів, а отже, і загальна жорсткість ДНК також не залежать від концентрації солі. Точніше, вплив іонної сили на жорсткість подвійної спіралі починає проявлятися за дуже низьких концентрацій солі внаслідок електростатичного розштовхування між віддаленими ділянками вигнутої ДНК – це питання розглядається також у розд. 4.

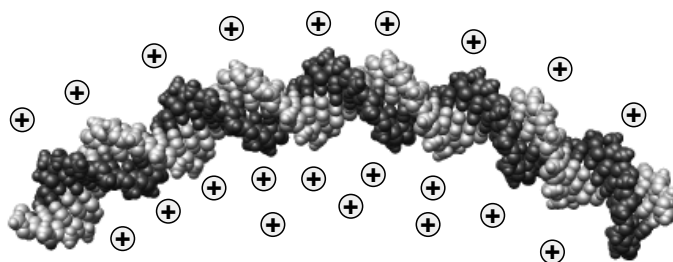


Рис. 3.5. Схема перерозподілу протиіонів при вигині ДНК

Зрозуміло, що зв'язування молекули білка (за електростатичним механізмом) із внутрішнього боку вигину має привести до асиметричної нейтралізації зарядів ДНК. Відповідно, вигідний ентропійний ефект від визволення протиіонів має зростати порівняно з таким ефектом при зв'язуванні з прямою молекулою (див. рис. 3.5). За цією логікою, асиметрична нейтралізація фосфатів на поверхні ДНК повинна сприяти вигнутому стану молекули: із внутрішнього боку протиіонів узагалі немає, а на зовнішньому боці вигин забезпечує визволення певної частини протиіонів унаслідок зниження поверхневої щільності заряду. Подібні міркування отримали повне підтвердження в експериментах з молеку-

лами ДНК, у складі яких було здійснено асиметричну модифікацію фосфатних залишків (заміну їх на електронейтральний аналог фосфату метилфосфонат). Модифікація, здійснена з одного боку подвійної спіралі, приводить до вигину молекули на $\sim 20^\circ$, тобто вигнутий стан стає енергетично вигідним.

3.5.3. Вплив іонної сили на стабільність подвійної спіралі

За положеннями теорії конденсації подвійна спіраль має бути менш стабільною (стосовно електростатичних взаємодій) порівняно з одноланцюговою ДНК: вища щільність заряду подвійної спіралі зумовлює більш концентровану іонну атмосферу навколо неї. Підвищення іонної сили нівелює цю різницю в невідповідних ентропійних внесках для дуплекса та одноланцюгового стану – різниця вільних енергій знижується й відносна стабільність дуплекса підвищується.

Кількісно це можна описати, виходячи з рівн. (3.16): різниця (на один фосфат) електростатичних вільних енергій в одиницях $k_B T$ дуплекса (h) та одноланцюгового стану (c) становить

$$\Delta g_{el} = g_{el}^h - g_{el}^c = \frac{1}{2}(\xi_h^{-1} - \xi_c^{-1}) \ln C, \quad (3.17)$$

де ξ_h і ξ_c – безрозмірні лінійні щільності заряду подвійної спіралі та одноланцюгової форми відповідно. Величина $\xi_c \sim 1,8$ (установлено за характером залежності температури плавлення від іонної сили) відповідає середній відстані між сусідніми фосфатами в конформаційно рухливій одноланцюговій формі $b_c \sim 4 \text{ \AA}$. Тобто, повертаючись до прийнятих у розд. 2 позначень (де вільна енергія виражалась на одну пару основ та в ккал/моль), різницю вільних енергій між двома станами ДНК можна записати як

$$\Delta G = \Delta G_0 + RT(\xi_h^{-1} - \xi_c^{-1}) \ln C, \quad (3.18)$$

де ΔG_0 – усі внески правої частини рівн. (2.13), крім ΔG_{el} (тобто всі, що не залежать від іонної сили). Отримане рівняння збігається за виглядом з емпіричним рівн. (2.19), коефіцієнт перед логарифмом дорівнює $-0,19$. Враховуючи, що електростатичний внесок у вільну енергію є цілком ентропійним, а $\Delta G = 0$ при температурі плавлення T_m , отримаємо з рівн. (2.15)

$$\frac{1}{T_m} = \frac{\Delta S_0 + \Delta S_{el}}{\Delta H_0} = \frac{1}{T_m^0} - \frac{R(\xi_h^{-1} - \xi_c^{-1})}{\Delta H_0} \ln C, \quad (3.19)$$

де $\Delta S_{el} = -R(\xi_h^{-1} - \xi_c^{-1}) \ln C$, ΔS_0 – усі неелектростатичні внески в ентропію, $\Delta H_0 \approx -9$ ккал/моль (див. підпідрозд. 2.2.3), $T_m^0 = \Delta H_0 / \Delta S_0$ – температура плавлення при $C = 1$ М. Оскільки абсолютна температура плавлення змінюється в досить вузькому інтервалі, залежність T_m від логарифма іонної сили також є практично лінійною – з останнього рівняння нахил залежності T_m від $\ln C$ дорівнює

$$\frac{dT_m}{d \ln C} = \frac{RT^2}{\Delta H_0} (\xi_h^{-1} - \xi_c^{-1}).$$

У діапазоні температур, що цікавить, величина $RT^2/\Delta H_0 = -25 \pm 3^\circ$, тобто її можна вважати константою. Підставивши числові значення, маємо остаточно

$$\frac{dT_m}{d \lg C} = 18 \pm 2^\circ,$$

що збігається з нахилом емпіричної залежності на рис. 2.8.

ЗАДАЧІ

3.1. Знайдіть загальний розв'язок рівняння Дебая – Хюккеля для точкового елементарного заряду і використовуючи наведені в тексті граничні умови, отримайте вираз (3.4).

3.2. Користуючись поясненнями щодо виводу рівн. (3.5), розрахуйте суму в попередньому до цього рівняння виразі для вільної енергії розштовхування зарядів поліелектроліту.

3.3. За рівн. (3.11) обчисліть для ДНК ($\xi = 4,2$) залежності електростатичної вільної енергії та двох її окремих внесків від логарифма концентрації солі в діапазоні від $C = 0,001$ до 1 М ($\lg C$ змінюйте від -3 до 0 із кроком $0,5$). Побудуйте відповідні графіки й порівняйте їх із залежностями на рис. 3.4.

3.4. За рівн. (3.19) розрахуйте залежність температури плавлення у $^{\circ}\text{C}$ від $\lg[\text{NaCl}]$ та побудуйте відповідний графік. Скористайтесь значеннями $\xi_c = 1,8$, $\Delta S_0 = -24,85$ кал/моль·град, $\Delta H_0 = -9$ ккал/моль.

3.5. Користуючись рівн. (3.17), (3.18), знайдіть діапазон значень ξ_c і, відповідно, b_c , якщо значення коефіцієнта перед $\ln C$ у рівн. (3.18) знаходиться в діапазоні від $-0,175$ до $-0,2$.

3.6. Користуючись рівняннями підпдрозд. 3.5.3, розрахуйте значення ΔS_{el} для концентрацій солі в діапазоні від $0,001$ до 1 М, узявши $\xi_c = 1,8$. Порівняйте отримані значення з величиною ΔS_0 .

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Загальна

Anderson, C. F. Polyelectrolyte theories and their application to DNA / C. F. Anderson, M. T. Record // Annu. Rev. Phys. Chem. – 1982. – Vol. 33. – P. 191–222.

Anderson C. F. Ion distributions around DNA and other cylindrical polyions – theoretical descriptions and physical implications / C. F. Anderson, M. T. Record // Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. – 1990. – Vol. 19. – P. 423–465.

Anderson, C. F. Salt-nucleic acid interactions / C. F. Anderson, M. T. Record // Annu. Rev. Phys. Chem. – 1995. – Vol. 46. – P. 657–700.

Sharp, K. A. Electrostatic interactions in macromolecules: theory and applications / K. A. Sharp, B. Honig // Annu. Rev. Biophys. Chem. – 1990. – Vol. 19. – P. 301–332.

Теорія конденсації протиіонів

Manning, G. S. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with application to the electrostatic properties of polynucleotides / G. S. Manning // Quart. Rev. Biophys. – 1978. – Vol. 11. – P. 179–246.

Рівняння Пуассона – Больцмана

Anderson, C. F. The relationship between the Poisson–Boltzmann model and the condensation hypothesis: an analysis based on the low salt form of the Donnan coefficient / C. F. Anderson, M. T. Record // Biophys. Chem. – 1980. – Vol. 11. – P. 353–360.

Chu, V. B. Evaluation of ion binding to DNA duplexes using a size-modified Poisson–Boltzmann theory / V. B. Chu, Y. Bai, J. Lipfert [et al.] // Biophys. J. – 2007. – Vol. 93. – P. 3202–3209.

Honig, B. Classical electrostatics in biology and chemistry / B. Honig, A. Nicholls // Science. – 1995. – Vol. 268. – P. 1144–1149.

Jayaram, B. The electrostatic potential of B-DNA / B. Jayaram, K. A. Sharp, B. Honig, // Biopolymers. – 1989. – Vol. 28. – P. 975–993.

Klein, B. K. Comparison of Poisson–Boltzmann and condensation model expressions for the colligative properties of cylindrical polyions / B. K. Klein, C. F. Anderson, M. T. Record // Biopolymers. – 1981. – Vol. 20. – P. 2263–2280.

Le Bret, M. Distribution of counterions around a cylindrical polyelectrolyte and Manning's condensation theory / M. Le Bret, B. H. Zimm // Biopolymers. – 1984. – Vol. 23. – P. 287–312.

Sharp, K. A. Calculating total electrostatic energies with the nonlinear Poisson–Boltzmann equation / K. A. Sharp, B. Honig // *J. Phys. Chem.* – 1990. – Vol. 94. – P. 7684–7692.

Shkel, I. A. Asymptotic solution of the cylindrical nonlinear Poisson–Boltzmann equation at low salt concentration: analytic expressions for surface potential and preferential interaction coefficient / I. A. Shkel, O. V. Tsodikov, M. T. Record // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99. – P. 2597–2602.

Методи Монте-Карло та молекулярної динаміки

Le Bret, M. Monte Carlo determination of the distribution of ions about a cylindrical polyelectrolyte / M. Le Bret, B. H. Zimm // *Biopolymers.* – 1984. – Vol. 23. – P. 271–285.

Mills, P. Monte Carlo studies of counterion-DNA interactions. Comparison of the radial distributions of counterions with predictions of other polyelectrolyte theories / P. Mills, C. F. Anderson, M. T. Record // *J. Phys. Chem.* – 1985. – Vol. 89. – P. 3984–3994.

Paulsen, M. D. Counterion exchange reactions on DNA: Monte Carlo and Poisson–Boltzmann analysis / M. D. Paulsen, C. F. Anderson, M. T. Record // *Biopolymers.* – 1985. – Vol. 27. – P. 1249–1265.

Ponomarev, S. Y. Ion motions in molecular dynamics simulations on DNA / S. Y. Ponomarev, K. M. Thayer, D. L. Beveridge // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101. – P. 14771–14775.

Várnai, P. DNA and its counterions: a molecular dynamics study / P. Várnai, K. Zakrzewska // *Nucl. Acids Res.* – 2004. – Vol. 32. – P. 4269–4280.

Експериментальні дослідження взаємодії ДНК та іонів

Andresen, K. Mono- and trivalent ions around DNA: a small-angle scattering study of competition and interactions / K. Andresen, X. Qiu, S.A., Pabit [et al.] // *Biophys. J.* – 2008. – Vol. 95. – P. 287–295.

Bleam, M. L. Sodium-23 nuclear magnetic resonance studies of cation-deoxyribonucleic acid interactions / M. L. Bleam, C. F. Anderson, M. T. Record // *Biochemistry.* – 1983. – Vol. 22. – P. 5418–5425.

Braunlin, W. H. ²³Na-NMR investigations of counterion exchange reactions of helical DNA / W. H. Braunlin, C. F. Anderson, M. T. Record // *Biopolymers.* – 1986. – Vol. 25. – P. 205–214.

Das, R. Counterion distribution around DNA probed by solution x-ray scattering / R. Das, T. T. Mills, L. W. Kwok [et al.] // *Phys. Rev. Lett.* – 2003. – Vol. 90, 188103.

Denisov, V. P. Sequence-specific binding of counterions to B-DNA / V. P. Denisov, B. Halle // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97. – P. 629–633.

Horkay, F. Anomalous small angle X-ray scattering determination of ion distribution around a polyelectrolyte biopolymer in salt solution / F. Horkay, A. M. Hecht, C. Rochas [et al.] // *J. Chem. Phys.* – 2006. Vol. 125, 234904.

***Вплив іонного оточення
на фізичні властивості ДНК***

Chen, S. W. Monovalent and divalent salt effects on electrostatic free energies defined by the nonlinear Poisson–Boltzmann equation: application to DNA binding reactions / S. W. Chen, B. Honig // *J. Phys. Chem. B.* – 1997. – Vol. 101. – P. 9113–9118.

Fixman, M. The flexibility of polyelectrolyte molecules / M. Fixman // *J. Chem. Phys.* – 1982. – Vol. 76. – P. 6346–6353.

Kosikov, K. M. Bending of DNA by asymmetric charge neutralization: all-atom energy simulations / K. M. Kosikov, A. A. Gorin, X.-J. Lu [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – Vol. 124. – P. 4838–4848.

Manning, G. S. An estimate of the extent of folding of nucleosomal DNA by laterally asymmetric neutralization of phosphate groups / G. S. Manning, K. K. Ebralidse, A. D. Mirzabekov [et al.] // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 1989. – Vol. 6. – P. 877–889.

Range, K. The contribution of phosphate–phosphate repulsions to the free energy of DNA bending / K. Range, E. Mayaan, L. J. Maher, [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2005. – Vol. 33. – P. 1257–1268.

Record, M. T. Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the role of ion association and release, screening and ion effects on water activity / M. T. Record, C. F. Anderson, T. Lohman // *Quart. Rev. Biophys.* – 1978. – Vol. 11. – P. 103–178.

Rouzina, I. Competitive electrostatic binding of charged ligands to polyelectrolytes: practical approach using the non-linear Poisson-Boltzmann equation / I. Rouzina, V. A. Bloomfield // *Biophys. Chem.* – 1997. – Vol. 64. – P. 139–155.

Sharp, K. A. Salt effects on polyelectrolyte-ligand binding: comparison of Poisson – Boltzmann, and limiting law / counterion binding models / K. A. Sharp, R. A. Friedman, V. Misra [et al.] // *Biopolymers.* – 1995. – Vol. 36. – P. 245–262.

Strauss, J. K. DNA bending by asymmetric phosphate neutralization / , J. K. Strauss, L. J. Maher // *Science.* – 1994. – Vol. 266. – P. 1829–1834.

Williams, L. D. Electrostatic mechanisms of DNA deformation / L. D. Williams, L. J. Maher // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2000. – Vol. 29. – P. 497–521.

Розділ 4

ПОЛІМЕРНІ Й МЕХАНІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДНК

Той факт, що подвійна спіраль складається з двох полінуклеотидних ланцюгів, об'єднаних у досить жорстку структуру, передбачає наявність у молекули ДНК таких властивостей, які суттєво відрізняють її від інших полімерів. Особливості поведінки полімерних молекул ДНК у розчині тісно пов'язані з механічними властивостями подвійної спіралі – її жорсткістю щодо різноманітних деформацій. Який вигляд має довга молекула ДНК у розчині, яким чином і за яку енергетичну ціну вона може бути деформована чи компактизована – усі ці питання розглядаються в даному розділі.

4.1. ВІЛЬНОЗЧЕПЛЕНИЙ ЛАНЦЮГ

Базовою моделлю фізики полімерів є модель ідеального вільнозчепленого ланцюга (рис. 4.1): N безтілесних ланок ланцюга довжиною l кожна ($N \gg 1$), з'єднані між собою абсолютно гнучкими "шарнірами" – напрямком ланки $(i + 1)$ може відхилитися від напрямку ланки i на будь-який випадковий кут θ в діапазоні від 0 до π . Конформацію такого ланцюга зазвичай характеризують відстанню між його кінцями. На рис. 4.1 зображено також проекцію цієї відстані на напрямку першої ланки – параметр, який теж часто використовується у фізиці полімерів і знадобиться для розгляду полімерних властивостей ДНК у наступних підрозділах.

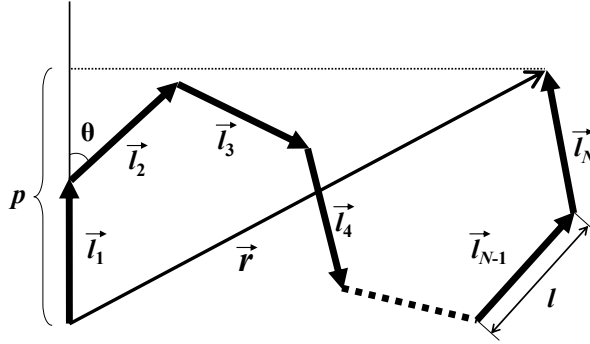


Рис. 4.1. Модель вільнозчепленого ланцюга. Показано вектори l_i , що описують орієнтацію ланок ланцюга, вектор відстані між кінцями ланцюга \mathbf{r} та його проекцію p на напрямок першої ланки

Вектор \mathbf{r} , який з'єднує кінці ланцюга, дорівнює сумі векторів, що визначають орієнтації ланок: $\mathbf{r} = \sum \mathbf{l}_i$, де підсумовування здійснюється від 1 до N . Зрозуміло, що для великої кількості конформацій ланцюга середнє значення цього вектора $\langle \mathbf{r} \rangle$ дорівнює нулю. Квадрат цього вектора дорівнює квадрату його абсолютної довжини, тобто

$$r^2 = \left(\sum_{i=1}^N \mathbf{l}_i \right)^2 = Nl^2 + 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \mathbf{l}_i \mathbf{l}_j,$$

де остання рівність випливає з відомої формули квадрата суми з урахуванням того, що добуток вектора на самого себе дорівнює квадрату абсолютної довжини вектора. Підсумовування в подвійній сумі здійснюється по всіх парах ланок, і кожен член цієї суми (скалярний добуток векторів) можна записати як $l^2 \cos \gamma$, де γ – кут між двома векторами. Оскільки цей кут, як і кут θ , може набувати будь-яких значень у діапазоні від 0 до π , середнє по всіх конформаціях значення $\langle \cos \gamma \rangle = 0$. Отже, середній квадрат відстані між кінцями вільнозчепленого ланцюга

$$\langle r^2 \rangle = Nl^2 = Ll, \quad (4.1)$$

де $L = Nl$ – контурна довжина ланцюга. Відповідно, середньоквадратична відстань між кінцями $\langle r^2 \rangle^{1/2} = l\sqrt{N}$. Головний зміст цього результату полягає в тому,

що середній лінійний розмір частини простору, який займає ланцюг, є значно меншим від контурної довжини ланцюга – відстань між кінцями, яка підпорядкована рівн. (4.1), може бути реалізована максимальною кількістю конформацій, тобто відповідає максимальному значенню конформаційної ентропії. Це означає, що розведення чи зведення кінців ланцюга зовнішньою силою потребує роботи, оскільки знижує ентропію ланцюга, а зникнення такої сили повертає ланцюг до неупорядкованої конформації – саме в цьому полягає механізм еластичності полімерних матеріалів.

Середньоквадратичне відхилення вектора \mathbf{r} від його середнього значення має бути того самого порядку, що й середній квадрат цього вектора: $\langle (\mathbf{r} - \langle \mathbf{r} \rangle)^2 \rangle = \langle r^2 \rangle = Nl^2$ (оскільки $\langle \mathbf{r} \rangle = 0$). Отже, ланцюг існує у вигляді *неупорядкованого клубка*, розмір якого осцилює з амплітудою, яка дорівнює середньому лінійному розміру клубка. Оскільки вектор \mathbf{r} є сумою незалежних випадкових (за напрямком) внесків \mathbf{l}_i , за центральною граничною теоремою теорії ймовірностей сума таких випадкових величин має бути розподілена за Гауссом (Carl Gauss) – реалізується гауссів розподіл відстані між кінцями. Імовірність того, що проекція r_α вектора \mathbf{r} на одну з декартових осей координат (α символізує одну з осей – x , y або z) знаходиться в діапазоні між r_α та $r_\alpha + dr_\alpha$, дорівнює $P(r_\alpha)dr_\alpha$, де густина ймовірності

$$P(r_\alpha) = \left(\frac{3}{2\pi Nl^2} \right)^{1/2} \exp\left(-\frac{3r_\alpha^2}{2Nl^2} \right). \quad (4.2a)$$

Вигляд цієї функції розподілу показано на рис. 4.2 ліворуч: максимум імовірності відповідає нульовому значенню проекції, при цьому більша частина конформацій відповідає значенням r_α у діапазоні від 0 до приблизно $\pm Nl^{1/2}$ (для більших значень r_α імовірність швидко знижується).

Такий самий вигляд (із точністю до нормуючого множника перед експонентою) має функція розподілу вектора відстані між кінцями. Імовірність реалізації певного значення вектора \mathbf{r} є добутком трьох незалежних імовірностей типу (4.2a); при цьому $\mathbf{r}^2 = r_x^2 + r_y^2 + r_z^2$, тобто густина ймовірності

$$P(\mathbf{r}) = \left(\frac{3}{2\pi Nl^2} \right)^{3/2} \exp\left(-\frac{3\mathbf{r}^2}{2Nl^2} \right) \quad (4.2b)$$

та ймовірність того, що кінець вектора \mathbf{r} міститься в елементі об'єму dV , дорівнює $P(\mathbf{r})dV$.

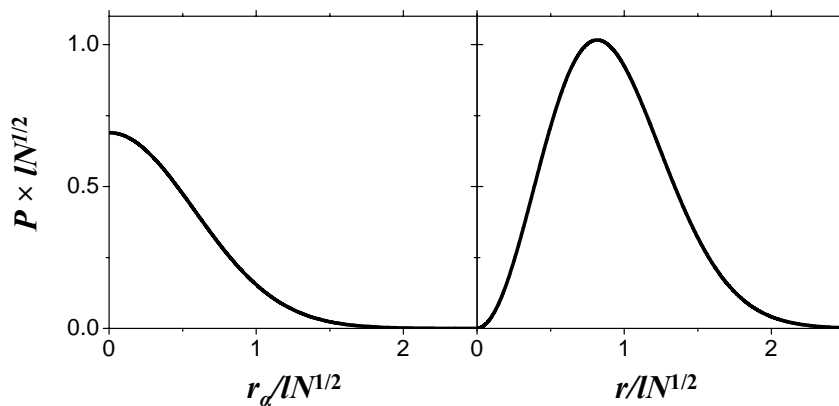


Рис. 4.2. Дві функції розподілу відстані між кінцями вільнозчепленого ланцюга: густина ймовірності для проекції відстані на визначений напрямок (ліворуч, за рівн. (4.2а)) та для абсолютного значення відстані незалежно від напрямку (праворуч, за рівн. (4.2в))

Якщо нас цікавить абсолютна величина вектора \mathbf{r} незалежно від його напрямку, тоді потрібно знайти ймовірність того, що кінець вектора \mathbf{r} лежить у сферичному елементі об'єму $4\pi r^2 dr$. Така ймовірність дорівнює $P(r)dr$, де густина ймовірності

$$P(r) = 4\pi \left(\frac{3}{2\pi N l^2} \right)^{3/2} \exp\left(-\frac{3r^2}{2N l^2} \right) r^2. \quad (4.2в)$$

Ця функція розподілу має вигляд, зображений на рис. 4.2 праворуч. Інтеграл від густини по dr від 0 до ∞ дорівнює 1, а інтеграл від $r^2 P(r)$ дає середнє значення квадрата відстані, яке збігається з рівн. (4.1). Невпорядкований клубок, що описується рівн. (4.1), (4.2), називають також *гауссовим клубком*.

Зрозуміло, що реальні полімерні ланцюги не є вільнозчепленими. Але цінність моделі, яка розглядається, полягає в тому, що будь-який довгий полімерний ланцюг (і ДНК у тому числі) можна розглядати як ланцюг уявних ланок (розділивши полімер на ділянки певної довжини), взаємні напрямки яких є незалежними. Довжина такої уявної ланки – *кунівський сегмент* l_k (Werner Kuhn) – залежить, звичайно, від природи ланцюга. Отже, для будь-якого ланцюга (якщо він є достатньо довгим) виконуються співвідношення (4.1), (4.2), в яких фігурує l_k замість l , а під N розуміється кількість кунівських сегментів.

Слід зауважити, що реальні ланцюги не є безтілесними: при хаотичному русі ланки можуть зайняти лише те місце простору, яке є вільним від інших ланок. У результаті такого *ефекту виключеного об'єму* реальний клубок "набухає" порівняно з гауссовим, і квадрат середньої відстані між кінцями приблизно відповідає рівнянню

$$\langle r^2 \rangle = l_k^2 N^{1+\delta}.$$

Для поліелектролітів додатково реалізуються електростатичні взаємодії між віддаленими по ланцюгу ланками, що наближаються одна до одної, і набухання клубка може бути суттєвішим (залежно від концентрації солі). Для високополімерної ДНК у 0,2 М NaCl $\delta \sim 0,1$, проте ця величина зростає при зниженні іонної сили.

4.2. ЕЛАСТИЧНИЙ СТРИЖЕНЬ

Виходячи зі структурної інформації (розд. 1), молекулу ДНК можна зобразити як стрижень круглого перерізу (рис. 4.3), здатний до торсійного закручування / розкручування (зміни кута твіста між сусідніми парами основ) і вигину (зміни кутів рола й тилта), і практично не здатний (принаймні поки подвійна спіраль зберігає певну структурну форму) до аксіального стискання чи розтягування (щільна упаковка пар основ). Залежно від бажаного рівня точності, стрижень можна вважати однорідним по довжині чи неоднорідним (ураховуючи різницю в енергії взаємодій для різних динуклеотидних контактів), а також ізотропним чи анізотропним щодо вигину (ураховуючи різний потенціал зміни кутів тилта й рола). Більш адекватна, порівняно з вільнозчепленим ланцюгом, модель ДНК як полімеру базується саме на моделі еластичного стрижня, тому розглянемо його механічні властивості.

Як відомо з теорії еластичності, торсійне кручення однорідного ізотропного стрижня довжиною s на кут $\Delta\phi$ (рис. 4.3) потребує роботи, яку можна назвати вільною енергією торсійної деформації:

$$G_t = \frac{C}{2s} \Delta\phi^2, \quad (4.3)$$

де C – константа торсійної жорсткості. Якщо розділити стрижень на n ділянок однакової довжини, то можна легко переконатися в тому, що енергія G_t є мінімальною за умови $\Delta\phi = n\Delta\Omega$, де $\Delta\Omega$ – кут, однаковий для всіх ділянок. Іншими словами, загальне торсійне кручення рівномірно розподіляється по довжині

(локальне кручення є однаковим в усіх точках). Зрозуміло, що ця закономірність виконується тільки тоді, коли константа торсійної жорсткості є однаковою для всіх ділянок. Якщо під ділянками розуміти динуклеотидні контакти ДНК (а під $\Delta\Omega$ – зміну кута твіста), вони явно розрізняються за потенціалом щодо зміни твіста (підрозд. 1.4) – ДНК не є однорідним стрижнем. Якщо кожна ділянка характеризується своєю константою жорсткості, локальне торсійне кручення буде очевидно більшим там, де жорсткість нижча, і навпаки. Але рівн. (4.3) при цьому повністю зберігає свою силу, якщо загальна торсійна жорсткість підпорядкована рівнянню (аналогічному до відомого з електротехніки виразу для опору при паралельному з'єднанні провідників), що також легко знайти з умови мінімуму вільної енергії деформації (при заданому сумарному куті $\Delta\phi$):

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{C_i}, \quad (4.4)$$

де C_i – константи жорсткості окремих ділянок (динуклеотидних контактів). Тоді для стрижня в цілому можна розглядати $\Delta\phi$ як суму однакових внесків, що дорівнюють середній на крок зміні кута твіста.

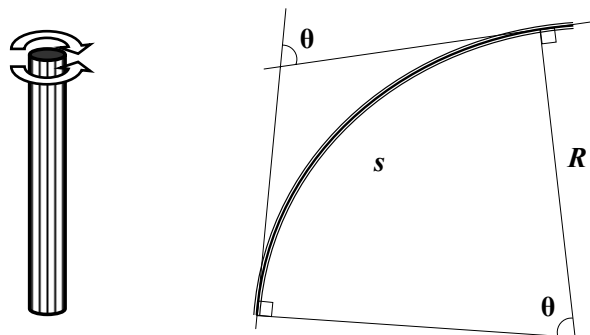


Рис. 4.3. Модель еластичного стрижня, який може піддаватися торсійним деформаціям (ліворуч: кручення одного кінця стрижня відносно іншого навкруг осі на деякий кут) і деформаціям вигину (праворуч: вигин ділянки стрижня довжиною s , яка утворює дугу кола з радіусом R , на кут θ)

Визначена в експериментах з кінетики деполяризації флуоресценції зв'язаних із ДНК барвників, а також шляхом аналізу експериментів із циркулярною ДНК (підрозд. 4.5, розд. 5), середня константа торсійної жорсткості (кут $\Delta\phi$ та інші кути в усіх рівняннях цього розділу виражаються в радіанах) $C \approx 3 \cdot 10^{-19}$ ерг·см (або $3 \cdot 10^{-28}$ Дж·м).

Вільна енергія вигину однорідного ізотропного стрижня довжиною s на кут θ підпорядкована рівнянню, цілком аналогічному до рівн. (4.3):

$$G_b = \frac{A}{2s} \theta^2 = \frac{As}{2R^2} = \frac{1}{2} A\kappa^2, \quad (4.5)$$

де A – константа (або модуль) жорсткості щодо вигину, R – радіус кривизни, $\kappa = 1/R$ – кривизна. Два останні вирази в рівн. (4.5) виходять з того, що $s = \theta R$ (рис. 4.3). Рівняння (4.5) є справедливим для ділянки стрижня, що утворює дугу кола радіуса R . У загальному випадку, коли кривизна варіює вздовж стрижня довжиною L , енергія вигину є просто сумою окремих внесків у всіх точках:

$$G_b = \frac{A}{2} \int_0^L \kappa(s)^2 ds. \quad (4.6)$$

Рівняння (4.5), (4.6) є справедливими для однорідного стрижня. Але для неоднорідного їх можна застосувати так само, як і у випадку торсійної деформації (записавши середню константу жорсткості за рівнянням, аналогічним до рівн. (4.4)). Крім того, слід мати на увазі, що для ДНК характерна анізотропія щодо вигину: жорсткості при зміні кутів рола ρ та тилта τ є різними (підрозд. 1.4). Інакше кажучи, кут вигину розкладається на два кути у двох взаємно перпендикулярних напрямках: $\theta^2 = \tau^2 + \rho^2$ (підрозд. 1.2.2), і константа A в рівн. (4.5), (4.6) є усередненою для цих двох кутів константою жорсткості.

Середня константа жорсткості ДНК щодо вигину (експериментально визначається за персистентною довжиною, див. підрозд. 4.3 і 4.4) $A \approx 2 \cdot 10^{-19}$ ерг·см, тобто відношення двох констант жорсткості $C/A \approx 1,5$. Цікаво, що за цим відношенням подвійна спіраль ДНК не підпорядковується відомим закономірностям для макроскопічних еластичних стрижнів, для яких $C/A < 1$.

4.3. ЧЕРВ'ЯКОПОДІБНИЙ ЛАНЦЮГ

Якщо розглянути молекулу ДНК як довгий еластичний стрижень, що піддається випадковим невеликим деформаціям у кожній точці, отримаємо модель черв'якоподібного полімерного ланцюга (worm-like chain), або ланцюга з кривизною, що плавно змінюється. Ця модель, відома також як ланцюг Порода – Краткі (G. Porod, O. Kratky), досить давно й широко використовується у фізиці полімерів, але саме для ДНК вона є ніби спеціально розробленою. На рис. 4.4 представлено кілька випадкових конформацій фрагмента ДНК, який можна розглядати як черв'якоподібний ланцюг – у кожному динуклеотидному кроці здійснюється вигин на невеликий кут у випадковому напрямку.



Рис. 4.4. Шість конформацій ланцюга ДНК довжиною 200 пар основ, отриманих шляхом генерації у кожному динуклеотидному кроці середньої для ДНК кривизни у випадковому напрямку (напрямок першої пари основ зафіксовано)

Перш ніж перейти до власне черв'якоподібного ланцюга, повернемося до рис. 4.1, де зображено проекцію p вектора відстані між кінцями на напрямок першої ланки. Ця проекція відображає ступінь загальної жорсткості ланцюга – чим менш рухливим він є, тим менше наступні ланки відхиляються за напрямком від першої та тим більшою є довжина проекції. Для нескінченно довгого ланцюга проекція вектора \mathbf{r} на напрямок першої ланки сходиться до певної величини, яка називається *персистентною довжиною*. Вважатимемо, що кожна ланка зображеного рис. 4.1 ланцюга відхиляється від попередньої на деякий середній кут θ . Проекція першої ланки на себе дорівнює довжині ланки l . Середня проекція другої ланки на напрямок першої є добутком довжини ланки на середній косинус кута відхилення: $l\langle\cos\theta\rangle$. Проекція третьої ланки на напрямок другої дорівнює такій самій величині, а проекція цієї проекції на напрямок першої ланки – $l\langle\cos\theta\rangle^2$ і т. д., тобто проекція N -ї ланки становить $l\langle\cos\theta\rangle^{N-1}$. Проекція вектора \mathbf{r} – суми векторів усіх ланок – дорівнює сумі проекцій:

$$p = l \sum_{i=0}^{N-1} \langle \cos \theta \rangle^i,$$

де сума є сумою геометричної прогресії. За визначенням, персистентна довжина $a = \lim_{N \rightarrow \infty} p$, отже,

$$a = \frac{l}{1 - \langle \cos \theta \rangle}.$$

Зрозуміло, що для вільнозчепленого ланцюга ($\langle \cos \theta \rangle = 0$) $a = l$. Для $\langle \cos \theta \rangle \neq 0$ маємо

$$\langle \cos \theta \rangle = 1 - \frac{l}{a}. \quad (4.7)$$

Розглянемо тепер ланцюг із кривизною, що плавно змінюється від точки до точки (рис. 4.5). Напрямок такого ланцюга в кожній точці задається вектором тангента \mathbf{t} – одиничним вектором уздовж дотичної до ланцюга, а взаємна зміна напрямку між двома точками – кутом θ між тангентами. Відстань між точками s_1 та s_2 вздовж ланцюга $s = |s_1 - s_2|$ може тепер бути якою завгодно, і $\langle \cos \theta \rangle$ є функцією цієї відстані.

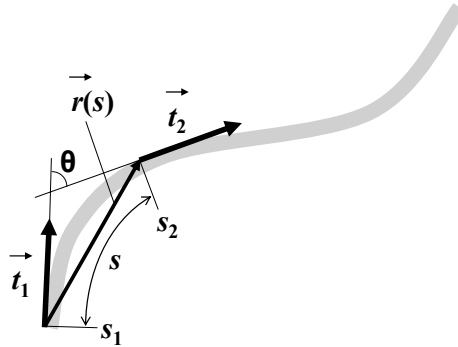


Рис. 4.5. Ділянка черв'якоподібного ланцюга.

Напрямок ланцюга в точках s_1 та s_2 , які з'єднує вектор $\mathbf{r}(s)$, задається векторами тангента \mathbf{t}_1 і \mathbf{t}_2

Якщо відстань по контуру наближається до нуля, кут θ має бути близьким до нуля, тобто $\langle \cos \theta \rangle \rightarrow 1$. Кут θ між дуже далекими одна від одної точками може бути яким завгодно, тобто $\langle \cos \theta \rangle \rightarrow 0$ при зростанні s . Разом із тим, для двох сусідніх невеличких ділянок ланцюга, які можна вважати прямими (скажімо, дві сусідні пари основ), має виконуватись рівн. (4.7), отримане саме для випадку прямих ланок; для черв'якоподібного ланцюга величину l у цьому рівнянні слід вважати маленькою відстанню по контуру між двома точками. Усім наведеним вимогам відповідає функція

$$\langle \cos \theta \rangle = \exp\left(-\frac{s}{a}\right). \quad (4.8)$$

Для малих s вона розкладається в ряд і збігається з (4.7), при $s = 0$ дорівнює 1, при $s \rightarrow \infty$ дорівнює 0. Рівняння (4.8) дозволяє сформулювати інше еквівалентне визначення персистентної довжини: це величина, що характеризує втрату кореляції за напрямком уздовж ланцюга. При $s < a$ існує пам'ять щодо напрямку, при зростанні s пам'ять поступово зникає, і врешті-решт напрямок стає абсолютно нескорельованим з напрямком у початку відліку. Зрозуміло, що чим вищою є персистентна довжина, тим жорсткішим є ланцюг і тим довше зберігається пам'ять щодо напрямку вздовж ланцюга. Для ДНК $a \sim 50$ нм (див. наступний підрозділ), або ~ 150 пар основ, тобто фрагменти, зображені на рис. 4.4, є не набагато довгими за персистентну довжину.

Знайдемо квадрат відстані між кінцями черв'якоподібного ланцюга. За визначенням тангента, цей вектор є похідною по криволінійній координаті s від вектора, що визначає просторові координати точок на кривій. Для нашого випадку можна задати цей останній вектор як $\mathbf{r}(s)$ – вектор від початку кривої до точки вздовж кривої (рис. 4.5). Зрозуміло, що коли s дорівнює контурній довжині ланцюга L , $\mathbf{r}(L)$ – це просто вектор відстані між кінцями \mathbf{r} . Оскільки $\mathbf{t}(s) = d\mathbf{r}(s)/ds$,

$$\mathbf{r} = \int_0^L \mathbf{t}(s) ds$$

Квадрат відстані між кінцями – це добуток двох таких інтегралів, який дорівнює подвійному інтегралу від добутку тангентів по всіх парах точок уздовж кривої. Оскільки тангенти є одиничними векторами, середній скалярний добуток двох тангентів $\langle \mathbf{t}(s_1) \cdot \mathbf{t}(s_2) \rangle = \langle \cos\theta \rangle = \exp(-s/a)$. Урахувавши це, отримаємо

$$\begin{aligned} \langle r^2 \rangle &= \int_0^L \int_0^L \langle \mathbf{t}(s_1) \cdot \mathbf{t}(s_2) \rangle ds_1 ds_2 = \\ &= \int_0^L \int_0^L \exp(-|s_1 - s_2|/a) ds_1 ds_2 = \\ &= \int_0^L \left(\int_0^{s_1} \exp((s_2 - s_1)/a) ds_2 + \int_{s_1}^L \exp((s_1 - s_2)/a) ds_2 \right) ds_1, \end{aligned}$$

і після інтегрування

$$\langle r^2 \rangle = 2aL \left(1 - \frac{a}{L} (1 - e^{-L/a}) \right). \quad (4.9)$$

За цим співвідношенням, коли $L \rightarrow \infty$, $\langle r^2 \rangle = 2aL$, що збігається з (4.1), якщо кунівський сегмент $l_k = 2a$ – нескінченно довгий черв'якоподібний ланцюг поводить себе як вільнозчеплений, побудований із ланок довжиною, що

дорівнює подвоєній персистентній довжині. При $L \sim a \langle r^2 \rangle \sim 2L^2 e^{-1} \sim L^2$ середньоквадратична відстань між кінцями приблизно дорівнює контурній довжині. Але слід розуміти, що йдеться про *середню* відстань для великої кількості конформацій – фрагмент ДНК довжиною $\sim a$ аж ніяк не поводить себе, як пряма паличка (див. рис. 4.4).

4.4. ПЕРСИСТЕНТНА ДОВЖИНА ДНК

4.4.1. Зв'язок персистентної довжини з жорсткістю щодо вигину

Як показано в попередньому підрозділі, персистентна довжина є мірою жорсткості ланцюга щодо вигину. З'ясуємо кількісний зміст цього твердження. Якщо під ділянкою s у рівн. (4.8) розуміти відстань h між сусідніми парами основ ($h \ll a$ і $\theta \ll \pi/2$), то обидві частини рівняння розкладаються в ряд ($\cos\theta \approx 1 - \theta^2/2$, $\exp(-h/a) \approx 1 - h/a$), і

$$\langle \theta^2 \rangle \approx 2h/a \quad (4.10)$$

При $a = 50$ нм середньоквадратичний кут вигину між двома парами основ становить за цим рівнянням $6,7^\circ$ (якщо перевести кут у градуси). Користуючись середніми стандартними відхиленнями для кутів рола ρ та тилта τ у табл. 1.3, можна визначити середній кут вигину ДНК у кристалах із рівняння $\langle \theta^2 \rangle = \langle \Delta\rho^2 \rangle + \langle \Delta\tau^2 \rangle$ (див. підрозд. 4.2) як $6,3^\circ$, що чудово узгоджується з наведеною оцінкою (невелика розбіжність пояснюється у підпідрозд. 4.4.3).

Інший вираз для середнього кута вигину можна отримати, користуючись рівн. (4.5). Середній вигин виникає в результаті теплових флуктуацій. Як відомо з класичної молекулярної фізики, середня енергія теплового руху для вільної частинки у тривимірному просторі дорівнює $3/2 k_B T$ – по $1/2 k_B T$ на кожен із трьох ступенів свободи (положення частинки визначається трьома незалежними координатами). Фізична ланка ланцюга ДНК (пара основ) має два ступеня свободи щодо вигину, оскільки кут вигину можна розкласти по двох кутах (див. вище), які виконують роль двох незалежних координат. Отже, середня енергія теплових коливань у нашому випадку дорівнює $k_B T$ – саме вона може спричинити вигин на певний середній кут однієї пари основ відносно сусідньої. Підставивши в рівн. (4.5) $k_B T$ замість G_b та відстань між сусідніми парами основ h замість s , отримаємо

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{2hk_B T}{A}, \quad (4.11)$$

звідки, порівнявши з рівн. (4.10), константа жорсткості щодо вигину є прямо пропорційною персистентній довжині:

$$A = k_B T a. \quad (4.12)$$

Відповідно, вираз (4.5) для вільної енергії вигину часто записують у такому вигляді:

$$G_b = k_B T \frac{as}{2R^2}. \quad (4.13)$$

4.4.2. Залежність персистентної довжини від іонної сили

Оскільки персистентна довжина визначає лінійні розміри клубка (рівн. (4.9)), її можна оцінити експериментально, установлюючи ці розміри тим чи іншим фізичним методом. Проте на розміри клубка довгої молекули впливає також ефект виключеного об'єму (підрозд. 4.1), який зазвичай важко точно врахувати.

Значно точніші результати дають підходи, пов'язані з дослідженням порівняно коротких (до 1–2 тисяч пар основ) молекул, для яких ефект виключеного об'єму не проявляється. Зокрема, це стосується визначення подвійного заломлення світла розчином молекул ДНК, орієнтованих у потоці чи в електричному полі: оптичні властивості подвійної спіралі (характер взаємодії азотистих основ зі світлом) суттєво залежать від орієнтації площини поляризації світла – уздовж осі спіралі чи перпендикулярно до неї. Зрозуміло, що зазвичай у розчині молекули розподілені випадково, і оптичні характеристики усереднюються за орієнтаціями. Але молекули ДНК можна орієнтувати, наклавши зовнішнє електричне поле або створивши потік рідини, – тоді буде виявлятися різниця оптичних характеристик світла, поляризованого уздовж поля (потіку) і перпендикулярно до нього. При цьому величина ефекту буде залежати від ступеня орієнтації, тобто від того, наскільки легко тепловий рух порушує таку орієнтацію, а отже, від загальної гнучкості молекули. При застосуванні електричного подвійного заломлення зазвичай досліджують кінетику ротаційної релаксації – повернення до випадкового розподілу після вимкнення орієнтуючого імпульсу електричного поля. Аналіз результатів експериментів такого типу приводить до оцінки $a = 50 \pm 5$ нм у широкому діапазоні концентрацій солі (рис. 4.6).

Таку саму оцінку персистентної довжини дають експерименти з механічного розтягнення клубків окремих молекул ДНК (див. підрозд. 4.6), результати яких також наведено на рис. 4.6. Цікаво, що до тієї ж величини a приводять визначення середньої кривизни молекул ДНК під електронним чи атомно-силовим мікроскопом.

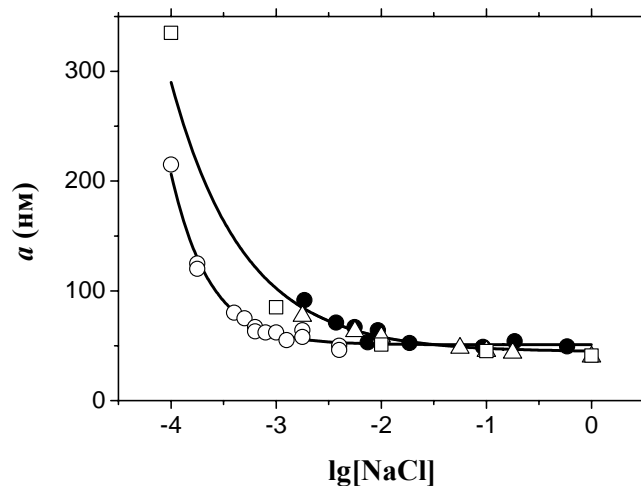


Рис. 4.6. Залежність персистентної довжини від логарифма молярної концентрації солі за даними електричного подвійного заломлення (○, Hagerman, 1981), подвійного заломлення в потоці (Δ, Cairney, Harrington, 1982) і механічного розтягування поодиноких молекул (●, Baumann *et al.*, 1997). Суцільні криві є інтерполяцією експериментальних даних. Представлено також результати розрахунків електростатичного внеску в персистентну довжину для рівномірно зарядженого циліндра (□, Fixman, 1982, константний неелектростатичний внесок прийнято за 35 нм)

Як видно з рис. 4.6, персистентна довжина дорівнює указаній вище константній величині за іонної сили понад 10 мМ. Зниження іонної сили до 1 мМ, за різними даними, або не впливає на жорсткість ДНК, або призводить до її незначного підвищення. І тільки за іонної сили нижче 1 мМ персистентна довжина починає швидко зростати.

Така поведінка пояснюється поліелектролітними властивостями ДНК (розд. 3). Сумарні енергетичні витрати G_b на вигин подвійної спіралі можна розділити на два внески: а) витрати G_b^0 , зумовлені частковим порушенням стабілізуючих взаємодій (у першу чергу – стекінг-взаємодій), які не залежать від іонної сили; б) витрати G_b^{el} , пов'язані зі зміною електростатичної вільної енергії при вигині. Отже, персистентну довжину в рівн. (4.13) можна записати як суму $a = a_0 + a_{el}$, тоді енергія вигину буде сумою відповідних внесків. Розрахунок на підставі рівняння Пуассона – Больцмана різниці G_b^{el} електростатичних вільних

енергій рівномірно заряджених вигнутого та прямого циліндрів дає змогу із залежності G_b^{el} від радіуса кривизни R визначити a_{el} (див. рівн. (4.13)) для різних концентрацій солі. Детальні розрахунки енергії великого вигину ДНК за допомогою молекулярної динаміки вказують, що ~30 % енергетичних витрат припадає на електростатичні взаємодії, тобто можна оцінити неелектростатичну компоненту персистентної довжини як $a_0 \sim 35$ нм. Сума a_0 і розрахованої за рівнянням Пуассона – Больцмана залежної від іонної сили a_{el} також представлена на рис. 4.6 – узгодження з результатами експериментів є очевидним.

Електростатичний внесок у персистентну довжину пояснюється ентропійними витратами на перерозподіл іонної атмосфери, а незалежність цих витрат (а отже, і персистентної довжини) від концентрації солі при $C > 10$ мМ – нечутливістю локальної концентрації протиіонів у цій атмосфері до зовнішньої іонної сили (підпдрозд. 3.5.2). Локальна концентрація протиіонів визначається поверхневою щільністю зарядів ДНК, а перерозподіл протиіонів – змінами поверхневої щільності по обидва боки вигину (див. рис. 3.5). Однак за дуже низьких концентрацій солі на розподіл протиіонів починає впливати також загальна форма ДНК (дається взнаки електростатичне розштовхування між віддаленими ділянками вигнутої молекули, які "не помічали" одна одну за більш високої іонної сили).

4.4.3. Динамічна та статична персистентна довжина

Середній кут вигину в рівн. (4.11) – це кут, який виникає в результаті теплових флуктуацій, тобто в результаті динаміки подвійної спіралі. Рівність цього кута й середнього кута вигину в рівн. (4.10) є насправді не зовсім коректною: втрата кореляції за напрямком уздовж подвійної спіралі, яку описує рівн. (4.10), є наслідком не тільки теплових флуктуацій, а й варіацій кута вигину залежно від послідовності. Справа в тому, що для певних динуклеотидних кроків найвигідніші кути рола й тилта не дорівнюють нулю, і флуктуації відбуваються вже щодо цих ненульових значень (підрозд. 1.4). Отже, рівн. (4.10) слід переписати у такому вигляді:

$$\langle \theta^2 \rangle = \langle \theta_{dyn}^2 \rangle + \langle \theta_{st}^2 \rangle = 2h / a ,$$

де динамічний внесок (який досі розглядали) $\langle \theta_{dyn}^2 \rangle = 2h/a_{dyn}$; внесок від статичних (перманентних) вигинів $\langle \theta_{st}^2 \rangle = 2h/a_{st}$; a_{dyn} і a_{st} – так звані динамічна та статична персистентна довжина відповідно. Зрозуміло, що персистентна довжина a , яка спостерігається в експерименті, підпорядкована рівнянню

$$a^{-1} = a_{dyn}^{-1} + a_{st}^{-1} ,$$

і тільки a_{dyn} має насправді входити до рівн. (4.12), (4.13).

Для випадкової послідовності (де залежні від послідовності варіації також можна розглядати як випадкові) можна оцінити два внески в персистентну довжину, користуючись даними табл. 1.3. Суму середніх квадратів *стандартних відхилень* кутів рола й тилта, яка згадувалась у підпідрозд. 4.4.1, слід розглядати як $\langle \theta_{dyn}^2 \rangle$ (середньоквадратична варіація кута вигину дорівнює $6,3^\circ$), а суму квадратів середніх значень *самих кутів* – як $\langle \theta_{st}^2 \rangle$ (середньоквадратичне значення дорівнює $3,16^\circ$). За останніми двома рівняннями (узявши $h = 3,4 \text{ \AA}$) $a_{dyn} = 56 \text{ нм}$ (що дуже близько до експериментального значення a), а $a_{st} = 223 \text{ нм}$ – залежні від послідовності "статичні" варіації кута вигину зумовлюють значно повільнішу втрату пам'яті за напрямком. Загальне значення $a = 45 \text{ нм}$ є дуже близьким до експериментальних оцінок персистентної довжини. Отже, для випадкових послідовностей статичну компоненту персистентної довжини практично можна не брати до уваги, але для молекул ДНК, що містять залежні від послідовності значні перманентні вигини, її внесок може бути суттєвим.

4.5. ЦИКЛІЗАЦІЯ МОЛЕКУЛ ДНК

Ще одним методом, який дозволяє визначити персистентну довжину, є дослідження ефективності замикання молекули ДНК у кільце (цей підхід має також відношення до матеріалу розд. 5). Циклізацію – звичайну процедуру в рекомбінантних технологіях – здійснюють за допомогою ферменту ДНК-лігази, який каталізує реакцію утворення фосфодіефірних зв'язків між 3'-ОН групою та 5'-фосфатом. Як правило, кінці мають бути "липкими" – містити короткі взаємно комплементарні одноланцюгові вирости, хоча лігаза здатна зшивати (зі значно меншою ефективністю) і тупі кінці. Але в будь-якому разі вона може зшити між собою тільки такі два кінці, які раптово зустрілися, оскільки кільце утворюється тоді, коли відстань між кінцями дорівнює нулю.

Рівняння (4.9), (4.13) указують, що ймовірність появи конформації з $r^2 = 0$ має залежати від контурної довжини: замикання в кільце короткої молекули потребує значного вигину, а отже, досить великих енергетичних витрат – тим більших, чим менше довжина. Але, з іншого боку, зростання контурної довжини приводить до збільшення середньоквадратичної відстані між кінцями – зменшення імовірності зведення кінців. Отже, має існувати певна оптимальна контурна довжина, для якої циклізація буде найефективнішою. На основі моделі черв'якоподібного ланцюга побудовано теорії, які дозволяють точно описати таку поведінку.

Експериментально ефективність циклізації визначають за так званим j -фактором, який є відношенням константи рівноваги K_c з'єднання кінців *одного* фрагмента до константи рівноваги K_l з'єднання кінців *двох різних* фрагментів (такі продукти, звичайно, також продукуються лігазою). Реакції зшивання хімічно однакові в обох випадках, тобто відношення констант залежить тільки від енергетичних витрат на зведення кінців перед циклізацією.

Перша константа є безрозмірною (внутрішньомолекулярна реакція), друга – є константою бімолекулярної реакції і має розмірність M^{-1} . Отже $j = K_c/K_l$ має розмірність концентрації (за своїм фізичним сенсом j -фактор – це локальна молярна концентрація одного кінця у безпосередній близькості до іншого). За визначенням константи рівноваги (див. підпідрозд. 2.1.1, 2.1.2), концентрація циркулярних форм ДНК зі зведеними кінцями, які виникають як наслідок конформаційної рівноваги, дорівнює $K_c f L_0$, де f – частка лінійних фрагментів, L_0 – вихідна загальна концентрація фрагментів. Частка цих циркулярних форм фіксується лігазою й таким чином виводиться з рівноваги. Концентрація лінійних димерів, які також частково фіксуються лігазою, дорівнює $K_l f^2 L_0^2$. Отже, відношення концентрацій циркулярних і лінійних продуктів дорівнює $K_c/(K_l f L_0)$, звідки, знаючи L_0 , можна визначити відношення констант при $f = 1$. Практично j -фактор визначають, зупиняючи реакцію з лігазою через різні проміжки часу, установлюючи відношення кількості матеріалу двох типів за допомогою електрофорезу й після того екстраполюючи це відношення до нульового моменту часу. Типові залежності j -фактора від довжини фрагментів наведено на рис. 4.7.

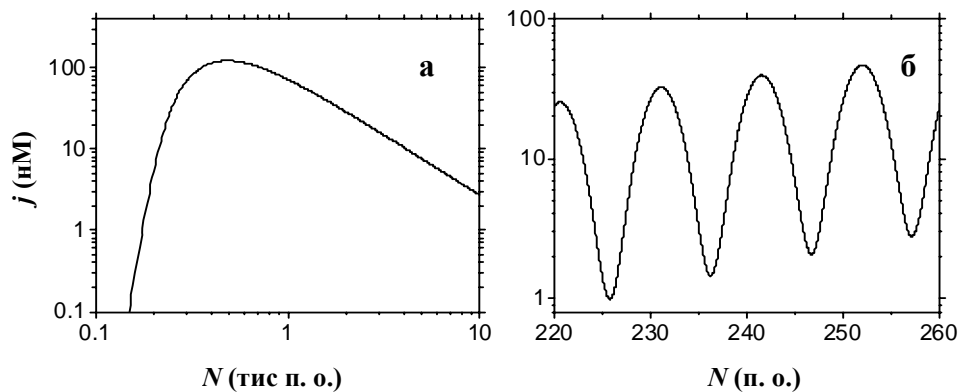


Рис. 4.7. Типова залежність j -фактора від довжини фрагмента ДНК, що піддається циклізації (а), та окрема ділянка цієї залежності (б).

Ліва гілка на графіку а є лінією, що усереднює періодичні осциляції, показані на графіку б

Скорочення фрагмента приводить до повільного зростання j -фактора, який досягає максимуму при ~ 500 пар основ. Молекули у дві-три персистентні довжини достатньо гнучкі, щоб ефективно замкнутися в кільце – витрати на вигин компенсуються достатньо високою імовірністю наближення двох кінців, розділених невеликою контурною довжиною. Але для фрагментів, коротших за ~ 250 пар основ, j -фактор швидко знижується. Аналіз подібних залежностей на основі моделі черв'якоподібного ланцюга дає оцінку персистентної довжини 45–49 нм незалежно від концентрації одновалентних катіонів (у присутності 1 mM MgCl₂, необхідного для активності лігази).

На ділянці зниження j -фактора відбуваються його досить значні періодичні флуктуації, показані на рисунку 4.7, б (усереднені на рис. 4.7, а). Справа в тому, що для зшивання кінців їм недостатньо просто стикнутися – реакція відбувається тільки в разі точної взаємної орієнтації 3'- та 5'-кінців. Найоптимальніша орієнтація кінців (особливо це проявляється для коротких фрагментів, які замикаються в планарне кільце – це мінімізує енергію вигину) має місце тоді, коли між двома кінцями вкладається ціле число витків подвійної спіралі. Інакше подвійна спіраль має закрутитися / розкрутитися торсійно (тим більше, чим значніше відхиляється кількість витків спіралі від найближчого цілого числа), щоб "виставити" кінці точно один проти одного. Оскільки це вимагає енергетичних витрат на торсійну деформацію (за рівн. (4.3)), j -фактор знижується, щоб потім знову повернутися до максимального значення через виток подвійної спіралі. Аналіз цих осциляцій дозволяє встановити періодичність подвійної спіралі (вона виявляється близькою до 10,5 пар основ / виток) і оцінити константу торсійної жорсткості C . За результатами різних експериментів із циклізації C варіює від $2,4 \cdot 10^{-19}$ до $3,4 \cdot 10^{-19}$ ерг·см. Варіації, напевно, пояснюються залежністю середньої константи жорсткості від послідовності пар основ.

4.6. МЕХАНІЧНА ДЕФОРМАЦІЯ ОКРЕМИХ МОЛЕКУЛ ДНК ЗОВНІШНЬОЮ СИЛОЮ

4.6.1. Наноманіпуляції з молекулами ДНК

Можливість у реальному часі слідкувати за поведінкою окремих одиничних молекул ДНК з'явилась відносно нещодавно, але методи таких досліджень уже стали потужним засобом вивчення динаміки й механічних властивостей як вільної ДНК, так і її комплексів з іншими молекулами. Два основні інструменти, що використовуються для наноманіпуляцій з молекулами ДНК, – магнітний пінцет (magnetic tweezers) та оптична пастка (optical trap), яку називають також оптичним пінцетом (рис. 4.8).

При застосуванні магнітного пінцета молекули ДНК (зазвичай довжиною від ~ 5 до ~ 50 тис. пар основ) пришивають за один кінець до поверхні скла в невеличкій камері, в яку подається розчин бажаного складу, під камерою міститься

об'єктив оптичного мікроскопа) (рис. 4.8, *a*). Пришивання здійснюється за рахунок попередньої обробки молекули ДНК: до одного кінця рекомбінантними методами приєднують лінкер – фрагмент ДНК, що містить азотисті основи, ковалентно модифіковані стероїдом дигоксигеніном (DIG). Скло, вкрите антитілами до DIG, жорстко фіксує цей кінець. До іншого кінця приєднано лінкер, модифікований біотином (вітамін Н), який міцно взаємодіє з бактеріальним білком стрептавідином, що вкриває поверхню кульки діаметром 2–3 мкм (тобто кулька є добре видимою в оптичний мікроскоп). Кулька, яка таким чином опиняється пришитою до кінця ДНК, є парамагнетиком (полістирен, насичений оксидами заліза) і перебуває під дією постійного магнітного поля, створеного електромагнітом (рис. 4.8, *a*). Магніт може переміщуватись та обертатись, як показано на рисунку. Переміщення створює розтягальну силу F , що прикладається до кінця ДНК, – величина сили залежить від висоти положення магніту над камерою. Кількість обертів магніту задає певний обертальний момент, прикладений до кінця молекули, – здійснюється кручення одного кінця відносно іншого в тому чи іншому напрямку. За допомогою мікроскопа реєструються два параметри. Перший із них – відстань r від підкладки до кульки: зміна відстані відносно відомої фокусної відстані об'єктиву створює інтерференційну картину навкруг кульки, за характером якої можна визначити r з точністю до кількох нанометрів. Другий параметр – середня амплітуда осциляцій Δx кульки у площині, перпендикулярній до напрямку сили, – дозволяє визначити величину сили (рис. 4.8, *a*): нитка ДНК із кулькою еквівалентна маятнику, що здійснює коливання під дією теплових флуктуацій – чим більша розтягальна сила, тим менша амплітуда осциляцій. Зазвичай прилад дозволяє змінювати й вимірювати силу в діапазоні від кількох сотих до кількох сотень піконьютонів (пН).

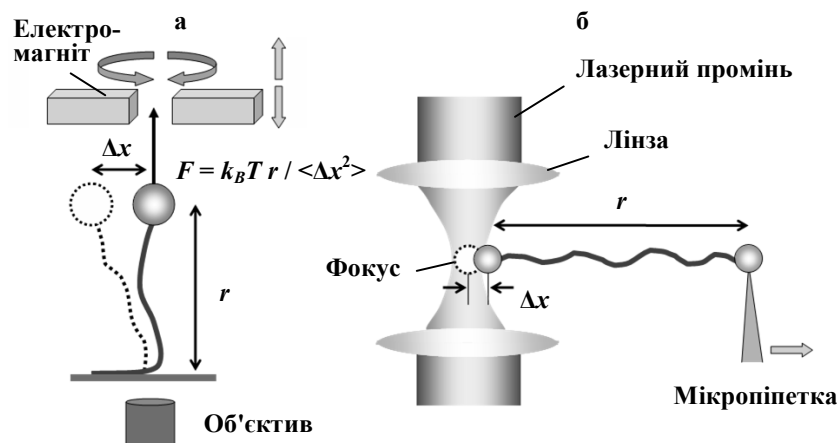


Рис. 4.8. Схема магнітного пінцета (а) та оптичної пастки (б)

Оптична пастка (рис. 4.8, б) являє собою точку, в якій сфокусовано лазерний промінь. В області фокуса утворюється сильний градієнт інтенсивності світла – градієнт електричного поля, здатний утримувати діелектричну кульку, виготовлену з матеріалу з високим коефіцієнтом заломлення. Тут знову йдеться про полістиренову кульку, пришиту до кінця молекули ДНК. Зазвичай один кінець молекули з кулькою утримується в пасці, створеній двома променями, сфокусованими в одній точці. Інший кінець пришивається до кульки, закріпленій на кінці мікропіпетки, яка може рухатись. Цей рух створює зовнішню розтягальну силу, прикладену до кінців молекули. Оптична система фіксує відстань між двома кульками, а також зміщення Δx кульки в пасці від фокусної точки (рис. 4.8, б): зовнішня сила та протилежно спрямована сила пастки перебувають у рівновазі, і зміщення (як для механічної пружини) є прямо пропорційним величині розтягальної сили. На відміну від магнітного пінцета, оптична пастка дозволяє вільне обертання кульки навколо осі, яка збігається з напрямком сили.

4.6.2. Розтягнення та надрозтягнення ДНК

Досить довга (~50 тис. пар основ) молекула ДНК перебуває у стані неупорядкованого клубка, поведінка якого описується рівн. (4.1), (4.2), (4.9) (у перших двох рівняннях слід підставити $l = 2a$). Інакше кажучи, середній вектор відстані між кінцями \mathbf{r} дорівнює нулю (як і його середня проекція на будь-який визначений напрямок), а кількість конформацій, якими можна реалізувати даний вектор, є пропорційною експоненті в рівн. (4.2б). Оскільки кількість конформацій W є мірою конформаційної ентропії, виходячи з рівн. (2.1), (2.4), (4.2б), вільну енергію полімерного ланцюга можна записати таким чином:

$$G = -k_B T \ln W = \text{const} + \frac{3}{4} k_B T \frac{r^2}{aL},$$

де L – контурна довжина, а const не залежить від r . Якщо до кінців молекули прикладено розтягальну силу, вона компенсується пружною силою, що намагається повернути молекулу в найбільш неупорядкований стан, тобто пружна сила має цілком ентропійну природу. Для даної відстані r між кінцями ДНК пружна сила, яка дорівнює за абсолютною величиною розтягальній силі,

$$F = \frac{\partial G}{\partial r} = \frac{3}{2} \frac{k_B T}{a} \frac{r}{L}. \quad (4.14)$$

Остання формула є справедливою, коли виправдовується гауссів розподіл (див. рівн. 4.2) – для не надто великих F і r . Вона демонструє, що сила за таких умов є пропорційною $1/L$ – для довгих молекул "модуль ентропійної пружності" (коефіцієнт перед r) є дуже маленьким, і клубок досить легко розтягається (ця загальна для полімерів властивість лежить в основі їхньої високої еластичності).

У повній відповідності до наведених міркувань, клубок ДНК легко розтягається зовнішньою силою – типову залежність сили від відносної довжини r/L в експериментах за допомогою оптичної пастки показано на рис. 4.9 (аналогічні залежності отримують також за допомогою магнітного пінцета). При незначному зростанні сили відстань між кінцями швидко збільшується – практично спостерігається плато, де сила зростає менше, ніж до 1 пН, при відносному розтяганні до $0,8 L$.

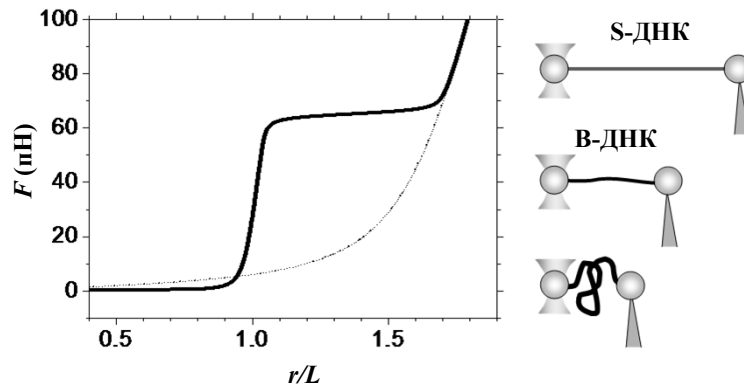


Рис. 4.9. Типова залежність розтягальної сили від відносного подовження молекули ДНК в експериментах з оптичною пасткою (суцільна крива). Пунктиром показано відповідну залежність для одноланцюгової ДНК (в якій кількість нуклеотидів дорівнює кількості пар основ у дволанцюговій формі, за L в обох випадках взято контурну довжину подвійної спіралі). Праворуч: схема конфігурацій молекули за різних значень зовнішньої сили (сила зростає знизу вгору)

При цьому для низьких сил виконується рівн. (4.14), яке порушується при зростанні r . Загальна інтерполяційна формула, що описує так зване *ентропійне розтягання* ДНК (розтягання клубка до контурної довжини молекули проти пружних сил ентропійної природи), має вигляд

$$\frac{Fa}{k_B T} = \frac{1}{4} \left(1 - \frac{r}{L} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{r}{L}, \quad (4.15)$$

і рівн. (4.14) є окремим випадком цього співвідношення при $r/L \rightarrow 0$. Аналіз експериментальної кривої розтягання (типу кривої на рис. 4.9) дозволяє оцінити персистентну довжину a (див. рис. 4.6 і підпідрозд. 4.4.2). Враховуючи можливість аксіального розтягання самої подвійної спіралі за високого значення сили (*ентальпійне розтягання*), рівн. (4.15) переписують таким чином:

$$\frac{Fa}{k_B T} = \frac{1}{4} \left(1 - \frac{r}{L} + \frac{F}{K_0} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{r}{L} - \frac{F}{K_0},$$

де K_0 – модуль аксіального розтягання. Величина K_0 є дуже великою (~1000 пН), і врахування K_0 не змінює оцінки персистентної довжини. Подвійну спіраль можна вважати такою, що не піддається аксіальному розтягання: в області $r/L = 1$ спостерігається крута стінка – система переходить у жорсткий режим, коли сила різко зростає при майже незмінності відносного подовження молекули (рис. 4.9). Але коли сила досягає величини ~65 пН, жорсткий режим знову змінюється на "м'який" – спостерігається друге плато, на якому при незначному додатковому зростанні сили довжина молекули швидко збільшується і в кінці плато *перевищує контурну довжину* подвійної спіралі в ~1,7 раза. Таке надрозтягання (overstretching) позначають як В–S перехід, а форму ДНК, що реалізується в зоні переходу, – як S-форму (від stretched).

На рис. 4.9 зображено також криву розтягання одноланцюгової ДНК, яка є значно гнучкішим полімером (персистентна довжина оцінюється в кілька нанометрів). Відповідно, "модуль ентропійної пружності" згідно з рівн. (4.14) є більш високим, і плато для одноланцюгової ДНК лежить дещо вище по шкалі сили від дволанцюгової. Але поза жорстким режимом для дуплекса одноланцюгова ДНК розтягається значно більше при тих самих значеннях сили, і жорсткий режим (коли r наближається до контурної довжини одноланцюгової форми) збігається з другою жорсткою фазою розтягання подвійної спіралі.

Порівняння поведінки дво- та одноланцюгової ДНК щодо розтягання підказує природу В–S переходу. Питання про те, що собою являє S-форма, є дискусійним, але зрозуміло, що при надрозтяганні порушується стекінг між парами основ. Деякі моделі передбачають, що при цьому зберігаються комплементарні водневі зв'язки. Проте, з огляду на механізми стабілізації подвійної спіралі (підпдрозд. 2.2.4), збереження водневих зв'язків при порушенні стекінгу є малоймовірним. Отже, В–S перехід є, найвірогідніше, кооперативним процесом плавлення подвійної спіралі під дією високої розтягальної сили. Такий перехід можна описати в термінах моделі, що розглядалась у підрозд. 2.3, де різниця вільних енергій (а отже, і параметр s) між дво- та одноланцюговими формами залежить також від роботи, яка виконується зовнішньою силою і компенсує енергетично не вигідне порушення стекінг-взаємодій. Така модель плавлення під час В–S переходу (Rouzina, Bloomfield, 2001), чудово описує експериментальні залежності сили від відносного подовження ДНК.

4.6.3. Закручування молекули ДНК

Закручування молекули ДНК магнітним пінцетом здійснюється шляхом обертання магніту (рис. 4.8, *a*) на певну кількість обертів за наявності тієї чи іншої розтягальної сили (значно меншої, ніж потрібно для В–S переходу). Якщо кількість обертів дорівнює нулю, ДНК перебуває в торсійно релаксованому стані – з найвигіднішим середнім кутом твіста. Торсійний стан ДНК

прийнято характеризувати параметром, що позначається як твіст (T_w) і являє собою кількість витків подвійної спіралі – з *кутом твіста* твіст пов'язаний співвідношенням $T_w = N\Omega/2\pi = N/\gamma$, де N – кількість пар основ, Ω – середній кут твіста, γ – кількість пар основ на виток спіралі. Отже, у торсійно релаксованій ДНК реалізується певне найвигідніше значення твіста T_{w_0} . Один оберт магніту, залежно від напрямку обертання, закручує або розкручує подвійну спіраль на один виток, відповідно збільшуючи або зменшуючи твіст. У спіралі виникає торсійна напруга, яка характеризується ненульовим значенням $\Delta T_w = T_w - T_{w_0}$ (позитивним при додатковому закручуванні та негативним – при розкручуванні правої подвійної спіралі). Якщо формально вважати (а це не завжди так, див. нижче), що ΔT_w дорівнює кількості обертів магніту, то замість ΔT_w можна використати питому величину $\sigma = \Delta T_w/T_{w_0}$ – кількість додаткових витків на один виток подвійної спіралі (σ частіше визначають дещо інакше й називають щільністю надспіралізації, див. розд. 5). Типові залежності відносного подовження r/L молекули ДНК від цієї величини наведено на рис. 4.10.

Для дуже низької розтягальної сили ($\sim 0,2$ пН) крива є симетричною щодо $\sigma = 0$. Досить швидко відносно скорочення при зростанні кількості обертів у той чи інший бік пояснюється тим, що оберти магніту дійсно індукують торсійну деформацію тільки до певної межі – подвійна спіраль здатна накопичити торсійну напругу лише певної величини (у даному випадку $\sigma \sim \pm 0,01$ або ~ 10 обертів для ДНК довжиною 10 тис. пар основ). Після досягнення критичної точки енергія торсійних деформацій стає надто високою і відбувається втрата стійкості: ДНК закручується в надспіральні *плектономічні витки* (рис. 4.10). У системі, що розглядається, на молекулу ДНК накладені топологічні обмеження – кінці не можуть вільно обертатися один відносно одного. Детальніше ДНК з такими обмеженнями розглядається в розд. 5, але в тому, що торсійне закручування має в певний момент перетворитися на плектономічні витки, можна легко переконатись, закручуючи гумову трубку або звичайну мотузку. Закручування *позитивного знаку* (за годинниковою стрілкою, якщо дивитись уздовж осі закручування від зафіксованого кінця на той кінець, що обертається) індукуює *позитивні* плектономічні витки у вигляді *лівої* подвійної суперспіралі, закручування негативного знаку (для ДНК еквівалентне розкручуванню дуплекса) – навпаки. Точка початку формування плектономи (критична величина σ) залежить від співвідношення між константами торсійної жорсткості та жорсткості щодо вигину C/A – торсійна деформація є більш енергетично вигідною за малих σ , вигин у складі плектономи стає вигіднішим, коли торсійна деформація була б надто високою. Аналіз кривих на рис. 4.10 дозволяє визначити це співвідношення: в експериментах із закручування молекул ДНК $C/A = 1,5$, тобто $C = 3 \cdot 10^{-19}$ ерг·см.

Критична величина σ (у чому знову можна переконатись, використовуючи "модель мотузки") залежить також від розтягальної сили – чим вона вища, тим важче відбувається утворення плектономи (яке виконує роботу зі скорочення, тобто проти розтягальної сили) і тим більше обертів накопичується у вигляді

торсійних деформацій (крива для 0,4 пН на рис. 4.10). Але при цьому спостерігається певна асиметрія – зростання σ у позитивному напрямку, як і раніше, скорочує відносну відстань до нуля, у негативній області відносно скорочення виходить на деяке плато. Це плато піднімається при подальшому зростанні розтягальної сили і, нарешті, відносна довжина взагалі не реагує на негативні оберти. Справа в тому, що висока розтягальна сила заважає формуванню плектонемі, але торсійна деформація також високо коштує енергетично. У результаті система знаходить ще один вихід – відбувається локальне плавлення подвійної спіралі в найменш стабільних ділянках. Енергетичні витрати на плавлення дають, однак, загальний енергетичний вигравш, оскільки руйнування одного витка дуплекса "поглинає" один негативний оберт, тим самим знімаючи негативну торсійну напругу в усіх інших місцях молекули. Локальне плавлення молекули підтверджується можливістю гібридизації розплавлених ділянок із доданими до системи одноланцюговими фрагментами тієї самої ДНК. Відсоток розплавленої ДНК прямо пропорційний абсолютній величині σ , повна денатурація відбувається при $\sigma = -1$.

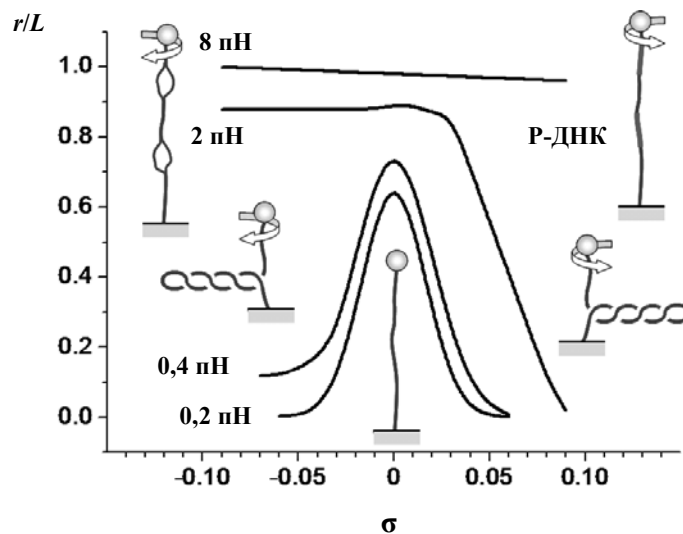


Рис. 4.10. Відносне подовження молекули ДНК залежно від питомої кількості обертів магнітного пінцета для різних значень розтягальної сили. Схематично показано структури, що реалізуються в різних зонах представлених кривих (зліва направо): частково розплавлена ДНК; негативні плектонемічні витки; торсійно релаксована ДНК; позитивні плектонемічні витки; ДНК, що містить ділянки в Р-формі.
Адаптовано з роботи Strick *et al.* (2000)

За розтягальної сили $F < 3$ пН у позитивній області σ залишаються, як і раніше, тільки дві можливості – або позитивна торсійна деформація, або плектонома, і позитивне закручування індукує скорочення. Але подальше зростання сили робить врешті-решт неможливим утворення плектономи, і відносна довжина взагалі не реагує на обертання магнітного пінцета (рис. 4.10). Молекулярне моделювання (яке підтверджується фактом доступності азотистих основ до хімічних модифікацій) свідчить, що за високої розтягальної сили та позитивного закручування відбувається несподіваний структурний перехід: подвійна спіраль викручується "навиворіт" таким чином, що цукрофосфатні ланцюги опиняються всередині спіралі, а азотисті основи, втрачаючи водневі зв'язки між собою, – зовні. Така структура нагадує спіраль, яка була запропонована Полінгом (Lynus Pauling) ще до моделі Уотсона – Кріка, але потім була забута, оскільки за звичайних умов є неможливою. Відповідно, цю незвичайну структуру, яка являє собою праву спіраль із $\sim 2,6$ пар основ на виток, було позначено як Р-форму ДНК. Таке суттєве зростання твіста (кут якого відповідає $\sim 140^\circ$) дозволяє Р-формі "адсорбувати" надлишкову позитивну торсійну деформацію – так само, як денатурована подвійна спіраль робить це для негативної деформації при розкручуванні подвійної спіралі.

4.7. КОМПАКТИЗАЦІЯ ДНК

Високополімерна ДНК існує в живих системах у досить компактному стані. Як приклад достатньо оцінити середньоквадратичну відстань між кінцями молекули ДНК довжиною 5 см (середня довжина ДНК хромосоми людини) за рівн. (4.1) – 70 мкм (узявши 100 нм як кунівський сегмент). У клітинному ядрі діаметром ~ 10 мкм розміщується 46 таких хромосом.

Компактизація будь-якого полімеру розглядається зазвичай у термінах переходу *клубок–глобула*. Клубок – невпорядкований стан полімерного ланцюга з великомасштабними осциляціями щільності (флуктуаціями розміру клубка, підрозд. 4.1). Глобула – стан зі щільною упаковкою ланок ланцюга в компактній структурі без пустот усередині. У загальному випадку перехід між цими двома станами залежить від розчинника, точніше, від взаємодії розчинника з ланками ланцюга. У так званому *доброму розчиннику* кожна ланка має високу спорідненість до нього – намагається розчинитись. Рівномірному розподілу ланок по всьому об'єму розчинника заважає тільки та обставина, що ланки фізично з'єд-

нані між собою. У результаті полімер перебуває у стані клубка. У *поганому розчиннику* взаємна спорідненість ланок є вищою, ніж ланок до розчинника. Наслідком є перехід полімерного ланцюга в компактний глобулярний стан. Наприклад, для молекули білка, що на ~50 % складається з гідрофобних амінокислот, вода – поганий розчинник, і переважним станом для такого білка за фізіологічних умов є глобула. Для молекули ДНК вода, навпаки, – добрий розчинник (поверхня подвійної спіралі є в основному полярною).

Більш того, ДНК є поліелектролітом – ця обставина підсилює ефект виключеного об'єму (підрозд. 4.1) за рахунок того, що наближення одна до одної ділянок, які відстоять по ланцюгу, є не вигідним, оскільки підвищує локальну щільність зарядів протиіонів (розд. 3). У результаті компактизація ДНК за низької іонної сили, коли таке розштовхування є суттєвим, виключається за будь-яких умов. І навпаки, зростання концентрації солі до фізіологічних значень або вище (порівняйте радіуси атмосфери протиіонів на рис. 3.3 за різних значень іонної сили) є необхідною (саме необхідною, а не достатньою) умовою компактизації.

Для переходу ДНК у компактний стан мало знизити електростатичне розштовхування, оскільки це не перетворює воду на поганий розчинник, – має існувати якийсь фактор компактизації, що забезпечить взаємне притягання між ділянками ланцюга. Один із таких чинників – дисперсійні вандерваальсові сили, які можуть бути суттєвими за майже тотальної нейтралізації зарядів ДНК. Другий можливий механізм – дипольна взаємодія між поляризованими іонними атмосферами, коли випадкові флуктуації щільності іонних атмосфер спрацьовують на кшталт флуктуацій електронної щільності в молекулах при вандерваальсових взаємодіях.

Подібні сили притягання здатні забезпечити компактизацію ДНК у двох добре вивчених системах *in vitro*. Перша така система – компактизація в присутності солі та нейтральних гнучких полімерів (типу поліетиленгліколю). Компактна форма ДНК, яка при цьому утворюється, отримала назву Ψ -форми (Ψ – Polymer and Salt Induced). Компактизація відбувається за рахунок виштовхування гнучких полімерних ланцюгів із зони, зайнятої клубком ДНК – цілком ентропійний ефект, пов'язаний із прагненням гнучких полімерів запобігти контактам із ДНК і зберегти повну конформаційну свободу. Можна сказати, що створюється зовнішній тиск гнучких полімерів, який сприяє переходу ДНК у глобулярний стан. Сама глобула (так само, як в усіх інших системах *in vitro*) має вигляд тороподібної структури з отвором по середині. Така форма глобули зумовлена необхідністю мінімізації енергії вигину при компактизації – це нагадує "компактизацію" жорсткого металевого кабелю, намотаного на велику катушку.

Більш фізіологічною причиною компактизації ДНК є присутність катіонів, заряд яких є більшим за одиницю. Моновалентні катіони, які зберігають значну рухливість у складі іонної атмосфери, не здатні забезпечити високий ступінь нейтралі-

зації зарядів. Ефективна компактизація забезпечується полікатионами із зарядом +3 і вище – $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, природні поліаміни спермідин³⁺ і спермін⁴⁺ (див. підрозд. 6.3). Ці агенти мають бути присутніми в концентраціях, що забезпечують нейтралізацію ~90 % фосфатних залишків. Двовалентні катіони у звичайних умовах компактизацію ДНК не викликають, хоча можуть сприяти компактизації у присутності спиртів чи інших ефективних компактизуючих агентів.

До найефективніших агентів, що компактизують ДНК, відносять невпорядковані позитивно заряджені оліго- та поліпептиди – протаміни, невпорядковані ділянки гістонів (див. підрозд. 8.3) тощо. Механізм компактизації полягає в утворенні такими поліпептидами полікатионних містків між віддаленими по ланцюгу ділянками ДНК – саме вони виконують роль сили, яка притягує розділені по ланцюгу ділянки одна до одної. Загальна залежність ефективності компактизації ДНК такими містками від іонної сили виглядає таким чином: у разі дуже низької іонної сили полікатиони міцно взаємодіють з ДНК, але сили відштовхування є надто великими – компактизація не відбувається; якщо іонна сила висока – полікатиони дисоціюють, що також робить неможливим компактний стан; ефективність компактизації є максимальною в діапазоні фізіологічних значень іонної сили (0,1–0,3 М).

ЗАДАЧІ

4.1. За рівнянням (4.1) розрахуйте середньоквадратичну відстань між кінцями молекули ДНК довжиною 10 см, узявши персистентну довжину за 50 нм.

4.2. Користуючись рівн. (4.2в), переконайтесь у тому, що сума ймовірностей для всіх конформацій вільнозчепленого ланцюга дорівнює одиниці: обчисліть інтеграл $\int_0^{\infty} P(r) dr$. Обчисливши його, отримайте вираз (4.1) для середнього квадрата відстані між кінцями. При обчисленні інтегралів скористайтесь тим, що для інтегралів вигляду

$$I_n = \int_0^{\infty} x^n \exp(-a^2 x^2) dx$$

виконуються наступні відомі формули:

$$I_0 = \frac{\sqrt{\pi}}{2a}; \quad I_1 = \frac{1}{2a^2}; \quad I_n = \frac{n-1}{2a^2} I_{n-2}.$$

4.3. Використовуючи наведені вище формули та рівн. (4.2а), знайдіть середнє значення квадрата проекції відстані між кінцями вільнозчепленого ланцюга на деякий напрямок: обчисліть інтеграл $\int_{-\infty}^{+\infty} r_{\alpha}^2 P(r_{\alpha}) dr_{\alpha}$. Чому дорівнює середнє абсолютне значення проекції однієї ланки ланцюга на цей напрямок?

4.4. Нехай еластичний стрижень довжиною l складається з двох ділянок довжиною d кожна, для яких константи торсійної жорсткості дорівнюють C_1 і C_2 . Один кінець стрижня торсійно закручений на кут $\Delta\varphi$ відносно іншого, при цьому $\Delta\varphi = \Delta\varphi_1 + \Delta\varphi_2$, де $\Delta\varphi_1$, $\Delta\varphi_2$ – сумарні торсійні кути на ділянках 1 і 2. Користуючись рівн. (4.3), запишіть рівняння для енергії торсійної деформації у вигляді суми енергій для двох ділянок, виразивши $\Delta\varphi_2$ через $\Delta\varphi_1$ і $\Delta\varphi$. Знайдіть рівноважні значення $\Delta\varphi_1$ і $\Delta\varphi_2$ – візьміть похідну від отриманого виразу для вільної енергії та знайдіть $\Delta\varphi_1$, за якого похідна дорівнює нулю; запишіть відповідний вираз для $\Delta\varphi_2$. Підставивши рівноважні значення $\Delta\varphi_1$ і $\Delta\varphi_2$ в рівняння для вільної енергії, знайдіть вираз для вільної енергії торсійної деформації в рівноважному стані. Порівнявши цей вираз (після відповідних алгебраїчних перетворень енергія матиме вигляд функції від $\Delta\varphi^2$ з певним коефіцієнтом) з рівн. (4.3), визначте усереднену

константу торсійної жорсткості для стрижня в цілому – переконайтеся в тому, що отриманий вираз є еквівалентним рівн. (4.4). Чому дорівнюють рівноважні значення $\Delta\varphi_1$ і $\Delta\varphi_2$, якщо $C_1 = C_2$?

4.5. Отримайте вираз (4.9), розрахувавши інтеграл у попередньому рівнянні.

4.6. Скориставшись рівн (4.9), побудуйте графік залежності середньоквадратичної відстані між кінцями ДНК від її контурної довжини в діапазоні від 0 до 10 тис. пар основ.

4.7. Нехай ділянка ДНК довжиною 50 пар основ вигинається в комплексі з білком на кут 80° (див. рис. 4.3). Розрахуйте радіус кривизни ДНК у комплексі та енергетичні витрати на вигин. Знайдіть значення енергії вигину в одиницях $k_B T$ і в ккал/моль комплексу при 27°C .

4.8. Фрагмент ДНК довжиною 250 пар основ є замкненим у кільце, яке утворює ідеальне коло в одній площині. Розрахуйте енергію вигину ДНК у такому кільці.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Загальна

- Гросберг, А. Ю.* Статистическая физика макромолекул / А. Ю. Гросберг, А. Р. Хохлов. – М. : Наука, 1989.
- Кантор, Ч.* Биофизическая химия : в 3 т. / Ч. Кантор, П. Шиммел. – М. : Мир, 1984.
- Флори, П.* Статистическая механика цепных молекул / П. Флори. – М. : Мир, 1971.
- Bloomfield, V. A.* Physical chemistry of nucleic acids / V. A. Bloomfield, D. M. Crothers, I. Tinoco. – N.Y. : Harper and Row, 1974.
- Yamakawa, H.* Modern theory of polymer solutions / H. Yamakawa. – N.Y. : Harper and Row, 1971.

Еластичні властивості ДНК

- Baumann, C. G.* Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules / C. G. Baumann, S. B. Smith, V. A. Bloomfield [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – Vol. 94. – P. 6185–6190.
- Cairney, K. L.* Flow birefringence of T7 phage DNA: dependence on salt concentration / K. L. Cairney, R. E. Harrington // Biopolymers. – 1982. – Vol. 21. – P. 923–934.
- Fixman, M.* The flexibility of polyelectrolyte molecules / M. Fixman // J. Chem. Phys. – 1982. – Vol. 76. – P. 6346–6353.
- Hagerman, K. R.* Helix rigidity of DNA: the meroduplex as an experimental paradigm / K. R. Hagerman, P. J. Hagerman // J. Mol. Biol. – 1996. – Vol. 260. – P. 207–223.
- Hagerman, P. J.* Investigation of the flexibility of DNA using transient electric birefringence / P. J. Hagerman // Biopolymers. – 1981. – Vol. 20. – P. 1503–1535.
- Hagerman, P. J.* Flexibility of DNA / P. J. Hagerman // Ann. Rev. Biophys. Chem. – 1988. – Vol. 17. – P. 265–286.
- Hogan, M. E.* Dependence of DNA helix flexibility on base composition / M. E. Hogan, J. LeGrange, R. H. Austin // Nature. – 1983. – Vol. 304. – P. 752–754.
- Millar, D. P.* Torsion and bending of nucleic acids studied by subnanosecond time-resolved fluorescence depolarization of intercalated dyes / D. P. Millar, R. J. Robbins, A. H. Zewail // J. Chem. Phys. – 1982. – Vol. 76. – P. 2080–2094.
- Olson, W. K.* Simulating DNA at low resolution / W. K. Olson // Curr. Opin. Struct. Biol. – 1996. – Vol. 6. – P. 242–256.
- Olson, W. K.* Modeling DNA deformations / W. K. Olson, V. B. Zhurkin, // Curr. Op. Struct. Biol. – 2000. – Vol. 10. – P. 286–297.
- Range, K.* The contribution of phosphate-phosphate repulsions to the free energy of DNA bending / K. Range, E. Mayaan, L. J. Maher [et al.] // Nucl. Acids Res. – 2005. – Vol. 33. – P. 1257–1268.

Schellman, J. A. Static contributions to the persistence length of DNA and dynamic contributions to DNA curvature / J. A. Schellman, S. C. Harvey // *Biophys Chem.* – 1995. – Vol. 55. – P. 95–114.

Taylor, W. H. Application of the method of phage T4 DNA ligase-catalyzed ring-closure to the study of DNA structure. II. NaCl-dependence of DNA flexibility and helical repeat / W. H. Taylor, P. J. Hagerman // *J. Mol. Biol.* – 1990. – Vol. 212. – P. 363–367.

Williams, L. D. Electrostatic mechanisms of DNA deformation / L. D. Williams, L. J. Maher // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2000. – Vol. 29. – P. 497–521.

Циклізація ДНК

Crothers, D. M. DNA bending, flexibility, and helical repeat by cyclization kinetics / D. M. Crothers, J. Drak, J. D. Kahn [et al.] // *Methods Enzymol.* – 1992. – Vol. 212. – P. 3–29.

Jacobson, H. Intramolecular reaction in polycondensation. I. Theory of linear systems / H. Jacobson, W. H. Stockmayer // *J. Chem. Phys.* – 1950. – Vol. 18. – P. 1600–1606.

Levene, S. D. Ring closure probabilities for DNA fragments by Monte Carlo simulation / S. D. Levene, D. M. Crothers // *J. Mol. Biol.* – 1986. – Vol. 189. – P. 61–72.

Podtelezhnikov, A. A. Multimerization-cyclization of DNA fragments as a method of conformational analysis / A. A. Podtelezhnikov, C. Mao, N. C. Seeman [et al.] // *Biophys. J.* – 2000. – Vol. 79. – P. 2692–2704.

Rippe, K. Making contacts on a nucleic acid polymer / K. Rippe // *Trends Biochem. Sci.* – 2001. – Vol. 26. – P. 733–740.

Shimada, J. Ring-closure probabilities for twisted wormlike chains: application to DNA / J. Shimada, H. Yamakawa // *Macromolecules.* – 1984. – Vol. 17. – P. 689–698.

Shore, D. Energetics of DNA twisting. I. Relation between twist and cyclization probability / D. Shore, R. L. Baldwin // *J. Mol. Biol.* – 1983. – Vol. 170. – P. 957–981.

Наноманіпуляції з індивідуальними молекулами ДНК

Allemand, J. -F. Stretched and overwound DNA forms a Pauling-like structure with exposed bases / J. -F. Allemand, D. Bensimon, R., Lavery [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 14152–14157.

Bustamante, C. Ten years of tension: single molecule DNA mechanics / C. Bustamante, Z. Bryant, S. B. Smith // *Nature.* – 2003. Vol. 421. – P. 423–427.

Bustamante, C. Entropic elasticity of λ -phage DNA / C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia [et al.] // *Science* – 1994. – Vol. 265. – P. 1599–1600.

Bustamante, C. Single-molecule studies of DNA mechanics / C. Bustamante, S. B. Smith, J., Liphardt [et al.] // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2000. – Vol. 10. – P. 279–285.

Lionnet, T. Wringing out DNA / T. Lionnet, S. Joubaud, R., Lavery [et al.] // *Phys. Rev. Lett.* – 2006. – Vol. 96, 178102.

Marko, J. Stretching DNA / J. Marko, E. Siggia // *Macromolecules.* – 1995. – Vol. 28. – P. 8759–8770.

Moffitt, J. R. Recent advances in optical tweezers / J. R. Moffitt, Y. R. Chemla, S. B. Smith [et al.] // *Annu. Rev. Biochem.* – 2008. – Vol. 77. – P. 205–228.

Strick, T. R. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule / T. R. Strick, J. -F. Allemand, D. Bensimon [et al.] // *Science* – 1996. – Vol. 271. – P. 1835–1837.

Strick, T. R. Behavior of Supercoiled DNA / T. R. Strick, J. -F. Allemand, D. Bensimon [et al.] // *Biophys. J.* – 1998. – Vol. 74. – P. 2016–2028.

Strick, T. R. Stress-induced structural transitions in DNA and proteins / T. R. Strick, J. -F. Allemand, D. Bensimon [et al.] // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2000. – Vol. 29. – P. 523–543.

B–S перехід у механічно розтягнутій ДНК

Ahsan, A. Elasticity theory of the B-DNA to S-DNA transition / A. Ahsan, J. Rudnick, R. Bruinsma // *Biophys. J.* – 1998. – Vol. 74. – P. 132–137.

Cluzel, P. DNA: an extensible molecule / P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller [et al.] // *Science.* – 1996. – Vol. 271. – P. 792–794.

Kosikov, K. M. DNA stretching and compression: large-scale simulations of double helical structures / K. M. Kosikov, A. A. Gorin, V. B. Zhurkin [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1999. – Vol. 289. – P. 1301–1326.

Lebrun, A. Modelling extreme stretching of DNA / A. Lebrun, R. Lavery // *Nucl. Acids Res.* – 1996. – Vol. 24. – P. 2260–2267.

Rousina, I. Force-induced melting of the DNA double helix / I. Rousina, V. A. Bloomfield // *Biophys. J.* – 2001. – Vol. 80. – P. 882–900.

Smith, S. B. Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules / S.B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante // *Science.* – 1996. – Vol. 271. – P. 795–796.

Wenner, J. R. Salt dependence of the elasticity and overstretching transition of single DNA molecules / J. R. Wenner, M. C. Williams, I. Rousina [et al.] // *Biophys. J.* – 2002. – Vol. 82. – P. 3160–3169.

Williams, M. C. Entropy and heat capacity of DNA melting from temperature dependence of single molecule stretching / M. C. Williams, J. R. Wenner, I. Rousina [et al.] // *Biophys. J.* – 2001. – Vol. 80. – P. 1932–1939.

Компактизація ДНК

Bloomfield, V. A. DNA condensation / V. A. Bloomfield // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1996. – Vol. 6. – P. 334–341.

Bloomfield, V. A. DNA condensation by multivalent cations / V. A. Bloomfield // *Biopolymers.* – 1997. – Vol. 44. – P. 269–282.

Chattoraj, D. K. DNA condensation with polyamines. II. Electron microscopic studies / D. K. Chattoraj, L. C. Gosule, J. A. Schellman // *J. Mol. Biol.* – 1978. – Vol. 121. – P. 327–337.

Gronbech-Jensen, N. Counterion-induced attraction between rigid polyelectrolytes / N. Gronbech-Jensen, R. J. Mashl, R. F. Bruinsma [et al.] // *Phys. Rev. Lett.* – 1997. – Vol. 78. – P. 2477–2480.

Grosberg, A. Yu. On the theory of Ψ -condensation / A. Yu. Grosberg, I. Ya. Erukhimovich, E. I. Shakhnovitch // *Biopolymers.* – 1982. – Vol. 21. – P. 2413–2432.

Livolant, F. Condensed phases of DNA: structures and phase transitions / F. Livolant, A. Leforestier // *Prog. Polym. Sci.* – 1996. – Vol. 21. – P. 1115–1164.

Rau, D. C. Direct measurement of the intermolecular forces between counterion-condensed DNA double helices. Evidence for long range attractive hydration forces / D. C. Rau, V. A. Parsegian // *Biophys. J.* – 1992. – Vol. 61. – P. 246–259.

Rouzina, I. Macroion attraction due to electrostatic correlation between screening counterions. 1. Mobile surface-adsorbed ions and diffuse ion cloud / I. Rouzina, V. A. Bloomfield // *J. Phys. Chem.* – 1996. – Vol. 100. – P. 9977–9989.

Post, C. B. Theory of DNA condensation: collapse vs. aggregation / C. B. Post, B. H. Zimm // *Biopolymers.* – 1982. – Vol. 21. – P. 2123–2137.

Розділ 5

ЦИРКУЛЯРНА ДНК

ДНК у живих системах практично не існує в лінійній формі з двома вільними кінцями. Довгі молекули ДНК еукаріотичних хромосом (розд. 8) утворюють петлі, кінці яких жорстко зафіксовані на скелетних структурах клітинного ядра. Бактеріальна ДНК є циркулярною: вона являє собою або порівняно невеликі циркулярні плазмідні, або велику циркулярну хромосому, у межах якої також утворюються петлі. У молекулі, два кінці якої жорстко зафіксовані або з'єднані один з одним, виникають *топологічні* обмеження, що приводить до нетривіальних фізичних ефектів і важливих біологічних наслідків. Подібна топологічно обмежена система вже розглядалась у підпідрозд. 4.6.3. У цьому розділі йтиметься здебільшого про циркулярну ДНК, але для ДНК із зафіксованими кінцями виконуються такі самі закономірності, що й для циркулярної.

5.1. ТОПОЛОГІЯ¹ ЦИРКУЛЯРНОЇ ДНК

Головне, що слід розуміти про циркулярну ДНК, це те, що вона складається з *двох кілець* (двох полінуклеотидних ланцюгів), закручених один навкруг одного в подвійну спіраль. Центральним поняттям топології циркулярної ДНК є так зване число зачеплень Lk (linking number) цих двох кілець.

¹ Топологія – розділ математики, що вивчає такі властивості просторових об'єктів, які не залежать від неперервних – без розривів – деформацій цих об'єктів.)

5.1.1. Число зачеплень

Число зачеплень визначається як *число перетинів одним циркулярним контуром поверхні, натягнутої на другий контур*. У найпростішому випадку два кільця можна зачепити одне за одне один раз ($Lk = 1$, рис. 5.1), і будь-які деформації кільця (за умови збереження цілісності кожного кільця) не змінять цієї величини: кільця не можна ні розвести, ні збільшити ступінь зачеплень. Отже, і це одна із двох важливих властивостей числа зачеплень, Lk системи двох кілець є *постійною величиною* – топологічним інваріантом, – поки обидва кільця інтактні (не містять розривів). Легко уявити два кільця, зачеплені одне за одне 2 рази, 20 (рис. 5.1) або 120 разів, але не може бути двох з половиною зачеплень. Це означає, що Lk є *цілим числом*. Можна сказати, що число зачеплень квантується. Саме ці дві властивості числа зачеплень і накладають топологічні обмеження на молекулу циркулярної ДНК.

На рис. 5.1 показано планарну (вісь подвійної спіралі лежить в одній площині) циркулярну молекулу ДНК з $Lk = 20$. Зрозуміло, що для такої системи Lk дорівнює твісту Tw – числу витків подвійної спіралі ($Tw = N\Omega/2\pi = N/\gamma$, де N – кількість пар основ, Ω – середній кут твіста, γ – кількість пар основ на виток спіралі; твіст прийнято вважати позитивним для правої спіралі та негативним – для лівої). Іншими словами, для *планарної* циркулярної ДНК $Lk = Tw$, де Tw має бути позитивним цілим числом.

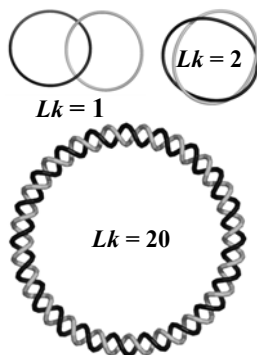


Рис. 5.1. Два кільця з різним числом зачеплень Lk , у тому числі – планарна форма циркулярної ДНК з $Lk = 20$

Найвигідніший твіст ДНК Tw_0 (часто позначається також як Lk_0) визначається зовнішніми умовами та послідовністю пар основ (підрозд. 1.4), тобто зовсім не повинен бути цілим числом. Лише тоді, коли $Tw = Tw_0$ (припустимо, що ця умова виконується для прикладу на рис. 5.1, і $Tw_0 = 20$), при замиканні в кільце ДНК набуде найбільш енергетично вигідної планарної форми, у складі якої реалізується мінімальний вигин молекули.

Якщо ж (як це частіше буває) T_{w_0} не є цілим числом, замикання в кільце (точне зведення кінців обох ланцюгів, див. також підрозд. 4.5) є можливим або за рахунок зміни твіста до цілого значення (треба підкрутити подвійну спіраль, щоб виставити один кінець точно напроти іншого), або шляхом додаткових вигинів молекули з відхиленням від планарної форми.

5.1.2. Твіст

Щоб з'ясувати, чому дорівнює число зачеплень у загальному випадку непланарного кільця, треба спочатку точніше визначити твіст для непланарної конфігурації осі подвійної спіралі. Вісь дуплекса, як і будь-яку криву у просторі, можна охарактеризувати в кожній точці трьома взаємно перпендикулярними одиничними векторами (рис. 5.2). Один із цих векторів – спрямований по дотичній до кривої вектор тангента \mathbf{t} – уже зустрічався в підрозд. 4.3. Інші два вектори – вектор нормалі \mathbf{n} , спрямований по радіусу кривизни, і перпендикулярний до тангента й нормалі вектор бінормалі \mathbf{b} . Нагадаємо, що тангент визначається як похідна по криволінійній координаті s від вектора \mathbf{r} , кінець якого описує криву: $\mathbf{t} = d\mathbf{r}/ds$. Три одиничні вектори підпорядковані співвідношенням:

$$\begin{aligned} \frac{d\mathbf{t}}{ds} &= \kappa\mathbf{n}, & \mathbf{t} \times \mathbf{n} &= \mathbf{b}, \\ \frac{d\mathbf{b}}{ds} &= -\tau\mathbf{n}, & \frac{d\mathbf{n}}{ds} &= -\kappa\mathbf{t} + \tau\mathbf{b}. \end{aligned} \quad (5.1)$$

де κ – кривизна, τ – *геометричне кручення* кривої. При русі точки вздовж кривої тангент обертається навколо бінормалі з миттєвою кутовою швидкістю κ (відношення кута вигину до нескінченно малої довжини дуги вздовж кривої, яке дорівнює оберненому радіусу кривизни – див. рис. 4.3). Сумарний квадрат кривизни всієї кривої дорівнює інтегралу в рівн. (4.6). Пара взаємно перпендикулярних векторів нормалі та бінормалі обертається навколо тангента з миттєвою кутовою швидкістю τ . Інакше, сумарне геометричне кручення (будемо надалі називати його просто *крученням*) для всієї кривої контурної довжини L – сумарний кут обертання нормалі (і бінормалі) навколо тангента

$$\Phi = \int_0^L \left(\mathbf{n} \times \frac{d\mathbf{n}}{ds} \right) \cdot \mathbf{t} ds = \int_0^L (\mathbf{t} \times \mathbf{n}) \cdot d\mathbf{n} = \int_0^L \tau ds. \quad (5.2)$$

Зрозуміло, що для планарної кривої нормаль завжди лежить в одній площині й не обертається, отже, сумарне кручення $\Phi = 0$.

Досі розглядалась просторова конфігурація кривої, яка збігається з віссю подвійної спіралі. Тепер уведемо ще один вектор \mathbf{v} , який лежить у площині нормалі та бінормалі й обертається навколо тангента незалежно від них із певною постійною кутовою швидкістю (рис. 5.2). Кінець цього вектора описує спіральну лінію навколо кривої, загальна кількість обертів такої лінії навколо тангента (не обов'язково ціла) – не що інше як твіст. Отже, математичне визначення твіста (достатньо розглянути тільки одну спіральну лінію – кількість витків подвійної спіралі є еквівалентною величиною) слід записати аналогічно до рівн. (5.2) як

$$Tw = \frac{1}{2\pi} \int_0^L (\mathbf{t} \times \mathbf{v}) \cdot d\mathbf{v} \quad (5.3)$$

Оскільки вектор \mathbf{v} лежить у площині нормалі й бінормалі, його завжди можна представити як суму цих двох векторів $\mathbf{v} = \mathbf{n} \cos \alpha + \mathbf{b} \sin \alpha$, де α – кут між вектором \mathbf{v} та нормаллю (який змінюється вздовж кривої). Підставивши це співвідношення в рівн. (5.3) і використавши формули (5.1), можна показати те, що легко зрозуміти з правої частини рис. 5.2: загальний кут оберту вектора \mathbf{v} дорівнює сумі загальної зміни кута α відносно нормалі (обертання \mathbf{v} у локальній системі координат) і крученню кривої – обертання самої нормалі (у будь-якому напрямку, який визначається конфігурацією кривої) навколо тангента. Тобто, позначивши загальну зміну кута α , розділену на 2π як локальний твіст Tw_{loc} (кількість обертів), можна записати:

$$Tw = Tw_{loc} + \Phi/2\pi. \quad (5.4)$$

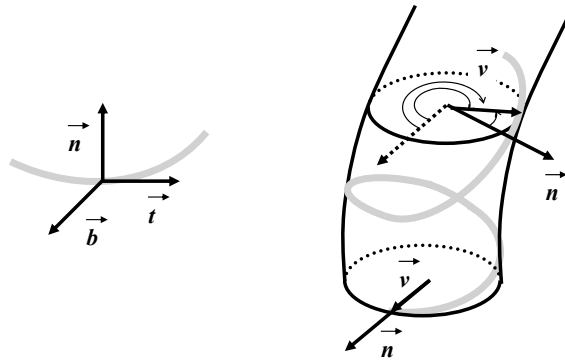


Рис. 5.2. Три одиничні вектори, що утворюють локальну систему координат у кожній точці кривої (ліворуч), і схема обертання нормалі та деякого вектора \mathbf{v} навколо тангента при русі вздовж кривої (праворуч). Показано, що сумарний кут обертання \mathbf{v} можна розкласти на суму двох кутів – кут \mathbf{v} відносно нормалі та кут обертання самої нормалі

5.1.3. Центральне рівняння топології циркулярної ДНК

Розглянемо тепер криву (вісь спіралі), замкнену в кільце. Оберемо деяку точку, де вектор \mathbf{v} збігається з нормаллю (вихідний кут $\alpha = 0$, як на рис. 5.2) – вихідний напрямок вектора \mathbf{v} можна обрати довільно. Оскільки крива замкнена, за будь-якої її конфігурації кінцева точка має збігатися з початковою, як і всі вектори, що характеризують криву. Отже, кінцевий кут α також неодмінно дорівнює нулю (точніше – цілому числу періодів 2π), оскільки вектор \mathbf{v} неодмінно має зробити *цілу загальну кількість обертів* відносно нормалі. Таким чином, локальний твіст $T_{w_{loc}}$ циркулярної ДНК, на відміну від загального твіста, дорівнює цілому числу. Зрозуміло при цьому, що твіст Tw (який може не бути цілим) є основним фактором, що визначає число зачеплень Lk (яке має бути цілим). Інакше кажучи, за рівн. (5.4), щоб зберегти цілочислове значення Lk , у загальному випадку до величини твіста слід додати деяке інше ціле число K і відняти нецілочислову кількість обертів нормалі:

$$Lk = T_{w_{loc}} + \Phi/2\pi + K - \Phi/2\pi. \quad (5.5)$$

Сума перших двох доданків дорівнює твісту (рівн. 5.4), а сума двох останніх (зміст величини K з'ясуємо нижче) – є функцією загальної просторової конфігурації осі дуплекса. Цю функцію називають *райзингом* (writhing) і позначають як Wr . Отже,

$$Lk = Tw + Wr. \quad (5.6)$$

Це просте рівняння – так зване рівняння Фуллера, або Калугареану – Уайта – Фуллера (Gheorghe Călugăreanu, James White, F. Brock Fuller), – є центральним у топології циркулярної ДНК. Для планарного кільця $\Phi = 0$ і $K = 0$ (див. нижче), тобто $Lk = Tw$. У загальному випадку число зачеплень, залишаючись цілим і не змінюючись за будь-яких деформацій, розподіляється між двома величинами, які можуть набувати будь-яких значень.

Як правило, число зачеплень дорівнює твісту тоді, коли $Tw = T_{w_0} \equiv Lk_0$. (Слід звернути увагу на те, що Lk_0 не є числом зачеплень, а просто дорівнює найвигіднішому за даних умов твісту подвійної спіралі.) Коли $Lk \neq Lk_0$, у кільці наявна деформація, яка мінімізується, розподіляючись певним чином між змінною твіста $\Delta Tw = Tw - T_{w_0}$ і ненульовим райзингом унаслідок зростання вигину молекули. Отже, загальною мірою деформації є величина

$$\Delta Lk = Lk - Lk_0 = \Delta Tw + Wr. \quad (5.7)$$

Оскільки зростання райзингу (при зростанні загальної деформації) часто пов'язане зі спіралізацією осі подвійної спіралі – *надспіралізацією* (supercoiling), –

величина ΔLk використовується як міра надспіралізації в циркулярній ДНК (під-розд. 5.2). Надспіралізація є тим більшою, чим більше Lk відрізняється від Lk_0 , і чим більша напруга, пов'язана з деформацією, накопичується в ДНК.

5.1.4. Визначення райзингу

Математично число зачеплень визначається інтегралом Гаусса:

$$Lk = \oint_A \oint_B \frac{(\mathbf{t}_1 \times \mathbf{t}_2) \cdot \mathbf{r}_{12}}{r_{12}^3} ds_A ds_B,$$

де інтегрування здійснюється по двох замкнених контурах A і B (двох полінуклеотидних ланцюгах), тобто по усіх парах точок 1 і 2, які належать *двом різним* контурам: $\mathbf{t}_1, \mathbf{t}_2$ – тангенти у двох точках, \mathbf{r}_{12} – вектор відстані між цими точками, r_{12} – його абсолютна величина. За теоремою Стокса (George Stokes) цей вираз саме й дорівнює алгебраїчній сумі перетинів одним контуром поверхні, що натягнута на інший. Основний внесок у цю кількість перетинів дає твіст, але якщо вісь подвійної спіралі сама перетинає поверхню, це буде змінювати загальну кількість перетинів – чим і зумовлений внесок райзингу в число зачеплень. Строге доведення рівняння Фуллера (5.6) полягає в тому, щоб показати, що наведений інтеграл Гаусса є сумою двох інтегралів по *одному* замкнутому контуру, який описує вісь подвійної спіралі. Перший інтеграл збігається з рівн. (5.3) і являє собою твіст, другий – підпорядковується рівнянню, яке визначає райзинг:

$$Wr = \oint_L \oint_L \frac{(\mathbf{t}_1 \times \mathbf{t}_2) \cdot \mathbf{r}_{12}}{r_{12}^3} ds_1 ds_2. \quad (5.8)$$

Останній вираз тільки своїм виглядом збігається з наведеним вище рівнянням для Lk : тут інтегрування здійснюється по всіх парах точок 1, 2 *одного* контуру. За правилами векторної алгебри векторний добуток двох тангентів, якщо вони лежать в одній площині, є перпендикулярним до вектора відстані між двома точками (який лежить у тій самій площині). А скалярний добуток двох взаємно перпендикулярних векторів дорівнює нулю, тобто підінтегральний вираз у такому випадку дорівнює нулю. Отже, рівняння (5.8) ясно вказує, що $Wr = 0$ для планарної кривої (коли всі тангенти лежать в одній площині), а райзинг можна розглядати як міру відхилення кільця від планарної конфігурації.

На рис. 5.3 показано дві 8-подібні конфігурації, які є планарними скрізь, крім однієї точки перехрещення. Можливими є два варіанти такої конфігурації – нижню частину рис. 5.3 можна використовувати як визначення позитивного й негативного перехрещень. Усі пари точок таких кривих, за винятком невеличких прямих

відривків, що перехрещуються, дають нульовий внесок у райзинг, оскільки лежать в одній площині. Інакше кажучи, з метою розрахунку райзингу цих кривих можна застосувати рівн. 5.8 тільки для нескінченно коротких прямих відривків в зоні перехрещення. Якщо вважати, що відстань між відривками по нормалі до поверхні прямує до нуля, обчислення інтеграла (5.8) приводить до дуже простого результату: незалежно від кута між відривками, що перехрещуються, райзинг позитивної вісімки дорівнює $+1$, негативної -1 . Цей результат можна узагальнити: райзинг проекції будь-якої просторової конфігурації кільця на площину дорівнює алгебраїчній сумі перехрещень (з урахуванням їхнього знаку). Останнє твердження відкриває геометричний зміст райзингу – райзинг просторової конфігурації кільця є середнім алгебраїчним числом перехрещень для всіх можливих проекцій кільця на всі площини навкруг просторової конфігурації. Наприклад, якщо для однієї з вісімок на рис. 5.3 зростає відстань між ділянками в точці перехрещення, з'являється все більше таких площин, проекції на які не містять перехрещень (зокрема, площина, перпендикулярна площині рисунка) – райзинг зменшується за абсолютною величиною. Таким чином, райзинг є неперервною функцією конфігурації кільця доти, поки ділянка кільця не проходить крізь іншу ділянку. Якщо таке проходження крізь ланцюг відбувається (а воно здійснюється за допомогою деяких ферментів, підрозд. 5.3), значення райзингу змінюється стрибком на ± 2 , як при перетворенні однієї вісімки на рис. 5.3 на іншу шляхом зміни місцями верхнього й нижнього відривків, що перехрещуються.

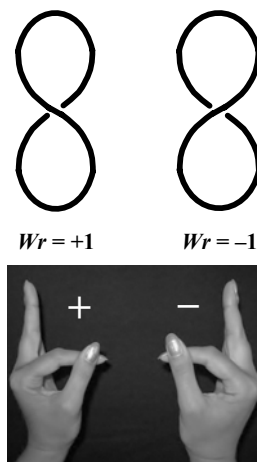


Рис. 5.3. Права (+) і ліва (-) 8-подібні конфігурації, планарні скрізь, крім точки перехрещення.
Унизу: визначення правого й лівого перехрещень – перехрещення вказівного та великого пальців лівої руки відповідає позитивному знаку, правої руки – негативному

Нарешті, повернувшись до векторів, розглянутих у підпідрозд. 5.1.2, сформулюємо ще одне корисне визначення райзингу. Кінець вектора нормалі, обертаючись навколо кривої, описує певну віртуальну лінію. Ця лінія і сама крива можуть бути зачеплені одна за одну, число таких зачеплень називають samozачепленням (self-link); зрозуміло, що samozачеплення може також дорівнювати нулю. Як будь-яке інше число зачеплень, samozачеплення SLk має бути цілим числом, і для нього має виконуватись рівн. (5.6) – SLk дорівнює сумі кількості обертів віртуальної лінії навколо кривої (тобто величині $\Phi/2\pi$, яка тут виконує роль твіста) і райзингу кривої. Отже,

$$Wr = SLk - \Phi/2\pi, \quad (5.9)$$

тобто ціле число, яке було введено в рівн. (5.5), – це samozачеплення SLk . Зрозуміло, що для планарного кільця віртуальна лінія, яка описується кінцем нормалі, не зачеплена за кільце, і $SLk = 0$.

5.1.5. Райзинг регулярних спіральних конфігурацій

Скориставшись рівнянням (5.9), розрахуємо райзинг двох регулярних конфігурацій, одна з яких часто зустрічається для циркулярної ДНК. Почнемо з випадку, коли вісь дуплекса утворює спіральну лінію: оскільки дуплекс сам являє собою спіраль, таку конфігурацію називають суперспіраллю (рис. 5.4).

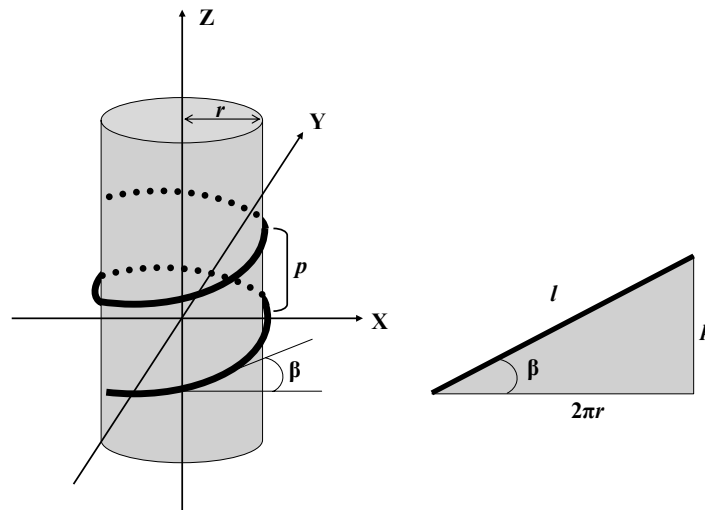


Рис. 5.4. Права спіраль у декартовій системі координат. Праворуч показано розгортку поверхні циліндра для одного витка спіралі довжиною l

Декартові координати кожної точки спіралі можна задати наступним чином (тут і нижче при використанні знаку "±" знак "+" відноситься до правої спіралі, "-" до лівої):

$$\begin{aligned}x &= r \cos(2\pi w), \\y &= \pm r \sin(2\pi w), \\z &= pw,\end{aligned}\tag{5.10}$$

де r – радіус спіралі, p – її крок (відстань уздовж осі z між двома точками, для яких w відрізняється на 1). Коли параметр w змінюється від $-n/2$ до $n/2$, де n – кількість витків спіралі, крива обертається навколо осі Z , як показано на рис. 5.4. Контурна довжина одного витка, як зрозуміло з правої частини рис. 5.4, $l = \sqrt{4\pi^2 r^2 + p^2}$. Відповідно, якщо виражати декартові координати як функції криволінійної координати s уздовж спіральної кривої, слід підставити $w = s/l$ у рівн. (5.10). На рис. 5.4 показано також кут підйому спіралі β – зрозуміло, що він визначається співвідношенням $\sin\beta = p/l$.

Координати (5.10) є координатами кінця вектора \mathbf{r} , спрямованого від початку координат до точки на спіральной кривій, тобто похідні від цих координат по s є декартовими координатами вектора тангента. Застосувавши формули (5.1), можна легко знайти координати векторів нормалі й бінормалі як функції s , а також кривизну та кручення кривої. Кривизна спіралі є постійною в усіх точках ($\kappa = (2\pi/l)\cos\beta$), вектор нормалі в усіх точках спрямований на вісь Z і перпендикулярний до цієї осі, кручення також постійне і становить $\tau = \pm(2\pi/l)\sin\beta$. Отже, загальне кручення є просто добутком τ на контурну довжину спіральної лінії nl :

$$\Phi/2\pi = n \sin\beta.\tag{5.11}$$

У цьому та всіх наступних рівняннях цього підпідрозділу кількості витків n приписано знак "+" для правої спіралі та "-" для лівої.

На рис. 5.5, a показано кільце, яке містить чотири витки регулярної лівої суперспіралі. Петля поза спіраллю є майже планарною і дає порівняно невеликий внесок у райзинг – надалі можна її ігнорувати (це спрощення є тим точнішим, чим більше витків містить спіраль). Кінець нормалі до спіральної частини кільця спрямований на вісь спіралі, тобто віртуальна лінія, що описується кінцем нормалі, являє собою відрізок осі, кінці якого з'єднані петлею. Зрозуміло, що ця лінія та сама циркулярна крива виявляються зачепленими, і число зачеплень – самозачеплення SLk – дорівнює просто кількості спіральних витків із позначкою "+" для правої спіралі та "-" для лівої (на рис. 5.5, a $SLk = -4$). Тому, за рівняннями (5.9), (5.11)

$$Wr = n(1 - \sin\beta)\tag{5.12}$$

– зростання $\sin\beta$ (тобто зростання кроку спіралі та l або зменшення її радіуса) приводить до зменшення абсолютної величини райзингу.

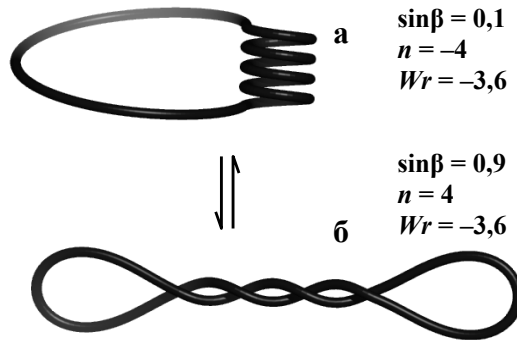


Рис. 5.5. Регулярна ліва суперспіраль у складі кільця (а) і топологічно еквівалентна плектономічна спіраль (б)

Спіральна конфігурація на рис. 5.5, а легко перетворюється в еквівалентну конфігурацію перекрученої плектономічної спіралі (рис. 5.5, б). У цьому можна переконатись, використавши замкнену в кільце гумову трубку. Нагадаємо, що плектонами вже зустрічалися в підпідрозд. 4.6.3. Зверніть увагу, що *ліва* суперспіраль перетворюється при цьому на *праву* плектоному, перехрещення в складі якої є *негативними* (порівн. рис. 5.3 – праву плектоному можна отримати шляхом закручування негативної вісімки навколо вертикалі у площині рисунка). Дві праві спіральні криві у складі плектонами роблять по два витки кожна (загалом чотири плектономічні витки) навколо спільної осі. Іншими словами, загальне кручення кривої знову підпорядковане рівн. (5.11), де кількість витків n має позитивний знак. Але спільну вісь спіралей з петлями на кінцях тепер можна легко "відділити" від кривої: лінія, що описується кінцем нормалі, не зачеплена за криву і $SLk = 0$. Отже, за рівн. (5.9), (5.11) для плектонами

$$Wr = -n \sin\beta, \quad (5.13)$$

де, як і у двох попередніх рівняннях, кількості витків n приписано знак "+" для правої плектономи та "-" для лівої. На відміну від рівн. (5.12), для плектонами зростання $\sin\beta$ приводить до збільшення абсолютної величини райзингу.

Ця різниця залежності райзингу від кута β для простої суперспіралі та плектонами відразу вказує на те, яка з двох конфігурацій є імовірнішою для циркулярної ДНК. Зростання $\sin\beta$ означає зниження кривизни, а отже, і енергетичної вартості конфігурації щодо вигину ДНК (рівн. (4.5), (4.6)). Із рівн. (5.12), (5.13) і рис. 5.5 зрозуміло, що при однаковому для двох конфігурацій значенні райзингу кривизна плектонами є значно нижчою – певного значення райзингу, а отже, і величини ΔLk (рівн. (5.7)), легше досягти у плектономічній конфігурації. У результаті надспіралізованих циркулярних ДНК зазвичай набувають форми перекручених плектоном,

а суперспіралі можуть бути стабілізовані тільки за рахунок додаткових взаємодій з білками (розд. 8). Зокрема, саме плектонами виникають при закручуванні молекули ДНК за допомогою магнітного пінцета (підпдрозд. 4.6.3).

5.2. НАДСПІРАЛІЗАЦІЯ

Походження терміна "надспіралізація" пов'язане зі спостереженнями, що циркулярні ДНК часто під електронним мікроскопом мають форму перекручених плектоном – конфігурацій з ненульовим райзингом. Але слід мати на увазі, що в таких циркулярних ДНК завжди присутні також і торсійні деформації. Відповідно, загальною мірою надспіралізації (тобто мірою деформацій подвійної спіралі, замкненої в кільце) є величина $\Delta Lk = Lk - Lk_0$, розподілена між двома внесками (рівн. (5.7)). У принципі, уся надспіралізація може бути реалізована як тільки зміна твіста – конкретний розподіл ΔLk по ΔTw та Wr залежить від механічних властивостей подвійної спіралі й контурної довжини кільця (підрозд. 5.4).

5.2.1. Позитивна та негативна надспіралізація

Поряд із абсолютною мірою надспіралізації ΔLk часто використовують також питому величину – щільність надспіралізації

$$\sigma = \frac{\Delta Lk}{Lk_0}. \quad (5.14)$$

Величина σ , що використана в підпдрозд. 4.6.3, є еквівалентною – там вважалось, що оберти одного кінця ДНК відносно іншого можуть бути реалізовані як торсійні деформації (ΔTw) і плектономічні витки (Wr), а кількість обертів дорівнювала ΔLk . Отже, відразу зрозуміло, що негативне значення ΔLk є топологічно еквівалентним розкручуванню, а позитивне – закручуванню подвійної спіралі. Виділені з бактерій циркулярні плазмідні зазвичай характеризуються величиною $\sigma \sim -0,06 \div -0,05$.

Оскільки, як правило, Lk_0 за даних умов не дорівнює цілому числу, замикання ДНК у кільце майже завжди пов'язане з виникненням тієї чи іншої надспіралізації, і ця надспіралізація буде тим більшою за абсолютною величиною, чим більше обертів здійснив один кінець молекули навколо іншого перед замиканням. При цьому для збільшення надспіралізації не обов'язково обертати дволанцюговий кінець – того самого ефекту можна досягти, обертаючи в місці одноланцюгового розриву

один кінець навколо інтактного ланцюга. Проілюструємо це на простому прикладі (рис. 5.6), використавши планарне кільце з $Lk = Lk_0 = 20$ з рис. 5.1. Якщо зробити одноланцюговий розрив, збільшити кількість витків подвійної спіралі на 1 (закрутити подвійну спіраль торсійно) і зашити розрив, відновивши ковалентний зв'язок, то тим самим число зачеплень зросте на 1: ΔLk набуде значення +1, яке розподілиться між зміною твіста та райзингом. У цьому випадку кажуть про *позитивну надспіралізацію*, яка є топологічно еквівалентною до зростання закручування подвійної спіралі. Відповідно, *розкручування* подвійної спіралі після розриву та наступне відновлення цілісності ланцюга приведе до *негативної надспіралізації* з $\Delta Lk = -1$. Однакові циркулярні молекули ДНК, які різняться лише числом зачеплень (як 3 молекули з $Lk = 19, 20$ та 21 на рис. 5.6), називаються *топоізомерами*.

Значення Lk певного топоізомеру залишається незмінним тільки за умови цілісності обох полінуклеотидних ланцюгів. Якщо внести навіть один розрив у хоча б один із ланцюгів, два кінці ланцюга в місці розриву отримають свободу обертатися навколо інтактного ланцюга. У результаті будь-яка надспіралізація і пов'язана з нею еластична напруга зникнуть – відбудеться *релаксація* циркулярної ДНК.

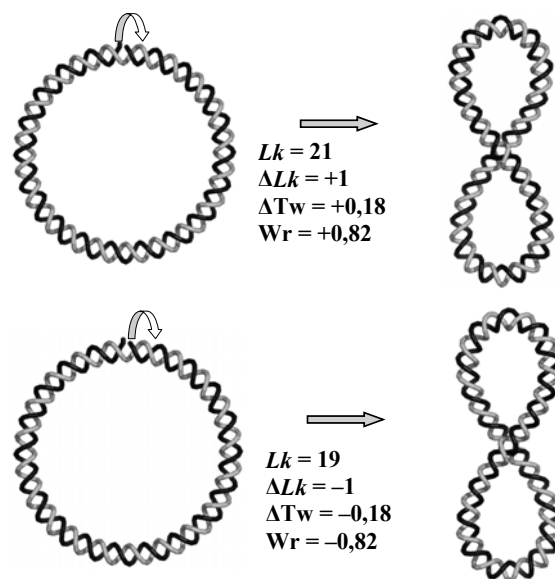


Рис. 5.6. Збільшення (угорі) чи зменшення (унизу) ступеня закручування подвійної спіралі на один оберт приводить, відповідно, до позитивної чи негативної надспіралізації циркулярної ДНК із $Lk_0 = 20$

Для негативно надспіралізованої ДНК існує ще один шлях релаксації (принаймні часткової) без розривів: локальне розкручування подвійної спіралі. Припустимо, що лінійна молекула ДНК із $Lk_0 = 20$ (як на рис 5.6) може існувати також

у формі зі зруйнованим (розплавленим) одним витком подвійної спіралі, тобто з величиною $Lk_0 = 19$. За фізіологічних умов розведення ланцюгів потребує зростання вільної енергії, і така форма є неможливою. Але локальне плавлення подвійної спіралі у складі негативного топоізомеру буде супроводжуватись також зниженням вільної енергії за рахунок релаксації, оскільки $\Delta Lk = 19 - 20 = -1$ зміниться на $\Delta Lk = 19 - 19 = 0$. У результаті, якщо загальна вільна енергія знизиться, локальна дестабілізація подвійної спіралі стане імовірнішою – саме такий ефект спостерігається при розкручуванні ДНК магнітним пінцетом (підпдрозд. (4.6.3)). Детальніше залежні від надспіралізації конформаційні переходи розглядаються в підрозд. 5.5.

5.2.2. Приготування та розділення топоізомерів

Отримати різні топоізомери за допомогою процедури, зображеної на рис. 5.6 (використовуючи ферменти – нуклеазу, яка вносить одноланцюговий розріз – нік (nick), і лігазу, яка його зашиває), насправді неможливо для кільця такого маленького розміру: топоізомери з $\Delta Lk = \pm 1$ дорого коштують енергетично, і єдиним топоізомером залишиться молекула з $\Delta Lk = 0$. Для великих (а отже, більш гнучких) кілець топоізомери з $\Delta Lk \neq 0$ після нікування-лігування будуть виникати за рахунок теплових флуктуацій (підрозд. 5.4). Проте навіть для маленьких кілець кількість топоізомерів (один або два) залежить від значення Lk_0 . Розглянемо кільце довжиною $N = 500$ пар основ в умовах, коли найвигіднішою є спіральна періодичність $\gamma_0 = 10,5$ пар основ на виток дуплекса. Іншими словами, $Lk_0 = N/\gamma_0 = 47,6$ приблизно однаково відрізняється від двох найближчих цілих чисел, і після нікування-лігування (або при замиканні лінійної ДНК у кільце) є можливими два топоізомери: з $Lk = 47$ і 48 . Зрозуміло, що відносний вміст другого топоізомеру буде вищим, оскільки йому відповідає трохи менше абсолютне значення ΔLk .

Отримати будь-який бажаний топоізомер можна, здійснивши ензиматичне зашивання ДНК у кільце в різних умовах, що зумовлюють різні значення Lk_0 . Одержані топоізомери будуть відповідати найменш енергетичним формам – таким, для яких Lk є максимально наближеними до найбільш вигідного твіста. Щойно зациклення відбулося, Lk залишається незмінним. А зміна умов і нове значення Lk_0 зумовить зростання величини ΔLk (і, відповідно, надспіралізації) у негативний чи позитивний бік. Наприклад, зашивання в кільце розглянутої вище молекули з $N = 500$ пар основ в умовах, що відповідають спіральній періодичності $10,0$ пар основ на виток (скажімо, за зниженої температури, див. рівн. (1.1a)), приведе до утворення топоізомеру з $Lk = 50$, в якому після підвищення температури до значень, які зумовлюють періодичність $10,5$ пар основ на виток, виникне надспіралізація $\Delta Lk = +2,4$.

Можна також проводити циклізацію в присутності інтеркаляторів – лігандів, що оборотно зв'язуються з ДНК, вбудовуючись між парами основ і розкручуючи подвійну спіраль у сайті зв'язування (розд. 6). Варіюючи концентрацію інтеркалятора

(а отже, і ступінь зв'язування), можна досягти практично будь-якого ступеня розкручування (а отже, значення Lk_0 , меншого за Lk_0 у відсутності інтеркалятора). Відмивання ДНК від інтеркалятора після циклізації залишає топоізомер з бажаним значенням Lk і негативним значенням ΔLk (слід зауважити, що паспортною характеристикою топоізомеру є величина Lk , оскільки ΔLk залежить від зовнішніх умов). Позитивні топоізомери можна отримати за допомогою тієї самої процедури циклізації у присутності, скажімо, антибіотика нетропсину (розд. 6), який закручує подвійну спіраль у сайті зв'язування.

Якщо інтеркалятор зв'язується з циркулярною ДНК, він так само локально розкручує ДНК. Оскільки число зачеплень при цьому змінитись не може, таке розкручення неодмінно компенсується закрученням в інших частинах молекули – інтеркалятор вносить в циркулярну ДНК позитивну надспіралізацію. Цей ефект використовується, зокрема, для розділення топоізомерів за допомогою гелелектрофорезу (рис. 5.7).

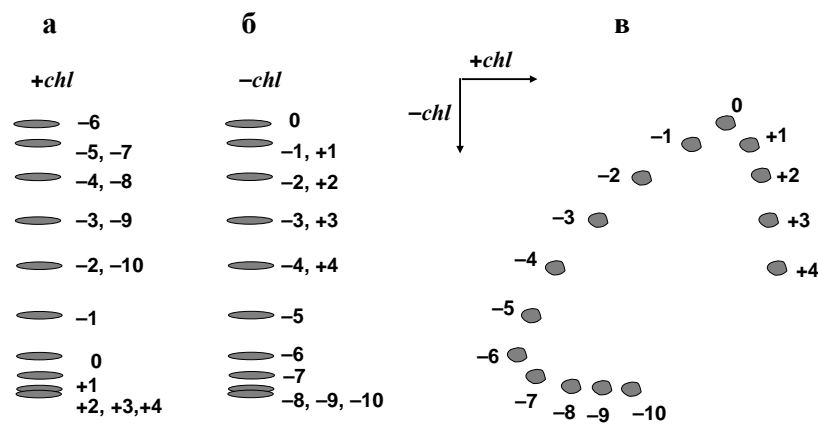


Рис. 5.7. Схема електрофоретичного поділу топоізомерів у присутності (а) та відсутності (б) інтеркалятора хлорокіну. Двовимірний електрофорез – перший напрямок без хлорокіну (-chl), другий у присутності хлорокіну (+chl) (в). Цифрами позначено ΔLk топоізомерів

Узагалі, електрофоретичне розділення топоізомерів базується на тому, що молекули з різною величиною ΔLk мають різний райзинг, а отже, і різний ступінь компактності. Вища компактність (при вищому абсолютному значенні ΔLk) приводить до вищої електрофоретичної рухливості. На рис. 5.7 (б) показано схему розділення топоізомерів з ΔLk від -10 до +4 (цілі числа ΔLk узято для зручності, – зрозуміло, що вони можуть бути якими завгодно, але при цьому завжди різниця становить 1). Рухливість зростає при підвищенні абсолютної величини ΔLk , але негативні та позитивні топоізомери неможливо розрізнити. З метою їхнього розділення та полегшення ідентифікації топоізомерів

проводять електрофорез у присутності інтеркалятора (зазвичай бромистий етидій або хлорокін). На рис. 5.7 (а) зображено ситуацію, коли інтеркалятор (у певній концентрації) вносить у циркулярну ДНК надспіралізацію, що дорівнює приблизно +6. Відповідно, топоізомер -6 тепер рухається як релаксований, -5 і -7 – як $+1$ та -1 відповідно і т. д. Якщо б у суміші не було топоізомерів від -10 до -7 , рухливість усіх топоізомерів була б просто пропорційною до величини ΔLk . Підібравши іншу концентрацію інтеркалятора, можна досягти розділення топоізомерів в іншому діапазоні ΔLk . Але найефективнішим для розділення великої кількості типів топоізомерів є двовимірний електрофорез (рис. 5.7, в): у першому напрямку суміш розганяють без інтеркалятора, після чого замочують гель у розчині інтеркалятора та здійснюють електрофорез у перпендикулярному напрямку у присутності інтеркалятора.

5.2.3. Виникнення надспіралізації *in vivo*

Не єдиним, але одним із основних джерел виникнення надспіралізації в живих системах є різноманітні функціональні процеси, які здійснюються на ДНК, – це передусім транскрипція і реплікація. Проходження такого процесу пов'язане з пересуванням (транслокацією) уздовж ДНК того чи іншого ферменту (*транслокази*), який локально руйнує подвійну спіраль. Транслоказами є, зокрема, РНК- і ДНК-полімерази, а також інші ферменти. Оскільки молекула ДНК – спіраль, пересування транслокази має супроводжуватись або її обертанням навколо осі подвійної спіралі (на кшталт обертання гайки навколо гвинта), або прокручуванням самої подвійної спіралі (обертанням гвинта в гайці). Саме друга можливість і реалізується, оскільки транслоказа працює зазвичай у складі величезного мультибілкового комплексу – "гайка" є надто масивною. Крім того, обертання транслокази додатково гальмується взаємодіями з ДНК, котрі реалізуються не тільки в області активного центру транслокази. Якщо (як це має місце в еукаріотичній клітині) кінці ДНК жорстко зафіксовані на скелетних структурах і не можуть обертатися, транслокація буде створювати топологічні проблеми (рис. 5.8).

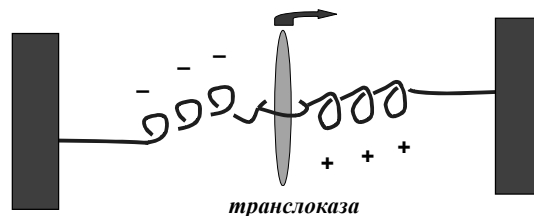


Рис. 5.8. Дві хвилі надспіралізації в процесі роботи транслокази

У процесі пересування вздовж ДНК транслоказа руйнує подвійну спіраль попереду від себе й відновлює її позаду. Локальне розкручування подвійної спіралі попереду транслокази має бути компенсованим позитивною надспіралізацією, відновлення спіралі (закручування) – надспіралізацією негативною. У результаті попереду й позаду від транслокази виникають дві "хвилі" надспіралізації протилежного знаку. У складі циркулярної ДНК такі хвилі взаємно "анігілюють", проте якщо дві транслокази рухаються у протилежних напрямках (саме так і відбувається, зокрема, під час реплікації у прокаріотичній циркулярній хромосомі), надспіралізація накопичується.

Дві хвилі надспіралізації, що виникають при роботі РНК-полімерази, були продемонстровані експериментально, причому як *in vitro*, так і *in vivo*. У першому випадку експеримент полягав у здійсненні транскрипції *in vitro* на циркулярній плазміді у присутності ферменту, що здатен знімати тільки негативну надспіралізацію (див. наступний підрозділ): анігіляції двох хвиль не відбувалося, і після зупинки реакції матриця являла собою суміш позитивних топоізомерів. Експерименти *in vivo* здійснюються, наприклад, шляхом вирізання й замикання в кільце певного фрагмента ДНК у клітині специфічним ферментом. Кільце виділяється та використовується як "свідок" – воно містить надспіралізацію, яка була присутньою в певній геномній зоні. Коли такий фрагмент міститься в промоторі (позаду від полімерази), інтенсифікація транскрипції приводить до накопичення негативної надспіралізації.

Зрозуміло, що накопичення надспіралізації (еластичної напруги) не може продовжуватись нескінченно: врешті-решт напруга буде блокувати процес транслокації. Тому має бути спосіб розв'язання цієї проблеми – знімати надспіралізацію, релаксуючи ДНК. Інструментом, який для цього використовується клітиною, є спеціальні ферменти – ДНК-топоізомерази.

5.3. ДНК-ТОПОІЗОМЕРАЗИ

ДНК-топоізомерази – це ферменти, здатні змінювати число зачеплень. Оскільки зміна числа зачеплень є можливою лише за умови порушення цілісності полінуклеотидних ланцюгів, загальний механізм роботи топоізомераз полягає у внесенні розриву (при цьому один кінець ланцюга тимчасово ковалентно пришивається до залишку Туг у активному центрі ферменту, а інший залишається вільним) і зворотному зашиванні цього розриву (рис. 5.9). Зміна *Lk* відбувається у проміжку між цими двома подіями. Зображена на рис. 5.9 хімічна реакція є оборотною і не потребує додаткових джерел енергії, оскільки дві форми ізоенергетичні. Залежно від типу топоізомерази, до тирозину пришивається або 5'-кінцевий (як на рис. 5.9), або 3'-кінцевий фосфат. Топоізомерази поділяють на два класи.

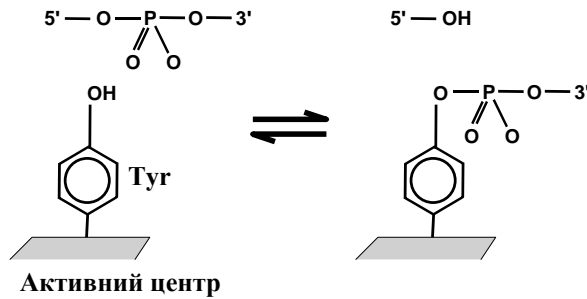


Рис. 5.9. Хімічна схема роботи топоізомераз

5.3.1. Топоізомерази I

Топоізомерази I – мономерні білки, які вносять у ДНК *одноланцюговий* розрив; у свою чергу, вони поділяються на два підкласи – Ia і Ib.

Топоізомерази Ia (прокаріотична топоізомераза I і топоізомераза III, яка присутня як у про- так і в еукаріотів) здатні релаксувати тільки негативно надспіралізовану ДНК. Фермент упізнає дестабілізовану ділянку подвійної спіралі, яка є в негативно надспіралізованій молекулі, розрізає один із ланцюгів і пришиває 5'-кінцевий фосфат до свого активного центру. Після цього відбувається конформаційна зміна ферменту: два кінці розірваного ланцюга розводяться і крізь розрив протягується інтактний ланцюг (рис. 5.10). Після зворотної конформаційної зміни кінці зводяться й розрив зашивається. У результаті твіст ДНК (а отже, і число зачеплень) змінюється на 1 у напрямку зниження рівня негативно надспіралізації – відбувається закручування подвійної спіралі на один виток. Оскільки впізнається дестабілізована ділянка, топоізомераза Ia спрацьовує тільки за наявності досить високої негативно надспіралізації й не здатна релаксувати ДНК повністю, тобто знизити ΔLk до 0. Основна роль топоізомераз цього типу – підтримувати певний оптимальний рівень негативно надспіралізації у ДНК бактеріальної клітини.

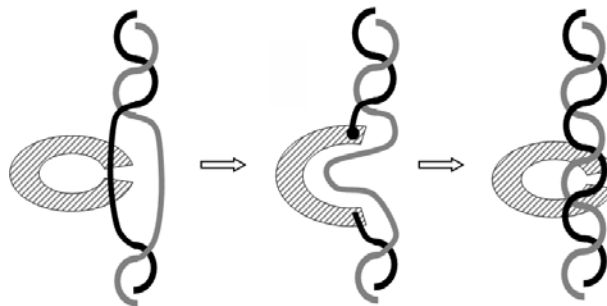


Рис. 5.10. Схема роботи топоізомераз Ia

Топоізомерази Ib (тільки еукаріотичні ферменти) переводять будь-яку ДНК у максимально релаксований стан. Механізм їхньої дії дуже простий: мультидоменний мономерний білок зв'язується з ДНК, оточуючи подвійну спіраль з усіх боків (рис. 5.11), і здійснює односторонній розрив та пришивання 3'-кінцевого фосфату до активного центру. Взаємодії з білком жорстко фіксують подвійну спіраль з того боку від розриву, де відбулося пришивання кінця, а інший кінець отримує змогу вільно обертатися навколо інтактного ланцюга. Після 3–4 випадкових обертів розрив зашивається, і фермент дисоціює. Оскільки оберти є вільними, вони здійснюються в напрямку зниження напруги – максимальної релаксації. Зрозуміло, що *Lk* у результаті роботи топоізомерази змінюється на величину, кратну одиниці, – на кількість обертів. Таким чином, топоізомерази I обох типів змінюють число зачеплень шляхом зміни твіста подвійної спіралі.

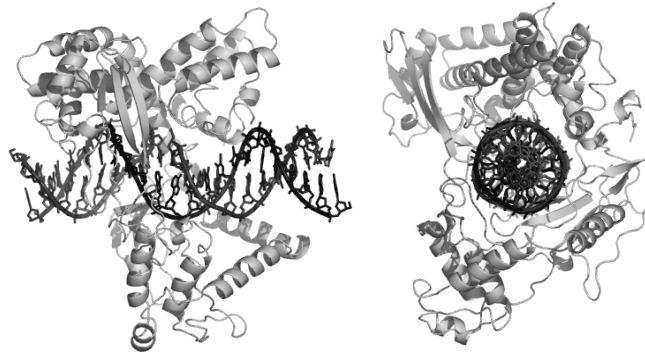


Рис. 5.11. Еукаріотична топоізомераза I у комплексі з ДНК у двох проекціях (код PDB 1K4S)

5.3.2. Топоізомерази II

Топоізомерази II (еукаріотична топоізомераза II, бактеріальні топоізомераза IV та гіраза, топоізомераза VI архебактерій), на відміну від топоізомераз першого класу, змінюють число зачеплень шляхом зміни райзингу циркулярної ДНК. Є також інші відмінності: ці субодиничні білки мають два активні центри, в яких відбувається розрізання обох полінуклеотидних ланцюгів; фермент активний тільки у присутності АТР, енергія гідролізу якого використовується для здійснення конформаційних змін білка. Структурні домени двох субодиниць еукаріотичної топоізомерази II (рис. 3, кольор. вст.) або чотири субодиниці прокаріотичних топоізомераз цього типу утворюють своєрідні верхні та нижні "ворота", що здатні розкриватися й закриватися при структурних перебудовах.

Схему роботи топоізомерази II зображено на рис. 5.12: 1) ділянка ДНК, яка називається G-сегментом, зв'язується з ферментом, і це викликає спорідненість ферменту до АТР; 2) у відповідь на зв'язування АТР відбувається конформаційна зміна, яка супроводжується замиканням іншої зв'язаної ділянки ДНК – Т-сегмента і дволанцюговим розривом у складі G-сегмента; 3) відбувається гідроліз АТР, що приводить до проштовхування Т-сегмента крізь розрив; 4) здійснюється зашивання розриву та звільнення обох сегментів. Шляхом описаної операції можна перетворити, наприклад, одну надспіралізовану молекулу на рис. 5.6 на іншу (або одну вісімку на іншу на рис. 5.3), звідки зрозуміло, що число зачеплень при роботі топоізомерази II змінюється на величину, кратну двом.

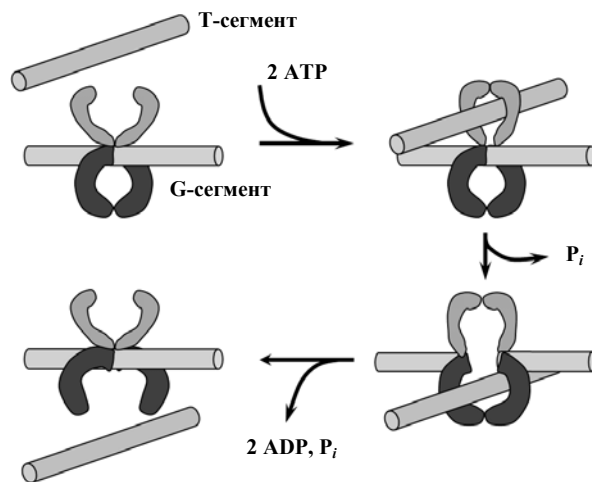


Рис. 5.12. Схema роботи топоізомерази II.

Напрямок зміни Lk залежить від взаємної орієнтації G- і T-сегментів. Еукаріотичні топоізомерази II дозволяють обидві орієнтації: у результаті Lk змінюється в напрямку релаксації ДНК. Проте до класу топоізомераз II належить також бактеріальний фермент – *гіраза* (gyrase), який допускає тільки одну орієнтацію, зображену на рис. 5.12. Результатом роботи гірази є зміна Lk тільки в одному напрямку – накопичення негативної надспіралізації. Це має важливі функціональні наслідки, оскільки сприяє дестабілізації подвійної спіралі ДНК на певних важливих ділянках: запуск багатьох функціональних процесів, зокрема транскрипції та реплікації, потребує розведення полінуклеотидних ланцюгів. У бактерій гіраза виконує також роль релаксації позитивно надспіралізованої ДНК.

Особливим випадком є *зворотна гіраза* термофільних архебактерій. Цей димерний білок складається з двох субодиниць, одна з яких є топоізомеразою класу Ia, а інша – ДНК-геліказою (helicase). Геліказами називають широкий клас ферментів,

які руйнують подвійну спіраль, використовуючи енергію гідролізу АТР. Руйнування здійснюється завдяки трансляційному руху гелікази вздовж одного з ланцюгів – гелікази є транслоказою, що створює попереду свого руху хвилю позитивної, а позаду – негативної надспіралізації (рис. 5.8). Але через присутність у складі ферменту топоізомерази Іа негативна надспіралізація знімається – зворотна гіраза вносить у ДНК позитивну надспіралізацію. Фізіологічна роль позитивної надспіралізації для організмів, які живуть в умовах високих температур, є очевидною: якщо *негативна* надспіралізація, на що вже часто вказувалося вище, сприяє *дестабілізації* дуплекса, то *позитивна стабілізує* його. Зауважимо, що йдеться про локальну стабілізацію / дестабілізацію: повне розходження ланцюгів при плавленні циркулярної ДНК є неможливим (число зачеплень не може змінитись), а отже, будь-яка циркулярна ДНК є стійкішою до підвищення температури.

Біологічна роль топоізомераз полягає в регуляції загального рівня надспіралізації шляхом релаксації надлишкової еластичної напруги та, у деяких випадках, внесення додаткової надспіралізації. Крім того, топоізомерази ІІ необхідні для розділення топологічно зачеплених дволанцюгових молекул ДНК, у першу чергу – дочірніх молекул ДНК після реплікації.

5.4. ЕНЕРГЕТИКА НАДСПІРАЛІЗАЦІЇ

5.4.1. Рівноважний розподіл топоізомерів та енергія надспіралізації

Якщо здійснити замикання лінійної ДНК у кільце або (із тим самим результатом) обробку циркулярної ДНК еукаріотичною топоізомеразою І, продуктом обох цих реакцій буде рівноважний набір топоізомерів – відносна кількість кожного топоізомеру буде визначатися тим, наскільки високу енергетичну ціну довелось сплатити за його утворення. Експеримент свідчить, що, незалежно від розмірів ДНК, розподіл є гауссовим (рис. 5.13) – частка f топоізомеру Lk у рівноважній суміші

$$f \propto \exp\left(-\frac{\Delta Lk^2}{2\langle \Delta Lk^2 \rangle}\right),$$

де $\Delta Lk = Lk - Lk_0$, тобто присутність топоізомеру буде тим нижчою, чим більше його Lk відрізняється від Lk_0 – середнє гауссового розподілу $\langle Lk \rangle = Lk_0$. Ширина (дисперсія) розподілу $\langle \Delta Lk^2 \rangle = \langle (Lk - \langle Lk \rangle)^2 \rangle$ є пропорційною до контурної довжини циркулярної ДНК (не завжди *прямо* пропорційною) – чим більша

контурна довжина, тим гнучкішою є молекула й тим більше топоізомерів може утворитись. Разом із тим, частка топоізомеру в рівноважній суміші (імовірність його утворення) очевидно залежить від вільної енергії деформацій, мірою яких є величина ΔLk . Іншими словами, за принципом Больцмана має виконуватись пропорційність

$$f \propto \exp\left(-\frac{G_{sc}}{RT}\right), \quad (5.15)$$

де G_{sc} – вільна енергія (на моль циркулярної ДНК), асоційована з утворенням даного топоізомеру, – так звана *енергія надспіралізації*. У загальному випадку енергія надспіралізації є сумою енергії деформацій і внеску від конформаційної ентропії, що визначається кількістю конформацій, якими можна реалізувати певним чином деформований стан кільця. Порівнявши два останні рівняння та взявши до уваги, що дисперсія розподілу $\langle(\Delta Lk)^2\rangle$ є пропорційною кількості пар основ N , отримаємо для енергії надспіралізації рівняння

$$G_{sc} = RT \frac{K_{sc}}{N} \Delta Lk^2, \quad (5.16)$$

де K_{sc} – силова константа надспіралізації, яка в загальному випадку може залежати від N (див. нижче). Використавши щільність надспіралізації (рівн. (5.14)), вираз для енергії надспіралізації можна переписати також у формі

$$G_{sc} = RTNk_{sc}\sigma^2, \quad (5.17)$$

де $k_{sc} = K_{sc}/\gamma_0^2$, γ_0 – найбільш вигідна спіральна періодичність ДНК за даних умов. Виходячи з рівн. (5.15), (5.16), для частки топоізомеру Lk у рівноважному розподілі можна записати:

$$f = \frac{\exp\left[-K_{sc}(Lk - Lk_0)^2 / N\right]}{\sum_{n=-\infty}^{+\infty} \exp\left[-K_{sc}(Lk + n - Lk_0)^2 / N\right]}, \quad (5.18)$$

де n – ціле число (зрозуміло, що експонента швидко зменшується при зростанні абсолютної величини n , і можна обмежитись не надто великими числами). Підгонка рівн. (5.18) під експериментально отриманий розподіл дозволяє оцінити значення K_{sc} і Lk_0 , а відповідно, і γ_0 (саме таким шляхом можна визначити γ_0 у розчині з високою точністю).

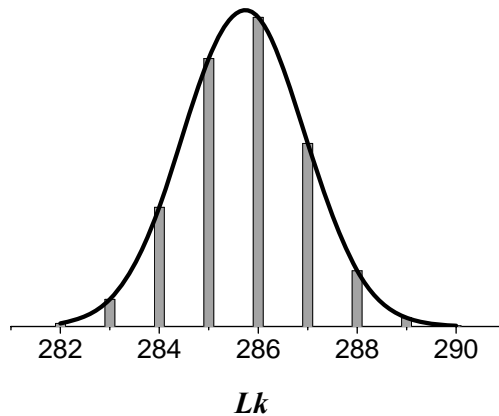


Рис. 5.13. Рівноважний розподіл топоізомерів циркулярної ДНК довжиною 3000 пар основ в умовах, коли спіральна періодичність дорівнює 10,5 пар основ / виток. Середнє розподілу $\langle Lk \rangle = 285,7$

Рівняння (5.16) є емпіричним, але цілком очікуваним на підставі загальних міркувань: надспіралізація пов'язана з деформаціями подвійної спіралі, а вільна енергія деформацій є пропорційною квадрату цих деформацій (рівн. (4.3), (4.5)). Рівняння (5.7) указує на те, що йдеться саме про ті деформації, які описуються рівн. (4.3), (4.5): торсійна деформація подвійної спіралі (зміна твіста) і деформація вигину (зростання абсолютної величини райзингу). Розподіл ΔLk між цими двома типами деформацій визначається співвідношенням між загальними торсійною жорсткістю ДНК та її жорсткістю щодо вигину. Якщо б, наприклад, торсійна жорсткість була нескінченно високою, у кільці змінювався б тільки райзинг, набуваючи дискретних значень, які б дорівнювали ΔLk . І навпаки, за нескінченно високої жорсткості щодо вигину кільце має набути найвигіднішої (відносно вигину) планарної форми, і в ньому має змінюватись тільки твіст. Саме ця друга ситуація реалізується за певних значень ΔLk для циркулярних ДНК маленького розміру (~200–500 пар основ) – мініциклів.

5.4.2. Надспіралізація мініциклів

Припустимо, що вся надспіралізація реалізується тільки як зміна твіста ($\Delta Lk = \Delta Tw$ і кільце є планарним). У такому разі енергія надспіралізації є еквівалентною вільній енергії торсійної деформації. Урахувавши, що зміна кута в рівн. (4.3) дорівнює зміні кількості обертів, помноженій на 2π ($\Delta\phi = 2\pi \Delta Tw$),

і записавши контурну довжину кільця як Nh (N – кількість пар основ, h – відстань між сусідніми парами), отримаємо вираз для енергії надспіралізації у випадку $\Delta Lk = \Delta Tw$:

$$G_{sc} \equiv G_t = \frac{2\pi^2 C}{Nh} \Delta Lk^2, \quad (5.19)$$

$$K_{sc} = 2\pi^2 l_t / h,$$

де друге рівняння впливає з порівняння першого та рівн. (5.16), $l_t = C/k_B T$ – аналог персистентної довжини для торсійної деформації. Підстановка $l_t = 75$ нм (підрозд. 4.2) дає значення $K_{sc} \sim 4300$, яке є оцінкою значення силової константи за умови $Wr = 0$.

Аналіз результатів релаксації міні-циклів еукаріотичною топоізомеразою I дозволяє отримати значення K_{sc} , яке добре узгоджується з цією оцінкою (рис. 5.14). На відміну від циркулярних плазмід більшого розміру (рис. 5.14), рівноважний розподіл для мініциклів містить зазвичай один топоізомер, іноді (залежно від значення Lk_0 , тобто від розміру) два: високе значення коефіцієнта K_{sc}/N у рівн. (5.16), (5.18)) приводить до того, що можливими є лише ті топоізмери, Lk яких є найближчим цілим числом до $Lk_0 = N/\gamma_0$. У результаті середнє число зачеплень розподілу $\langle Lk \rangle$ не дорівнює Lk_0 , а осцилює навкруг нього – крива залежності $\langle Lk \rangle$ від N має вигляд сходинок між цілими числами. Зростання контурної довжини приводить до згладжування сходинок (приблизно для $N > 800$ пар основ залежність, зображена на рис. 5.14, перетворюється на пряму лінію).

Невеличке відхилення експериментально отриманої силової константи від її граничного значення ~ 4300 пояснюється наявністю теплових флуктуацій, завдяки яким кільце насправді осцилює біля планарної конфігурації. Зростання контурної довжини приводить до підвищення цих осциляцій, тобто більш вагомим стає негативний ентропійний внесок у вільну енергію (підвищується кількість мікростанів). У результаті вільна енергія надспіралізації зростає трохи повільніше при підвищенні ΔLk^2 – для $N < 500$ пар основ непогано виконується рівняння, отримане Тобіасом (Tobias, 1998):

$$K_{sc} = 2\pi^2 (C/A)a/h - (3/4)N(C/A)^2,$$

де $a = 50$ нм – персистентна довжина, $h = 0,34$ нм – відстань між сусідніми парами основ, C і A – відповідно константи торсійної жорсткості та жорсткості щодо вигину ($C/A = 1,5$). Згідно з рівнянням, K_{sc} знижується від 4000 до 3700 при зростанні N від 200 до 400 пар основ – осциляції є невеликими.

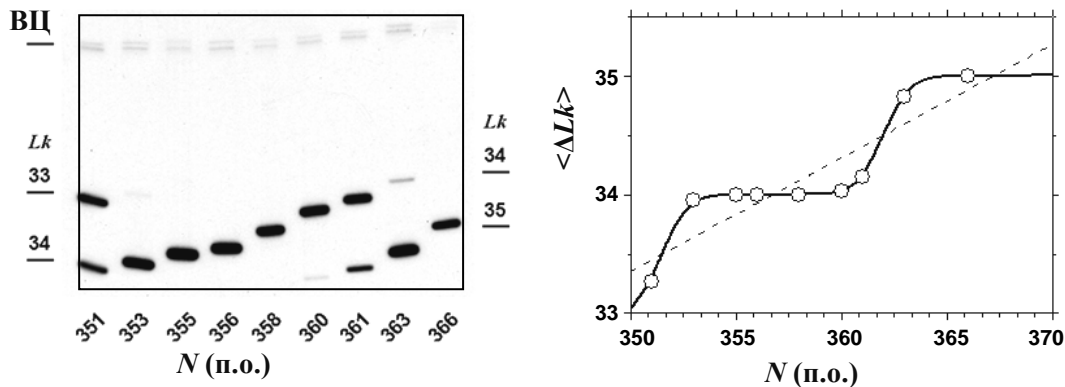


Рис. 5.14. Розділення топоізомерів, отриманих після релаксації мініциклів різного розміру (усі мініцикли походять від одного фрагмента ДНК певної послідовності), за допомогою гель-електрофорезу в присутності хлорокіну. Указано значення Lk топоізомерів, ВЦ – відкрита циркулярна (нікована) ДНК. Праворуч: середнє число зачеплень $\langle Lk \rangle$ рівноважних розподілів топоізомерів для мініциклів різного розміру. Суцільну криву розраховано на підставі рівн. (5.18) зі значеннями $K_{sc} = 3800$, $\gamma_0 = 10,49$ пар основ / виток. Пунктир – лінія $\langle Lk \rangle = Lk_0$. Адаптовано з роботи De Lucia *et al.* (1999)

Отже, у разі невеликого відхилення Lk від точки релаксації (ΔLk від нуля), мініцикл поводить себе як планарне кільце, в якому надспіралізація накопичується переважно у вигляді зміни твіста. Але на віддаленні від точки релаксації ця поведінка змінюється, причому стрибком – відбувається рапто-вий так званий "натиск райзингу" (onset of writhing), і за високого рівня надспіралізації мініцикли виглядають під електронним мікроскопом як 8-подібні конфігурації або перекручені вісімки – плектонеми. Розрахувати для будь-якого значення ΔLk рівноважну конфігурацію мініциклу – таку, що мінімізує енергію деформацій ДНК, – можна на підставі теорії еластичності (застосовуючи модель еластичного стрижня). На рис. 5.15 наведено приклад такого розрахунку: залежності від ΔLk вільної енергії рівноважних конфігурацій (енергія торсійних деформацій і вигину) та відповідного значення райзингу для мініциклу з контурною довжиною 350 пар основ. На рисунку зображено також декілька конфігурацій мініциклу в певних точках.

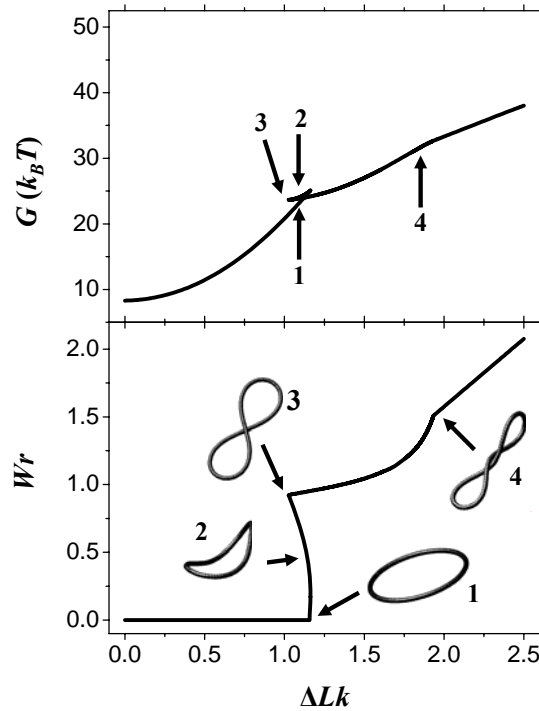


Рис. 5.15. Залежності енергії деформацій G і райзингу Wr мініциклу з контурною довжиною 350 пар основ від ΔLk , розраховані на підставі теорії (Coleman *et al.*, Tobias *et al.*, 2000) рівноважних конфігурацій еластичного стрижня. Позначено точки графіків, де реалізуються певні конфігурації мініциклу 1–4

До певного значення $\Delta Lk \approx 1$ (зрозуміло, що поведінка є симетричною відносно $\Delta Lk = 0$) можливою є лише планарна конфігурація, для якої $\Delta Lk = \Delta Tw$, $Wr = 0$, інші ж потребують значного вигину мініциклу, що веде до значних енергетичних втрат. При цьому енергія, яка є практично енергією торсійних деформацій (плюс константний внесок від вигину ДНК у планарному кільці), швидко зростає за параболою з великим коефіцієнтом (згідно з рівн. (5.19)). За певного значення ΔLk (яке залежить від співвідношення між двома константами жорсткості й визначається умовою $|\Delta Lk| = \sqrt{3A/C} \approx 1$) виникає ситуація, коли енергетично вигіднішим є значний вигин у кільці з утворенням 8-подібної конфігурації: першій параболі енергетичної залежності на рис. 5.15 відповідає $K_{sc} = 4300$, другу гілку залежності можна апроксимувати параболою з $K_{sc} \approx 1000$. Як видно із залежності райзингу від ΔLk , таке перетворення зі зміною конфігурації та еластичних властивостей має місце в дуже вузькому діапазоні ΔLk , практично в точці, коли райзинг раптово змі-

нюється від 0 до ~ 1 , тобто відбувається натиск райзингу. У гнучкому режимі після натиску райзингу від 50 до 90 % (у середньому 77 %) ΔLk припадає на райзинг. Плектономічна конфігурація є не єдиною з можливих, проте всі інші характеризуються значно вищими енергіями деформації. Саме плектонома, яка мінімізує енергію вигину, є рівноважною конфігурацією за високих рівнів надспіралізації.

Отже, за певного критичного значення ΔLk енергія торсійних деформацій зростає настільки, що стає енергетично вигідним значний вигин, який супроводжує утворення вісімки. Причиною перемикання конфігурації є те, що після утворення вісімки енергія зростає значно повільніше – легше вводити додаткові плектономічні витки, незначним чином додатково збільшуючи вигин, ніж продовжувати змінювати твіст. Такий самий механізм лежить в основі перетворення витягнутої молекули ДНК на плектоному при закручуванні магнітним пінцетом (підпідрозд. 4.6.3).

Підсумовуючи викладене, можна сформулювати два висновки:

- підвищення внеску райзингу у ΔLk зумовлює зростання загальної гнучкості кільця (зниження силової константи надспіралізації) – райзинг *накопичується* легше, ніж твіст;
- у мініциклах таке підвищення внеску райзингу й перехід у більш гнучкий режим накопичення надспіралізації відбувається після досягнення певного рівня торсійних деформацій, оскільки початковий вигин є дуже невідповідним енергетично – ненульовий райзинг *виникає* значно важче, ніж ненульовий твіст.

Другий висновок приводить до нетривіального зауваження щодо поведінки ДНК при топологічних обмеженнях *in vivo*. Оскільки ДНК у клітині завжди зв'язана з білками, які суттєво обмежують її конформаційну свободу, можна вважати, що модель жорстких мініциклів є насправді ближчою до такої ДНК у комплексах із білками, ніж, скажімо, циркулярна плазмід більшого розміру. При цьому білок, взаємодіючи з ДНК, може створювати ненульовий райзинг і тоді додаткові витрати на початковий вигин вже не потрібні – система відразу здатна накопичувати надспіралізацію в гнучкому режимі просто додатково змінюючи цей райзинг. Саме такий ефект спостерігається для білково-нуклеїнових комплексів хроматину (розд. 8).

5.4.3. Надспіралізація циркулярних плазмід

Надспіралізація циркулярних плазмід розміром ~ 3 – 6 тис. пар основ принципово відрізняється від поведінки мініциклів тим, що для плазмід уже неможливо нехтувати тепловими флуктуаціями. Зростання контурної довжини очевидно приводить до підвищення загальної гнучкості – кільце існує у вигляді неупорядкованого клубка. Інакше кажучи, навіть для релаксованої плазмід, хоча в середньому райзинг дорівнює нулю, існує досить широкий набір конфігурацій з не-

нульовим райзингом, які реалізуються за рахунок енергії теплового руху. Відповідно, не спостерігається ефекту натиску райзингу, який практично зникає при підвищенні контурної довжини до ~ 3 тис. пар основ.

Розрахувати розподіл циркулярних молекул за величиною райзингу дозволяє метод Монте-Карло (підрозд. 3.4). У даному випадку метод полягає в генерації набору випадкових конформацій, для яких обчислюється райзинг. Виявляється, що розподіл є гауссовим, тобто частка молекул із даною величиною райзингу

$$f_{Wr} \propto \exp\left(-\frac{Wr^2}{2D^2}\right),$$

де дисперсія розподілу D^2 для плазмід розміром $\sim 3-6$ тис. пар основ пропорційна до контурної довжини кільця: близько до точки релаксації $D^2 = \lambda N$, $\lambda \approx 3,4 \cdot 10^{-4}$. Слід зауважити, що всі наступні співвідношення у цьому підрозділі також належать до випадку, коли рівень надспіралізації є близьким до точки релаксації.

Користуючись принципом Больцмана (як це було зроблено, наприклад, при переході від рівн. (5.15) до (5.16)) і рівн. (5.7), можна записати частину вільної енергії кільця, що залежить від значення райзингу (в одиницях $k_B T$):

$$g_{Wr} = \frac{(\Delta Lk - \Delta Tw)^2}{2\lambda N}. \quad (5.20)$$

Інша частина вільної енергії визначається торсійними деформаціями і за рівн. (5.19) в одиницях $k_B T$ становить

$$g_t = \frac{2\pi^2 l_t}{Nh} \Delta Tw^2. \quad (5.21)$$

Залишається знайти рівноважний стан шляхом мінімізації суми (5.20) і (5.21) відносно змінної ΔTw – записати похідну від суми за ΔTw , знайти рівноважне значення ΔTw , при якому похідна дорівнює нулю, визначити за рівн. (5.7) рівноважне середнє значення райзингу і, нарешті, підставивши ці значення у вирази (5.20), (5.21), знайти рівноважне значення вільної енергії, тобто енергії надспіралізації за даної величини ΔLk .

Для середньої рівноважної величини райзингу отримаємо рівняння

$$\langle Wr \rangle = \frac{4\pi^2 l_t \lambda}{4\pi^2 l_t \lambda + h} \Delta Lk, \quad (5.22)$$

або $Wr = 0,75 \Delta Lk$, якщо підставити числові значення. Енергія надспіралізації має такий вигляд:

$$G_{sc} = RT \frac{2\pi^2 l_t}{4\pi^2 l_t \lambda + h} \frac{1}{N} \Delta Lk^2. \quad (5.23)$$

Порівнюючи цей вираз із рівн. (5.16), бачимо, що перший дріб дорівнює силовій константі K_{sc} . Отже, за рівн. (5.23) для досить великих плазмід K_{sc} не повинна залежати від N , а підставивши числові значення, матимемо $K_{sc} = 1100$. Саме таке незалежне від N значення отримують в експериментах із релаксації плазмід. У граничному випадку $\lambda = 0$ (у відсутності флуктуацій за райзингом) рівн. (5.23) збігається з рівн. (5.19) для жорстких планарних кілець. Для проміжних значень N експериментальна залежність K_{sc} від розміру циркулярної ДНК має вигляд, зображений на рис. 5.16.

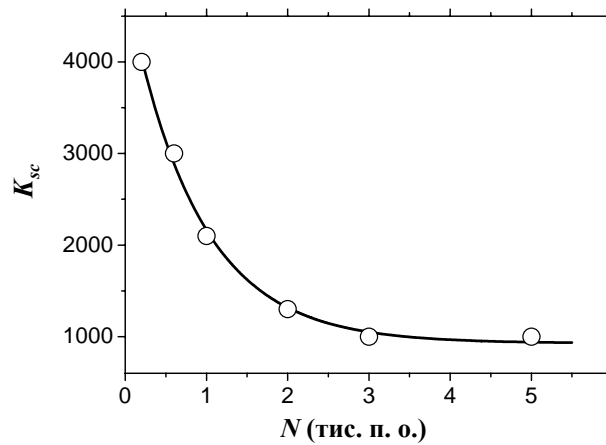


Рис. 5.16. Залежність сили константи надспіралізації поблизу від точки релаксації від контурної довжини циркулярної ДНК (за даними Horowitz, Wang, 1984)

Значення K_{sc} на рис. 5.16 отримані за фізіологічних значень іонної сили. Зниження концентрації солі приводить до зростання ефекту виключеного об'єму (підрозд. 4.7) – електростатичне розштовхування утруднює формування плекто-немічних витків. Відповідно, для великих плазмід відносний внесок райзингу в загальну надспіралізацію ΔLk знижується, а K_{sc} зростає. Відносний внесок райзингу $\langle Wr \rangle / \Delta Lk$ знижується (майже лінійно відносно логарифма концентрації солі) від $\sim 0,75$ у 0,1 М солі до $\sim 0,4$ у 10 мМ. Для мініциклів при цьому дещо зростає абсолютне критичне значення ΔLk , за якого відбувається натиск райзингу.

5.5. ЗАЛЕЖНІ ВІД НАДСПІРАЛІЗАЦІЇ СТРУКТУРНІ ПЕРЕХОДИ

Оскільки зростання надспіралізації викликає накопичення еластичної напруги в молекулі ДНК, будь-який процес, що сприяє релаксації (частково знімає цю напругу) може виявитись енергетично вигідним.

Розглянемо наступний приклад: в циркулярній плазміді присутня паліндронна ділянка послідовності – така, що в принципі здатна утворити хрестоподібну структуру (підпідрозд. 1.3.3). Формування такої структури потребує плавлення кількох пар основ (рис. 1.16): за фізіологічних умов вільна енергія утворення хреста G_+ є позитивною і становить, практично незалежно від розміру хреста, приблизно $10 \text{ ккал/моль} = 16,7 RT$, тобто виникнення хреста в лінійній ДНК є неможливим. Але в циркулярній ДНК з'являється ще один внесок у вільну енергію, який залежить від утворення хреста. Хрестоподібна структура, яка містить n_+ пар основ, відділена розплавленими зонами від решти кільця – кільце перетворюється на петлю з жорстко зачепленими на хресті кінцями, значення Lk_0' такої петлі дорівнює $(N - n_+)/\gamma_0$, де N – загальна кількість пар основ плазміді. Відповідно, будь-яке значення $\Delta Lk = Lk - Lk_0$ після утворення хреста перетворюється на $\Delta Lk' = Lk - Lk_0' = \Delta Lk + n_+/\gamma_0$, а щільність надспіралізації σ (рівн. (5.14)) – на щільність надспіралізації $\sigma' = \sigma + n_+/N$. Отже, для стану системи без хрестоподібної структури вільна енергія є енергією надспіралізації кільця за рівн. (5.17), де константа $k_{sc} \approx 10$ для великих плазмід. Вільна енергія стану з хрестоподібною структурою становить

$$G = RTk_{sc}N(\sigma + n_+/N)^2 + G_+ \quad (5.24)$$

якщо щільність надспіралізації є негативною, перший внесок у вільну енергію знижується після утворення хреста. На рис. 5.17 зображено залежності вільних енергій двох станів від щільності надспіралізації. Після утворення хреста парабола зсувається вище вздовж осі ординат, але також ліворуч уздовж осі абсцис. У результаті після досягнення певного рівня негативною надспіралізації вільна енергія стану з хрестом є нижчою відносно стану без хреста – утворення хрестоподібної структури стає енергетично вигідним.

Точка напівпереходу (щільність надспіралізації, за якої ймовірність утворення хреста становить 50%) визначається умовою рівності вільних енергій двох станів – різниця енергій між ними, які задаються рівн. (5.17), (5.24), у цій точці дорівнює нулю. Звідси отримуємо оцінку щільності надспіралізації в точці напівпереходу:

$$-\sigma_{1/2} = \frac{G_+}{2RTk_{sc}n_+} + \frac{n_+}{2N} \quad (5.25)$$

– $\sigma_{1/2}$ є тим меншою за абсолютною величиною, чим більше n_+ (другий доданок значно менший, ніж перший). Зазвичай утворення хрестоподібної структури спостерігається в плазмідах при $\sigma \sim -0,04 \div -0,06$, тобто за фізіологічних рівнів надспіралізації.

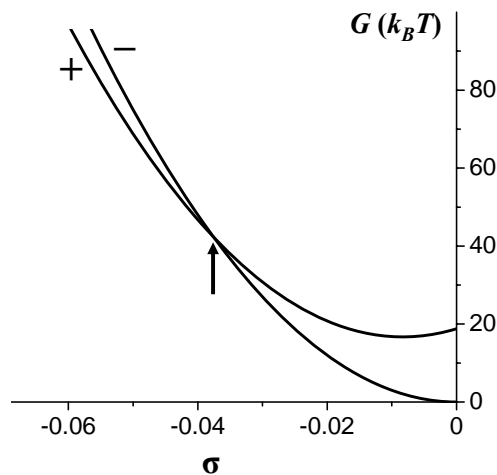


Рис. 5.17. Вільні енергії станів плазмиди контурною довжиною 3000 пар основдо (–) і після (+) утворення хрестоподібної структури, що містить 25 пар основ. Стрілкою позначено точку напівпереходу

Зафіксувати утворення хрестоподібної структури (як і інших неканонічних форм) у складі циркулярної ДНК можна за допомогою двовимірного електрофорезу (рис. 5.18). Утворення хрестоподібної структури після досягнення певного рівня негативної надспіралізації приводить до порушення регулярності в розташуванні електрофоретичних плям (порівн. праву частину рис. 5.7), тобто топоізомер –8 має таку саму рухливість у першому напрямі (у відсутності інтеркалятора), що й топоізомер –6, за рахунок часткової релаксації після утворення хреста. Підтвердженням того, що топоізомери з $\Delta Lk < -8$ містять хрестоподібну структуру, є їхня чутливість до нуклеази S1: ця нуклеаза гідролізує тільки одноланцюгові ділянки, які містяться в основі хреста. Відповідно, після обробки нуклеазою S1, топоізомери, що містять хрестоподібну структуру, на відміну від усіх інших, зникають з електрофореграми (перетворюються на ніковану та/або лінійну ДНК). Для невеликої кількості топоізомерів стрибок електрофоретичної рухливості можна помітити й при одновимірному електрофорезі за відсутності інтеркалятора.

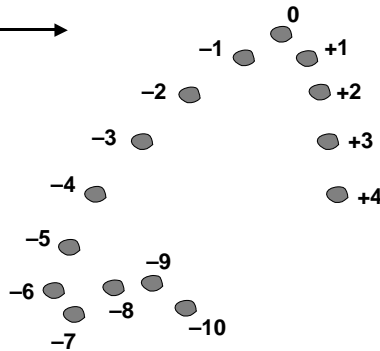


Рис. 5.18. Схема електрофоретичного розділення суміші топоізомерів циркулярної ДНК, яка містить паліндромну ділянку, за допомогою двовимірного електрофорезу. Порушення регулярності в розташуванні електрофоретичних плям (порівняно з рис. 5.7) указує на утворення хрестоподібної структури. Цифрами позначено ΔLk топоізомерів

Аналогічно до описаного механізму, у негативно надспіралізованій ДНК, що містить трек $oligo(dGdC)$, відбувається перехід цього трека в Z-форму – ліва спіраль дуже ефективно знімає негативну торсійну напругу в циркулярній ДНК. Після переходу n_z пар основ у Z-форму Lk_0 перетворюється в $Lk_0' = (N - n_z)/\gamma_0 - n_z/\gamma_z$, де $\gamma_z = 12$ – кількість пар основ на виток лівої спіралі в Z-формі (підпідрозд. 1.3.2). Тобто щільність надспіралізації σ перетворюється в $\sigma' = \sigma + 1,87 \cdot n_z/N$. Енергетичні витрати на утворення Z-форми в лінійній ДНК дорівнюють $m_z G_b + n_z G_z$, де m_z – кількість ділянок, що містяться в Z-формі, G_b – вільна енергія двох меж між В- та Z-формою (кооперативний механізм В–Z переходу аналогічний до механізму плавлення ДНК, підрозд. 2.3, 2.4), G_z – вільна енергія однієї пари основ у Z-формі відносно В-форми. Якщо вважати кожен ділянку не надто великою (перехід відбувається за принципом "усе або нічого"), різниця між вільною енергією циркулярної ДНК, де відбувся перехід, та енергією кільця, яке повністю знаходиться у В-формі,

$$\Delta G_{BZ} = 2 \cdot 1,87 R T k_{sc} \sigma n_z + 1,87^2 R T k_{sc} n_z^2 / N + m_z G_b + n_z G_z. \quad (5.26)$$

Енергія меж оцінюється приблизно як $G_b \sim 10$ ккал/моль, $G_z \sim 0,33$ ккал/моль для GC-пари. За рівн. (5.26) точка напівпереходу для однієї ділянки $(dGdC)_{12}$ у плазміді довжиною 3000 пар основ становить $\sigma_{1/2} \sim -0,055$. Отже знову, структурний перехід, *абсолютно неможливий* у лінійній ДНК за фізіологічних умов, стає *енергетично вигідним* за фізіологічних рівнів надспіралізації. Індукований негативною надспіралізацією В–Z перехід здійснюється не тільки в циркулярних ДНК *in vitro*, а також *in vivo* в промоторних зонах деяких генів,

причому ця подія впливає на транскрипційну активність. Негативна надспіралізація, що створюється позаду від РНК-полімерази, здатна викликати також інші структурні перебудови в ДНК.

При достатньо високих рівнях негативної надспіралізації не тільки ділянки oligo(dGdC) та oligo(dAdC·dGdT), а й інші альтернуючі пурин-піримідинові послідовності здатні переходити в Z-форму (за більш високу енергетичну ціну). При цьому кілька переходів на різних ділянках не є незалежними, як це має місце в лінійній ДНК. Різні ділянки конкурують між собою – перехід в одній із них частково знімає негативну надспіралізацію, що знижує імовірність переходу в іншій. Розглянемо ситуацію, коли в кільці з 3000 пар основ міститься два треки (dGdC)₁₂. Є три можливі стани для такого кільця: жодна з ділянок (з імовірністю f_0), одна з двох (з імовірністю f_1) або обидві ділянки (з імовірністю f_2) знаходяться в Z-формі. Статистичні ваги трьох станів за принципом Больцмана визначаються вільними енергіями $\Delta G_{BZ}(n_z, m_z)$, які підпорядковані рівн. (5.26): для першого стану статистична вага $p_0 = 1$, для другого $p_1 = 2\exp(-\Delta G_{BZ}(12, 1))$, для третього $p_2 = \exp(-\Delta G_{BZ}(24, 2))$. Отже, імовірність кожного i -го стану визначається співвідношенням

$$f_i = \frac{p_i}{1 + p_1 + p_2},$$

а середнє ефективне значення щільності надспіралізації –

$$\sigma' = \sigma + 1,87 \cdot 12 \cdot f_1 / N + 1,87 \cdot 24 \cdot f_2 / N.$$

Залежність σ' від σ (рис. 5.19) є двоступеневою (аналогічні залежності отримують в експериментах) – два переходи на двох однакових ділянках відбуваються за різних рівнів загальної надспіралізації в кільці. Можна сказати, що загальні для кільця топологічні обмеження об'єднують дві ділянки (незалежно від відстані між ними) в єдину систему. Картина взаємного впливу різних структурних переходів зазвичай ще складніша. Зокрема, ділянка oligo(dGdC) є водночас паліндромом і здатна також утворювати хрестоподібну структуру.

Серед інших неканонічних форм, які виникають у негативно надспіралізованих ДНК за описаним механізмом, слід згадати H-форму, яка також приводить до часткової релаксації негативної надспіралізації – утворення H-форми пов'язане з появою одноланцюгової ділянки, тобто локальним розплітанням подвійної спіралі (підпідрозд. 1.3.4). На відміну від B–Z і B–H переходів, B–A перехід, як правило, не індукується негативною надспіралізацією. Хоча A-форма ДНК характеризується меншим твістом порівняно з B-формою (підпідрозд. 1.3.1), ця різниця є недостатньо великою, щоб забезпечити суттєве зниження енергії надспіралізації порівняно з енергетичною вартістю B–A переходу.

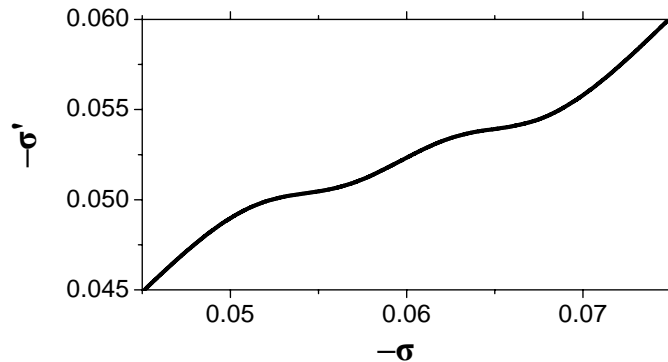


Рис. 5.19. Зміна ефективної щільності надспіралізації при зростанні негативної надспіралізації в плазміді, де відбуваються два В–Z переходи

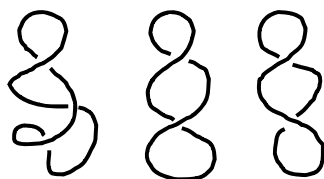
Нарешті, загальним типом структурного переходу, який індукується негативною надспіралізацією, є плавлення ДНК у порівняно нестабільних ділянках. Цей процес в умовах негативної торсійної напруги вже розглядався у підпдрозд. 4.6.3. У негативно надспіралізованих циркулярних ДНК також реєструється локальне розплітання подвійної спіралі при фізіологічній температурі. Таке розплітання зазвичай починається у плазмідах при $\sigma \sim -0,04$, у разі подальшого зростання негативної надспіралізації ефективний рівень напруги не змінюється – накопичується кількість розплавлених пар основ. В умовах експерименту з магнітним пінцетом можна розкрутити ДНК повністю (за наявності розтягувальної сили). Накопичення негативної надспіралізації гірша блокується при досягненні рівня $\sigma \sim -0,1$ – уведення надспіральних витків та/або плавлення ДНК потребує після цього зусиль, на які гіраза вже не здатна.

Об'єднання великої кількості різноманітних ділянок у межах одного топологічного домену (кільця або петлі) приводить до того, що стабільність кожної з ділянок визначається не лише її нуклеотидною послідовністю (про що йшлося в розд. 2). Ділянки впливають одна на одну, і здатність певної зони до розплітання залежить від такої здатності в інших місцях домену (за таким самим механізмом, що обговорювався вище для двох В–Z переходів). Теорія, розроблена Бенемом (Craig Benham), дозволяє з високою точністю визначити стабільність кожної ділянки в межах одного топологічного домену певної послідовності. Аналіз дріжджового геному показує, що ділянок, які відрізняються суттєво зниженою стабільністю, відносно небагато, і зазвичай вони збігаються із сайтами ініціації реплікації – ориджинами. Зміна загального рівня надспіралізації може розглядатися як загальний механізм регуляції реплікації, яка починається на ориджинах саме з розходження полінуклеотидних ланцюгів.

Біологічна роль надспіралізації не вичерпується її впливом на структурні переходи в ДНК. Зв'язування білка також може знімати частину еластичної напруги (або шляхом зміни твіста, або через вигин і зміну райзингу). Зрозуміло, що в такому випадку спорідненість білка до ДНК залежить від рівня надспіралізації (розд. 6, 7). Надспіралізація та варіації її рівня тісно пов'язані з механізмами конформаційної динаміки хроматину (розд. 8) і загальною системою регуляції генетичної активності.

ЗАДАЧІ

5.1. Визначте райзинг трьох проекцій кільця на площину:



5.2. Циркулярна молекула ДНК довжиною 405 пар основ має число зачеплень $Lk = 35$. Топоізмери з якими значеннями Lk будуть отримані після обробки прокариотичною топоізомеразою I, еукаріотичною топоізомеразою I або топоізомеразою II? Спіральна періодичність в умовах інкубації з усіма топоізомеразами дорівнює $\gamma = 10,5$ п. о/виток. Розрахуйте відносний вміст (частку) топоізомерів, які будуть отримані після обробки еукаріотичною топоізомеразою I, узявши $K_{sc} = 3000$.

5.3. З топоізомером із $Lk = 35$ з попередньої задачі взаємодіє білок: у складі комплексу формується суперспіраль з $Wr = -1,5$, а твіст подвійної спіралі не змінюється. Який остаточний рівень надспіралізації ΔLk залишається в частині кільця, що не зв'язана з білком? Топоізомер з яким Lk буде отримано після релаксації цієї остаточної надспіралізації еукаріотичною топоізомеразою I?

5.4. Після обробки циркулярної ДНК довжиною 1001 пар основ еукаріотичною топоізомеразою I у рівноважному розподілі отримано три топоізмери з $Lk = 95$ (відносна частка 0,167), $Lk = 96$ (0,767) і $Lk = 97$ (0,066). Визначте спіральну періодичність γ та силову константу надспіралізації K_{sc} . Одне з можливих рішень полягає в тому, щоб за допомогою рівн. (5.18) записати вирази для $\ln(f_1/f_2)$ та $\ln(f_1/f_3)$ (де f_1, f_2, f_3 – частки трьох топоізомерів) і розв'язати отриману систему двох рівнянь відносно Lk_0 та K_{sc} .

5.5. Для циркулярної ДНК довжиною 4000 пар основ зі спіральною періодичністю 10,45 пар основ/виток розрахуйте за рівн. (5.18) частки всіх топоізомерів, які мають бути отримані після обробки еукаріотичною топоізомеразою I (використуйте значення $K_{sc} = 1000$). Розрахуйте значення ΔLk всіх топоізомерів і намалюйте приблизну схему їхнього розділення при електрофорезі у відсутності та у присутності інтеркалятора, який компенсує негативну надспіралізацію $\Delta Lk = -4,7$.

5.6. Після обробки циркулярної ДНК довжиною 3500 пар основ еукаріотичною топоізомеразою I отримано наступний рівноважний розподіл топоізомерів (f – частка топоізомеру з відповідним Lk):

Lk	f
329	0,04
330	0,12
331	0,26
332	0,30
333	0,19
334	0,07
335	0,02

За рівн. (5.18), використовуючи відповідне програмне забезпечення, здійсніть нелінійну підгонку та знайдіть значення K_{sc} і спіральної періодичності ДНК.

5.7. Здійснивши диференціювання рівнянь (5.10) по s , знайдіть три декартові координати вектора тангента для регулярної суперспіралі. Застосувавши формули (5.1), визначте координати вектора нормалі (переконайтеся в тому, що нормаль є перпендикулярною до осі z у кожній точці) та отримайте вираз для кривизни спіральної лінії.

5.8. Користуючись поясненнями в тексті, отримайте вирази (5.22) і (5.23).

5.9. Скориставшись рівн. (5.25), з'ясуйте, чи можливий перехід паліндрома довжиною 7 пар основ у хрестоподібну форму в плазміді з рівнем надспіралізації $\sigma = -0,05$?

5.10. За рівн. (5.26) розрахуйте щільність надспіралізації $\sigma_{1/2}$ для напівпереходу в Z-форму однієї ділянки (dGdC)₂₀ у плазміді довжиною 3000 пар основ.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Загальна

Вологодский, А. В. Топология и физические свойства кольцевых ДНК / А. В. Вологодский. – М. : Наука, 1988.

Франк-Каменецкий, М. Д. Топологические аспекты физики полимеров: теория и ее биофизические приложения / М. Д. Франк-Каменецкий, А. В. Вологодский // Успехи физ. наук. – 1981. – Т. 134. – С. 641–673.

Bates, A. D. DNA topology. / A. D. Bates, A. Maxwell. – Oxford : Oxford University Press, 1993.

Vologodskii, A. Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA / A. Vologodskii, N. Cozzarelli // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. – 1994. – Vol. 23. – P. 609–643.

Топологія циркулярної ДНК

Crick, F. H. Linking numbers and nucleosomes / F. H. Crick // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1976. – Vol. 73. – P. 2639–2643.

Fuller, F. B. The writhing number of a space curve / F. B. Fuller // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1971. – Vol. 68. – P. 815–819.

Fuller, F. B. Decomposition of the linking number of a closed ribbon: A problem from molecular biology / F. B. Fuller // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1978. – Vol. 75. – P. 3557–3561.

White, J. H. Self-linking and the Gauss integral in higher dimensions / J. H. White // Am. J. Math. – 1969. – Vol. 91. – P. 693–728.

White, J. H. Calculation of the twist and the writhe for representative models of DNA / J. H. White, W. R. Bauer // J. Mol. Biol. – 1986. – Vol. 189. – P. 329–341.

ДНК-топоізомерази

Champoux, J. J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism / J. J. Champoux // Annu. Rev. Biochem. – 2001. – Vol. 70. – P. 369–413.

Wang, J. DNA topoisomerases / J. Wang // Annu. Rev. Biochem. – 1996. – Vol. 65. – P. 635–692.

Wang, J. C. Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine / J. C. Wang // Q. Rev. Biophys. – 1998. – Vol. 31. – P. 107–144.

Wang, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective / J. C. Wang // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2002. – Vol. 3. – P. 430–440.

Енергетика надспіралізації

Frank-Kamenetskii, M. D. Torsional and bending rigidity of double helix from data on small DNA rings / M. D. Frank-Kamenetskii, A. V. Lukashin, A.V. Anshelevich [et al.] // J. Biomol. Struct. Dynam. – 1985. – Vol. 2. – P. 1005–1012.

Horowitz, D. S., Torsional rigidity of DNA and length dependence of the free energy of DNA supercoiling / D. S. Horowitz, J. C. Wang // J. Mol. Biol. – 1984. – Vol. 173. – P. 75–91.

Klenin, K. V. Computer simulation of DNA supercoiling / K. V. Klenin, A.V. Vologodskii, V. V. Anshelevich [et al.] // J. Mol. Biol. – 1991. – Vol. 217. – P. 413–419.

Levene, S. Topological distributions and the torsional rigidity of DNA. A Monte Carlo study of DNA circles / S. Levene, D. Crothers // J. Mol. Biol. – 1986. – Vol. 189. – P. 73–83.

Rybenkov, V. V. The effect of ionic conditions on the conformations of supercoiled DNA / V. V. Rybenkov, A. V. Vologodskii, N. R. Cozzarelli // J. Mol. Biol. – 1997. – Vol. 267. – P. 299–323.

Shimada, J. Statistical mechanics of DNA topoisomers. The helical wormlike chain / J. Shimada, H. Yamakawa // J. Mol. Biol. – 1985. – Vol. 184. – P. 319–329.

Shore, D. Energetics of DNA twisting II. Topoisomer analysis / D. Shore, R. L. Baldwin // J. Mol. Biol. – 1983. – Vol. 170. – P. 983–1007.

Vologodskii, A. V. Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA / A. V. Vologodskii, S. D. Levene, K. V. Klenin [et al.] // J. Mol. Biol. – 1992. – Vol. 227. – P. 1224–1243.

Мініцикли ДНК

Bednar, J. The twist, writhe and overall shape of supercoiled DNA change during counterion-induced transition from a loosely to a tightly interwound superhelix – possible implications for DNA structure *in vivo* / J. Bednar, P. Furrer, A. Stasiak [et al.] // J. Mol. Biol. – 1994. – Vol. 235. – P. 825–847.

Coleman, B. D. Theory of self-contact in Kirchhoff rods with applications to supercoiling of knotted and unknotted DNA plasmids / B. D. Coleman, D. Swigon // Philos. Trans. R. Soc. Lond. A. – 2004. – Vol. 362. – P. 1281–1299.

Coleman, B. D. Elastic stability of DNA configurations. II. Supercoiled plasmids with self-contact / B. D. Coleman, D. Swigon, I. Tobias // Phys. Rev. E. – 2000. – Vol. 61. – P. 747–758.

De Lucia, F. Nucleosome dynamics III. Histone tail-dependent fluctuation of nucleosomes between open and closed DNA conformations. Implication for chromatin dynamics and the linking number paradox. A relaxation study of mononucleosomes on DNA minicircles / F. de Lucia, M. Alilat, A. Sivolob [et al.] // J. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 285. – P. 1101–1119.

Le Bret, M. Twist and writhing in short circular DNAs according to first-order elasticity / M. Le Bret // Biopolymers – 1984. – Vol. 23. – P. 1835–1867.

Olson, W. K. Implications of the dependence of the elastic properties of DNA on nucleotide sequence / W. K. Olson, D. Swigon, B. D. Coleman // Philos. Trans. R. Soc. Lond. A. – 2004. – Vol. 362. – P. 1403–1422.

Schlick, T. Supercoiled DNA energetics and dynamics by computer simulation / T. Schlick, W. K. Olson // J. Mol. Biol. – 1992. – Vol. 223. – P. 1089–1119.

Schlick, T. On higher buckling transitions in supercoiled DNA / T. Schlick, W. K. Olson, T. Westcott [et al.] // Biopolymers. – 1994. – Vol. 34. – P. 565–597.

Swigon, D. The elastic rod model for DNA and its application to the tertiary structure of DNA minicircles in mononucleosomes / D. Swigon, B. D. Coleman, I. Tobias // Biophys. J. – 1998. – Vol. 74. – P. 2515–2530.

Tobias, I. A theory of thermal fluctuations in DNA miniplasmids / I. Tobias // Biophys. J. – 1998. – Vol. 74. – P. 2545–2553.

Tobias, I. Elastic stability of DNA configurations. I. General theory / I. Tobias, D. Swigon, B. D. Coleman // Phys. Rev. E. – 2000. – Vol. 61. – P. 747–758.

Надспіралізація in vivo

Liu, L. F. Supercoiling of the DNA template during transcription / L. F. Liu, J. C Wang // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1987. – Vol. 84. – P. 7024–7027.

Ljungman, M. Localized torsional tension in the DNA of human cells / M. Ljungman, P. C. Hanawalt // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1992. – Vol. 89. – P. 6055–6059.

Kanaar, R. Roles of supercoiled DNA structure in DNA transactions / R. Kanaar, N. R. Cozzarelli // Curr. Opin. Struct. Biol. – 1992. – Vol. 2. – P. 369–379.

Kouzine, F. The functional response of upstream DNA to dynamic supercoiling in vivo / F. Kouzine, S. Sanford, Z. Elisha-Feil, [et al.] // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2008. – Vol. 15. – P. 146–154.

Kramer, P. R Measurement of unrestrained negative supercoiling and topological domain size in living human cells / P. R Kramer, R. R. Sinden // *Biochemistry*. – 1997. – Vol. 36. – P. 3151–3158.

Rahmouni, A. R Direct evidence for the effect of transcription on local DNA supercoiling *in vivo* / A. R. Rahmouni, R. D. Wells // *J. Mol. Biol.* – 1992. – Vol. 223. – P. 131–144.

Tsao, Y. -P. Transcription-driven supercoiling of DNA: direct biochemical evidence from *in vitro* studies / Y. -P. Tsao, H. -Y. Wu, L. F Liu // *Cell*. – 1989. – Vol. 56. – P. 111–118.

Wang, Z. Long-range effects in a supercoiled DNA domain generated by transcription *in vitro* / Z. Wang, P. Droge // *J. Mol. Biol.* – 1997. – Vol. 271. – P. 499–510.

Надспіралізація та структурні переходи в ДНК

Anshelevich, V. V. A theoretical study of formation of DNA noncanonical structures under negative superhelical stress / V. V. Anshelevich, A. V. Vologodskii, M. D. Frank-Kamenetskii // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 1988. – Vol. 6. – P. 247–259.

Benham, C. J. Theoretical analysis of heteropolymeric transitions in superhelical DNA molecules of specified sequence / C. J. Benham // *J. Chem. Phys.* – 1990. – Vol. 92. – P. 6294–6305.

Benham, C. J. Energetics of the strand separation transition in superhelical DNA / C. J. Benham // *J. Mol. Biol.* – 1992. – Vol. 225. – P. 835–847.

Benham, C. J. Duplex destabilization in superhelical DNA is predicted to occur at specific transcriptional regulatory regions / C. J. Benham // *J. Mol. Biol.* – 1996. – Vol. 255. – P. 425–434.

Kelleher, R. J. Competitive behavior of multiple, discrete B-Z transitions in supercoiled DNA / R. J. Kelleher, M. J. Ellison, P.S. Ho [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1986. – Vol. 83. – P. 6342–6346.

Murchie, A. I. H. Supercoiled DNA and cruciform structures / A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley // *Methods Enzymol.* – 1992. – Vol. 211. – P. 158–180.

Panayotatos, N. Cruciform structures in supercoiled DNA / N. Panayotatos, R. D. Wells // *Nature* – 1981. – Vol. 289. – P. 466–470.

Rothenburg, S. A polymorphic dinucleotide repeat in the rat nucleolin gene forms Z-DNA and inhibits promoter activity / S. Rothenburg, F. Koch-Nolte, A. Rich [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2001. – Vol. 98. – P. 8985–8990.

Sheridan, S. Inhibition of supercoiling dependent transcriptional activation by a distant B-DNA to Z-DNA transition / S. Sheridan, C. J. Benham, G. W. Hatfield // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 8169–8174.

Розділ 6

ВЗАЄМОДІЇ ДНК З ІНШИМИ МОЛЕКУЛАМИ

Молекула ДНК є мішенню взаємодії для багатьох інших молекул різного розміру (лігандів) – від молекул води та неорганічних катіонів до білків і великих мультибілкових комплексів. Цей розділ присвячено загальним принципам термодинаміки зв'язування лігандів, а також огляду взаємодій ДНК із порівняно невеликими лігандами. Взаємодія ДНК із білками розглядається в наступному розділі.

6.1. ТЕРМОДИНАМІКА ВЗАЄМОДІЇ ЛІГАНДІВ З ДНК

6.1.1. Енергетичний ефект одного акту зв'язування

Елементарну подію зв'язування ліганду, вільна концентрація якого в розчині дорівнює L , з окремим сайтом на полімері зображено на рис. 6.1. Константа рівноваги K визначається так само, як і для будь-якої іншої бімолекулярної реакції (див. підпідрозд. 2.1.2), – рівноважними концентраціями комплексу X , вільних сайтів на полімері S і вільного ліганду в розчині L : $K = X/SL$.

Для визначення різниці вільних енергій між конфігураціями, зображеними у правій і лівій частинах рис. 6.1, можна скористатися рівн. (2.7), (2.8). У даному випадку нас цікавить різниця між вільними енергіями одного зайнятого лігандом сайту (комплексу) та одного вільного сайту у присутності вільного ліганду в концентрації L : вільні енергії комплексу та вільного сайту дорівнюють їхнім стандартним вільним енергіям; відповідні внески, що залежать від концентрації, скорочуються, оскільки концентрація вільного сайту ліворуч на рис. 6.1 дорівнює концентрації зайнятого сайту праворуч. Таким чином (див. також рівн. (2.7), (2.8)), різниця вільних енергій між конфігураціями на рис. 6.1.

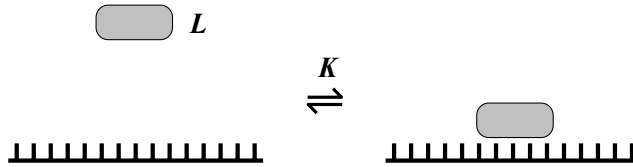


Рис. 6.1. Елементарна подія зв'язування ліганду з лінійним полімером (вертикальними рисками позначено мономерні одиниці, наприклад, пари основ ДНК).
 L – рівноважна концентрація вільного ліганду,
 K – константа зв'язування

$$\Delta G = \Delta G^0 - RT \ln L .$$

Ураховуючи, що $\Delta G^0 = -RT \ln K$ (рівн. (2.9)), зміна вільної енергії при зв'язуванні одного ліганду становить

$$\Delta G = -RT \ln KL . \quad (6.1)$$

Отже, вільна енергія елементарного акту зв'язування, і, відповідно, імовірність зв'язування залежить від константи зв'язування та концентрації *вільного* ліганду. Зазвичай в експериментах є відомою *загальна* концентрація доданого ліганду: використовуючи той чи інший метод, при цьому встановлюють частку зв'язаного ліганду, звідки розраховують концентрації комплексу та вільного ліганду. Проте слід пам'ятати, що саме концентрація вільного ліганду є зовнішнім термодинамічним параметром, який визначає ступінь зв'язування.

6.1.2. Константа зв'язування

Константа зв'язування очевидно має розмірність л/моль (якщо обрано моль/л як одиницю виміру концентрацій). За принципом Больцмана, добуток KL у рівн. (6.1) дорівнює імовірності зв'язування ліганду. Ця ймовірність повинна мати два співмножника: імовірність, що ліганд потрапить у певний об'єм в оточенні сайту зв'язування (імовірність співударяння), та ймовірність того, що між лігандом і сайтом будуть реалізовані певні взаємодії, що приведе до утворення комплексу. Виходячи з міркувань розмірності, безрозмірний добуток KL можна записати як $KL = K^* V_L L$, де K^* – безрозмірна частина константи, а V_L – деякий молярний об'єм (в одиницях л/моль). Зрозуміло, що добуток об'єму на концентрацію $V_L L$ є не що інше, як імовірність співударяння, а V_L – об'єм, де має опинитися ліганд, щоб він у принципі міг провзаємодіяти з полімером. Цей об'єм приблизно дорівнює просто об'єму ліганду (у розрахунку на

один моль речовини). Точніше, ідеться про так званий парціальний молярний об'єм – зміну загального об'єму розчину після додавання одного моля компонента, за умови, що об'єм розчину є достатньо великим і концентрація компонента суттєво не змінюється.

Безрозмірна частина константи K^* дорівнює ймовірності реалізації взаємодій, яка визначається незалежною від концентрацій зміною вільної енергії при утворенні комплексу (за умови, що співударяння відбулося). Отже, зміну стандартної вільної енергії бімолекулярної реакції можна записати як

$$\Delta G^0 = -RT \ln K = \Delta G^* - RT \ln V_L, \quad (6.2)$$

де $\Delta G^* = -RT \ln K^*$ є вільною енергією утворення комплексу – сумою всіх змін вільної енергії при утворенні комплексу після того, як відбулось співударяння.

Друга складова стандартної вільної енергії зв'язування у рівн. (6.2) (невігідна, тобто позитивна, оскільки для розведених розчинів $V_L < 1$ л/моль) має суто ентропійне походження: величина $R \ln V_L L$ є негативною зміною ентропії змішування (підпрозд. 2.1.1, 2.1.2) при утворенні комплексу – зрозуміло, що ентропія завжди сприяє руйнуванню комплексів і рівномірному розподілу всіх компонентів по розчину. Парціальний молярний об'єм не завжди можна легко визначити (унаслідок процесів сольватації в загальному випадку він залежить від концентрації компонента). Іноді, якщо розмір ліганду не надто великий, можна скористатись спрощенням *ідеального розчину* – такого, де всі молекули (включаючи розчинник) мають однаковий розмір. Для водного ідеального розчину парціальний молярний об'єм будь-якого компонента дорівнює молярному об'єму води: молярність чистої води – 55,55 моль/л, і тоді $V_L \approx 1/55,55$ л/моль. Отже, за рівн. (6.2), для ідеального водного розчину неспецифічний ентропійний внесок у стандартну вільну енергію зв'язування становить $\approx 4RT$:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K = \Delta G^* + 4RT.$$

Щоб зв'язування відбулося, порівняно невеликий ентропійний внесок у стандартну вільну енергію зв'язування має перекиватися негативною вільною енергією утворення комплексу ΔG^* , яка складається як із вільної енергії різноманітних взаємодій між лігандом і полімером, так і з усіх інших можливих внесків (зміни конформації взаємодіючих компонентів, взаємодії компонентів із розчинником тощо). У загальному вигляді вільну енергію утворення комплексу можна записати як суму наступних основних внесків (не всі вони обов'язково присутні в конкретному випадку):

$$\Delta G^* = \Delta G_{el} + \Delta G_{nel} + \Delta G_w + \Delta G_{conf} + \dots, \quad (6.3)$$

де ΔG_{el} – внесок від електростатичних взаємодій (часто присутній для лігандів, які взаємодіють з ДНК), ΔG_{nel} – сума енергій неелектростатичних взаємодій (водневі зв'язки, вандерваальсові та гідрофобні взаємодії), ΔG_w – внесок від додаткової фіксації або звільнення гідратної води з інтерфейсу взаємодії, ΔG_{conf} – внесок (зазвичай позитивний) від конформаційних змін ліганду та/або полімеру, що відбуваються при зв'язуванні.

Рівняння (6.2), (6.3) визначають константу зв'язування – якщо всі внески у вільну енергію відомі, її можна розрахувати. На практиці зазвичай роблять навпаки: визначають саму константу (на відміну від розрахунків, це можна зробити експериментально без будь-яких припущень), після чого за характером залежності константи зв'язування від зовнішніх умов роблять висновки про наявність тих чи інших взаємодій і співвідношення між різноманітними внесками у вільну енергію. Найважливішими для системи ліганд-ДНК зовнішніми факторами, від яких може залежати константа зв'язування, є температура та йонна сила розчину.

6.1.3. Залежність константи зв'язування від температури

Усі внески у стандартну вільну енергію зв'язування можна розкласти на ентальпійну та ентропійну складові (рівн. 2.4). Згрупувавши відповідні члени та скориставшись рівн. (6.2), отримаємо співвідношення між константою зв'язування та температурою, відоме як рівняння Вант-Гоффа (Jacobus Van't Hoff):

$$\ln K = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}, \quad (6.4)$$

де ΔH^0 і ΔS^0 – стандартні ентальпія та ентропія зв'язування відповідно. За умови, що ΔH^0 і ΔS^0 не залежать від температури (умова виконується, коли зміна теплоємності при зв'язуванні $\Delta C_p = 0$, рівн. (2.6)), залежність $\ln K$ від $1/T$ (графік Вант-Гоффа) є лінійною (рис. 6.2). При цьому можливі три випадки:

- Константа зв'язування не залежить від температури – графік Вант-Гоффа є паралельним до осі абсцис. Виходячи з рівн. (6.4), це означає, що $\Delta H^0 = 0$ – зв'язування не супроводжується тепловими ефектами і зумовлене тільки ентропійними внесками до вільної енергії. Ця ситуація є досить типовою, і такий вигляд графіка свідчить про виключно електростатичний механізм стабілізації комплексу – електростатичні взаємодії мають ентропійну природу й не залежать від температури (розд. 3).

- Константа зв'язування знижується при зростанні температури (пряма на рис. 6.2). Це означає, що $\Delta H^0 < 0$ (рівн. (6.4)) – при зв'язуванні виділяється тепло. Такий характер залежності свідчить про вагомий внесок взаємодій, які мають ентальпійну природу (водневі зв'язки, взаємодії Ван дер Ваальса), у стабілізацію комплексу. Рівняння (6.4) вказує, що нахил лінійного графіка Вант-Гоффа дорівнює $-\Delta H^0/R$, а при $1/T = 0$ пряма лінія відсікає на осі ординат $\Delta S^0/R$.

- Константа зв'язування зростає при підвищенні температури – $\Delta H^0 > 0$ (невигідний ентальпійний внесок у вільну енергію зв'язування, зумовлений, наприклад, суттєвими деформаціями ДНК), а зв'язування, таким чином, залежить від вигідних ентропійних внесків.

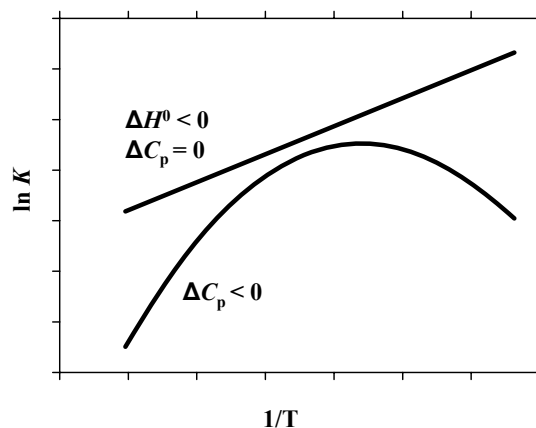


Рис. 6.2. Типові приклади лінійного та нелінійного графіків Вант-Гоффа (за рівн. (6.4) і (6.5) відповідно)

Крім того, графік Вант-Гоффа може бути нелінійним – у випадку, коли ΔH^0 та ΔS^0 залежать від температури, тобто $\Delta C_p \neq 0$. Якщо при цьому ΔC_p не залежить від температури (є ненульовою константою), то, виходячи з рівн. (2.6б), ці функції можна представити у вигляді:

$$\Delta H^0 = \Delta H_0^0 + \Delta C_p (T - T_0),$$

$$\Delta S^0 = \Delta S_0^0 + \Delta C_p \ln \frac{T}{T_0},$$

де ΔH_0^0 та ΔS_0^0 – стандартні ентальпія та ентропія зв'язування відповідно за певної реперної температури T_0 . Підстановка цих виразів у рівн. (6.4) дає:

$$\ln K = \ln K_0 - \frac{\Delta H_0^0}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) + \frac{\Delta C_p}{R} \left(\ln \frac{T}{T_0} + \frac{T_0}{T} - 1 \right), \quad (6.5)$$

де K_0 – константа зв'язування за температури T_0 . Підгонка рівняння під експериментально отриманий графік Вант-Гоффа дозволяє визначити ΔC_p , $\ln K_0$ та ΔH_0^0 (а отже, і ΔS_0^0 та характер залежності всіх термодинамічних функцій від температури). Приклад такої залежності представлено на рис. 6.2 для випадку $\Delta C_p < 0$ – при зв'язуванні відбувається зниження теплоємності. Такий графік Вант-Гоффа є дуже характерним для специфічних білково-нуклеїнових взаємодій – повернемося до цього питання у розд. 7.

6.1.4. Залежність константи зв'язування від іонної сили

Спорідненість позитивно зарядженого ліганду до ДНК визначається ентропійним виграшем від визволення порції конденсованих протиіонів у зовнішній розчин (підпідрозд. 3.5.1). Позитивна електростатична вільна енергія ДНК зумовлена головним чином конденсацією протиіонів (розд. 3). Згідно з теорією конденсації $Z(1 - (2\xi)^{-1}) = 0,88Z$ протиіонів звільнюється з іонної атмосфери у відповідь на зв'язування ліганду із зарядом Z (в одиницях елементарного позитивного заряду). Електростатична вільна енергія ДНК (в одиницях $k_B T$) змінюється при цьому на величину $-Zg_{el}$, де g_{el} підпорядковане приблизному співвідношенню (3.16). Отже, внесок електростатичних взаємодій у стандартну вільну енергію зв'язування (рівн. (6.3)) становить $\Delta G_{el} = 0,88 RT Z \ln C$, де C – молярна концентрація солі. Тобто, користуючись рівн. (6.2), (6.3), для константи зв'язування можна записати:

$$\ln K = \ln K_T - 0,88Z \ln C, \quad (6.6)$$

де $\ln K_T = -\Delta G_T/RT$, ΔG_T є сумою всіх неелектростатичних внесків у стандартну вільну енергію зв'язування.

Лінійна залежність логарифма константи зв'язування від логарифма концентрації солі є чіткою ознакою наявності електростатичного внеску в загальну енергію стабілізації комплексу. Аналіз такої залежності дозволяє отримати два важливі параметри:

- Нахил відповідного графіка до осі абсцис

$$\frac{\partial \ln K}{\partial \ln C} = -0,88Z$$

дає оцінку кількості електростатичних контактів між фосфатами ДНК і лігандом – ефективного позитивного заряду ліганду Z .

- Значення логарифма константи за концентрації солі 1 М (отримане шляхом екстраполяції лінійної залежності до $\ln C = 0$) є оцінкою внеску від неелектростатичних взаємодій $\ln K_T = -\Delta G_T/RT$ (незалежних від концентрації солі) у загальну вільну енергію стабілізації комплексу. За будь-якої концентрації солі тоді можна оцінити внесок від електростатичних взаємодій $\Delta G_{el} = \Delta G^0 - \Delta G_T$.

Крім того, оскільки електростатичний внесок у вільну енергію зв'язування є цілком ентропійним, тобто $\Delta G_{el} = -T\Delta S_{el}$, зміна ентропії ΔS_{el} за рахунок визволення протиіонів є автоматично відомою. Якщо із залежності константи зв'язування від температури (попередній підрозділ) є відомими ΔH^0 та ΔS^0 за деякої іонної сили, можна також оцінити неелектростатичний ентропійний внесок $\Delta S_T = \Delta S^0 - \Delta S_{el}$.

6.1.5. Ізотерма зв'язування ліганду з лінійним полімером

Для експериментального визначення константи зв'язування зазвичай здійснюють титрування одного реагуючого компонента іншим, визначають рівноважні концентрації компонентів суміші та будують графік, в тих чи інших координатах, залежності ступеня зв'язування ліганду від його вільної концентрації – так звану *ізотерму зв'язування* (адсорбції).

Розглянемо для прикладу взаємодію з лігандом однакових коротких фрагментів ДНК, з кожним із яких може зв'язатись тільки один ліганд. Тобто маємо звичайну бімолекулярну реакцію: записавши концентрацію комплексу як $X = \theta X_{tot}$, де θ – частка фрагментів у складі комплексу, X_{tot} – загальна концентрація фрагментів, а концентрацію вільних фрагментів як $S = (1 - \theta)X_{tot}$, отримаємо вираз для константи зв'язування (див. визначення константи зв'язування на початку підрозд. 6.1.1):

$$K = \frac{\theta}{(1 - \theta)L},$$

який, власне, і встановлює співвідношення між ступенем зв'язування θ і вільною концентрацією ліганду L . З цього виразу можна легко отримати інші форми ізотерми зв'язування:

$$\theta = \frac{KL}{1 + KL}$$

або

$$\theta/L = K(1 - \theta). \quad (6.7)$$

Останній вираз – ізотерма в координатах Скетчарда (George Scatchard) – утворює лінійну залежність θ/L від θ , нахил якої дорівнює константі зв'язування.

Розглянута проста бімолекулярна схема зазвичай не може бути застосована до ДНК – лінійного полімеру, вздовж якого регулярно повторюються стандартні мономерні елементи (за винятком випадку, коли ліганд з високою специфічністю зв'язується тільки з одним конкретним сайтом у межах молекули ДНК). Справа в тому, що на незаповненому полімері кожна пара основ може слугувати початком сайту зв'язування – кількість потенційних сайтів зв'язування дорівнює загальній кількості мономерних одиниць (нехтуючи кінцевими ефектами для досить довгого полімеру), тобто потенційні сайти перекриваються. При поступовому заповненні полімеру між зв'язаними лігандами з певною ймовірністю утворюються прогалини, менші за розміром, ніж довжина сайту, – хоча прогалина містить певну кількість вільних мономерів, там не може розміститись новий ліганд (рис. 6.3). У результаті кількість вільних сайтів зв'язування зменшується швидше, ніж зростає ступінь заповнення полімеру.

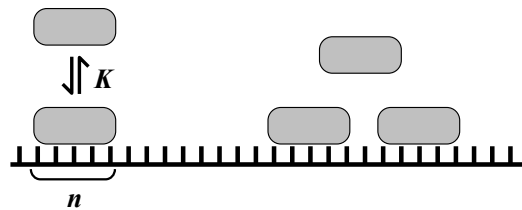


Рис. 6.3. Зв'язування лігандів із довгим лінійним полімером.
 K – константа зв'язування, n – розмір сайту зв'язування

Розглянемо найпростішу модель, зображену на рис. 6.3: з нескінченно довгим полімером (загальна кількість мономерних одиниць N) зв'язано q лігандів, кожен із яких займає n мономерних одиниць на полімері; зв'язування характеризується константою K , концентрація вільного ліганду дорівнює L . Зрозуміло, що для ДНК під мономерними одиницями слід розуміти пари основ або, іноді, фосфатні залишки. У найпростішому випадку ліганди не розрізняють пари основ (зв'язування неспецифічне) і зв'язуються незалежно один від одного – не взаємодіють між собою (відсутня кооперативність, див. наступний підпідрозділ). Загальна вільна енергія такої системи, відрахована від рівня повністю вільного полімеру, має вигляд (підпідрозд. 2.1.1):

$$G = -q \ln KL - RT \ln W,$$

де перший член дорівнює вільній енергії зв'язування q лігандів (за рівн. (6.1)), другий – ентропійний внесок, який залежить від кількості W переставлень q лігандів по полімеру (рівн. (2.1), (2.4)). Для q зв'язаних лігандів загальна кількість вільних пар основ дорівнює $(N - nq)$, кожна з них плюс ще q пар може бути використана як перша пара, що розпочинає один з q зайнятих сайтів (без втрати загальності будемо вважати, що полімер має напрямок – наприклад, зліва направо). Кількість переставлень W – це кількість способів обрати q перших пар із зазначеної загальної кількості – кількість сполучень з $(N - nq + q)$ по q . Отже,

$$W = \frac{(N - nq + q)!}{q!(N - nq)!}.$$

Після підстановки цього виразу в попередній, позбавившись від факторіалів великих чисел за допомогою формули Стирлінга (підрозд. 2.3), розділивши ліву і праву частини на NRT та позначивши $\nu = q/N$ (щільність зв'язування – кількість зв'язаних лігандів на одну мономерну одиницю), отримаємо вільну енергію в одиницях RT на одну пару основ як функцію щільності зв'язування

$$g = -\nu \ln KL + (1 - n\nu) \ln \frac{1 - n\nu}{1 - n\nu + \nu} + \nu \ln \frac{\nu}{1 - n\nu + \nu}. \quad (6.8)$$

Деяка рівноважна щільність зв'язування відповідає мінімуму цієї вільної енергії. Мінімізація g відносно ν (як завжди, слід узяти похідну від g по ν та прирівняти її до нуля) дає рівноважне значення ν для даної концентрації L – вираз для ізотерми зв'язування. У координатах Скетчарда ізотерма має вигляд

$$\frac{\nu}{L} = K \frac{(1 - n\nu)^n}{(1 - n\nu + \nu)^{n-1}}. \quad (6.9)$$

Якщо зв'язування підпорядковується розглянутій моделі, підгонка цього рівняння під експериментально отриману ізотерму (див. підпідрозд. 6.1.7) дозволяє визначити параметри K та n .

При $n = 1$ (сайти не перекриваються) останнє рівняння перетворюється на $\nu/L = K(1 - \nu)$, що збігається з рівн. (6.7), – ордината графіка Скетчарда лінійно зменшується при зростанні щільності зв'язування до його максимального значення $\nu_{\max} = 1$; при $\nu = 0$ ордината дорівнює константі зв'язування (рис. 6.4).

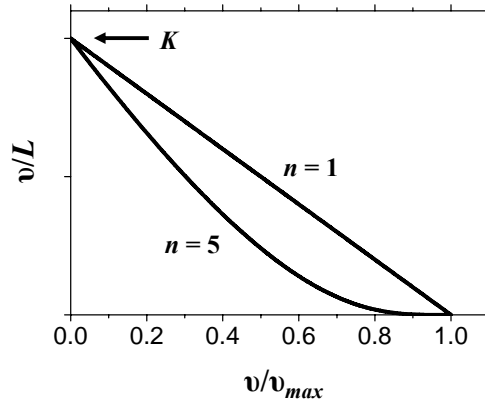


Рис. 6.4. Ізотерми зв'язування лігандів з лінійним полімером у координатах Скетчарда при двох значеннях розміру сайту зв'язування (за рівн. (6.9))

Як видно з рівн. (6.9), при $v = 0$ ордината дорівнює константі для будь-яких n , але при $n > 1$ графік прогинається донизу (тим більше, чим вище n), і максимальна щільність $v_{\max} = 1/n$ стає практично недосяжною (рис. 6.4). Така поведінка є прямим наслідком перекриття потенційних сайтів зв'язування – при зростанні щільності збільшується кількість вільних пар основ, що входять до складу надто коротких прогалів між зв'язаними лігандами.

Підстановка умови рівноваги (6.9) у вираз для вільної енергії (6.8) дозволяє отримати рівняння для зміни вільної енергії від початку реакції (коли полімер вільний від лігандів) до стану рівноваги (сумарний енергетичний ефект реакції в одиницях RT на одну пару основ):

$$g_{eq} = \ln \frac{1 - n\nu}{1 - n\nu + \nu}, \quad (6.10)$$

де ν – рівноважне значення щільності, яке визначається рівн. (6.9). У граничному випадку $n = 1$ останнє рівняння перетворюється на добре відоме рівняння для звичайних бімолекулярних реакцій

$$g_{eq} = \ln(1 - \nu) = -\ln(1 + KL).$$

6.1.6. Кооперативне зв'язування

Коли спорідненість ліганду залежить від ступеня заповнення полімеру лігандами (такими самими чи іншими), кажуть про *кооперативне* зв'язування. Кооперативність може бути позитивною (зв'язані ліганди підвищують спорідненість) або негативною (зв'язані ліганди знижують спорідненість – антикооперативність).

Найпростішим і досить поширеним механізмом кооперативності є безпосередня взаємодія між лігандами, що зв'язані на полімері поруч один з одним. Ускладнимо розглянуту в попередньому підпідрозділі модель, припустивши, що зв'язані ліганди, опинившись поруч на полімері, здатні взаємодіяти між собою (рис. 6.5): з ізольованим сайтом (y відсутності контактів з іншими лігандами) ліганд зв'язується з константою K ; якщо зв'язування відбувається поруч з іншим зв'язаним лігандом – із константою ωK ; точно між двома зв'язаними лігандами (реалізуються два контакти) – $\omega^2 K$. Параметр ω , який відіграє роль фактору кооперативності, є константою рівноваги між двома конфігураціями, зображеними на вставці рис. 6.5: 1) два ліганди, що зв'язані окремо один від одного на деякій ділянці довжиною $2n + x + y$ пар основ (n – довжина сайту зв'язування, x – прогалина між лігандами); 2) два ліганди у контакті один з одним на тій самій ділянці. Випадок $\omega > 1$ відповідає позитивній кооперативності (між лігандами реалізуються енергетично вигідні взаємодії – ліганди "притягуються"), $\omega < 1$ – негативній кооперативності (ліганди "відштовхуються"), $\omega = 1$ – відсутності кооперативності (модель перетворюється на розглянуту в попередньому підпідрозділі).

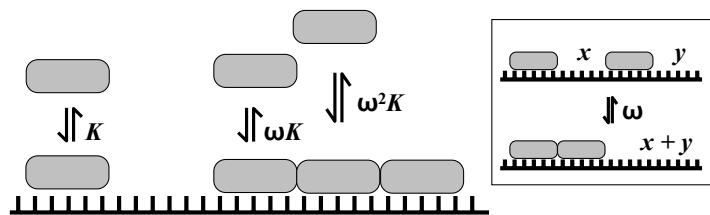


Рис. 6.5. Кооперативне зв'язування лігандів з довгим полімером.
 K – константа зв'язування, ω – параметр кооперативності.
 На вставці: визначення параметру ω як константи рівноваги між двома зображеними конфігураціями

Щоб знайти вираз для ізотерми кооперативного зв'язування, використаємо інший – імовірнісний – підхід (який можна було б застосувати й для попередньої моделі). Спочатку введемо *умовні ймовірності*: (ff) – імовірність того, що праворуч за вільною парою основ також стоїть вільна пара (як і в попередньому підпідрозділі, оберемо напрямком зліва направо); (fb) – імовірність того, що за вільною парою знаходиться зайнята (розпочинається зайнятий сайт зв'язування); (bf) – імовірність знайти вільну пару праворуч від правого краю зайнятого лігандом сайту; (bb) – імовірність того, що за правим краєм зайнятого сайту знаходиться лівий край наступного зайнятого сайту. Очевидно, що суми двох перших і двох останніх імовірностей дорівнюють одиниці:

$$(ff) + (fb) = 1, \quad (6.11a)$$

$$(bf) + (bb) = 1. \quad (6.11b)$$

Частка вільних від ліганду пар основ (імовірність зустріти вільну пару) дорівнює $(1 - nv)$, де знову v – кількість зв'язаних лігандів на одну пару основ. Вільна пара може стояти або праворуч від вільної, або праворуч від правого краю зайнятого сайту. Імовірність першої можливості дорівнює добутку ймовірності $(1 - nv)$ зустріти першу вільну пару на умовну ймовірність (ff) . Імовірність другої можливості – добуток ймовірності v зустріти правий край зв'язаного ліганду на ймовірність (bf) того, що поряд із ним міститься вільна пара. Сума ймовірностей двох зазначених можливостей є просто ймовірністю зустріти вільну пару основ:

$$(1 - nv) = (1 - nv)(ff) + v(bf). \quad (6.11b)$$

Виходячи з визначення параметра кооперативності, ω можна виразити через зазначені умовні ймовірності. Імовірність нижньої конфігурації на вставці рис. 6.5 дорівнює $(bb)(bf)(ff)^{x+y-1}$, верхньої – $(bf)(ff)^{x-1}(fb)(bf)(ff)^{y-1}$, тобто константа рівноваги (відношення ймовірностей, яке визначає, наскільки нижня конфігурація є частішою за верхню)

$$\omega = \frac{(bb)(ff)}{(bf)(fb)}. \quad (6.11r)$$

Чотири рівн. (6.11) дозволяють знайти вирази для чотирьох умовних ймовірностей як функцій v , n і ω .

Загальна кількість зв'язаних лігандів q складається з кількостей лігандів трьох типів: q_{is} лігандів, зв'язаних ізольовано без контактів з іншими лігандами; q_s лігандів, що реалізують один контакт з іншим зв'язаним лігандом; q_d лігандів, що реалізують два таких контакти. Відповідно, у розрахунку на одну пару основ $v = v_{is} + v_s + v_d$, і результуюча ізотерма зв'язування є сумою трьох ізотерм (за визначенням константи зв'язування):

$$\begin{aligned} v_{is} / L &= K v S_{is}, \\ v_s / L &= \omega K v S_s, \\ v_d / L &= \omega^2 K v S_d, \end{aligned} \quad (6.12)$$

де L – концентрація вільного ліганду; S_{is} , S_s і S_d – середні кількості вільних сайтів, що допускають відповідно ізольоване зв'язування та зв'язування з одним і двома контактами, на одну прогалину між зв'язаними лігандами. Для довгого полімеру кількість прогалин дорівнює кількості зв'язаних лігандів (v у розрахунку на одну пару основ), тобто середні кількості сайтів на одну прогалину, помножені на v , дають загальні кількості вільних сайтів відповідного типу в розрахунку на одну пару основ.

Імовірність зустріти прогалину довжиною x пар основ дорівнює $(bf)(ff)^{x-1}(fb)$. Кількість ізольованих сайтів у такій прогалині становить $(x - n - 1)$, а мінімальна довжина прогалини (щоб там міг розміститися принаймні один ізольовано зв'язаний ліганд) дорівнює $(n + 2)$. Отже, середня кількість ізольованих сайтів на одну прогалину

$$S_{is} = \sum_{x=n+2}^{\infty} (x-n-1)(bf)(ff)^{x-1}(fb) = \frac{(bf)(ff)^{n+1}}{(fb)}.$$

З першого рівняння видно, що загальна сума розкладається на суму нескінченної геометричної прогресії та похідну від геометричної прогресії за (ff) , звідки можна отримати остаточний вираз. Кількість сайтів з одним контактом у будь-якій прогалині дорівнює двом, мінімальна довжина прогалини, що допускає розміщення двох таких сайтів, $-(n + 1)$. Скориставшись формулою суми нескінченної геометричної прогресії, отримаємо

$$S_s = \sum_{x=n+1}^{\infty} 2(bf)(ff)^{x-1}(fb) = 2(bf)(ff)^n.$$

А оскільки вільний сайт із двома контактами може бути тільки один і тільки в прогалині довжиною n ,

$$S_d = (bf)(ff)^{n-1}(fb).$$

Підставивши три останні вирази в рівн. (6.12) і записавши суму цих рівнянь після підстановки умовних імовірностей, виражених через ν , n та ω , шляхом алгебраїчних перетворень можна отримати два еквівалентні вирази для ізотерми кооперативного зв'язування:

$$\begin{aligned} \frac{\nu}{L} &= \frac{1}{4}K(1-n\nu)^{-n} \left(\frac{(2\omega-1)(1-n\nu) + \nu - R}{2(\omega-1)} \right)^{n-1} (1-n\nu - \nu + R)^2 = \\ &= \frac{1}{4}K(1-n\nu)^n \left(\frac{2\omega}{(2\omega-1)(1-n\nu) + \nu + R} \right)^{n+1} (1-n\nu + \nu + R)^2, \end{aligned} \quad (6.13)$$

$$R = \sqrt{(1-n\nu - \nu)^2 + 4\omega\nu(1-n\nu)}.$$

При $\omega = 1$ (відсутність кооперативності) рівн. (6.13) спрощується до рівн. (6.9), отримане іншим шляхом у попередньому підпідрозділі. При $\omega = 0$ (абсолютна антикооперативність) рівн. (6.13) також перетворюється на рівняння того

самого вигляду, що рівн. (6.9), де замість n стоїть $m = n + 1$ – неможливість контакту між лігандами приводить до того, що при максимальному заповненні полімеру між лігандами стоїть одна вільна пара основ, тобто розмір сайту зв'язування просто збільшується на одиницю. Приклади ізотерм зв'язування, розрахованих за рівн. (6.13) за різних значень параметра кооперативності, наведено на рис. 6.6.

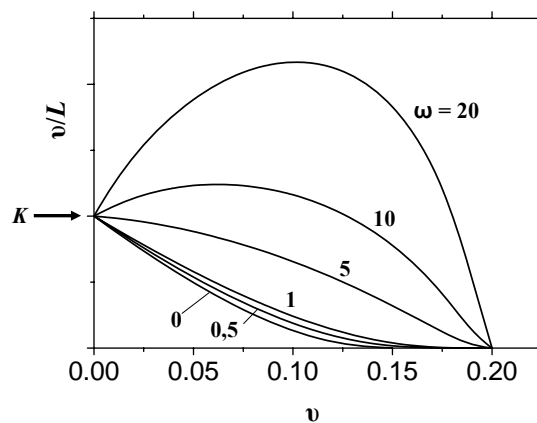


Рис. 6.6. Ізотерми зв'язування лігандів з лінійним полімером у координатах Скетчарда за різних значень параметра кооперативності ω , розмір сайту зв'язування $n = 5$ (за рівн. (6.13))

У разі негативної кооперативності ($\omega < 1$) графік Скетчарда прогинається донизу – практично, порівняно з відсутністю кооперативності ($\omega = 1$), така ситуація є еквівалентною зростанню розміру сайту зв'язування, тобто ізотерму можна описати за допомогою рівн. (6.9), де при $0 < \omega < 1$ розмір сайту дорівнюватиме деякому нецілому числу між n та $n + 1$. Інакше кажучи, негативну кооперативність досить важко ідентифікувати експериментально, обмежуючись тільки аналізом ізотерм зв'язування. Позитивна кооперативність приводить до вигину графіка Скетчарда у протилежний бік – тим більшого, чим вищим є значення ω (рис. 6.6). Тобто, за наявності енергетично вигідних взаємодій між лігандами відбувається ефективно заповнення полімеру – спорідненість є тим вищою, чим більше лігандів уже зв'язано, і тільки зменшення вільних сайтів при високих значеннях щільності зв'язування приводить до різкого зниження ординати графіка.

Описаний механізм кооперативності зв'язування не єдиний із можливих. Ліганди можуть взаємодіяти між собою, зв'язуючись на відстані, коли прогалина між ними формує петлю (характерно для багатьох білків, розд. 7). Крім того, зв'язані ліганди можуть змінювати загальні властивості полімеру, що, у свою чергу, може впливати на спорідненість – один із прикладів такого типу буде розглянуто в підпідрозд. 6.5.2.

Описані в цьому та попередньому підпідрозділах моделі часто доводиться ускладнювати, розглядаючи конкретні системи: урахувати кінцеві ефекти, якщо досліджувана полімерна молекула є не надто довгою; брати до уваги конкуренцію між різними лігандами, що знаходяться в суміші, або доступність ДНК для ліганду, якщо ця ДНК міститься у складі білково-нуклеїнового комплексу; враховувати специфічність зв'язування – різну спорідненість до ділянок, збагачених парами основ різних типів чи певними елементами послідовності. Деякі приклади можна знайти в оригінальних роботах, представлених у переліку рекомендованої літератури.

6.1.7. Експериментальне визначення ізотерми зв'язування

Експериментальне визначення ізотерми зв'язування є, зрозуміло, попередньою умовою для її наступного аналізу. Для цього використовують різноманітні методи, детальний розгляд яких виходить за рамки цієї книги (його можна знайти в багатьох підручниках, присвячених фізико-хімічним методам дослідження нуклеїнових кислот). Нижче наведено лише загальні принципи.

Найбільш прямим засобом визначення ізотерми зв'язування, який не потребує жодних припущень, є рівноважний діаліз. Метод надзвичайно простий, але може бути застосований тільки для лігандів невеликого розміру – таких, що вільно проникають крізь мембрану, непроникну для ДНК. Розчин розділяється на дві камери такою мембраною: у першій із них присутня ДНК, а ліганд, який додається, наприклад у другу, вільно дифундує між обома камерами. Коли рівновага досягнута, загальна концентрація ліганду в другій камері дорівнює його вільній концентрації в першій, а загальна концентрація в першій камері – сумі концентрацій вільного та зв'язаного ліганду: залишається тільки визначити ці загальні концентрації, щоб отримати точку на ізотермі зв'язування.

Напевно, найбільш зручними й широко вживаними є спектральні методи (найчастіше використовують спектрофотометрію та флуоресцентну спектроскопію). Загальний принцип їхнього використання досить простий і не залежить від типу спектроскопії: необхідно, щоб деякий спектральний параметр (наприклад, екстинкція чи інтенсивність або анізотропія флуоресценції) змінювався при зв'язуванні ліганду. При цьому можна використовувати або власні спектральні характеристики ліганду (інколи ДНК), або характеристики ковалентно приєднаної мітки (наприклад, флуоресцентної).

Якщо деякий спектральний параметр ліганду (чи приєднаної до нього мітки) має значення F_f і F_b для вільного та зв'язаного ліганду відповідно, то коли в суміші за даних загальних концентрацій ліганду L_t та ДНК D_t (у молях пар основ) існують ці обидва типи лігандів, експериментально буде виміряно значення параметра

$$F = F_b \theta + F_f (1 - \theta),$$

де θ – частка зв'язаного ліганду, яку можна легко визначити з цього рівняння з одним невідомим. Слід пам'ятати (і відповідним чином емпірично підбирати загальні концентрації), що значення θ може вважатись досить точним за умови, що воно знаходиться в діапазоні принаймні від 0,1 до 0,9 – наближення ступеня зв'язування до 0 або до 1 приводить до великої похибки визначення рівноважних концентрацій компонентів. Значення спектрального параметра F_f визначається заздалегідь для ліганду у відсутності ДНК, значення F_b можна отримати, наприклад, титруючи ліганд великим надлишком ДНК та екстраполюючи отримані значення до нескінченної концентрації ДНК (до $1/D_t = 0$). Як тільки частка зв'язаного ліганду стане відомою, його вільну концентрацію можна розрахувати як $L = L_t(1 - \theta)$, а щільність зв'язування як $\nu = \theta L_t/D_t$.

Описаний підхід є прийнятним тільки тоді, коли в суміші присутні лише два типи лігандів – вільний і зв'язаний (тобто здійснюється рівновага двох станів). Часто так воно і є, але в цьому бажано переконатись. Наприклад, при використанні спектрофотометрії ознакою наявності лише двох станів є ізобестична точка в спектрах поглинання, отриманих при різних співвідношеннях між компонентами (за постійної загальної концентрації ліганду). Проте досить часто ліганди можуть здійснювати зв'язування кількох типів, з різною спорідненістю й різним характером зміни спектральних характеристик, наприклад зовні подвійної спіралі та шляхом вбудовування між парами основ (див. підпідрозд. 6.5.1). У таких випадках іноді можна розрізнити два типи зв'язування, підібравши такий діапазон співвідношення між компонентами, де переважно реалізується один із цих типів.

Іншим важливим підходом є використання ізотермічної калориметрії, яка дозволяє вимірювати поглинання чи виділення тепла при змішуванні двох компонентів за постійної температури – тепловий ефект реакції. Проаналізувавши (шляхом, аналогічним до описаного вище) залежність теплового ефекту від концентрації реагентів, можна визначити ізотерму, а отже, і константу зв'язування та, відповідно, стандартну вільну енергію зв'язування ΔG^0 . Перевагою цього підходу є те, що одночасно *вимірюється* кількість тепла, питома зміна якої (на 1 моль зв'язаного ліганду) дорівнює стандартній ентальпії зв'язування ΔH^0 , а знаючи ΔG^0 , можна отримати також зміну ентропії ΔS^0 за рівн. (6.2), (6.4), отже, визначити всі термодинамічні характеристики зв'язування.

6.1.8. Вплив зв'язування лігандів на стабільність ДНК

Присутність лігандів може суттєво впливати на термостабільність подвійної спіралі, що проявляється у зсуві температури плавлення (підпідрозд. 2.2.2). Проілюструємо механізм такого впливу на простому прикладі. Нехай є великий за розміром ліганд, що зв'язується з досить довгою ділянкою ДНК. При цьому спорідненість ліганду до дволанцюгової та одноланцюгової ДНК є різною –

позначимо відповідні вільні енергії зв'язування як ΔG_{ds} і ΔG_{ss} . За відсутності ліганду різниця вільних енергій між дво- та односпіральним станами дорівнює ΔG , а співвідношення між різницями ентальпій і ентропій двох станів визначає температуру плавлення (рівн. (2.14), (2.15)). За наявності ліганду до ΔG слід додати також різницю між енергіями зв'язування $\Delta G_b = \Delta G_{ds} - \Delta G_{ss}$. Якщо $\Delta G_b < 0$ (спорідненість ліганду до дволанцюгової ДНК є вищою, ніж до одноланцюгової), сумарна різниця вільних енергій у присутності ліганду знижується, тобто подвійна спіраль стає стабільнішою – ліганд відіграє роль "скріпки". Вільна енергія може знижуватись або за рахунок ентальпійної складової (яка стає більш негативною), або за рахунок ентропії (стає менш негативною) – в обох випадках підвищується температура плавлення (рівн. (2.15)).

Ця ситуація є досить типовою для різноманітних лігандів, що взаємодіють з ДНК. Проте можливий також і протилежний випадок: якщо $\Delta G_b > 0$ (спорідненість є вищою до одноланцюгової ДНК), ліганд дестабілізує ДНК. Одним із прикладів такого типу є білки, що стабілізують одноланцюговий стан ДНК під час реплікації (SSB – single strand binding proteins).

У загальному випадку для лігандів будь-якого розміру описати вплив зв'язування на температуру плавлення можна, наприклад, таким чином. У вираз для вільної енергії системи двоспіральна – односпіральна ДНК (рівн. (2.20)) слід додати (помноживши на кількість спіральних і неспіральних пар основ) рівноважні вільні енергії зв'язування лігандів (рівн. (6.10)) з одно- та двоспіральною ДНК, використовуючи відповідно рівноважні щільності зв'язування v_{ss} та v_{ds} і розміри сайтів зв'язування n_{ss} та n_{ds} . Після мінімізації відносно частки спіральних пар основ (підрозд. 2.3) отримаємо умову рівноваги у вигляді:

$$s^* = s \frac{1 - n_{ds} v_{ds}}{1 - n_{ds} v_{ds} + v_{ds}} \frac{1 - n_{ss} v_{ss} + v_{ss}}{1 - n_{ss} v_{ss}},$$

де $s = \exp(-\Delta G/RT)$ – константа рівноваги між спіральним і неспіральним станами за відсутності ліганду, ΔG – різниця вільних енергій між дво- та односпіральним станами (підрозд. 2.3). Величина $s^* = 1$ при температурі плавлення T_m , а $s = 1$ при температурі плавлення за відсутності ліганду T_0 .

Вважаючи, що ентальпія та ентропія плавлення ДНК практично не залежать від температури у вузькому температурному інтервалі (підрозд. 2.2.2), можна, скориставшись рівнянням Вант-Гоффа (рівн. (6.4)), записати залежність s^* від температури таким чином:

$$\frac{d \ln s^*}{d(1/T)} = -\frac{\Delta H_0}{R}$$

де $\Delta H_0 < 0$ – стандартна зміна ентальпії при утворенні подвійної спіралі. Або, після відповідного інтегрування, зміна температури плавлення у присутності ліганду задається рівнянням:

$$\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T_m} = \frac{R}{\Delta H_0} \left(\ln \frac{1 - n_{ds} v_{ds}}{1 - n_{ds} v_{ds} + v_{ds}} - \ln \frac{1 - n_{ss} v_{ss}}{1 - n_{ss} v_{ss} + v_{ss}} \right), \quad (6.14)$$

де v_{ds} і v_{ss} – рівноважні щільності зв'язування, які за даної концентрації вільного ліганду можна розрахувати за допомогою рівн. (6.9). Рівняння (6.14) указує, що коли спорідненість є вищою до дволанцюгової ДНК ($v_{ds} > v_{ss}$), температура плавлення підвищується у присутності ліганду.

Часто використовують також різноманітні спрощені рівняння, які можуть бути отримані з рівн. (6.14). Наприклад, за умови дуже низьких щільностей зв'язування

$$\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T_m} = \frac{R}{\Delta H_0} (v_{ss} - v_{ds}).$$

Це співвідношення може бути використаним, коли зв'язування є слабким і більша частина ліганду перебуває у вільному стані. У цьому випадку температура плавлення не залежить від концентрації, а крива плавлення є монофазною. Якщо зв'язування з двоспіральною формою міцне ($K_{ds}L \gg 1$, де K_{ds} – відповідна константа зв'язування), а взаємодією з одноланцюговою ДНК, навпаки, можна нехтувати, то

$$\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T_m} = \frac{R}{\Delta H_0} \ln(1 + K_{ds}L)^{1/n} \approx \frac{R}{\Delta H_0} \ln(K_{ds}L)^{1/n}.$$

Останнє рівняння використовують для опису поведінки високотемпературного переходу на біфазних кривих плавлення – за великої різниці у спорідненостях у певному діапазоні концентрацій ліганду частина двоспіральних ділянок плавиться легше, вивільняючи ліганд на інші ділянки, які, у свою чергу, насичуються лігандом і плавляться при більш високій температурі. Як видно з рівняння, для цього другого переходу залежність $1/T_m$ від логарифма концентрації ліганду часто є лінійною.

6.2. ГІДРАТАЦІЯ ДНК

Поверхня ДНК – цукрофосфатний остов і жолобки – полярна, оскільки містить хімічні групи, які можуть виступати донорами або акцепторами водневого зв'язку. Відповідно, взаємодія з молекулами води є суттєвим моментом існування подвійної спіралі та її структурної організації. Це було зрозуміло вже на початкових етапах дослідження ДНК після встановлення того факту, що зміна вологості фібрил індукує структурний перехід з А- (відносна вологість 75–80 %) у В-форму (>85 %).

За досить давніми результатами, отриманими на тонких плівках ДНК методами інфрачервоної спектроскопії, перший гідратний шар води, яка має певні особливості коливального спектра, містить 18–23 молекули води на один нуклеотид у В-формі ДНК. 11–12 цих молекул взаємодіють з ДНК безпосередньо: ~2 молекули більш-менш міцно зв'язані з фосфатним залишком, ~4 – з фосфодіефірною групою та пентозним кільцем, 4–6 молекул взаємодіють з екзоциклічними групами азотистої основи в жолобках. Інші 8–9 молекул першого гідратного шару утворюють водневі зв'язки з молекулами води першої групи. Наступні шари води в оточенні ДНК не відрізняються за своїми спектральними характеристиками від звичайної рідкої води.

Прямим засобом побачити впорядковану воду в оточенні ДНК є рентгенівська кристалографія. Кристали кожної структурної форми ДНК мають свої особливості у розташуванні зв'язаних молекул води. Упорядковані структури води найчастіше розташовані в жолобках меншого розміру – у маленькому для В-форми та великому для А-форми. При цьому реалізується так званий "принцип економичності гідратації", який пояснює, чому А-форма є переважною за зниження вологості фібрил: скорочена відстань між сусідніми фосфатами в А-формі (підпрозд. 1.3.1) робить можливим утворення "містків" з молекул води, які одночасно зв'язані з цими фосфатами. Тобто А-форма допускає гідратацію меншою кількістю молекул води.

Найхарактернішою особливістю кристалів В-ДНК є так званий "хребет" із молекул води (spine of hydration) в АТ-збагаченому маленькому жолобку (АТ-пари сприяють звуженню жолобка). Наприклад, такий хребет спостерігається в маленькому жолобку в центрі фрагмента додекамера Дікерсона d(CGCGAATTCGCG)₂. Детальний вигляд хребта, отриманий на інших кристалах методами дифракції рентгенівських променів і нейтронів, зображено на рис. 4, кольор. вст. Вважається, що цей хребет заважає структурному перетворенню АТ-збагачених ділянок в А-форму (GC-збагачені ділянки перетворюються легше).

Крім маленького жолобка, гідратовані також і фосфатні залишки, і цукри. Виходячи зі значень кристалографічного В-фактора (характеризує ступінь неупорядкованості внаслідок теплових флуктуацій та/або статичного безладу в комірках кристалічної решітки), упорядкованість води, зв'язаної з різними елементами ДНК, знижується в ряду основи > цукри > фосфати. Відносна частота присутності води в різних сайтах знижується в ряду АТ-збагачений маленький жолобок > заряджені оксигени фосфатних залишків > О4' цукру > екзоциклічні групи основ у великому жолобку > О3' > О5'. Слід зауважити, що в кристалах можна ідентифікувати тим більше молекул води, чим нижча температура, при якій здійснюється опромінення кристала, – при кімнатних температурах велика кількість молекул є невидимою внаслідок теплових флуктуацій.

Головне, що треба розуміти про воду в найближчому оточенні ДНК (як і водорозчинних білків), – **гідратний шар є надзвичайно динамічним утворенням**. За даними розрахунків молекулярної динаміки (прозд. 3.4), середній час іммобілізації молекул води біля поверхні ДНК становить від 11 до 18 пс (максимум ~200 пс). Ці розрахунки підтверджуються фемтосекундною флуоресцентною

спектроскопією, яка дозволяє слідкувати за змінами залежних від взаємодії з водою спектрів флуоресценції зондів і міток, зв'язаних із ДНК, у фемто- та пікосекундному діапазоні. В оточенні ДНК фіксується два класи молекул води: 1) з часом іммобілізації ~ 1 пс (50–60 %) – характерний час для чистої рідкої води; 2) молекули, які затримуються на одному місці на час ~ 10 –20 пс (50–40 %). Другий клас, власне, і являє собою "впорядковану" ("структуровану", "зв'язану" – з огляду на такий масштаб часу, усі ці слова мають братися в лапки) воду. Така швидка динаміка характерна для більшої частини молекул води, хоча певна кількість молекул може затримуватись на поверхні ДНК трохи довше: в ЯМР-експериментах із ^{23}Na було показано, що середній час іммобілізації води в жолобках становить 200–400 пс, при цьому час затримки води у великому жолобку на порядок менший, ніж у маленькому.

Узявши $\tau_w \sim 20$ пс як середній час затримки молекули води на поверхні ДНК, отримаємо константу швидкості дисоціації $k_{off} \sim 5 \cdot 10^{10} \text{ c}^{-1}$, а контрольована дифузією константа швидкості асоціації (підпідрозд. 2.5.1) має дорівнювати $k_{on} \sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$, тобто константа рівноваги $K = k_{on}/k_{off} \sim 0,2 \text{ M}^{-1}$: у середньому сайти на поверхні ДНК мають бути зайняті водою $>90\%$ часу (використавши концентрацію води 55,55 М і рівн. (6.7)). Але завдяки швидкому обміну зв'язаної води з основною масою розчинника впорядкований гідратний шар постійно порушується й відновлюється в пікосекундному діапазоні.

Швидка динаміка гідратного шару ДНК має важливе значення для структурної стабільності ДНК та її взаємодії з іншими молекулами.

- Та обставина, що час обміну зв'язаної води є значно меншим часу конформаційних перетворень подвійної спіралі, забезпечує стабільність структури в В-формі: довга затримка молекул води, що випадково зв'язались в орієнтації, яка сприяє іншим структурним формам ДНК, могла б привести до суттєвих змін структури подвійної спіралі.

- Час затримки молекул води на поверхні ДНК має той самий порядок величини, що й середній час існування водневого зв'язку в рідкій воді (кілька пікосекунд). Це забезпечує можливість ефективного швидкого зв'язування з поверхнею ДНК інших молекул, які також використовують водневий зв'язок для взаємодії.

- Порівняно з молекулами води, інші масивніші ліганди характеризуються значно більшим часом обертальної дифузії – це забезпечує визначену достатньо жорстку (у масштабі часу динамічно-впорядкованої води) геометрію комплексу.

- Хоча вода зберігає швидку динаміку, рухи зв'язаних молекул води все ж таки гальмуються поверхнею ДНК, що приводить до зниження ентропії системи. Повне визволення води з інтерфейсу взаємодії між ДНК і більш масивним лігандом дає, таким чином, вигідний ентропійний внесок у вільну енергію зв'язування. Іноді навпаки, молекули води залишаються в інтерфейсі, виконуючи роль містків, що утворюють водневі зв'язки і з ДНК, і з лігандом. У такому випадку вода фіксується в певному місці, а пов'язані з цим ентропійні витрати компенсуються енергетично вигідними стабільними водневими зв'язками молекули-містка.

6.3. ВЗАЄМОДІЯ ДНК З ОЛІГОКАТІОНАМИ

Моновалентні катіони взаємодіють з ДНК за механізмом конденсації, описаним у розд. 3. При цьому, як було зауважено у підрозд. 3.4, моновалентні катіони можуть на короткий проміжок часу зв'язуватися з поверхнею подвійної спіралі безпосередньо, хоча загалом це є досить рідкою подією. Головними сайтами зв'язування є зазвичай негативно заряджені киснеги фосфатних залишків, проте зв'язування можливе також і з екзоциклічними групами основ у жолобках та гідроксильними групами пентоз. Винятком є іон Ag^+ , який має підвищену спорідненість до азотистих основ.

Взаємодія катіонів вищої валентності (починаючи з двовалентних неорганічних катіонів) також характеризується динамічністю та є значною мірою делокалізованою, але товщина шару, де розміщуються такі олігокатіони значно менша порівняно з розмірами шару конденсованих моновалентних протиіонів (розд. 3). Отже, взаємодію двовалентних катіонів (і тим більше – лігандів із вищим позитивним зарядом) можна описати в термінах класичного зв'язування із сайтами на поверхні ДНК (рис. 6.7). Таке зв'язування має цілком електростатичну природу – зумовлено ентропійним виграшем від визволення конденсованих моновалентних катіонів (підпідрозділи 3.5.1 і 6.1.4). На рис. 6.8 наведено кілька прикладів: залежності від концентрації NaCl констант зв'язування Mg^{2+} , гексамінокобальту $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, природних поліамінів путресцину²⁺ ($^+\text{H}_3\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_3^+$), спермідину³⁺ ($^+\text{H}_3\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2^+- (\text{CH}_2)_3-\text{NH}_3^+$), сперміну⁴⁺ ($^+\text{H}_3\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2^+- (\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2^+- (\text{CH}_2)_3-\text{NH}_3^+$), а також зарядженого олігопептиду пенталізіну Lys_5 .

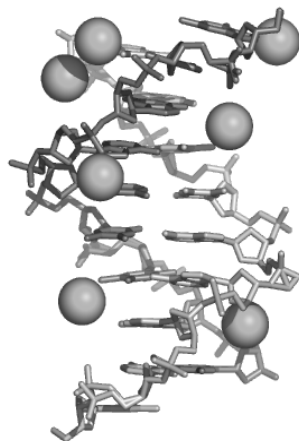


Рис. 6.7. Кристалічна структура ДНК у комплексу з іонами Mg^{2+} (кульки). Код PDB 1ENN

Рисунок демонструє чітку лінійну логарифмічну залежність констант зв'язування від концентрації моновалентних катіонів – відповідно до рівн. (6.6). У двох випадках (Mg^{2+} і путресцин $^{2+}$ і $Co(NH_3)_6^{3+}$ та спермідин $^{3+}$) спорідненість визначається саме зарядом, а не природою ліганду. Крім того, і це також передбачено рівн. (6.6): середній нахил лінійних залежностей на рис. 6.8 дорівнює $0,88Z$, де Z – позитивний заряд ліганду; значення lgK при $lg[NaCl] = 0$ є близьким до нуля в усіх випадках; логарифм константи зв'язування за даної концентрації $NaCl$ є зростаючою лінійною функцією заряду ліганду. Ізотерма зв'язування заряджених лігандів за даної іонної сили підпорядковується рівн. (6.9), причому розмір сайту зв'язування знижується при зростанні іонної сили. Наприклад, при підвищенні концентрації $NaCl$ від 50 до 150 мМ розмір сайту для сперміну $^{4+}$ змінюється від 4,8 до 3,6 фосфатів, спермідину $^{3+}$ – від 3,2 до 2,1, тобто зв'язування заряджених лігандів характеризується певною негативною кооперативністю (підпідрозд. 6.1.6) – зв'язані однойменно заряджені ліганди електростатично відштовхуються один від одного. Цей ефект знижується при зростанні концентрації солі.

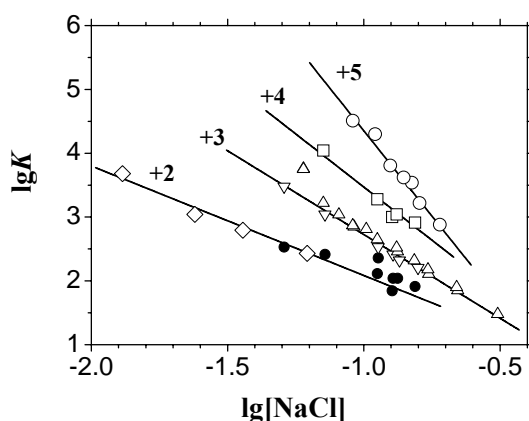


Рис. 6.8. Залежність від молярної концентрації $NaCl$ констант зв'язування з ДНК Mg^{2+} (●), путресцину $^{2+}$ (◇), спермідину $^{3+}$ (▽), сперміну (□) (за даними Braunlin *et al.*, 1982), $Co(NH_3)_6^{3+}$ (Δ, за даними Braunlin *et al.*, 1987) і пенталізину (○, за даними Lohman *et al.*, 1980)

Катіони Mg^{2+} та Ca^{2+} , зв'язуючись з ДНК за електростатичним механізмом, впливають на структуру та стабільність подвійної спіралі: порівняно з моновалентними катіонами, Mg^{2+} та Ca^{2+} є значно ефективнішими щодо додаткового закручення подвійної спіралі (збільшення середнього кута твіста, підрозд. 1.4) і збільшення температури плавлення ДНК (ефект "скріпки", підрозд. 6.1.8). Що стосується інших неорганічних дивалентних катіонів, то вони можуть зв'язу-

ватися з ДНК не тільки за суто електростатичним механізмом. Найяскравіше це виявляється у впливі різних катіонів на температуру плавлення – за високих загальних концентрацій (~3–4 іона на фосфат) Mg^{2+} , Co^{2+} , та Ni^{2+} продовжують стабілізувати ДНК (стабілізуючий вплив спадає у зазначеному порядку), а Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} і Cu^{2+} викликають зниження температури плавлення (дестабілізуючий вплив зростає у зазначеному порядку). Дестабілізація, у відповідності до загальних міркувань, викладених у підпідрозд. 6.1.8, залежить від спорідненості відповідних іонів до азотистих основ, тобто до одноланцюгової ДНК.

Неорганічні оліговалентні катіони впливають також і на структурні перетворення подвійної спіралі. Так, Mg^{2+} індукує В–Z перехід в альтернуючих послідовностях poly(dGdC) більш ефективно, ніж моновалентні катіони (підпідрозд. 1.3.2). Гексамінокобальт $Co(NH_3)_6^{3+}$ є в 10 тис. разів ефективнішим за Mg^{2+} . Це пов'язано з утворенням аміногрупами ліганду п'яти водневих зв'язків з гуаніном та оксигенами фосфатів за умови реалізації Z-форми.

Серед сполук, наведених на рис. 6.8, особливий інтерес становить пенталізін – як модель взаємодії з ДНК поліпептидів і білків, що містять позитивно заряджені за нейтральних рН амінокислотні залишки Lys⁺ і Arg⁺. Розглянемо ще один цікавий приклад взаємодії з ДНК двох заряджених олігопептидів, досліджений Радманабхан *et al.* (1997): WK₄ – один триптофановий залишок (використовувався як флуоресцентна мітка), фланкований чотирма лізинами, та АК – олігопептид довжиною 17 амінокислотних залишків, серед яких знову один Trp, чотири Lys і 12 Ala, причому лізини розділені по ланцюгу трьома чотирма залишками Ala (рис. 6.9).

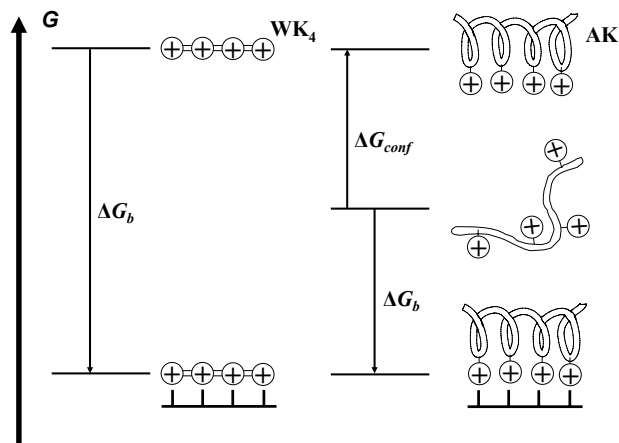


Рис. 6.9. Схема взаємодії двох однаково заряджених олігопептидів різної довжини (WK₄ і АК, пояснення в тексті) з ДНК. G – шкала вільної енергії, ΔG_b – енергія зв'язування, ΔG_{conf} – енергія утворення α -спіралі. Адаптовано з роботи Радманабхан *et al.* (1997)

Експериментально визначений розмір сайту зв'язування є приблизно однаковим для обох олігопептидів – 4,6 фосфатів для WK₄, 3,9 фосфатів для АК. Нахил логарифмічної залежності константи зв'язування K від іонної сили (який характеризує кількість електростатичних контактів у складі комплексу, рівн. (6.6)) також практично однаковий: $-4,1$ для WK₄ і $-4,0$ для АК. Проте значення констант зв'язування K розрізняються на два порядки: за певної низької іонної сили $\lg K$ (пропорційний вільній енергії зв'язування, рівн. (6.2)) дорівнює 7,8 для WK₄, але 5,8 для АК. При цьому спектроскопія кругового дихроїзму фіксує утворення α -спіралі у складі АК при його зв'язуванні з ДНК – у вільному вигляді олігопептид перебуває у стані неупорядкованого клубка. Структурна перебудова виводить усі лізини на один бік α -спіралі (3,6 амінокислотні залишки на виток), забезпечуючи можливість їхньої одночасної взаємодії з фосфатами, – у витягнутій або неупорядкованій конформації олігопептид також міг би взаємодіяти з ДНК, але з меншою спорідненістю.

Отже, короткий і відносно конформаційно жорсткий олігопептид WK₄ зв'язується "як є" – вільна енергія зв'язування головним чином визначається внеском від електростатичних взаємодій (рис. 6.9). Для більш довгого та лабільного АК електростатичний внесок практично не змінюється, але сумарна енергія зв'язування містить позитивний внесок від конформаційної перебудови: конформаційне перетворення коштує енергетичних витрат (α -спіраль є енергетично не вигідною для даного олігопептиду за даних умов), але при цьому забезпечує ефективну електростатичну взаємодію (рис. 6.9).

Розглянутий приклад демонструє певну досить загальну закономірність, характерну для багатьох білків, що взаємодіють із ДНК, – здійснення конформаційних перебудов білка у складі комплексу. Як правило, у результаті таких перебудов у білках відбувається підведення додаткових хімічних груп для взаємодії з ДНК, що забезпечує підвищення спорідненості. Повернемося до цього питання в розд. 7.

6.4. ВЗАЄМОДІЯ ОРГАНІЧНИХ ЛІГАНДІВ З МАЛЕНЬКИМ ЖОЛОБКОМ

Низка органічних сполук – в основному антибіотики та синтетичні флуоресцентні барвники (приклади наведено на рис. 6.10) – реалізують взаємодії з молекулою ДНК через маленький жолобок (рис. 6.11) (слід зауважити, що прикладів взаємодії порівняно невеликих органічних лігандів з великим жолобком практично не існує). Такі ліганди виявляють певну специфічність щодо

послідовності ДНК – більшість із них має підвищену спорідненість до АТ-збагаченого маленького жолобка (хоча антибіотик хромоміцин є більш спорідненим до GC-пар). Наприклад, нетропсин і дистаміцин здатні досить міцно взаємодіяти з чотирма послідовними АТ-парами через маленький жолобок – ці антибіотики мають вигнуту форму, яка точно відповідає спіральній закрученій формі жолобка. Позитивний заряд (рис. 6.10) визначає певний внесок від електростатичних взаємодій, але він не є визначальним. Головний внесок в енергію зв'язування дають водневі зв'язки між амідними групами антибіотиків та N3 аденіну й O2 тиміну (див. рис. 1.9). Поява GC-пари на АТ-збагаченій ділянці знижує спорідненість унаслідок стеричних проблем, що створюються аміногрупою гуаніну в маленькому жолобку. Крім водневих зв'язків, внесок в енергію зв'язування дають також вандерваальсові взаємодії та гідрофобні контакти між пірольними кільцями нетропсину й дистаміцину та гідрогенами С2 аденіну. Зазвичай така сама ієрархія взаємодій (водневі зв'язки як головний чинник плюс додатково взаємодії всіх інших типів) зберігається при специфічному щодо послідовності зв'язуванні з ДНК білків (див. розд. 7).

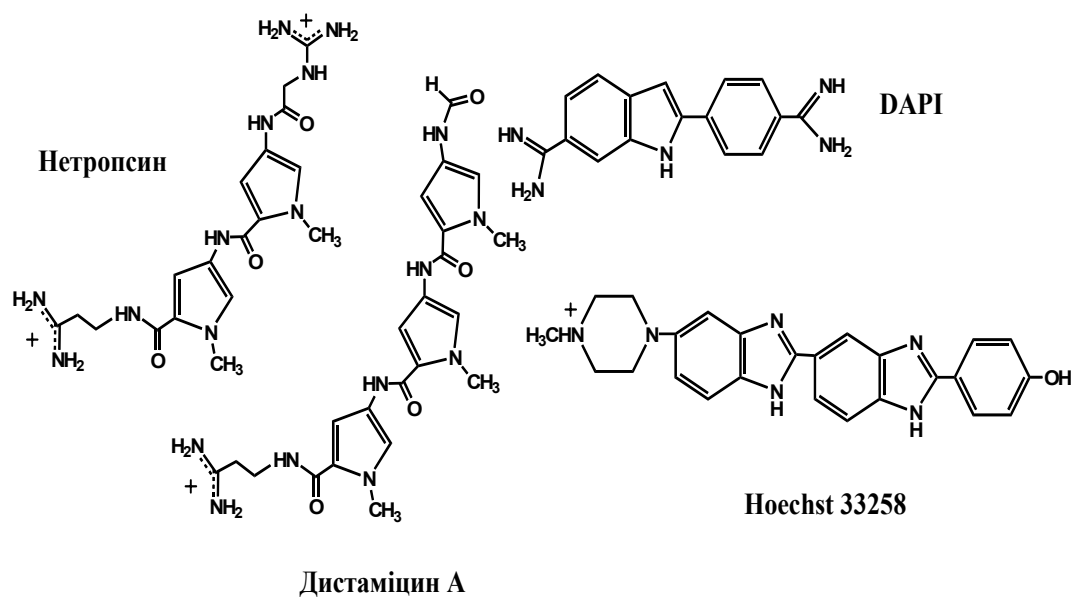


Рис. 6.10. Деякі антибіотики (нетропсин і дистаміцин А) і флуоресцентні барвники (DAPI та Hoechst 33258), що взаємодіють з маленьким жолобком ДНК

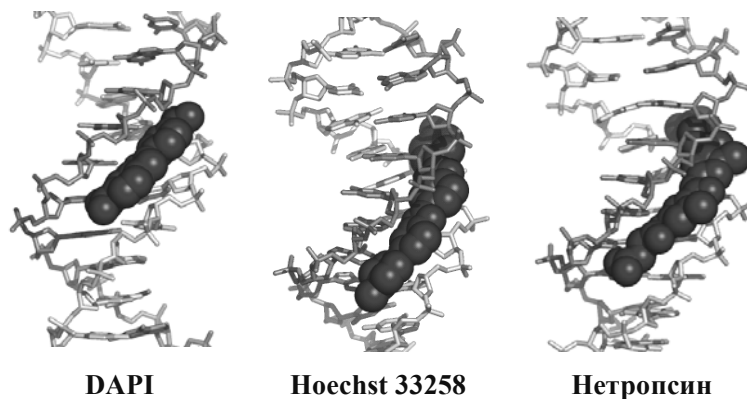


Рис. 6.11. DAPI, Hoechst 33258 і нетропсин у комплексах з ДНК
(коди PDB 1D30, 1D43 та 6BNA відповідно)

Як і інші ліганди, антибіотики, що зв'язуються з ДНК, підвищують її термостабільність. Крім того, нетропсин і дистаміцин викликають зміну структури подвійної спіралі, підвищуючи кут твіста (закручуючи спіраль) у сайті зв'язування. Якщо взаємодія відбувається з циркулярною ДНК, це приводить до ефектів, протилежних до тих (але таких самих за механізмом), що описані у підпідрозд. 6.5.2.

6.5. ІНТЕРКАЛЯЦІЯ

6.5.1. Механізми інтеркаляції

Планарні ароматичні молекули (зазвичай гетероцикли), які за розміром наближаються до пари основ (рис. 6.12), здатні до особливого типу взаємодій із ДНК – інтеркаляції, тобто вбудовування між двома сусідніми парами основ (рис. 5, кольор. вст.). При цьому між інтеркалятором і парами основ по обидва боки від нього реалізуються стекінг-взаємодії – приблизно такої самої природи, що й між парами основ. Якщо у складі сполуки до власне інтеркалятора приєднані додаткові непланарні подовження (рис. 6.12), вони укладаються в маленький жолобок (рис. 5, кольор. вст.) – це стосується і олігопептидних елементів у складі актиноміцину D.

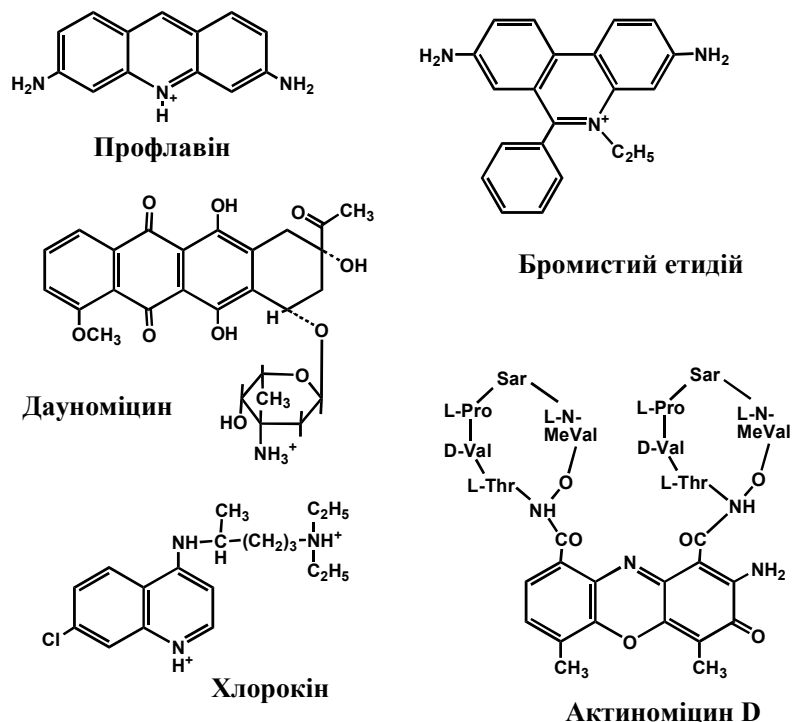


Рис. 6.12. Хімічна будова деяких інтеркаляторів
 (для бромистого етидію не показано дисоційований іон Br^- ,
 у структурі актиноміцину D Sar – саркозин, MeVal – метилвалін)

За деякими винятками, інтеркалятори зазвичай не проявляють помітної специфічності щодо послідовності пар основ (у тому числі найуживаніші бромистий етидій, профлавін, хлорокін). Серед специфічних інтеркаляторів найкраще вивченим є актиноміцин D: він має підвищену спорідненість до GC-пар (хоча б одна має бути присутньою в сайті інтеркаляції), ще вищу – до динуклеотидного кроку GpC, а найкращим контекстом для взаємодії є крок GpC, фланкований двома AT-парами з обох боків.

Безпосереднім наслідком інтеркаляції є дві найхарактерніші зміни в структурі подвійної спіралі:

- Вбудовування інтеркалятора між двома щільно упакованими парами основ приводить до подовження подвійної спіралі – на товщину однієї пари основ на один сайт інтеркаляції. За даними електронної мікроскопії, при максимальному насиченні інтеркалятором спіраль подовжується на ~50 % – один інтеркалятор на кожні дві пари основ (див. нижче). Подовження проявляється і в зростанні

в'язкості розчину комплексу ДНК-інтеркалятор, його коефіцієнту седиментації та електрофоретичної рухливості – ці показники відображають також підвищення жорсткості ДНК щодо вигину внаслідок інтеркаляції.

- У сайті інтеркаляції здійснюється помітне розкручування пар основ, між якими вбудований інтеркалятор, – кут твіста знижується на 26° для актиноміцину D, на $22\text{--}26^\circ$ (за різними оцінками) для бромистого етидію, на 17° для профлавіну, на 11° для дауноміцину. Таке розкручування може бути зафіксованим за змінами седиментації або електрофоретичної рухливості комплексів інтеркалятора з циркулярними молекулами ДНК, а також за зменшенням середнього числа зачеплень у розподілах топоізомерів, отриманих при циклізації ДНК у присутності інтеркаляторів (підпідрозд. 5.2.2, 5.4.1).

Подовження та розкручування подвійної спіралі є двома чіткими тестами на інтеркаляцію як спосіб зв'язування того чи іншого ліганду з ДНК.

У результаті таких досить радикальних змін структури подвійної спіралі в сайті інтеркаляції проміжки між парами основ, що фланкують інтеркальований ліганд, не можуть бути використані як нові сайти – зв'язування відбувається за так званим механізмом з виключенням сусідів. Інакше кажучи, взаємодія інтеркаляторів з ДНК характеризується абсолютною антикооперативністю (підпідрозд. 6.1.6) – ізотерма зв'язування описується рівн. (6.9), де розмір сайту $n = 2$ парам основ або дещо більше (рис. 6.13).

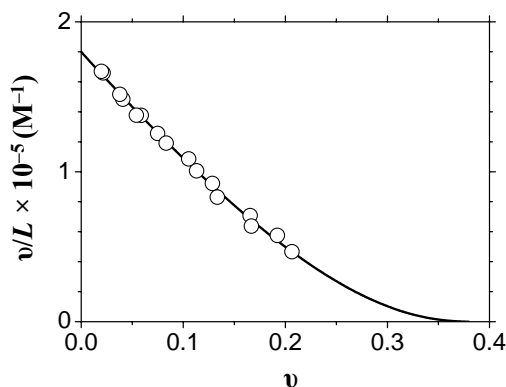
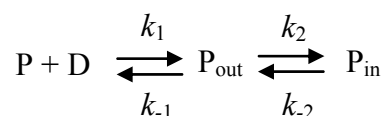


Рис. 6.13. Изотерма зв'язування бромистого етидію з ДНК у 100 мМ NaCl (за даними Sivolob *et al.*, 1999)

Завдяки тому, що більшість інтеркаляторів є хромофорами (характеризуються помітним поглинанням та іноді флуоресценцією у видимій області, параметри яких суттєво змінюються при інтеркаляції), термодинаміка їхнього зв'язування з ДНК непогано вивчена. Розмір сайту $n = 2$ іноді спостерігається, але

насправді це скоріше нижня границя. Для деяких інтеркаляторів $n = 3$ (наприклад, для тилорону) за не зовсім зрозумілих причин. Для актиноміцину D, завдяки досить масивним олігопептидним "додаткам" (рис. 6.12), розмір сайту збільшується до 4–6 пар основ. Зв'язування позитивно заряджених інтеркаляторів характеризується додатковими ефектами негативної кооперативності – одноіменно заряджені ліганди уникають наближатися один до одного, і ступінь такої негативної кооперативності знижується при підвищенні іонної сили (аналогічно до заряджених лігандів, описаних у підрозд. 6.3). Так, ефективний розмір сайту зв'язування бромистого етидію знижується від 2,8 до 2,5 пар основ при підвищенні концентрації солі від 10 до 100 мМ. При цьому, відповідно рівн. (6.6), знижується також і константа зв'язування – сумарна вільна енергія зв'язування містить електростатичну компонентну (хоча внесок від взаємодій інтеркалятора з площинами пар основ превалює).

Зазвичай інтеркалятори здатні також взаємодіяти з ДНК і в інший спосіб – зовні подвійної спіралі. Зовнішнє зв'язування відбувається з нижчою порівняно з інтеркаляцією спорідненістю, а отже, стає помітним при надлишку ліганду щодо пар основ. Іноді таке зовнішнє зв'язування важко зафіксувати експериментально: взаємодія, скажімо, бромистого етидію, чудово описується в термінах двох станів – вільного та інтеркальованого ліганду (підпідрозд. 6.1.7). Для профлавіну два типи комплексів можна розрізнити за особливостями їхніх спектрів поглинання – взаємодія описується двостадійним механізмом:



де D – ДНК, P, P_{out} та P_{in} – відповідно вільний, зовнішньо зв'язаний та інтеркальований профлавін; k_1, k_{-1}, k_2, k_{-2} – константи швидкості відповідних стадій. Тобто (підпідрозд. 2.5.1) константи рівноваги для двох стадій $K_1 = k_1/k_{-1}, K_2 = k_2/k_{-2}$, перша стадія залежить від концентрації (K_1 має розмірність M^{-1}), друга описує інтеркаляцію зовнішньо зв'язаного ліганду – є мономолекулярним процесом (K_2 безрозмірна). Співвідношення між двома стадіями процесу ілюструють значення констант швидкості, які були визначені для профлавіну методом температурного стрибка: за даними Лі, Кродерс (Li, Crothers, 1969) $k_1 = 10^7 M^{-1}c^{-1}, k_{-1} = 3,5 \cdot 10^3 c^{-1}, k_2 = 1,5 \cdot 10^3 c^{-1}, k_{-2} = 110 c^{-1}$. Відповідно, середній час існування ліганду в зв'язаному стані (обернена константа швидкості руйнування комплексу) становить приблизно 300 мкс для зовнішнього зв'язування та 10 мс для інтеркаляції, а константи рівноваги $K_1 = 2,8 \cdot 10^3 M^{-1}, K_2 = 13,6$, тобто результуюча константа зв'язування для інтеркаляції становить $K_1 K_2 = 3,8 \cdot 10^4 M^{-1}$.

6.5.2. Взаємодія інтеркаляторів з циркулярною ДНК

Взаємодія інтеркаляторів із циркулярною ДНК приводить до топологічних змін циркулярної молекули – розкручування пар основ у сайті інтеркаляції має бути компенсованим закрученням в усіх інших місцях, оскільки число зачеплень Lk повинно залишатись інваріантом (розд. 5). Інакше кажучи, зв'язування інтеркалятора вносить у кільце позитивну надспіралізацію. Зміна властивостей циркулярної молекули зумовлює зміни її спорідненості до інтеркалятора – спостерігаються кооперативні ефекти, коли спорідненість залежить від щільності зв'язування. Проілюструємо цей особливий механізм кооперативності на прикладі бромистого етидію.

При інтеркаляції однієї молекули ліганду кут твіста знижується від свого нормального значення Ω до $\Omega_E = \Omega - \varphi_E$, де φ_E – кут розкручування пар основ у сайті інтеркаляції. За відсутності інтеркалятора найвигідніший твіст ДНК $Lk_0 = N\Omega/360^\circ$, де N – загальна кількість пар основ у кільці (підпідрозд. 5.1.1, 5.1.3). При зв'язуванні q молекул інтеркалятора ця величина набуває значення $Lk_E = Lk_0 - q\varphi_E/360^\circ$, тобто рівень надспіралізації в кільці у присутності інтеркалятора за рівн. (5.7) становить

$$\Delta Lk_E = Lk - Lk_E = \Delta Lk + q\varphi_E / 360^\circ,$$

де $\Delta Lk = Lk - Lk_0$ – рівень надспіралізації у відсутності інтеркалятора. Другий доданок визначає позитивну надспіралізацію, що вводиться в кільце внаслідок інтеркаляції. Тобто, якщо до інтеркаляції ДНК була негативно надспіралізованою ($\Delta Lk < 0$), то, залежно від кількості q , інтеркаляція компенсує еластичну напругу негативного знаку або частково, або повністю, або ж сумарна надспіралізація стає позитивною.

Вільна енергія надспіралізації у присутності інтеркалятора визначається рівн. (5.16), куди замість ΔLk слід підставити ΔLk_E . Якщо перейти до щільності зв'язування інтеркалятора $\nu = q/N$ і розділити енергію на NRT , отримаємо вираз для вільної енергії надспіралізації у присутності інтеркалятора в одиницях RT на одну пару основ:

$$g_{sc} = A_{sc}(\nu - \nu_0)^2, \tag{6.15}$$

$$A_{sc} = K_{sc} \left(\frac{\varphi_E}{360^\circ} \right)^2, \quad \nu_0 = -\frac{\Omega}{\varphi_E} \sigma,$$

де A_{sc} – модифікована силова константа надспіралізації, $\sigma = \Delta Lk/Lk_0$ – щільність надспіралізації за відсутності ліганду. Залежна від σ величина ν_0 визначає таку щільність зв'язування, коли відбувається повна релаксація і $g_{sc} = 0$.

Енергію надспіралізації, визначену рівн. (6.15), слід додати до повної вільної енергії системи – записати як додатковий член у правій частині рівн. (6.8), яке визначало вільну енергію як функцію щільності зв'язування для лінійної ДНК. Мінімізація отриманого виразу дає умову рівноваги – визначає ізотерму зв'язування інтеркалятора з циркулярною ДНК:

$$\frac{\nu}{L} = K \frac{(1 - n\nu)^n}{(1 - n\nu + \nu)^{n-1}} \exp[2A_{sc}(\nu_0 - \nu)]. \quad (6.16)$$

Рівняння (6.16) відрізняється від виразу (6.9) експоненціальним множником, який описує вплив залежної від щільності зв'язування надспіралізації на спорідненість інтеркалятора до циркулярної ДНК. Якщо циркулярна ДНК є негативно надспіралізованою за відсутності інтеркалятора ($\nu_0 > 0$ за рівн. (6.15)), то при малих щільностях зв'язування $\nu < \nu_0$ експонента більша за 1, і спорідненість до циркулярної молекули більша, ніж до лінійної – ордината графіка Скетчарда є вищою для циркулярної ДНК (рис. 6.14). Підвищена спорідненість пояснюється тим, що інтеркаляція знімає частину еластичної напруги – зв'язування виявляється більш вигідним за рахунок зниження енергії надспіралізації. Зростання щільності зв'язування приводить до зниження цього додаткового енергетичного вигаду, і врешті-решт, коли негативна надспіралізація повністю релаксована ($\nu = \nu_0$), спорідненості інтеркалятора до лінійної та циркулярної ДНК однакові – дві ізотерми перехрещуються. Подальше зростання щільності зв'язування при $\nu > \nu_0$ (експонента в рівн. (6.16) менша 1) підвищує позитивну надспіралізацію – зв'язування з циркулярною ДНК стає менш енергетично вигідним, ніж із лінійною.

Підгонка рівн. (6.9) і (6.16) під експериментальні ізотерми дозволяє визначити константу та розмір сайту зв'язування, а також параметри надспіралізації досліджуваної циркулярної ДНК: ν_0 (відповідно, і щільність надспіралізації або ΔLk) та A_{sc} (відповідно, і силову константу надспіралізації K_{sc}). Дві ізотерми, зображені на рис. 6.14, можна об'єднати в одну лінійну залежність (вставка на тому ж рисунку), розділивши рівн. (6.16) на (6.9) і перейшовши до логарифмічної шкали:

$$\ln \frac{L_{lin}}{L} = 2A_{sc}(\nu_0 - \nu), \quad (6.17)$$

де L та L_{lin} – концентрації вільного інтеркалятора, необхідні для досягнення однакової щільності зв'язування ν на циркулярній і лінійній ДНК відповідно. Лінійна підгонка дає значення параметрів ν_0 та A_{sc} .

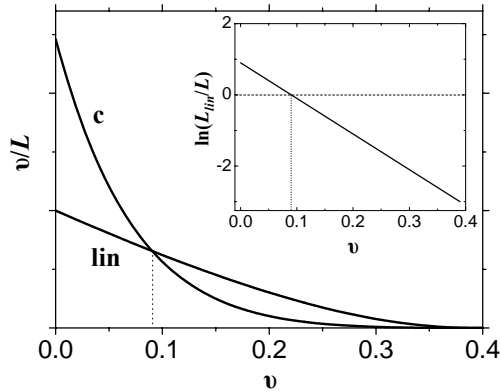


Рис. 6.14. Типові ізотерми зв'язування бромистого етидію з лінійною (lin) і негативно надспіралізованою циркулярною (c) ДНК у координатах Скетчарда за рівн. (6.9) і (6.16) відповідно. Пунктир маркує точку релаксації при $v = v_0$. На вставці: лінеаризована ізотерма за рівн. (6.17)

Ізотерми на рис. 6.14 є типовими для циркулярних ДНК великої контурної довжини – плазмід. При цьому спостерігається залежність величини нахилу лінеаризованої ізотерми від іонної сили: за фізіологічних значень концентрації солі нахил відповідає силовій константі $K_{sc} \sim 1000$, зниження іонної сили викликає підвищення K_{sc} . Як обговорювалось у підрозд. 5.4, значення силової константи залежить від розподілу надспіралізації між зміною твіста та райзингом: чим більший внесок райзингу, тим нижча K_{sc} . Накопичення райзингу пов'язане з компактизацією плазміди – утворенням плектонемічної форми, у складі якої розділені по ланцюгу ділянки ДНК наближаються одна до одної. Це стає менш енергетично вигідним унаслідок зростання електростатичного розштовхування при зниженні іонної сили, що й зумовлює підвищення внеску твіста в надспіралізацію та відповідне зростання K_{sc} (див. також підрозд. 5.4.3).

Для циркулярної ДНК маленької контурної довжини – мініциклу – ізотерма адсорбції в координатах $\ln(L_{lin}/L)$ проти v стає більш складною: замість однієї спостерігаються три послідовні лінійні ділянки з різною величиною нахилу (рис. 6.15).

Перша ділянка (починаючи з низьких v) має високий нахил, який відповідає $K_{sc} \sim 5000$, тобто спорідненість інтеркалятора швидко знижується при зростанні щільності зв'язування. Високе значення силової константи свідчить про високу жорсткість – відбувається титрування в жорсткому режимі, у межах якого ізотерма перетинає нульову лінію. Значення K_{sc} у цьому режимі є близьким до максимальної граничної оцінки (підрозд. 5.4.2), тобто свідчить про відсутність внеску райзингу в загальний рівень еластичних напружень – кільце є планарним, і зміни надспіралізації здійснюються за рахунок змін твіста.

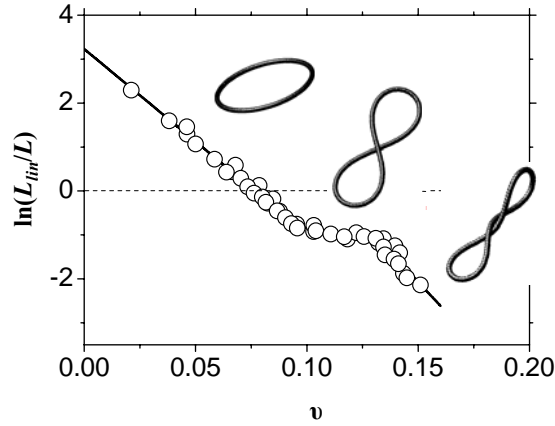


Рис. 6.15. Ізотерма зв'язування бромистого етидію з негативно надспіралізованим мініциклом ($\Delta Lk = -1,2$) контурною довжиною 256 пар основ. Зображено конфігурації мініциклу, які відповідають різним режимам ізотерми (за даними Sivolob *et al.*, 1999)

Після проходження точки релаксації відбувається зміна жорсткого режиму на більш гнучкий, який характеризується $K_{sc} \sim 1500$, що приблизно збігається зі значенням силової константи для плазмідної ДНК. Тобто, мініцикл у цьому другому режимі здатен ефективно змінювати свій райзинг – відбувається натиск райзингу, описаний у підпідрозд. 5.4.2 (порівн. рис. 6.15 і 5.15). Зрозуміло, що процес закручування 8-подібної структури не може продовжуватись безмежно – при деякій кількості супервитків вигин ДНК у маленьких термінальних петлях стає надмірно великим, і тоді гнучкий режим титрування змінюється знову на жорсткий.

На відміну від надспіралізації мініциклу, розглянутої в підпідрозд. 5.4.2, у системі з інтеркалятором є присутнім додатковий енергетичний внесок – енергія зв'язування бромистого етидію з ДНК. За рахунок цієї енергії компенсуються енергетичні витрати на вигин ДНК, і натиск райзингу відбувається при значно менших значеннях сумарної ΔLk_E , ніж на рис. 5.15 (точка зміни першого жорсткого режиму на гнучкий на рис. 6.15 відповідає $\Delta Lk_E \sim +0,3$). Далі внаслідок утворення 8-подібної структури енергія надспіралізації зростає повільніше (рис. 5.15) і завдяки цьому більше молекул інтеркалятора може зв'язатися з позитивно надспіралізованою ДНК.

ЗАДАЧІ

6.1. Вільна енергія взаємодії деякого ліганду з ДНК становить -9 ккал/моль при температурі 27°C . Розрахуйте вільну енергію зв'язування та константу зв'язування, вважаючи розчин ідеальним.

6.2. Залежність константи зв'язування деякого ліганду з ДНК від концентрації солі при температурі 27°C підпорядкована емпіричному рівнянню

$$\lg K = 4,34 - 4,41 \lg[\text{NaCl}].$$

Розрахуйте кількість електростатичних контактів між ДНК і лігандом, вільну енергію зв'язування у 100 мМ NaCl у ккал/моль, а також електростатичний і неелектростатичний внески в цю вільну енергію.

6.3. Для ліганду з попередньої задачі отримано емпіричну залежність константи зв'язування від температури у 100 мМ NaCl:

$$\ln K = 11,7 + 2500/T.$$

Розрахуйте ентальпію та ентропію зв'язування у 100 мМ NaCl при 27°C , а також зміну теплоємності при зв'язуванні. Користуючись розв'язком попередньої задачі, розрахуйте електростатичну та неелектростатичну складові ентропії зв'язування.

6.4. Константа зв'язування K деякого ліганду у 100 мМ NaCl залежить від температури таким чином:

Температура ($^\circ\text{C}$)	K (M^{-1})
7	$1,5 \cdot 10^{11}$
14	$2,2 \cdot 10^{11}$
20	$3,7 \cdot 10^{11}$
24	$4,1 \cdot 10^{11}$
28	$1,5 \cdot 10^{11}$
37	$1,0 \cdot 10^{11}$
41	$2,4 \cdot 10^{10}$

Побудуйте графік Вант-Гоффа. Що можна сказати про зміну теплоємності при зв'язуванні? Зробіть нелінійну підгонку рівняння (6.5) під емпіричну залежність, узявши реперну температуру при 27°C , тобто знайдіть значення константи, зміни теплоємності та ентальпії зв'язування за цієї температури. Розрахуйте ентропію

зв'язування за реперної температури. Якщо нахил залежності константи зв'язування від концентрації солі при температурі 27°C дорівнює -4.41 , розрахуйте електростатичний і неелектростатичний внески у вільну енергію зв'язування у 100 мМ NaCl, а також електростатичну та неелектростатичну складові ентропії зв'язування.

6.5. Користуючись наведеними в тексті поясненнями, отримайте вираз (6.8) для вільної енергії на одну пару основ як функції щільності зв'язування. Знайдіть похідну від вільної енергії за щільністю зв'язування та отримайте умову рівноваги (6.9).

6.6. Вирішіть систему рівнянь (6.11) відносно чотирьох умовних імовірностей.

6.7. Спростіть рівняння (6.13) для випадків $\omega = 1$ та $\omega = 0$.

6.8. ДНК у загальній концентрації 9,9 мкг/мл титрується лігандом. Залежність частки зв'язаного ліганду θ від його загальної молярної концентрації C виглядає так:

C (M)	θ
$4 \cdot 10^{-7}$	0,71
$9 \cdot 10^{-7}$	0,66
$1,2 \cdot 10^{-6}$	0,63
$2,3 \cdot 10^{-6}$	0,52
$6 \cdot 10^{-6}$	0,29
$1,3 \cdot 10^{-5}$	0,16

Побудуйте графік Скетчарда (молекулярну вагу нуклеотиду візьміть за 330) і здійсніть нелінійну підгонку рівн. (6.9) під отриманий графік, знайдіть значення константи зв'язування та розміру сайту зв'язування у парах основ.

6.9. Користуючись наведеними в тексті поясненнями, отримайте вираз (6.16) для ізотерми зв'язування інтеркалятора з циркулярною ДНК. Розрахуйте графіки Скетчарда для зв'язування бромистого етидію з лінійною ДНК і двома циркулярними зі щільностями надспіралізації $-0,05$ та $+0,03$. Візьміть значення константи зв'язування $K = 10^5 \text{ M}^{-1}$, розміру сайту $n = 2,5$ пар основ, спіральної періодичності ДНК $\gamma = 10,5$ пар основ/виток, кута розкручування $\phi_E = 25^\circ$, силової константи надспіралізації $K_{sc} = 1000$.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Загальна

Кантор, Ч. Биофизическая химия, Т. 3 / Ч. Кантор, П. Шиммел. – М. : Мир, 1984.

Ізотерми зв'язування лігандів з ДНК

Заседателев, А. С. Теория одномерной адсорбции. Адсорбция малых молекул на гомополимере / А. С. Заседателев, Г. В. Гурский, М. В. Волькенштейн // Мол. биология. – 1971. – Т. 5. – С. 245–490.

Bujalowski, W. On the cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice: the generalized three-state lattice model / W. Bujalowski, T. M. Lohman, C. F. Anderson // Biopolymers – 1989. – Vol. 28. – P. 1637–1643.

Crothers, D. M. Calculation of binding isotherms for heterogeneous polymers / D. M. Crothers // Biopolymers. – 1968. – Vol. 6. – P. 575–584.

Epstein, I. R. Cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a finite one-dimensional lattice. A model for ligand oligonucleotide interactions / I. R. Epstein // Biophys. Chem. – 1978. – Vol. 8. – P. 327–339.

Kowalczykowski, S. C. The cooperative and noncooperative binding of protein ligands to nucleic acid lattices: experimental approaches to the determination of thermodynamic parameters / S. C. Kowalczykowski, L. S. Paul, N. Lonberg [et al.] // Biochemistry. – 1986. – Vol. 25. – P. 1226–1240.

McGhee, J. D. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice / J. D. McGhee, P. H. von Hippel // J. Mol. Biol. – 1974. – Vol. 86. – P. 469–489.

Schwarz, G. Linear cooperative binding of large ligands involving mutual exclusion of different binding modes / G. Schwarz, S. Stankowski // Biophys. Chem. – 1979. – Vol. 10. – P. 173–181.

Tsodikov, O. V. Analytic binding isotherms describing competitive interactions of a protein ligand with specific and nonspecific sites on the same DNA oligomer / O. V. Tsodikov, J. A. Holbrook, I. A. Shkel [et al.] // Biophys. J. – 2001. – Vol. 81. – P. 1960–1969.

Вплив лігандів на стабільність ДНК

Crothers, D. M. Statistical thermodynamics of nucleic acid melting transitions with coupled binding equilibria / D. M. Crothers // Biopolymers – 1971. – Vol. 10. – P. 2147–2160.

Lazurkin, Y. S. Melting of DNA: its study and application as a research method / Y. S. Lazurkin, M. D. Frank-Kamenetskii, E. N. Trifonov // *Biopolymers*. – 1970. – 9. – P. 1253–1306.

McGhee, J. D., Theoretical calculations of the helix-coil transition of DNA in the presence of large, cooperatively binding ligands / J. D. McGhee, P. H. von Hippel // *Biopolymers* – 1976. – Vol. 15. – P. 1345–1375.

Гідратація ДНК

Arai, S. Complicated water orientations in the minor groove of the B-DNA decamer d(CCATTAATGG)₂ observed by neutron diffraction measurements / S. Arai, T. Chatake, T. Ohhara [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2005. – Vol. 33. – P. 3017–3024.

Berman, H. M., Schneider, B. Nucleic acid hydration / H. M. Berman, B. Schneider // *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure* (Ed. S. Neidle). – NY : Oxford University Press, 1999. – P. 295–310.

Bonvin, A. M. J. J. Water molecules in DNA recognition. II. A molecular dynamics view of the structure and hydration of the Trp operator / A. M. J. J. Bonvin, M. Sunnerhagen, G. Otting [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1998. – Vol. 282. – P. 859–873.

Denisov, V. P. Sequence-specific binding of counterions to B-DNA / V. P. Denisov, B. Halle // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 2000. – Vol. 97. – P. 629–633.

Drew, H. R. Structure of a B-DNA dodecamer. III. Geometry of hydration / H. R. Drew, R. E. Dickerson // *J. Mol. Biol.* – 1981. – Vol. 151. – P. 535–556.

Falk, M. Hydration of deoxyribonucleic acid. II. An infrared study / M. Falk, K. A. Hartman, R. C. Lord // *J. Am. Chem. Soc.* – 1963. – Vol. 85. – P. 387–391.

Jayaram, B. The role of water in protein-DNA recognition / B. Jayaram, T. Jain // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2004. – Vol. 33. – P. 343–361.

Shui, X. The B-DNA dodecamer at high resolution reveals a spine of water on sodium / X. Shui, L. McFail-Isom, G. G. Hu [et al.] // *Biochemistry*. – 1998. – Vol. 37. – P. 8341–8355.

Halle, B. Water and monovalent ions in the minor groove of B-DNA oligonucleotides as seen by NMR / B. Halle, V. P. Denisov // *Biopolymers*. – 1998. – Vol. 48. – P. 210–233.

Liepinsh, E. NMR observation of individual molecules of hydration water bound to DNA duplexes: direct evidence for a spine of hydration water present in aqueous solution / E. Liepinsh, G. Otting, K. Wuthrich // *Nucl. Acids Res.* – 1992. – Vol. 20. – P. 6549–6553.

Pal, S. K. Site- and sequence-selective ultrafast hydration of DNA / S. K. Pal, L. Zhao, T. Xia [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2003. – Vol. 100. – P. 13746–13751.

Pal, S. K. Water at DNA surfaces: Ultrafast dynamics in minor groove recognition / S. K. Pal, L. Zhao, A. H. Zewail // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2003. – Vol. 100. – P. 8113–8118.

Saenger, W. DNA conformation is determined by economics in the hydration of phosphate groups / W. Saenger, W. N. Hunter, O. Kennard // Nature. – 1986. – Vol. 324. – P. 385–388.

Westhof, E. Water: an integral part of nucleic acid structure / E. Westhof // Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. – 1988. – Vol. 17. – P. 125–144.

Взаємодія олігокатіонів з ДНК

Andresen, K. Mono- and trivalent ions around DNA: a small-angle scattering study of competition and interactions / K. Andresen, X. Qiu, S. A. Pabit [et al.] // Biophys. J. – 2008. – Vol. 95. – P. 287–295.

Braunlin, W. H. NMR studies of cation binding environments on nucleic acids / W. H. Braunlin // Advances in Biophysical Chemistry / ed. A.D. Bush. – Greenwich, CT : JAI Press, 1995. – Vol. 5.

Braunlin, W. H. Competitive interaction of $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ and Na^+ with helical B-DNA probed by ^{59}Co and ^{23}Na NMR / W. H. Braunlin, C. F. Anderson, M. T. Record // Biochemistry – 1987. – Vol. 26. – P. 7724–7731.

Braunlin, W. H. Equilibrium dialysis studies of polyamine binding to DNA / W.H. Braunlin, T. J. Strick, M. T. Record // Biopolymers – 1982. – Vol. 21. – P. 1301–1314.

Eichhorn, G. L. Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity / G. L. Eichhorn, Y. A. Shin // J. Am. Chem. Soc. – 1968. – Vol. 90. – P. 7323–7328.

Lohman, T. M. Pentalysine-deoxyribonucleic acid interaction: a model for the general effect of ion concentration on the interaction of proteins with nucleic acids / T. M. Lohman, P. L. de Haseth, M. T. Record // Biochemistry. – 1980. – Vol. 19. – P. 3522–3530.

Morfin, I. Adsorption of divalent cations on DNA / I. Morfin, F. Horkay, P. J. Basser [et al.] // Biophys. J. – 2004. – Vol. 87. – P. 2897–2904.

Padmanabhan, S. Binding of cationic (+4) alanine- and glycine-containing oligopeptides to double-stranded DNA: thermodynamic analysis of effects of coulombic interactions and α -helix induction / S. Padmanabhan, W. Zhang, M.W. Capp [et al.] // Biochemistry – 1997. – Vol. 36. – P. 5193–5206.

**Взаємодія лігандів
з маленьким жолобком**

Alemán, C. Toward an understanding of the drug-DNA recognition mechanism. Hydrogen-bond strength in netropsin-DNA complexes / C. Alemán, M. C. Vega, L. Tabernero [et al.] // *J. Phys. Chem.* – 1996. – Vol. 100. – P. 11480–11487.

Chaires, J. B. Drug-DNA interactions / J. B. Chaires // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1998. – Vol. 8. – P. 314–320.

Deng, H. Structural basis of polyamine-DNA recognition: spermidine and spermine interactions with genomic B-DNAs of different GC content probed by Raman spectroscopy / H. Deng, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2000. – Vol. 28. – P. 3379–3385.

Dolenc, J. Molecular dynamics simulations and free energy calculations of netropsin and distamycin binding to an AAAAA DNA binding site / J. Dolenc, C. Oostenbrink, J. Koller [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2005. – Vol. 33. – P. 725–733.

Kopka, M. L. The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin / M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell [et al.] // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1985. – Vol. 82. – P. 1376–1380.

Korolev, N. On the competition between water, sodium ions, and spermine in binding to DNA: A molecular dynamics computer simulation study / N. Korolev, A. P. Lyubartsev, A. Laaksonen [et al.] // *Biophys. J.* – 2002. – Vol. 82. – P. 2860–2875.

Lah, J. Binding of distamycin A and netropsin to the 12mer DNA duplexes containing mixed AT-GC sequences with at most five or three successive AT base pairs / J. Lah, G. Vesnaver // *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 39. – P. 9317–9326.

Neidle, S. Crystallographic insights into DNA minor groove recognition by drugs / S. Neidle // *Biopolymers.* – 1997. – Vol. 44. – P. 105–121.

Ren, J. Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands / J. Ren, J. B. Chaires // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38. – P. 16067–16075.

Tabernero, L. Hydrogen bond geometry in DNA-minor groove binding drug complexes / L. Tabernero, J. Bella, C. Alemán // *Nucl. Acids Res.* – 1996. – Vol. 24. – P. 3458–3466.

Zimmer, C. Nonintercalating DNA binding ligands: Specificity of the interaction and their use as tools in the biophysical biochemical and biological investigations of the genetic material / C. Zimmer, U. Wähnert // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 1986. – Vol. 47. – P. 31–112.

Інтеркаляція

Bauer, W. Interaction of closed circular DNA with intercalative dyes II. The free energy of superhelix formation in SV40 DNA / W. Bauer, J. Vinograd // *J. Mol. Biol.* – 1970. – Vol. 47. – P. 419–435.

Coury, J. E. A novel assay for drug-DNA binding mode, affinity, and exclusion number: scanning force microscopy / J. E. Coury, L. McFail-Isom, L. D. Williams [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – Vol. 93. – P. 12283–12286.

Dougherty, G. Spectroscopic analysis of drug-nucleic acid interactions / G. Dougherty, W. J. Pigram // CRC Crit. Rev. Biochem. – 1982. – Vol. 12. – P. 103–132.

Goodisman, J. Site-specific binding constants for actinomycin D on DNA determined from footprinting studies / J. Goodisman, R. Rehfus, B. Ward [et al.] // Biochemistry. – 1992. – Vol. 31. – P. 1046–1058.

Hsieh, T. Thermodynamic properties of superhelical DNAs / T. Hsieh, J. C. Wang // Biochemistry. – 1975. – Vol. 14. – P. 527–535.

Lee, J. S. A rapid method for the measurement of the unwinding angle of intercalating agents and the superhelix density of circular DNAs / J. S. Lee, A. R. Morgan // Nucl. Acids Res. – 1978. – Vol. 5. – P. 2425–2439.

Li, H. J. Relaxation studies of the proflavine-DNA complex: the kinetics of an intercalation reaction / H. J. Li, D. M. Crothers // J. Mol. Biol. – 1969. – Vol. 39. – P. 461–477.

Liu, L. F. On the degree of unwinding of the DNA helix by ethidium. II. Studies by electron microscopy / L. F. Liu, J. C. Wang // Biochim. Biophys. Acta. – 1975. – Vol. 395. – P. 401–412.

Müller, W. Studies of the binding of actinomycin and related compounds to DNA / W. Müller, D. M. Crothers // J. Mol. Biol. – 1968. – Vol. 35. – P. 251–290.

Müller, W. Interaction of heteroaromatic compounds with nucleic acids. 1. The influence of heteroatoms and polarizability on the base specificity of intercalating ligands / W. Müller, D. M. Crothers // Eur. J. Biochem. – 1975. – Vol. 54. – P. 267–277.

Neidle, S. Structural and sequence dependent aspects of drug intercalation into nucleic acids / S. Neidle, Z. Abraham // CRC Crit. Rev. Biochem. – 1984. – Vol. 17. – P. 73–121.

Sivolob, A. Nucleosome dynamics II. High flexibility of nucleosome entering and exiting DNAs to positive crossing. An ethidium bromide fluorescence study of mononucleosomes on DNA minicircles / A. Sivolob, F. de Lucia, B. Révet [et al.] // J. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 285. – P. 1081–1099.

Sivolob, A. Nucleosome dynamics V. Ethidium bromide versus histone tails in modulating ethidium bromide-driven tetrasome chiral transition. A fluorescence study of tetrasome on DNA minicircles / A. Sivolob, A. Prunell // J. Mol. Biol. – 2000. – Vol. 295. – P. 41–53.

Wang, A. H. J. Interactions between antitumor drugs and DNA / J.C. Wang // Nucleic Acids Mol. Biol. – 1987. – Vol. 1. – P. 53–69.

Wang, J. C. The degree of unwinding of DNA helix by ethidium. I. Titration of twisted PM2 DNA molecules in alkaline cesium chloride density gradients / J. C. Wang // J. Mol. Biol. – 1974. – Vol. 89. – P. 783–801.

Розділ 7

ВЗАЄМОДІЇ ДНК З БІЛКАМИ

ДНК у живих системах постійно взаємодіє з великою кількістю різноманітних білків, які визначають її структурний і функціональний стан. Базові закономірності міжмолекулярних взаємодій за участю ДНК, розглянуті в попередньому розділі, зберігаються також і для білків, хоча зрозуміло, що білково-нуклеїнові взаємодії складніші й мають певні особливості. Серед ДНК-зв'язувальних білків є неспецифічні щодо послідовності пар основ і такі, що ефективно розпізнають конкретні елементи послідовності. За своїм функціональним значенням їх можна поділити на три основні групи: структурні білки, які визначають певну просторову організацію як усієї ДНК у клітинах, так і окремих її ділянок під час виконання різноманітних функціональних операцій; найбільша й найрізноманітніша група – фактори транскрипції, від яких залежить регуляція експресії генетичної інформації; ферменти, що здійснюють хімічні перетворення ДНК і зв'язаних з нею білків, забезпечують синтез ДНК під час реплікації, транскрипцію тощо.

7.1. ЗАГАЛЬНІ ПРИНЦИПИ СТРУКТУРНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ БІЛКІВ

Детальний розгляд такої великої теми, як структура білків виходить за рамки цієї книги – нижче наведено лише загальні відомості з даного питання, повнішу інформацію можна знайти в книгах, указаних у списку рекомендованої літератури.

Хімічні формули амінокислот – мономерних одиниць молекули білка – представлено на рис. 7.1. Усього у складі білків зустрічається 20 амінокислот (у дужках – загальноприйняті скорочення, три- та однолітерні): аланін (Ala, A), аргінін (Arg, R), аспарагін (Asn, N), аспарагінова кислота (Asp, D), валін (Val, V), гістидин (His, H), гліцин (Gly, G), глутамін (Gln, Q), глутамінова кислота (Glu, E), ізолейцин (Ile, I), лейцин (Leu, L), лізин (Lys, K), метіонін (Met, M), пролін (Pro, P), серин (Ser, S), тирозин (Tyr, Y), треонін (Thr, T), триптофан (Trp, W), фенілаланін (Phe, F), цистеїн (Cys, C). Стандартним для всіх амінокислот угрупованням, що забезпечує утворення полімерної молекули білка, є аміно- та карбоксильна групи, приєднані до спільного атома карбону (C^{α} -атом) (рис. 7.1). Розрізняються амінокислоти за типом бокового (амінокислотного) залишку.

За здатністю взаємодіяти з водою амінокислотні залишки поділяють на дві групи: полярні та неполярні (гідрофобні). Три гідрофобні залишки Gly, Ala, Pro – маленького розміру, тому, оскільки гідрофобний ефект залежить від розміру поверхні

(підпідрозд. 2.1.6), їх можна вважати "нейтральними" щодо спорідненості до води. Полярні амінокислоти тому так і називаються, що прагнуть взаємодіяти з водою за рахунок водневих зв'язків (містять донорні й акцепторні групи). Серед них є залишки, які мають постійний заряд при pH 7,0: негативний у Asp і Glu (за рахунок карбоксильних груп у складі бокового залишку), позитивний у Lys (аміногрупа) та Arg (гуанідинова група). His також може набувати позитивного заряду в структурі білка в певному мікрооточенні (у розчині він іонізується при pH < 6,5).

У глобулярних водорозчинних білках співвідношення між гідрофобними й полярними залишками становить у середньому 50 : 50. Унаслідок гідрофобного ефекту неполярні залишки прагнуть опинитися всередині структури білка, полярні залишаються на поверхні, зберігаючи взаємодії з водою. Це і є головна рушійна сила, яка змушує білковий ланцюг укладатися певним чином у просторі, формуючи компакту глобулярну структуру.

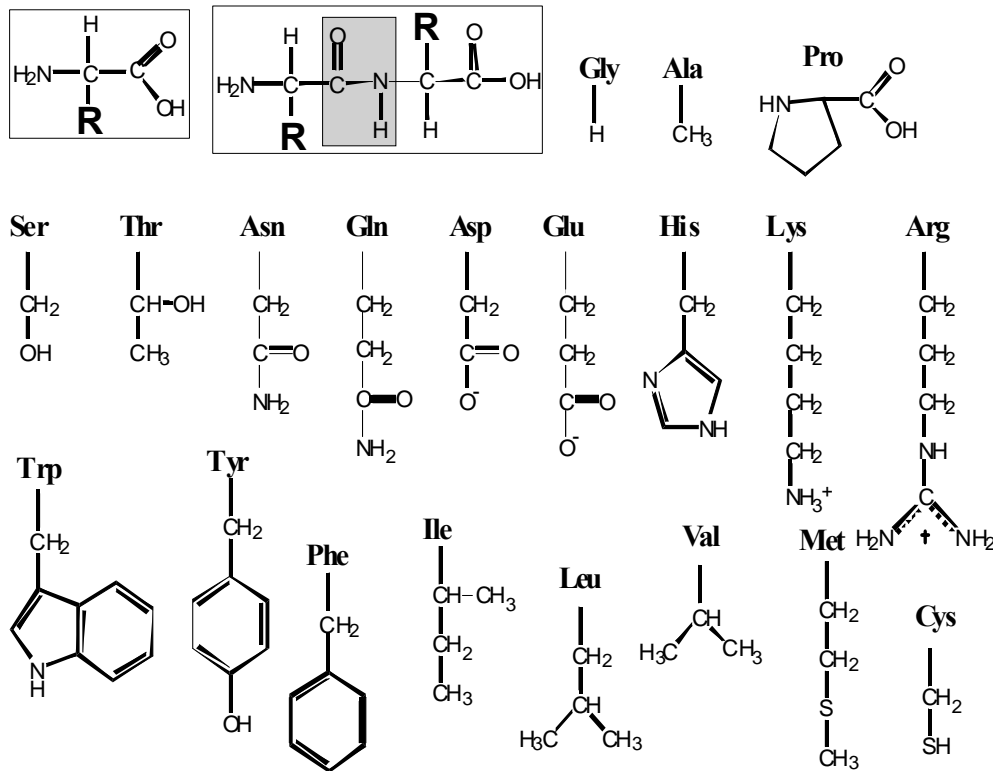


Рис. 7.1. Бокові залишки амінокислот у стані іонізації, який вони мають при pH 7,0 (повну структурну формулу наведено тільки для імінокислоти Pro).

Верхній ряд – маленькі аліфатичні залишки, які можна вважати нейтральними щодо спорідненості до води; середній ряд – полярні залишки; нижній – гідрофобні.

На вставках: узагальнена формула амінокислоти (R – боковий залишок) і дипептид (виділено пептидну групу)

У складі полімерного ланцюга карбоксильна група однієї амінокислоти та аміногрупа іншої, втрачаючи молекулу води, утворюють ковалентний пептидний зв'язок, група атомів ОС–NH називається пептидною (рис. 7.1). Кінець поліпептидного ланцюга, де залишається аміногрупа, називається N-кінцем, протилежний (карбоксильна група) – C-кінцем. Остов поліпептидного ланцюга (пептидні групи та C^α-атоми, що чергуються), від якого відгалужуються полярні й неполярні бокові залишки, є полярним, оскільки кожна пептидна група виступає одночасно донором і акцептором водневих зв'язків.

Локальну конформацію амінокислотного ланцюга називають вторинною структурою білка. Певна частина (іноді значна) ланцюга знаходиться в нерегулярній конформації. Але в глобулярних білках завжди зустрічаються також регулярні конформації, стабілізовані водневими зв'язками між пептидними групами. У білках в основному представлено всього два типи таких конформацій – α -спіраль (α -helix) і β -структура (β -structure).

Перша з цих конформацій являє собою праву спіраль (3,6 амінокислотного залишку на виток), стабілізовану водневими зв'язками між оксигеном пептидної групи кожного i -го залишку (акцептор) і NH-групи залишку $i + 4$ (донор). По три донорні й акцепторні угруповання залишаються ненасиченими водневими зв'язками на кінцях спіралі. Оскільки оксиген відтягує на себе електронну щільність (набуває парціального негативного заряду), а щільність гідрогену відтягнута азотом у складі NH-групи, три ненасичені зв'язками NH-групи на N-кінці спіралі та три C = O групи на C-кінці створюють позитивний і негативний заряди відповідно. Інакше кажучи, α -спіраль являє собою диполь із парціальними зарядами на кінцях $\sim \pm 1/2$ елементарного заряду.

α -Спіраль можна приблизно уявити як циліндр діаметром $\approx 10 \text{ \AA}$, на поверхні якого розташовані амінокислотні залишки (рис. 7.2). У глобулярних білках спостерігається закономірність: гідрофобні амінокислотні залишки згруповані на поверхні спіралі у більш-менш суцільний гідрофобний кластер. Така закономірність пояснюється тим, що внаслідок конкуренції з молекулами води водневі зв'язки між пептидними групами, а отже і спіраль, у водному оточенні не є дуже стабільними. Адже утворення спіралі потребує енергетичних витрат – зниження ентропії за рахунок обмеження конформаційної свободи. А водневі зв'язки у присутності води (тобто заміна зв'язку між пептидною групою та водою на зв'язок між пептидними групами) не здатні суттєво компенсувати ці витрати (підпдрозд. 2.1.5). Якщо ж на поверхні спіралі є гідрофобний кластер, він прагне адсорбувати іншу гідрофобну поверхню (спіралі чи інших елементів вторинної структури). Тоді частина пептидних груп і водневих зв'язків між ними опиняється в неполярному оточенні, що суттєво стабілізує і ці зв'язки, і α -спіраль. У результаті в глобулі залишаються лише α -спіралі з гідрофобним кластером на поверхні.

Інший тип регулярної вторинної структури, який часто зустрічається в білках – β -структура, що складається з витягнутих фрагментів поліпептидного ланцюга: кілька таких фрагментів – β -тяжів (β -strands) – утворюють β -структурний

шар, у площині якого розташовані водневі зв'язки між пептидними групами тяжів, а від обох поверхонь відходять амінокислотні залишки (рис. 7.2). β -Шар може бути антипаралельним (сусідні тяжі спрямовані у протилежних один до одного напрямках, як на рис. 7.2) або паралельним (якщо тяжі не йдуть один за одним по ланцюгу). Сусідні по ланцюгу амінокислотні залишки розташовані по різні боки β -структурного шару. І знову спостерігається вже зрозуміла закономірність: принаймні одна поверхня шару є переважно гідрофобною.

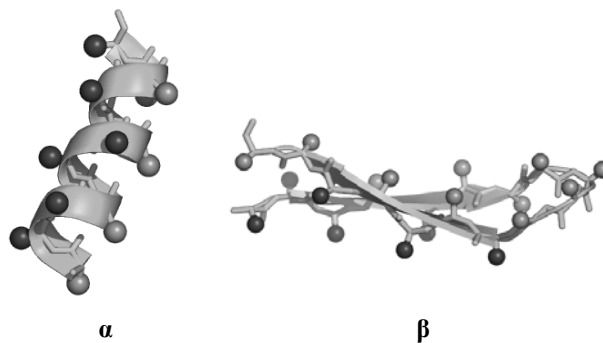


Рис. 7.2. α -Спіраль і елемент β -структури – антипаралельна β -шпилька. Бокові залишки показано схематично у вигляді кульок, різне забарвлення символізує два типи залишків – полярні та неполярні

Поліпептидний ланцюг глобулярного білка довжиною 50–150 (максимально 250) амінокислотних залишків укладається в єдину щільну *глобулу* розміром 25–40 Å. Усередині такої глобули формується гідрофобне ядро з неполярних залишків, закрановане від води полярною поверхнею глобули. Довші ланцюги утворюють кілька субглобул із власним гідрофобним ядром кожна – структурних *доменів*. Різні варіанти зображення просторової структури білка наведено на рис. 6, кольор. вст. На частинах (б) і (в) добре видно щільне гідрофобне ядро всередині глобули.

Каркас глобули *завжди* складається з ділянок регулярної вторинної структури (α -спіралей та/або β -структурних шарів), гідрофобні поверхні яких, взаємодіючи між собою, утворюють гідрофобне ядро. Причина цього правила полягає в тому, що разом із неполярними амінокислотними залишками, які прагнуть зануритися всередину глобули внаслідок гідрофобного ефекту, у неполярному оточенні мають опинитись *полярні* пептидні групи остова. Втрата їхніх водневих зв'язків із молекулами води потребує дуже великих енергетичних затрат, тому насичення пептидних груп водневими зв'язками в складі регулярної вторинної структури є необхідною передумовою утворення всередині глобули гідрофобного ядра. Петлі та перемички між ділянками вторинної структури знаходяться в нерегулярній конформації і залишаються на поверхні глобули, їхні пептидні групи при цьому зберігають контакт із водою. Таким

чином, роль водневих зв'язків між пептидними групами у формуванні глобули є цілком аналогічною до ролі водневих зв'язків між азотистими основами в утворенні подвійної спіралі (див. підпідрозд. 2.2.4).

З викладеного випливає, що головною рушійною силою формування глобулярної структури є гідрофобні взаємодії. Але для здійснення певних функцій білок повинен мати дуже стабільну просторову структуру, яку гідрофобні взаємодії не можуть забезпечити: для їхньої реалізації достатньо просто витіснити воду з інтерфейсу між гідрофобними поверхнями. При цьому поверхні, тобто сегменти вторинної структури, яким вони належать, будуть зберігати певну свободу руху. Першим етапом у процесі вкладання просторової структури білка є одночасне й досить швидке утворення вторинної структури та "злипання" сегментів вторинної структури за рахунок гідрофобних взаємодій. На другому етапі реалізується щільна упаковка глобули за рахунок вандерваальсових взаємодій – точна взаємна підгонка амінокислотних залишків з утворенням численних контактів між ними, без порожнин усередині глобули. Результатом є тверде тіло – нативна глобула.

Твердість є найхарактернішою та найважливішою ознакою білка, вона забезпечує наявність стабільної специфічної робочої поверхні, яка й виконує певну функцію. Решта молекули – лише каркас, який утримує цю робочу поверхню. Твердість забезпечує також надійність роботи білка, дозволяє уникнути розмивання специфічності. Адже молекула білка поводить себе як тверде тіло при зміні умов: вона витримує зовнішні зміни до певних меж, не змінюючись сама, а за цими межами руйнується кооперативно – за принципом "усе або нічого" (див. підрозд. 2.4).

Слід зауважити, що далеко не всі водорозчинні білки мають упорядковану просторову структуру. Досить велика кількість білків (до 40 % у клітинах еукаріотів) не утворюють за фізіологічних умов жорсткої третинної структури, залишаючись неупорядкованими (неструктурованими), до 70 % білків мають у своєму складі окремі неупорядковані ділянки. Такі неструктуровані білки (*intrinsically disordered proteins*) або окремі ділянки глобулярних білків, часто розташовані на кінцях поліпептидного ланцюга, є збідненими на гідрофобні амінокислоти, що й робить неупорядкований стан енергетично вигіднішим. Загальною рисою неструктурованих білків є їхня здатність взаємодіяти з багатьма партнерами, що дозволяє їм слугувати своєрідними платформами для збірки мультимолекулярних комплексів. Часто зв'язування з іншими білками чи нуклеїновими кислотами приводить до утворення певної просторової структури, яка стабілізується взаємодіями з іншою макромолекулою. Утворення такої структури, у свою чергу, приводить до формування робочої поверхні, яка має спорідненість до наступної макромолекули: неструктурований білок (що стає структурованим унаслідок міжмолекулярних взаємодій) спрацьовує як своєрідний перемикач, необхідний для формування мультимолекулярного комплексу, задіяного до певного регуляторного акту.

Молекула білка, яка має впорядковану просторову структуру, зазвичай перебуває під дією теплового руху як частин власної молекули, так і оточуючих її молекул. В основі конформаційної рухливості білка лежить взаємний зсув великих структурних блоків (субодиниць, доменів або елементів вторинної структури) за рахунок невеликих локальних деформацій. Невеличкі конформаційні зміни можуть викликати тимчасові взаємні зсуви ділянок вторинної структури. Але якщо ці структурні блоки залучені до формування спільного (і щільного) гідрофобного ядра, взаємодія між ними швидко відновить вихідну конформацію (у випадку, коли немає додаткових факторів, що можуть порушити баланс вільної енергії). Іноді відбуваються також локальні перебудови вторинної структури в різних структурних станах білка – руйнування або утворення спіралей тощо. Найрадикальнішою структурною зміною є утворення просторової структури у згаданих неструктурованих білках при їхній взаємодії з іншими молекулами. Зрозуміло, що структурні перебудови змінюють форму робочої поверхні молекули, тобто впливають на виконання білком своїх функцій.

Перемикання стабільних структурних станів молекули білка здійснюється зазвичай завдяки використанню певного ліганду (як такий може виступати органічна низькомолекулярна сполука, іон, інший білок – залежно від конкретної системи). Якщо, наприклад, ліганд має спорідненість до однієї з двох структурних форм і не має такої спорідненості до іншої, то тим самим він зсуває конформаційну рівновагу на користь першої форми.

7.2. СТРУКТУРНА КЛАСИФІКАЦІЯ БІЛКІВ, ЩО ВЗАЄМОДІЮТЬ З ДНК

За своєю структурою ДНК-зв'язувальні білки надзвичайно різноманітні, але при цьому більшість структурних елементів, які безпосередньо взаємодіють із ДНК, можна поділити на досить обмежену кількість стандартних типів – ДНК-зв'язувальних структурних мотивів.

7.2.1. Взаємодія білків з великим жолобком

Великий жолобок є елементом поверхні подвійної спіралі, який найчастіше використовується для взаємодії з білками. Структурним елементом білків, який здійснює цю взаємодію, найчастіше виступає α -спіраль. Причина полягає в майже точній просторовій відповідності між двома елементами – можна сказати, що α -спіраль є просторово комплементарною до великого жолобка.

Одним із найпоширеніших структурних мотивів, які здійснюють взаємодію між α -спіраллю та великим жолобком, є **мотив НТН** (Helix-Turn-Helix, спіраль-поворот-спіраль), приклад якого наведено на рис. 7, кольор. вст. Мотив складається з двох α -спіралей, часто приблизно перпендикулярних одна до одної, з'єднаних короткою перемичкою. Одна з цих спіралей (та, що впізнає певну послідовність) виконує роль "читаючої головки", взаємодіючи з азотистими основами у великому жолобку подвійної спіралі. Орієнтація цієї спіралі відносно ДНК може варіювати для різних білків, від приблизно перпендикулярної відносно осі подвійної спіралі до паралельної цукрофосфатному остову. Друга α -спіраль може утворювати допоміжні контакти з цукрофосфатним остовом.

Двоспіральний НТН-мотив утримується в структурі того чи іншого структурного домену, часто у складі α -спірального пучка з 4–6 спіралей (рис. 7 і 8, кольор. вст.). Часто білки, що містять НТН-мотив, взаємодіють з ДНК у вигляді гомодимеру (дві однакові субодиниці) – це особливо характерно для прокариотичних факторів транскрипції. Тоді дві однакові "читаючі головки" впізнають дві однакові послідовності, які симетрично розташовані в сайті взаємодії.

Інші приклади НТН-мотивів у складі ДНК-зв'язувальних білків проілюстровано на рис. 8, кольор. вст. Серед них: *гомеодомен*, у складі якого довга α -спіраль укладається у великий жолобок; домен *ets* – приклад досить поширеного особливого варіанта НТН-мотиву "*НТН із крильцем*" (winged НТН), роль крильця відіграє невеличкий β -структурний шар і петля, що здійснює додаткові контакти з ДНК (до цього ж класу належить і ДНК-зв'язувальний глобулярний домен гістону H5, який зображено на рис. 6, кольор. вст.); гомодимерний прокариотичний фактор транскрипції – активатор катаболізму (CAP – Catabolite Activator Protein). Спорідненість CAP до свого специфічного сайту залежить від ліганду – cAMP (циклічного АМР). Зв'язування cAMP індукує структурні зміни в молекулі білка, унаслідок чого він набуває здатності впізнавати специфічну послідовність.

Як демонструє структура, яку наведено на рис. 8, кольор. вст., при взаємодії гомодимеру CAP зі специфічним сайтом відбувається досить значна деформація – вигин ДНК у бік білка (подвійна спіраль "огортає" білок). Два різкі вигини в бік великого жолобка (значне позитивне значення кута рола, див. підпрозд. 1.2.2 та підпрозд. 1.4) у місці взаємодії з НТН-мотивами, розділені приблизно одним витком подвійної спіралі, роблять головний внесок у зазначену деформацію (рис. 7.3). Практично в цих місцях, у другому динуклеотидному кроці специфічного консенсусу послідовності TGTGA, реалізуються кінки (kink – різкий злам подвійної спіралі) на $\sim 40^\circ$ кожний. Додатковий вигин спостерігається між двома кінками – на $\sim 10^\circ$ у маленькому жолобку (негативне значення рола). Сумарний вигин ДНК у сайті взаємодії із CAP становить $\sim 90^\circ$.

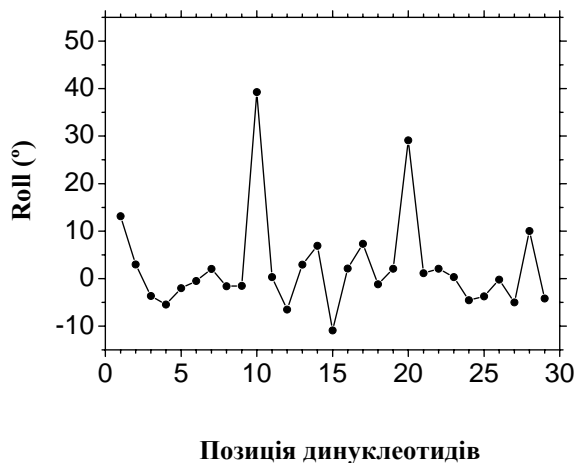


Рис. 7.3. Варіації кута рола вздовж послідовності ДНК, яка взаємодіє із CAP (зі структури на рис. 8, кольор. вст.)

Іншим поширеним класом білкових мотивів, які взаємодіють з великим жолобком ДНК, є **Zn-координуючі мотиви**. Це дуже невеликі структурні елементи, які складаються з обмеженої, недостатньої для формування жорсткої глобули, кількості сегментів вторинної структури. Іон цинку надає жорсткості такому мотиву, утворюючи координаційні зв'язки з чотирма амінокислотними залишками, частіше Cys або His. Чотири такі зв'язки створюють жорсткий каркас, який утримує білкову поверхню, що має взаємодіяти з ДНК. Один зі структурних мотивів такого типу – **цинковий палець** ($\beta\beta\alpha$ Zn finger, рис. 9, кольор. вст.). Він має дуже просту будову: одна α -спіраль і маленький β -шар із двох β -ділянок; одна з них та α -спіраль містять залишки, що утворюють координаційні зв'язки з Zn. Як правило, кілька таких пальців (три на рис. 9, кольор. вст.), з'єднані перемичкою, спіралью огортають великий жолобок (взаємодіючим елементом є знову α -спіраль). Перемичка між пальцями є конформаційно лабільною у складі вільного білка, у комплексі з ДНК вона взаємодіє з α -спіраллю попереднього пальця, фіксуючи структуру білка в комплексі. Сайт зв'язування для кожного пальця має довжину лише 3 пари основ, але кожен додатковий палець (їхня кількість варіює для різних білків) підвищує спорідненість (а також і рівень специфічності) у ~ 1000 разів.

До родини Zn-координуючих мотивів належить велика кількість різноманітних типів структур. Зокрема, мотив **спіраль-лист-спіраль** (helix-sheet-helix) – β -структурний шар із 3–5 β -ділянок, фланкований двома α -спіралями. Інший приклад – ДНК зв'язувальний домен **гормонового рецептора** (рис. 9, кольор. вст.). Ці рецептори – еукаріотичні фактори транскрипції, здебільшого гомодимери, які набувають спорідненості до певних елементів послідовності ДНК після зв'язування

стероїдного гормону зі спеціальним гормонозв'язувальним доменом білка. ДНК-зв'язувальний домен має два структурні модулі типу α -спіраль – суміжна нерегулярна петля, кожен із них координує іон Zn через чотири залишки Cys в α -спіралі та петлі. Один модуль бере участь у димеризації, інший – у взаємодії з ДНК шляхом укладання α -спіралі у великий жолобок, петля здійснює додаткові контакти.

Ще один приклад двоспірального Zn-координуючого мотиву стосується родини транскрипційних факторів GAL4. У складі цих білків дві α -спіралі, розділені петлею, координують два іони Zn, одна зі спіралей укладається у великий жолобок. Дві довгі α -спіралі поза Zn-координуючим мотивом забезпечують утворення гомодимеру, формуючи двоспіральну структуру – трохи закручену подвійну спіраль (так званий *coiled coil*), у складі якої дві α -спіралі нахилені одна до одної під кутом $\sim 18^\circ$. Ці дві спіралі взаємодіють своїми торцями з цукрофосфатним остовом з боку маленького жолобка (рис. 9, кольор. вст.). Два Zn-координуючі модулі в складі димеру взаємодіють з однаковими елементами послідовності, розділеними 14 парами основ (розташовані по різні боки подвійної спіралі); вільний простір між сайтами взаємодії є доступним для інших факторів транскрипції.

Поширеним мотивом, який взаємодіє з великим жолобком ДНК за рахунок α -спіралей, є *лейциновий зіпер* (Leu zipper, bZip). Він являє собою дві довгі α -спіралі, що належать різним поліпептидним ланцюгам (може бути гомо- або гетеродимер, який складається з гомологічних субодиниць). Кожну спіраль можна розділити на дві частини. Одна частина обох спіралей здійснює димеризацію – за рахунок гідрофобних взаємодій між неполярними амінокислотними залишками (часто Leu, звідки назва мотиву) утворюється *coiled coil*. Друга частина кожної α -спіралі, збагачена позитивно зарядженими залишками, взаємодіє з великим жолобком ДНК (рис. 10, кольор. вст.). Слід зауважити, що ця друга частина набуває α -спіральної конформації лише в комплексі з ДНК.

Варіацією лейцинового зіпера є мотив *HLH – спіраль-петля-спіраль* (Helix-Loop-Helix) – різниця в тому, що кожна довга α -спіраль розділена на дві коротші, з'єднані петлею: одна пара спіралей формує *coiled coil*, інша – взаємодіє з ДНК; при цьому всі чотири спіралі об'єднані своїми кінцями в α -спіральний пучок за рахунок гідрофобних взаємодій (рис. 10, кольор. вст.).

В усіх наведених прикладах взаємодіючим елементом є α -спіраль, але це не означає, що *тільки* вона використовується для взаємодії білків з великим жолобком ДНК. У цей жолобок добре вкладається також β -шар із двох β -ділянок – саме такий шар є взаємодіючим елементом, зокрема для білків типу метіонінового репресора (рис. 11, кольор. вст.).

Численний клас еукаріотичних білків становить родину імуноглобулін-подібних транскрипційних факторів (структура є подібною до такої константної частини імуноглобулінів), які здійснюють взаємодії перемичок між ділянками β -структури з великим жолобком і цукрофосфатним остовом (рис. 11, кольор. вст.). Отже, хоча α -спіраль використовується частіше, реалізуються і всі інші можливості.

7.2.2. Взаємодія білків з маленьким жолобком

Усе викладене в попередньому підпідрозділі не означає, що білки взаємодіють з ДНК тільки через великий жолобок (хоча через такий – частіше). Так, структурні білки хроматину – корові гістони (див. розд. 8) – взаємодіють з маленьким жолобком перемичками між α -спіралями й торцями спіралей.

На рис. 12, кольор. вст. наведено приклад, який стосується білків НМГА (інша їхня назва НМГ-I/Y) – білків групи високої рухливості (High Mobility Group) типу А (НМГ – історична назва для білків різних структурних класів, мається на увазі рухливість при електрофорезі). Білки НМГА не мають глобулярної структури і є невпорядкованими. Вони містять 3 пентапептидні елементи (Pro-Arg-Gly-Arg-Pro), які називаються **АТ-гаками** (АТ-hook). Такий гак має специфічність до невеликих АТ-збагачених сайтів довжиною 5 пар основ – він добре укладається у звужений маленький жолобок ділянки подвійної спіралі, збагаченої АТ-парами, де набуває витягнутої конформації. Тут спостерігається певна аналогія з антибіотиками, які розглядалися в підрозд. 6.4. Головний внесок у стабілізацію комплексу дають два занурені в жолобок залишки Arg, які утворюють водневі зв'язки з екзоциклічними групами тиміну (див. рис. 12, кольор. вст.). Конформаційна рухливість поліпептидних з'єднань між АТ-гаками дозволяє білку впізнавати різноманітні комбінації АТ-збагачених сайтів, розташованих на різній відстані один від одного. З'єднання використовуються далі як платформи для збирання мультибілкових комплексів (див. підрозд. 7.4.1), що активують/блокують транскрипцію.

Наступні приклади стосуються дуже важливих випадків взаємодії елементів регулярної вторинної структури білків із маленьким жолобком. Оскільки α -спіраль та дволанцюговий β -шар добре укладаються у великий жолобок, це автоматично означає, що в маленькому жолобку їм не вистачає місця. Відповідно, така взаємодія буде можливою тільки за умови суттєвої деформації подвійної спіралі ДНК (розширення жолобка) – ефект, який має важливі функціональні наслідки.

На кольоровій вставці (рис. 13) представлено досить поширений мотив – **НМГ-бокс**, який, зокрема, входить до складу білків НМГВ (ще один клас білків НМГ). Серед НМГ-боксів є як специфічні до певних послідовностей пар основ, так і неспецифічні. L-подібна структура боксу складається з трьох α -спіралей, дві з яких вбудовуються в маленький жолобок, що супроводжується розкрученням подвійної спіралі та вигином на $\sim 80^\circ$ у протилежний щодо білка бік – у великий жолобок. Відповідно, структура подвійної спіралі в комплексі характеризується в середньому позитивним ролом (рис. 13, кольор. вст.). У взаємодії між ДНК і білком беруть участь гідрофобні поверхні двох α -спіралей та деформованого маленького жолобка, при цьому здійснюється часткова інтеркаляція двох гідрофобних залишків (зазвичай Met, Phe або Ile) між парами основ. У складі білка НМГВ бокс фланкований позитивно зарядженою N-кінцевою

невпорядкованою ділянкою (хвостом), яка додатково стабілізує комплекс, електростатично взаємодіючи з ДНК із внутрішнього боку вигину. При цьому асиметрична нейтралізація фосфатів N-кінцевим хвостом сприяє вигинанню подвійної спіралі (підпідрозд. 3.5.2). Слід зауважити, що аналогічні невпорядковані подовження, які роблять додатковий внесок у стабілізацію комплексу (а іноді й у специфічність зв'язування), є досить характерними і часто зустрічаються в ДНК-зв'язувальних білках узагалі. Неспецифічний білок HMGB виконує функцію фактора, що підвищує конформаційну рухливість ДНК у клітині: білки зв'язуються на короткий проміжок часу, індують вигин, після чого дисоціюють і зв'язуються в іншому місці. Результатом є полегшення різноманітних маніпуляцій з ДНК, які потребують деформацій подвійної спіралі: рекомбінація, ремоделювання хроматину (див. розд. 8), зв'язування транскрипційних факторів у зоні тимчасового вигину тощо.

У складі білка **TBP** (TATA-box Binding Protein) – важливого елемента ініціації транскрипції в еукаріотів (див. підпідрозд. 7.4.1) – досить широкий β -шар взаємодіє з маленьким жолобком подвійної спіралі в зоні так званого TATA-боксу – регуляторного елемента послідовності ДНК (рис. 14, кольор. вст.). Наслідком цієї взаємодії також є значна деформація подвійної спіралі (рис. 7.4) з її розкрученням і значним вигином у протилежний від білка бік.

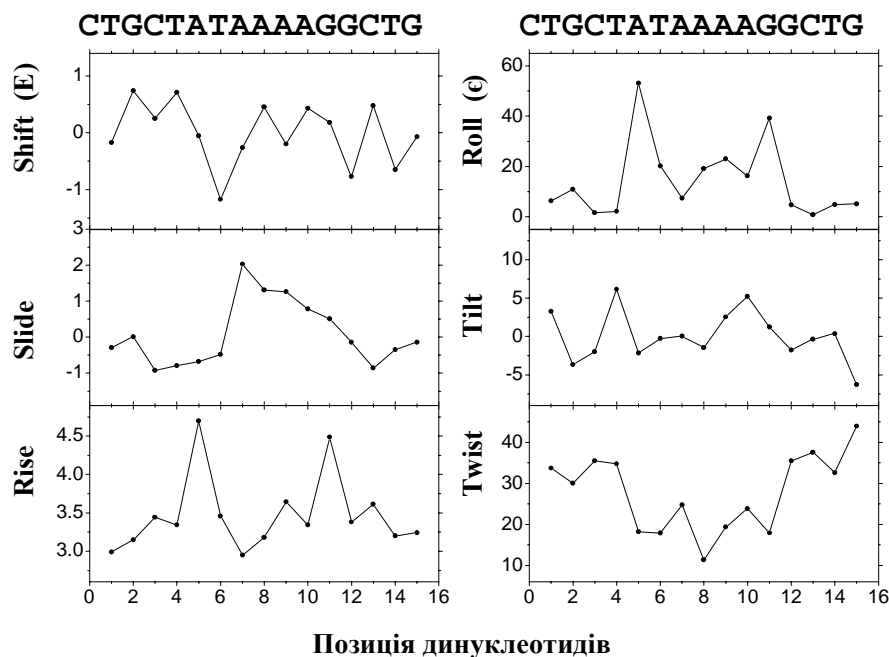


Рис. 7.4. Варіації конформаційних параметрів уздовж ДНК у комплексі з TBP (зі структури на рис. 14, кольор. вст.)

Цей вигин відіграє дуже важливу роль – із його внутрішнього боку збирається преініціаторний комплекс за участю РНК-полімерази й загальних факторів транскрипції. Вигин, що індукується ТВР, як і у випадку НМГ-боксу, підсилюється інтеркаляцією двох гідрофобних амінокислотних залишків (зазвичай Phe) між парами основ (див. рис. 21, кольор. вст.). У місцях інтеркаляції порушуються стекінг-взаємодії та утворюються кінки, які чітко проявляються на рис. 7.4 як точки двох різких підвищень райза та рола в динуклеотидних кроках ТА та АГ на кінцях послідовності ТАТААААГ. На ділянці між кінками відбувається розкручення подвійної спіралі (зниження твіста), яке сприяє експонуванню маленького жолобка до взаємодій з β -шаром.

7.2.3. Ферменти, що взаємодіють з ДНК

На відміну від розглянутих факторів транскрипції та структурних білків, ферменти, що працюють на ДНК, досить важко описати в термінах простих структурних мотивів. Ферменти використовують складні комбінації різноманітних елементів білкової структури для впізнання ДНК і зв'язування з нею. У підрозд. 5.3 вже розглядалися структури деяких ДНК-топоізомераз. Нижче наведено лише кілька прикладів інших ДНК-ферментних комплексів, які ілюструють надзвичайне розмаїття структур та способів взаємодії з ДНК.

На рис. 15, кольор. вст. зображено комплекси з ДНК двох ендонуклеаз – ферментів, що гідролізують фосфодіефірний зв'язок між нуклеотидами всередині полінуклеотидного ланцюга. ДНКаза I зв'язується через маленький жолобок, індукує структурну перебудову подвійної спіралі з розширенням маленького жолобка та здійснює одноланцюговий розріз. Фермент загалом взаємодіє з ДНК неспецифічно, але має певні преференції щодо послідовності – зв'язування зі звуженим маленьким жолобком відбувається важче. Гомодимерна рестриктаза *EcoRV* – ендонуклеаза, що з високою специфічністю спрацьовує тільки на паліндромному елементі послідовності GATATC: дві субодиниці містять два активні центри, кожен з яких робить одноланцюговий розріз, тобто рестриктаза продукує дволанцюговий розріз у рестриктному сайті.

На рис. 16, кольор. вст. показано структуру основної частини – фрагмента Кленова (Hans Klenow) – бактеріальної ДНК-полімерази I під час елонгації синтезу ДНК при реплікації та репарації. Важливий допоміжний β -білок, який утворює так званий ковзний обруч (sliding clamp), демонструє досить незвичайний спосіб взаємодії з ДНК – топологічний. Дві однакові субодиниці обруча, міцно взаємодіючи за принципом "голова до хвоста", утворюють циркулярну

тороподібну структуру з отвором приблизно 35 Å у діаметрі (рис. 16, кольор. вст.). Усередині такого кільця легко розміщується подвійна спіраль ДНК, яка практично не взаємодіє з β-білком (кільце завантажується на ДНК спеціальною системою). Кільце може вільно рухатись уздовж ДНК, але не може дисоціювати. Гідрофобний олігопептидний хвіст ДНК-полімерази взаємодіє з гідрофобним карманом обруча – у результаті формується своєрідний поводок, який допускає певну свободу рухів полімерази, але міцно утримує її на ДНК.

Ще одним важливим елементом системи реплікації є гексамерна ДНК-геліказа (helicase) – молекулярна машина, що забезпечує розплітання подвійної спіралі в основі реплікативної вилки. Комплекс шести однакових субодиниць утворює кільце, всередині якого розміщується один полінуклеотидний ланцюг (рис. 17, кольор. вст.). Уздовж цього ланцюга відбувається транслокація гексамеру, яка приводить до руйнування подвійної спіралі. Шість субодиниць гелікази мають сайти зв'язування АТР, де відбувається його гідроліз. Структурні перебудови білка у відповідь на зв'язування та гідроліз АТР змінюють інтерфейс взаємодії з одноланцюговою ДНК, що й забезпечує транслокацію.

Гексамерні гелікази (кілька структурних надродин) є не єдиним типом цих ферментів. Ще дві надродини геліказ (дещо схожі між собою) мають іншу структурну організацію та реалізують інші механізми дії. Гелікази надродини SF2, як і гексамерні, використовують енергію гідролізу АТР для транслокації. Серед них є суто транслокази (у тому числі Rad54 на рис. 17, кольор. вст.), які пересуваються вздовж ДНК, не руйнуючи подвійну спіраль, – ферменти цього типу є каталітичними субодиницями комплексів ремоделювання хроматину (розд. 8). Транслокація здійснюється за "механізмом гусениці" (inchworm) – два ДНК-зв'язувальні домени (один з яких – АТРазний – показано на рис. 17, кольор. вст.) "крокують" по ДНК унаслідок конформаційних змін білка у відповідь на зв'язування та гідроліз АТР. Інші гелікази цього типу здійснюють таку саму транслокацію вздовж одного ланцюга, руйнуючи дуплекс.

Транслоказами є також і РНК-полімерази – ферменти, що пересуваються вздовж подвійної спіралі, локально руйнуючи її в оточенні свого активного центру і звільняючи таким чином один з ланцюгів, який використовується як матриця для синтезу РНК. Всі РНК-полімерази мають певні спільні риси своєї структурної організації (рис. 18, кольор. вст.): рухливі щелепи, між якими відбувається зв'язування двоспіральної ДНК (у напрямку руху полімерази); глибоко між щелепами розташований каталітичний активний центр, в оточенні якого відбувається локальне плавлення дуплекса; від активного центра на поверхню полімерази йде канал виходу РНК, що синтезується, та вторинний канал, через який до активного центру потрапляють субстрати синтезу – рибонуклеозидтрифосфати.

7.3. ЕНЕРГЕТИКА ВЗАЄМОДІЙ І МЕХАНІЗМИ БІЛКОВО-НУКЛЕЇНОВОГО ВПІЗНАННЯ

7.3.1. Контакти між ДНК і білками

На поверхні ДНК розташовані негативно заряджені фосфатні залишки, дезоксирибози та екзоциклічні групи азотистих основ у жолобках. Саме ці групи і залучаються до контактів з амінокислотними боковими залишками та пептидними групами на поверхні білка. Найважливішими типами контактів є, і це зрозуміло також виходячи із загальних міркувань, електростатичні контакти та водневі зв'язки. Статистичний аналіз білково-нуклеїнових комплексів указує, що половина всіх контактів припадає на водневі зв'язки за участі фосфатів (62 %), основ (25 %) та дезоксирибоз (13 %) Крім того, між білками та ДНК реалізуються численні вандерваальсові та, іноді, гідрофобні взаємодії.

Електростатичні взаємодії реалізуються між негативно зарядженими фосфатами ДНК та позитивно зарядженими за нейтральних рН залишками Arg та Lys у білках. З боку білка в цих взаємодіях може іноді брати участь His, заряджений завдяки білкового мікрооточення, а також позитивно заряджені N-кінцеві торці α -спіралей (підрозд. 7.1). Оскільки йдеться про взаємодію зі стандартним цукрофосфатним остовом, електростатичні взаємодії не можуть бути специфічними щодо послідовності пар основ. Проте, певний опосередкований внесок послідовності не можна повністю виключати – іноді взаємодія фосфатів з позитивними зарядами на поверхні білка може вимагати невеликих змін геометрії розташування фосфатів, тобто змін конформації подвійної спіралі, ефективність яких залежить від послідовності (підрозд. 1.4).

Як обговорювалось у підрозд. 3.5.1 і 6.1.4, головний внесок в енергію електростатичних взаємодій дає зростання ентропії, зумовлене визволенням конденсованих протиіонів. У результаті наявності електростатичної компоненти в енергії зв'язування, спорідненість білка до ДНК має залежати від іонної сили (підрозд. 6.1.4, підрозд. 6.3), а нахил логарифмічної залежності константи зв'язування від концентрації солі відображає кількість електростатичних контактів у комплексі (рівн. (6.6)).

Зрозуміло, що саме електростатичні взаємодії відповідають за неспецифічне зв'язування білків з ДНК. Але, оскільки заряди на фосфатних залишках в інтерфейсі між ДНК та білком, де відсутні протиіони, мають бути нейтралізованими, електростатичні взаємодії присутні практично завжди в білково-нуклеїнових комплексах. Відповідно, білки, що здатні впізнавати з високою спорідненістю певні елементи послідовності, взаємодіють також з меншою спорідненістю та з усіма іншими послідовностями – неспецифічні за рахунок електростатичних взаємодій.

Ілюстрацією сказаного може служити приклад дослідженої Frank *et al.* (1997) взаємодії *lac*-репресора (гомодимерний білок LacI – репресор транскрипції бактеріального лактозного оперона) зі специфічною операторною послідовністю та набором мутантних операторів (кожен відрізняється кількома нуклеотидними замінами) і випадковою неспецифічною послідовністю. Лінійний характер логарифмічної залежності константи зв'язування від іонної сили (рис. 7.5) є типовим і спостерігається для багатьох інших білків – ця залежність, власне, і відображає електростатичний внесок в енергію зв'язування.

Для специфічного оператора нахил залежності на рис. 7.5 дорівнює $-5,3$, що відповідає кількості електростатичних контактів $Z = 6$ (рівн. (6.6)). Саме стільки позитивно заряджених залишків розташовано на поверхні двох ДНК-зв'язувальних доменів гомодимерного репресора в ДНК-білковому інтерфейсі (структуру комплексу представлено на рис. 22, кольор. вст.). Екстраполяція логарифмічної залежності до 1 М вказує на суттєвий внесок від неелектростатичних взаємодій. У результаті в 0,2 М KCl константа має високе, характерне для специфічних білково-нуклеїнових взаємодій, значення $1,5 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$ (відповідне значення стандартної вільної енергії зв'язування за рівн. (6.2) $\Delta G^0 = -15,5$ ккал/моль), причому неелектростатичні взаємодії домінують.

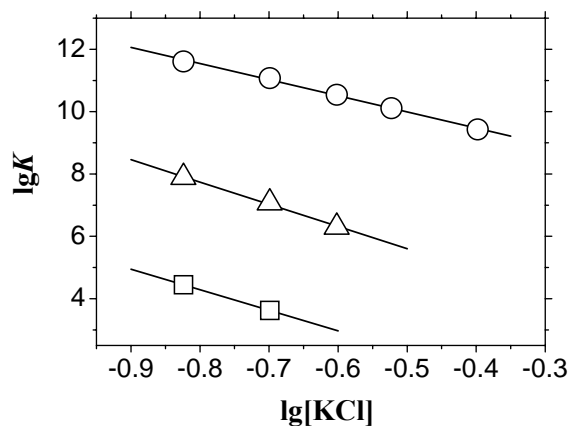


Рис. 7.5. Залежність константи зв'язування *lac*-репресора зі специфічним (○) та одним із мутантних операторів (△) і неспецифічною послідовністю (□) від молярної концентрації KCl при 24 °C (за даними Frank *et al.* (1997))

Нуклеотидні заміни в операторі приводять до зниження абсолютного значення константи зв'язування, а для неспецифічної послідовності вона є нижчою на ~ 7 порядків порівняно зі специфічним оператором (рис. 7.5). Екстра-

поляція залежності константи зв'язування з неспецифічною послідовністю до 1 М КСІ дає значення lgK близьке до нуля – неспецифічні взаємодії зумовлені практично тільки електростатичним внеском. Цікаво, що нахил логарифмічних залежностей константи від іонної сили для мутантних операторів та неспецифічної послідовності є трошки більшим порівняно зі специфічним оператором (рис. 7.5), що вказує на деяке зростання електростатичного внеску за рахунок появи 1–2 нових електростатичних контактів у неспецифічних комплексах. Це може бути пов'язане з різницею структури як ДНК, так і білка у специфічних та неспецифічних комплексах (див. рис. 22, кольор. вст.): у специфічному комплексі або 1–2 фосфати можуть відводитись від контактів з позитивними зарядами на поверхні білка, або позитивно заряджені залишки білка – від контактів з фосфатами.

Водневі зв'язки утворюються між донорними та акцепторними групами, з одного боку, амінокислотних залишків і поліпептидного остова, з іншого – цукрофосфатного остова й азотистих основ у жолобках. Оскільки водневі зв'язки потребують чіткої взаємної орієнтації донора та акцептора (підпідрозд. 2.1.5), то саме вони зазвичай відіграють роль головного фактору специфічного впізнання.

Кожна послідовність пар основ утворює у жолобках подвійної спіралі власний патерн донорних та акцепторних груп (рис. 19, кольор. вст., див. також рис. 1.9), який і може впізнаватися поверхнею білка – білкові донорні та акцепторні групи здійснюють "пряме зчитування" (direct readout) нуклеотидної послідовності. Цей патерн є більш варіабельним у великому жолобку, де легше розрізнити пари основ та динуклеотидні кроки – і це ще одна причина, за якої саме великий жолобок частіше використовується для впізнання. Наприклад, динуклеотидні кроки AG та TC мають однаковий донорно-акцепторний патерн у маленькому жолобку, але різний – у великому (рис. 19, кольор. вст.).

Водневі зв'язки між амінокислотними залишками та основами дуже різноманітні (деякі приклади представлено на рис. 20, кольор. вст.). При цьому не існує будь-якого коду впізнання – чіткої відповідності між амінокислотними залишками та парами основ. Певні закономірності (своєрідний код, коли залишок певного типу в певному місці утворює зв'язок з певною основою) спостерігаються тільки в межах однієї родини структурних мотивів, але і тоді такі закономірності не носять абсолютного характеру.

Деякі амінокислотні залишки здатні утворювати два водневі зв'язки з азотистою основою, наприклад, Arg з гуаніном або Gln та Asn з аденіном (рис. 20, кольор. вст.). Зрозуміло, що така взаємодія є більш міцною та специфічною порівняно з одним водневим зв'язком. Однак Arg, Gln та Asn утворюють однократні водневі зв'язки й з усіма іншими основами. Чи буде певний залишок залученим до утворення водневого зв'язку, і з якою основою чи фосфатом, залежить

від орієнтації цього залишку на поверхні білка та груп на поверхні ДНК. Таким чином, головний фактор утворення системи водневих зв'язків у інтерфейсі між ДНК і білком – структурна відповідність (комплементарність) між двома взаємодіючими поверхнями.

Слід зауважити, що більша частина водневих зв'язків між ДНК та білками (до 75 %) формується за участі фосфатів та дезоксирибоз. Такі водневі зв'язки часто відповідають за додаткові (неспецифічні або зі зниженою специфічністю) взаємодії, що стабілізують комплекс.

Особливий тип водневих зв'язків, який досить часто зустрічається в білково-нуклеїнових комплексах, – зв'язки, опосередковані молекулами води. Окремі молекули води можуть не звільнитися з гідратного шару, що оточує білки та ДНК (підрозд. 6.2), а залишатися в інтерфейсі, виконуючи роль біфункціональної зшивки – утворюючи водневі зв'язки з білковими групами та фосфатами або групами азотистих основ.

Гідрофобні взаємодії не є, як правило, визначальними в стабілізації білково-нуклеїнових комплексів: поверхні подвійної спіралі та молекули білка є в основному полярними. Деякий внесок у стабілізацію можуть давати гідрофобні контакти між неполярними групами білка та метильною групою тиміну у великому жолобку (рис. 19, кольор. вст.), але, зважаючи на маленький розмір метильної групи, цей внесок не може бути суттєвим.

Проте за умови істотної деформації подвійної спіралі з частковим експонуванням гідрофобних поверхонь азотистих основ, яка має місце при взаємодіях регулярних вторинних структур білка з маленьким жолобком (підпідрозд. 7.2.2), гідрофобні взаємодії можуть стати важливим фактором. Такі випадки спостерігаються при інтеркаляції гідрофобних залишків між парами основ у комплексах з ДНК, зокрема, НМГ-боксу та ТВР – приклад інтеркаляції залишку фенілаланіну ТВР, який утворює міцний стекінг з аденіном, представлено на рис. 21, кольор. вст.

7.3.2. Термодинаміка зв'язування білків і роль води в білково-нуклеїнових взаємодіях

Як було зауважено в попередньому підпідрозділі, молекули води можуть слугувати біфункціональними зшивками між поверхнями ДНК і білка, але цим роль води в білково-нуклеїнових взаємодіях не вичерпується. Слід відмітити ще принаймні два важливі аспекти.

По-перше, вода може залишатися в інтерфейсі між ДНК і білком, утворюючи водневий зв'язок тільки з одним із взаємодіючих партнерів. В основному йдеться про взаємодію молекул води з акцепторами на поверхні ДНК і білків. Таку воду

можна розглядати як буфер (або своєрідне "мастило"), що знижує електростатичне відштовхування між частково негативно зарядженими акцепторними групами. Проте значна частина молекул води звільняється з гідратних шарів ДНК та білків при утворенні комплексу. Отже, по-друге, і це, як правило, є більш суттєвим, визволення молекул води з інтерфейсу дає енергетично вигідний ентропійний внесок в енергію зв'язування. З енергетичної точки зору, визволення води супроводжується зростанням ентропії та зниженням ентальпії системи за рахунок руйнування водневих зв'язків води з поверхнею, останній внесок домінує. Але якщо водневі зв'язки відновлюються в інтерфейсі, вже між білком та ДНК, залишається тільки вигідний ентропійний ефект.

Аналіз термодинаміки зв'язування для досліджених у цьому аспекті білково-нуклеїнових комплексів вказує, що найбільш суттєвим ентропійний ефект звільнення води є для білків (а також для маленьких лігандів, розглянутих у підрозд. 6.4), які взаємодіють із маленьким жолобком. І це є цілком очікуваним, оскільки саме в АТ-збагаченому маленькому жолобку міститься найбільш упорядкована вода (підрозд. 6.2), а білки, що зв'язуються з маленьким жолобком, зазвичай мають підвищену спорідненість саме до АТ-збагачених ділянок.

Термодинамічні параметри зв'язування за 20°C у 100 мМ солі демонструють важливі відмінності між великим та маленьким жолобком як мішенями для білків (рис. 7.6). Специфічне зв'язування білків із великим жолобком є в основному ентальпійним (негативне значення ΔH^0 на рис. 7.6), хоча зазвичай присутня також і помітна ентропійна компонента. При цьому основна складова цієї ентропійної компоненти – електростатичні ефекти визволення протионів (див. визначення відповідних внесків наприкінці підрозд. 6.1.4), неелектростатична складова ентропії зв'язування близька до нуля. Отже, зв'язування з великим жолобком зазвичай зумовлене неспецифічними електростатичними взаємодіями та специфічними ентальпійно вигідними взаємодіями, насамперед – водневими зв'язками між ДНК і білком.

На відміну від великого жолобка, маленький жолобок характеризується загалом позитивною зміною ентальпії при зв'язуванні з білком (рис. 7.6). Певний внесок у таку не вигідну зміну ентальпії може давати (і дає) деформація ДНК у комплексі, але позитивним значенням ΔH^0 характеризуються також комплекси з маленьким жолобком, в яких не відбувається суттєвих деформацій (наприклад, АТ-гак). Разом із тим, деформації відбуваються і при взаємодії з великим жолобком, хоча для зв'язування з великим жолобком ентальпія залишається зазвичай негативною. Єдине інше джерело для підвищення ентальпії при взаємодії з маленьким жолобком – втрата водневих зв'язків води з поверхнею жолобка. При цьому зниження ентальпії за рахунок утворення зв'язків між ДНК і білком виявляється недостатнім для компенсації такої втрати, і сумарна ентальпія зв'язування залишається позитивною (у середньому, для конкретних білків спостерігаються варіації).

Проте взаємодія з маленьким жолобком супроводжується великим зростанням ентропії, причому значна її частина – неелектростатичної природи (рис. 7.6). Велика неелектростатична компонента ентропії зв'язування з маленьким жолобком може мати тільки одне походження – від звільнення води з інтерфейсу взаємодії. У результаті сумарна зміна вільної енергії є приблизно такою самою, що й при взаємодіях з великим жолобком – ентропійні зміни з лихвою компенсують не вигідне підвищення ентальпії.

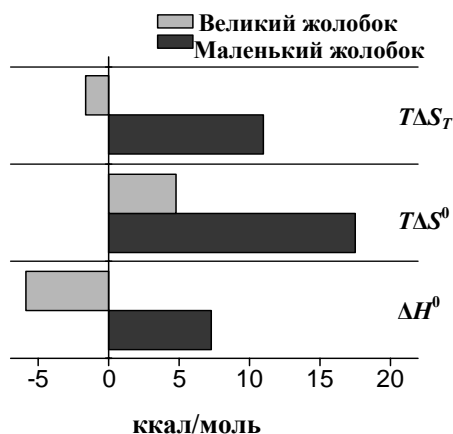


Рис. 7.6. Усереднені внески від ентальпії ΔH^0 , ентропії $T\Delta S^0$ та неелектростатичної складової ентропії $T\Delta S_T$ у стандартну вільну енергію зв'язування білків з великим і маленьким жолобками при 20 °C у 100 мМ солі (за результатами Privalov *et al.*, 2007)

Досі говорилося про воду, зв'язану з полярними поверхнями ДНК і білків. У наступному підпідрозділі розглядатиметься інший тип структурованої води – біля гідрофобних залишків, – який також опосередковано впливає на білково-нуклеїнові взаємодії.

7.3.3. Термодинаміка зв'язування та структурні перебудови білків при специфічних взаємодіях із ДНК

Деформації подвійної спіралі різного ступеня, як вже згадувалось багато разів, часто спостерігаються при утворенні білково-нуклеїнових комплексів. Проте структурні зміни в білках є також досить загальним правилом, особливо це стосується специфічних взаємодій.

Прикладом може слугувати *lac*-репресор, структуру якого в комплексах із ДНК представлено на рис. 22, кольор. вст. ДНК-зв'язувальні домени гомодимеру репресора відносяться до класу НТН і взаємодіють через великий жолобок з будь-якою послідовністю неспецифічно. При взаємодії з оператором НТН-мотиви впізнають специфічні елементи послідовності у великому жолобку та відбувається реструктурування білка з утворенням двох нових α -спіралей, які взаємодіють з маленьким жолобком. Це приводить також до суттєвого вигину ДНК у сайті взаємодії.

Як обговорювалось у підпідрозд. 7.3.1, специфічна взаємодія приводить до зниження кількості електростатичних контактів між ДНК та білком, що детектується по деякому зниженню нахилу логарифмічної залежності константи зв'язування від іонної сили. В тому ж дослідженні була проаналізована залежність константи від температури (рис. 7.7). Графік Вант-Гоффа для константи зв'язування зі специфічним оператором є нелінійним, що відразу вказує на ненульову зміну теплоємності при утворенні комплексу (підпідрозд. 6.1.3). Графік описується рівн. (6.5), яке припускає незалежність від температури зміни теплоємності ΔC_p , сама ця зміна (різниця теплоємності між комплексом та вільними компонентами) оцінюється як $\Delta C_p = -1,5$ ккал/моль·град, а $\Delta H_0^0 = -11$ ккал/моль при 297°K. Взаємодія з мутантними операторами характеризується зменшенням значення ΔC_p за абсолютною величиною (приблизно в два рази для мутантної послідовності на рис. 7.7). При взаємодії з неспецифічною послідовністю графік Вант-Гоффа стає практично лінійним ($\Delta C_p \approx 0$), більше того – нахил графіка є дуже маленьким, тобто ентальпія зв'язування наближається до нуля, що характерно для суто електростатичних взаємодій.

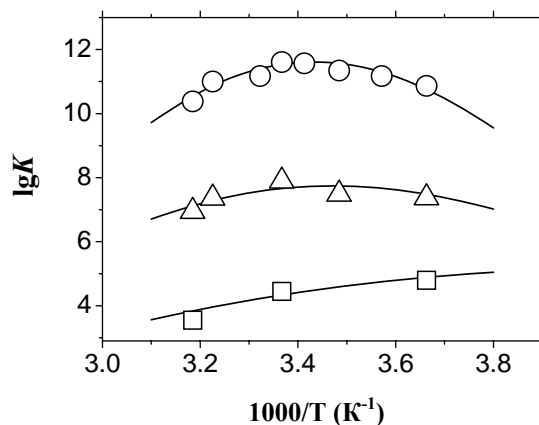


Рис. 7.7. Залежність константи зв'язування *lac*-репресора зі специфічним (○) та одним із мутантних операторів (Δ) і неспецифічною послідовністю (□) від температури в 0,15 М КСІ (за даними Frank *et al.*, 1997)

Отримане для специфічного зв'язування негативне значення ΔC_p є чіткою ознакою структурних перебудов, які супроводжуються зниженням експонування гідрофобних груп до води. Підвищене, порівняно зі звичайною рідкою водою, позитивне значення теплоємності є характерним для кригоподібних кластерів впорядкованої води навкруг гідрофобних груп (підпідрозд. 2.1.6). Занурення таких груп та їх екранування від води приводить, відповідно, до відносного зниження теплоємності. Зрозуміло, що йдеться про гідрофобні групи білка та саме його структурні перебудови. Отже можна сказати, що *lac*-репресор є дещо недо-структурованим, поки не знаходиться у комплексі зі специфічним оператором – взаємодія з оператором викликає утворення остаточної просторової структури білка із зануренням частини гідрофобних груп у неполярне оточення, а білок при цьому індукує зміни структури подвійної спіралі. Одночасно відбувається підведення взаємодіючих груп ДНК та білка у такі просторові позиції, що найкраще сприяють утворенню міцних контактів.

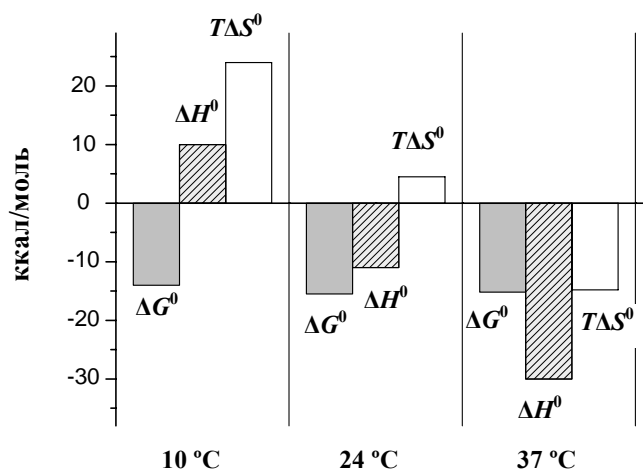


Рис. 7.8. Значення стандартних вільних енергій ΔG^0 , ентальпій ΔH^0 та ентропійних внесків у вільну енергію $T\Delta S^0$ зв'язування *lac*-репресора зі специфічним оператором при трьох температурах у 0,15 М КСІ (за даними Frank *et al.*, 1997)

Така досить складна картина специфічної взаємодії приводить і до складного характеру залежності термодинамічних параметрів зв'язування від температури. Розрахунок за рівн. (6.5) з використанням наведених вище значень ΔC_p та ΔH_0^0 дозволяє отримати значення цих параметрів за будь-якої температури (рис. 7.8).

За низьких температур (коли нахил графіка Вант-Гоффа на рис. 7.7 є негативним) $\Delta H^0 > 0$ – взаємодія є ентальпійно не вигідною (поглинається тепло при утворенні комплексу), і зв'язування відбувається за рахунок ентропійних внесків. Вигідні ентропійні внески обумовлені електростатичними взаємодіями та визволенням води – як з інтерфейсу між ДНК та білком, так і від гідрофобних груп білка. Позитивна ентальпія відображає великий не вигідний внесок від руйнування водневих зв'язків, у тому числі – зв'язків у кластерах води біля гідрофобних груп. Підвищення температури приводить до зниження позитивних ентропійних внесків, а за високих температур ентропія зв'язування стає не вигідною. Ентальпійний внесок, навпаки, стає негативним та зростає за абсолютною величиною: напевно, водневі зв'язки між молекулами води у кластерах руйнуються (кластер плавиться), і внесок від утворення міцних водневих зв'язків між ДНК та білком превалує. Загалом така термодинамічна поведінка вказує на суттєвий внесок від зміни гідрофобних взаємодій у складі білка (порівн. рис. 2.5) у загальну вільну енергію зв'язування. Цікаво, що при цьому сумарна вільна енергія зв'язування зберігає велике негативне значення і практично не залежить від температури в зазначеному на рис. 7.8 діапазоні – у зоні максимуму графіка Вант-Гоффа на рис. 7.7.

Зниження теплоємності при специфічному зв'язуванні з ДНК є загальним правилом і спостерігається для багатьох інших білків. Отже, реструктурування білка при взаємодії зі специфічною послідовністю відбувається практично завжди. Деякі приклади вже згадувались у підрозд. 7.2: АТ-гак є повністю неупорядкованим у вільному стані і набуває жорсткої структури у комплексі; лабільні перемички між цинковими пальцями стають жорсткими при взаємодії з ДНК; у складі лейцинового зіпера за умови взаємодії утворюються α -спіралі. На підставі всіх цих фактів можна стверджувати, що певна конформаційна рухливість вільного білка є в багатьох випадках передумовою специфічного зв'язування. Пролілюструємо це положення на прикладі взаємодії з ДНК НМГ-боксів різного типу, що була досліджена групою П. Л. Привалова (Dragan *et al.*, 2004).

Як зазначено в підрозд. 7.2.2, серед НМГ-боксів є неспецифічні щодо послідовності пар основ (бокси у складі білка НМГВ ссавців та його аналогів у інших організмів) та такі, що специфічно впізнають певні послідовності (зокрема, у білках LEF-1, Sox-5, SRY). За результатами диференційної сканувальної калориметрії (див. рис. 2.6) специфічні та неспецифічні бокси радикально різняться ступенем упорядкованості своїх структур у вільному стані: неспецифічні плавляться за механізмом різкого кооперативного переходу, плавлення специфічних відбувається дифузно у більш широкому інтервалі температур; значення теплоємності за низьких температур (до денатурації) є суттєво вищими для специфічних боксів порівняно з неспецифічними. Таким чином, неспецифічні бокси мають жорстку впорядковану структуру, тоді як структура специфічних

є лабільнішою та характеризується експонуванням до води частини гідрофобних груп. У комплексах з ДНК структура неспецифічних боксів суттєво не змінюється, а специфічні набувають жорсткої структури, ступінь кооперативності руйнування якої значно зростає.

За результатами ізотермічної калориметрії, яка дозволяє безпосередньо вимірювати тепловий ефект зв'язування (зміну ентальпії ΔH^0 , див. підпдрозд. 6.1.7), ентальпія зв'язування для специфічних боксів знижується при зростанні температури (рис. 7.9), що вказує на негативне значення ΔC_p . За фізіологічних температур ентальпія зв'язування є негативною, причому більша її частина визначається вигідним тепловим ефектом від реструктурування білка (так само, як і для *lac*-репресора).

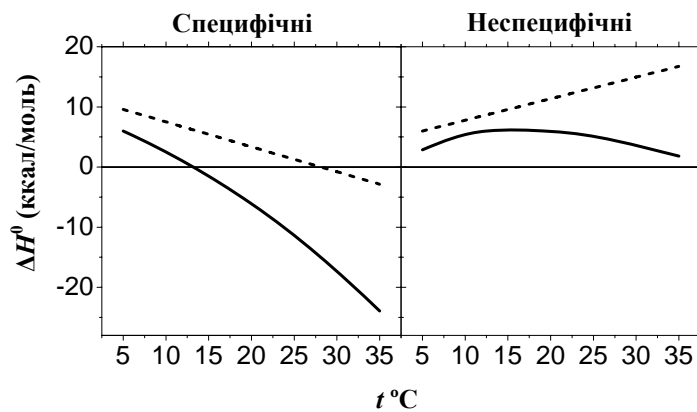


Рис. 7.9. Приблизні усереднені залежності від температури зміни сумарної ентальпії (суцільні криві) і складової цих змін, що визначається тільки взаємодіями з ДНК (пунктирні криві, отримані шляхом віднімання від суцільних кривих ентальпійних внесків, які відображають зміни структури білків), при зв'язуванні з ДНК специфічних і неспецифічних НМГ-боксів. Адаптовано з роботи Dragan *et al.* (2004)

Окрема оцінка зміни ентальпії за рахунок власне взаємодій з ДНК (пунктирна крива на рис. 7.9) вказує, що ця ентальпійна складова також знижується з температурою, але є позитивною у широкому діапазоні температур. Позитивні внески в ентальпію зв'язування відображають значну деформацію ДНК, а також, більшою мірою, визволення води з маленького жолобка, з яким взаємодіють НМГ-бокси (попередній підпдрозділ). Проте, ці внески частково компенсуються негативною зміною від міцних ДНК-білкових взаємодій (вандерваальсових та водневих зв'язків), що виникають у специфічному інтерфейсі між двома молекулами – у результаті сумарне значення ентальпії є меншим, ніж для неспецифічних боксів (див. нижче). Зниження залежної тільки від взаємодій з ДНК складової ентальпії з температурою

свідчить про негативне значення відповідної складової ΔC_p . Напевно, цей факт відображає утворення гідрофобних контактів між ДНК та білком при інтеркаляції неполярних амінокислотних залишків у маленький жолобок (підпідрозд. 7.2.2).

Термодинамічна поведінка зв'язування неспецифічних боксів є суттєво іншою: сумарна ентальпія зв'язування є дещо позитивною та близькою до нуля, ентальпія власне ДНК-білкових взаємодій зростає з температурою ($\Delta C_p > 0$) і є більш позитивною, ніж для специфічних боксів (рис. 7.9). Іншими словами, зв'язування неспецифічних боксів визначається тільки вигідними ентропійними внесками у вільну енергію (які існують також і для специфічних боксів). Позитивна зміна теплоємності є характерною для звільнення гідратної води від полярних поверхонь – зростання ентальпії для неспецифічних боксів визначається звільненням води з маленького жолобка, яке не компенсується достатньо міцними взаємодіями між ДНК та білком.

Отже, специфічна взаємодія відбувається для білків, які мають достатньо лабільну структуру і здатні до перебудов. Білки із жорсткою стабільною структурою, не маючи такого потенціалу конформаційних змін, зв'язуються "як є" з ДНК будь-якої послідовності з порівняно низькою спорідненістю. Лабільні білки, зустрічаючи специфічну послідовність, адаптують свою структуру таким чином, який дозволяє їм реалізувати більшу кількість міцних енергетично вигідних контактів з ДНК.

7.3.4. Механізми білково-нуклеїнового впізнання

Підсумовуючи матеріал цього та попереднього підрозділів, можна сформулювати деякі принципи, які визначають високу специфічність зв'язування білків з певними послідовностями ДНК. Але зупинимось на ще одному питанні, яке досі не обговорювалось: якою має бути ця "певна послідовність" за довжиною, щоб її дійсно можна було вважати специфічною, тобто унікальною? У першому наближенні, сукупні послідовності будь-якого геному можна вважати випадковими. Тобто, поставлене запитання зводиться до наступного: яку мінімальну довжину повинен мати сайт зв'язування, щоб такий самий сайт не повторився випадково в іншому місці? Якщо, з метою спрощення рішення, прийняти зустрічності p всіх чотирьох нуклеотидів однаковими (що приблизно виконується), тобто вважати, що співвідношення АТ- та GC-пар дорівнює 50:50 і $p = 1/4$, то ймовірність зустріти будь-яку конкретну послідовність довжиною n нуклеотидів дорівнює p^n . Кількість таких однакових послідовностей у геномі довжиною N пар основ (тобто $2N$ нуклеотидів) дорівнює $2Np^n$. Отже, мінімальний розмір m унікального сайту (щоб такий сайт зустрічався один раз на геном) визначається рівнянням:

$$2Np^m = 1.$$

Не обов'язково m пар основ мають неодмінно стояти поряд в сайті зв'язування: у послідовності довжиною m можуть бути прогалини, що містять не важливі для впізнання пари. Для геному *Escherichia coli* ($N = 4,6 \cdot 10^6$ пар основ) $m = 11$, для геному людини ($N = 3 \cdot 10^9$ пар основ у гаплоїдному наборі) $m = 16$. Насправді, розмір регуляторних елементів послідовності в еукаріотичних геномах є зазвичай дещо меншим, але вони, як правило, не є унікальними – повторюються в багатьох промоторах.

Зрозуміло, що збільшення довжини сайту зв'язування не тільки знижує імовірність того, що він випадково зустрінеться в іншому місці, але й повинно підвищувати специфічність зв'язування за рахунок збільшення кількості контактів (зв'язків) між ДНК та білком. Наприклад, згадувана у попередніх підпідрозділах операторна послідовність для взаємодії з *lac*-репресором має довжину 20 пар основ (два однакові інвертовані повтори по 10 пар основ для двох мономерів репресора). Можна очікувати, що нуклеотидні заміни, які унеможливають контакт у даній точці сайту, повинні приводити до зниження спорідненості: чим більше замін, тим більше знижується вільна енергія зв'язування за абсолютною величиною. Це дійсно спостерігається, але не завжди таке зниження є пропорційним кількості нуклеотидних замін. Більш важливим є те, що, як указує ретельний термодинамічний аналіз, таке зниження вільної енергії не можна віднести до будь-якої однієї її складової – скажімо, до ентальпії зв'язування, яка, як можна очікувати виходячи з простих механізмів, має бути пропорційною кількості водневих зв'язків.

Отже, чим визначається висока специфічність зв'язування? На перший погляд, тут відсутні будь-які чіткі правила. Розглянуті у підрозд. 7.2 структурні мотиви ДНК-зв'язувальних білків є різними еволюційними рішеннями для специфічної взаємодії з тією чи іншою послідовністю: існує багато шляхів для того, щоб сформувати білкову поверхню для впізнання послідовності пар основ. При цьому не існує і будь-якого коду впізнання пар основ амінокислотними залишками. Міцні та стабільні контакти між ДНК та білком (особливе значення мають водневі зв'язки) виникають за умови чіткої відповідності взаємних орієнтацій хімічних груп на двох поверхнях, що взаємодіють. Але це зовсім не означає, що білкова поверхня просто "читає" той чи інший нуклеотидний текст шляхом взаємодії з одним із жолобків подвійної спіралі – загальновідома аналогія "ключ-замок" тут не працює.

Розгляд структур білково-нуклеїнових комплексів і термодинаміки їхнього утворення приводить до висновку, що **головною умовою реалізації міцних контактів між ДНК та білком є взаємна підгонка структури взаємодіючих елементів унаслідок відповідних конформаційних перетворень**. Інакше кажучи, відомий механізм індукованої відповідності (induced fit), запропонований для взаємодії білків з лігандами Кошландом (Daniel Koshland), може бути застосований

і для білково-нуклеїнових взаємодій. За механізмом Кошланда можна описати, наприклад, процес відбору РНК-полімеразою тільки одного з чотирьох нуклеозидтрифосфатів – того, що відповідає нуклеотиду матриці, уданий момент присутньому в активному центрі. У "відкритій" структурній формі ферменту активний центр має невисоку спорідненість до всіх чотирьох нуклеозидтрифосфатів (завдяки чому є можливим швидкий перебір варіантів) і не здатен каталізувати хімічне перетворення. Якщо нарешті зв'язується нуклеозидтрифосфат, що відповідає даному нуклеотиду матриці, утворюється комплементарна пара, котра спрацьовує як специфічний ліганд – індукує перетворення ферменту в "закриту" форму. Закрита форма жорстко фіксує субстрати – і каталітичний центр спрацьовує.

Аналогічно, для специфічного ДНК-зв'язувального білка існує велика кількість різноманітних елементів послідовності, серед яких один має бути впізнаним. Усі ці елементи є неспецифічними лігандами для білка – він зв'язується з ними з порівняно невеликою спорідненістю (перебір варіантів). Коли нарешті з'являється потрібна послідовність, вона викликає структурні перебудови білка, тобто спрацьовує як специфічний ліганд.

На відміну від взаємодії білків з простими лігандами, білок, у свою чергу, є лігандом для подвійної спіралі: шляхом певних конформаційних змін дуплекса (вигини спіралі, зміни твіста тощо) змінюється розмір жолобків, хімічні групи "підводяться" під водневі зв'язки, електростатичні та вандерваальсові контакти, збільшується загальна поверхня, що може взаємодіяти з білком. Інакше кажучи, для ефективного впізнання необхідна певна конформація подвійної спіралі та певні зміни цієї конформації. І те, й інше визначається послідовністю пар основ (підрозд. 1.4). Деформації подвійної спіралі, які відбуваються при утворенні комплексу з білком коштують енергетичних витрат – дають несприятливий позитивний внесок у вільну енергію зв'язування. Чим менший цей внесок (чим краще указана послідовність адаптована до конкретних конформаційних змін), тим вище спорідненість. Цей опосередкований шлях, через який послідовність визначає спорідненість до неї білка – "непряме зчитування" послідовності (indirect readout), коли білок сприймає не стільки послідовність як таку, скільки залежні від неї конформаційні особливості, – є не менш важливим, ніж безпосередня відповідність між нуклеотидною послідовністю та амінокислотами на поверхні білка. Таким чином, однією з основ для білково-нуклеїнового впізнання є структурно-динамічний поліморфізм нуклеотидних послідовностей – залежні від послідовності структурні особливості та конформаційна рухливість подвійної спіралі.

Зрозуміло, що енергетичні витрати на деформацію ДНК (а також неспецифічні ентальпійні витрати від дегідратації подвійної спіралі, особливо помітні для маленького жолобка, підрозд. 7.3.2, 7.3.3) компенсуються негативними внесками у вільну енергію зв'язування: неспецифічними ентропійними ефектами

від звільнення протиіонів (електростатичні взаємодії) та води (що знов-таки особливо проявляється для маленького жолобка), а також утворенням специфічних контактів між ДНК та білком, які стають можливими і як наслідок самої наявності певних азотистих основ у певній комбінації, і, що важливіше, у результаті відповідних конформаційних змін подвійної спіралі.

При цьому, повертаючись до ролі ДНК як ліганду, є ще один надзвичайно важливий внесок у вільну енергію зв'язування – від енергетично вигідних структурних перебудов самого білка. Ці перебудови стають вигідними при наявності даної послідовності (індукуються лігандом), оскільки забезпечують підведення певних хімічних груп білка під контакти з ДНК. Щоб такий механізм був ефективним, білок (або його частина, домен чи субдомен) має бути структурно лабільним – існувати у вільному стані у вигляді рівноймовірних конформерів. При взаємодії зі специфічною послідовністю тільки один з них обирається системою, оскільки найкраще відповідає вимогам реалізації максимальної кількості енергетично вигідних взаємодій.

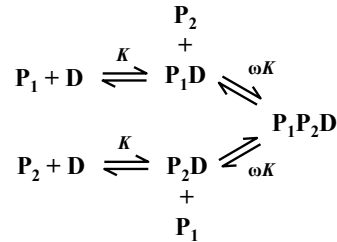
Отже, при впізнанні здійснюється взаємна конформаційна підгонка білка та подвійної спіралі – перефразуючи Кошланда, *mutually induced fit*. Від того, наскільки легко потрібні конформаційні зміни відбуваються при зустрічі конкретного білка з конкретною послідовністю пар основ, залежить ефективність взаємодії. Таким чином, головним механізмом білково-нуклеїнового впізнання є структурно-динамічна комплементарність двох молекул.

7.4. КООПЕРАТИВНІ ЕФЕКТИ В БІЛКОВО-НУКЛЕЇНОВИХ ВЗАЄМОДІЯХ

Як правило, кожен окремий білок зв'язується з ДНК не сам по собі, а залучається до складної мережі міжмолекулярних взаємодій. Якщо розглядати ДНК як матрицю для адсорбції білків, то властивості цієї матриці поступово змінюються по мірі її заповнення і залежать від характеру такого заповнення. Такі кооперативні ефекти, які є дуже характерними для білково-нуклеїнових взаємодій, мають надзвичайно велике біологічне значення. Механізми кооперативності є досить різноманітними, в основному можна виділити три варіанти впливу зв'язування одних білків на спорідненість інших: взаємодія між собою білків, зв'язаних з ДНК поряд один з одним; взаємодія між білками, зв'язаними на відстані; зміна білками властивостей подвійної спіралі, що впливає на спорідненість інших білків.

7.4.1. Кооперативне зв'язування білків з ДНК

Як обговорювалось у підпідрозд. 6.1.6, при неспецифічних взаємодіях з ДНК однотипних лігандів, енергетично вигідні контакти між лігандами сприяють більш ефективному зв'язуванню. Розглянемо аналогічний випадок: молекули двох білків P_1 та P_2 зв'язуються з двома специфічними сайтами поряд один з одним і при цьому взаємодіють між собою. Прийmemo для простоти, що константи зв'язування K між ДНК та білками є однаковими; безрозмірну константу міжбілкової взаємодії позначимо як ω , тобто загальна схема рівноваги має такий вигляд:



де D – ділянка ДНК, що містить два сайти зв'язування, P_1D , P_2D та P_1P_2D – відповідні комплекси. Якщо прийняти концентрації вільних білків однаковими ($[P_1] = [P_2] = L$), то, виходячи з визначення константи зв'язування, концентрації комплексів P_1D та P_2D , в яких зайнято по одному сайту, дорівнюють $KL[D]$, а концентрація комплексу з обома зайнятими сайтами – $\omega K^2 L^2 [D]$. Тоді загальна частка θ зайнятих сайтів обох типів дорівнює відношенню сумарної концентрації зайнятих сайтів до сумарної концентрації зайнятих і вільних сайтів:

$$\theta = \frac{\omega K^2 L^2 + 2KL}{1 + \omega K^2 L^2 + 2KL}$$

Якщо кооперативність відсутня ($\omega = 1$), заповнення обох сайтів дуже повільно залежить від вільної концентрації білків: половина сайтів заповнюється при $KL = 1$, 100 % сайтів – за значно вищих значень вільної концентрації (рис. 7.10).

Як видно з того ж рисунка, ефективність заповнення значно зростає вже при не дуже великих значеннях ω . Слід нагадати, що константа рівноваги залежить від вільної енергії відповідних взаємодій експоненційно (рівн. (2.9)): наприклад, $\omega = 100$ відповідає енергії взаємодій між двома білками всього $-2,7$ ккал/моль ($-4,6$ одиниць $k_B T$).

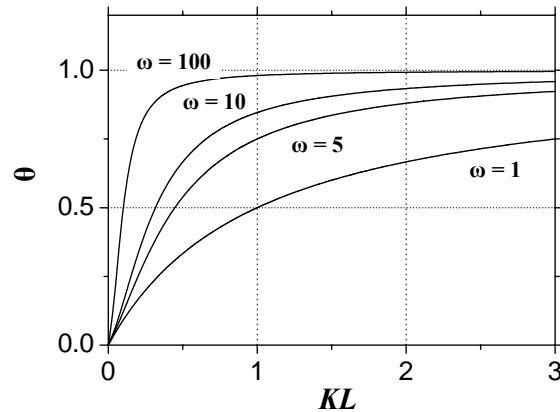


Рис. 7.10. Ізотерми зв'язування для кооперативного заповнення двох сусідніх сайтів (пояснення в тексті)

Отже, навіть енергетично не дуже значні міжбілкові взаємодії суттєво підвищують імовірність зв'язування обох білків із сусідніми елементами послідовності ДНК і навіть тоді, коли ДНК-білкові взаємодії є не надто сильними. Цей принцип дуже широко використовується при зв'язуванні транскрипційних факторів з промоторами (регуляторними зонами, від яких залежить вмикання/вимикання транскрипції на певному гені). Розглянутій вище спрощеній гіпотетичній моделі відповідають численні приклади кооперативного зв'язування транскрипційних факторів, два з яких представлено на рис. 23, кольор. вст., 7.11.

Перший приклад стосується зв'язування так званих *загальних (базальних) факторів транскрипції* – згадуваного в підпідрозд. 7.2.2 білка ТВР (є субодиницею загального фактора транскрипції ТFIID) та фактора ТFIІВ (рис. 23, кольор. вст.). У даному випадку кооперативність забезпечується не тільки контактами між двома білками, а й вигином ДНК, що індукується ТВР (підпідрозд. 7.2.2), у результаті якого полегшується взаємодія двох субдоменів ТFIІВ із внутрішнього боку вигину. Частина білка ТFIІВ, яка не показана на рис. 23, кольор. вст., взаємодіє з РНК-полімеразою II, визначаючи її точну орієнтацію відносно старту транскрипції. Загалом до так званого *преініціаторного комплексу* РНК-полімерази, який збирається із внутрішнього боку вигину, залучаються ще чотири загальні фактори транскрипції (ТFIІА, ТFIІЕ, ТFIІF, ТFIІН).

Збірка преініціаторного комплексу відбувається в зоні старту транскрипції (де можуть міститись загальні регуляторні елементи послідовності, одним із них є згадуваний у підпідрозд. 7.2.2 ТАТА-бокс). Крім того, промотор кожного гена має набір специфічних регуляторних елементів послідовності (так званих *цис-елементів*), які можуть розміщуватись або не дуже далеко від старту, або на значних відстанях. Ділянку, де розміщені *цис-елементи*, від яких залежить активація транскрипції, називають *енхансером* (enhancer). На рис. 7.11 показано

кооперативну взаємодію двох специфічних факторів транскрипції: кожен має порівняно невисоку спорідненість до відповідного елемента послідовності, але коли два *цис*-елементи знаходяться поруч, стабільність потрійного комплексу значно зростає за рахунок додаткових міжбілкових взаємодій.

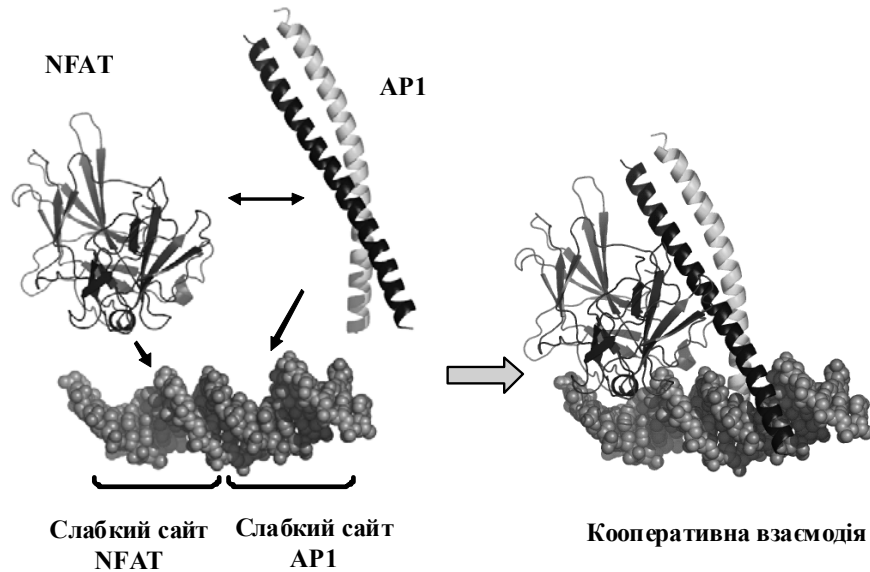


Рис. 7.11. Приклад кооперативної взаємодії двох транскрипційних факторів з ДНК (код PDB 1A02)

Приклад, наведений на рис. 7.11, показує лише один "елементарний акт" кооперативної взаємодії кількох транскрипційних факторів із промотором. Принцип кооперативності тісно пов'язаний із принципом модульної будови еукаріотичних промоторів. Кілька десятків тисяч еукаріотичних генів потребують диференційної активації / репресії в певні моменти залежно від типу клітин, стадії розвитку, зовнішніх умов тощо. Кожен ген не може контролюватися своїм особливим фактором транскрипції: фактор також є продуктом певного гена, який також має контролюватися певним фактором. Принцип модульної будови промоторів є відповіддю на необхідність регулювати окремо активність великої кількості генів лімітованим набором факторів транскрипції. Обмежена (хоча й досить велика) кількість однакових *цис*-елементів – модулів, що мають спорідненість до відповідних факторів транскрипції, – використовується в багатьох промоторах. Однак кожен промотор може мати свій власний набір модулів, який відрізняє його від інших промоторів, тобто кількість комбінацій є практично необмеженою. Відповідно, для активації даного гена потрібен певний набір транскрипційних факторів, які кооперативно взаємодіють із промотором.

При цьому зв'язування відбувається не таким чином, що взаємодіють між собою тільки сусідні транскрипційні фактори (як птахи на дроті). Більшість факторів транскрипції мають у своїй структурі принаймні два домени: той, що взаємодіє з ДНК, та так званий активаційний домен, який використовується для взаємодії з іншими білками. Активаційні домени зв'язують білкові кофактори (коактиватори), у результаті на енхансерах і проксимальних (поблизу від старту транскрипції) елементах ліганду (сукупність яких також часто називають енхансером) формується мультибілковий комплекс зі складною просторовою структурою – *енхансосома* (enhanceosome). До складу енхансосоми часто залучаються різноманітні ферменти (які здійснюють хімічні модифікації та АТР-залежне ремоделювання хроматину (розд. 8)).

Різні елементи енхансосоми діють синергічно, підвищуючи загальну стабільність комплексу. З іншого боку, відсутність кількох елементів може зумовити дестабілізацію та розпад енхансосоми, де спорідненість до ДНК кожного окремого елемента є невисокою. Це забезпечує динамізм активації: енхансосома не є фіксованою, а збирається/розбирається у відповідь на регуляторні сигнали.

Одним із прикладів є енхансосома, що збирається в енхансері гена інтерферону β . У відповідь на вірусну інфекцію здійснюється активація транскрипційного фактора IRF-3 (Interferon Regulatory Factor) шляхом його фосфорилування. У результаті фактор набуває спорідненості до відповідних *цис*-елементів та зв'язується з ними у вигляді гомодимеру, після чого розпочинається збірка енхансосоми (рис. 7.12).

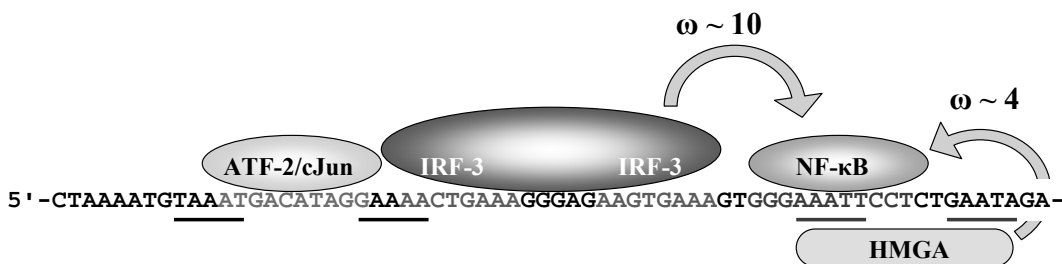


Рис. 7.12. Енхансер інтерферонового гена.

Фактори транскрипції взаємодіють з відповідними *цис*-елементами послідовності, підкреслено ділянки, котрі взаємодіють з АТ-гаками в складі білків HMGA. Стрілочки вказують на позитивний вплив двох білків на зв'язування третього, наведено відповідні фактори кооперативності (за даними Dragan *et al.*, 2008)

Ліворуч від IRF-3 (вище від старту транскрипції – РНК-полімераза рухається праворуч на рис. 7.12; енхансер розташований на відстані $-45 \div -110$ пар основ від старту) зв'язується гетеродимерний білок ATF-2/cJun, що відноситься до родини лейцинових зіперів (структура на рис. 10, кольор. вст.). За результатами дослідження збірки енхансосоми *in vitro*, димер IRF-3 не впливає на його взаємодію зі своїм специфічним сайтом, проте робить цю взаємодію більш адресною – запобігає неспецифічному зв'язуванню ATF-2/cJun в інших місцях енхансера. Натомість IRF-3 підсилює в ~ 10 разів константу зв'язування транскрипційного фактора NF- κ B

(Nuclear Factor κB) зі своїм сайтом (структура NF-κB на рис. 11, кольор. вст.). Енхансер містить також кілька сайтів взаємодії з АТ-гаком у складі білків HMGA (структура на рис. 12, кольор. вст.): зв'язування HMGA з двома з них не впливає на взаємодію інших білків; зв'язування HMGA своїми двома АТ-гаками з двома іншими, розміщеними в зоні сайту NF-κB, підвищує спорідненість NF-κB в ~4 рази (рис. 7.12). Сайт АТ-гака міститься всередині сайту NF-κB, але перший білок взаємодіє з маленьким жолобком, другий – з великим по іншій бік подвійної спіралі, проте слід зазначити, що вони не тільки не заважають один одному, а навпаки, взаємно підсилюють спорідненість. Далі до енхансосоми рекрутуються також інші білки.

Активаційні домени транскрипційних факторів та коактиватори, що входять до складу енхансосоми, мають спорідненість до базальних факторів транскрипції та так званого *медіатора*, зв'язаного з РНК-полімеразою, (мультибілковий комплекс, який за рахунок білок-білкових взаємодій інтегрує енхансосоми та преініціаторний комплекс в єдину систему). Результатом такої взаємодії є ефективна збірка преініціаторного комплексу в зоні старту транскрипції (рис. 7.13). Зауважимо, що певні компоненти мультибілкових комплексів, які збираються на промоторах, можуть, навпаки, блокувати ініціацію транскрипції – тоді їх називають репресорами та корепресорами.

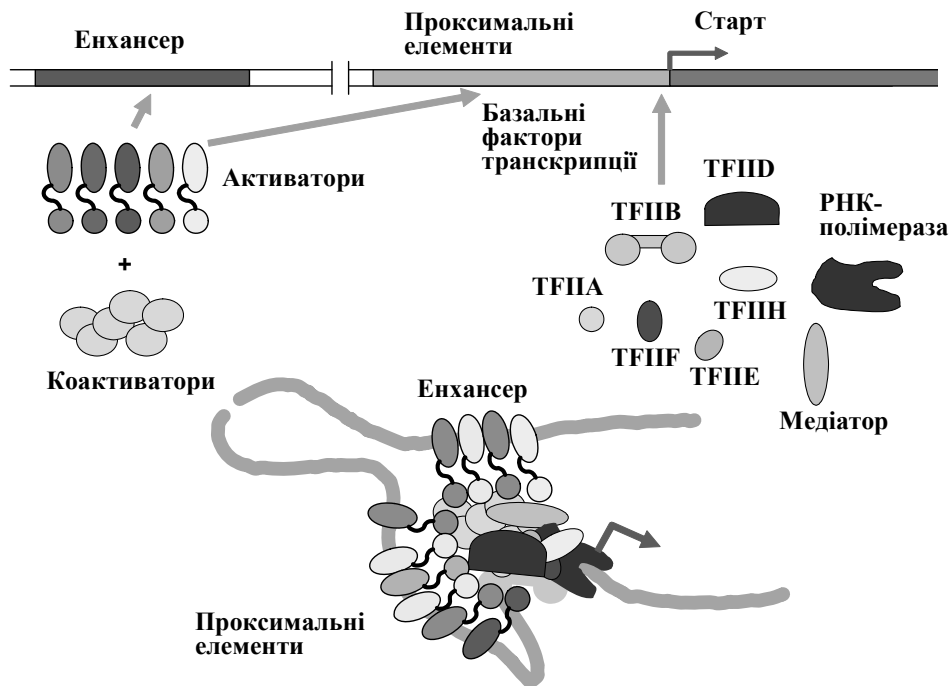


Рис. 7.13. Схема збірки комплексу активації транскрипції

Як показано на рис. 7.13, енхансери часто розташовані досить далеко по ланцюгу ДНК від місця збірки преініціаторного комплексу. Це означає, що ділянка ДНК між двома білковими комплексами (скажімо, на віддаленому енхансері та в зоні старту транскрипції), які безпосередньо контактують між собою, утворює петлю.

7.4.2. Взаємодія між білками, зв'язаними на відстані: утворення петлі ДНК

Кооперативна взаємодія між білками, зв'язаними з ДНК на відстані один від одного, відрізняється від описаної у попередньому підпідрозділі взаємодії між білками, зв'язаними на сусідніх сайтах, лише одним: утворення петлі – практично, нековалентна циклізація ділянки ДНК – потребує додаткових енергетичних витрат. Формування петлі підпорядковане таким самим закономірностям, що обговорювались у зв'язку з ковалентною циклізацією ДНК (підрозд. 4.5). По-перше, чим коротша ділянка між двома зв'язаними білками, тим вища енергія вигину; але чим більша відстань, тим менш імовірно є зустріч двох кінців. По-друге, для маленьких відстаней стає важливою не тільки, і не стільки, відстань як така, а "фаза" розташування двох білків на кінцях ділянки. Якщо на відстані між білками вкладається ціле число витків подвійної спіралі (наприклад, обидва білки взаємодіють з великим жолобком – збігаються за фазою), це сприяє циклізації, оскільки мінімізує енергетичні витрати на деформацію ДНК (рис. 7.14, див. також рис. 4.7, б). Якщо ціле плюс $\frac{1}{2}$ витків (білки взаємодіють із різними жолобками) – утворення петлі потребує додаткових витрат на торсіне кручення подвійної спіралі – зміну твіста.

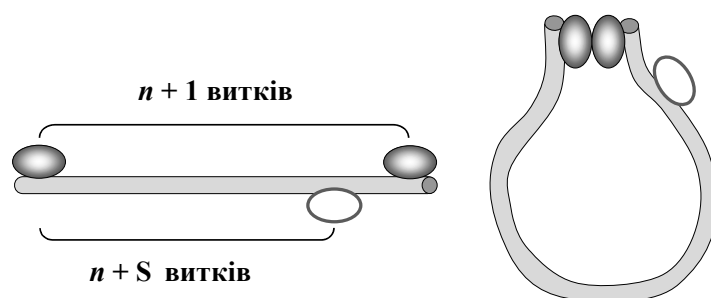


Рис. 7.14. Утворення петлі ДНК між двома білками, зв'язаними на відстані, де укладається ціле число $n + 1$ витків дуплекса. Зв'язування білків на відстані $n + \frac{1}{2}$ витків утруднює формування петлі

Утворення петель ДНК при її взаємодії з білками є досить загальним явищем як для еукаріотів, так і для прокаріотів, де петлі, що формуються в промоторах, також відіграють важливу роль у регуляції транскрипції. На більш простих прокаріотичних системах формування петель вивчено краще.

Першим прикладом є *lac*-репресор LacI: у підпідрозд. 7.3.1, а також у 7.3.3 обговорювалась його взаємодія з оператором у гомодимерній формі (рис. 22, кольор. вст.). Однак у промоторі лактозного оперона (кластера кількох генів, що транскрибуються зі спільного промотору), який перебуває під контролем *lac*-репресора, розташовані дві операторні ділянки *O1* та *O3* на відстані 92 пари основ одна від одної – з обома зв'язуються димери LacI, котрі взаємодіють між собою, утворюючи тетрамер і, відповідно, петлю ДНК (рис. 24, кольор. вст.). Усередині петлі розташовані сайти зв'язування активатора транскрипції CAP (рис. 8, кольор. вст.) і РНК-полімерази, які стають недоступним. На відстані 401 пара основ від оператора *O1* міститься ще один оператор *O2* – між *O1* та *O2* також може утворюватись петля.

Відповідно до викладених вище закономірностей, штучне збільшення або зменшення відстані між операторами *O1* та *O3* на 5–6 пар основ ($\sim\frac{1}{2}$ витка) знижує ефективність репресії в ~ 50 разів – рівень транскрипційної активності оперона залежно від відстані між операторами осцилює з періодом, що дорівнює кількості пар основ на один виток (так само, як *j*-фактор на рис. 4.7, б). Аналогічні спостереження були зроблені для інших оперонів, де здійснюється подібний механізм репресії. Проте слід зауважити, що не завжди виконується очікувана залежність усередненої для таких осциляцій ефективності утворення петлі від її контурної довжини – очікувана, виходячи з припущення, що петля просто являє собою окружність. Справа в тому, що конкретна конфігурація петлі, котра мінімізує енергію вигину, залежить від структури білково-нуклеїнових комплексів, які утримують кінці петлі. Крім того, таким комплексам часто притаманна конформаційна рухливість, унаслідок якої петля може адаптувати ту чи іншу переважну конфігурацію. Проілюструємо викладене на прикладі лактозного оперона.

Оскільки операторна ділянка являє собою паліндром (послідовність обох ланцюгів від 5'- до 3'- кінця є однаковою), кожен димер LacI може зв'язатися з оператором у двох орієнтаціях. Тобто, показана на схемі рис. 24, кольор. вст. взаємна орієнтація двох операторів на кінцях петлі є тільки однією з чотирьох можливих (рис. 7.15). Зв'язування кінців петлі з білком створює топологічні обмеження для петлі: оскільки два димери взаємодіють з ДНК в одній "фазі", петля повинна характеризуватись цілим числом зачеплень Lk – так само, як і для циркулярної ковалентно замкненої ДНК (див. розд. 5). І так само, ця величина буде розподіленою між твістом Tw та райзингом Wr залежно від еластичних властивостей подвійної спіралі.

Задавши граничні умови на кінцях петлі, які визначаються структурою білково-нуклеїнового комплексу (координати кінцевих точок і кінцеві вектори тангентів осі подвійної спіралі), та будь-яку величину Lk , можна, на підставі згаданої в підрозд. 5.4.2 теорії рівноважних конфігурацій еластичного стрижня (Coleman *et al.*, Tobias *et al.*, 2000; Olson *et al.*, 2004), розрахувати рівноважну конфігурацію петлі – таку, що мінімізує енергію деформацій (і автоматично розподіляє Lk між твістом та райзингом). Значення енергії рівноважної конфігурації, власне, і дорівнює енергії утворення петлі (не враховуючи енергію білково-нуклеїнових взаємодій, яка не змінюється для різних конфігурацій). При цьому ДНК можна вважати гомогенним ізотропним еластичним стрижнем (підрозд. 4.2), а можна, скориставшись даними, наведеними в табл. 1.3, урахувати залежність еластичних властивостей від послідовності (яка, звичайно, є відомою для лактозного оперона).

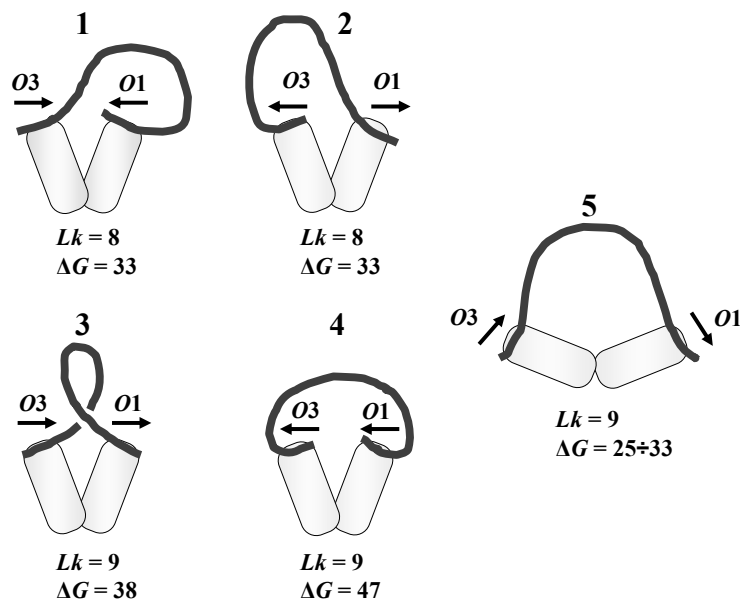


Рис. 7.15. Чотири можливі варіанти (1–4) взаємної орієнтації операторів $O1$, $O3$, зв'язаних з димерами *lac*-репресора, і відповідна приблизна конфігурація петель. Указано число зачеплень Lk і вільні енергії утворення петлі ΔG в одиницях $k_B T$ (без урахування взаємодій з білком) для відповідних розрахованих рівноважних конфігурацій петлі. Конфігурація 5 передбачає структурне перетворення тетрамеру LacI, відповідна вільна енергія враховує витрати на таке перетворення (за результатами Swigon *et al.*, 2006)

Результати таких розрахунків представлено на рис. 7.15 (указано значення енергій для Lk , що відповідають мінімальним витратам на деформацію). Очевидно, що дві конфігурації з антипаралельною орієнтацією операторів (1 і 2) передбачають мінімальні енергетичні витрати на утворення петлі. Крім того, оскільки ці конфігурації відповідають меншим значенням Lk , вони мають бути переважними, якщо петля перебуває у складі негативно надспіралізованої циркулярної ДНК (яку і являє собою бактеріальна ДНК). Слід зауважити, що експериментальні результати вказують на суттєве полегшення формування петлі в умовах негативно надспіралізації.

Проте на граничні умови на кінцях петлі може впливати конформаційна рухливість білково-нуклеїнового комплексу. Для тетрамеру LacI експериментально продемонстровано можливість структурного перетворення зі збільшенням кута між двома димерами (як на конфігурації 5 на рис. 7.15), яке має супроводжуватись руйнуванням частини міжбілкових контактів. Позитивна вільна енергія такого перетворення оцінюється в 2–9 одиниць $k_B T$. Незважаючи на такі додаткові витрати, петля, приєднана до перебудованого тетрамеру, є переважною для однієї з паралельних орієнтацій операторів (рис. 7.15). Експериментальні результати, отримані *in vitro* на лінійних молекулах ДНК (де неможлива надспіралізація), – залежність ефективності утворення петлі від відстані між операторами та футпринтинг (доступність ДНК уздовж контуру петлі до агентів, що руйнують фосфодієфірні зв'язки, яка визначається локальною конформацією подвійної спіралі) – найкраще узгоджуються з конфігурацією 5. Однак для випадку, коли оператори знаходяться у циркулярній надспіралізованій ДНК, конфігурації 1 і 2 є найбільш імовірними: з ними краще узгоджуються результати футпринтингу та електронної мікроскопії. Остання вказує на наявність перехрещень в основі петлі, які передбачаються конфігураціями 1 і 2 та не передбачаються конфігурацією 5 (рис. 7.15).

В іншому бактеріальному опероні – галактозному – працює аналогічна система репресії: з двома операторами, розділеними 113 парами основ, зв'язуються два мономерні репресора GalR, і, взаємодіючи між собою, утворюють петлю. Якщо репресія, тобто утворення петлі, в лактозному опероні полегшується за наявності негативно надспіралізації та HU (Heat Unstable) – білка, що неспецифічно взаємодіє з ДНК у бактеріальних клітинах, репресія в галактозному опероні *потребує* цих двох факторів. Утворення петлі між двома галактозними операторами було досліджене у реальному часі за допомогою магнітного пінцета (див. підпідрозд. 4.6.1). Схему експерименту представлено на рис. 7.16: ділянка галактозного промотору з двома операторами пришивається за один кінець до підкладки; кулька, пришита до іншого кінця, знаходиться під дією електромагніта, за допомогою якого цей кінець можна закрутити/розкрутити торсійно та прикласти до нього зовнішню розтягальну силу.

Якщо між операторами утворюється петля, відстань r між кулькою та підкладкою скорочується на величину $\Delta r \sim 55$ нм: експеримент полягає в реєстрації відстані у часі – періоди, коли відстань дорівнює r , змінюються періодами, коли підтримується відстань $(r - \Delta r)$, і навпаки. Аналіз такої залежності дозволяє встановити середній час існування системи в станах з петлею τ_l і без петлі τ_u : відповідно, константа швидкості переходу зліва направо на рис. 7.16 дорівнює $k_l = 1/\tau_u$, справа наліво – $k_u = 1/\tau_l$ (див. підпдрозд. 2.5.1). Щоб стан без петлі був достатньо помітним, доводиться прикладати невелику розтягальну силу, яка сприяє руйнуванню петлі.

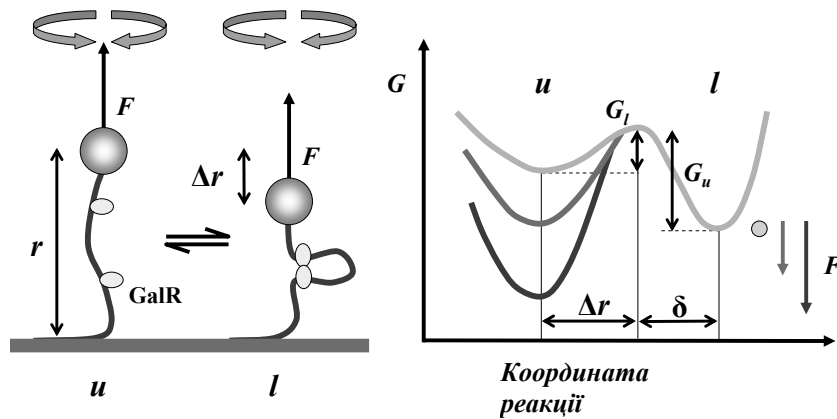


Рис. 7.16. Схема експерименту з дослідження утворення петлі між двома галактозними операторами, зв'язаними з GalR, за допомогою магнітного пінцета.

Праворуч: енергетична схема мономолекулярної реакції між двома станами – з петлею (l) і без петлі (u). Вільна енергія G другого стану знижується при зростанні зовнішньої розтягальної сили F (стрілочка), точка символізує випадок $F = 0$.

δ – відстань максимального наближення між двома молекулами GalR, на якій між ними ще не реалізовані міжбілкові взаємодії.

Адаптовано з роботи Lia *et al.* (2003)

У відсутності зовнішньої розтягальної сили активаційний бар'єр G_l на шляху утворення петлі (рис. 7.16) є енергією деформації петлі – бар'єрний стан відображає ситуацію, коли петля вже сформована (енергія витрачена на її деформацію), але взаємодії між білками, які мають компенсувати ці витрати, ще не реалізувалися. Активаційний бар'єр G_u на зворотному шляху являє собою несприятливий внесок від руйнування міжбілкових взаємодій. За наявності розтягальної сили формування петлі утруднюється: при створенні петлі необхідно виконати роботу $F\Delta r$ проти цієї сили, тобто активаційний бар'єр тепер дорівнює $G_l + F\Delta r$. При руйнуванні петлі силою виконується робота $-F\delta$, де $\delta \sim 1$ нм –

відстань, на яку треба розвести дві молекули GalR, щоб взаємодії між ними були зруйновані; тобто висота бар'єра дорівнює $G_u - F\delta$. Середній час існування системи в тому чи іншому стані експоненційно залежить від висоти активаційного бар'єра (рівн. (2.24)), тобто за наявності розтягальної сили середній час існування ДНК у станах без петлі та з петлею становить

$$\tau_u(F) = \tau_u(0) \exp\left(\frac{F\Delta r}{k_B T}\right), \quad \tau_l(F) = \tau_l(0) \exp\left(-\frac{F\delta}{k_B T}\right),$$

де $\tau(0)$ – відповідні часи у відсутності зовнішньої сили. Знаючи величину сили F , а також Δr та δ , ці часові інтервали можна встановити.

У присутності зв'язаних молекул GalR, але у відсутності білка HU та/або мінімальної негативної надспіралізації петля не утворюється взагалі. У присутності HU та за наявності негативної надспіралізації (створювалась магнітним пінцетом), рівень якої відповідає щільності $\sigma = -0,03$, час існування у стані з петлею $\tau_l(0) = 21$ с, у стані без петлі $\tau_u(0) = 0,1$ мс. Перерахувавши ці характеристичні часи у константи швидкості, можна визначити константу рівноваги для переходу між двома станами (рівн. (2.25)) та, відповідно, різницю вільних енергій між ними (рівн. (2.3)). Вільна енергія утворення петлі відносно стану без петлі становить $12 k_B T$. Для порівняння, вільна енергія утворення петлі між операторами $O1$ та $O2$ в лактозному опероні (рис. 24, кольор. вст.), установлена іншими методами, дорівнює $-7 k_B T$, хоча взаємодії між *lac*-репресорами міцніші. Полегшують формування петлі в галактозному опероні два фактори: 1) негативна надспіралізація, яка підвищує спорідненість до ДНК білка HU; 2) зв'язаний білок HU, який індукує вигин ДНК, що сприяє створенню петлі.

Білок HU є бактеріальним аналогом (щодо функціонального значення, але не структури) еукаріотичного білка HMGB (рис. 13, кольор. вст.) – він також створює вигин подвійної спіралі та індукує її часткове розкручування. Остання обставина й визначає його підвищену спорідненість до негативно надспіралізованої ДНК. Вплив надспіралізації – це ще один важливий механізм кооперативних ефектів у білково-нуклеїнових взаємодіях.

7.4.3. Вплив надспіралізації ДНК на її взаємодії з білками

Фактором, який має особливе значення, є вплив надспіралізації ДНК на її взаємодії з білками, оскільки *in vivo* білки практично завжди взаємодіють із топологічно обмеженими доменами ДНК – циркулярними молекулами в прокаріотів чи петлями хроматину (розд. 8) в еукаріотів. Якщо білок розкручує подвійну спіраль у сайті зв'язування, його спорідненість до негативно надспіра-

лізованої ДНК підвищується за таким самим механізмом, що його було описано в підрозд. 6.5.2 для інтеркаляторів. Аналогічно, білок може змінювати не твіст подвійної спіралі, а її райзинг, утворюючи елемент лівої (негативний райзинг) або правої (позитивний райзинг) суперспіралі ДНК на своїй поверхні (підрозд. 5.1.5). Результатом буде зняття частини, відповідно, негативної чи позитивної надспіралізації – так само, як і у випадку зміни твіста, це спричиняє підвищення спорідненості до негативно чи позитивно надспіралізованої ДНК. За таким самим механізмом полегшується описане в попередньому підрозділі утворення петель між зв'язаними білками, якщо петля характеризується ненульовою зміною твіста та/або ненульовим райзингом.

У прокаріотичних клітинах надспіралізація виникає, головним чином, як результат балансу між активностями топоізомераз різного типу (підрозд. 5.3). Зміна цього балансу в напрямку підвищення негативної надспіралізації приводить до загальної активації ініціації транскрипції, а також є необхідною для ініціації реплікації – в обох випадках відбувається локальне плавлення подвійної спіралі в процесі ініціації. Головним джерелом надспіралізації в еукаріотів є робота транслоказ, і в першу чергу – РНК-полімерази, яка створює позитивну надспіралізацію попереду, та негативну – позаду свого руху (підрозд. 5.2.3). Як показують експерименти *in vivo*, схему яких описано в тому ж підрозділі, топоізомерази не встигають швидко видаляти такі дві хвилі надспіралізації і, відповідно, ці хвилі впливають на зв'язування білків з ДНК.

Негативна надспіралізація особливо ефективно накопичується позаду від двох РНК-полімераз у численних двонаправлених промоторах – сусідніх промоторах двох генів, що транскрибуються в різних напрямках. Таке узагальнення промоторної зони двома генами може забезпечувати координовану регуляцію транскрипції – промотори взаємно підсилюють ініціацію транскрипції, що пов'язана з локальним плавленням ДНК.

Крім того, як обговорювалось у підрозд. 5.5, негативна надспіралізація здатна ефективно індукувати структурні перетворення подвійної спіралі, викликаючи локальне плавлення порівняно з нестабільними ділянками або В–Z переходом на пурин-піримідинових ділянках послідовності. З одного боку, ділянки обох типів широко представлені в еукаріотичних промоторах, з іншого – існують білки, що мають спорідненість до одноланцюгової ДНК або до Z-форми. Структурні перетворення обох типів під час транскрипції *in vivo* були зафіксовані експериментально. Зв'язування білків, які мають спорідненість, наприклад, до Z-форми (рис. 7.17), з промотором після початку транскрипції може модулювати наступні акти ініціації на тому самому промоторі. Якщо зв'язування таких білків є достатньо міцним, це може служити механізмом своєрідної пам'яті, яка підтримує транскрипційно активний статус даного промотору, або навпаки – пригнічує наступні акти ініціації за принципом зворотного зв'язку. Існують експериментальні свідчення на користь реалізації обох цих механізмів у різних промоторах.

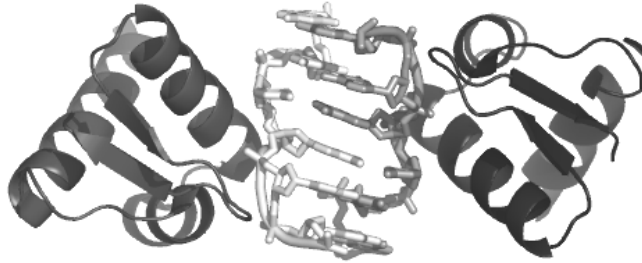


Рис. 7.17. Комплекс двох Z-специфічних доменів (Zα або ADAR1) аденозиндеамінази з ДНК у Z-формі (код PDB 3F23)

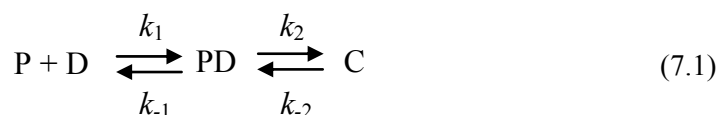
Нарешті, залежні від негативної надспіралізації структурні перетворення ДНК, а також сама еластична напруга обох знаків, впливають на особливості структури та динаміки хроматину, що розглядатиметься в розд. 8.

7.5. КІНЕТИКА БІЛКОВО-НУКЛЕЇНОВИХ ВЗАЄМОДІЙ

Досі обговорювалась в основному термодинаміка білково-нуклеїнових взаємодій, яка не може дати відповіді на запитання, наскільки швидко реалізуються ці взаємодії, – запитання, відповідь на яке тісно пов'язана зі з'ясуванням шляхів та механізмів того чи іншого процесу (підпідрозд. 2.5.1).

Зазвичай неспецифічне зв'язування білків з ДНК відбувається за одностадійним механізмом звичайної бімолекулярної реакції, а константа швидкості зв'язування контролюється дифузією – практично дорівнює бімолекулярній константі швидкості співударянь (рівн. (2.26)). Згідно з рівн. (2.24), це означає, що активаційний бар'єр практично відсутній – співударяння автоматично приводить до зв'язування, а час існування комплексу визначається константою швидкості дисоціації, яка залежить від вільної енергії взаємодій між ДНК та білком. Підстановка в рівн. (2.26) типових значень коефіцієнтів дифузії білка та фрагмента ДНК відповідного маленького розміру ($\sim 5 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2 \text{ с}^{-1}$) і відстані мінімального наближення $r_0 \sim 5 \text{ нм}$, а також використання коефіцієнту 0,05, на який помножається права частина виразу (приблизна частка ефективної поверхні білка, яка реалізує взаємодію), дає оцінку контрольованої дифузією константи швидкості асоціації $\sim 10^8 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Значення константи швидкості такого порядку зазвичай і реєструються в експериментах з маленькими фрагментами ДНК.

Специфічна взаємодія, як обговорювалось у підрозд. 7.3, часто супроводжується конформаційними змінами ДНК та білка. Ці зміни потребують певного часу, адже на шляху перемикання конформацій можуть існувати активаційні бар'єри. Відповідно, специфічне зв'язування часто можна описати, використовуючи принаймні одну проміжну стадію:



де P – білок, D – ДНК, PD та C – неспецифічний і специфічний комплекси відповідно; k_1 , k_{-1} , k_2 , k_{-2} – константи швидкості відповідних переходів; перша бімолекулярна реакція контролюється дифузією, друга – є мономолекулярним процесом із вільною енергією активації > 0 . Саме такий мономолекулярний процес, який відповідає вже взаємодії між двома специфічними комплексами (утворення петлі), було розглянуто наприкінці підрозд. 7.4.2.

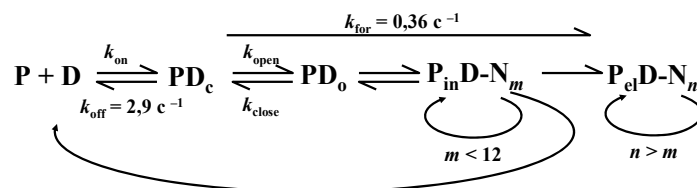
Зрозуміло, що для складних комплексів кількість проміжних стадій може бути більшою. Так, взаємодія бактеріальної РНК-полімерази з промотором передбачає існування принаймні двох інтермедіатів. За результатами детального дослідження кінетики зв'язування та дисоціації ферменту (Roe *et al.*, 1984), перший комплекс є наслідком неспецифічного електростатичного зв'язування; другий (так званий закритий комплекс) утворюється після реалізації міцної взаємодії між полімеразою та промоторною ДНК і, потребуючи конформаційних змін білка, характеризується позитивною енергією активації; фінальний третій – відкритий комплекс – виникає внаслідок локального плавлення частини промоторної ДНК, зв'язаної в зоні активного центру полімерази.

Взаємодію РНК-полімерази бактеріофага T7 з промотором було досліджено в реальному часі за допомогою техніки оптичної пастки (підрозд. 4.6.1) у роботі Skinner *et al.* (2004). Розглянемо детальніше цей цікавий експеримент, який може служити прикладом сучасних підходів у молекулярній кінетиці. До фрагмента ДНК, у центрі якого міститься промотор РНК-полімерази бактеріофага T7, пришиваються дві кульки (використовуються різні методи пришивання до двох кінців, щоб кінці можна було розрізнити, одна з кульок є флуоресцентно міченою). Обидві кульки знаходяться в оптичних пастках (рис. 7.18), відстань між кульками задається таким чином, щоб клубок ДНК був тільки злегка розтягнутим. Одна з пасток (і відповідна кулька) здійснює осциляції з частотою 5 Гц уздовж підкладки, до якої приєднана ще одна кулька, – до її поверхні пришита мономерна РНК-полімераза T7 (структура на рис. 18, кольор. вст.). До цієї останньої кульки, маніпулюючи пастками, підводять фрагмент ДНК.

Під дією осциляцій правої кульки – ДНК відіграє роль повідка – ліва висмикується зі своєї пастки з відповідною частотою, такі осциляції схематично показані в нижній частині рис. 7.18. Якщо відбувається зв'язування з полімеразою, точка зв'язування розділяє повідок на дві частини – ліва кулька припиняє осциляції та завмирає в певній позиції відносно своєї пастки. Відстань від пастки характеризує позицію вздовж повідка, в якій відбулось зв'язування. У 85 % випадків гальмування осциляції відповідає половині амплітуди осциляцій – центру фрагмента ДНК, тобто промотору. Після цього, як правило, відбувається дисоціація, і осциляції відновлюються.

Гальмування в результаті зв'язування з промотором продовжуються від 50 мс (нижня границя чутливості приладу) до 1 хв. Розподіл таких подій гальмування за часом має експоненціальну форму, звідки можна встановити середній час життя зв'язаного стану (0,34 с), тобто константу швидкості дисоціації від полімерази $k_{off} = 2,9 \text{ c}^{-1}$.

Для 2 % подій гальмування продовжується значно довше, в половині таких випадків спостерігається не поновлення осциляцій, а рух лівої кульки праворуч – якщо іммобілізована полімераза починає елонгацію транскрипції, вона переміщує лівий кінець фрагмента далі від його пастки (рис. 7.18). Зростанню відстані від лівої кульки до пастки завжди передуює лаг-період, коли кулька зберігає своє положення постійним. Цей період продовжується від 1 до 5 с, середній час – 2,8 с, тобто константа переходу від зв'язування до елонгації транскрипції становить $k_{for} = 0,36 \text{ c}^{-1}$. Відношення констант $k_{for}/k_{off} = 0,12$ дає оцінку ймовірності переходу до елонгації, якщо зв'язування відбулось. При елонгації швидкість скорочення відстані між лівою кулькою та центром фрагмента дає оцінку швидкості транскрипції в умовах експерименту – 43 нуклеотиди за секунду. Ті події довгого гальмування, які не змінюються елонгацію (половина випадків), напевно означають відоме явище абортивної ініціації – полімераза синтезує короткий транскрипт, після чого комплекс руйнується. Сумарну кінетичну схему процесу можна зобразити наступним чином:



де P – полімераза, D – ДНК; PD_c – закритий, PD_o – відкритий комплекс; P_{in} – полімераза в комплексі під час ініціації, P_{el} – під час елонгації транскрипції, N_i – РНК-транскрипт довжиною *i* нуклеотидів. Імовірність переходу від ініціації до елонгації становить ~0,5.

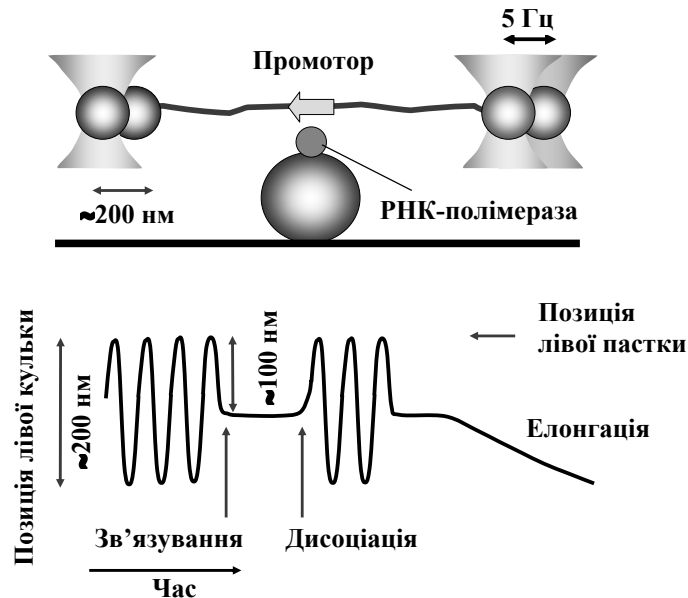


Рис. 7.18. Схема експерименту з вивчення взаємодії РНК-полімерази бактеріофага Т7 з промотором і транскрипції за допомогою оптичних пасток (пояснення в тексті).
Адаптовано з роботи Skinner *et al.* (2004)

У роботі Darzacq *et al.* (2007) було здійснено реєстрацію кінетики роботи еукаріотичної РНК-полімерази II у живих клітинах. У геном клітини штучно вбудовували кластер певного гена (200 копій). Місце розташування генного кластера в клітині можна знайти завдяки зв'язуванню флуоресцентно міченого білка зі специфічним сайтом, що знаходиться перед промотором кожного гена, а РНК-полімеразу – завдяки флуоресцентно міченим антитілам до неї. Накладання двох таких зображень дає місце зв'язування полімерази з генним кластером. Після цього застосовують процедуру FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching – відновлення флуоресценції після випалювання мітки): знайдену зону опромінюють інтенсивним лазерним променем, який руйнує флуоресцентну мітку фотохімічним шляхом, після чого спостерігають у часі за зростанням інтенсивності флуоресценції, яке відображає появу в цьому місці нових молекул РНК-полімерази. Крім того, гени у кластері продукують мРНК зі специфічними дволанцюговими шпильками, розташованими після кодувальної частини, котрі впізнаються певним флуоресцентно міченим білком – завдяки цьому можна реєструвати в часі процес елонгації транскрипції.

Найпростіша кінетична схема, яка дозволяє описати результати кінетики взаємодії РНК-полімерази з генним кластером, передбачає зв'язування полімерази з промотором, яке змінюється або дисоціацією, або ініціацією транскрипції; після ініціації відбувається або руйнування комплексу (абортівна ініціація), або розпочинається елонгація транскрипції. Відповідні константи швидкості названих стадій вказують на середні проміжки часу, які полімераза проводить у тому чи іншому стані, і на ймовірність переходу від одного стану до іншого: середній час іммобілізації РНК-полімерази на промоторі після зв'язування з ним – 6 с; лише 13 % зв'язаних полімераз переходять до ініціації транскрипції, і тоді цей етап продовжується у середньому 54 с; лише 8,6 % таких полімераз вступають до стадії елонгації транскрипції, решта здійснює абортівну ініціацію. Отже, тільки одна молекула полімерази з ~90 таких, що зв'язались із промотором, продукує молекулу мРНК. Така досить низька ефективність може мати біологічне значення, знижуючи ймовірність випадкової транскрипції будь-де в геномі ("транскрипційний шум"). Оцінена швидкість елонгації транскрипції становить ~70 нуклеотидів за секунду (один досліджений ген може бути транскрибованим за 46 с). Але 4 % полімераз вступають у паузи під час елонгації тривалістю в середньому 4 хв. Оскільки такі полімерази затримуються значно довше тих, що здійснюють безперервну елонгацію, приблизно чверть усіх полімераз у кожний момент часу – це полімерази в паузах.

В обох щойно описаних експериментах не досліджувалась швидкість первинного зв'язування РНК-полімерази з промотором. Як було відмічено на початку підрозділу, швидкість зв'язування великої кількості білків з маленькими фрагментами ДНК контролюється дифузією – відповідне значення константи являє собою *верхню* межу для швидкості асоціації. Проте швидкість зв'язування білків зі специфічними сайтами, які знаходяться у складі високополімерної молекули ДНК (ситуація, яка моделює пошук білком своєї специфічної мішені в клітині), є значно *вищою* цієї межі. Наприклад, константа швидкості зв'язування *lac*-репресора сягає $\sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. На перший погляд такий результат виглядає дивним, особливо якщо згадати, що зі специфічним сайтом за білок конкурує значно більша кількість неспецифічних сайтів. Але саме ця обставина – наявність неспецифічних сайтів – і є фактором, що значно пришвидшує пошук мішені.

Якщо специфічний сайт знаходиться "сам по собі" десь у розчині, молекула білка змушена здійснювати тривимірну дифузію по всьому об'єму розчину, щоб на решті його знайти. Коли сайт знаходиться у складі довгого полімеру, який утворює неупорядкований клубок, тривимірна дифузія необхідна тільки для того, щоб зустрітися з цим досить великим клубком (рис. 7.19).

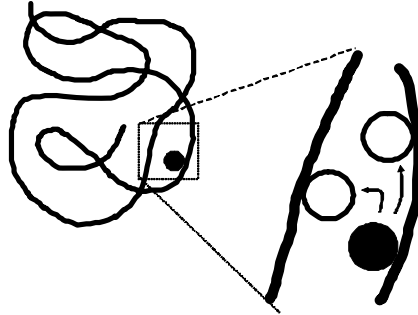
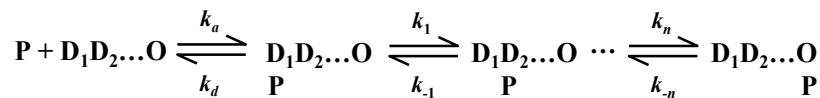


Рис. 7.19. Пошук специфічного сайта-мішені в полімерній ДНК шляхом слайдингу та перенесення на віддалені по ланцюгу ділянки

Далі відбувається неспецифічне зв'язування де завгодно на полімері, після чого пошук мішені здійснюється у значно меншій області простору. Існує два механізми такого пошуку. Першим є одновимірна дифузія вздовж ДНК – слайдинг (рис. 7.19). Взаємодія з сусіднім неспецифічним сайтом відбувається внаслідок теплового руху – вона не супроводжується ані зниженням, ані зростанням вільної енергії. Зрозуміло, що така дифузія може суттєво підвищити швидкість пошуку порівняно зі скануванням усього простору (пробірки або клітини, або клітинного ядра). Експериментальні оцінки показують, що на вільній ДНК переміщення шляхом слайдингу може здійснюватись на відстань до кількох сотень пар основ. Візуалізація в реальному часі руху неспецифічно зв'язаної флуоресцентно міченої РНК-полімерази вздовж молекули ДНК, розтягнутої за кінці двома оптичними пастками, свідчить, що слайдинг відбувається по спіралі – уздовж цукрофосфатного остова.

Припустимо, що первинне зв'язування (контрольована дифузією константа швидкості асоціації k_a , константа швидкості дисоціації k_d) відбувається з неспецифічним сайтом D_1 , початок якого знаходиться за n пар основ від початку специфічного сайту O . Далі білок P "передається" з одного неспецифічного сайту на інший до зустрічі з мішенню:



Якщо фрагмент ДНК довжиною N пар основ є не надто довгим, і всі події первинного зв'язування (загальною кількістю N) приводять до іммобілізації на специфічному сайті, то результуюча константа швидкості асоціації зі специфіч-

ним сайтом дорівнює просто Nk_a , тобто значно зростає порівняно з контрольованою дифузією константою швидкості. Більш реалістичні вирази для залежності результуючої константи швидкості від середньої довжини слайдингу та коефіцієнтів одномірної дифузії вздовж ДНК є більш складними, але також указують на пришвидшення пошуку мішені. Слід зауважити, що умовою ефективного слайдингу є не надто висока спорідненість білка до неспецифічних сайтів – сайти мають легко "віддавати" білок.

Зрозуміло, що в клітині, де ДНК зв'язана з численними білками, роль слайдингу має бути обмеженою. Другий механізм пошуку – перенесення на віддалені по ланцюгу ділянки, які опинилися просторово наближеними до білка, що здійснює слайдинг (рис. 7.19). Після перенесення відбувається слайдинг на певну відстань, нове перенесення – і так далі до зустрічі з мішенню. Важливість механізму перенесення була продемонстрована зокрема в дослідженнях кінетики зв'язування рестриктази *EcoRV* з її специфічним сайтом у складі індивідуальної молекули ДНК (van den Broek *et al.*, 2008): якщо молекула перебуває у стані клубка (працюють обидва механізми пошуку – і слайдинг, і перенесення), швидкість специфічного зв'язування зростає приблизно вдвічі порівняно з розтягнутою молекулою (для якої реалізується тільки слайдинг).

Сучасні методи мікроскопії дозволяють спостерігати за однією молекулою флуоресцентно міченого білка в живій клітині. Подібні експерименти з бактеріальними клітинами, в яких було візуалізовано *lac*-репресор (Elf *et al.*, 2007) приводять до висновку, що, шукаючи специфічний оператор, більшу частину часу (~90 %) репресор є зв'язаним з неспецифічними сайтами на ДНК; середній час іммобілізації на неспецифічному сайті оцінюється в < 5 мс. На пошук специфічної мішені молекула репресора витрачає приблизно 360 с, цей час збігається з теоретично очікуваним на підставі моделі, що передбачає одномірний слайдинг на відстань до 85 пар основ та перенесення на віддалені по ланцюгу ділянки.

ЗАДАЧІ

7.1. На сайті PDB (див. задачу 1.5) завантажте структуру білково-нуклеїнового комплексу (наприклад, одну з представлених на рисунках цього розділу, див. коди PDB у підписах до рисунків). Відкрийте файл у програмі для візуалізації pdb-файлів. Уважно роздивіться структуру, створіть кілька зображень у різних проекціях та форматах.

7.2. За допомогою програмного пакету 3DNA проаналізуйте pdb-файл з попередньої задачі – отримайте конформаційні параметри для кожного динуклеотидного кроку фрагмента ДНК. Створіть графіки залежності шести параметрів від позиції вздовж фрагмента та проаналізуйте їх (див. задачу 1.6).

7.3. За даними рис. 7.6 дайте приблизну оцінку усереднених вільних енергій зв'язування білків з великим та маленьким жолобками при 20°C у 100 мМ солі.

7.4. Користуючись рівн. (6.5) та наведеними у підпідрозд. 7.3.3 значеннями термодинамічних параметрів, розрахуйте значення стандартних вільних енергій ΔG^0 , ентальпій ΔH^0 та ентропійних внесків у вільну енергію $T\Delta S^0$ зв'язування *lac*-репресора зі специфічним оператором за температур 0, 20 та 50 °C у 0,15 М КСІ.

7.5. Розрахуйте в одиницях $k_B T$ вільну енергію вигину петлі ДНК довжиною 92 пари основ, вважаючи петлю планарною окружністю (скористайтесь матеріалом розд. 4). Порівняйте отримане значення з даними на рис. 7.15.

7.6. Розрахуйте в одиницях $k_B T$ сумарну вільну енергію вигину та торсійних деформацій при замиканні ділянки ДНК довжиною 92 пари у планарну окружність (скористайтесь матеріалом розд. 4 та 5). Вважайте, що спіральна періодичність ДНК дорівнює 10,5 пар основ/виток. Розрахуйте залежність сумарної енергії деформацій від довжини ДНК у діапазоні від 80 до 100 пар основ.

7.7. Для експерименту, зображеного на рис. 7.16, використавши наведені в тексті значення параметрів, розрахуйте величину розтягальної сили у пН, необхідну для того, щоб стани з петлею та без петлі були рівноймовірними.

7.8. Дві молекули білка взаємодіють з ДНК поруч одна з одною та одночасно – між собою, параметр кооперативності $\omega = 10$. За рахунок контакту між білками ділянка ДНК довжиною 50 пар основ вигинається навкруг двох молекул із радіусом кривизни 5 нм, при руйнуванні контакту ДНК розпрямляється. Розрахуйте загальну вільну енергію утворення вигнутої конформації комплексу (відносно невивгнутої – коли два білки зв'язані з ДНК, але між собою не взаємодіють), а також енергію вигину ДНК та енергію взаємодії між білками. Розрахуйте константу швидкості утворення вигнутої конформації та константу швидкості зворотного процесу (прийміть константу швидкості елементарного кроку за 10^7 c^{-1} , див. підпідрозд. 2.5.1 та 7.4.2). Скільки часу в середньому існують вигнута та невивгнута конформації? Дайте оцінку константи взаємодії між двома білками, не зв'язаними з ДНК (скористайтесь спрощенням ідеального розчину, див. підрозд. 6.1).

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Структурна організація білків

Финкельштейн, А. В. Физика белка. Курс лекций / А. В. Финкельштейн, О. Б. Птицын. – М.: КДУ, 2007.

Branden, C.-I. Introduction to protein structure / C.-I. Branden, J. Tooze. – N.Y. : Garland Science, 1999.

Creighton, T. Proteins: structure and molecular properties / T. Creighton. – N.Y. : W. H. Freeman and Company, 1992.

Lesk, A. M. Introduction to protein architecture: the structural biology of proteins / A. M. Lesk, – Oxford : Oxford University Press, 2001.

Структура білків, що взаємодіють з ДНК

Crane-Robinson, C. The extended arms of DNA-binding domains: a tale of tails / C. Crane-Robinson, A. I. Dragan, P. L. Privalov // Trends Biochem. Sci. – 2006. – Vol. 31. – P. 547–552.

Garvie, C. W. Recognition of specific DNA sequences / C. W. Garvie, C. Wolberger // Mol. Cell. – 2001. – Vol. 8. – P. 937–946.

Harrison, S. C. A structural taxonomy of DNA-binding domains / S. C. Harrison // Nature. – 1991. – Vol. 353. – P. 715–719.

Luscombe, N. M. An overview of the structures of protein-DNA complexes / N. M. Luscombe, S. E. Austin, H. M. Berman [et al.] // Genome Biol. – 2000. – Vol 1. – P. 1–37.

Pabo, C. O. Geometric analysis and comparison of protein-DNA interfaces: why is there no simple code for recognition? / C. O. Pabo, L. Nekludova // J. Mol. Biol. – 2000. – Vol. 301. – P. 597–624.

Pabo, C. O. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition / C. O. Pabo, R. T. Sauer // Ann. Rev. Biochem. – 1992. – Vol. 61. – P. 1053–1095.

Patikoglou, G. Eukaryotic transcription factor-DNA complexes / G. Patikoglou, S. K. Burley // Ann. Rev. Biophys. – 1997. – Vol. 26. – P. 289–325.

Steitz, T. A. Structural studies of protein-nucleic acid interaction: the sources of sequence-specific binding / T. A. Steitz // Quart. Rev. Biophys. – 1990. – Vol. 23. – P. 205–280.

Принципи ДНК-білкового впізнання

Jen-Jacobson, L. Structural and thermodynamic strategies for site-specific DNA binding proteins / L. Jen-Jacobson, L. E. Engler, L. A. Jacobson // Structure. – 2000. – Vol. 8. – P. 1015–1023.

Kalodimos, C. Structure and flexibility adaptation in nonspecific and specific protein-DNA complexes / C. Kalodimos, N. Biris, A. Bonvin [et al.] // Science. – 2004. – Vol. 305. – P. 386–389.

Lejeune, D. Protein-nucleic acid recognition: statistical analysis of atomic interactions and influence of DNA structure / D. Lejeune, N. Delsaux, B. Charlotiaux [et al.] // *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. – 2005. – Vol. 61 – P. 258–271.

Rohs, R. Nuance in the double-helix and its role in protein-DNA recognition / R. Rohs, S. M. West, P. Liu [et al.] // *Curr. Op. Struct. Biol.* – 2009. – Vol. 19. – P. 171–177.

Rohs, R. The role of DNA shape in protein-DNA recognition / R. Rohs, S.M. West, A. Sosinsky [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 461. – P. 1248–1253.

Rohs, R. Origins of specificity in protein-DNA recognition / R. Rohs, X. Jin, S.M. West [et al.] // *Annu. Rev. Biochem.* – 2010. – Vol. 79. – P. 233–269.

Sarai, A. Protein-DNA recognition patterns and predictions / A. Sarai, H. Kono // *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2005. – Vol. 34. – P. 379–398.

Spolar, R. S. Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA / R. S. Spolar, M. T. Record // *Science*. – 1994. – Vol. 263. – P. 777–784.

Travers, A. A. DNA conformation and protein binding / A. A. Travers // *Ann. Rev. Biochem.* – 1989. – Vol. 58. – P. 427–452.

von Hippel, P. H. Protein-DNA recognition: new perspectives and underlying themes / P. H von Hippel // *Science*. – 1994. – Vol. 263. – P. 769–770.

von Hippel, P. H. From "simple" DNA-protein interactions to the macromolecular machines of gene expression / A. A. Travers // *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2007. – Vol. 36. – P. 79–105.

Watkins, D. Sequence recognition of DNA by protein-induced conformational transitions / D. Watkins, S. Mohan, G. B. Koudelka [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 396. – P. 1145–64.

Термодинаміка ДНК-білкових взаємодій

Dragan, A. I. Forces driving the binding of homeodomains to DNA / A. I. Dragan, Z. Li, E. N. Makeyeva [et al.] // *Biochemistry*. – 2006. – Vol. 45. – P. 141–151.

Dragan, A. I. DNA binding and bending by HMG boxes: energetic determinants of specificity / A. I. Dragan, C. M. Read, E. N. Makeyeva [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 343. – P. 371–393.

Frank, D. E. Thermodynamics of the interactions of *lac* repressor with variants of the symmetric *lac* operator: effects of converting a consensus site to a non-specific site / D. E. Frank, R. M. Saecker, J. P. Bond [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1997. – Vol. 267. – P. 1186–1206.

Privalov, P. L. What drives proteins into the major and minor grooves of DNA? / P. L. Privalov, A. I. Dragan, C. Crane-Robinson [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 365. – P. 1–9.

Record, M. T. Analysis of equilibrium and kinetic measurements to determine the thermodynamic origins of stability and specificity and mechanism of formation of site-specific complexes between proteins and helical DNA / M. T. Record, J.-H. Ha, M. A. Fisher // *Methods Enzymol.* – 1991. – Vol. 208. – P. 290–343.

Record, M. T. Some thermodynamic principles of nonspecific and site-specific protein-DNA interactions / M. T. Record, R. S. Spolar // *Nonspecific DNA-Protein Interactions* (eds. Revzin, Arnold). – Boca Raton, FL : CRC Press, 1990. – P. 33–69.

Spolar, R. S. Role of the hydrophobic effect in stability of site-specific protein-DNA complexes / R. S. Spolar, J.-H. Ha, M. T. Record // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – Vol. 86. – P. 8382–8385.

Takeda, Y. Thermodynamics of Cro protein-DNA interactions / Y. Takeda, P. D. Ross, C. P. Mudd // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – Vol. 89. – P. 8180–8184.

Кооперативність ДНК-білкових взаємодій

Dragan, A. I. Assembling the human IFN- β enhanceosome in solution / A. I. Dragan, R. Carrillo, T. I. Gerasimova [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 384. – P. 335–348.

Frankel, A. D. Modular structure of transcription factors: implications for gene regulation / A. D., Frankel, P. S. Kim // *Cell.* – 1991. – Vol. 65. – P. 717–719.

Goodrich, J. A. Contacts in context: Promoter specificity and macromolecular interactions in transcription / J. A. Goodrich, G. Cutler, R. Tjian // *Cell.* – 1996. – Vol. 84. – P. 825–830.

Grosschedl, R. Higher-order nucleoprotein complexes in transcription: analogies with site-specific recombination / R. Grosschedl // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1995. – Vol. 7. – P. 362–370.

Kim, T. K. The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon- β enhanceosome / T. K. Kim, T. Maniatis // *Mol. Cell.* – 1997. – Vol. 1. – P. 119–129.

Panne, D. The enhanceosome / D. Panne // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2008. – Vol. 18. – P. 236–242.

Wolberger, C. Multiprotein-DNA complexes in transcriptional regulation / C. Wolberger // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 1999. – Vol. 28. – P. 29–56.

Формування петель ДНК

Lia, G. Supercoiling and denaturation in Gal repressor/heat unstable nucleoid protein (HU)-mediated DNA looping / G. Lia, D. Bensimon, V. Croquette [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol. 100. P. 11373–11377.

Matthews, K. S. DNA looping / K. S. Matthews // *Microbiol. Rev.* – 1992. – Vol. 56. – P. 123–136.

Rippe, K. Making contacts on a nucleic acid polymer / K. Rippe // Trends Biochem. Sci. – 2001. – Vol. 26. – P. 733–740.

Rippe, K. Action at a distance: DNA-looping and initiation of transcription / K., Rippe, P. H. von Hippel, J. Langowski // Trends Biochem. Sci. – 1995. – Vol. 20. – P. 500–506.

Swigon, D. Modeling the Lac repressor-operator assembly: The influence of DNA looping on Lac repressor conformation / D. Swigon, B. D. Coleman, W. K. Olson // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103. – P. 9879–9884.

Vanzi, F. Lac repressor hinge flexibility and DNA looping: single molecule kinetics by tethered particle motion / F., Vanzi, C. Broggio, L. Sacconi [et al.] // Nucl. Acids Res. – 2006. – Vol. 34. – P. 3409–3420.

Надспіралізація ДНК і ДНК-білкові взаємодії

Browning, D. F. The regulation of bacterial transcription initiation / D. F. Browning, S. J. Busby // Nat. Rev. Microbiol. – 2004. – Vol. 2. – P.57–65.

Kanaar, R. Roles of supercoiled DNA structure in DNA transactions / R. Kanaar, N. R. Cozzarelli // Curr. Opin. Struct. Biol. – 1992. – Vol. 2. – P. 369–379.

Kouzine, F. The functional response of upstream DNA to dynamic supercoiling in vivo / F. Kouzine, S. Sanford, Z. Elisha-Feil [et al.] // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2008. – Vol. 15. – P. 146–154.

Oh, D.-B. Z-DNA-binding proteins can act as potent effectors of gene expression in vivo / D.-B. Oh, Y.-G. Kim, A. Rich // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol. 99. – P. 16666–16671.

Rahmouni, A. R. Direct evidence for the effect of transcription on local DNA supercoiling in vivo / A. R. Rahmouni, R. D. Wells // J. Mol. Biol. – 1992. – Vol. 223. – P.131–144.

Rothenburg, S. A polymorphic dinucleotide repeat in the rat nucleolin gene forms Z-DNA and inhibits promoter activity / S. Rothenburg, F. Koch-Nolte, A. Rich [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98. – P. 8985–8990.

Кінетика ДНК-білкових взаємодій

Bai, L. Single-molecule analysis of RNA polymerase transcription / L. Bai, T. J. Santangelo, M. D. Wang // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. – 2006. – Vol. 35. – P. 343–360.

Berg, O. G. Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 1. Models and theory / O. G. Berg, R. B. Winter, P. H. von Hippel // Biochemistry. – 1981. – Vol. 20. – P. 6929–6948.

Darzacq, X. In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription / X. Darzacq, Y. Shav-Tal, V. de Turreis [et al.] // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2007. – Vol. 14. – P. 796–806.

- Elf, J.* Probing transcription factor dynamics at the single-molecule level in a living cell / J. Elf, G.-W. Li, X. S. Xie // *Science*. – 2007. – Vol. 316. – P. 1191–1194.
- Gowers, D. M.* Measurement of the contributions of 1D and 3D pathways to the translocation of a protein along DNA / D. M. Gowers, G. G. Wilson, S. E. Halford // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2005. – Vol. 102. – P. 15883–15888.
- Halford, S. E.* How do site-specific DNA-binding proteins find their targets? / S. E. Halford, J. F. Marko // *Nucl. Acids Res.* – 2004. – Vol. 32. – P.3040–3052.
- Harada, Y.* Single-molecule imaging of RNA polymerase-DNA interactions in real time / Y. Harada, T. Funatsu, K. Murakami [et al.] // *Biophys. J.* – 1999. – Vol. 76. – P. 709–715.
- Herbert, K. M.* Single-molecule studies of RNA polymerase: motoring along / K. M. Herbert, W. J. Greenleaf, S. M. Block // *Annu. Rev. Biochem.* – 2008. – Vol. 77. – P. 149–176.
- Kabata, H.* Visualization of single molecules of RNA polymerase sliding along DNA / H. Kabata, O. Kurosawa, I. Arai [et al.] // *Science*. – 1993. – Vol. 262. – P. 1561–1563.
- Kim, J. G.* Kinetic studies on Cro repressor-operator DNA interaction / J. G., Kim, Y. Takeda, B. W. Matthews [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1987. – Vol. 196. – P. 149–158.
- Riggs, A. D.* The lac repressor-operator interaction. 3. Kinetic studies / A. D. Riggs, S. Bourgeois, M. Cohn // *J. Mol. Biol.* – 1970. – Vol. 53. – P. 401–417.
- Roe, J.-H.* Kinetics and mechanism of the interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with the λP_R promoter / J.-H. Roe, R. R. Burgess, M. T. Record // *J. Mol. Biol.* – 1984. – Vol. 176. – P. 495–521.
- Skinner, G. M.* Promoter binding, initiation, and elongation by bacteriophage T7 RNA polymerase. A single-molecule view of the transcription cycle / G. M. Skinner, C. G. Baumann, D. M. Quinn [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 3239–3244.
- Slutsky, M.* Kinetics of protein-DNA interaction: facilitated target location in sequence-dependent potential / M. Slutsky, L. A. Mirny // *Biophys. J.* – 2004. – Vol. 87. – P. 4021–4035.
- van den Broek B.* How DNA coiling enhances target localization by proteins / B. van den Broek, M. A. Lomholt, S.-M. J. Kalisch [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2008. – Vol. 105. – P. 15738–15742.
- von Hippel, P. H.* Facilitated target location in biological systems / P. H. von Hippel, O. G. Berg // *J. Biol. Chem.* – 1989. – Vol. 264. – P. 675–678.

Розділ 8

ДНК У ХРОМАТИНІ

Загальна довжина молекул ДНК в ядрі еукаріотичної клітини – близько 2 м. Зрозуміло, що мають існувати спеціальні механізми для упакування такої кількості ДНК в ядрі мікронних розмірів. Але не йдеться тільки про компактизацію – упаковка ДНК, яка знижує загальну доступність подвійної спіралі до ДНК-зв'язувальних білків, має при цьому дозволяти вибірково активацію різноманітних функціональних процесів на певних ділянках у певні моменти часу. Ці альтернативні завдання вирішуються завдяки тому, що ДНК існує в клітинному ядрі у вигляді компактного, але досить динамічного нуклеопротейнового комплексу – хроматину. Крім ДНК, основними структурними компонентами хроматину є гістони – збагачені позитивно зарядженими амінокислотними залишками білки п'яти типів. Зрозуміло, що компонентами хроматину є також численні ДНК-зв'язувальні білки, про які йшла мова в попередньому розділі.

Організація хроматину відрізняється наявністю ієрархії кількох структурних рівнів. На першому рівні вся ядерна ДНК формує за рахунок взаємодії з чотирма коровими гістонами H2A, H2B, H3 та H4 елементарні одиниці, що повторюються, – нуклеосоми – із середньою щільністю одна нуклеосома на ~200 пар основ. Корчастинки нуклеосом, які містять гістоновий кор і ДНК довжиною ~145 пар основ, з'єднані міжнуклеосомними ділянками ДНК – лінкерами. На другому рівні компактизації полінуклеосомний ланцюг утворює за участю п'ятого гістону (лінкерного гістону H1) так звану фібрилу товщиною 30 нм. Хроматинова фібрила, у свою чергу, формує петлі розміром 20–200 тис. пар основ, кінці яких жорстко закріплені на скелетних структурах ядерного матриксу. Ядерний матрикс – це система білкових філаментів, яка формує структурний каркас ядра. З білками матриксу взаємодіють ділянки ДНК довжиною від 300 до 1000 пар основ – ділянки, асоційовані з матриксом (MAR, Matrix Associated Regions). Оскільки основи петлі фіксуються на матриксі, ДНК у складі петлі має топологічні обмеження, тобто

є еквівалентною циркулярній. Одна петля, що містить один або кілька генів, розглядається як окремий елемент регуляції процесів транскрипції та реплікації. Тут і далі в цьому розділі мається на увазі хроматин у період інтерфази – між двома клітинними поділами, тобто тоді, коли на ДНК відбувається більшість функціональних процесів. Коли клітина вступає до мітозу, хроматиновий комплекс (хромосома, до складу якої входить одна довга молекула ДНК) починає далі компактизуватися й утворюється надкомпактна мітотична хромосома, деталі структурної організації якої залишаються недостатньо зрозумілими.

Структура та динаміка хроматину мають визначальний вплив на регуляцію транскрипції та усіх інших процесів у клітинному ядрі, а сама ця тема є надзвичайно багатоплановою. У цьому розділі увагу зосереджено на фізичних аспектах існування та функціонування ДНК у хроматині.

8.1. НУКЛЕОСОМА

8.1.1. Структура нуклеосоми:

загальний огляд

Білковий компонент нуклеосоми – корові гістони H2A, H2B, H3 і H4, які становлять один із найбільш еволюційно консервативних класів білків, – побудовані за спільною схемою. У первинній структурі (гістони містять від 102 до 135 амінокислотних залишків) виділяють дві частини: глобулярну та N-кінцеву неупорядковану (хвіст) довжиною від 20 (H2A) до 40 (H3) амінокислотних залишків. Гістон H2A має також помітний C-кінцевий хвіст довжиною близько 15 залишків. Невпорядковані хвости практично не містять гідрофобних залишків, збагачені позитивно зарядженими амінокислотами і є субстратами для численних посттрансляційних ковалентних модифікацій.

Глобулярна частина всіх корових гістонів також має спільну структуру. Вона виглядає як характерний триспіральний гістоновий мотив (histone fold), у якому одна довга α -спіраль ($\alpha 2$) фланкована двома короткими ($\alpha 1$, $\alpha 3$), приєднаними до неї петлями L1, L2 (рис. 25, кольор. вст.). Гістон H3 містить також додаткову α -спіраль з боку N-кінця мотиву (αN -спіраль), гістон H2B – додаткову αC -спіраль, дві короткі α -спіралі знаходяться з двох боків поза гістоновим мотивом у складі гістону H2A. Гістоновий мотив не формує гідрофобного ядра, заекранованого від розчинника, – значна кількість гідрофобних залишків опиняється на поверхні. Унаслідок цього одна молекула корового гістону не може існувати як окремий глобулярний білок у водному розчині. Мінімальними стабільними структурними одиницями є гетеро-

димери H2A-H2B та H3-H4 (обидва мають подібну структуру, яку зображено на рис. 25, кольор. вст.). Два гістонові мотиви формують у складі димерів щільне гідрофобне ядро, а специфічність утворення гетеродимерів залежить від наявності додаткових α N- та α C-спіралей у гістонах H3 та H2B відповідно.

На поверхні димеру розташовані три зони скупчення позитивно заряджених амінокислотних залишків, які здатні взаємодіяти з ДНК за електростатичним механізмом: у місцях взаємодії між петлями L1 та L2 різних субодиниць (де утворюються дуже короткі елементи міжмолекулярної β -структури) та в зоні контакту між N-кінцями спіралей α 1. Разом ці три сайти створюють платформу для зв'язування ділянки ДНК довжиною 27–28 пар основ (~2,5 витка подвійної спіралі, рис. 25, кольор. вст.).

У розчині за фізіологічних умов два гетеродимери H3-H4 взаємодіють між собою за рахунок утворення чотириспірального пучка між спіралями α 3 та C-кінцевими частинами довгих спіралей α 2 гістонових мотивів молекул H3. У результаті формується тетрамер $(H3-H4)_2$ – комплекс, який займає центральну позицію в структурі нуклеосоми та зв'язує ~55 пар основ (рис. 25, кольор. вст.). Комплекс тетрамеру з ДНК називають *тетрасомою*. Структура тетрамеру та тетрасоми нагадує підкову, яка характеризується хіральністю – утворює елемент лівої суперспіралі. Вісь симетрії другого порядку тетрамерного комплексу (яка водночас є і віссю симетрії другого порядку всієї нуклеосоми) проходить через інтерфейс між двома молекулами H3 та центральну пару основ (вісь симетрії другого порядку – лінія, обертання навколо якої на 180° переводить одну частину структури в іншу).

Аналогічний за своєю структурою чотириспіральный пучок між гістоновими мотивами молекул H4 та H2B служить для забезпечення взаємодій між тетрамером $(H3-H4)_2$ та димером H2A-H2B. Таким чином, "підкова" тетрамеру симетрично продовжується двома димерами H2A-H2B в обидва боки, результатом чого є утворення білкового кора нуклеосоми – октамеру $(H2A-H2B-H3-H4)_2$. Можна сказати, що зв'язування гістонових комплексів з ДНК характеризується високою позитивною кооперативністю (підрозд. 7.4), результатом реалізації ДНК-гістонових та гістон-гістонових взаємодій є формування на поверхні октамеру ~1,7 витка лівої суперспіралі ДНК. Структуру нуклеосоми, що містить ДНК довжиною 147 пар основ, встановлену методом рентгеноструктурного аналізу кристалів нуклеосом у лабораторії Річмонда (Timothy Richmond), показано на рис. 26, кольор. вст.

Октамер гістонів, на відміну від гістонових комплексів нижчого порядку, може існувати за фізіологічних умов лише при його взаємодії з ДНК – для стабілізації октамеру необхідно нейтралізувати позитивні заряди гістонів. За відсутності ДНК октамер формується в умовах високої іонної сили (2 М NaCl) та високої загальної концентрації гістонів (1 мг/мл та вище). Отже, білковий кор нуклеосоми складається з трьох структурних модулів: тетрамеру $(H3-H4)_2$ (який може іноді розпадатися на два гетеродимери) і двох димерів H2A-H2B. Загалом октамер

стабілізується за рахунок контактів між гістонами H4 та H2B в інтерфейсі між тетрамером і димером H2A-H2B; крім того, додаткову роль відіграють контакти між молекулами H2A двох димерів.

Вісь симетрії нуклеосоми проходить через центральну пару основ нуклеосомної ДНК, у цій точці великий жолобок подвійної спіралі є зверненим до поверхні октамеру гістонів (рис. 25 і 26, кольор. вст.). ДНК-гістонові взаємодії здійснюються в позиціях, де маленький жолобок контактує з октамером – з позитивно зарядженими сайтами на поверхні гістонових димерів. Один із прикладів таких контактів зображено на рис. 8.1 – занурення залишку аргініну в маленький жолобок відбувається в кожному такому сайті взаємодії. У кожному сайті два фосфатні залишки різних ланцюгів ДНК (по обидва боки від маленького жолобка) жорстко фіксуються на поверхні октамеру, яка задає певну конформацію нуклеосомної ДНК, що розглядатиметься в наступному підпідрозділі. Гістони в основному взаємодіють з цукрофосфатним остовом ДНК: головну роль відіграють електростатичні контакти, до яких залучаються залишки аргініну та лізину, а також N-кінцеві частини диполів гістонових спіралей $\alpha 1$ (див. підрозд. 7.1). При цьому реалізуються численні водневі зв'язки з цукрофосфатним остовом (до більшої частини їх залучені залишки Arg та Lys) як безпосередні між ДНК і гістонами, так і опосередковані молекулами води (див. підпідрозд. 7.3.1). Спостерігаються також водневі зв'язки з азотистими основами, які не можуть відігравати значної ролі у зв'язуванні (13 % від загальної кількості безпосередніх водневих зв'язків). Водневі зв'язки в даному випадку слід розглядати як ізоенергетичний наслідок заміни частини водневих зв'язків з водою на контакти між полярними поверхнями – головним чинником зв'язування є електростатичні взаємодії.

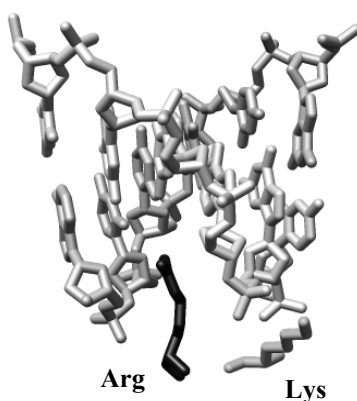


Рис. 8.1. Приклад контактів між двома позитивно зарядженими амінокислотними залишками та маленьким жолобком ДНК у складі нуклеосоми (зі структури на рис. 26, кольор. вст.)

З указаними вище сайтами на поверхні чотирьох гістонових димерів взаємодіє центральна частина – 121 пара основ (~12 витків подвійної спіралі) – нуклеосомної ДНК (12 контактів з маленьким жолобком). Два останні контакти (перед виходом ДНК із нуклеосоми) з маленькими жолобками реалізуються за допомогою α N-спіралей гістонів H3 (рис. 25 і 26, кольор. вст.). Загалом нуклеосомна ДНК містить трохи більше 14 витків, невеликі додаткові фрагменти на кінцях стабілізуються частинами N-кінцевих хвостів H3, які фланкують α N-спіралі.

Нуклеосомна ДНК зв'язана з глобулярною частиною октамеру гістонів, кінцеві непорядковані хвости гістонів практично не беруть у цьому участі. N-кінцеві хвости гістонів H3 та H2B виходять за межі нуклеосоми через канали, сформовані маленькими жолобками двох дуплексів сусідніх витків нуклеосомної суперспіралі (рис. 26 і 27, кольор. вст.): один із чотирьох хвостів H3 та H2B проходить через такий канал через кожні ~20 пар основ уздовж нуклеосомної ДНК. Ділянки хвостів, які безпосередньо розташовані в каналах, є позитивно зарядженими й додатково скріплюють сусідні витки суперспіралі. Іншим наслідком такого розташування чотирьох хвостів є сама необхідність створення каналів, тобто точного розташування маленьких жолобків сусідніх витків один напроти одного, що накладає певні обмеження на спіральну періодичність нуклеосомної ДНК. N-кінцеві хвости пістонів H4 та H2A взаємодіють з маленьким жолобком зовні нуклеосомної суперспіралі. Особливе місце – входу/виходу нуклеосомної ДНК – займають найдовші N-кінцеві хвости гістону H3. Позитивно заряджений хвіст H3 стабілізує структуру нуклеосоми в цій зоні, де спостерігається найвища щільність негативних зарядів ДНК.

Зазначеним внеском у стабілізацію нуклеосоми роль хвостів не обмежується. Значна частина гістонових хвостів просто виходить за межі нуклеосоми (рис. 26 і 27, кольор. вст.). Завдяки своїй структурній лабільності вони приймають участь в організації хроматину на наднуклеосомному рівні (підрозд. 8.3), а також відіграють важливу роль платформи для зв'язування різноманітних білків, спорідненість до яких визначається посттрансляційними модифікаціями хвостів. Остання роль хвостів є одним з ключових елементів системи регуляції транскрипції. Співвідношення між патерном модифікацій та набором білків, які впізнають такий патерн, що, у свою чергу, має певні функціональні наслідки, називають *гістоновим кодом*.

Модифікаціям піддаються конкретні (такі, що мають конкретну позицію у складі поліпептидного ланцюга) амінокислотні залишки певного типу. Найбільш вживаною модифікацією є **ацетилювання** залишків Lys – перенесення ацетату на аміногрупу (загалом більше 30 залишків може бути ацетильовано у складі нуклеосоми). Результатом реакції є зникнення позитивного заряду Lys. Два типи ферментів-антагоністів – гістон-ацетилтрансферази та гістон-деацетилази – підтримують певний динамічний гомеостаз ацетилювання/деацетилювання, зсунутий у той чи інший бік у певних ділянках хроматину.

До інших модифікацій відносяться: *метилування* Lys та Arg (до 16 залишків на нуклеосому) – перенесення метильних груп на аміногрупу Lys або на гуанідинову групу Arg; *фосфорилювання* кількох залишків Ser – перенесення фосфатного залишку на ОН-групу; *убіквітинування* чотирьох залишків Lys (по одному в гістонах H2A та H2B) – приєднання до аміногрупи невеликого глобулярного білка – убіквітину.

Серед усіх модифікацій, лише про ацетилювання можна сказати, що воно чітко корелює з транскрипційною активністю: гіперацетильовані гістони присутні в активних ділянках хроматину, у репресованих підтримується деацетильований статус. Інші модифікації впливають на функціональний стан не так однозначно – залежно від загального контексту модифікацій. Крім того, на відміну від інших модифікацій, високий рівень ацетилювання призводить також до неспецифічних наслідків, оскільки суттєво знижує позитивний заряд хвостів. Це не впливає на структуру нуклеосоми (яка практично не залежить від хвостів), але змінює характер структурної динаміки як нуклеосоми (підрозд. 8.2), так і хроматинової фібрили на наднуклеосомному рівні її організації (підрозд. 8.3).

8.1.2. Структура ДНК у нуклеосомі

На рис. 8.2 зображено нуклеосомну ДНК та одну з її симетричних половин. Центральну точку нуклеосомної ДНК, через яку проходить вісь симетрії другого порядку (вісь проходить точно через пару основ), і в якій великий жолобок подвійної спіралі є поверненим до поверхні октамеру гістонів, прийнято позначати як SHL 0 (SuperHelical Location – суперспіральна позиція). Позиції, де великий жолобок знову опиняється поверненим до поверхні октамеру (через кожен виток подвійної спіралі), позначають цілими числами від 1 до 6 (при русі від центру до периферії за годинниковою стрілкою, рис. 8.2) та від -1 до -6 (у протилежному напрямку). Відповідно, SHL $\pm 0,5$; $\pm 1,5$ і т.д. є позиціями, де маленький жолобок контактує з поверхнею октамеру (див. також рис. 26, кольор. вст.): нуклеосомна ДНК на ділянці від SHL -2,5 до +2,5 зв'язана з тетрамером (H3-H4)₂, від SHL $\pm 3,5$ до $\pm 5,5$ – з димерами H2A-H2B, в SHL $\pm 6,5$ – з α N-спіралями гістонів H3.

Очевидно, що подвійна спіраль є значно вигнутою на поверхні октамеру гістонів, а загальна конфігурація її осі може бути апроксимована ідеальною лівою суперспіраллю із радіусом 41,9 Å і кроком 25,9 Å (див. підпідрозд. 5.1.5). Центральні 133 пари основ такої суперспіралі дають 1,67 витка, дві ділянки по 7 пар основ на вході/виході просто продовжують хід нуклеосомної ДНК по прямій.

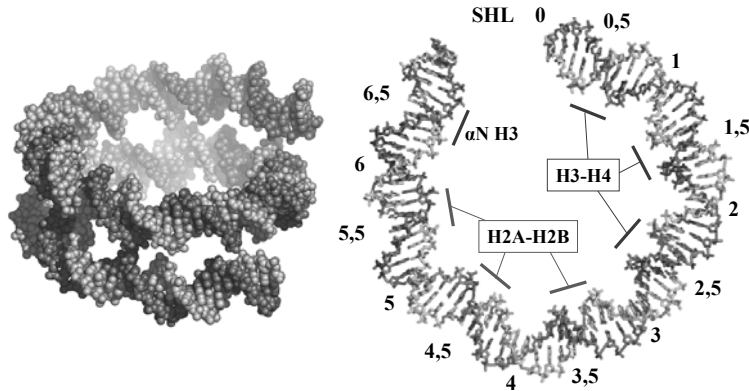


Рис. 8.2. ДНК довжиною 147 пар основ у нуклеосомі (зі структури на рис. 26, кольор. вст.) та одна з її симетричних половин (73 + одна центральна пара основ). Указано суперспіральні позиції SHL і сайти взаємодії з гістоновими димерами та α N-спіраллю H3

Нуклеосомна суперспіраль є майже ідеальною. Щоб з'ясувати, що означає "майже" в попередньому реченні, слід спочатку зупинитись на тому, як має змінитись конформація дуплекса для утворення *ідеальної* суперспіралі.

Як відмічено в підпідрозд. 5.1.5, ідеальна спіральна лінія (задається рівн. 5.10) характеризується тим, що в кожній точці має постійне значення кривизни та геометричного кручення – обидві константи однозначно визначаються радіусом та кроком спіралі. Для ДНК "кожна точка" – це кожен динуклеотидний крок уздовж подвійної спіралі, а кривизна є пропорційною куту вигину Γ між сусідніми парами основ, який, у свою чергу, залежить від значень кутів рола ρ й тилта τ : $\Gamma = (\tau^2 + \rho^2)^{1/2}$ (підпідрозд. 1.2.2). Одна з можливостей реалізувати постійну кривизну полягає в тому, щоб конформаційні кути змінювались від одного кроку до іншого періодично та зі зсувом по фазі на чверть періоду:

$$\begin{aligned} \rho &= \Gamma \cos(i\Omega_{loc}), \\ \tau &= \Gamma \sin(i\Omega_{loc}), \end{aligned} \tag{8.1}$$

де i – порядковий номер пари основ (другої пари кроку), який набуває позитивних і негативних значень, починаючи від центральної пари нуклеосомної ДНК з нульовим номером, Ω_{loc} – певний кут, що визначає періодичність. Бачимо, що в такому випадку сума квадратів двох кутів є для кожного кроку постійною величиною – рівняння (8.1) визначають суперспіральну конфігурацію з постійною кривизною. Крок такої суперспіралі залежить від співвідношення між кутом твіста Ω на кожному кроці та Ω_{loc} . Нехай $\Omega_{loc} = \Omega$ і на деякому кроці аргумент тригонометричних

функцій у рівн. (8.1) є кратним до 360° – рол набуває максимального позитивного значення Γ (вигин у великий жолобок), тилт дорівнює нулю. Через чверть витка подвійної спіралі в тому самому напрямку на поверхні дуплекса, де на вихідному кроці розміщувався великий жолобок, розташований один із ланцюгів; у цій точці ($\Omega_{loc} = \Omega$ змінився на 90°) $\rho = 0$, $\tau = \Gamma$ – вигин у бік цукрофосфатного остова, але в тому ж напрямку, що й на вихідному кроці. Через піввитка місце великого жолобка займає маленький жолобок – $\rho = -\Gamma$, $\tau = 0$; через виток знову маємо максимальний рол у тому самому напрямку, що на вихідному кроці. Інакше кажучи, реалізується вигин ДНК в одній площині: геометричне кручення і крок суперспіралі дорівнюють нулю. Щоб суперспіраль була лівою, точки максимального значення рола й тилта мають бути розділеними дещо меншою кількістю пар основ, ніж укладається на повний виток дуплекса. Тобто необхідно, щоб виконувалась умова $\Omega_{loc} > \Omega$ (для правої суперспіралі – навпаки). Різниця $\Omega_{loc} - \Omega$ є при цьому пропорційною геометричному крученню (рівн. 5.4), а величина Ω_{loc} – це кут локального твіста, який визначає періодичність ДНК відносно поверхні октамеру гістонів (тобто відносно нормалі до поверхні, яка збігається з нормаллю суперспіралі, див. підрозд. 5.1.2, 5.1.5).

Отже, для створення ідеальної лівої суперспіралі ДНК необхідно, щоб рол і тилт змінювались періодично вздовж подвійної спіралі з однаковою амплітудою за рівн. (8.1), а також щоб кут локального твіста, який визначає цю періодичність, був більшим, ніж кут твіста подвійної спіралі. Реальні конформаційні параметри нуклеосомної ДНК, які демонструють відхилення від такої "ідеальної поведінки", представлено на рис. 28, кольор. вст.

По-перше, відповідно до анізотропії подвійної спіралі щодо вигину (підрозд. 1.4), рол дає значно більший внесок у вигин нуклеосомної ДНК, ніж тилт. Якщо варіації останнього є досить безладними (середнє значення тилта близьке до нуля, а стандартне відхилення – до значення, що спостерігається для білково-нуклеїнових комплексів узагалі, табл. 1.3), то рол змінюється періодично з високою амплітудою. При цьому вигин у бік великого жолобка (позитивний рол) є суттєво більшим порівняно з вигином у бік маленького жолобка. Крім того, спостерігаються різкі вигини в декількох місцях, імовірно пов'язані з особливостями конкретної послідовності ДНК: наприклад, три різкі негативні вигини в SHL 3,5; 4,5 та 5,5 (рис. 28, кольор. вст.) трапляються на кроках CA/TG. Такі залежні від послідовності особливості конформації ДНК відображають певний структурний поліморфізм нуклеосом (див. нижче). Отже, вигин нуклеосомної ДНК в основному визначається змінами рола.

Періодична зміна твіста є цілком очікуваною і відображає добре відому негативну кореляцію між цим параметром і ролом (підрозд. 1.4). Середнє значення твіста відповідає періодичності 10,4 пар основ/виток подвійної спіралі в нуклеосомі – тобто дещо менше, ніж для вільної ДНК у розчині (зазвичай $\sim 10,5$ пар основ/виток). При цьому осциляція рола відбувається практично з таким самим періодом – усупереч очікуванням, твіст і локальний твіст практично не відрізняються один від одного в нуклеосомній суперспіралі.

Натомість спостерігається періодична зміна слайда: кожного разу, коли великий жолобок є орієнтованим до поверхні октамеру гістонів (цілі значення SHL), слайд має негативні значення (у середньому $\sim -0,5 \text{ \AA}$): реалізується зсув пари основ у напрямку другого ланцюга, тобто зсув відбувається вздовж осі нуклеосомної суперспіралі в напрямку, що відповідає саме лівій спіралі (див. праворуч на рис. 1.10, а, б; 8.3; та рис. 26, кольор. вст.). Коли до поверхні октамеру орієнтований маленький жолобок, слайд має позитивні значення (більш ніж удвічі більші за абсолютною величиною порівняно з великим жолобком): зсув до першого ланцюга, який через піввитка дуплекса займає місце другого ланцюга на поверхні ДНК. Отже, суперспіральність нуклеосомної ДНК визначається періодичною зміною слайда: якщо в структурі нуклеосомної ДНК зберегти всі конформаційні параметри такими, як вони є, але задати нульове значення слайда на кожному кроці, то реалізується вигин подвійної спіралі в одній площині (рис. 8.3).

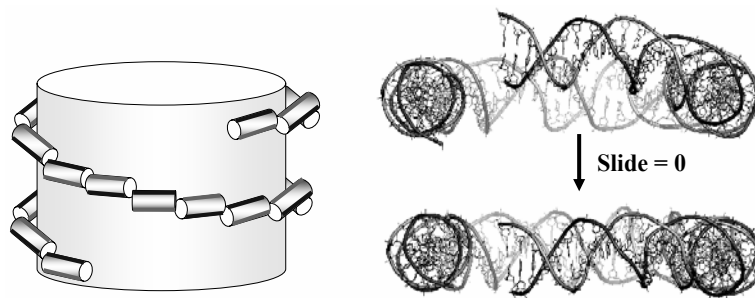


Рис. 8.3. Механізм утворення нуклеосомної суперспіралі за рахунок періодичної зміни слайда. Ліворуч: кожний маленький циліндр символізує ділянку ДНК довжиною піввитка подвійної спіралі, стик між циліндрами – місце, де один із жолобків орієнтований до поверхні гістонів (великий циліндр), темними та світлими відрізками позначено два ланцюги ДНК, що перехрещуються на стиках. Праворуч: половина нуклеосомної ДНК (інша проекція структури з рис. 8.2) перетворюється на планарне кільце, якщо задати $\text{Slide} = 0$ на кожному кроці, зберігаючи всі інші параметри без змін.
Адаптовано з роботи Tolstorukov *et al.* (2007)

Що стосується двох інших конформаційних параметрів зсуву, шифт варіює безладно (іноді в досить широких межах), відображаючи певні нерегулярності у структурі ДНК, залежні від вигинів (унаслідок кореляцій між різними параметрами) та/або від особливостей послідовності. Райз варіює в дуже вузьких межах (середнє значення $3,35 \text{ \AA}$), що вказує на збереження міцних стекінг-взаємодій у нуклеосомній ДНК.

Повертаючись до кутових параметрів, слід особливо зупинитися на різниці між середнім твістом ДНК у нуклеосомі та в розчині, яка свідчить про торсійну деформацію подвійної спіралі (закручування) на поверхні октамеру гістонів. Це закручу-

вання, так само як і вигин, зумовлене ДНК-гістоновими взаємодіями – розподіл позитивно заряджених сайтів зв'язування по поверхні октамеру вимагає зміни твіста для підведення фосфатних залишків під міцні контакти. Крім того, обмеження на твіст накладаються необхідністю сформувати канали виходу гістонових хвостів між двома витками суперспіралі (попередній підпідрозділ). Проте структура нуклеосоми допускає досить значні залежні від послідовності варіації твіста як локальні, так і в середньому по нуклеосомній ДНК.

Досі в цьому розділі обговорювалась одна кристалічна структура нуклеосоми (нуклеосома-147), яка містить спеціально сконструйовану молекулу ДНК довжиною 147 пар основ: два однакові за послідовністю інвертовані фрагменти довжиною по 73 пари основ плюс одна пара між ними. Тобто загальна послідовність являє собою паліндром – за винятком центрального нуклеотиду, читається однаково по обом ланцюгам від 5'- до 3'-кінця. Таким чином, і послідовність, і структура нуклеосоми характеризуються ідеальною симетрією другого порядку. На сьогодні в усіх кристалографічних роботах щодо структури нуклеосоми, крім цієї послідовності, були використані ще тільки три інші симетричні (дві довжиною по 146 пар основ, та одна – 145 пар основ) та одна асиметрична послідовність (так звана "послідовність 601"). Послідовність ДНК нуклеосоми-145 відрізняється від нуклеосоми-147 відсутністю двох симетричних пар основ на кінцевих ділянках. Обидві послідовності у складі симетричних нуклеосом-146 складаються з двох інвертованих повторів по 73 пари основ кожен. Повтор першої нуклеосоми практично збігається за послідовністю (за винятком однієї пари основ) з повтором, використаним у нуклеосомі-147. Послідовність повтору другої нуклеосоми-146 інша. Оскільки вісь симетрії другого порядку проходить точно через пару основ, обидві структури зі 146 парами основ виявились дещо асиметричними – одна центральна пара та дві половини нуклеосомної ДНК довжиною 73 та 72 пари основ.

Асиметрія нуклеосомної ДНК довжиною 146 пар основ проявляється в тому, що більш коротка половина змушена, заради реалізації контактів з поверхнею октамеру гістонів (який зберігає симетрію), трохи розтягнутися (дещо зростає райз) і збільшити закручення – сумарна кількість витків дуплекса залишається такою самою, що й для більш довгої половини, а кількість пар основ є зменшеною на 1. У результаті середній кут твіста коротшої половини зростає (кількість пар основ на виток дуплекса зменшується). Середнє значення твіста у двох нуклеосомах-146 відповідає періодичності подвійної спіралі 10,23 та 10,15 п.о./виток. У першій нуклеосомі довша й коротша половини мають відповідно 10,3 й 10,16 п.о./виток, у другій – 10,22 і 10,08 п.о./виток. Зростання кута твіста та розтягування реалізуються локально на ділянках довжиною по ~12 пар основ, але в різних місцях для двох нуклеосом: в області SHL -2 або -5 (якщо для довшої половини використовувати позитивні значення SHL). У довшій половині саме ці місця характеризуються меншими, порівняно з іншими ділянками, значеннями твіста – локальне розтягування/закручування (stretching/overtwisting) відбувається там, де подвійна спіраль

легше може здійснити торсійну деформацію. Нуклеосома-145 є симетричною, але в ній в обох половинах спостерігається розтягування/закручування в $SHL \pm 2$ (на ділянці довжиною ~ 9 пар основ зростає райз до $3,63 \text{ \AA}$ та кут твіста); середній кут твіста відповідає $10,26$ п.о./виток. Отже, навіть одна й та сама послідовність (у нуклеосомах-145 і -147) при утворенні нуклеосоми має "вибір" – або зберегти мінімальне значення райза та твіста, або трохи розтягнутись та збільшити закручення в певному невеликому сайті.

Найімовірніше, такий сайт розтягування/закручування може бути локалізований тільки у двох місцях – у $SHL \pm 2$ або ± 5 , тобто в позиціях, фланкованих однотипними сайтами взаємодії ДНК з поверхнею гістонових димерів H3-H4 та H2A-H2B відповідно (див. рис. 8.2; 25 і 26, кольор. вст.). Цю закономірність було підтверджено у ще одній кристалографічній роботі, де досліджувалась структура нуклеосоми, що містить "послідовність 601" – синтетичну випадкову нуклеотидну послідовність, відібрану як така, що має підвищений потенціал щодо позиціонування нуклеосоми (підрозд. 8.4). Нуклеосома-601 містить 145 пар основ ДНК (послідовність є асиметричною), середній кут твіста відповідає $10,09$ п.о./виток, розтягування/закручування реалізується локально на ділянках по ~ 13 пар основ в оточенні $SHL \pm 5$. Слід зауважити, що незважаючи на асиметрію послідовності 601, дві половини октамеру гістонів у складі нуклеосоми-601 характеризуються симетрією, більш того – структура октамеру у складі нуклеосом-147 та 601, незважаючи на відмінності в конформації ДНК, є дуже подібною. Отже, октамер гістонів, зберігаючи більш-менш жорстку структуру, "вимагає" від ДНК реалізувати контакти з гістонами, а подвійна спіраль адаптується під ці контакти, змінюючи свою конформацію в певних межах залежно від своєї нуклеотидної послідовності.

Спіральна періодичність ДНК для нуклеосом, що містять інші послідовності, досить широко досліджувалася за допомогою футпринтингу – розщеплення ДНК у нуклеосомі ДНКазою I або вільними радикалами. ДНКазою I та вільні OH^{\bullet} радикали розщеплюють тільки експоновані зони кожного ланцюга ДНК з боку маленького жолобка; ділянки, які зв'язані з гістонами, залишаються захищеними. М'яка обробка ферментом чи радикалами дає набір фрагментів, розмір яких є кратним періодичності експонування, що можна проаналізувати за допомогою електрофорезу в денатуруючих умовах. За цими даними періодичність варіює від $9,9$ до $10,5$ пар основ/виток, у середньому дорівнюючи $10,2-10,3$ пар основ/виток.

Отже, властивості конкретної послідовності, яка входить до складу нуклеосоми, визначають особливості її конформації – згідно із загальними уявленнями щодо білково-нуклеїнових взаємодій (підрозд. 7.3.4) відбувається тонка підгонка конформації ДНК під поверхню октамеру гістонів. Нуклеосомам притаманний певний структурний поліморфізм – саме такий поліморфізм і не дозволяє отримати структурну інформацію високого розділення на кристалах нуклеосом, приготованих просто з тотального препарату нуклеосом хроматину.

8.1.3. Стабільність нуклеосоми

Описані в попередньому підпідрозділі значні деформації нуклеосомної ДНК потребують енергетичних витрат. Щоб приблизно оцінити найвагомійший дестабілізуючий внесок від вигину ДНК, можна скористатись рівн. 4.13: якщо персистентна довжина ДНК дорівнює 50 нм, то вигин 133 пар основ із радіусом кривизни 4,23 нм (виходячи з параметрів суперспіралі, що визначають кривизну, як зазначено в підпідрозд. 5.1.5) потребує 62 одиниць $k_B T$. Крім деформацій ДНК, ще одним дестабілізуючим внеском у вільну енергію нуклеосоми є електростатичне розштовхування між сусідніми витками суперспіралі ДНК.

Стабілізують нуклеосому, компенсуючи несприятливі внески, кілька факторів. Перший – взаємодії, насамперед електростатичні, між ДНК і гістонами, які утримують деформовану подвійну спіраль на поверхні октамеру гістонів. Але не менш важливими є гістон-гістонові взаємодії, що забезпечують цілісність самого октамеру. При цьому останні, у першу чергу це стосується взаємодій між димерами H2A-H2B та тетрамером (H3-H4)₂, залежать від електростатичних ДНК-гістонових взаємодій – міцний контакт між димером і тетрамером є можливим за умови нейтралізації позитивних зарядів гістонів фосфатами ДНК. Інакше кажучи, взаємодія гістонових комплексів з ДНК забезпечує можливість утворення октамеру, тоді вигнутий стан нуклеосомної ДНК підтримується одночасно її адсорбцією на поверхні комплексів і взаємодіями між самими комплексами. Розгортання нуклеосомної ДНК є можливим у два способи: або внаслідок порушення електростатичних взаємодій з гістонами, або шляхом порушення гістон-гістонових взаємодій, наприклад у присутності денатурантів, коли нуклеосомна ДНК розгортається разом із зв'язаними з нею гістонами. Додатковими факторами, що стабілізують структуру нуклеосоми, є асиметрична нейтралізація зарядів подвійної спіралі гістонами із внутрішнього боку вигину (підпідрозд. 3.5.2) і присутність позитивно заряджених неупорядкованих хвостів, які знижують електростатичне розштовхування сусідніх витків нуклеосомної суперспіралі.

Серед зазначених внесків у вільну енергію нуклеосоми тільки один – енергія деформацій подвійної спіралі – залежить від послідовності пар основ, усі інші є неспецифічними. Тому нуклеосоми прагнуть утворюватись на таких ділянках ДНК, які можна легше деформувати – саме такий механізм лежить в основі важливого феномена переважного позиціонування нуклеосом відносно послідовності, який розглядатиметься у підрозд. 8.4. Тепер слід тільки зауважити, що різниця вільних енергій між різними позиціями нуклеосом є досить невисокою – якщо "немає вибору", нуклеосома може сформуватись практично на будь-якій природній послідовності.

Усі неспецифічні внески у вільну енергію так чи інакше залежать від іонної сили. Відповідно, зміни концентрації солі допомагають змінити баланс вільної енергії у той чи інший бік і тим самим виявити ті чи інші взаємодії. Так, за дуже низької іонної сили (1–2 мМ NaCl) у нуклеосомі спостерігається так званий низько-сольовий перехід: розгортання кінцевих ділянок нуклеосомної ДНК при збереженні контактів з ними димерів H2A-H2B (електростатичні ДНК-гістонові контакти можуть лише підсилюватися при зниженні іонної сили). Рушійною силою низько-сольового переходу є зростання електростатичного розштовхування між сусідніми витками нуклеосомної суперспіралі, яка, подібно пружині, розгортається, руйнуючи контакти димеру H2A-H2B із тетрамером (H3-H4)₂. Ензиматичне видалення не-впорядкованих гістонових хвостів (тобто зниження ступеня нейтралізації негативних зарядів, у першу чергу – на кінцевих ділянках нуклеосомної ДНК) полегшує цей структурний перехід, зсуваючи його до дещо вищих концентрацій солі.

За фізіологічної іонної сили *in vitro* нуклеосома характеризується високою стабільністю. Електростатичні взаємодії є настільки міцними, що виключають не тільки тимчасову дисоціацію гістонових комплексів, а й навіть трансляційні переміщення нуклеосоми вздовж ДНК (слайдинг). У зв'язку з тим, що взаємне розташування ДНК і октамеру гістонів є строго детермінованим (попередні підпідрозділи), переміщення нуклеосоми потребує появи високоенергетичних інтермедіатів (часткове розгортання нуклеосомної ДНК або її прокручування по поверхні октамеру). За фізіологічних умов ці інтермедіати не є вірогідними. Зміна позицій нуклеосом у клітині потребує наявності спеціальних АТР-залежних молекулярних машин – комплексів ремоделювання хроматину (підпідрозд. 8.4.2), що полегшують утворення таких інтермедіатних станів.

У діапазоні 0,3–0,6 М NaCl спостерігається дисоціація від ДНК не-впорядкованих гістонових хвостів, а також ефективний слайдинг нуклеосом: у вказаних умовах вільна енергія інтермедіатних станів стає порівняною з енергією теплових флуктуацій, що робить можливими зміни позицій нуклеосом уздовж ДНК. Відповідно, зростання температури також підвищує ефективність слайдингу. Подальше зростання концентрації солі індукує двоступеневу дисоціацію нуклеосом: у діапазоні 0,7–1,2 М NaCl дисоціюють димери H2A-H2B, у 1,2–2,0 М NaCl – тетрамер (H3-H4)₂, який взагалі є одним з найбільш міцно зв'язаних з ДНК білків.

Оскільки електростатичні взаємодії між ДНК та гістонами за фізіологічних умов дуже міцні, зв'язування гістонів з ДНК є практично необерненим – дуже висока константа зв'язування (див. нижче) робить неможливою рівновагу між зв'язаними та дисоційованими гістонами. Тому, хоча структура нуклеосоми відповідає мінімуму вільної енергії, цього мінімуму неможливо досягти за розумний проміжок часу: при змішуванні гістони швидко та безладно зв'язуються з ДНК без подальшої дисоціації. Реконструкція нуклеосом *in vitro* можлива шляхом поступового зниження концентрації солі в суміші ДНК і гістонів від 2 М до фізіологіч-

них або більш низьких значень за допомогою ступеневого діалізу. У таких умовах за проміжних концентрацій солі, коли електростатичні взаємодії ще не є надто ефективними, відбувається рівноважне зв'язування та формування нуклеосомної структури. Подальше зниження іонної сили "заморожує" цю структуру.

Для реалізації рівноважних умов ДНК-гістонової взаємодії *in vivo* у хроматині існують проміжні акцептори гістонів – хроматинові шаперони, які виконують роль факторів збірки/руйнування нуклеосом. Ці акцептори мають спорідненість до гістонів трохи меншу, ніж спорідненість гістонів до ДНК (рис. 8.4), що й забезпечує можливість рівноважного обміну гістонами між ДНК та проміжними акцепторами із зсувом цієї рівноваги в бік ДНК-гістонових комплексів. Наявність проміжних акцепторів гістонів приводить до можливості обміну димерами H2A-H2B між різними нуклеосомами: тимчасове видалення димерів є важливим шляхом структурної динаміки хроматину в клітині.

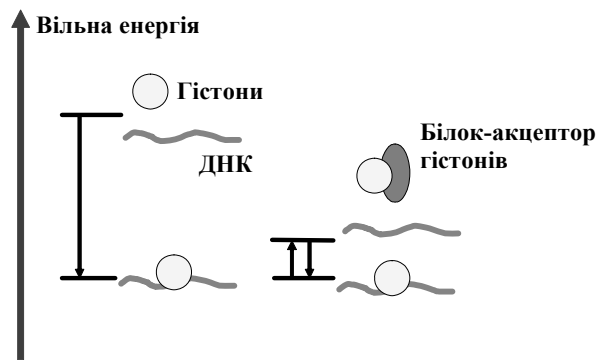


Рис. 8.4. Роль проміжних акцепторів гістонів у збірці нуклеосоми: дисоціація гістонів є практично забороненою за фізіологічної іонної сили; у присутності акцептора взаємодія гістонів із ДНК стає рівноважною

Стабільність нуклеосоми може бути випробувана за допомогою механічних маніпуляцій з індивідуальними молекулами. Наприклад, у роботі Mihardja *et al.* (2006) досліджувалось розтягування зовнішньою силою молекули ДНК, на якій містилася одна нуклеосома (сила була значно меншою, ніж потрібна для надрозтягнення ДНК, описаного в підпідрозд. 4.6.2). Унаслідок закручування ДНК у нуклеосомі загальна довжина такої конструкції в розтягнутому стані є меншою за сумарну контурну довжину ДНК, і нуклеосома чинить спротив остаточному розтягуванню до цієї контурної довжини. Остаточне розтягування реалізується при збільшенні розтягальної сили й відбувається у два етапи, що проявляються на кривій розтягування як два стрибкоподібні переходи. Перший перехід відповідає розгортанню кінцевих ділянок (у нуклеосомі залишається ~1 виток суперспіралі), другий – розгортанню центрального витка нуклеосомної ДНК (рис. 8.5).

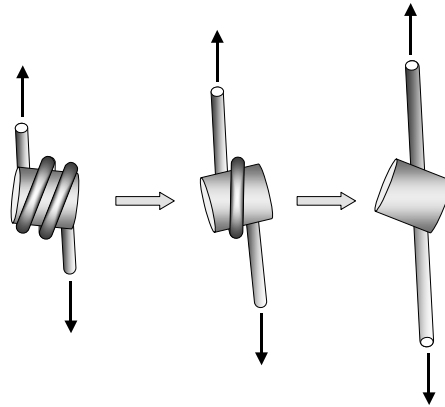


Рис. 8.5. Двоступеневе розкручування нуклеосомної суперспіралі під дією зовнішньої сили. Адаптовано з роботи Mihardja *et al.* (2006)

Другий перехід складно аналізувати кількісно, тому що він характеризується гістерезисом – повернення до вихідного стану при зменшенні розтягальної сили відбувається із запізненням, при меншому значенні сили, ніж та, за якої перехід починався. Але перший перехід описується стандартною моделлю двох станів: за проміжного постійного значення сили довжина молекули осцилює між двома значеннями, що відповідають двом станам. Аналіз отриманих залежностей (аналогічний описаному в підпідрозд. 7.4.2 стосовно галактозного оперона) дозволяє оцінити константи швидкості прямого та зворотного переходу, а отже, і константу рівноваги, у відсутності розтягальної сили. Оцінки вказують, що спонтанне розгортання кінцевих ділянок (довжиною по ~ 30 пар основ) нуклеосомної ДНК є рідкою подією: у розгорнутому стані нуклеосома проводить ~ 17 мс проти ~ 44 хв у компактному стані. Різниця вільних енергій між двома станами становить ~ 12 одиниць $k_B T$. Екстраполяція цієї величини до всієї нуклеосоми дає грубу оцінку вільної енергії утворення нуклеосоми $\sim -30 k_B T$, що відповідає екстраординарно високій константі рівноваги $\sim 10^{13} M^{-1}$. Якщо врахувати оцінений вище найбільш вагомий дестабілізуючий внесок від вигину ДНК, стабілізуючі внески у вільну енергію нуклеосоми мають становити $\sim -90 k_B T$.

При цьому ефективність взаємодій ДНК з поверхнею октамеру гістонів неоднорідна по довжині. Про це свідчить хоча б дуже різна концентрація солі, що є необхідною для дисоціації димерів H2A-H2B та тетрамеру (H3-H4)₂ (див. вище). На відносну слабкість взаємодій на кінцях нуклеосомної ДНК вказує також різна термостабільність нуклеосомної ДНК: узагалі гістони відіграють роль "скріпки" (підпідрозд. 6.1.8), але при цьому центральні ділянки нуклеосомної плавляться за більш високих температур, ніж кінцеві. Пряму оцінку відносної сили ДНК-гістонових

взаємодій по довжині нуклеосомної ДНК було здійснено за допомогою ще однієї техніки маніпуляцій з індивідуальними молекулами – розстібання подвійної спіралі (unzipping). Схему експерименту наведено на рис. 8.6: на дволанцюговій молекулі ДНК знаходиться нуклеосома, кінець одного ланцюга зафіксований в оптичній пастці, кінець іншого пришито до поверхні скельця, що рухається.

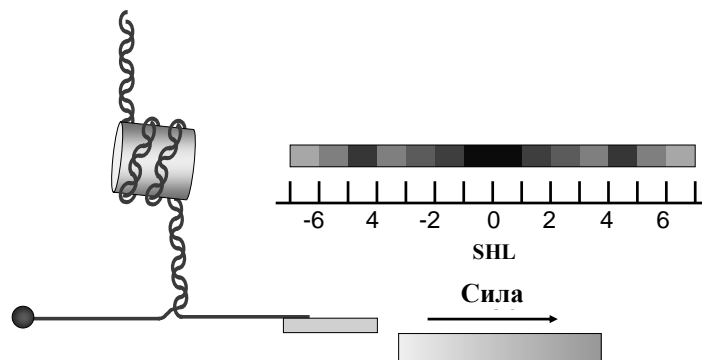


Рис. 8.6. Схema експерименту з розстібання подвійної спіралі ДНК (пояснення в тексті) і карта відносної сили ДНК-гістонових взаємодій уздовж нуклеосомної ДНК. Адаптовано з роботи Hall *et al.*, 2009

Під дією зовнішньої сили подвійна спіраль розкручується, а взаємодії ДНК з гістонами змушують скельце загальмуватись на певний час – розкручуванню передуює відрив подвійної спіралі від поверхні октамеру гістонів. Час гальмування відображає силу ДНК-гістонових взаємодій, а відстань між двома одноланцюговими кінцями ДНК, на якій це гальмування трапляється, – точку вздовж нуклеосомної ДНК, де реалізуються ці взаємодії. Результати вказують, що гальмування відбувається з періодичністю у ~ 5 нуклеотидів, відображаючи взаємодії гістонів із двома ланцюгами ДНК. Найслабкіші ДНК-гістонові контакти мають місце в SHL $\pm 6,5$ (див. рис. 8.2); відносно слабкі контакти – у SHL $\pm 5,5$, а також $\pm 3,5$ та $\pm 2,5$; зона сильніших контактів розташована в оточенні SHL $\pm 4,5$; найміцніші контакти реалізуються на ділянці між SHL $-1,5$ та $+1,5$.

Наведені дані щодо структурних перетворень нуклеосоми стосуються досить екстремальних, цілком нефізіологічних впливів. Проте вони вказують на деякі "слабкі місця" у структурі, в яких можна очікувати перебудов нуклеосоми у фізіологічних умовах. Таких місць можна назвати принаймні два: кінцеві сегменти нуклеосомної ДНК, які найменшою мірою стабілізовані в нуклеосомі, та контакти між димерами H2A-H2B та тетрамером (H3-H4)₂.

8.2. КОНФОРМАЦІЙНА РУХЛИВІСТЬ НУКЛЕОСОМИ ЗА ФІЗІОЛОГІЧНИХ УМОВ

8.2.1. Тимчасове розгортання кінцевих ділянок нуклеосомної ДНК

Одним із основних шляхів конформаційних перебудов за фізіологічних умов є тимчасове розгортання кінцевих ділянок нуклеосомної ДНК. З одного боку, висока щільність негативного заряду (контакт між сусідніми витками нуклеосомної суперспіралі) дестабілізує нуклеосому ДНК на виході з нуклеосоми, з іншого – ДНК-гістонові взаємодії на кінцевих ділянках є більш слабкими, ніж у центральній частині нуклеосомної ДНК.

Наведені в попередньому підпідрозділі приблизні оцінки дають $-30 k_B T$ як вільну енергію утворення нуклеосоми за фізіологічних умов. Але розгортання нуклеосомної ДНК має здійснюватись не за принципом "все або нічого", а поступово, починаючи з кінця ДНК – ДНК-гістонові контакти будуть тоді руйнуватись один за одним (рис. 8.7). Порушення двох контактів – по одному на обох кінцях в $SHL \pm 6/5$ – залишає $\sim 1,4$ витки суперспіралі (1,67 витки відповідають 133 парам основ, 1 виток – 80 парам). Якщо по два контакти зруйновані на кінцях, суперспіраль, що залишилась, містить $\sim 1,2$ витки.

Виходячи з наведеної сумарної оцінки вільної енергії, руйнування одного контакту – розгортання ділянки довжиною один виток подвійної спіралі – становить у середньому $\sim 2 k_B T$ (на кінцях трохи менше, усередині нуклеосомної ДНК – більше). Ця енергія, наближена до енергії теплових флуктуацій, указує на можливість спонтанного тимчасового розгортання коротких кінцевих ділянок нуклеосомної ДНК за фізіологічних умов. Константа рівноваги між розгорнутим і компактним станами одного кінцевого витка дуплекса повинна дорівнювати приблизно 0,1 (рівн. 2.3), для розгортання двох витків, коли після кінцевого руйнується другий контакт (рис. 8.7), константа конформаційного перетворення становитиме $\sim 0,01$ (приблизно протягом 1 % часу ділянка є розгорнутою). Спонтанне розгортання половини нуклеосомної ДНК (руйнування 6–7 контактів) має тоді відбуватися з низькою константою конформаційної рівноваги $\sim 10^{-6}$ – 10^{-7} .

Під час такого спонтанного розгортання специфічні сайти всередині нуклеосомної ДНК стають тимчасово доступними для взаємодії з відповідними білками. Інакше кажучи, така конформаційна динаміка нуклеосоми відкриває

можливість для "проникнення" регуляторних білків до їхніх мішеней. Оскільки специфічні білки характеризуються високою спорідненістю до своїх *цис*-елементів послідовності, взаємодія з білком може зафіксувати частково розгорнутий інтермедіатний високоенергетичний стан нуклеосоми: таким чином може полегшуватись доступ до інших сайтів шляхом подальшого розгортання. Крім того, властивість нуклеосомної ДНК спонтанно розгортатись на кінцях може використовуватись комплексами ремоделювання хроматину, які, власне, і фіксують високоенергетичні проміжні стани нуклеосоми (підпідрозд. 8.4.2), а також РНК-полімеразою для проникнення всередину нуклеосомної ДНК під час елонгації транскрипції.

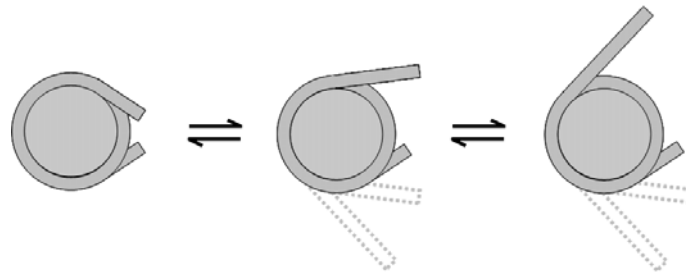


Рис. 8.7. Схема спонтанного розгортання нуклеосомної ДНК, починаючи з її кінців. На кожній стадії руйнується один контакт малого жолобка ДНК з поверхнею октамеру гістонів.

Часткове розгортання нуклеосомної ДНК за фізіологічних умов було продемонстровано експериментально. У лабораторії Відома (Jonathan Widom) було показано, що нуклеосомна ДНК є тимчасово доступною до рестрикційних ендонуклеаз. Ця доступність є найбільшою на кінцях нуклеосомної ДНК і не пов'язана з трансляційним переміщенням нуклеосом: експонування рестриктних сайтів усередині нуклеосоми відбувається за рахунок тимчасового визволення ДНК від поверхні октамеру гістонів, яке прогресує, починаючись із кінця нуклеосомної ДНК. Оцінки констант рівноваги для розгортання кінцевих ділянок різної довжини (різної відстані розташування певного рестриктного сайту від кінця) узгоджуються з наведеними вище. Тимчасове розгортання кінцевих ділянок нуклеосомної ДНК було показано також методом реєстрації резонансного переносу енергії між двома флуоресцентними мітками – на кінці нуклеосомної ДНК та на гістонах поблизу від центру нуклеосомної ДНК. За фізіологічних значень іонної сили константа розгортання одного витка дуплекса оцінюється в 0,02–0,1.

8.2.2. Конформаційна рухливість нуклеосоми в циркулярних ДНК

Оскільки *in vivo* нуклеосоми знаходяться в складі петельних доменів хроматину, вплив топологічних обмежень на структурну динаміку нуклеосом є важливим фізіологічним фактором. Кожна петля з зафіксованими на ядерному матриксі кінцями є еквівалентною або до молекули ДНК в умовах експерименту з магнітним пінцетом (підпідрозд. 4.6.1), або до циркулярної ДНК (розділ 5).

Із нуклеосомами в складі циркулярних молекул ДНК пов'язана давня проблема так званого *парадокса надспіральності*. Унаслідок формування лівої суперспіралі (негативне значення райзингу, див. підпідрозд. 5.1.5), нуклеосома вводить у циркулярну ДНК позитивну надспіралізацію або, що те ж саме, фіксує на собі частину негативної надспіралізації, якщо вона була присутня в циркулярній ДНК (аналогічний топологічний ефект унаслідок інтеркаляції розглядався в підпідрозд. 6.5.2). Якщо здійснити реконструкцію нуклеосом на циркулярній плазміді у присутності еукаріотичної топоізомерази I (підпідрозд. 5.3.1), то в отриманій таким чином циркулярній мініхромосомі мінімізовані еластичні напруження. Кількість нуклеосом у мініхромосомі підраховується під електронним мікроскопом. Далі нуклеосоми видаляються – вільна циркулярна ДНК містить негативні надспіральні витки (еластичні напруження), які вивільнилися внаслідок видалення нуклеосом (були зафіксовані нуклеосомами). Середнє число зачеплень отриманого розподілу топоізомерів циркулярної ДНК кількісно визначається за допомогою електрофорезу (підпідрозд. 5.4.1). У таких експериментах було встановлено, що зниження числа зачеплень у мініхромосомі відносно вільної циркулярної ДНК, релаксованої в таких самих умовах, практично дорівнює кількості нуклеосом. Тобто, число надспіральних витків, зафіксоване однією нуклеосомою, $\Delta Lk_n = -1$.

У топологічному сенсі нуклеосомна суперспіраль має два витки – якщо лінкер на ДНК продовжує по прямій траєкторію, задану нуклеосомною суперспіраллю (підпідрозд. 8.1.2), відбувається два негативних перехрещення осі подвійної спіралі ДНК – усередині нуклеосоми та на вході/виході. За рівн. (5.12) з урахуванням радіуса та кроку суперспіралі отримаємо оцінку райзингу нуклеосомної суперспіралі $-1,82$. Якщо взяти до уваги внесок від лінкерних ділянок (яким нехтує рівн. 5.12), то райзинг нуклеосомної ДНК оцінюється як $Wr_n \approx -1,7$. Розбіжність між Wr_n та ΔLk_n і виглядає парадоксальною. Одним із розв'язань парадокса надспіральності може бути позитивний внесок від зміни твіста нуклеосомної ДНК ΔTw_n у загальну зміну числа зачеплень (за рівн. 5.7). Це розв'язання, запропоноване у свій час Кріком та Клугом (Francis Crick, Aaron Klug), відіграло важливу роль у розвитку молекулярної біофізики, але воно не дозволяє повною мірою вирішити парадокс надспіральності. Справді, хоча ΔTw_n має позитивне значення (відбувається додаткове закручення подвійної спіралі в нуклеосомі, підпідрозд. 8.1.2), зміна твіста не є достатньо

високою, щоб повністю компенсувати Wr_n до $\Delta Lk_n = -1$. Середня спіральна періодичність нуклеосомної ДНК дорівнює 10,2–10,3 пар основ / виток, тобто, якщо середня періодичність вільної ДНК становить $\sim 10,5$ пар основ / виток, то для 147 пар основ $\Delta Tw_n \sim +0,3 \div +0,4$, і ΔLk_n залишається достатньо далеким від експериментально отриманої величини.

Відповідь дає конформаційна динаміка нуклеосоми, яку вдається зафіксувати на простій системі – мононуклеосомі, що реконструйована на циркулярній ДНК малого розміру (мініциклі). Принципову схему експериментального підходу зображено на рис. 8.8: нуклеосома реконструюється на мініциклі розміром 350–360 пар основ, після чого мініцикл обробляється топоізомеразою I (за фізіологічних значень іонної сили та температури) для максимально можливої релаксації. З цього релаксованого матеріалу видаляються гістони, і відносний вміст топоізомерів у рівноважній суміші аналізується за допомогою електрофорезу.

Унаслідок маленького розміру та, відповідно, високої жорсткості, вільні мініцикли дають зазвичай лише один топоізомер після релаксації (рис. 5.14). Але за наявності нуклеосоми для мініциклу будь-якого розміру в релаксованій суміші присутні принаймні два топоізомери. Це відразу вказує на зростання загальної пластичності мініциклу – висновок неочікуваний та дещо контраінтуїтивний, зважаючи на те, що розмір вільної петлі в складі реконструйованої частинки є значно меншим загальної контурної довжини мініциклу. Оскільки Lk та ΔLk для мініциклу даної контурної довжини відрізняються на одиницю, доводиться, щоб отримати більш-менш суцільний спектр ΔLk , відтворювати однотипні експерименти на мініциклах, що за довжиною різняться на 1–2 пари основ, – використовувати серію мініциклів, на кшталт наведеної на рис. 5.15, де всі мініцикли походять від одного фрагмента ДНК певної послідовності.

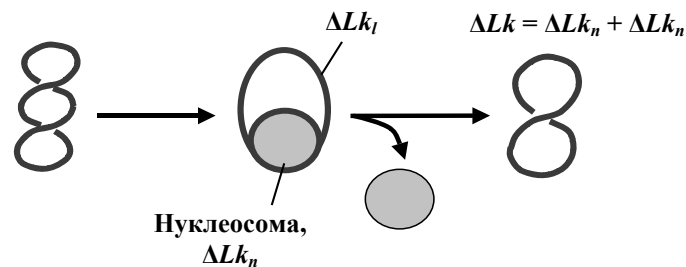


Рис. 8.8. Схема експерименту з нуклеосомами, реконструйованими на мініциклах ДНК (пояснення в тексті)

Циркулярна ДНК, що містить нуклеосому і піддається релаксації за допомогою топоізомерази, може бути розділеною на два топологічні домени: ДНК у складі нуклеосоми, структура якої визначена взаємодіями всередині частинки,

та вільна петля, структура якої обмежена тільки на її кінцях. Сумарне значення ΔLk мініциклу складається з частини надспіралізації ΔLk_n , знятої нуклеосою, та надспіралізації ΔLk_l , що залишилася в петлі (рис. 8.8):

$$\Delta Lk = \Delta Lk_n + \Delta Lk_l. \quad (8.2)$$

Іншими словами, ΔLk топоізомеру дорівнює ΔLk_n , якщо петля повністю релаксована і $\Delta Lk_l = 0$. Зрозуміло, що в умовах релаксації переважним буде той топоізомер, для якого ΔLk_l наближається до нуля – тобто ΔLk якого є найближчим до ΔLk_n . Вільна енергія даного топоізомеру із нуклеосою підпорядкована рівнянню, подібному до рівн. (5.16), куди входить ΔLk_l замість ΔLk :

$$G = RT \frac{K_{sc}}{N_l} (\Delta Lk - \Delta Lk_n)^2 + \Delta G_n, \quad (8.3)$$

де перший член є енергією надспіралізації петлі, N_l – контурна довжина петлі в парах основ, ΔG_n – вільна енергія вигину релаксованої петлі та всі внески від взаємодій всередині нуклеосоми. Результати свідчать про те, що нуклеосома у складі мініциклів може існувати в кількох структурних станах, кожному з яких притаманні свої значення ΔLk_n та K_{sc} (силова константа надспіралізації залежить від граничних умов на кінцях петлі, які визначаються структурою нуклеосоми). Отже, ΔG_n містить вільну енергію структурних перетворень нуклеосоми відносно деякого референтного стану.

Результати аналізу відносного вмісту топоізомерів на мініциклах усіх розмірів можна представити як залежність цього вмісту F від ΔLk топоізомеру (рис. 8.9). Імовірність існування нуклеосоми в i -тому структурному стані на топоімері ΔLk пропорційна, за принципом Больцмана, $f(i, \Delta Lk) = \exp(-G(i, \Delta Lk)/RT)$, де $G(i, \Delta Lk)$ залежить від ΔLk_n , K_{sc} та ΔG_n для i -того стану за рівн. (8.3). Отже,

$$F = \frac{\sum_i f(i, \Delta Lk)}{\sum_{j=-\infty}^{\infty} \sum_i f(i, \Delta Lk + j)}, \quad (8.4)$$

де підсумовування здійснюється по всіх i -тих станах і всіх топоізомерах, що відрізняються від даного цілими числами j (замість нескінченності можна обмежитись не надто великими числами, як у рівн. 5.18). Величина F відображає ймовірність утворення топоізомеру ΔLk , але, оскільки сумарна залежність F від ΔLk складається з окремих рівноважних розподілів на мініциклах різного розміру, сума всіх значень F при всіх ΔLk не дорівнює одиниці (на відміну від f у рівн. 5.18).

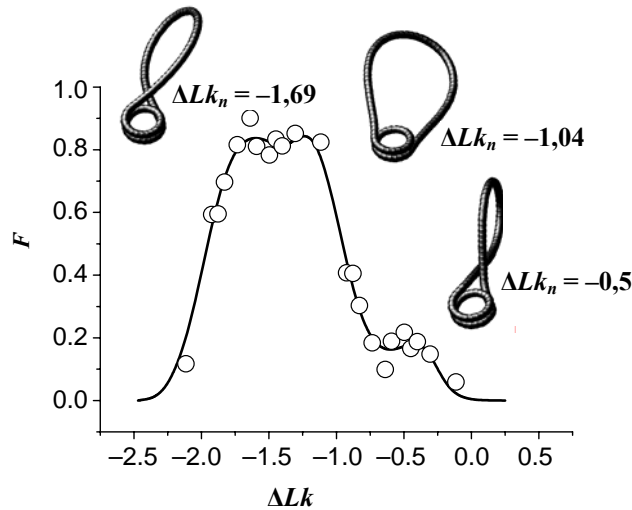


Рис. 8.9. Відносний вміст F топоізомерів у рівноважних розподілах релаксованих мініциклів, що містять нуклеосому. Наведено конфігурації мініциклів з нуклеосомами у трьох структурних станах (для випадків, коли рівень надспіралізації петлі дорівнює нулю) та відповідні значення ΔLk_n . Адаптовано з роботи Sivolob *et al.* (2003)

Підгонка рівн. (8.14) під експериментальну залежність дозволяє визначити ΔLk_n , K_{sc} та ΔG_n для кожного стану. Знаючи ΔLk_n для даного стану, можна знайти таку структурну форму нуклеосомної суперспіралі (кількість витків, радіус та крок суперспіралі), що відповідає отриманому значенню: розрахувавши рівноважну конфігурацію петлі, виходячи з граничних умов (що задаються структурою нуклеосоми, див. підпідрозд. 7.4.2), визначити райзинг мініциклу та, відповідно, ΔTw_n .

Такий розрахунок показує, що для "канонічної" нуклеосоми, яка містить 1,7 витків суперспіралі, райзинг мініциклу у випадку релаксованої петлі дорівнює $-1,64$. Крім того, є можливим ще один локальний мінімум вільної енергії, який відповідає петлі з неповним позитивним перехрещенням на її кінцях (на виході з нуклеосоми), із райзингом $-0,31$. Реалізація цього стану потребує певних перебудов структури нуклеосоми, які наближують одна до одної лінкерні ділянки, чим сприяють їх позитивному перехрещенню. Розгортання нуклеосомної ДНК на кінцях, яке залишає 1,4 суперспіральних витка, відповідає райзингу $-1,0$.

Приклад експериментальної залежності F від ΔLk для мініциклів, які походять із фрагменту плазмід рBR322, наведено на рис. 8.9. Крива має три локальні максимуми, що відповідають принаймні трьом структурним формам нуклеосоми: закрита негативна (1,7 витків суперспіралі, негативне перехрещення лінкерів на виході з нуклеосоми); відкрита (1,4 витки суперспіралі, відсутність перехрещення); закрита позитивна (знову 1,7 витків, але позитивне перехрещення на виході).

Отримані значення ΔLk_n практично збігаються з наведеними вище значеннями райзингу: для даної серії мініциклів твіст ДНК у нуклеосомі дорівнює такому в розчині (останній в умовах експерименту відповідає 10,49 пар основ/виток, що визначено з даних рис. 5.15). Ця ситуація не є загальним правилом: на мініциклах іншого походження (тобто на ДНК інших послідовностей) зареєстровані інші, менші за абсолютною величиною, значення ΔLk_n , які вказують на додаткове закручування нуклеосомної ДНК. На мініциклах, що походять від фрагменту α -сателітної ДНК людини (як і ДНК, що використана в кристалографічних дослідженнях нуклеосом, описаних у попередньому підрозділі) спіральна періодичність усередині нуклеосоми оцінюється в 10,3 пар основ/виток (проти 10,49 пар основ/виток у розчині), а значення ΔLk_n для трьох станів становлять $-1,55$, $-0,79$ та $-0,47$. На ДНК із гена рибосомної РНК 5S морського їжака *Lytechinus variegatus* відповідні ΔLk_n дорівнюють $-1,40$, $-0,72$ та $-0,41$, а спіральна періодичність у нуклеосомі 10,3 пар основ/виток проти 10,54 пар основ/виток у розчині. Отже, парадокс надспіральності вирішується просто: отримане на мініхромосомах значення $\Delta Lk_n = -1$ є усередненим для кількох структурних станів нуклеосом, кожному з яких притаманне своє ΔLk_n . Кожне таке значення ΔLk_n відображає певний райзинг і, як правило, позитивну зміну твіста нуклеосомної ДНК.

Крім залежного від послідовності пар основ поліморфізму нуклеосом щодо спіральної періодичності, нуклеосом на мініциклах різного походження характеризуються різною конформаційною динамікою. Переважним, що можна було очікувати, є закритий негативний стан, який відповідає канонічній структурі нуклеосом, – його вільна енергія ΔG_n (відносно відкритого стану, для якого взято $\Delta G_n = 0$) варіює від $-0,8$ до $-1,7$ одиниць $k_B T$. Закритий позитивний стан є найменш вигідним енергетично, і для деяких послідовностей він узагалі практично недоступний.

Таким чином, невелика порівняно з енергією теплових флуктуацій різниця вільних енергій між структурними станами, власне, і забезпечує можливість конформаційної рівноваги. Ця рівновага зсувається в той чи інший бік залежно від рівня надспіралізації, а також модулюється послідовністю ДНК у складі нуклеосом. Інакше кажучи, нуклеосомні структурні стани відіграють роль буфера, який знімає частину надспіралізації того чи іншого знаку, і ці буферні властивості залежать від послідовності пар основ нуклеосомної ДНК.

Крім того, конформаційна рівновага залежить від типу гістонів, що входять до складу нуклеосом. Так, гіперацетилювання гістонів робить переважною відкриту форму нуклеосом: зниження позитивного заряду гістонових хвостів призводить до зростання розштовхування між сусідніми витками нуклеосомної суперспіралі на кінцях. Оскільки ацетилювання гістонів завжди позитивно корелює з транскрипційною активністю, значення відкритої форми нуклеосом є очевидним: по-перше, розгортання нуклеосомної ДНК на кінцях підвищує її доступність до регуляторних білків; по-друге, таке розгортання дестабілізує димери H2A-H2B у нуклеосомі – їхнє перенесення на проміжні гістонові акцептори, яке досить активно відбувається під час транскрипції, полегшується.

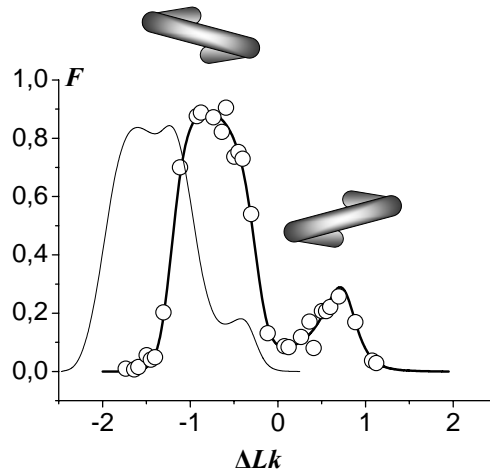


Рис. 8.10. Відносний вміст F топоізомерів у рівноважних розподілах релаксованих мініциклів, що містять тетрасому.
Для порівняння зображено криву для нуклеосом з рис. 8.9.
Схематично зображено тетрасому в ліво- та правоспиральному станах.
Адаптовано з роботи Sivolob *et al.* (2000)

Тимчасове видалення димерів залишає на ДНК тетрасому (рис. 25, кольор. вст.), яка також характеризується неабиякою конформаційною рухливістю: під дією надспіралізації того чи іншого знаку тетрасомна суперспіраль змінює свою хіральність. У розподілах топоізомерів, отриманих в експериментах, аналогічних до тих, що описані вище для нуклеосом, чітко проявляються два максимуми в області негативних та позитивних значень ΔLk : більш енергетично вигідна лівоспиральна тетрасома (яка відповідає структурі в складі нуклеосоми) перетворюється на правоспиральну в складі позитивно надспіралізованих топоізомерів (рис. 8.10).

Отже, правоспиральна тетрасома може легко поглинути частину позитивної надспіралізації, яка виникає попереду РНК-полімерази під час транскрипції (підпідрозд. 5.2.3): для неї також проявляються зазначені вище буферні властивості, які також залежать від послідовності ДНК у складі тетрасоми (різниця вільних енергій між двома станами трохи варіює для різних послідовностей) і від гістонових хвостів, видалення або гіперацетилювання яких значно полегшує перехід у правоспиральну конформацію.

Загалом конформаційна динаміка тетрасоми та нуклеосоми зумовлює неочікувану властивість ДНК-гістонових комплексів (яка проявляється і на наднуклеосомному рівні, підрозд. 8.3): їх присутність на ДНК робить молекулу ДНК значно пластичнішою – здатною легше накопичувати надспіралізацію (торсійну напругу) того чи іншого знаку. Головним чинником підвищення пластичності є конформаційна рухливість ДНК-гістонових комплексів, додатковий внесок у пластичність дає сама структура цих комплексів: завдяки ненульовому райзингу, що створюється за рахунок вигину ДНК на поверхні гістонів, надспіралізація накопичується з меншими енергетичними витратами (підпідрозд. 5.4.2).

8.2.3. Зміна хіральності нуклеосоми: реверсома

Висока пластичність полінуклеосомної фібрили проявляється також в експериментах із магнітним пінцетом. Схема експерименту є подібною до описаної в підпідрозд. 4.6.3, тільки молекула ДНК, яка піддається закручуванню/розкручуванню (при застосуванні дуже невеликої розтягальної сили), містить реконструйовані нуклеосоми. Так само, як для голої ДНК, відстань від парамагнітної кульки до підкладки при обертанні магнітного пінцета скорочується внаслідок формування плектонем (але вже полінуклеосомним ланцюгом). Проте, на відміну від голої ДНК, перед тим, як починається формування плектонем, полінуклеосомний ланцюг здатен накопичувати значно більшу торсійну напругу за рахунок конформаційної рухливості нуклеосом (рис. 8.11).

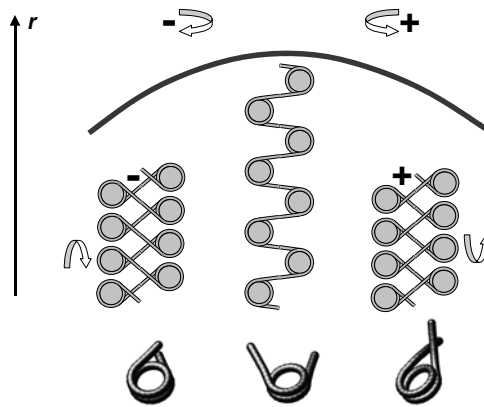


Рис. 8.11. Відповідь полінуклеосомного ланцюга на торсійну деформацію: крива схематично відображає зміну довжини ланцюга r (відстані від парамагнітної кульки до підкладки) як функції кількості обертів в оточенні максимуму (подаліше накопичення торсійних витків обох знаків приводить до більш різкого скорочення за рахунок утворення плектонем). Три структурні форми нуклеосоми (внизу) сприяють накопиченню напруги за рахунок обертання нуклеосом навколо своїх осей симетрії в тому чи іншому напрямку. Адаптовано з роботи Vancaud *et al.* (2006)

Найбільше подовження полінуклеосомного ланцюга відповідає відкритій формі нуклеосоми в його складі – в умовах експерименту (низька іонна сила) ця форма є переважною внаслідок великого електростатичного розштовхування між витками нуклеосомної суперспіралі. Утворення плектонем гальмується обертанням нуклеосом навколо своїх осей симетрії та переходом у закриті структурні форми – негативну чи позитивну залежно від напрямку обертання магнітного пінцета.

Тільки після закінчення структурних переходів починається утворення плекто-
нем. Формальний аналіз залежності довжини від кількості обертів дає оцінку
константи "торсійної жорсткості" полінуклеосомного ланцюга $C/k_B T = 5$ нм –
проти 80 нм для ДНК без нуклеосом.

Але найцікавіша структурна перебудова трапляється в нуклеосомах при на-
копиченні високого рівня позитивної торсійної напруги – після утворення плек-
тонемі. Результати вказують на зміну хіральності нуклеосомної суперспіралі –
перетворення її на *праву* в складі частинки, яка називається *реверсомою*
(*reversome* – *reverse nucleosome*).

Якщо кількість обертів пінцета в позитивному напрямку (у бік закручення
подвійної спіралі) є не надто великою, зворотне обертання приводить до подов-
ження фібрили по тій самій траєкторії – пряма та зворотна криві залежності дов-
жини від кількості обертів збігаються. Але за певною граничною кількістю пози-
тивних обертів (приблизно 20 обертів після того, як довжина знизилася до нуля
внаслідок утворення плектонемі), зворотний рух характеризується гістерезисом:
скидання плектономічних витків (подовження фібрили) починається раніше, і при
однаковій кількості обертів відносно нульової точки фібрила має довжину біль-
шу, ніж ця довжина була при прямому русі (рис. 8.12).

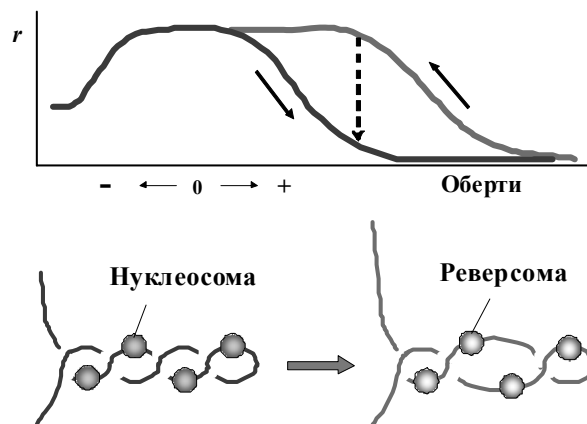


Рис. 8.12. Схема гістерезису при накопиченні та зворотному скиданні
позитивної торсійної напруги в полінуклеосомній фібрилі.
Стрілки вказують напрямок обертання, пунктирна стрілка –
напрямок скорочення фібрили, якщо зворотне обертання
зупиняється в певній точці.

Унизу: унаслідок структурної перебудови в нуклеосомі
реверсома поглинає частину позитивної надспіралізації.

Адаптовано з роботи Vancaud *et al.* (2007)

Така поведінка дозволяє зробити два висновки. По-перше, при високому рівні позитивної торсійної напруги в нуклеосомі відбувається структурне перетворення, унаслідок якого нова частинка – реверсома – фіксує на собі певну частину позитивної надспіралізації. Амплітуда гістерезису (величина відносного зсуву двох кривих на рис. 8.12) є прямо пропорційною кількості нуклеосом у складі фібрили, із нахилу цієї залежності отримано оцінку $\Delta Lk_n = +0,9$ для реверсоми. Очевидно, що ДНК у складі частинки утворює *праву* суперспіраль, яка, імовірно, є дзеркальним відображенням лівоспіральної відкритої форми нуклеосоми. По-друге, наявність гістерезису вказує на те, що дві структури розділені високим активаційним бар'єром – при зворотному обертанні реверсома не встигає перебудуватись у більш енергетично вигідну нуклеосому. Якщо зворотне обертання зупинити за деякої кількості обертів, спостерігається тривале (десятки хвилин) скорочення фібрили (пунктирна стрілка на рис. 8.12) – здійснюється перехід реверсоми в нуклеосому. Аналіз кінетики переходу, яка описується простим двостадійним мономолекулярним механізмом (рівн. 2.29), дозволяє оцінити висоту активаційного бар'єра й різницю вільних енергій між нуклеосомою та реверсомою: вільна енергія реверсоми щодо нуклеосоми дорівнює $\sim 10 k_B T$, енергія активації $\sim 30 k_B T$. Остання величина приблизно збігається з вільною енергією взаємодії двох димерів H2A-H2B із тетрамером (H3-H4)₂ у 2 М NaCl. Це вказує, що наявність активаційного бар'єра пов'язана з необхідністю зруйнувати енергетично вигідні контакти між димерами та тетрамером на шляху структурної перебудови.

Справді, перетворити ліву нуклеосому суперспіраль на праву можна тільки одним способом: порушивши взаємодію димерів із тетрамером, розгорнувши нуклеосому ДНК разом зі зв'язаними димерами, потім змінивши хіральність тетрасоми та встановивши нові контакти між димерами та тетрамером (рис. 29, кольор. вст.). Відповідно, видалення димерів із полінуклеосомної фібрили приводить до зникнення гістерезису: тетрасома, що залишається, легко змінює свою хіральність (див. попередній підпідрозділ) без будь-яких активаційних бар'єрів. Гістон-гістонові контакти в реверсомі відрізняються від таких у нуклеосомі (димери зв'язуються з іншого боку від тетрамеру, рис. 29, кольор. вст.), що, напевно, і дає основний внесок у різницю вільних енергій між двома структурами.

Наскільки фізіологічною є реверсома? Тут знову треба повернутися до хвилі позитивної надспіралізації, яка виникає попереду РНК-полімерази під час транскрипції: полімераза індукує обертальний момент анітрохи не менший, ніж під час експерименту з магнітним пінцетом. Іншими словами, реверсома є цілком можливою як тимчасова структура під час транскрипції. Значення її може бути подвійним. По-перше, реверсома ефективно поглинає позитивну надспіралізацію, забезпечуючи можливість продовження процесу транскрипції, поки не спрацюють ДНК-топоізомерази. По-друге, вона може розглядатись як високоенергетична "активована" форма нуклеосоми – дестабілізовані в такій структурі димери H2A-H2B легше мають зніматися проміжними акцепторами.

Справа в тому, що в кодуючих ділянках генів нуклеосоми зберігаються під час транскрипції (підпідрозд. 8.4.2), але в експериментах *in vitro* на лінійних молекулах ДНК нуклеосома створює майже абсолютний бар'єр на шляху РНК-полімерази II. *In vivo* гістонові комплекси тимчасово знімаються з ДНК проміжними акцепторами попереду від полімерази та відразу повертаються після її проходження. Димер H2A-H2B є першим блокатором руху полімерази – у транскрипційно активних ділянках реєструється швидкий обмін димерів. Отже, дві хвилі надспіралізації, що створюються самою РНК-полімеразою, допомагають здійснити обидві операції, необхідні для ефективної елонгації транскрипції при збереженні нуклеосомної упаковки: попереду полегшується видалення димерів, позаду негативна надспіралізація сприяє відновленню лівоспіральної нуклеосомної структури.

8.3. СТРУКТУРА Й ДИНАМІКА ХРОМАТИНОВОЇ ФІБРИЛИ

При обговоренні конформаційної рухливості нуклеосоми досить часто згадувалась транскрипція. Це цілком доцільно, оскільки в транскрипційно активних ділянках хроматин є часто збідненим на гістон H1 і перебуває в деконденсованому стані полінуклеосомного ланцюга. Проте більша частина хроматину являє собою компактну фібрилу, товщина якої становить 30 нм, до стабілізації якої задіяний гістон H1.

Перш ніж перейти до ролі гістону H1, варто розглянути, що власне являє собою полінуклеосомний ланцюг за своєю структурою. У хроматині нуклеосоми з'єднані лінкерами довжиною ~50 пар основ. Якщо лінкер, на який не накладено жодних структурних обмежень, просто продовжує хід нуклеосомної ДНК по прямій, нуклеосоми у складі полінуклеосомного ланцюга мають бути розташовані приблизно так, як показано на рис. 8.13 – конкретна геометрія буде варіювати залежно від довжини та твіста лінкера. Проекція такої конфігурації на площину дає зигзаг – саме такий вигляд має декомпактизована (за відсутності H1 та за низької іонної сили) полінуклеосомна фібрила під мікроскопом (електронним чи атомно-силовим). Товщина такого тривимірного зигзагу дорівнює приблизно 30 нм.



Рис. 8.13. Зигзагоподібна конфігурація полінуклеосомного ланцюга

Аксіальна конденсація полінуклеосомного зигзагу відбувається за фізіологічних значень іонної сили (мають бути присутніми двовалентні катіони). Присутність неорганічних катіонів (необхідна, але не достатня умова конденсації) забезпечує певний рівень нейтралізації фосфатів, а отже, і зниження електростатичного розштовхування між наближеними одна до одної лінкерними ділянками та нуклеосомами в складі конденсованої фібрили. Головною рушійною силою конденсації є невпорядковані хвости корових гістонів: лабільні позитивно заряджені хвости ефективно "зшивають" фібрилу, взаємодіючи з лінкерами та ДНК сусідніх нуклеосом. При ензиматичному видаленні хвостів компактизація фібрили є неможливою навіть у присутності Н1, і навпаки – без Н1 компактизація відбувається тільки за рахунок хвостів корових гістонів. Відповідно, ацетилювання хвостів сприяє деконденсації хроматину в активних і потенційно активних ділянках. Найважливішу роль у сприянні конденсації відіграють N-кінцеві хвости гістонів Н3 та Н4.

Гістонові хвости можуть взаємодіяти не тільки з ДНК. Зокрема, N-кінцевий хвіст Н4 здійснює контакти з негативно зарядженим сайтом на поверхні димеру Н2А-Н2В іншої нуклеосоми. Крім того, у кристалічній структурі тетрануклеосом (фрагмента полінуклеосомної фібрили, "замороженого" в компактному стані, рис. 30, кольор. вст.), – спостерігається "стекінг" нуклеосомних дисків – взаємодії між глобулярними частинами димерів Н2А-Н2В сусідніх нуклеосом.

Отже, наявність лабільних позитивно заряджених хвостів призводить до появи своєрідних сил притягання (підрозд. 4.7) між нуклеосомами. Проте, ці сили є досить слабкими: хвости швидко осцилюють, зв'язуючись з ділянками ДНК на короткий час. Результати розрахунків методом Монте-Карло, які беруть до уваги електростатичні взаємодії між ділянками ДНК та між ДНК і лабільними гістоновими хвостами (Агуа, Schlick, 2006), свідчать, що за низької іонної сили електростатичне розштовхування призводить до декомпактизації фібрили, а за фізіологічних умов сили розштовхування приблизно компенсуються силами притягання – сумарна вільна енергія взаємодії між нуклеосоми в компактному стані фібрили відносно деконденсованого приблизно дорівнює нулю. Тобто, і це підтверджується багатьма експериментами, полінуклеосомна фібрила є динамічним утворенням – ділянки фібрили осцилюють між приблизно рівноймовірними компактизованим та деконденсованим станами.

У присутності лінкерного гістону Н1 за фізіологічної іонної сили компактна фібрила стає значно стабільнішою: за результатами розтягування такої фібрили оптичним пінцетом (Cui, Bustamante, 2000), сумарна вільна енергія стабілізації компактного стану дорівнює $\sim -3,4 k_B T$ на одну нуклеосому. Таке значення вказує, що компактна фібрила, сформована за участю Н1, усе одно залишається досить динамічною – $\sim 4\%$ часу будь-які дві сусідні нуклеосоми втрачають контакт і переходять

у деконденсований стан. Молекулярне моделювання з використанням даних щодо розтягування свідчить про організацію фібрили, сформованої за участю H1, як нерегулярного флуктуючого зигзага. Іншими словами, гістон H1 не створює нової структури, а просто використовує внутрішні властивості фібрили для додаткової стабілізації її компактного стану.

У хроматині з кожною нуклеосою взаємодіє не більше однієї молекули гістону H1. Проте ця взаємодія, на відміну від корових гістонів, є динамічною: спостерігається швидкий обмін лінкерних гістонів між хроматином та їхнім пулом у ядрі; середній час присутності молекули H1 у зв'язаному стані оцінюється в живих клітинах в 1–2 хв.

За своєю структурою гістон H1 (мономерний білок) суттєво відрізняється від корових гістонів. Молекула H1 містить N-кінцевий неупорядкований хвіст, глобулярний домен GH1 і довгий, збагачений позитивно зарядженими залишками (насамперед лізином) неупорядкований C-кінцевий хвіст довжиною близько 100 амінокислотних залишків (приблизно половина молекули). Лінкерні гістони, як і корові, існують у кількох гомологічних варіантах, зокрема в еритроцитах птахів присутній варіант гістону H1 – гістон H5. Варіанти розрізняються за послідовністю хвостів, глобулярні домени характеризуються високим консерватизмом.

Глобулярний домен H1 (приблизно 80 амінокислот) належить до родини "спіральної із крильцем" (winged HTH) ДНК-зв'язувальних білків (підпдрозд. 7.2.1) – структуру глобулярного домену гістону H5 зображено на рис. 6, кольор. вст. Основу домену складає пучок із трьох α -спіралей, між першою та другою спіраллю знаходиться ділянка β -структури, яка утворює антипаралельний β -шар з двома іншими ділянками на C-кінці домену. Ці останні ділянки з'єднані досить довгою петлею (крильцем). По поверхні домену розподілені позитивно-заряджені залишки, що зумовлює можливість його взаємодії з наближеними у просторі ділянками ДНК. Глобулярний домен, найімовірніше, зв'язується з двома ділянками ДНК на початку лінкерів, що виходять з нуклеосоми, а також взаємодіє з центральною ділянкою нуклеосомної ДНК (рис. 8.14). Результатом такої взаємодії є додаткова стабілізація нуклеосомної суперспіралі. C-кінцевий хвіст H1 взаємодіє з обома лінкерами, що виходять з нуклеосоми. Наднуклеосомну частинку, яка містить гістоновий октамер, ~160–170 пар основ ДНК та гістон H1, називають *хроматосою*.

Важливим результатом взаємодії C-кінцевого хвоста з лінкерами (довжиною по 10–30 пар основ) є об'єднання двох лінкерів на виході з нуклеосоми у стеблоріподібну структуру (рис. 8.14). Цьому стеблу, а також додатковій суттєвій нейтралізації негативно заряджених лінкерів C-кінцевим хвостом H1, належить ключова роль у стабілізації компактної хроматинової фібрили: за рахунок стебла сусідні нуклеосоми значно зближуються, що сприяє конденсації (рис. 8.15). Іншими словами, присутність H1 наближає нуклеосоми одна до одної у складі

фібрили, чим сприяє "зшиванню" цих нуклеосом хвостами корових гістонів. І навпаки, компактизація фібрили за участю хвостів корових гістонів сприяє зв'язуванню Н1 із наближеними у просторі ділянками лінкерів.

Отже, суперструктура конденсованої фібрили товщиною 30 нм являє собою тривимірний зигзаг нуклеосом, з'єднаних лінкерами, які спрямовані всередину фібрили. Всередині містяться також і гістони Н1; сумісна дія Н1 та хвостів корових гістонів підтримує компактний стан фібрили.

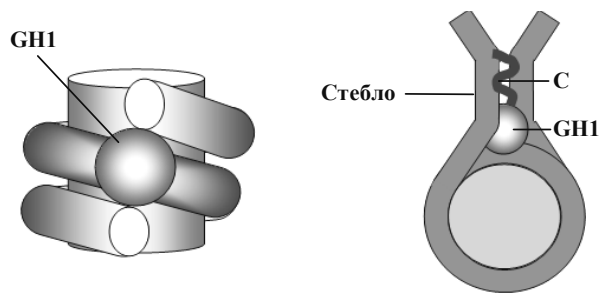


Рис. 8.14. Схема взаємодії глобулярного домену GH1 та С-кінцевого хвоста (С) гістону Н1 з нуклеосомою

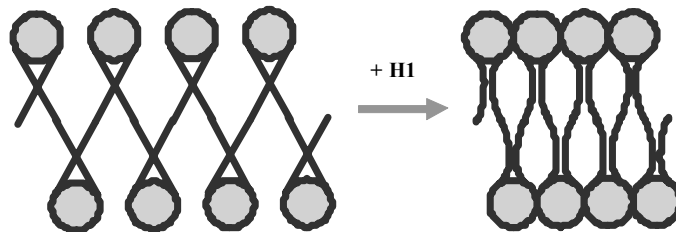


Рис. 8.15. Роль Н1-залежного стебла на виході з нуклеосом у стабілізації компактного стану хроматинової фібрили

Стебло, сформоване на виході з нуклеосом за рахунок взаємодії з гістоном Н1, характеризується важливими властивостями, які виявляються в експериментах із хроматосомами, реконструйованими на мініциклах. Для хроматосом залежність імовірності появи топоізомерів у рівноважних розподілах від їх ΔLk (аналогічна до представлених на рис. 8.9, 8.10) має вигляд бімодальної кривої з двома добре розділеними піками (рис. 8.16). За своїм положенням на осі абсцис

ці два піки приблизно відповідають двом закритим структурним станам нуклеосоми. Але обидва піки зсунуті в область більших абсолютних значень ΔLk , що свідчить про зростання райзингу. Пік, який відповідав відкритому стану нуклеосоми, не спостерігається – Н1 стабілізує нуклеосомну суперспіраль на вході/виході. Цікаво, що для хроматосом відбувається уніфікація динамічних властивостей – різниця вільних енергій між двома структурними станами практично не відрізняється для досліджених мініциклів різної послідовності.

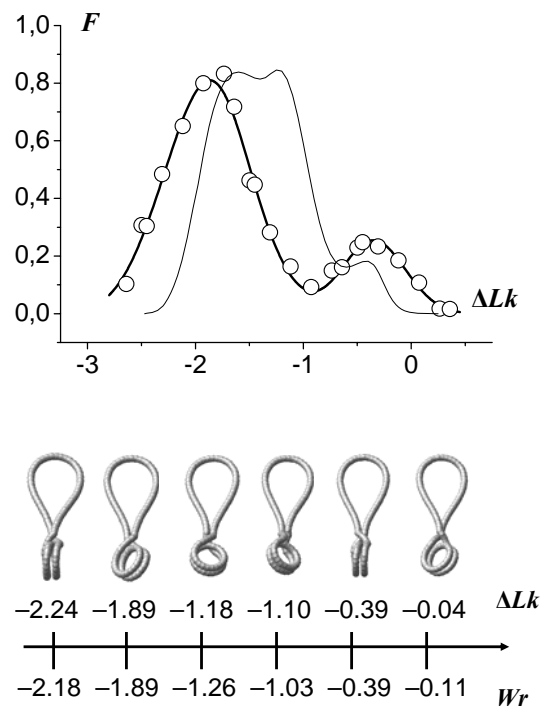


Рис. 8.16. Відносний вміст F топоізомерів у рівноважних розподілах релаксованих мініциклів, що містять хроматосому. Для порівняння наведено криву для нуклеосом з рис. 8.9. Унизу: набір конфігурацій мініциклів за різних значень ΔLk (по три конфігурації ліворуч і праворуч відповідають негативному та позитивному структурним станам стебла) демонструє обертання нуклеосоми навколо стебла у відповідь на зміну надспіралізації. Оскільки в даному випадку зміна твіста всередині частинки дорівнює 0, збіг значень ΔLk і W_r означає релаксовану петлю (точки максимумів на кривій відносного вмісту), різниця між цими значеннями дорівнює рівню торсійних деформацій петлі. Адаптовано з роботи Sivolob, Prunell (2003)

Аналіз результатів релаксації вказує на те, що Н1-залежне стебло являє собою подвійну спіраль з дуже великим кроком, яка складається з двох лінкерів: лінкери трохи закручуються один навколо одного в той чи інший бік у двох структурних формах хроматосоми, що й приводить до зростання абсолютної величини райзингу відносно нуклеосомної суперспіралі. Найхарактернішою ознакою стебла при цьому є його висока торсійна еластичність: ступінь взаємного закручування лінкерів у тому чи іншому напрямку змінюється дуже легко, з маленькими енергетичними витратами. Це виявляється у зниженні константи K_{sc} (див. рівн. 8.3) у 2–3 рази порівняно з нуклеосомою. Зниження силової константи, як обговорювалось у підрозд. 5.4.2, означає, що більша частина надспіралізації петлі реалізується у формі райзингу (рис. 8.16). Отже, гістон Н1 вносить ще більшу пластичність у хроматинову фібрилу. Можливість легкого обертання навколо стебла має значення для адаптації нуклеосом до свого оточення у складі компактної фібрили – реалізації компактного стану незалежно від довжини лінкерів, яка може варіювати вздовж полінуклеосомного ланцюга.

Тонкі особливості внутрішньої структурної організації хроматинової фібрили залишаються недостатньо з'ясованими. У регулярних фібрилах, реконструйованих з використанням ДНК, послідовність якої складається з тандемних повторів послідовності певної довжини (кожен повтор містить одну позиційовану нуклеосому, див. наступний підрозділ) довжина лінкерів є уніфікованою вздовж фібрили. Електронно-мікроскопічне дослідження таких фібрил (Robinson et al., 2006) вказує, що товщина фібрили залишається постійною (~33 нм) для нуклеосомного повтору від 177 до 207 пар основ, при цьому рівень компактизації становить ~11 нуклеосом на 11 нм уздовж фібрили. Для нуклеосомних повторів від 217 до 237 пар основ відбувається різке підвищення товщини до ~45 нм і рівня компактизації до ~15 нуклеосом на 11 нм.

Результати молекулярного моделювання таких фібрил наведено на рис. 31, кольор. вст. Коротка довжина лінкера (повтор 177 пар основ) практично не дозволяє сформувати повноцінне стебло на виході з нуклеосоми. У складі фібрили здійснюється стекінг між кожною i -тою та $(i+5)$ -тою нуклеосомою, хоча сусідні по ланцюгу нуклеосоми є також сусідніми в складі суперспіралі, що утворюється полінуклеосомним ланцюгом. Ця структура дещо нагадує давню модель соленоїда, яка передбачала стекінг між сусідніми по ланцюгу нуклеосомами. Зростання довжини лінкера дозволяє формування стебла, при цьому лінкери перехрещуються всередині фібрили, а загальна топологія розташування нуклеосом у фібрилі поступово змінюється (рис. 31, кольор. вст.). В усіх випадках гістон Н1 опиняється всередині хроматинової фібрили, що відповідає факту, добре встановленому експериментально різноманітними методами.

З викладеного випливає, що єдиної регулярної структури для хроматинової фібрили, імовірно, просто не існує: деталі просторової організації суттєво залежать від довжини лінкерів. Зрозуміло, що хроматинова фібрила, гетерогенна за довжиною лінкерів, є досить нерегулярною структурою.

Така нерегулярність виникає не тільки внаслідок варіації довжини лінкерів. По-перше, у репресованих ділянках (які становлять більшу частину хроматину в диференційованих клітинах еукаріотів) хроматинова фібрила може бути як додатково стабілізованою у компактному стані, так і піддаватися компактизації більш високого порядку за рахунок взаємодії з особливими негістоновими білками. Частина хроматину, що зберігає стан підвищеної компактизації протягом інтерфазу називається *гетерохроматином* (решта хроматину, де в принципі може відбуватися активація транскрипції, позначається як *еухроматин*). Система утворення та підтримання гетерохроматинового статусу тісно пов'язана з гістоновим кодом і є сьогодні зрозумілою в багатьох аспектах, але деталі структури та фізичні механізми утворення гетерохроматину залишаються не з'ясованими.

По-друге, нерегулярність структури хроматинової фібрили є наслідком її динаміки. Тимчасова дисоціація гістону H1, яка полегшується ацетилюванням корових гістонів, модифікаціями самого H1, а також конкурентними взаємодіями з ДНК інших білків (зокрема, HMGB – див. підпдрозд. 7.2.2), приводить до деконденсації фібрили – створює "вікно можливості" для доступу регуляторних білків до їх специфічних сайтів на ДНК. Зрозуміло, що локальна деконденсація є передумовою активації транскрипції. Але при цьому більша частина регуляторних елементів послідовності має залишатись захищеною взаємодіями з коровими гістонами в нуклеосомах – доступ до них залежить від характеру розташування нуклеосом на ДНК.

8.4. ПОЗИЦІЮВАННЯ НУКЛЕОСОМ

8.4.1. Феномен позиціювання нуклеосом

Феномен позиціювання нуклеосом відносно послідовності пар основ проявляється в тому, що деякі ділянки послідовності є дещо кращими за інші для утворення там нуклеосом. Кращими – в енергетичному сенсі: експерименти, в яких порівнювалась відносна ефективність реконструкції нуклеосом на різних послідовностях ДНК, свідчать, що послідовності можуть розрізнятися між

собою за вільною енергією утворення нуклеосом на величину до $\sim 6-7 k_B T$. Але це, скоріше, граничні випадки: зазвичай різниця енергій між різними послідовностями становить $\sim 2 k_B T$.

Щоб з'ясувати, що можуть означати в термінах імовірності заповнення тих чи інших позицій такі значення вільної енергії, розглянемо простий гіпотетичний випадок. Нехай на деякому фрагменті ДНК довжиною $N = 204$ пари основ (максимально $N - 144 = 60$ позицій для нуклеосом, що містить 145 пар основ) є тільки одна позиція, розташування нуклеосом в якій супроводжується відносним зниженням вільної енергії на $\Delta\Delta G = -2 k_B T$ – вільні енергії для всіх інших позицій прийемо за нуль. Тоді ймовірність знаходження нуклеосом на переважній позиції за принципом Больцмана пропорційна $\exp(-\Delta\Delta G) = 7,39$, на всіх інших позиціях – до 1. Нормування по всіх позиціях дає імовірність знайти нуклеосому в переважній позиції

$$p = \frac{\exp(-\Delta\Delta G)}{N - 145 + \exp(-\Delta\Delta G)} = 0,11$$

проти ймовірності для кожної з інших позицій 0,01. Зниження відносної вільної енергії переважної позиції до $-6 k_B T$ призводить до підвищення першої ймовірності до 0,87 та зниження другої до 0,002. Таким чином, позиціонування нуклеосом не є жорстко детермінованим – мова завжди йде про більшу чи меншу ймовірність присутності нуклеосом в даному сайті.

Вільна енергія утворення нуклеосом визначає "силу" даної позиції, а конкретний енергетичний профіль вздовж ДНК – складну картину переважного позиціонування. Наприклад, зазвичай на фрагментах довжиною 200–250 пар основ реєструються 2–3 альтернативні переважні позиції. Крім того, для появи регулярної картини позиціонування нуклеосом може бути достатнім існування на певній ділянці тільки однієї "сильно" позиційованої нуклеосом, яка задає рамку розташування для інших нуклеосом (рис. 8.17, а). Тобто нуклеосом, розташовані за сильно позиційованою, займають не переважні, а просто доступні позиції, що не перекриваються. У результаті на ділянці певної довжини нуклеосом виявляються *фазованими* – спостерігається їхнє впорядковане розташування, коли на багатьох фрагментах ДНК, що аналізуються, у тій самій області з високою ймовірністю міститься нуклеосома – так зване статистичне позиціонування. На віддаленні від позиційованої нуклеосом накопичуються випадкові зсуви нуклеосом у той чи інший бік, і регулярність їхнього розташування порушується – на багатьох фрагментах ДНК нуклеосом хаотично займають місця, що перекриваються. Якщо дві альтернативні сильні позиції перекриваються, обирається та з них, що є більш переважною (рис. 8.17, б) – вона й задає рамку фазованих

нуклеосом. Але в межах цієї позиції може бути розташований специфічний регуляторний сайт – зв'язування з ним транскрипційного фактора зумовить реалізацію іншої переважної позиції та іншої рамки розташування нуклеосом (рис. 8.17, в). Зрозуміло, що специфічно зв'язаний білок сам по собі здатен визначити рамку фазування.

Доступність регуляторного *цис*-елемента не обов'язково пов'язана з його розташуванням у лінкері – досить короткі сайти зв'язування можуть бути всередині нуклеосомної ДНК, і тоді доступність їх залежить від того, на якому боці дуплекса – оберненого назовні чи до поверхні октамеру гістонів – вони знаходяться. Оскільки для здійснення контактів між ДНК та гістонами маленький жолобок має стати точно проти сайту зв'язування на октамері, трансляційний зсув нуклеосоми приводить до одночасного прокручування дуплекса – змінюється так звана ротаційна позиція. При зсуві на піввитка подвійної спіралі експонований сайт стає недоступним і навпаки (рис. 32, кольор. вст.).

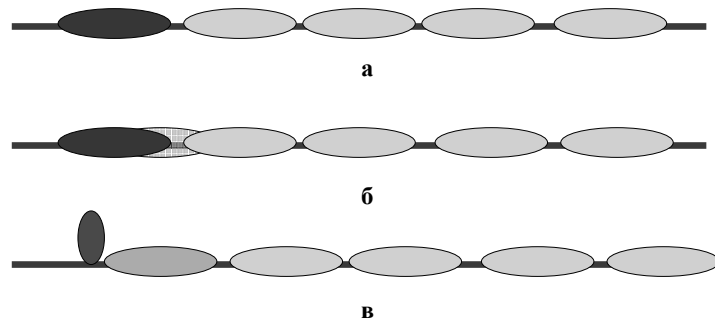


Рис. 8.17. Приклади варіантів розташування нуклеосом у геномних ділянках: (а) нуклеосома в сильній позиції (темний овал) задає рамку розташування інших нуклеосом (світлі овали); (б) із двох альтернативних сильних позицій, що перекриваються, обирається сильніша; (в) транскрипційний фактор заважає утворенню нуклеосоми на сильнішій позиції у випадку (б) – обирається наступна за силою позиція та утворюється нова рамка нуклеосом

Яке походження має енергетичний профіль уздовж послідовності ДНК, що визначає позиціонування нуклеосом? Відповідь на це запитання наведено в підпідрозд. 8.1.3: тільки один внесок у вільну енергію утворення нуклеосоми – енергія деформацій подвійної спіралі – суттєво залежить від послідовності пар основ. Різниця між енергіями деформації різних ділянок (на рівні $\sim 2 k_B T$ або іноді більше) і є головним механізмом переважного позиціонування нуклеосом відносно послідовності.

Оскільки різні елементи послідовності (мінімальні – динуклеотидні кроки) розрізняються між собою за потенціалом щодо певних деформацій (підрозд. 1.4), найважливішими з яких для нуклеосом є зміни рола, твіста і слайда (підрозд. 8.1.2), у нуклеосомних ДНК виявляються певні закономірності частоти зустрічності різних динуклеотидів у різних позиціях. Наприклад, аналіз послідовностей ДНК, виділених із тотального препарату нуклеосом дріжджів указує на те, що АТ-збагачені кроки частіше зустрічаються там, де маленький жолобок контактує з поверхнею октамеру гістонів, а GC-збагачені частіше розташовані у протилежній фазі (рис. 33, кольор. вст.). Аналогічні статистичні закономірності виконуються і для інших еукаріотичних геномів, а також для нуклеосом реконструйованих *in vitro* на геномних ДНК. Остання обставина вказує на те, що саме послідовність ДНК, а не інші фактори (конкуренція інших білків, специфічні механізми репозиціонування при ремоделюванні хроматину (див. наступний підрозділ), наднуклеосомна структура хроматину тощо) є головним чинником позиціонування.

Установлені статистичні закономірності можна використати для передбачення позицій нуклеосом, шукаючи ділянки з найсприятливішим для утворення нуклеосом розподілом динуклеотидів. Передбачувана сила таких алгоритмів досягає 50 %, але не більше. Напевно, від статистичних підходів і не слід очікувати кращого. Статистичні закономірності виникають у результаті усереднення за багатьма послідовностями, у результаті чого суттєво зменшується "шум": кожна *індивідуальна* нуклеосомна ДНК характеризується розподілом динуклеотидів, який лише трохи відрізняється від випадкового.

Більш перспективними є підходи, що базуються на прямій оцінці вільної енергії деформації ДНК певної послідовності. Проте вони поки що не здатні привести до кращих результатів. На сьогодні найповнішим джерелом інформації щодо залежних від послідовності еластичних властивостей ДНК є дані, отримані з кристалів білково-нуклеїнових комплексів (табл. 1.3). Але, по-перше, масив цих даних недостатньо великий для надійної оцінки стандартних відхилень усіх конформаційних параметрів для всіх динуклеотидних кроків. По-друге, еластичні особливості залежать від типу динуклеотидів лише в першому наближенні – має значення також контекст послідовності. По-третє, кристалографічні дані завжди залишають питання про ступінь впливу сил упаковки кристалів на досліджувані параметри. По-четверте, в білково-нуклеїнових комплексах ДНК вже є більш-менш деформованою (хоча найбільш деформовані комплекси виключаються з аналізу щодо оцінки конформаційних параметрів), а розраховувати енергію деформації в нуклеосомі слід відносно вільної ДНК у розчині. Нарешті, сама нуклеосомна ДНК відрізняється структурним поліморфізмом, адекватною оцінкою енергії її деформації є різниця між станами вільної ДНК і такої нуклеосомної, яка мінімізує деформацію при забезпеченні міцних контактів з гістонами. Подальший розвиток зазначених підходів на основі накопичення знань щодо фізичних властивостей ДНК має відкрити нові можливості аналізу геномних послідовностей.

Розвиток сучасних геномних технологій зробив можливим тотальне картування позицій нуклеосом у масштабі цілого геному з високим розділенням. Останнім часом накопичено дані щодо такого картування в геномах дріжджів, нематоди, дрозофіли та людини. Певна річ, кожна ділянка геному має свої тонкі особливості щодо позиціонування нуклеосом, але існують і вражаючі загальні закономірності щодо розташування нуклеосом відносно стартових точок транскрипції (рис. 8.18).

У негативному напрямку (протилежному щодо напрямку транскрипції) на відстані ~ -220 пар основ від стартової точки часто розташована позиційована нуклеосома (позначена як -1 на рис. 8.18, позиція нуклеосоми визначається як позиція центральної точки нуклеосомної ДНК). Відразу за нею в позитивному напрямку часто розташована зона, вільна від нуклеосом (NFR – Nucleosome-Free Region), довжиною ~ 150 пар основ – прогалина, де могла бути розміщена одна нуклеосома. За цією зоною, яка позначається як 5'-NFR, після стартової точки, розміщена сильно позиційована нуклеосома $+1$. У геномі дріжджів межа цієї нуклеосоми практично збігається зі стартовою парою основ, у багатоклітинних еукаріотів нуклеосома розташована через ~ 10 пар основ у позитивному напрямку від стартової точки в неактивних промоторах, але через ~ 40 пар – в активних. Нуклеосоми $+1$ узагалі належать до найсильніше позиційованих у геномі. Отже, дві сусідні ділянки – з дуже низьким і дуже високим потенціалами щодо утворення нуклеосом – маркують старт транскрипції. Нуклеосома $+1$ задає рамку фазованих нуклеосом у кодуючій частині гена, яка згодом "затухає", і усереднений розподіл стає хаотичним. В області термінації транскрипції є інша характерна зона, вільна від нуклеосом, – 3'-NFR (рис. 8.18). У досить "компактному" геномі дріжджів 3'-NFR часто виступає як 5'-NFR для сусіднього гена.

Зрозуміло, що 5'-NFR є зоною збірки преініціаторного комплексу РНК-полімерази (підпідрозд. 7.4.1), а 3'-NFR – збірки мультибілкового комплексу, від якого залежить термінація транскрипції. Можна припустити, що існування обох цих зон є наслідком транскрипції – видалення нуклеосом із промоторів активних генів. Але зони, збіднені на нуклеосоми, реєструються також і в неактивних генах. Крім того, загальна картина позиціонування нуклеосом є дуже подібною в живих клітинах дріжджів і в хроматині, реконструйованому на дріжджовій ДНК *in vitro*, – тобто тоді, коли залишається тільки послідовність пар основ як єдиний фактор позиціонування. Між розподілами нуклеосом *in vitro* та *in vivo* є певні відмінності (поява або зникнення деяких нуклеосом, зміна трансляційних позицій), але вони виглядають як модуляції позиціонування за рахунок специфічних чинників. Отже, головним фактором, що визначає позиції нуклеосом, є послідовність пар основ, у тому числі це стосується й особливостей розподілу нуклеосом у зоні стартових точок транскрипції.

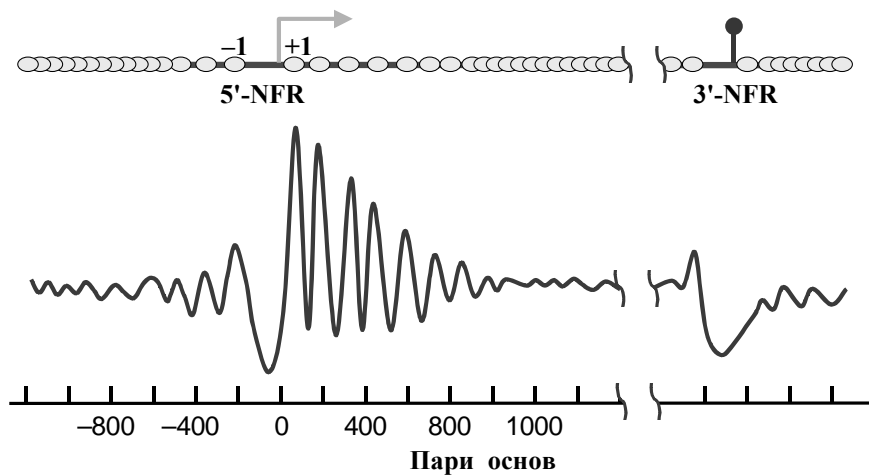


Рис. 8.18. Приблизний усереднений по всіх стартових точках транскрипції розподіл нуклеосом відносно старту (нульова точка). Крива відображає частоту (у логарифмічній шкалі) зустрічності даної пари основ у складі нуклеосоми. На верхній панелі нуклеосоми зображено як овали; стрілка – старт транскрипції; коло – сайт термінації транскрипції; NFR – зони, вільні від нуклеосом; -1 та +1 – дві нуклеосоми, що фланкують старт транскрипції. Адаптовано з кількох робіт з нуклеосомного картування геномів (див. перелік літератури)

Цілком можливо, що саме ці особливості й визначають еукаріотичний промотор. У зоні старту транскрипції (так званому базальному промоторі) часто зустрічаються стандартні елементи послідовності (зокрема, ТАТА-бокс). Але велика частка еукаріотичних промоторів не містить таких елементів і залишалося не зовсім зрозумілим, як у таких випадках система транскрипції визначає промотор. Наявність 5'-NFR, фланкованих позиційованими нуклеосомами, дає вірогідне розв'язання цієї проблеми. Базальні фактори транскрипції (підпідрозд. 7.4.1) мають у своєму складі структурні елементи, здатні взаємодіяти з певним чином модифікованими гістоновими хвостами. Іншими словами, сильно позиційована нуклеосома +1 і вільна від нуклеосом ділянка ДНК поряд із нею формують зручний сайт для початкових етапів збірки преініціаторного комплексу. Цілком можливо, що стандартні елементи базального промотору виникли в процесі еволюції пізніше – як адаптація, що підсилює спорідненість до компонентів преініціаторного комплексу.

Наявність позиційованих нуклеосом по обидва боки від 5'-NFR має також інший наслідок: початкова збірка преініціаторного комплексу є недостатньою для ініціації транскрипції. Підсилення збірки залежить від доступності специфічних елементів промотору для факторів транскрипції, розташованих зазвичай у негативному напрямку від стартової точки. Це може потребувати зміни позицій чи

видалення нуклеосом, зокрема нуклеосоми -1 . Аналогічно, остаточне розташування РНК-полімерази на стартовій точці та ініціація її руху потребують дестабілізації та тимчасового видалення нуклеосоми $+1$, яка являє собою суттєвий бар'єр. Крім того, у багатьох промоторах 5'-NFR просто відсутня (розподіл на рис. 8.18 є *усередненим*), такі промотори при ініціації транскрипції вимагають тимчасового видалення нуклеосоми в оточенні стартової точки. Отже, ефективна ініціація транскрипції залежить від змін характеру розташування нуклеосом у промоторних зонах – ремоделювання хроматину.

8.4.2. АТР-залежне ремоделювання хроматину

Тимчасове видалення або репозиціонування нуклеосом у промоторах при активації транскрипції є досить загальним правилом. У підпідрозд. 8.1.3 йшлося про те, що нуклеосома – дуже стабільна структура за фізіологічних умов, і її трансляційне переміщення (наприклад, таке, як на рис. 32, кольор. вст.) потребує спочатку порушити взаємодії між ДНК і гістонами, щоб потім відновити їх у новій позиції. Інакше кажучи, навіть якщо дві позиції характеризуються однаковими значеннями вільної енергії, вони розділені високим активаційним бар'єром – енергетично не вигідним станом з порушеними ДНК-гістоновими взаємодіями. У результаті спонтанне переміщення нуклеосоми, не кажучи вже про її видалення, виявляється кінетично забороненим.

Завдання каталізу конформаційних перетворень нуклеосом, наслідком якого є їхнє репозиціонування або перенесення на проміжні акцептори, вирішують комплекси (або фактори) ремоделювання хроматину – АТР-залежні мультибілкові машини, що містять від 4 до 14 субодиниць. До складу всіх комплексів ремоделювання входить АТРазна субодиниця. Її АТРазний домен є гомологічним для всіх комплексів і належить до родини ДНК-геліказ (рис. 17, кольор. вст.), але власне геліказної активності не має: АТР, використовуючи енергію гідролізу, пересувається вздовж подвійної спіралі, не руйнуючи її. Залежно від наявності додаткових структурних доменів різного типу в складі каталітичної субодиниці, комплекси ремоделювання розділяють на чотири основні групи: SWI/SNF, ISWI, CHD, INO80. Ремоделюючі комплекси всіх груп мають спорідненість до нуклеосоми; містять домени або білки, здатні впізнавати модифікації (різні для різних груп) гістонових хвостів; домени або білки, що взаємодіють із транскрипційними факторами, ферментативними комплексами, які здійснюють модифікації гістонів, або іншими хроматиновими білками. За рахунок наявності таких структурних блоків комплекси ремоделювання адресно рекрутуються до ділянок хроматину, де необхідна їхня активність.

Основні типи цієї активності, вірніше, її наслідки, схематично зображено на рис. 8.19. Комплекси ремоделювання здатні уніфікувати довжину лінкера в хроматині, забезпечуючи рівномірніший розподіл нуклеосом. Ця функція є особливо важливою під час реплікації ДНК, коли гістони тимчасово знімаються з ДНК, а за реплікативною вилкою відновлюється хроматинова структура на дочірніх дуплексах із використанням як щойно знятих гістонових комплексів, так і синтезованих *de novo*. Уніфікація довжини лінкерів важлива також для забезпечення стабільного компактного стану хроматинової фібрили (підрозд. 8.3) у репресованих ділянках хроматину. Іншим результатом роботи комплексів ремоделювання є репозиціювання нуклеосом унаслідок утворення інтермедіатів з частково розгорнутою ДНК, а також перенесення гістонів на проміжні акцептори – видалення нуклеосом. Таке перенесення може бути частковим, коли видаляються тільки димери H2A-H2B. Результатом може бути заміна димерів у складі нуклеосоми на такі, що містять особливі варіанти гістонів.

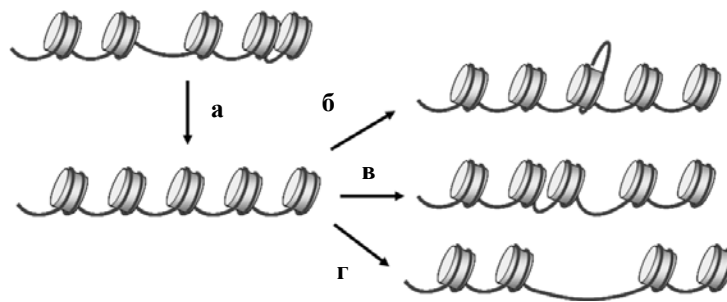


Рис. 8.19. Основні наслідки активності ремоделюючих комплексів: сприяння рівномірному розміщенню нуклеосом (а), підвищення доступності нуклеосомної ДНК за рахунок її часткового розгортання (б), репозиціювання нуклеосом (в), тимчасове видалення нуклеосом (г)

За яким механізмом здійснюються всі ці активності? Для комплексів типу ISWI було показано, що взаємодія АТРазного домену (структуру його комплексу з ДНК зображено на рис. 17, кольор. вст.) з нуклеосою відбувається за два витки дуплекса від центру нуклеосомної ДНК – у $SHL \pm 2$. Інший ДНК-зв'язувальний домен взаємодіє з лінкером на вході в нуклеосому. Принаймні для частини комплексів цього типу показано, що з нуклеосою кооперативно й симетрично зв'язуються два комплекси, кожен з яких містить свою АТРазну субодиницю. У випадку комплексів типу SWI/SNF нуклеосома зв'язується у глибокій щілині, що формується комплексом, а єдина АТРаза взаємодіє, як і для комплексів ISWI, поблизу центру нуклеосомної ДНК (рис. 8.20).

Найімовірніший механізм дії ремоделюючих комплексів, який базується на аналогіях з ДНК-геліказами та результатах досліджень роботи ремоделюючих комплексів, схематично зображено на рис. 8.20. АТРазний домен взаємодіє з нуклеосомною ДНК поблизу від центру, інший ДНК-зв'язувальний домен АТРазної субодиниці – на вході в нуклеосому. Цей останній домен зумовлює порушення взаємодії кінцевої ділянки ДНК з гістонами, "віддираючи" ДНК з поверхні октамеру. АТРазний домен взаємодіє також із невпорядкованими гістоновими хвостами, що забезпечує його фіксоване положення відносно нуклеосоми. Зв'язування й гідроліз АТР індукує конформаційні зміни та, відповідно, транслокацію АТРазного домену вздовж ДНК у напрямку до ДНК-зв'язувального домену. Оскільки положення АТРазного домену є при цьому фіксованим, така транслокація приводить до "відпомповування" нуклеосомної ДНК з периферії всередину нуклеосоми – на поверхні гістонового октамеру утворюються петля ДНК, яка потім мігрує від центру в другу половину нуклеосоми. Під час переміщення петлі (яке нагадує хвилеподібний рух гусениці) зруйнованими весь час є лише 1–2 контакти між ДНК і гістонами. Результатом міграції петлі та, зрештою, виходу її назвоні є трансляційне переміщення нуклеосоми.

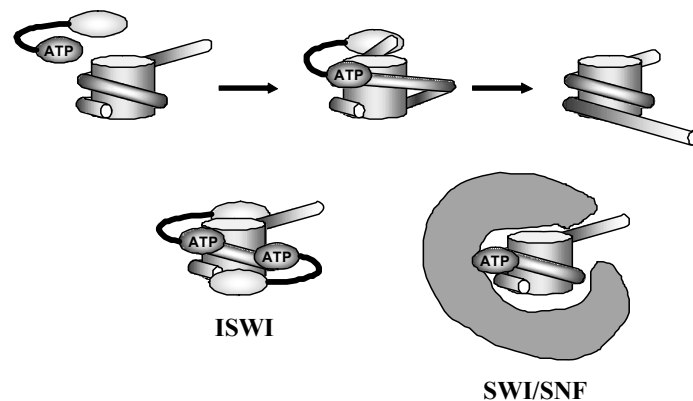


Рис. 8.20. Гіпотетична схема роботи АТРазної субодиниці ремоделюючого комплексу. Показано АТРазний домен і другий ДНК-зв'язувальний домен, інші пояснення в тексті.

Унизу: симетричне зв'язування з нуклеосомою двох АТРазних субодиниць у складі комплексу ISWI та взаємодія нуклеосоми зі внутрішньою порожниною комплексу SWI/SNF, до складу якого входить одна АТРазна субодиниця

У випадку комплексів ISWI дві АТРазні субодиниці працюють, напевно, за принципом конкуренції одна з одною (рис. 8.20). При цьому АТРазна (тобто транслокаційна) активність залежить від довжини лінкера – активність є більш

високою для субдиниці, ДНК-зв'язувальний домен якої взаємодіє з довшим лінкером. У результаті здійснюється переміщення нуклеосоми вперед/назад, і рівноважний стан відповідає ситуації з двома однаковими лінкерами по обидва боки від нуклеосоми – відбувається уніфікація довжини лінкерів. Саме такий наслідок ремоделювання – створення рівномірного розподілу нуклеосом – є головною функцією більшості комплексів типу ISWI. Для комплексів SWI/SNF механізм репозиціонування нуклеосом є цілком аналогічним: один АТФазний домен у складі комплексу забезпечує переміщення ДНК відносно октамеру гістонів, взаємодії з яким є суттєво порушеними по всій довжині за рахунок зв'язування ДНК із внутрішньою позитивно зарядженою поверхнею порожнини, що формується комплексом (рис. 8.20).

Різні комплекси ремоделювання можуть створювати петлі ДНК різного розміру на поверхні нуклеосоми: від мікропетель, що містять 1–12 пар основ, до великих петель розміром до ~100 пар основ. У першому випадку нуклеосома під час ремоделювання не суттєво відрізняється за своєю структурою від "звичайної" – це стосується комплексів типу ISWI. Комплекси родини SWI/SNF генерують великі петлі та, відповідно, інтермедіатні структури нуклеосоми, в складі яких великі ділянки нуклеосомної ДНК втрачають зв'язок з гістонами.

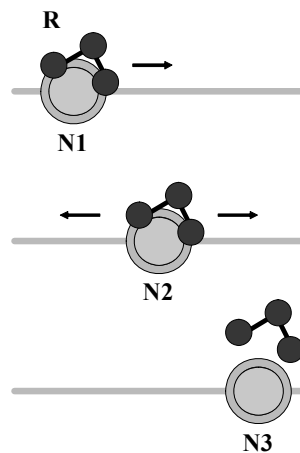


Рис. 8.21. Модель, що пояснює спрямований зсув нуклеосоми до однієї з трьох позицій – до позиції N3.

R – ремоделюючий комплекс, пояснення в тексті.

Адаптовано з роботи Rippe *et al.* (2007)

Спорідненість ДНК-зв'язувальних доменів різних ремоделюючих комплексів до ДНК певною мірою залежить від послідовності пар основ. Унаслідок цього, по-перше, репозиціонування нуклеосом, яке відбувається за принципом випадкової

транслокації (одномірної дифузії), призводить до адресного переміщення нуклеосом у певні позиції. По-друге, ці певні позиції розрізняються для різних ремоделюючих комплексів. Рис. 8.21 ілюструє описане на простій моделі. Нехай є три рівномірні позиції нуклеосоми N1, N2 та N3. Після зв'язування ремоделюючого комплексу відбувається рівномірна транслокація нуклеосоми до будь-якої іншої позиції, але внаслідок того, що спорідненість комплексу є однаковою до нуклеосоми в позиціях N1 та N2 і пониженою – до позиції N3, нуклеосома врешті-решт опиняється саме в позиції N3.

Репозиціонування нуклеосом – не єдиний наслідок утворення інтермедіатного структурного стану з петлею. Велика петля, що генерується комплексами типу SWI/SNF, може бути важливою сама по собі – ДНК в її складі є тимчасово доступною для регуляторних білків. Петля може захоплюватись цими білками, що сприятиме подальшій дестабілізації нуклеосоми за рахунок кооперативного зв'язування інших факторів транскрипції та, відповідно, тимчасовому перенесенню гістонових комплексів на проміжні акцептори. Напевно, саме такий механізм використовується в промоторах для реалізації рівноваги, за якої нуклеосоми протягом активації транскрипції втрачаються та відновлюються, що забезпечує високу доступність регуляторних елементів послідовності.

Ремоделюючі комплекси беруть участь також і в полегшенні тимчасового видалення гістонів під час елонгації транскрипції. Крім того, більшість ремоделюючих комплексів (за винятком деяких високо спеціалізованих) залучена до ремоделювання хроматину не тільки при активації, а й при репресії транскрипції, коли регуляторні ділянки послідовності переводяться в недоступний стан завдяки відповідного репозиціонування нуклеосом. Конкретна роль даного ремоделюючого комплексу в даній ділянці хроматину залежить, таким чином, від контексту інших факторів системи регуляції транскрипції, у координації з якими цей комплекс працює. Аналогічно, операції зі зміни відстані між нуклеосомами, репозиціонуванню та тимчасовому видаленню нуклеосом забезпечуються комплексами ремоделювання хроматину і при всіх інших функціональних процесах: реплікації, репарації та рекомбінації ДНК, установленні гетеро- та еухроматинових ділянок і меж між ними тощо.

ЗАДАЧІ

8.1. Скориставшись рівн. (4.13) і формулами підпідрозд. 5.1.5, розрахуйте енергію вигину ДНК у тетрасомі (55 пар основ, радіус суперспіралі 41,9 Å, крок 25,9 Å).

8.2. Розрахуйте райзинг нуклеосомної суперспіралі ДНК (133 пари основ, радіус 41,9 Å, крок 25,9 Å), скориставшись формулами підпідрозд. 5.1.5. Яку величину негативної надспіралізації ΔLk має знімати в циркулярній ДНК одна нуклеосома, якщо спіральна періодичність ДНК в нуклеосомі дорівнює 10,3 пар основ/виток, а вільної ДНК – 10,5 пар основ/виток?

8.3. Нехай нуклеосома у складі лінійної ДНК існує в трьох структурних станах, вільні енергії яких дорівнюють $-1,2$; 0 та $+1$ одиниць $k_B T$. Користуючись принципом Больцмана, розрахуйте відносну частку кожного стану.

8.4. Нехай на фрагменті ДНК довжиною 210 пар основ є дві переважні позиції нуклеосоми, які характеризуються $\Delta\Delta G = -2$ та $-4 k_B T$, для всіх інших позицій $\Delta\Delta G = 0$ (див. підпідрозд. 8.4.1). Розрахуйте імовірності знаходження нуклеосоми на переважних позиціях.

8.2. Нехай ремоделюючий комплекс має однакову спорідненість до всіх трьох нуклеосомних позицій на рис. 8.21, а самі ці позиції характеризуються $\Delta\Delta G = -1$, -2 та $-3 k_B T$. Розрахуйте імовірності для трьох позицій після дії ремоделюючого комплексу протягом часу, достатнього для переведення системи в рівноважний стан.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Загальна

Chromatin structure and dynamics: state-of-the-art. New Comprehensive Biochemistry / eds. J. Zlatanova, S. H. Leuba. – Amsterdam : Elsevier, 2004. – Vol. 39.

Chromatin structure and gene expression: frontiers in molecular biology / eds. S. Elgin, J. L. Workman. – Oxford : Oxford University Press, 2002.

Kornberg, R. D. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome / R. D. Kornberg, Y. Lorch // *Cell*. – 1999. – Vol. 98. – P. 285–294.

Li, B. The role of chromatin during transcription / B. Li, M. Carey, J. L. Workman // *Cell*. – 2007. – Vol. 128. – P. 707–719.

Rando, O. J. Genome-wide views of chromatin structure / O. J. Rando, H. Y. Chang, // *Annu. Rev. Biochem.* – 2009. – Vol. 78. – P. 245–271.

Van Holde, K. E. Chromatin / K. E. Van Holde. – N.Y. : Springer, 1989.

Структура нуклеосоми

Davey, C. A. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution / C. A. Davey, D. F. Sargent, K. Luger [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2002. – Vol. 319. – P. 1097–1113.

Hall, M. A. High-resolution dynamic mapping of histone-DNA interactions in a nucleosome / M. A. Hall, A. Shundrovsky, L. Bai [et al.] // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 16. – P. 124–129.

Luger, K. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution / K. Luger, A. W. Mäder, R. K. Richmond, [et al.] // *Nature*. – 1997. – Vol. 389. – P. 251–260.

Muthurajan, U. M. Crystal structures of histone Sin mutant nucleosomes reveal altered protein–DNA interactions / U. M. Muthurajan, Y. Bao, L. J. Forsberg [et al.] // *EMBO J.* – 2004. – Vol. 23. – P. 260–271.

Ong, M. S. DNA stretching and extreme kinking in the nucleosome core / M. S. Ong, T. J. Richmond, C. A. Davey // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 368. – P. 1067–1074.

Richmond, T. J. The structure of DNA in the nucleosome core / T. J. Richmond, C. A. Davey // *Nature*. – 2003. – Vol. 423. – P. 145–150.

Tolstorukov, M. Y. A novel roll-and-slide mechanism of DNA folding in chromatin: Implications for nucleosome positioning / M. Y. Tolstorukov, A. V. Colasanti, D. M. McCandlish [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 371. – P. 725–738.

Vasudevan, D. Crystal structures of nucleosome core particles containing the '601' strong positioning sequence / D. Vasudevan, E. Y. D. Chua, C. A. Davey // *J. Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 403. – P. 1–10.

Структурна динаміка нуклеосоми

Anderson, J. D. Spontaneous access of proteins to buried nucleosomal DNA target sites occurs via a mechanism that is distinct from nucleosome translocation / J. D. Anderson, A. Thastrom, J. Widom // *Mol. Cell. Biol.* – 2002. – Vol. 22. – P. 7147–7157.

Bancaud, A. Structural plasticity of single chromatin fibers revealed by torsional manipulation / A. Bancaud, N. Conde e Silva, M. Barbi // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 13. – P. 444–450.

Bancaud, A. Nucleosome chiral transition under positive torsional stress in single chromatin fibers / A. Bancaud, G. Wagner, N. Conde e Silva // *Mol. Cell.* – 2007. – Vol. 27. – P. 135–147.

Hodges, C. Nucleosomal fluctuations govern the transcription dynamics of RNA polymerase II / C. Hodges, L. Bintu, L. Lubkowska [et al.] // *Science.* – 2009. – Vol. 325. – P. 626–628.

Kelbauskas, L. Sequence-dependent variations associated with H2A/H2B depletion of nucleosomes / L. Kelbauskas, N. Chan, R. Bash [et al.] // *Biophys. J.* – 2008. – Vol. 94. – P. 147–158.

Li, G. Nucleosomes facilitate their own invasion / G. Li, J. Widom // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 11. – P. 763–769.

Mihardja, S. Effect of force on mononucleosomal dynamics / S. Mihardja, A. J. Spakowitz, Y. Zhang [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103. – P. 15871–15876.

Muthurajan, U. M. Structure and dynamics of nucleosomal DNA / U. M. Muthurajan, Y. -J. Park, R. S. Edayathumangalam [et al.] // *Biopolymers.* – 2003. – Vol. 68. – P. 547–556.

Polach, K. J. Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin: a dynamic equilibrium model for gene regulation / K. J. Polach, J. Widom // *J. Mol. Biol.* – 1995. – Vol. 254. – P. 130–149.

Sivolob, A. Nucleosome dynamics VI. Histone tail regulation of tetrasome chiral transition. A relaxation study of tetrasomes on DNA minicircles / A. Sivolob, F. De Lucia, M. Alilat [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 295. – P. 55–70.

Sivolob, A. Sequence-dependent nucleosome structural and dynamic polymorphism. Potential involvement of histone H2B N-terminal tail proximal domain / A. Sivolob, C. Lavelle, A. Prunell // *J. Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 326. – P. 49–63.

Sivolob, A. Flexibility of nucleosomes on topologically constrained DNA / A. Sivolob, C. Lavelle, A. Prunell // IMA Volumes in Mathematics and its Applications, Vol. 150 (Eds. C. J. Benham, S. Harvey, W. Olson, D. W. Sumners, D. Swigon). – New York : Springer-Verlag, 2009. – P. 251–291.

Sivolob, A. Nucleosome conformational flexibility and implications for chromatin dynamics / A. Sivolob, A. Prunell // Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. A. – 2004. – Vol. 362. – P. 1519–1547.

Studitsky, V. M. Chromatin remodeling by RNA polymerases / V. M. Studitsky, W. Walter, M. Kireeva [et al.] // Trends Biochem. Sci. – 2004. – Vol. 29. – P. 127–135.

Tomschik, M. Fast, long-range, reversible conformational fluctuations in nucleosomes revealed by single-pair fluorescence resonance energy transfer / M. Tomschik, H. Zheng, K. van Holde [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102. – P. 3278–3283.

Наднуклеосомна структура хроматину

Arya, G. Role of histone tails in chromatin folding revealed by a mesoscopic oligonucleosome model / G. Arya, T. Schlick // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103. – P. 16236–16241.

Bednar, J. Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin / J. Bednar, R. A. Horowitz, S. A. Grigoryev [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 95. – P. 14173–14178.

Carruthers, L. M. The core histone N termini function independently of linker histones during chromatin condensation / L. M. Carruthers, J. C. Hansen // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275. – P. 37285–37290.

Cui, Y. C. Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher order structure / Y. Cui, C. Bustamante // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 127–132.

Hamiche, A. Linker histone dependent DNA structure in linear mononucleosomes / A. Hamiche, P. Schultz, V. Ramakrishnan [et al.] // J. Mol. Biol. – 1996. – Vol. 257. – P. 30–42.

Horowitz, R. A. The three-dimensional architecture of chromatin *in situ*: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon / R. A. Horowitz, D. A. Agard, J. W. Sedat [et al.] // J. Cell Biol. – 1994. – Vol. 125. – P. 1–10.

Katritch, V. Pulling chromatin fibers: computer simulations of direct physical micromanipulations / V. Katritch, C. Bustamante, W. K. Olson // J. Mol. Biol. – 2000. – Vol. 295. – P. 29–40.

Ramakrishnan, V. Histone H1 and chromatin higher-order structure / V. Ramakrishnan // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* – 1997. – Vol. 7. – P. 215–230.

Robinson, P. J. EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure / P. J. Robinson, L. Fairall, V. A. Huynh [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103. – P. 6506–6511.

Schalch, T. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre / T. Schalch, S. Duda, D. F. Sargent [et al.] // *Nature.* – 2005. – Vol. 436. – P. 138–141.

Sivolob, A. Linker histone-dependent organization and dynamics of nucleosome entry/exit DNAs / A. Sivolob, A. Prunell // *J. Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 331. – P. 1025–1040.

Sun, J. Electrostatic mechanism of nucleosomal array folding revealed by computer simulation / J. Sun, Q. Zhang, T. Schlick // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 8180–8185.

Syed, S. H. Single-base resolution mapping of H1–nucleosome interactions and 3D organization of the nucleosome / S. H. Syed, D. Goutte-Gattat, N. Becker [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107. – P. 9620–9625.

Tremethick, D. J. Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber / D. J. Tremethick // *Cell.* – 2007. – Vol. 128. – P. 651–654.

Woodcock, C. L. A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures / C. L. Woodcock, S. A. Grigoryev, R. A. Horowitz [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – Vol. 90. – P. 9021–9025.

Позиціювання нуклеосом

Balasubramanian, S. DNA sequence-directed organization of chromatin: structure-based computational analysis of nucleosome-binding sequences / S. Balasubramanian, F. Xu, W. K. Olson // *Biophys. J.* – 2009. – Vol. 96. – P. 2245–2260.

Drew, H. R. DNA bending and its relation to nucleosome positioning / H. R. Drew, A. A. Travers // *J. Mol. Biol.* – 1985. – Vol. 186. – P. 773–790.

Ioshikhes, I. P. Nucleosome positions predicted through comparative genomics / I. P. Ioshikhes, I. Albert, S. J. Zanton [et al.] // *Nat. Genet.* – 2006. – Vol. 38. – P. 1210–1215.

Jiang, C. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics / C. Jiang, B. F. Pugh // *Nat. Rev. Genet.* – 2009. – Vol. 10. – P. 161–172.

Kaplan, N. The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome / N. Kaplan, I. K. Moore, Y. Fondufe-Mittendorf [et al.] // *Nature.* – 2009. – Vol. 458. – P. 362–366.

Lowary, P. T. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning / P. T. Lowary, J. Widom // *J. Mol. Biol.* – 1998. – Vol. 276. – P. 19–42.

Morozov, A. V. Using DNA mechanics to predict in vitro nucleosome positions and formation energies / A. V. Morozov, K. Fortney, D. A. Gaykalova [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2009. – Vol. 37. – P. 4707–4722.

Segal, E. A genomic code for nucleosome positioning / E. Segal, Y. Fondudfe-Mittendorf, L. Chen [et al.] // *Nature.* – 2006. – Vol. 442. – P. 772–778.

Widom, J. Role of DNA sequence in nucleosome stability and dynamics / J. Widom // *Quart. Rev. Biophys.* – 2001. – Vol. 34. – P. 269–324.

Ремоделювання хроматину

Cairns, B. R. Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies / B. R. Cairns // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 14. – P. 989–996.

Cairns, B. R. The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters / B. R. Cairns // *Nature.* – 2009. – Vol. 461. – P. 193–198.

Clapier, C. R. The biology of chromatin remodeling complexes / C. R. Clapier, B. R. Cairns // *Annu. Rev. Biochem.* – 2009. – Vol. 78. – P. 273–304.

Lorch, Y. Mechanism of chromatin remodeling / Y. Lorch, B. Maier-Davis, R. D. Kornberg // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107. – P. 3458–3462.

Racki, L. R. ATP-dependent chromatin remodeling enzymes: two heads are not better, just different / L. R. Racki, G. J. Narlikar // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2008. – Vol. 18. – P. 137–144.

Racki, L. R. The chromatin remodeller ACF acts as a dimeric motor to space nucleosomes / L. R. Racki, J. G. Yang, N. Naber [et al.] // *Nature.* – 2009. – Vol. 462. – P. 1016–1021.

Rippe, K., Schrader, A., Riede, P., Strohner, R. DNA sequence- and conformation-directed positioning of nucleosomes by chromatin-remodeling complexes / K. Rippe, A. Schrader, P. Riede [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104. – P. 15635–15640.

Shukla, M. S. Remosomes: RSC generated non-mobilized particles with approximately 180 bp DNA loosely associated with the histone octamer / M. S. Shukla, S. H. Syed, F. Montel [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107. – P. 1936–1941.

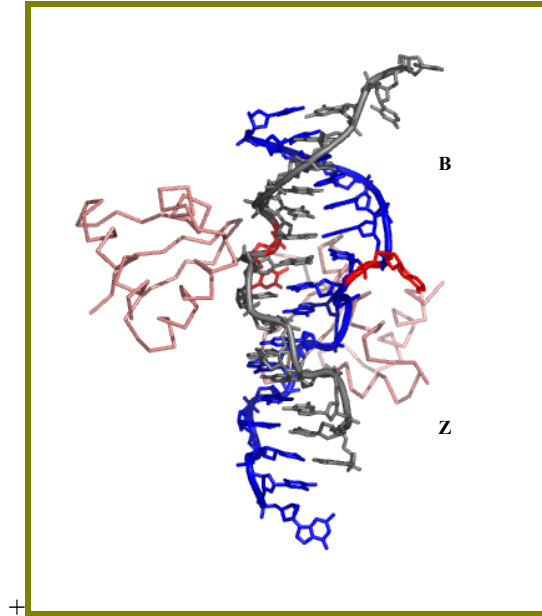


Рис. 1. Структура комплексу з ДНК білка, що стабілізує Z-форму (код PDB 2ACJ). Одна пара основ (червона) є розкритою на межі між B- і Z-формами. Для білкових субодиниць (два домени Z α (або ADAR1) аденозиндеамінази) показано тільки загальний хід поліпептидного ланцюга

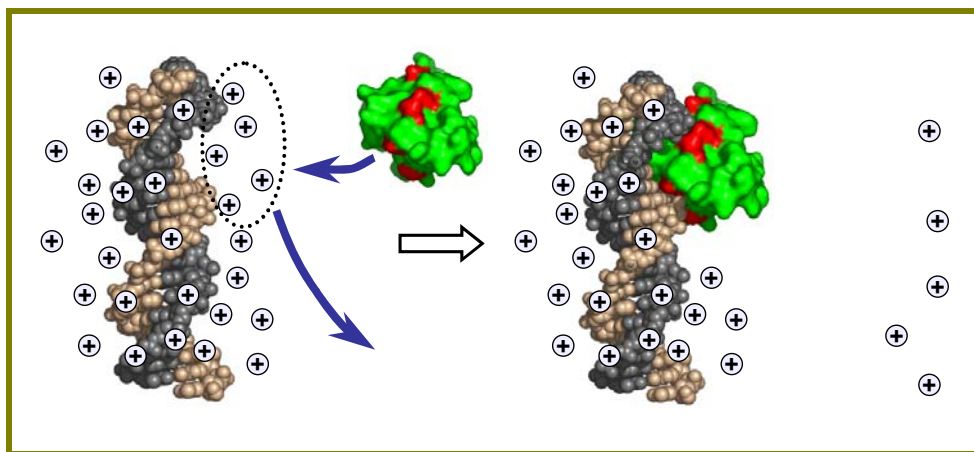


Рис. 2. Електростатичне зв'язування білка (червоним позначені позитивно заряджені амінокислотні залишки) з ДНК за рахунок визволення протонів

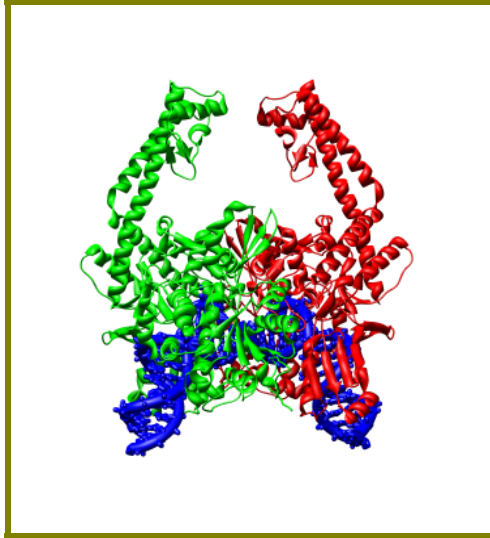


Рис. 3. Еукаріотична топоізомераза II (код PDB 2RGR) у комплексі з сегментом ДНК, в якому здійснюється дволанцюговий розріз (G-сегментом)

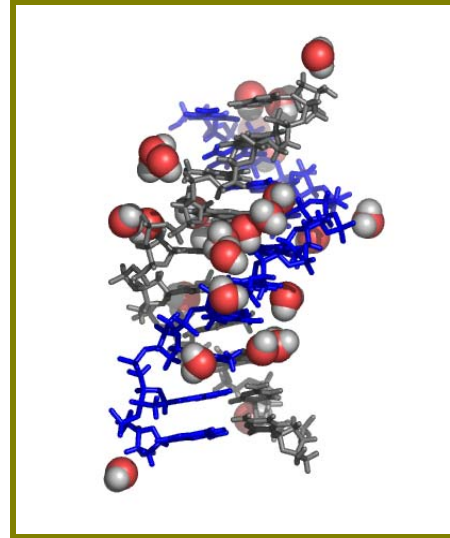


Рис. 4. Зв'язані молекули води у кристалічній структурі декамера d(CCATTAATGG)₂ (код PDB 1WQZ). На передньому плані – хребет із шести молекул води в маленькому жолобку

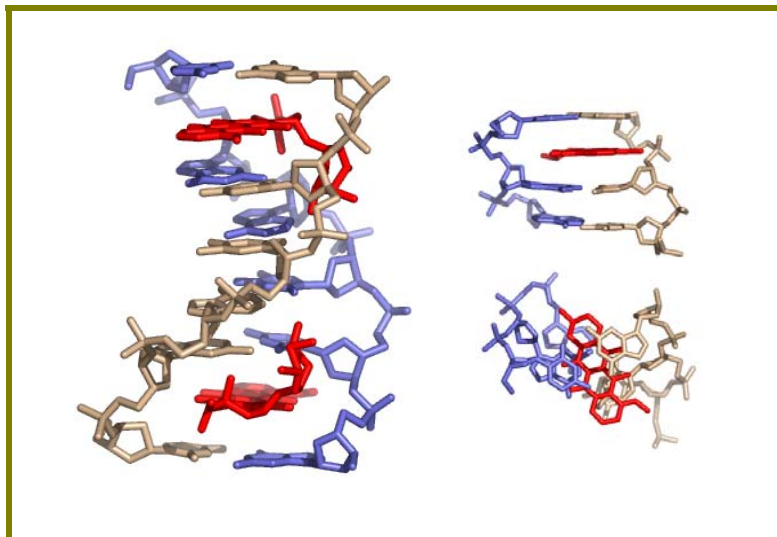


Рис. 5. Комплекс ДНК з двома інтеркальованими молекулами дауноміцину (код PDB 1DA0). Праворуч: фрагмент структури у двох проєкціях – показано три пари основ і частина ліганду, що здійснює інтеркаляцію між двома з них

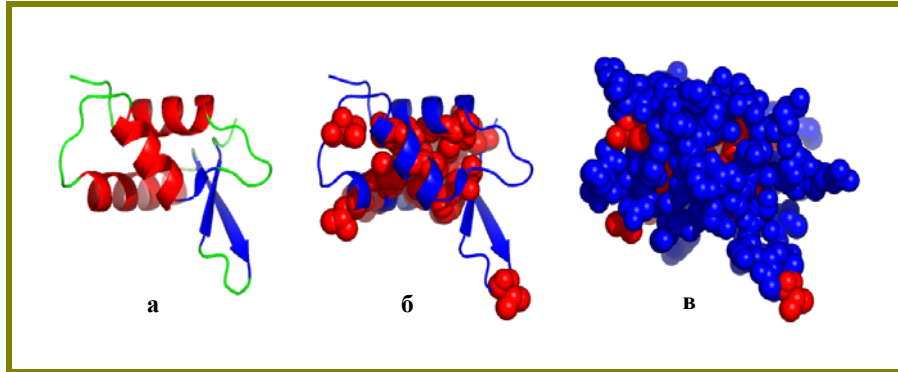


Рис. 6. Різні варіанти зображення структури глобулярного білка (глобулярний домен гістону H5, код PDB 1HST): (а) – схема будови, де показано ділянки вторинної структури; (б) – до попередньої схеми додано атоми неполярних залишків (червоні); (в) – атомна модель, червоні – атоми неполярних, сині – полярних залишків.
Усі рисунки в однакових проекції та масштабі

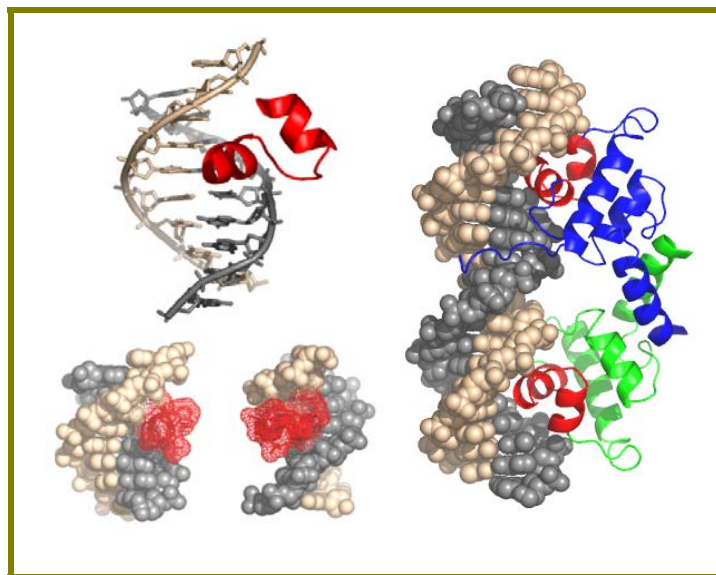


Рис. 7. НТН-мотив репресора бактеріофага λ (ліворуч угорі), дві проекції α -спіралі у великому жолобку (ліворуч унизу) і комплекс гомодимеру репресора зі специфічним елементом послідовності (оператором, праворуч).
Код PDB 1LMB

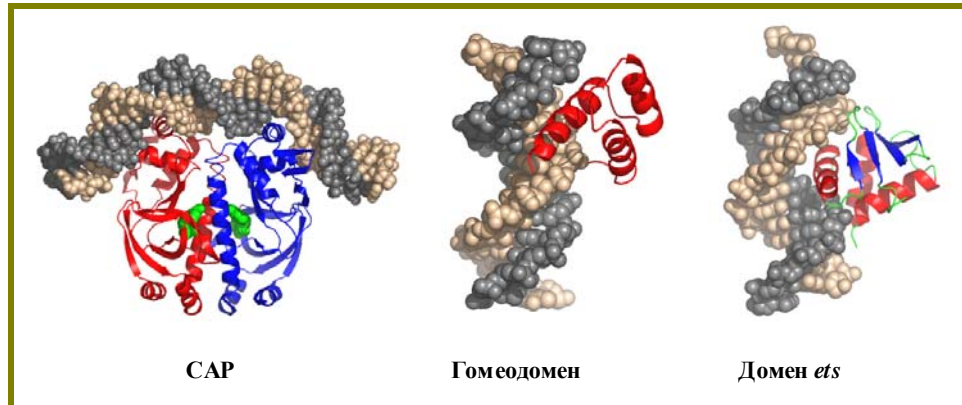


Рис. 8. Комплекси з ДНК гомодимерного прокаріотичного активатора транскрипції генів катаболізму CAP (код PDB 1CGP, зеленим кольором позначено молекули сАМР), гомеодомена еукаріотичного фактора транскрипції (1APL) і домену *ets* еукаріотичного фактора Pu.1 (1PUE)

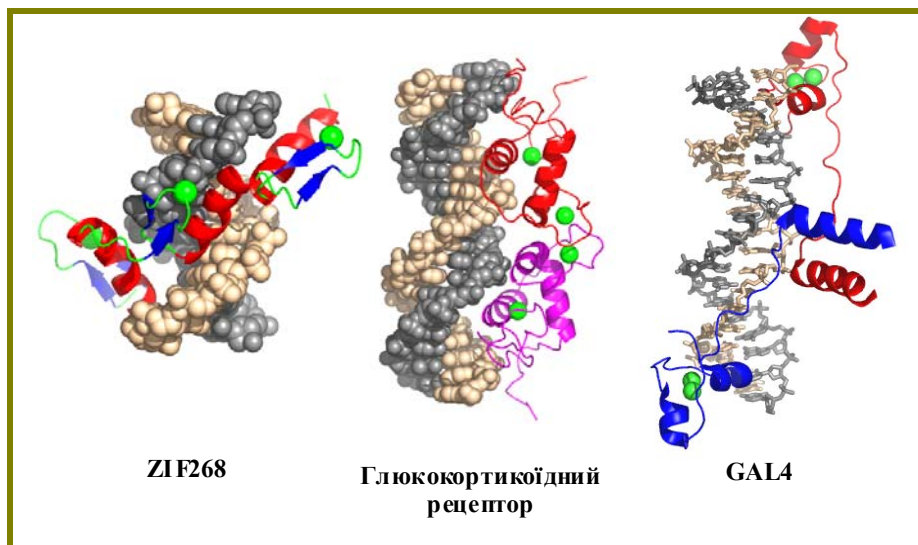


Рис. 9. Цинк-координуючі ДНК-зв'язувальні мотиви: три цинкові пальці у складі білка ZIF268 (код PDB 1ZAA), ДНК-зв'язувальний домен (гомодимер) глюкокортикоїдного рецептора (1GLU) і гомодимерний транскрипційний фактор GAL4 (1D66). Зелені сфери – іони Zn

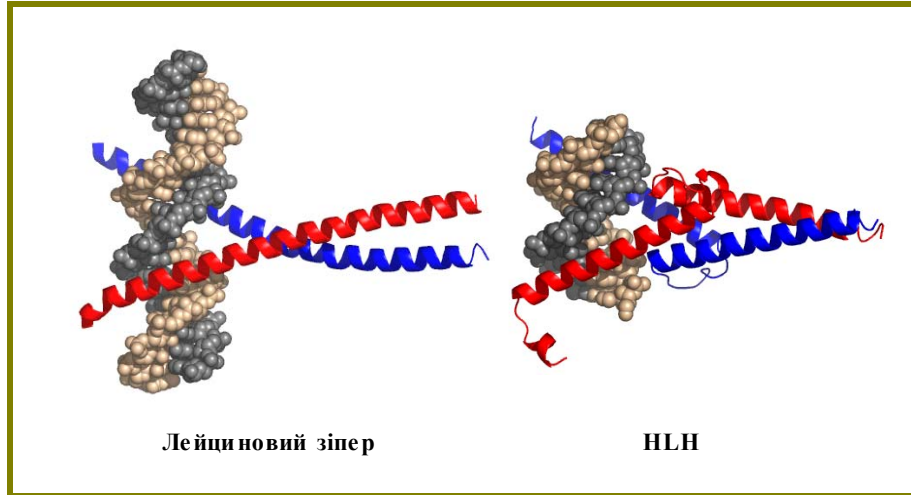


Рис. 10. Лейциновий зіпер (код PDB 1NWQ)
і HLH-мотив (1HLO)

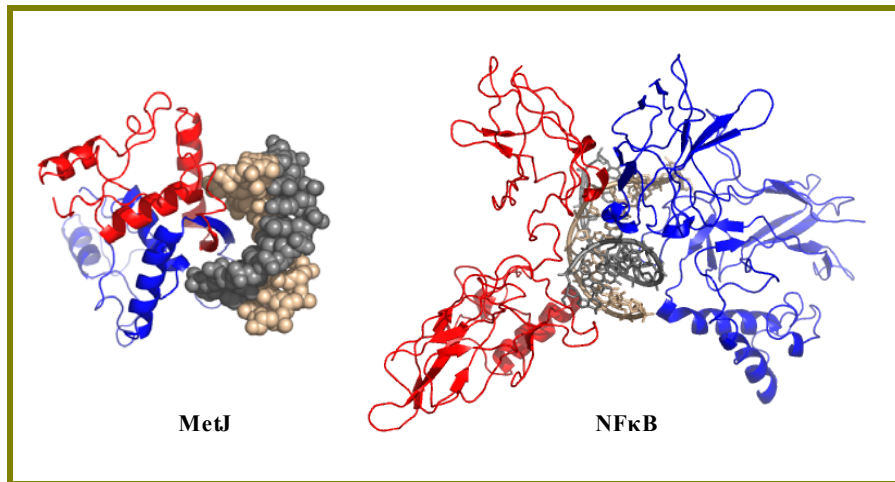


Рис. 11. Комплекси з ДНК гомодимерного метіонінового репресора MetJ (код PDB 1CMA) та імуноглобулінподібного фактора транскрипції NFκB (гетеродимер p50/p65, 1VKX)

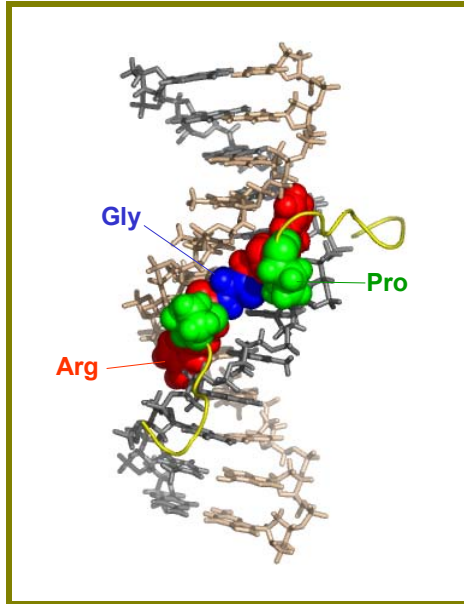


Рис. 12. АТ-гак (Pro-Arg-Gly-Arg-Pro)
у складі білка HMG1 (код PDB 2EZD)

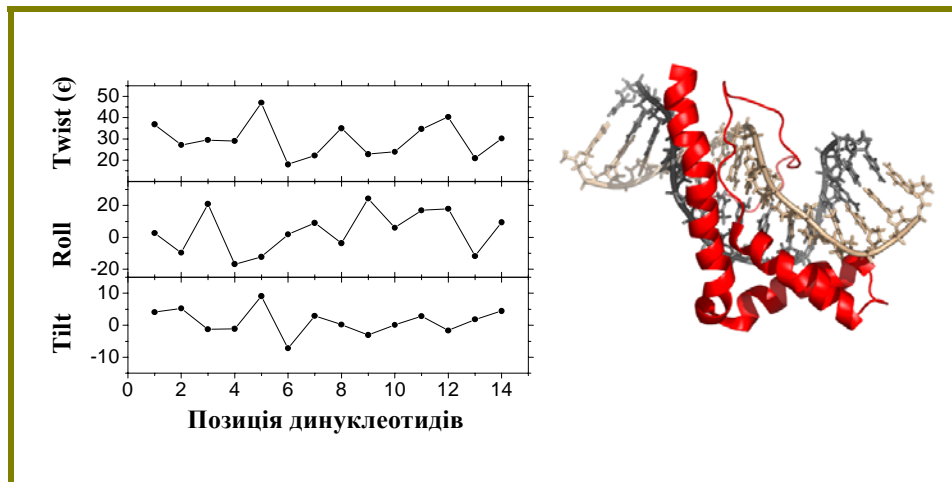


Рис. 13. Комплекс із ДНК HMG-боксу
у складі білка HMG1 (код PDB 1J5N)
і варіації трьох кутових конформаційних параметрів
уздовж фрагмента ДНК у складі комплексу

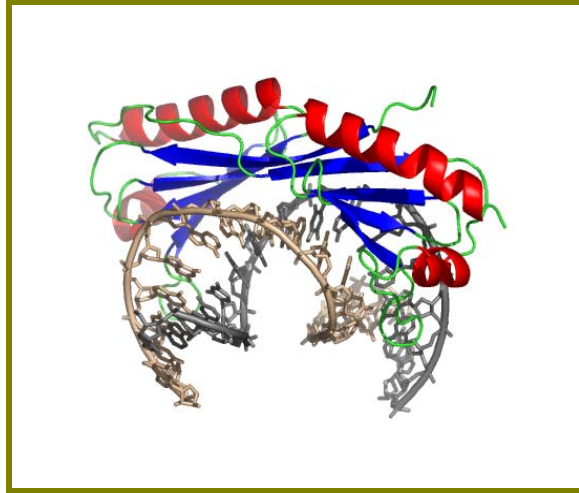


Рис. 14. ДНК-зв'язувальний домен ТВР у комплексі з ТАТА-боксом (код PDB 1CDW)

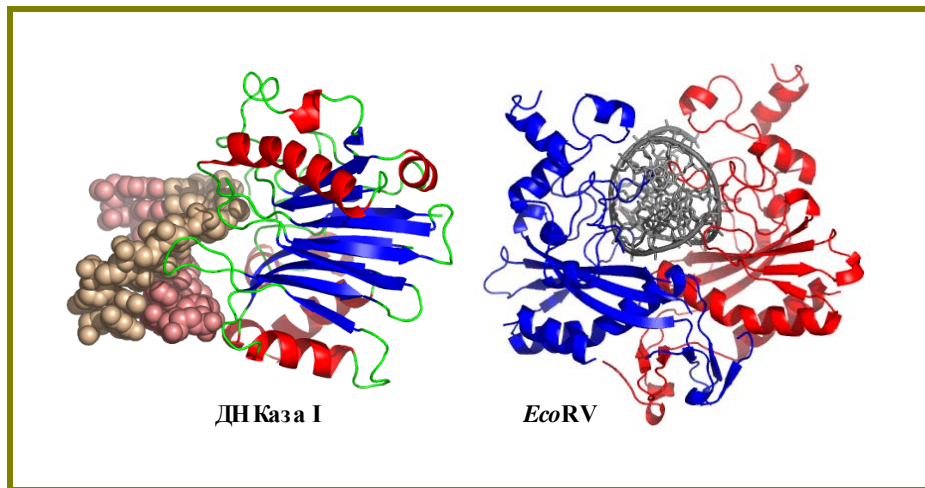


Рис. 15. Комплекси з ДНК ДНКази I (код PDB 1DNK) і рестриктази *EcoRV* (1AZ0)

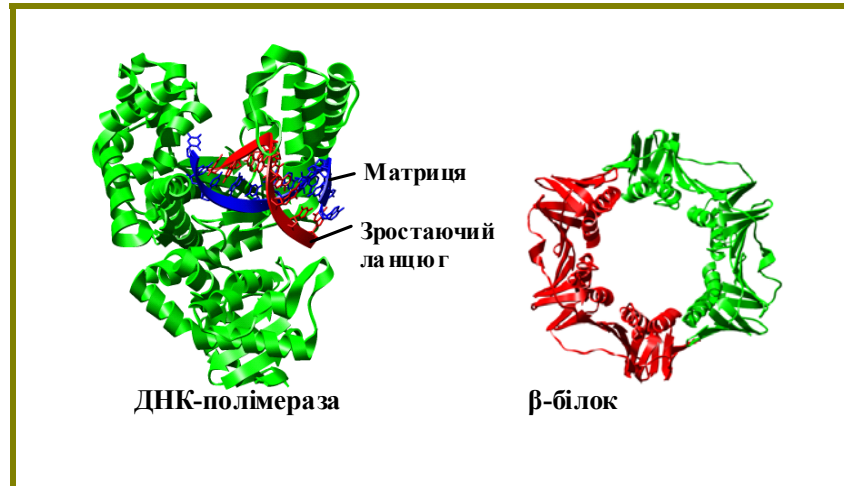


Рис. 16. Комплекс фрагмента Кленова бактеріальної ДНК-полімерази I з ДНК під час елонгації синтезу (код PDB 1L3T) і допоміжний ковзний обруч – β-білок (2POL)

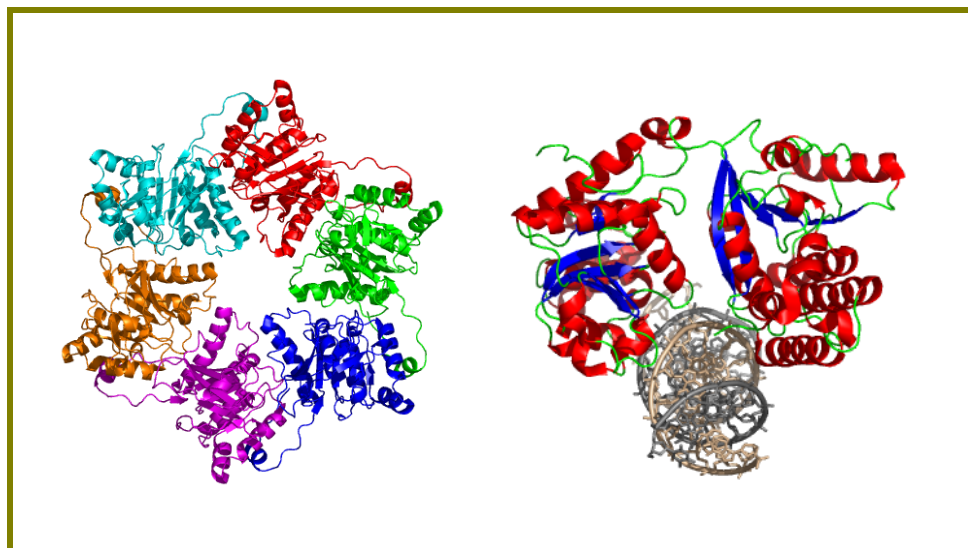


Рис. 17. Гексамерна геліказа (ліворуч, код PDB 1G8Y) і комплекс з ДНК АТРазного домену транслокази Rad54 родини Swi2/Snf2 (праворуч, код PDB 1Z63)

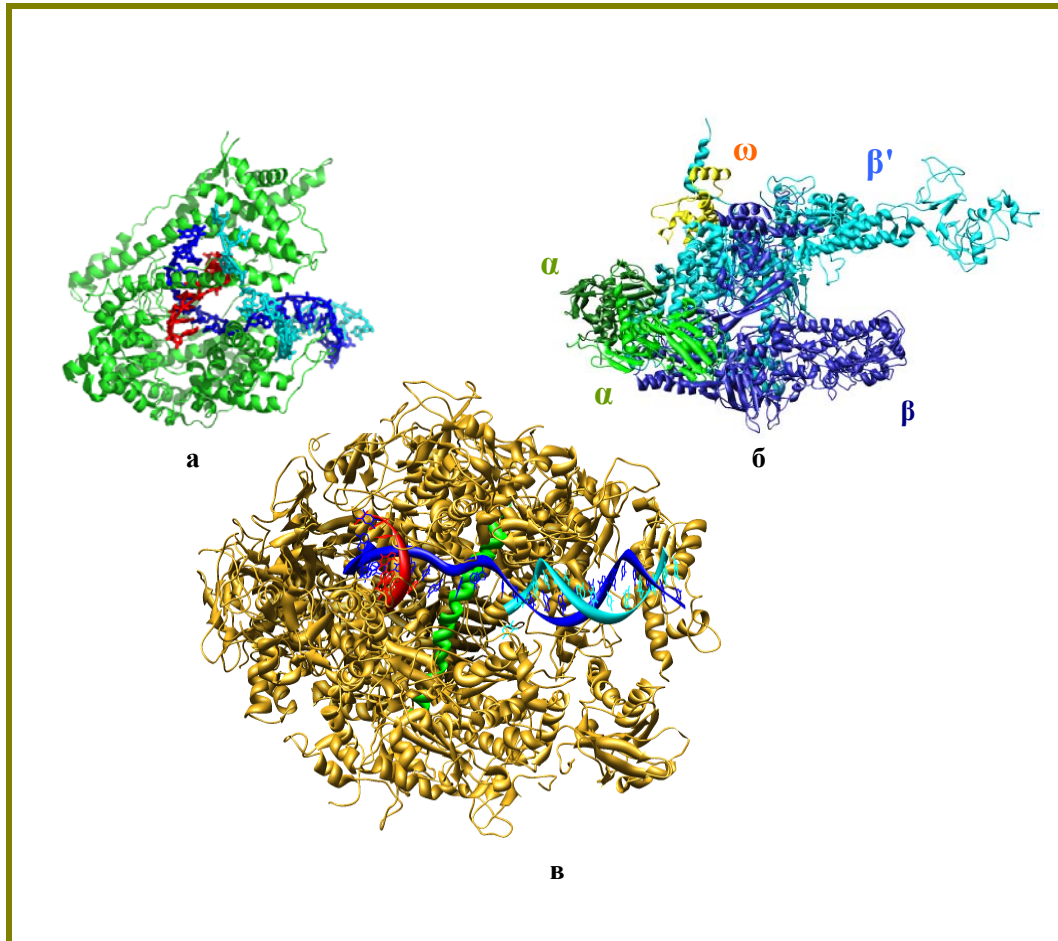


Рис. 18. РНК-полімерази: (а) комплекс мономерної РНК-полімерази бактеріофага Т7 з нуклеїновими кислотами під час елонгації транскрипції (код PDB 1MSW); (б) кор-фермент бактеріальної РНК-полімерази (1IW7, грецькими літерами позначено субодиниці); (в) елонгаційний комплекс еукаріотичної мультисубодиничної РНК-полімерази II (1R9T).
У складі елонгаційних комплексів матричний ланцюг ДНК – темно-синій, РНК – червона

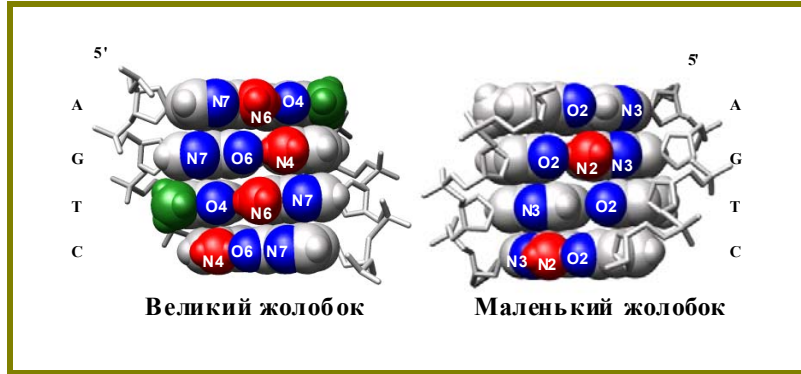


Рис. 19. Донорно-акцепторний патерн послідовності чотирьох пар основ з боку великого та маленького жолобків. Донорні аміногрупи забарвлені червоним, акцептори – синім, метильна група тиміну –зеленим

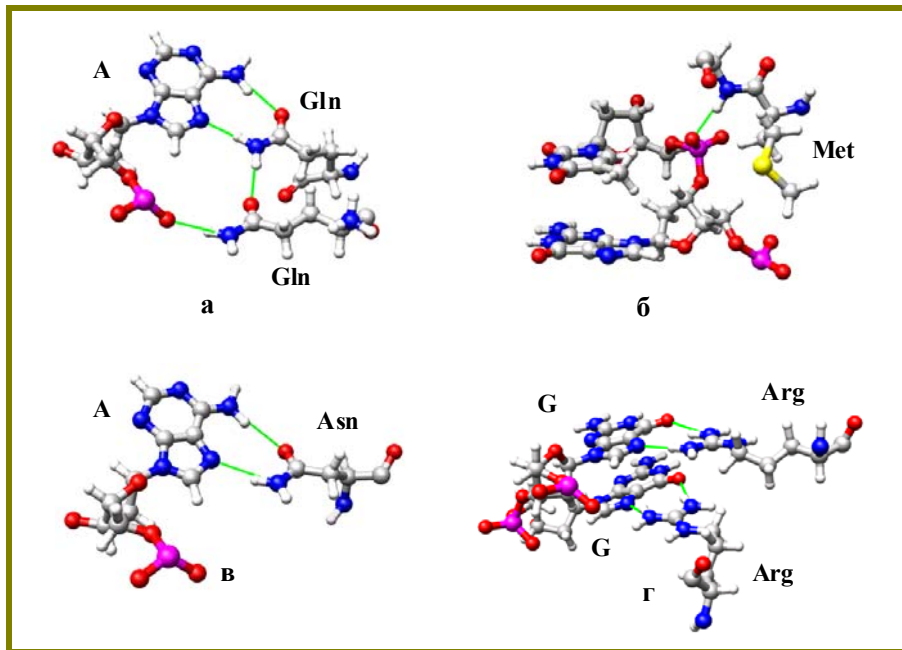


Рис. 20. Приклади водневих зв'язків між ДНК і білками (зі структур на рис. 7, 8, 9)
 (а) два водневі зв'язки між глутаміном і аденіном у комплексі з ДНК λ -репресора, одночасно аміногрупа Gln утворює водневий зв'язок з оксигеном іншого залишку Gln, який, у свою чергу, зв'язаний з оксигеном фосфатного залишку;
 (б) водневий зв'язок між NH пептидної групи та фосфатом у тому самому комплексі;
 (в) два водневі зв'язки між аспарагіном і аденіном у комплексі з ДНК гомеодомену;
 (г) два залишки аргініну утворюють по два водневі зв'язки з двома сусідніми гуанінами в комплексі цинкового пальця з ДНК

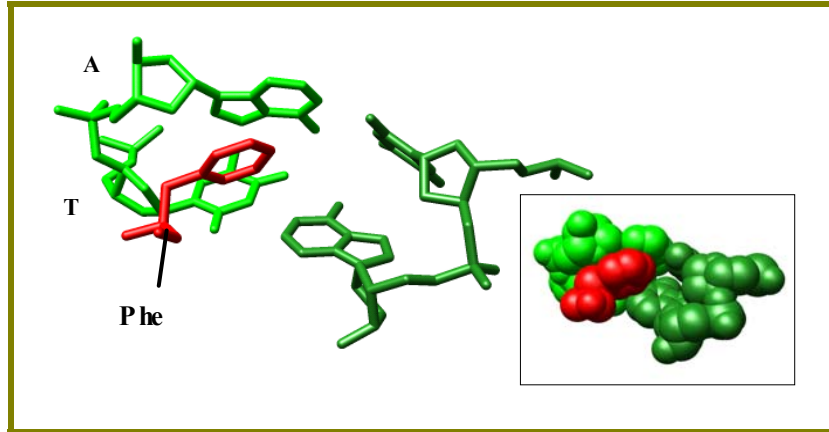


Рис. 21. Стекінг інтеркальованого залишку фенілаланіну з аденіном у динуклеотидному кроці ТА (п'ятий крок на рис. 7.4) у комплексі TBP із ТАТА-боксом (зі структури на рис. 14). На вставці: те саме зображення у вигляді атомної моделі

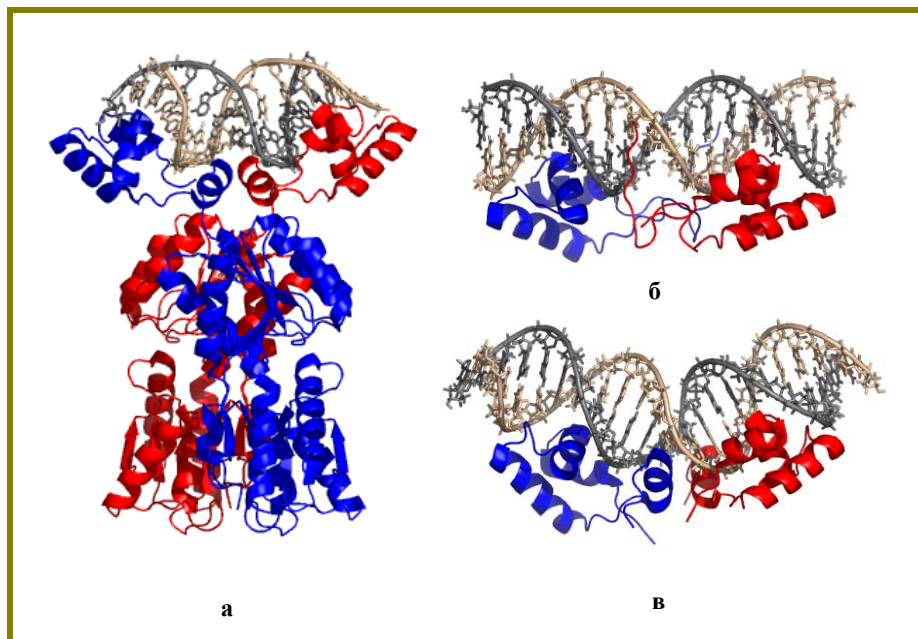


Рис. 22. Структура комплексу гомодимеру *lac*-репресора LacI зі специфічним оператором (а, код PDB 1JWL) і його ДНК-зв'язувальних доменів з неспецифічною послідовністю (б, 1OSL) та оператором (в, 1L1M)

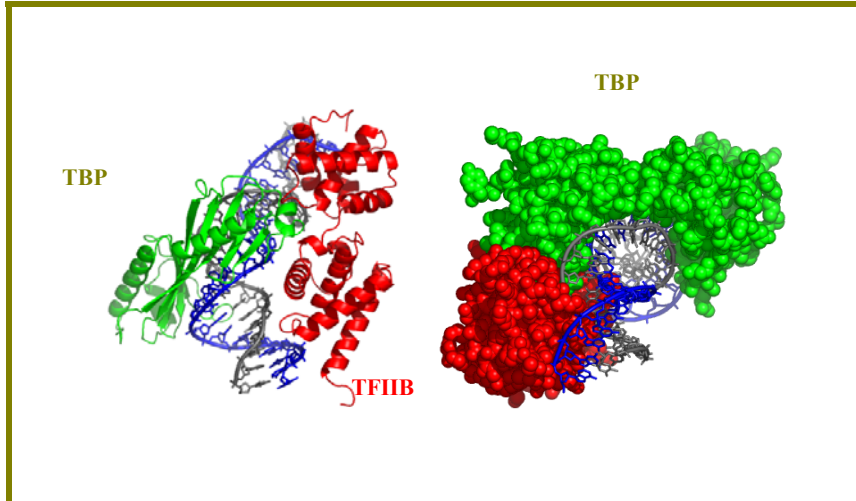


Рис. 23. Дві проєкції комплексу ДНК-зв'язувального домена ТВР і С-кінцевої частини ТФІІВ з ДНК (код PDB 1D3U)

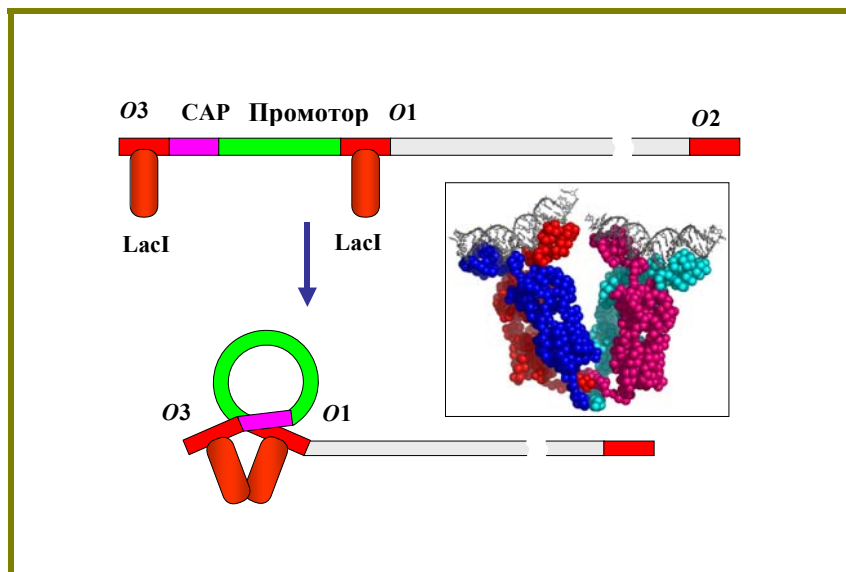


Рис. 24. Схема лактозного оперона та утворення петлі в його промоторі двома димерами *lac*-репресора LacI. O1, O2, O3 – операторні ділянки. На вставці: структура тетрамерного комплексу, зв'язаного з двома операторами (код PDB 1LBG, для білків показано тільки C^α-атоми)

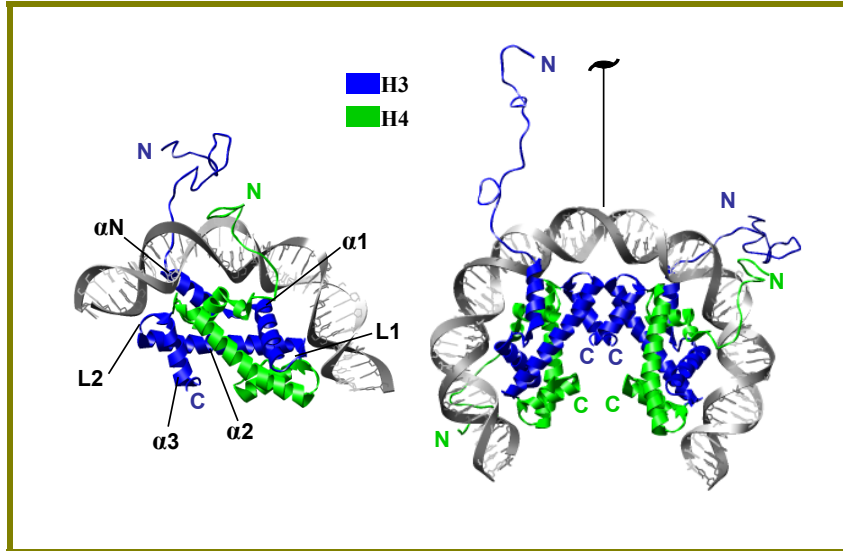


Рис. 25. Димер і тетрамер гістонів H3 і H4 у складі нуклеосоми (зі структури на рис. 26). Позначено N- і C-кінці поліпептидних ланцюгів, для гістону H3 – α -спіралі та петлі (L1, L2) між спіралями. Для тетрамерного комплексу (тетрасоми) зображено вісь симетрії другого порядку, яка міститься в площині рисунка. У просторі права частина тетрасоми розташована ближче до глядача – виходить із площини рисунка вперед, ліва – назад

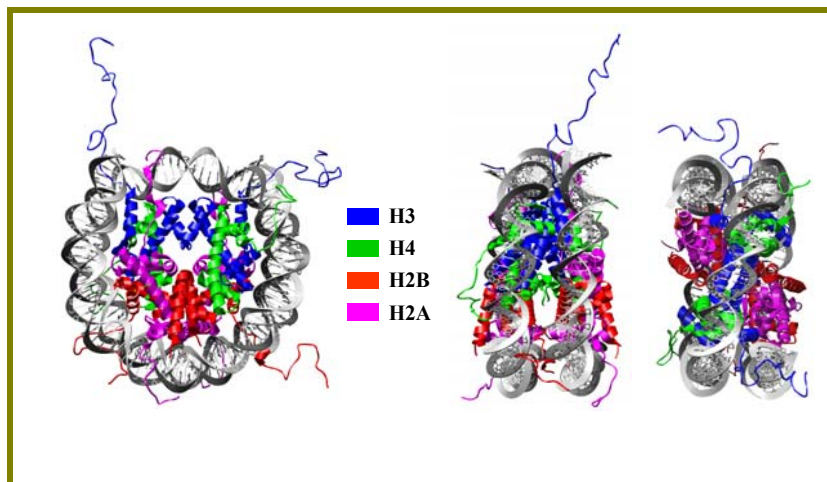


Рис. 26. Структура нуклеосоми, що містить 147 пар основ ДНК, у трьох проекціях (код PDB 1KX5)

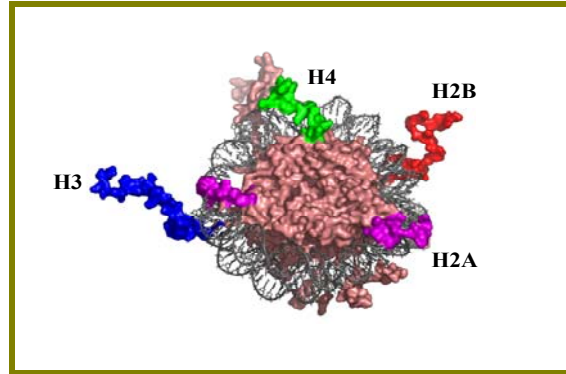


Рис. 27. Кінцеві хвости гістонів у структурі нуклеосоми (структура з рис. 26): кольором виділено по одному N-кінцевому хвосту кожного гістону, а також С-кінцевий – гістону H2A (поряд із N-кінцем H3)

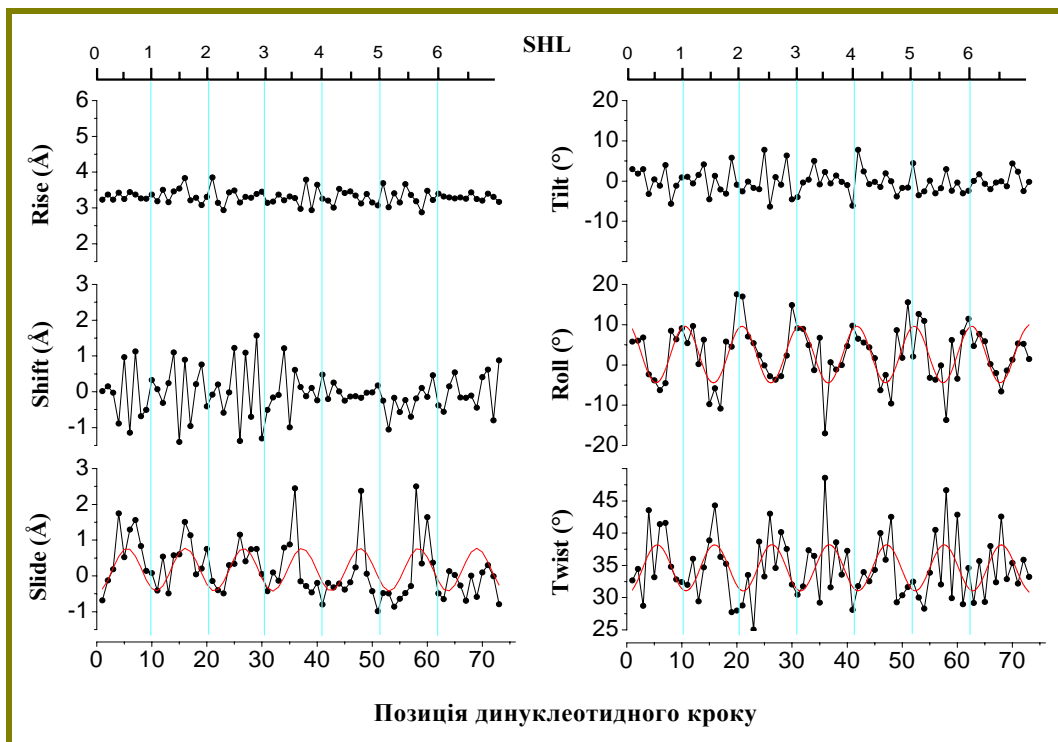


Рис. 28. Конформаційні параметри половини нуклеосомної ДНК (зі структури на рис. 26). Динуклеотидні кроки пронумеровано від центру нуклеосомної ДНК до периферії. Суцільні криві – апроксимації залежностей синусоїдами

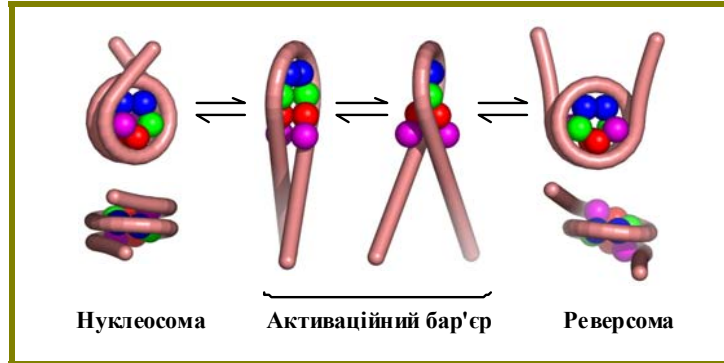


Рис. 29. Схема структурної перебудови в нуклеосомізі зміною хіральності суперспіралі. Гістони зображено у вигляді кульок, кольоровий код, як на рис. 26

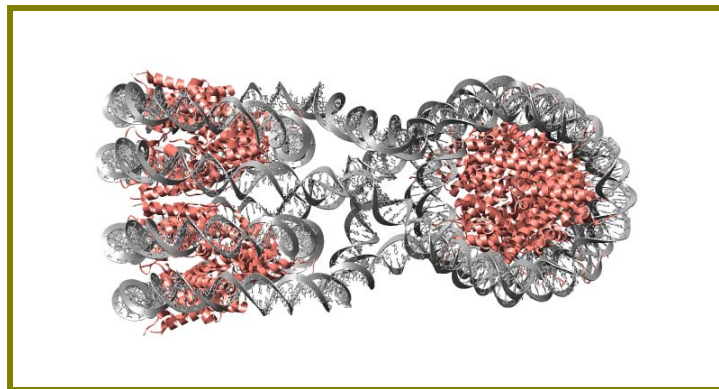


Рис. 30. Структура компактизованого елемента полінуклеосомної фібрили в кристалах тетрануклеосом (код PDB 1ZBB)

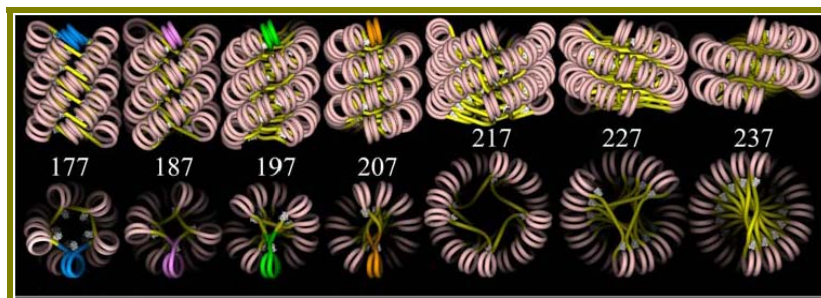


Рис. 31. Моделі регулярних компактних хроматинових фібрил із різною величиною нуклеосомного повтору (числа у парах основ). З роботи Wong et al., 2007 (PloS ONE 2(9): e877. doi:10.1371/journal.pone.0000877.g003)

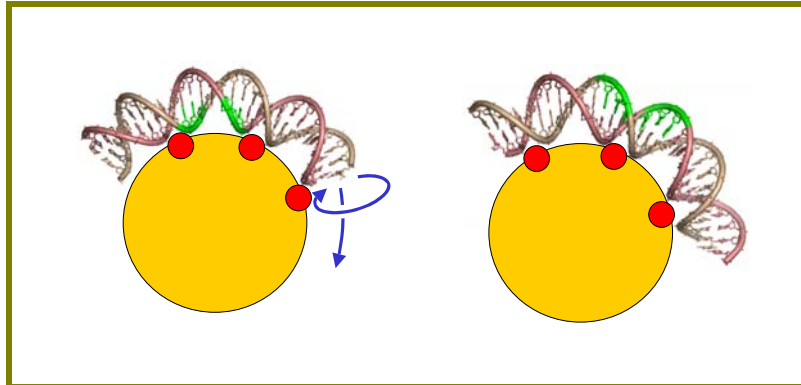


Рис. 32. Ротаційне позицювання нуклеосоми: зсув ДНК по поверхні октамеру гістонів на піввитка подвійної спіралі призводить до експонування чи екранування регуляторного сайту (забарвлений зеленим)

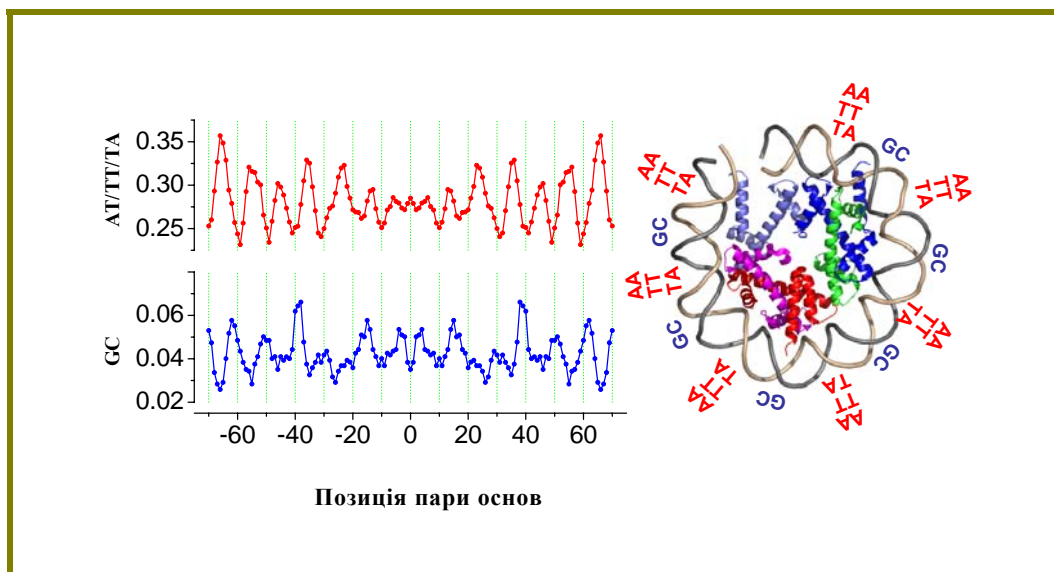


Рис. 33. Частота зустрічальності динуклеотидних кроків AA/TT/TA та GC вздовж нуклеосомних ДНК у геномі дріжджів. Праворуч: переважні позиції відповідних динуклеотидних кроків. За даними Segal et al. (2006)

ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК

Азотисті основи 11–12

Актиноміцин D 212–213

Амінокислоти 227–228

Біномраль 150–151

Бромистий етидій 162, 213–215

Взаємодії

– вандерваальсові 20, 53–54

– електростатичні 55, 60, 64, 66, 92–97, 107–108, 128–129, 140, 189–190, 192–193, 207–208, 240–242

– гідрофобні 57–59, 63, 65, 230, 243

Вигин ДНК 23–24, 36–37, 121–122, 233, 236, 285–286, 290

– анізотропія 37, 122

– залежність від іонної сили 109, 128–129

– перманентний 36–37, 129–130

Вода

– взаємодія з ДНК 204–206

– роль у білково-нуклеїнових взаємодіях 243–245

Впізнання білково-нуклеїнове 242, 250–253

Вторинна структура білків 229–230

Геометричне кручення 150

Гістони

– корові 279–284

– лінкерні 279, 307–309

Графік

– Арреніуса 83

– Вант-Гоффа 190–192, 246

– Скетчарда 194–196, 200, 217–218

Дауноміцин 213–214

Дезоксирибоза 13–14

Динуклеотиди

- конформація 20–21, 23, 26, 29–30, 36, 38–39
- термостабільність 65–66, 69

Довжина

- Б'єррума 93
- персистентна 123–130

Еластичний стрижень 120–122

Енергія

- активації 83
- вигину 122, 127
- вільна 46–50
 - активації 81–83
 - зв'язування 53, 188–189
 - стандартна 53, 189
- внутрішня 47–48
- електростатична 55, 61, 65, 66, 99, 102–104, 110, 192–193
- межі 71–73
- надспіралізації 168
- торсійних деформацій 120–121, 170

Ентальпія 48

- активації 82

Ентропія 48

- активації 82
- змішування 51–52, 71, 97, 99, 189
- конформаційна 49, 60, 64–65

Енхансер 255, 257–258

Енхансосома 257

Ефект виключеного об'єму 120

Жолобки подвійної спіралі 18–19, 21, 27

Закон діючих мас 53

Зв'язок

- водневий 55–57
- глікозидний 13
- фосфодієфірний 15

Ідеальний розчин 189
Ізотерма зв'язування 193
Інтеркаляція 212–219
Іонна сила 94

Калориметрія 62–63, 202

Квадруплекс 32–33

Кінетика

- денатурації ДНК 84–86
- конформаційних перетворень 80–84
- зв'язування білків з ДНК 266–267, 270–272
- ренатурації ДНК 86–87

Компактизація

- ДНК 139–141
- хроматинової фібрили 307, 309, 311–312

Конденсація протиіонів 99, 107

Константа

- жорсткості
 - торсійної 120–121
 - щодо вигину 122, 127
- зв'язування 52, 188–190
- надспіралізації силова 168
- рівноваги 46–47, 51–52
- швидкості 82
 - елементарного кроку 80
 - співударянь 82

Конформаційні параметри

- динуклеотидів 22–23
- спіральні 24
- пар основ 21–22

Кооперативність

- структурних перетворень 70–73, 75–79
- зв'язування 196–200, 216–219, 253–257

Кривизна 122, 150

Кунівський сегмент 119, 125

Ланцюг

- вільнозчеплений 116–120
- черв'якоподібний 122–126

Лапласіан (див. *оператор Лапласа*)
Лейциновий зіпер 235

Магнітний пінцет 132–133

Метод

– молекулярної динаміки 105–106

– Монте-Карло 105

Мініцикли ДНК 169–173, 218–219, 298–300

Надрозтягання ДНК 135–136

Надспіралізація 152, 158–163

Натиск райзингу 171–173

Нетропсин 161, 211–212

Нормаль 150–151

Нуклеозид 12

Нуклеосома 279–283

Нуклеотид 13–14

Оператор Лапласа 92, 94, 100

Оптична пастка 133–134

Парадокс надспіральності 297–298, 301

Параметр Дебая-Хюккеля 93

Петлі ДНК 259–264, 279–280

Піримідини 11–12

Плавлення ДНК 61–63, 65–67, 70–75, 84–86, 110–111, 136, 138, 203–204

Плектонома 137–138, 157

Позиціювання нуклеосом 312–318

Потенціал

– електростатичний 93–95, 102

– Леннард-Джонса 54

– хімічний 52

Потрійна спіраль 31–32

Принцип

– Больцмана 47–48

– економічності гідратації 205

Промотор 255, 258, 260, 268–270, 316–317
Профлавін 213–215
Пурини 11–12

Радіус Дебая 93

Райз 23–24

Райзинг 152–155

– плектонеми 157

– суперспіралі 156

Реверсома 304

Релаксація циркулярної ДНК 159–160

Ремоделювання хроматину 318–322

Рибоза 13

Рівняння

– Вант-Гоффа 190–192

– Дебая – Хюккеля 94–95

– Пуассона 92

– Пуассона – Больцмана 93

– для зарядженого циліндра 100

– Фуллера 152

РНК 11–13, 19, 22

РНК-полімераза 162, 239, 258, 267–270

Розподіл

– протиіонів навкруг ДНК 102, 106, 109

– топоізомерів рівноважний 167–169

Розтягнення ДНК 134–136

– ентальпійне 135

– ентропійне 135

Рол 23

Слайд 23

Стекінг 19–20, 59–60, 65, 69, 212, 243

Структурні переходи

– залежні від надспіралізації 30, 32, 137–139, 176–180

– клубок-глобула 139–141

– кооперативні 75–79

– поступові 76–77

– спіраль-клубок 70–75

– фазові 79

Суперспіраль 155–157, 284–287

Тангент 124–125, 150–151
Твіст (кут) 23–24, 35–36
Твіст (кількість витків) 137, 150–151
Температура плавлення 61–62
Теорема Ландау 79
Теорія Менінга 95–100
Теплоємність 50
Тетрасома 281, 302
Тилт 23
Топоізомерази 163–167
Топоізомери 159
Топологічний інваріант 149
Топологічні обмеження 149
Транслоказа 162–163

Фактори транскрипції 255–258

Форми ДНК структурні

- А 25–28
- В 25–29, 34–39
- С 28
- D 29
- Н 31–32
- Р 139
- S 135–136
- Z 29–30

Формула Стірлінга 71

Хлорокін 161–162, 213

Хрестоподібна форма ДНК 30–31

Хроматинова фібрила 279, 306–312

Хроматосома 308

Цинковий палець 234

Цис-елементи 255–256

Цукрофосфатний остов 15–16

Час

- елементарного кроку 80
- обертальної кореляції 80
- релаксації 83

Число зачеплень 148–149, 152–153

Чотириланцюгове з'єднання 33–34

Шифт 22–23

Щільність надспіралізації 158

АТ-гак 236

НЛН 235

НМГ 236

НМГ-бокс 236–237

НТН 233

j-фактор 131–132

lac-репресор 241, 246–247, 260–262

ТАТА-бокс 237–238

ТВР 237, 255

α -спіраль 229–230

β -структура 229–230

Навчальне видання

СИВОЛОБ Андрій Володимирович

ФІЗИКА ДНК

Навчальний посібник

Редактор *В. Р. Філь*

Технічний редактор *Л. П. Шевченко*

Оригінал-макет виготовлено Видавничо-поліграфічним центром "Київський університет"



**Формат 70x100^{1/16}. Ум. друк. арк. 27,09. Наклад 200. Зам. № 211-5749.
Гарнітура Times New Roman. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б9.
Підписано до друку 15.12.11**

Видавець і виготовлювач
Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет",
б-р Т. Шевченка, 14, м. Київ, 01601
☎ (38044) 239 32 22; (38044) 239 31 72; тел./факс (38044) 239 31 28
e-mail: vpc@univ.kiev.ua
<http://vpc.univ.kiev.ua>
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02