Ю. Д. Нечипуренко

АНАЛИЗ СВЯЗЫВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

Связывание лигандов с нуклеиновыми кислотами:
от действия лекарственных соединений
до молекулярного конструирования и нанотехнологий

Институт компьютерных исследований

Москва ♦ Ижевск

2015

Долг теоретического исследования состоит в том, чтобы выработать форму выражения результатов экспериментов
Дж. В. Гиббс

Введение

Регуляция работы генов осуществляется посредством взаимодействия лигандов–белков, биологически активных соединений и малых нуклеиновых кислот с ДНК и РНК. В роли лигандов выступают как регуляторные белки (белковые факторы и целые белковые комплексы — например, гистоновые октамеры), так и олигонуклеотиды, малые РНК и разного рода молекулы, определяющие упаковку и экспонирование регуляторных участков ДНК. Лиганды служат тем инструментарием живой клетки, который позволяет успешно сохранять, эффективно проявлять и своевременно востребовать генетическую информацию. Лиганды связываются с участками нуклеиновых кислот, имеющими регуляторное значение, «включают» и «выключают» считывание гена, определяют пути превращения пре-мРНК в мРНК, играют ключевую роль при трансляции генетической информации, в результате которой и возникает сложная упорядоченность структур и процессов живой клетки.

Для выполнения большинства из этих функций необходимо координированное действие разных лигандов. На первый взгляд, эта «организованность» связывания лигандов с нуклеиновыми кислотами противоречит равновесной природе взаимодействия молекул (такие взаимодействия носят характер случайного процесса). Ситуация осложняется тем обстоятельством, что в живой клетке взаимодействие ДНК с регуляторными белками проходит на фоне её связывания с полипептидами, протаминами, олигонуклеотидами и разного рода низкомолекулярными соединениями, что сами молекулы ДНК в хромосомах плотно упакованы и т. д.

Противоречие между статистическим и организованным поведением молекул лиганда («хаосом» и «порядком») может найти разрешение в представлениях физической теории адсорбции. Дело в том, что сами молекулы ДНК и РНК, на которых происходит связывание, организованы как регулярные матрицы, имеющие реакционные центры (химические группы), при помощи которых на матрицах «записаны» определенные сигналы. Регуляторные белки, в свою очередь, несут на себе «оттиски» участков

этих матриц: группы атомов, которые способны вступать с ними во взаимодействие. Таким образом, связывание белков с матрицами НК происходит посредством многоточечной координированной адсорбции, приводящей к молекулярному узнаванию белками соответствующих участков матрицы. Координация связывания лигандов на матрицах НК может быть обусловлена также кооперативными взаимодействиями между адсорбированными лигандами — и существованием определенных граничных условий.

Если лиганд связывается стереоспецифично только с определенными участками матрицы («сайтами», которые редко встречаются на ДНК), такое связывание описывают при помощи уравнений химического равновесия. Однако большинство биологически активных лигандов способно связываться с разными участками матрицы. При таком, «неспецифическом» связывании один лиганд может закрывать участок матрицы, делая его недоступным для связывания других молекул лиганда. Если константы связывания на разных участках НК равны, то в этом случае говорят о связывании на гомополимере. В случае, когда такие константы разных участках НК различаются, говорят о связывании на гетерополимере. Описание связывания в этих случаях требует привлечения методов статистической термодинамики.

Благодаря интересу основателя статистической механики Джозайя Вилларда Гиббса к явлению адсорбции мы имеем известное уравнение Гиббса [1]. Описанию связывания лигандов с биополимерами посвящены работы Арчибальда Хилла и Джеральда Скетчарда [2, 3]. Развитие теории физической адсорбции интенсивно проходило в середине XX века (в том числе в статьях Зельдовича, Темкина, Киселева и других отечественных исследователей). Основополагающей здесь можно назвать работу Ирвинга Ленгмюра, посвященную экспериментальному изучению связывания молекул газа на поверхностях [4]. Уникальным по широте приложений оказались уравнения изотерм Хилла и Ленгмюра. Следует упомянуть также работу Роберта Сипса [5], в которой описывается гетерогенное связывание лигандов и предложена своя формула для описания изотермы адсорбции.

В работах Террела Хилла [6], Самуэля Латта и Герберта Собера [7] и Дональда Крозерса [8] сформулирован подход, позволяющий описывать адсорбцию лигандов на линейных полимерах. Террел Хилл предложил ряд моделей для описания связывания малых молекул с линейными полимерами, и получил уравнения, описывающие такое связывание. Самуэль Латт и Герберт Собер получили точное решение уравнений адсорбции для случая некооперативного связывания лигандов на полимере, все звенья которого одинаковы (гомополимере). Дональд Крозерс продемонстрировал возможность расчета уравнений адсорбции в случае, когда лиганд связы-

вается на гетерополимере. Применение матричного метода статистической термодинамики [8] открыло перспективы для анализа сложных систем, когда лиганды связываются с молекулами ДНК.

В работах Георгия Гурского и Александра Заседателева с соавторами [9–13] были сформулированы представления о решёточном узнавании, как общем механизме, лежащем в основе взаимодействия между молекулами нуклеиновых кислот и регуляторными белками. Молекула НК (или система молекул НК) в рамках таких представлений рассматривается как матрица, в которой можно выделить решётку реакционных центров. Лиганд также несёт решётку реакционных центров, которые могут взаимодействовать с центрами связывания на НК по принципу комплементарности. Заметим, что представление о молекуле, на которой происходит адсорбция (то есть молекуле, выполняющей роль адсорбента), как о матрице, не было введено в работах Гурского и соавторов, однако по сути своего подхода эти авторы именно так представляли молекулу НК. Всюду далее здесь молекулы ДНК и РНК, как двухцепочечные, так и одноцепочечные будут называться матрицами, когда будет рассматриваться связывание на них лигандов.

Представление об адсорбенте как о матрице требует определенной расшифровки: мы предпочитаем употреблять термин «матрица» потому, что он является более общим, чем «полимер». Далее будет показано, что матрицу могут составлять, например, две молекулы ДНК, сближенные в пространстве. Мы предпочитаем термин «матрица» термину «решётка» потому, что представление о решётке реакционных центров является уже *модельным* — то есть регулярно расположенные атомы в составе матрицы можно рассматривать как решётку реакционных центров на той стадии моделирования, когда реальная молекулярная система заменяется схемой связывания в процессе создания решёточной модели адсорбции. Заметим, что английское «lattice» может переводиться и как *матрица* и как *решётка*.

Лиганд «узнает» участок матрицы и связывается с ним, и если такое связывание равновесно и обратимо, то можно применить к нему представления теории физической адсорбции. В простейшем случае в качестве матрицы выступает линейный полимер, в более сложных случаях матрица представляет собой двойную, тройную, четверную спираль ДНК или даже систему таких спиралей, в которой можно выделить определённые решётки реакционных центров.

Александр Заседателев и соавторы [9] сформулировали модель адсорбции и нашли решение уравнений адсорбции для кооперативного связывания протяженного лиганда на полимерах в той форме, в которой оно используется сейчас (так называемое «приближение бесконечного полиме-

ра»). Георгий Гурский и соавторы [10–13] получили рекуррентные соотношения, позволяющие рассчитывать изотермы адсорбции на гетерополимере произвольной длины. Эти авторы нашли также асимптотические соотношения, позволяющие рассчитать начальный ход изотерм адсорбции в представлении Скетчарда для связывания лиганда на гомополимере и гетерополимере со случайной последовательностью нуклеотидов и анализировать экспериментальные кривые связывания. В целом, современный подход к описанию адсорбции протяженных лигандов на линейных матрицах нуклеиновых кислот основан на работах Заседателева, Гурского и Волькенштейна, а также наших работах с соавторами [14, 15], что позволило Дмитрию Ландо назвать этот подход сокращенно «подходом ЗГВН» [16]. Здесь далее я буду использовать сокращение ЗГВ, так как свои работы считаю вытекающими из оснований, заложенными в работах указанных авторов.

Заметим, что проблемы описания связывания протяженных лигандов с линейными полимерами привлекали внимание широкого круга авторов (в частности, речь шла о связывании олигонуклеотидов с полинуклеотидами: именно такое связывание послужило основанием для развития представлений о связывании белков с ДНК). С появлением статьи Мак-Ги и фон Хиппеля [17] (которая была выполнена в русле подхода ЗГВ) к проблеме неспецифического взаимодействия лигандов с полимерами НК было привлечено внимание широкого круга биохимиков и молекулярных биологов: авторы наглядно показали, как можно представить все события, происходящие на матрице в рамках теории вероятностей и показали, что соотношения, описывающие связывание лигандов, имеют форму уравнений химического равновесия (хотя и выглядят гораздо сложнее).

Еще в конце 40-х годов XX века Джеральд Скетчард сформулировал четыре вопроса, которые ставит перед собой исследователь, изучающий связывание лигандов: «Сколько? Как сильно? Где? Почему?» Ответы на два первых вопроса помогает получить тот способ представления кривых связывания, который называется теперь представлением Скетчарда [3]. Ответ на третий вопрос в случае связывания лигандов с матрицами НК позволяет получить техника диаграмм фут-принтинга (см., например, здесь [18]). Как показали в своих работах Гроховский и соавторы [18], диаграммы фут-принтинга вместе с подходами генной инженерии являются мощным методом, позволяющим локализовать места посадки лигандов, и в седьмой главе будут подробно рассмотрены методы количественного анализа таких диаграмм, которые позволяют получать детальную количественную информацию о связывании. Что же касается четвертого вопроса, то для ответа на него необходимо предварительно задаться вопросом

«Как?», и представить, каким образом происходит связывание, то есть восстановить в общих чертах стереохимическую схему связывания. Схема связывания может включать как один вариант образования комплекса между лигандом и связывающим местом на ДНК, так и несколько таких вариантов.

В целом описание взаимодействия молекул НК с лигандами на языке статистической механики (в русле подхода ЗГВ) включает в себя два взаимосвязанных структурных компонента: это физическая и математическая модели адсорбции. Однако, прежде чем перейти к описанию этих моделей, полезно представить себе общую схему анализа данных по связыванию лигандов с нуклеиновыми кислотами (Рис.0.1). «Позвоночником» схемы является представление о том, что термодинамическая теория выступает в качестве посредника между первичными экспериментальными данными и данными, рассчитанными на основании моделей адсорбции. Видно, что существует целый ряд промежуточных звеньев между моделями и экспериментальными данными.

В монографии А. А. Лопаткина «Теоретические основы физической адсорбции» [19] (это единственная отечественная монография, посвященная адсорбции и вышедшая из печати за последние тридцать лет) содержится призыв к осторожности в применении теории адсорбции. Разделяя эту осторожность, хотелось бы всё же отметить, что в последние годы опубликованы тысячи работ, в которых теория адсорбции применялась к описанию связывания лигандов с биополимерами, было достигнуто существенное продвижение в понимании механизмов такого взаимодействия. С точки зрения теории физической адсорбции взаимодействие лигандов с линейными полимерами является частным случаем применения одномерной решёточной модели адсорбции. Именно решёточная модель позволяет построить не только термодинамическое, но и математическое описание адсорбционной системы.

А. А. Лопаткин пишет о решёточных моделях адсорбции: «Решёточные модели — это весьма обширный класс моделей, используемых при описании различных физических явлений, в том числе адсорбции. (Их применяют также в теории твердого тела при рассмотрении ферромагнетизма, смешанных кристаллов, сплавов, фазовых переходов порядок-беспорядок в твердом веществе, а также в теории жидкостей и т. д.). В адсорбционном варианте решёточной модели сложное, но периодическое адсорбционное поле вблизи поверхности заменяется на дискретную, также периодическую систему центров. В одномерном случае центры образуют цепочку. Центры могут быть одинаковыми или разными: в первом случае решёточная модель имитирует однородную поверхность, во втором — неоднородную».

Мы будем использовать понятие «решёточная модель адсорбции» в таком смысле, в то время как под «схемой связывания» будем подразумевать ту часть модели адсорбции, которая геометрически описывает взаимодействие лиганда с матрицей (модель адсорбции включает в себя также помимо схемы связывания ещё термодинамическое описание взаимодействий в системе).

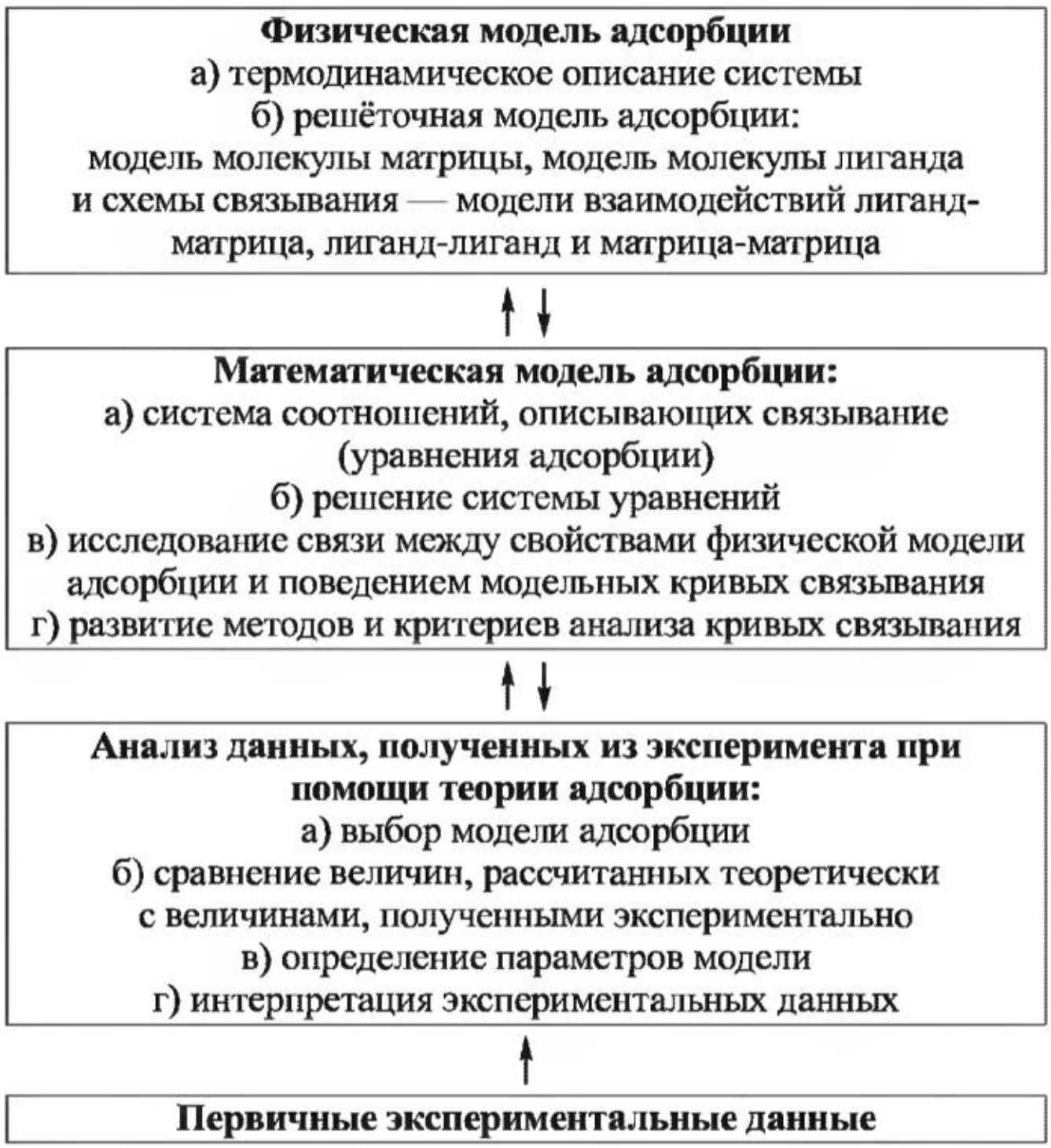

Рис. 0.1 Схема, демонстрирующая взаимосвязи между отдельными этапами исследования связывания лигандов с матрицами НК

В тысячах экспериментальных работ для анализа взаимодействия лигандов с ДНК применялись представления теории физической адсорбции. Однако в значительной части этих работ такое применение было некритичным: рассматривались экспериментальные кривые связывания и для их анализа применялись соотношения, которые в англоязычной литературе обычно связывают с именами Арчибальда Хилла, Джеральда Скетчарда, Роберта Сипса, Терелла Хилла и Мак-Ги и фон Хиппеля. Сами по себе со-

отношения, однако, предполагают как рассмотрение соответствующей модели адсорбции, так и обоснование её применения. Более того, корректное описание модели адсорбции требует оперирования понятиями определенного ряда, между тем, в применении теории адсорбции к биологическим явлениям, существуют известные «лакуны» в том числе и терминологического характера. Понятие «кооперативности» стало довлеющим, а самый простой тип кооперативности, соответствующий контактным взаимодействиям между адсорбированными лигандами, стал восприниматься как главный и чуть ли не единственный. В сложных биологических системах могут наблюдаться самые разные типы кооперативных взаимодействий, да и сами кооперативные взаимодействия являются не единственным способом координации лигандов.

Заметим, что в области применения теории адсорбции к биологическим системам терминология ещё не устоялась. Здесь используется понятие «связывание» наряду с понятием «адсорбция» по сути как синонимичное: равновесное связывание рассматривается как явление физической адсорбции. В целом же понятие связывания является более общим хотя бы потому, что может включать как равновесное, так и неравновесное (химическое) связывание.

Указанием на тип модели адсорбции служит форма экспериментальных кривых, однако, экспериментатор, который намерен исследовать систему наиболее полно и обоснованно, должен иметь перед собой «инструментарий» в виде целого ряда моделей адсорбции. Задача теории состоит в «вооружении» исследователя как понятийной базой, так и набором признаков, по которым тому или иному виду кривых ставится в соответствие модель адсорбции.

Дуглас Поланд [20] обратил внимание на то, что даже в самом известном руководстве по биофизической химии Кантора и Шиммеля [21] есть примеры, в которых некорректно применяются модели адсорбции (не обоснованно вводится ряд предположений о схеме связывания лиганда). Если теория решает «прямую» задачу: при заданной модели адсорбции находит уравнения, описывающие связывание, то на практике обычно встает «обратная» задача: необходимо по кривым связывания определить свойства модели адсорбции. Для решения такой задачи необходима предварительная работа по классификации моделей адсорбции и типологическому описанию кривых связывания. Однако до настоящего времени в литературе не существовало ни подобной классификации, ни систематического описания связывания лигандов с биополимерами, в котором бы с единой точки зрения рассматривалась вся совокупность достижений теории адсорбции. Наиболее полное описание моделей адсорбции сейчас содержит-

ся в книге Кантора и Шиммеля [21], однако она вышла из печати уже более тридцати назад. В последнее время появились новые концепции, позволяющие модернизировать решёточную модель адсорбции (в частности, были развиты представления о деформации решётки реакционных центров лиганда при связывании - в реальности молекулы белка не только претерпевают изменения сами при адсорбции, но существенно искажают и саму ДНК-матрицу (см, например, [22,23]).

Развитие теории для количественного описания связывания лигандов с матрицами НК до настоящего времени не приняло формы систематического знания: тысячи публикаций в этой области связаны с одной-двумя простейшими моделями адсорбции, в то время как единичные работы посвящены более сложным моделям, которые не вошли ещё в обиход экспериментаторов. С развитием именно таких, более сложных моделей можно связывать надежды на адекватное описание реальных биологических систем.

Системный подход к специфическому связыванию лигандов с макромолекулами с точки зрения статистической термодинамики содержится в монографии Энрико Сера [24], которая вышла в 1995 году. Однако в ней не рассматриваются многие эффекты, обусловленные неспецифическими взаимодействиями. Полезный обзор по связыванию лигандов с ДНК выпустил в 2006 году Владимиж Буяловский, однако в этом обзоре описана только та часть работ по теории адсорбции, которая понадобилась автору для анализа связывания ДНК с хеликазой [25]. Недавно появилась монография Гари Стормо [26], посвященная связыванию белков с ДНК, к ней мы также можем адресовать всех тех, кто интересуется именно специфичными взаимодействиями белков с ДНК: здесь они подробно описываются с точки зрения термодинамики и биоинформатики. Эта книга не рассматривает совокупность моделей адсорбции для биологически активных соединений. По сути, она развивает подход Георгия Гурского, Михаила Лившица и соавторов [27], а также Отто Берга и Питера фон Хиппеля [28]. Энергетическим аспектам взаимодействия лигандов с ДНК посвящена также монография Виктора Костюкова и Максима Евстигнеева [29] — в ней содержится множество экспериментальных данных по связыванию разного рода биологически активных соединений с ДНК и детальный анализ такого связывания. Развитию этого подхода посвящена также глава Максима Евстигнеева и Анны Шестопаловой в сборнике, посвященном применению компьютерных технологий в фармакологии [30].

Мы предприняли попытку составления современного «компендиума» моделей адсорбции, теоретических подходов и соответствующих им математических моделей, описывающих связывание лигандов с матрицами нуклеиновых кислот. Необходимым этапом исследования такого связыва-

ния в живой клетке является развитие как модельных экспериментальных систем, где такие комплексы изучаются *in vitro*, так и формирование модельных теоретических систем, в рамках которых становится возможным адекватное описание этих комплексов и изучение возможности применения моделей к описанию процессов, происходящих в клетке [31].

В самое последнее время теория адсорбции получила применение в задачах анализа связывания мРНК на ДНК-чипах. Посредством связывания мРНК из различных областей генома на чипах, содержащих пробы — олигонуклеотиды, комплементарные определенным последовательностям, измеряются концентрации разных мРНК и таким образом, определяют уровня экспрессии генов [32, 33]. В монографии (в Приложении) рассматривается анализ изотерм адсорбции мРНК на чипах. Можно упомянуть и ещё три примера применения моделей адсорбции: во-первых, описание шума генетической экспрессии [34], во-вторых, анализ устройства хроматина [35, 36] и, в-третьих, анализ кооперативного связывания лигандов с гуаниновым квадруплексом [37].

Такие модели и приложения не вошли в современные руководства по биофизике, так что в целом наша книга может рассматриваться как дополнение к известным учебным пособиям [38–40].

Литература и примечания

1. *Gibbs D.W.* On the equilibrium of heterogeneous substances // Trans. Connect. Acad., 1878, V. 3. P. 343–524. Перевод этой работы содержится в книге: *Джозайя Виллард Гиббс* Термодинамика. Статистическая механика. 584 с. — М.: Наука, 1982.
2. *Hill A.V.* The possible effects of the aggregation of the molecules of the hemoglobin on the dissociation curves // J. Physiol. (London) 1910, V. 40. P. iv–vii., см. также *Hill A.V.* The combination of hemoglobin with oxygen and with carbon monoxide // Biochemistry J. 1913 V. 7. P. 471–480.
3. *Scatchard G.* The attractions of proteins for small molecules and ions // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1949. V.15. P. 660–672.
4. *Langmuir I.* Solid-gas adsorption isotherms // J. Am. Chem. Soc., 1916, V. 38. P. 2267, см. также *Langmuir I.* The constitution and fundamental properties of solids and liquids // *J. Amer. Chem. Soc.* 1916. V. 38, P. 2221, и сообщение об этой работе: Строеніе и основныя свойства твердыхъ и жидкихъ телъ (ИЗЪ ТЕКУЩЕЙ ЛИТЕРАТУРЫ) // Успехи Физических Наук. 1918, Выпуск 1. С. 78–79.
5. *Sips R.* On the structure of catalyst surface. // J. Chem. Phys. 1948, V. 16, P. 490–495.
6. *Hill T.L.* Some statistical problems concerning linear macromolecules // J. Polymer Sci. 1957. V. 23. P. 549–562.

7. *Latt S.A., Sober L.H.* Protein-nucleic acid interactions. Oligopeptide- polyribonucleotide binding studies // Biochemistry. 1967. V. 6. P.3293–3306.
8. *Crothers D.* Calculation of binding isotherms for heterogeneous polymers. // Biopolymers. 1968. V. 6. P. 575–584.
9. *Заседателев А. С., Гурский Г. В. и Волькенштейн М. В.* Теория одномерной адсорбции. 1. Адсорбция малых молекул на гомополимере // Мол. биология. 1971. Т.5. С. 245–490.
10. *Гурский Г. В., Заседателев А. С. и Волькенштейн М. В.* Теория одномерной адсорбции. П. Адсорбция малых молекул на гетерополимере // Мол. биология. 1972. Т. 6. С. 479–489.
11. *Гурский Г. В., Заседателев А. С.* Точные соотношения, описывающие связывание регуляторных белков и других решёточных лигандов на двухспиральных полинуклеотидах // Биофизика. 1978. Т. 23. С. 932–946. См. также *Гурский Г. В., Заседателев А. С.* // В кн. Итоги науки и техники. Сер. Молекулярная биология. М. ВИНИИТИ, 1982, с. 190–237 и 12. *Gursky G. V., Zasedatelev A.S.* Thermodynamic and stereochemical aspects of binding interactions between sequence-specific ligands and DNA // Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol. 1984. V. 5, P. 53–139.
13. *Гурский Г. В., Туманян В. Г., Заседателев А. С., Жузе А. Л., Гроховский С. Л., Готтих Г.П.* Код, управляющий специфическим связыванием белков с ДНК и структура стереоспецифических участков регуляторных белков // Мол. биология. 1975. Т. 9. С. 635–651.
14. *Нечипуренко Ю. Д., Заседателев А. С., Гурский Г. В.* Теория одномерной адсорбции на гомополимере. Учет различных ориентаций молекул лиганда // Биофизика. 1979. Т. 24. С. 351–361. См. также *Нечипуренко Ю. Д., Заседателев А. С., Гурский Г. В.* // Кооперативные взаимодействия при связывании протяженных лигандов с ДНК. 1 Неконтактные кооперативные взаимодействия // Мол. биология 1984. Т. 18. С. 798–812, *Nechipurenko Yu. D., Gursky G. V.* Cooperative effects on binding of proteins to DNA // Bioph. Chem. 1986, V.24, P. 195–209, *Нечипуренко Ю. Д., Гурский Г. В.* Термодинамические модели связывания лигандов с ДНК // Биофизика. 2003. Т.48. С. 773–796.
15. *Нечипуренко Ю. Д., Волькенштейн М. В.* Анализ расположения нуклеосом на сателлитной ДНК // ДАН СССР. 1986. Т.286. С. 216–220.
16. *Lando D. Y., Fridman A. S., Haroutiunian S. G., Vardanyan V. I.* Representation of binding parameters for DNA-ligand complexes using two infinite series characterizing long-range ligand-ligand interactions along the double helix // Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus., 2006. V. 50, P. 46–50.
17. *McGhee J. D. and von Hippel P. H.* Theoretical Aspects of DNA-Protein Interactions: Co-operative and Non-co-operative Binding of Large Ligands to a One-dimensional Homogeneous Lattice. // J. Mol. Biol. 1974. V. 86. P. 469–489.
18. *Гроховский С. Л., Николаев В. А., Зубарев В. Е., Суровая А. Н., Жузе А. Л., Чернов Б. Л., Сидорова Н. Ю., Заседателев А. С., Гурский Г. В.* Специфическое расщепление ДНК аналогом нетропсина, содержащим хелатирующий

ион меди(II) пептид Gly-Gly-His. Молекуляр. Биология. 1992. Т. 26. С.1274–1297, см. также *Grokhovsky S. L., Surovaya A. N., Burckhardt G., Pismensky V. F., Chernov B. K., Zimmer Ch. and Gursky G. V.* DNA Sequence Recognition by Bis-linked Netropsin and Distamycin Derivatives. FEBS Lett. 1998 V. 439. P. 346–350; в том же русле выполнено очень любопытное исследование *Wells G., Martin, C. R., Howard, P. W., Sands, Z. A., Laughton, C. A., Tiberghien, A., ... & Thurston, D. E.*. Design, synthesis, and biophysical and biological evaluation of a series of pyrrolobenzodiazepine-poly (N-methylpyrrole) conjugates // Journal of medicinal chemistry. 2006. Т. 49. №. 18. С. 5442–5461; методы анализа диаграмм разработаны нами в следующих публикациях: *Рябоконь В. Ф., Нечипуренко Ю. Д., Гурский Г. В.* Количественные методы анализа диаграмм фут-принтинга для комплекса лиганда с ДНК с известной последовательностью. // ДАН. 2004. Т. 398, С. 832–837., см. также: *Nechipurenko Yu. D., Jovanovic B., Riabokon V. F., Gursky G. V.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2005. V. 15. P. 660–672.

19. *Лопаткин А. А.* Теоретические основания физической адсорбции. — М. МГУ, 1983.
20. *Poland D.* Ligand binding distributions in nucleic acids // Biopolymers. 2001. V. 58. P. 477–490.
21. *Кантор Ч., Шиммел П.* Биофизическая химия. — М.: Мир, 1984.
22. *Savir Y, Tlusty T.* Conformational Proofreading: The Impact of Conformational Changes on the Specificity of Molecular Recognition. PLoS ONE, 2007. 2(5): e468.
23. *Kostjukov V. V. and Evstigneev M. P.* Relation between the change in DNA elasticity on ligand binding and the binding energetics , Phys. Rev. E 86, 031919 (2012).
24. *Cera E.* Thermodynamic Theory of Site-Specific Binding Processes in Biological Macromolecules. Cambridge University Press, Cambridge (1995).
25. *Bujalowski W.* Thermodynamic and kinetic methods of analyses of protein-nucleic acid interactions. From simpler to more complex systems //Chemical reviews. 2006. V. 106. P. 556–606, см. также *Bujalowski W., Jezewska M. J.* Quantitative thermodynamic analyses of spectroscopic titration curves //Journal of Molecular Structure. 2014.
26. *Stormo G.* Introduction to protein-DNA interactions: Structure, thermodynamics, and bioinformatics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2013.
27. *Livshitz M. A., Gursky G. V., Zasedatelev A. M, Volkenstein M. V.* Equilibrium and kinetic aspects of protein-DNA recognition // Nucleic Acids Res. 1979. V. 6. P.2217–2236.
28. *Berg O. G., von Hippel P. H.* Selection of DNA binding sites by regulatory proteins: Statistical-mechanical theory and application to operators and promoters // Journal of molecular biology. 1987. V. 193. P. 723–743.
29. *Костюков В. В., Евстигнеев М. П.* Энергетика комплексообразования биологическиактивных соединений и нуклеиновых кислот в водном растворе. Севастополь, 2012.

30. *Evstigneev M. P., Shestopalova A. V.* Structure, Thermodynamics and Energetics of Drug-DNA Interactions: Computer Modeling and Experiment //Application of Computational Techniques in Pharmacy and Medicine. — Springer Netherlands, 2014. — P. 21–57.
30. *Нечипуренко Ю. Д.* Статистическая термодинамика связывания лигандов с ДНК. Российский химический журнал (Ж. Росс. Хим. Общества им. Д. И. Менделеева), 2007. Т. 51, С. 23–30 (см. также Нечипуренко Ю. Д., Статистическая термодинамика связывания лигандов с ДНК и РНК: Автореферат дис. доктора физ.-мат. наук. М., 2005).
31. *Нечипуренко Ю. Д.,* Анализ связывание лигандов с нуклеиновыми кислотами // Биофизика 2014. Т.59, С. 12–36.
32. *Ходыков М. В., Анашкина А. А., Головкин М. В., Матвеева О. В., Нечипуренко Ю. Д.,* Анализ связывания лигандов с ДНК в растворе и на микрочипах. Биофизика, 2011, Т. 56, 1053–1061.
33. *Стирманов Я. В., Ходыков М. В., Матвеева О. В., Нечипуренко Ю. Д.* Анализ связывания олигонуклеотидов на микрочипах: энергетические изотермы гибридизации Биофизика, 2013, Т.58. С. 981–986.
34. *Головкин М. В., Нечипуренко Ю. Д., Гурский Г. В.* Статистические флуктуации в уровне заполнения репрессором оператора определяют величину экспрессии репортерного гена. Биофизика 2009, т. 54, С. 581–588.
35. *Нечипуренко Ю. Д.* Антикооперативные взаимодействия между ближайшими соседними хроматосомами. // Биофизика. 1988. Т.33. С. 580–583.
36. *Teif V. , B. Kepper, N., Yserentant, K., Wedemann, G., & Rippe, K.* Affinity, stoichiometry and cooperativity of heterochromatin protein 1 (HP1) binding to nucleosomal arrays // Journal of Physics: Condensed Matter. 2015. V. 27. P. 064110.
37. *Kudrev A. G.* Calculation of cooperativity and equilibrium constants of ligands binding to G-quadruplex DNA in solution // Talanta. 2013. V. 116. P. 541–547.
38. *Сердюк И., Заккаи Н., Заккаи Дж.* Методы в молекулярной биофизике. Структура, функция, динамика. КДУ. 2009.
39. *Рубин А. Б.* Биофизика (учебник) в 2-х т.т. — М., 1999, 2002.
40. *Ризниченко Г.Ю.*, Лекции по математическим моделям в биологии, М., 2002, 2011.

Глава 1.
ОПИСАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

1.1. Решеточная модель адсорбции

Обычно эксперименты по связыванию лигандов с ДНК в растворе проводятся при постоянной температуре и постоянном давлении и термодинамическим потенциалом такой системы является свободная энергия (см. ниже). В рамках решеточной модели адсорбции реальная молекула ДНК представляется в наиболее общем виде — как одномерная матрица, или линейная решетка центров связывания. Эти центры связывания называются «реакционными центрами» [1–4]. В зависимости от соотношения размеров ДНК и молекулы лиганда, а также в зависимости от природы взаимодействий ДНК-лиганд в качестве реакционных центров матрицы могут выступать не только отдельные атомы пар оснований, но и целые участки молекулы ДНК, включая группы атомов сахарофосфатного остова.

Молекула лиганда также представляется в общем виде, как структура, которая содержит одну или несколько групп атомов, способных вступать во взаимодействие с центрами связывания матрицы. Обычно считается, что лиганд может образовывать комплекс с рядом расположенных подряд центров связывания матрицы, совокупность которых называются *связывающим местом* (см. рис. 1.1а).

Следует заметить, что реальные взаимодействия лигандов с ДНК могут происходить по-разному, в зависимости от размера участка ДНК, вовлеченного во взаимодействие с лигандом, молекулярных масс молекул лиганда и ДНК. Если в качестве лигандов выступают низкомолекулярные соединения, то естественно предположить, что адсорбция лиганда не искажает (или незначительно искажает) молекулу ДНК, выступающую в роли матрицы: регулярная решетка центров связывания не изменяется при адсорбции. Другая ситуация может возникнуть, если лигандом является макромолекула белка или даже несколько белков (например, комплекс белков, входящих в состав РНК-полимеразы). Здесь мы ограничимся рас-

смотрением ситуации, когда решетка реакционных центров не трансформируется при адсорбции лигандов.

Рис. 1.1. Адсорбция лиганда на матрице. а) Показано связывание лиганда из раствора. K — константа связывания, характеризующая взаимодействие лиганда со связывающим местом на матрице, в данном случае при адсорбции лиганд занимает два реакционных центра матрицы. б) Схематически показано взаимодействие между адсорбированными лигандами, ω — параметр кооперативности, описывающий такое взаимодействие.

Так как речь идет о физической адсорбции, то взаимодействие между центрами связывания матрицы и реакционными центрами лиганда имеет обратимый характер. Обычно это невалентные, вандерваальсовы или диполь-дипольные взаимодействия. Энергия таких взаимодействий составляет, как правило, несколько kT (А. В. Киселев с соавторами связывает специфическую адсорбцию с наличием кулоновских сил, однако специфика связывания в целом выходит за пределы нашего рассмотрения).

Решеточная модель адсорбции включает описание взаимодействий между адсорбированными лигандами, характер которых определяет свойства модели (рис. 1.1.б). С точки зрения статистической механики поведение адсорбированных на матрице лигандов во многом аналогично поведению одномерного «решеточного газа», частицы которого взаимодействуют между собой. Такие взаимодействия могут включать как стерическое отталкивание между молекулами лигандов, конкурирующими за одни и те же центры связывания на ДНК (в этом случае принято говорить об «исключенном объеме» молекул решеточного газа), так и электростатические взаимодействия между атомами ближайших соседних молекул лиганда, сближенными на матрице.

Заметим, что терминологическое словосочетание «реакционный центр», которое используется в литературе для обозначения одного центра связывания лиганда на матрице [1–4], может ввести в заблуждение: с понятием реакции обычно связывают в химии ряд процессов, имеющих необратимый характер, в то время как процесс физической адсорбции является обратимым. Здесь мы будем использовать наряду с термином «реакционный центр», как эквивалентный, термин «центр связывания». С другой

стороны, существует устойчивое сочетание слов «реакционный центр» фермента. Такой центр включает в себя место связывания лиганда. Если рассматривать адсорбцию на ДНК лиганда, размер которого меньше радиуса молекулы ДНК, то понятие реакционного центра матрицы будет в чем-то аналогично понятию «реакционный центр фермента»: связывание лиганда здесь происходит так же многоточечным образом. Связывание лиганда в реакционном центре фермента является первым актом в серии процессов, которые приводят к химической трансформации лиганда, в то время как связывание лиганда с ДНК обычно не приводит к необратимым последствиям для лиганда. Однако следует заметить, что при связывании белков с нуклеиновыми кислотами может существенно искажаться как структура НК, так и молекулы белков, в которых связывание с ДНК и РНК инициируют существенные конформационные превращения.

Рассмотрим пример связывания молекулы дистамицина А с ДНК. В соответствии с молекулярной моделью комплекса, предложенной Заседателевым и соавт. [5], дистамицин А погружен в малую бороздку ДНК таким образом, что NH группы лиганда выступают в качестве доноров водородных связей, а акцепторами служат N3 атомы аденина и O2 атомы тимина (рис. 1.2). Кроме того, концевая положительно заряженная NH_3 группа лиганда располагается глубоко в узкой бороздке, в области максимальной плотности отрицательного электростатического потенциала. Рентгеноструктурный анализ подтвердил эту модель, добавив лишь факт наличия бифуркационных водородных связей: одна NH группа лиганда может образовать одновременно сразу две водородные связи — с N3 атомом аденина и O2 атомом тимина [6].

Одна химическая группа лиганда взаимодействует сразу с двумя разными химическими группами матрицы. Целый ряд атомов матрицы формируют один центр связывания для одной группы лиганда. Предсказанная на основании анализа первичных экспериментальных данных по адсорбции молекулярная модель комплекса дистамицина А с ДНК стала сейчас общепринятой, что можно рассматривать как одно из самых значительных достижений применения теории физической адсорбции к анализу взаимодействий лигандов с ДНК.

Ниже кратко описаны основные этапы анализа связывания лигандов с нуклеиновыми кислотами (в соответствии со схемой, показанной на Рис. 0.1).

1) Термодинамическая модель адсорбции. При построении физической модели адсорбции необходимо определиться: в рамках какой именно термодинамической системы будет рассматриваться взаимодействие молекул НК с лигандами. Обычно речь идет об открытой системе, которая

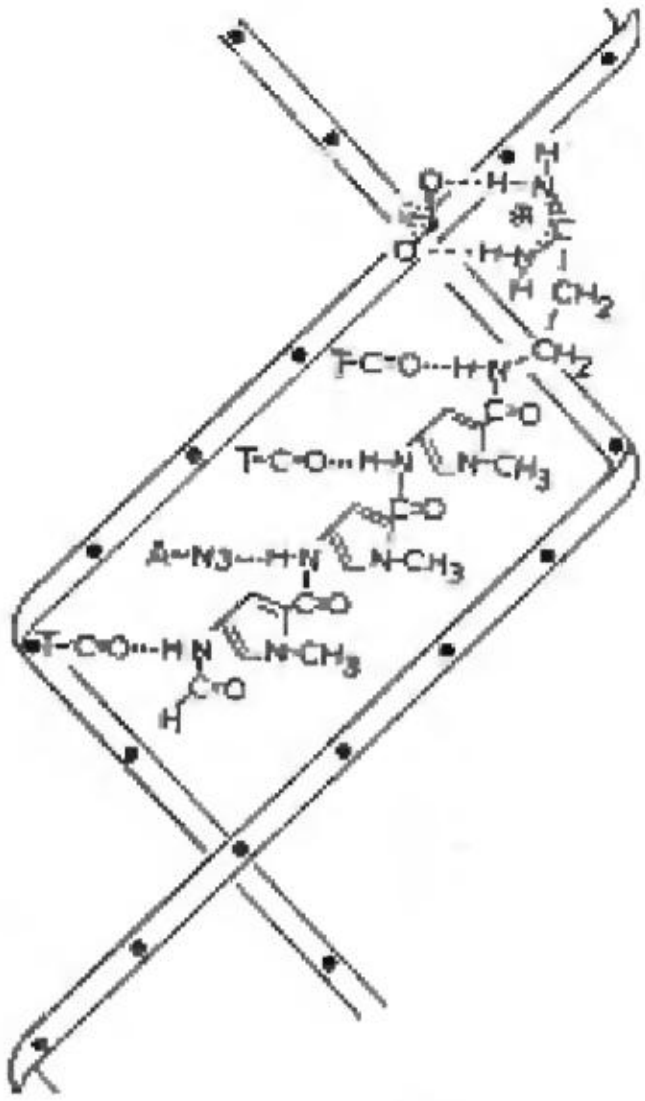

Рис. 1.2. Схема связывания дистамицина А с участком ДНК. NH группы антибиотика образуют водородные связи с акцепторами водородных связей – азотами и кислородами расположенных подряд четырех АТ пар ДНК (по Заседателеву и соавт. [5])

обозначается (μ, p, T) — здесь независимыми переменными являются химический потенциал лиганда в растворе μ, давление p и температура T [7]. Рассматривая в качестве системы матрицу с адсорбированными лигандами, которая находится в растворе при постоянном давлении и постоянной температуре, мы полагаем, что эта система является открытой: лиганды могут адсорбироваться на матрице и десорбироваться с нее, т. е. происходит обмен веществом с раствором, в котором находятся свободные молекулы, имеющие определенный химический потенциал.

Переход от статистической механики к термодинамике предполагает установление такого способа усреднения различных величин по динамическим состояниям, который бы позволил получаемые средние по ансамблю поставить в соответствие термодинамическим функциям системы [7]. Для проведения такого усреднения существуют стандартные процедуры (см. ниже).

2) Математическая модель адсорбции. На этом этапе для описания связывания могут применяться разные методы статистической термодинамики, позволяющие рассчитать характеристики адсорбционной системы.

Обычно это матричный метод [8, 9] (или метод рекуррентных соотношений [2, 10–12], который является его модификацией), комбинаторный метод [1], метод генерирующих функций [13, 14]. Результатом является система уравнений, формирующих математическую модель адсорбции. Решением такой системы являются зависимости концентрации адсорбированных молекул лиганда от концентрации свободных молекул лиганда в растворе. Можно построить и другой ряд теоретических зависимостей — например, распределение расстояний между адсорбированными лигандами для определенной концентрации лиганда в растворе. Исследование формы этих зависимостей позволяет провести классификацию моделей адсорбции и предложить методы, которые могут быть использованы для анализа конкретных экспериментальных данных.

3) Анализ данных. Математическая модель является посредником между теорией и экспериментом: она позволяет на основании физической модели адсорбции сделать определенные предсказания относительно того, как должны вести изотермы адсорбции (рис. 0.1). С другой стороны, экспериментальные изотермы (кривые связывания) позволяют сделать качественные и количественные выводы относительно физической модели адсорбции.

Заметим, что физическая модель адсорбции может включать молекулярную модель связывания. Однако анализ кривых связывания, как и другого рода термодинамических данных, обычно позволяет установить самые общие свойства модели, которую мы называем решеточной моделью адсорбции. В такой модели не конкретизируется, какие группы лиганда взаимодействуют с центрами матрицы, а оцениваются размер участка матрицы, который занимает молекула адсорбированного лиганда как физическое тело и энергия взаимодействия лиганда с таким участком. Если в модели адсорбции рассматривается несколько типов комплекса, которые образует лиганд на матрице и учитываются кооперативные взаимодействия между адсорбированными лигандами, то необходимо определить энергии образования этих комплексов и параметры кооперативных взаимодействий.

На основании анализа кривых связывания выбирается модель адсорбции и определяются её параметры. Такой выбор часто осуществляется неоднозначно: требуется привлечение дополнительных данных об экспериментальной системе и проведение специального математического исследования, поскольку связь между молекулярной моделью адсорбции и экспериментальными данными опосредована математической моделью. Кроме того, сами экспериментальные данные зачастую оказываются непрямыми: обычно измеряется не число связанных и свободных молекул, а сигналы, которые требуют интерпретации.

Заметим, что существует специфика систем с малым числом частиц. Рассмотрению подобных систем посвятил ряд статей и монографий Террел Хилл [15–17]. К этой теме также обращались Лев Блюменфельд, Александр Гросберг и Александр Тихонов [18]. Однако только в последнее время, в связи с развитием подходов к описанию поведения молекул в клетках с одной стороны, и в связи с прогрессом в области нанотехнологий с другой, возник общий интерес к этим системам.

Число моделей адсорбции, предложенных для описания связывания, относительно невелико. Можно сказать, что в основании всех их лежит модель связывания протяженного лиганда с полимером, предложенная в работах Брэдли, Лифсона и др. [19] и Крозерса [9] и развитая в работах Гурского и Заседателева [1, 2, 10–12], где впервые были рассмотрены кооперативные взаимодействия между адсорбированными лигандами для этого случая. Модель Гурского и Заседателева известна англоязычному читателю как модель Мак-Ги и фон Хиппеля [20]. Эти авторы несколько позже, зато более доходчиво и подробно изложили модель Гурского и Заседателева так, что она стала известна широкому кругу молекулярных биологов и биохимиков. В наших работах совместно с Гурским и Заседателевым [21–24] произошло дальнейшее развитие этой «базовой» модели. Однако в теории адсорбции важно рассмотреть не только различные варианты моделей адсорбции, но и уделить внимание методам описания и анализа связывания лигандов с макромолекулами. И здесь существует ряд подходов, связанных с развитием той или иной системы представлений. Наиболее общий путь, позволяющий получить уравнения адсорбции, включает расчет большой статистической суммы или свободной энергии системы (смотри, например, работу Шеллмана [25], в которой развернута система представлений о связывании лигандов с макромолекулами). Теоретики, работавшие в области адсорбции лигандов на биополимерах, подробно рассмотрели те или иные аспекты связывания — таким образом, вышли десятки работ, которые сформировали целое направление в науке.

Однако экспериментаторы нуждаются не только в общих представлениях, но и в методах анализа конкретных кривых связывания. Одним из таких методов может служить сравнение экспериментальных данных с наборами теоретических кривых, которые соответствуют как разным моделям адсорбции, так и разным параметрам связывания. Набор таких кривых рассмотрели в своих работах Шварц и Станковский [26–28]. В целом подход Шварца направлен именно на то, чтобы показать, как изменяются кривые связывания в зависимости от используемой модели и ее параметров. Можно сказать, что Шварц заложил основания «модельного исследования» адсорбционных систем, который будет развит здесь далее.

Эпштейн [29] рассмотрел кооперативное связывание лигандов на матрицах конечной длины, и исследовал, как влияет длина матрицы на форму кривых связывания. Он показал, что изотермы адсорбции для связывания лигандов на матрицах, длина которых в десятки раз превосходит размер связывающего места, мало отличаются от изотерм адсорбции лиганда на матрицах «бесконечной» длины. По этой причине мы не будем здесь подробно рассматривать связывание на матрицах конечной длины.

1.2. Модели связывания лигандов на биополимерах

Статистическая механика вводит в рассмотрение ряд моделей адсорбции, включая модель «одномерной» адсорбции, которая используется при описании равновесного связывания лиганда с линейным полимером, подобным ДНК. За последние тридцать лет вышли десятки работ, в которых описывается связывание лигандов с матрицами (см., например, [30–47]). С точки зрения статистической механики модели, описывающие адсорбцию в одномерном случае, близки к моделям, описывающим решеточный газ частиц и ферромагнетики. Такой класс моделей связывают с моделью Изинга [48]. Адсорбция на линейных полимерах, в случае, когда учитываются парные взаимодействия между адсорбированными лигандами, была рассмотрена ещё в статье Стейнера [49]. В этой работе были получены уравнения, которые могут быть применены к описанию связывания ионов с полиэлектролитами. В таком подходе предполагается, что один лиганд (ион) при связывании занимает один реакционный центр матрицы и учитываются как взаимодействия между «первыми» соседними парами ближайших адсорбированных лигандов (такие лиганды занимают ближайшие соседние в последовательности реакционные центры матрицы), так и взаимодействия между «вторыми» соседними парами лигандов, которые разделены одним реакционным центром матрицы.

Террел Хилл продемонстрировал применение метода статистических сумм к задачам адсорбции и специально рассмотрел ситуацию связывания на линейном полимере лигандов нескольких типов [8]. В этой работе с помощью матричного метода была построена большая статистическая сумма и получены уравнения, описывающие ряд важных с точки зрения приложений ситуаций: когда матрица состоит из реакционных центров двух разных типов («гетерополимерное связывание»), когда лиганд при связывании закрывает сразу два реакционных центра и когда рассматривается одновременное связывание двух разных лигандов.

При изучении взаимодействие определенного лиганда с ДНК исследователи задают схему связывания и постулируют характер взаимодейст-

вий между адсорбированными лигандами (рис. 0.1). При этом учитывается только самая общая характеристика связывания: размер места, которое занимает лиганд при связывании на ДНК. Двойная спираль ДНК может быть представлена как одномерная решетка реакционных центров, и число центров, которые занимает лиганд, составляет размер связывающего места. Ниже описываются схемы связывания протяженного лиганда с ДНК.

1.3. Схемы связывания

Молекула ДНК составляется из двух свитых в одну спираль нитей, или цепочек, в которых чередуются атомы фосфора и пятичленные кольца сахара [50]. К сахарофосфатному остову присоединены нуклеотиды — основания ДНК (рис. 1.3). Водородные связи между основаниями, принадлежащими разным цепочкам, объединяют эти цепочки в двутяжевую структуру, образуя двойную спираль. Эту спираль в упрощенном виде можно представить как двустороннюю витую лестницу, перилами которой служат цепочки сахарофосфатного остова, ступеньками — пары оснований. Внутренняя и внешняя стороны лестницы аналогичны так называемым *малой* и *большой* бороздкам реальной ДНК.

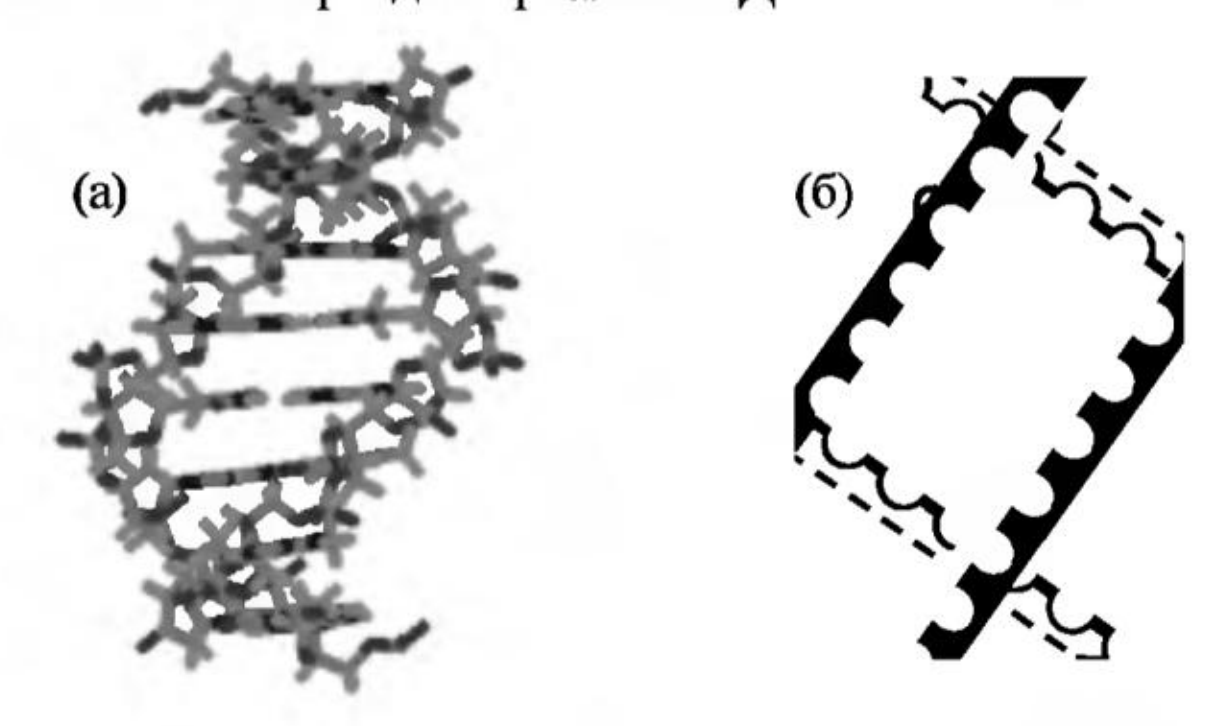

Рис. 1.3. Схема, позволяющая рассматривать двойную спираль ДНК как две параллельные линейные матрицы реакционных центров. а) Фрагмент двойной спирали ДНК (молекулярная модель). б) Схематическое представление участка ДНК, на котором происходит связывание лигандов (вид со стороны малой бороздки). Каждая нить ДНК соответствует одной матрице. Лунками показаны реакционные центры, черный цвет соответствует наружной стороне матрицы, белый — внутренней

Большая часть атомов пар оснований участвует в стекинг-взаимодействиях, обусловленных вандерваальсовыми контактами между плоско-

стями ближайших соседних в последовательности пар оснований. Атомы фосфора и кислорода, составляющие сахарофосфатный остов, атомы кислорода и NH группы оснований, которые выходят в малую и большую бороздки ДНК, могут выступать в качестве реакционных центров ДНК.

Биологически активные соединения разных типов могут связываться с ДНК, используя разные наборы реакционных центров. Однако могут существовать и «универсальные» наборы реакционных центров, используемые лигандами одной природы. Гурский с соавторами [51, 52] сформулировал принципы, в соответствии с которыми лиганды пептидной природы (белки, а также содержащие пептидные или амидные группы антибиотики) могут узнавать определенные последовательности пар оснований ДНК. Ключевой чертой такого узнавания является образование водородных связей между «донорами» водородной связи, амидными группами лиганда и «акцепторами» этой связи, N3 атомами аденина или O2 атомами тимина и цитозина молекулы ДНК. Указанные атомы тимина, аденина и цитозина занимают в канонической B-форме молекулы ДНК положения, связанные спиральной симметрией (трансляция на 3.4 ангстрема вдоль оси спирали и поворот на 36° переводит их друг в друга с известной степенью точности). Эти атомы формируют регулярную решетку реакционных центров — акцепторов водородной связи. Рассматривая только эти ключевые для связывания атомы, мы можем представить двуспиральную молекулу ДНК в качестве решетки реакционных центров (рис. 1.3). Такая решетка является «двойной», т. е. имеет две параллельные линейные цепочки реакционных центров, и если участок ДНК содержит только AT-пары, то такие центры, как акцепторы водородной связи, будут эквивалентны. Михаил Лившиц и Георгий Гурский с соавторами продемонстрировали, что подобная схема связывания приводит к реалистическим оценкам способности регуляторного белка найти специфическое место связывания среди случайной последовательности пар нуклеотидов ДНК [52].

Такие лиганды, как нептропсин, дистамицин A, хекст и целый ряд соединений, сконструированных на основании этих веществ и несущих пептидные и амидные группы, связываются по малой бороздке ДНК, используя именно эти принципы [5, 54–60]. Связывание соединений этого класса обусловлено не только взаимодействием доноров и акцепторов водородной связи, существенный вклад вносят вандерваальсовы контакты и разного рода взаимодействия, в которые вступают лиганды в малой бороздке молекулы ДНК. Выше уже было указано, что даже такое схематичное и упрощенное представление о связывании дистамицин A с ДНК позволило оценить размер связывающего места, число реакционных центров и, в конечном счете, предложить молекулярную модель связывания, под-

твержденную рентгеноструктурным анализом [5,6]. Таким образом, весьма упрощенная схема связывания, в рамках которой ДНК представлена в качестве линейной решетки реакционных центров, позволяет описывать связывание лигандов и анализировать экспериментальные данные.

Следует специально оговорить термины: решетку реакционных центров мы называем двойной, потому что атомы сахарофосфатного остова двойной спирали ДНК связаны осью симметрии второго порядка, которая направлена перпендикулярно длинной оси спирали (рис. 1.3.). Так как N3 атом аденина и O2 атом тимина, которые могут выступать в качестве акцепторов водородной связи, тоже связаны осью симметрии второго порядка. Поэтому на участке ДНК, состоящем из АТ пар, мы будем иметь двойную решетку реакционных центров (то же самое касается ряда полимеров, например, поли (А) поли (Т), если пренебречь изгибами оси спирали ДНК).

В случае, когда лиганд при связывании закрывает центры только одной половины матрицы, связывание по разным половинам будет неконкурентным. При этом связывании возможно образование «сэндвича» — двух прижатых друг к другу лигандов, каждый из которых связан со своей решеткой реакционных центров (рис. 1.4.б, рис. 1.5.а). Заметим, что к связыванию лигандов в виде сэндвичей с ДНК в последнее время привлечено особе внимание исследователей (см., например, недавно вышедшую монографию Костюкова и Евстигнеева [53]). Однако если один лиганд при связывании стерически закрывает все пространство в узкой бороздке ДНК, то такая двойная решетка по многим своим свойствам будет похожа на линейную решетку (см. рис. 1.5.б).

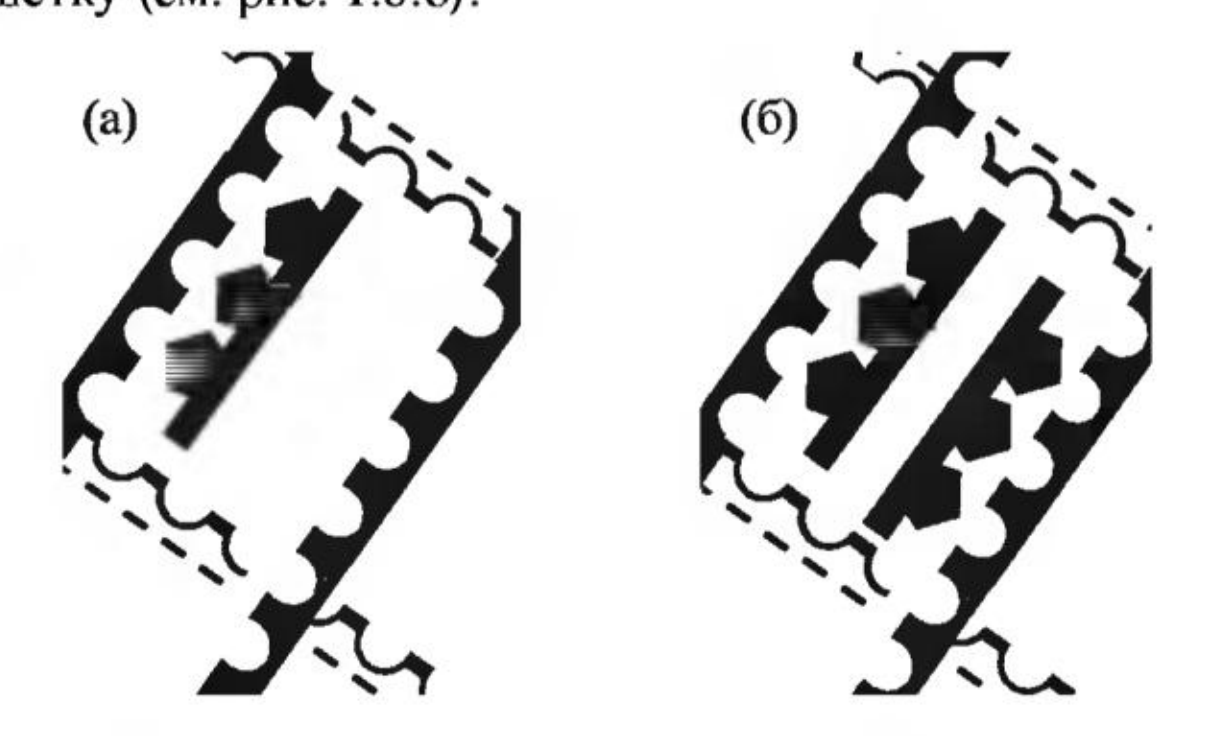

Рис. 1.4. Схемы связывания лигандов с ДНК. а) Показана адсорбция лиганда, который образует связи с тремя реакционными центрами на одной нити ДНК). б) Схематически показана адсорбция двух молекул лиганда на ДНК. Лиганды образуют «сэндвич» при связывании с двумя нитями ДНК, ограничивающими одну бороздку

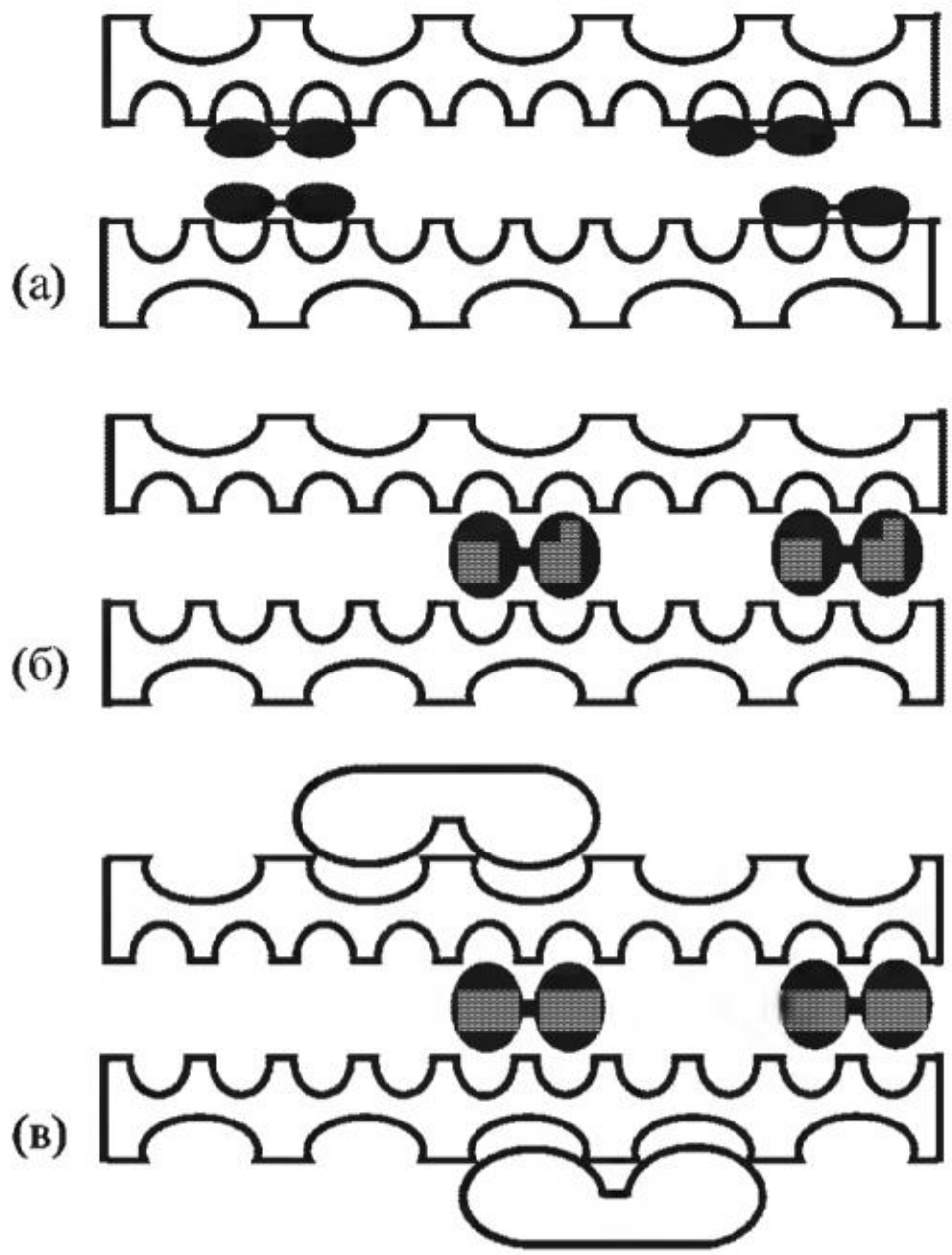

Рис. 1.5. Варианты конкурентного и неконкурентного связывания лигандов с двойными матрицами. а) Схематически показана двойная матрица. «Внешняя» поверхность матрицы может иметь реакционные центры другого размера и типа, чем «внутренняя» (например, внешней может соответствовать сахарофосфатный остов, внутренней — атомы пар оснований, выходящие в малую бороздку). В случае, когда лиганд при связывании закрывает центры только одной половины матрицы, связывание по разным таким половинам будет неконкурентным. б) Случай, когда один лиганд при связывании закрывает внутренние центры сразу двух половин двойной матрицы (в этом случае можно представить двойную матрицу как линейную цепочку реакционных центров). в) Ситуация, когда возможно неконкурентное связывание двух разных лигандов по внутренней и внешней поверхностям матрицы

С другой стороны, если лиганд связывается не с парами оснований, а с фосфатами сахарофосфатного остова, и связывание на каждой из цепочек фосфатов происходит отдельно и независимо от связывания на другой цепочке, такая двойная решетка реакционных центров может представляться как две независимые одномерные решетки (рис. 1.5в).

Связывание лигандов с матрицами РНК и одноцепочечной ДНК тоже может рассматриваться как адсорбция на линейных, одномерных решетках

реакционных центров. В этом случае множество конкретных молекулярных моделей связывания лиганда с НК в первом приближении может сводиться к небольшому набору простых схем связывания. Одна из таких схем проиллюстрирована на рис. 1.6, где показано связывание лиганда, занимающего два реакционных центра на матрице.

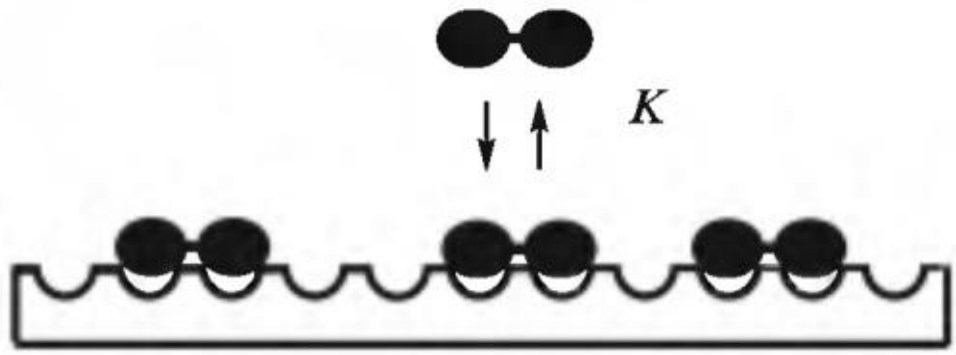

Рис. 1.6. Схема адсорбции лиганда на ДНК: представление матрицы в виде линейной цепочки реакционных центров. Показано связывание лиганда, который стерически закрывает $L = 2$ реакционных центра на матрице ДНК

1.4. Характер взаимодействия между адсорбированными лигандами

Уже в одной из первых работ, посвященных описанию адсорбции лиганда, который занимает при связывании один реакционный центр линейного полимера, рассматривались как взаимодействия между ближайшими соседними лигандами, так и взаимодействия между вторыми парами соседей (см. рис. 1.7). Речь идет о работе Стейнера [49], который применил для описания связывания ионов с полимерами матричный метод, использованный ранее для описания ферромагнетизма. В дальнейшем описание взаимодействий между адсорбированными лигандами ограничивалось только первой парой «соседей».

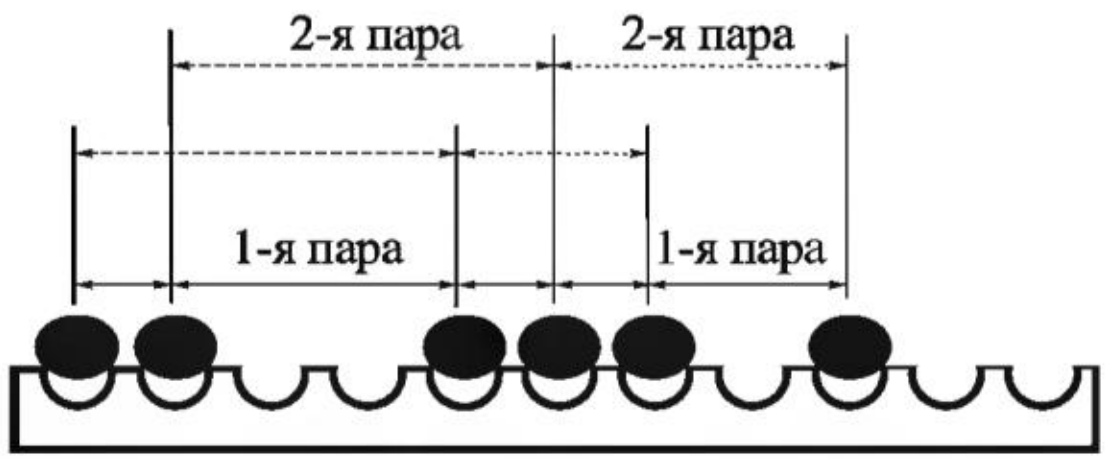

Рис. 1.7. Пары соседних лигандов, адсорбированных на матрице. При учете взаимодействий между адсорбированными лигандами 1-я пара называется парой «ближайших соседних» адсорбированных лигандов. Когда рассматривается взаимодействие со «вторым соседом» в последовательности, учитывается 2-я пара адсорбированных лигандов

Протяженный лиганд при связывании на матрице закрывает несколько реакционных центров, делая их недоступными для других молекул лиганда. Стерическое отталкивание между лигандами, не позволяющее двум лигандам одновременно связываться с одними и теми же реакционными центрами матрицы, можно рассматривать как взаимодействие и формально приписывать этому взаимодействию потенциал отталкивания, соответствующий «бесконечной» энергии. Подобным образом поступал Хилл в работе [8]. Однако со временем стал преобладать другой подход — взаимодействие между лигандами стали рассматривать отдельно от стерического отталкивания. Заседателев, Гурский и Волькенштейн рассмотрели взаимодействия между первой парой соседей адсорбированных лигандов (так называемыми «ближайшими соседями») [1]. Был введен в рассмотрение потенциал, описывающий такие взаимодействия. На рис. 1.8 показан пример такого потенциала — в случае, когда энергия взаимодействия между ближайшими соседними адсорбированными лигандами постоянна и распространяется на расстояние в пять звеньев полимера. Пример такого типа взаимодействий рассмотрели Крылов и соавторы в работе [61]. Речь идет о ситуации, когда между адсорбированными лигандами существуют положительные кооперативные взаимодействия — то есть связывание одного лиганда облегчает связывание другого (такую модель связывают с аллостерическим эффектом ДНК, см. ниже).

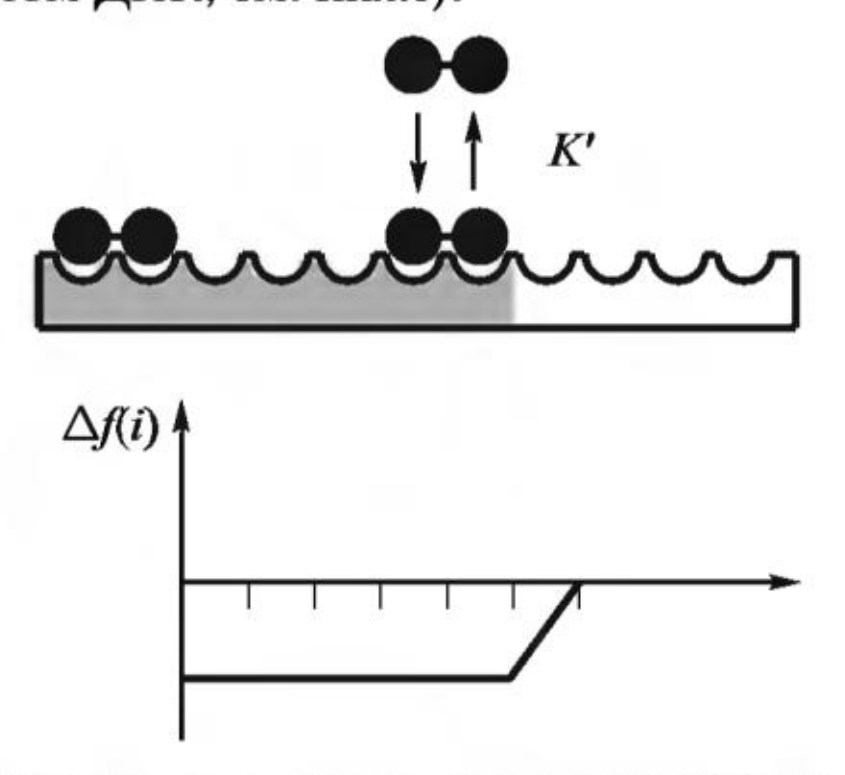

Рис. 1.8. Схема, иллюстрирующая аллостерический эффект ДНК. Вверху схематически показана матрица ДНК. Связывание первого лиганда на матрице (показан слева) происходит с константой K. В результате такого связывания участок матрицы переходит в возмущенное состояние (показано серым цветом). Связывание последующего лиганда на расстоянии меньше, чем 6 пар нуклеотидов, характеризуется константой K'. Внизу представлен потенциал прямоугольной формы $\Delta f(i)$, описывающий в этом случае взаимодействия между лигандами, адсорбированными на ДНК

Существуют и другие типы взаимодействий между адсорбированными лигандами: к примеру, лиганд может связываться на определенном месте ДНК в виде димера, тримера и т.п. комплексов. Подобное связывание было обнаружено экспериментально и исследовано как спектрофотометрически, так и при помощи ЯМР и рентгеноструктурного анализа. Возможно полное или частичное перекрывание мест связывания лигандов при адсорбции на двойной решетке реакционных центров. Исследование взаимодействия с ДНК искусственно сконструированных лигандов, которые специфически связываются на определенных последовательностях ДНК, требует построения новых моделей адсорбции, в которых учитываются разные типы кооперативных взаимодействий между адсорбированными лигандами.

Следует принять во внимание и то обстоятельство, что в живой клетке регуляция экспрессии генов осуществляется посредством координированного взаимодействия с ДНК разных регуляторных белков. Упаковка ДНК в хроматине обусловлена взаимодействием с ДНК гистоновых октамеров и исследование регуляции экспрессии требует моделирования процессов координированной адсорбции и десорбции лигандов разных типов. Некоторые особенности состояния молекул ДНК в таких биологических объектах, как вирусы, хромосомы простейших и т.п. могут быть промоделированы экспериментально в системах, где образуется конденсированная форма молекул ДНК [62]. Отличительная особенность конденсированной формы ДНК, на которую стали обращать внимание в последние годы, состоит в том, что ее «биологическая активность» существенно превышает биологическую активность исходных молекул ДНК [63]. Этот факт стимулирует дополнительный интерес к исследованию особенностей конденсации ДНК.

С этой точки зрения представляет интерес моделирование процесса конденсации хроматина, или, в общем случае, влияния связывания лигандов как на состояние одной матрицы, так и на взаимодействие между разными матрицами. Такое моделирование мы проведем в Приложениях А и Б.

1.5. Влияние связывания лигандов на матрицы

Для объяснения кооперативных взаимодействий между аналогами антибиотика дистамицина А, адсорбированными на ДНК, Александр Крылов и соавторы [61] предложили следующую модель: связывание лиганда инициирует переход участка матрицы определенной длины в возмущенное состояние, связывание с которым последующих лигандов характеризуется измененной константой (рис. 1.8). Связывание первого лиганда на матрице происходит с константой K, а связывание каждого последующего лиганда

на расстоянии, меньшем чем l, от одного из адсорбированных лигандов, происходит с одной и той же константой K'. Так как адсорбированный лиганд влияет на связывание другого лиганда на некотором расстоянии, то этот эффект можно назвать «аллостерическим» по аналогии с ситуацией алллостерической регуляции в ферментах (в переводе с греческого алло — «другой», стерос — «место») [64]. Похожую модель рассмотрели Хоган, Даттагупта и Крозерс [65], которые описали аллостерический эффект ДНК в рамках другой модели. По Дональду Крозерсу и соавторам, этот эффект заключается в переходе при воздействии лиганда отдельных пар оснований ДНК в возмущенное состояние. В отличии от модели Крылова и соавторов, в модели Крозерса этот переход не является обязательным: в возмущенном состоянии пары оснований могут находиться и безотносительно к связыванию с лигандом, адсорбция лиганда лишь смещает равновесие этого перехода. Заметим, что похожие эффекты ранее были обнаружены в работе Бурда, Веллса и соавторов, но там они назывались «телестабильностью» ДНК [66].

1.6. Взаимодействие между матрицами, покрытыми лигандом

Эффект конденсации заряженных ионов из раствора на полимерах, несущих регулярно повторяющиеся заряженные группы, описывает теория Маннинга. В этой теории идет речь о делокализации зарядов противоионов [67]. Однако в ряде работ для описания связывания лигандов, несущих заряженные группы, применяется подход Гурского–Заседателева, то есть используется модель, описывающая локализованное связывание протяженных лигандов с матрицами НК [68–70]. Наиболее полно развил и обосновал применение этого подхода Дитмар Поршке [69, 70]. По-видимому, существует определенное соотношение между гидрофобными и гидрофильными свойствами лиганда, количеством его заряженных и нейтральных групп, при котором оптимальным образом описывать связывание лиганда будет модель делокализованного и/или локализованного связывания.

Поршке, а вслед за ним Тейф и Ландо [69–72] применили подход ЗГВ для описания ситуации, когда при связывании с лигандами матрицы переходят в состояние, когда между ними возможны взаимодействия. Известны два варианта таких взаимодействий: в первом случае лиганды переводят матрицы в целом в измененное состояние, которое позволяет матрицам вступать во взаимодействие (опосредованное влияние лигандов), во втором лиганды могут выступать непосредственно в качестве «сшивок», при этом один лиганд может взаимодействовать одновременно с двумя разными матрицами (рис. 1.9) либо лиганды, адсорбированные на разных матрицах, могут взаимодействовать между собой.

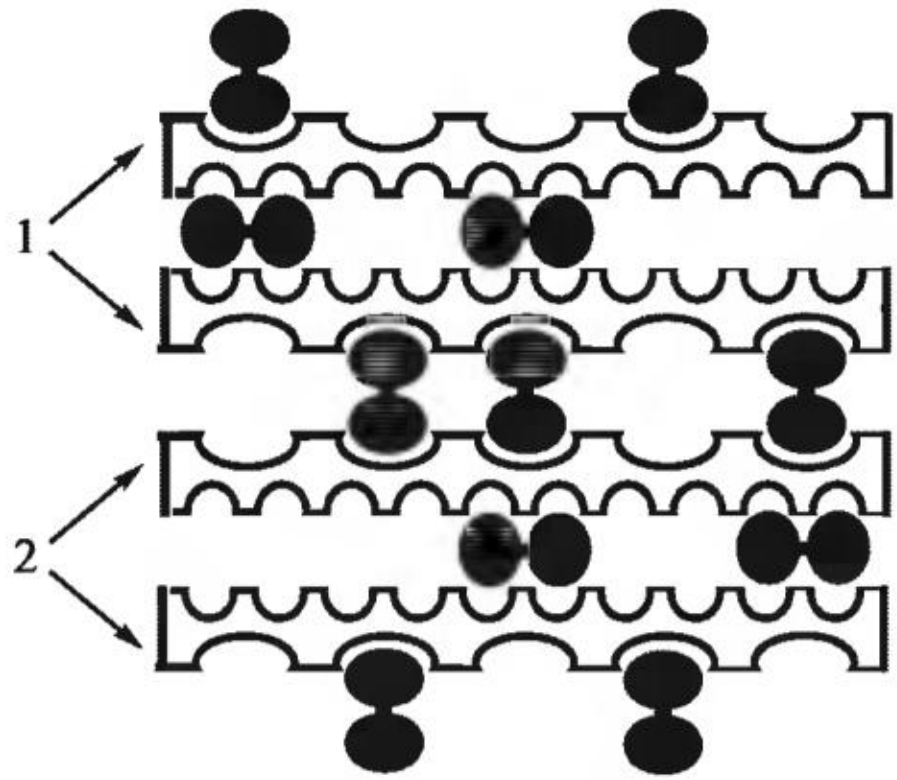

Рис. 1.9. Лиганд может образовывать с двойной матрицей два типа комплекса и матрицы могут взаимодействовать между собой. Лиганд связывается по внешним и внутренним поверхностям матрицы. Благодаря связыванию по внешним поверхностям становится возможным взаимодействие между двумя двойными матрицами (1) и (2), поверхности которых покрыты лигандами. Покрытие лигандом матрицы могут вступать во взаимодействие, лиганды в этом случае служат мостиками (сшивками) между разными двойными матрицами

В первом случае возможен следующий механизм взаимодействий между матрицами. Предположим, что лиганд несет положительно заряженные группы, тогда по мере связывания происходит компенсация отрицательно заряженных фосфатных групп НК и между молекулами матриц могут возникать силы притяжения, обусловленные взаимодействием типа диполь — наведенный диполь, дисперсионными или прочими силами, вносящими вклад в энтальпийную часть свободной энергии взаимодействия между матрицами. Такие взаимодействия могут приводить к конденсации молекул НК.

Во втором случае, который вслед за Поршке подробно рассмотрели Ландо и Тэйф, лиганды могут выступать в качестве скрепок, или сшивок между сближенными разными молекулами НК. В этом случае предполагается, что две молекулы НК могут взаимодействовать между собой и без лигандов, но свободная энергия такого взаимодействия положительна, то есть само взаимодействие невыгодно. Однако, кроме того что на каждой из молекул НК могут связываться лиганды, две взаимодействующие молекулы НК могут выступать в качестве новой матрицы (которую можно назвать матрицей следующего уровня), на такой составной матрице возможна адсорбция другого типа: скажем, один конец лиганда связывается с реакционным центром первой молекулы НК, а другой — с реакционным центром второй молекулы. Таким образом, лиганды могут выступать в ка-

честве сшивок между разными молекулами НК. В работах [73, 74] рассмотрены возможности такого связывания.

Литература

1. *Заседателев А. С., Гурский Г. В. и Волькенштейн М. В.* Теория одномерной адсорбции. 1. Адсорбция малых молекул на гомополимере // Мол. биология. 1971. Т. 5. С. 245–490.
2. *Гурский Г. В., Заседателев А. С. и Волькенштейн М. В.* Теория одномерной адсорбции. П. Адсорбция малых молекул на гетерополимере // Мол. биология. 1972. Т. 6. С. 479–489.
3. *Лопаткин А. А.* Теоретические основания физической адсорбции. — М.: МГУ, 1983.
4. *Нечипуренко Ю. Д., Гурский Г. В.* Термодинамические модели связывания лигандов с ДНК // Биофизика. 2003. Т. 48. С. 773–796, см. также *Нечипуренко Ю. Д.,* Анализ связывание лигандов с нуклеиновыми кислотами. Биофизика. 2014. Т. 59, С. 12–36.
5. *Zasedatelev A. S., Gursky G. V., Zimmer Ch., Thrum H.* Binding of netropsin to DNA and synthetic polynucleotides // Mol. Biol. Reports. 1974. V. 1. P. 337–342, см. также *Заседателев А. С., Жузе А. Л., Циммер К., Гроховский С. Л., Туманян В. Г. Гурский Г. В., Готтих Г. П.* Стереохимическая модель молекулярного механизма узнавания АТ-пар при связывании с ДНК антибиотиков дистамицина и нетропсина // ДАН СССР. 1976. Т. 231. С. 1006–1009.
6. *Kopka M. L., Yoon C., Goodsell D., Pjura P., Dickerson R. E.* The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin // PNAS. 1985. V. 82. P. 1376–1380.
7. *Hill T. L* // Statistical Mechanics. McGraw-Hill. N. Y. 1956. Перевод: Статистическая механика. М. 1960.
8. *Hill T. L.* Some statistical problems concerning linear macromolecules // J. Polymer Sci. 1957. V. 23. P. 549–562.
9. *Crothers D.* Calculation of binding isotherms for heterogeneous polymers // Biopolymers. 1968. V. 6. P. 575–584.
10. *Гурский Г. В., Заседателев А. С.* Точные соотношения, описывающие связывание регуляторных белков и других решеточных лигандов на двухспиральных полинуклеотидах // Биофизика. 1978. Т. 23. С. 932–946.
11. *Гурский Г. В., Заседателев А. С* //В кн. Итоги науки и техники. Сер. Молекулярная биология. М. ВИНИИТИ, 1982, с. 190–237.
12. *Gursky G. V., Zasedatelev A. S.* Thermodynamic and stereochemical aspects of binding interactions between sequence-specific ligands and DNA // Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol. 1984. V. 5, P. 53–139.
13. *Lifson S.* Partition function of linear-chain molecules // J. Chem. Phys. 1964. V. 40. P. 3705–3710.

14. *Schellman J. A.* Sequence generating functions // «Molecular structure and dynamics», ed. M. Balaban. 1980. P. 245–265.
15. *Hill T. L.* Thermodynamics of Small Systems. Dover, New York. 1994.
16. *Hill T. L.* Perspective: nanothermodynamics. Nano Letters. 2001. V. 1. P. 111–112.
17. *Hill T. L.* A different approach to nanothermodynamics // Nano Letters. 2001. V. 1. P. 273–275.
18. *Blumenfeld L. A., Grosberg A.Yu, Tikhonov A. N.* Fluctuations and mass-action law breakdown in statistical thermodynamics of small systems // J. Chem. Phys. 1991. V. 95. P. 7541–7547.
19. *Bradley D. F., Lifson S.,* in Molecular associations in biology, Pullman B., Ed., New York, N. Y., Academic., см. также *Latt S. A., Sober L. H.* Protein-nucleic acid interactions. Oligopeptide- polyribonucleotide binding studies // Biochemistry. 1967. V. 6. P. 3293–3306.
20. *McGhee J. D. and von Hippel P. H.* Theoretical Aspects of DNA-Protein Interactions: Co-operative and Non-co-operative Binding of Large Ligands to a One-dimensional Homogeneous Lattice // J. Mol. Biol. 1974. V. 86. P. 469–489.
21. *Нечипуренко Ю. Д., Заседателев А. С., Гурский Г. В.* Теория одномерной адсорбции на гомополимере. Учет различных ориентаций молекул лиганда // Биофизика. 1979. Т. 24. С. 351–361.
22. *Нечипуренко Ю. Д., Заседателев А. С., Гурский Г. В //* Кооперативные взаимодействия при связывании протяженных лигандов с ДНК. 1 Неконтактные кооперативные взаимодействия // Мол. биология 1984. Т. 18. С. 798–812.
23. *Нечипуренко Ю. Д.* Кооперативные взаимодействия при связывании протяженных лигандов с ДНК. П. Контактные кооперативные взаимодействия между адсорбированными лигандами // Мол. биология. 1984. Т. 18. С. 1066–1079.
24. *Нечипуренко Ю. Д., Гурский Г. В.* Анализ связывания белков и антибиотиков с фрагментами ДНК // ДАН СССР. 1985. Т. 281. С. 213–216.
25. *Schellman J. A.* Macromolecular Binding // Biopolymers. 1975. V. 14. P. 999–1018.
26. *Schwarz G.* On the analysis of linear binding effects associated with curved Scatchard plot // Biophys. Chem. 1977. V. 6 P. 65–76.
27. *Schwarz G., Stankovsky S.* Linear cooperative binding of large ligands involving mutual exclusion of different binding modes // Biophys. Chemistry. 1979. V. 10. P. 173–181.
28. *Schwarz G.* A universal thermodynamic approach to analyze biomolecular binding experiments // Biophys Chem. 2000. V. 86 P. 119–129.
29. *Epstein I. R.* Cooperative and Non-Cooperative Binding of Large Ligands to a Finite One-dimensional Lattice. A Model for Ligand-Oligonucleotide Interactions // Biophys. Chemistry. 1978. V. 8. P. 327–339.
30. *Chen Y. D., Maxwell A., Westerhoff H. V //* J. Mol. Biol. 1986. V. 190. P. 211–214.
31. *Reiter J., Epstein I. R.* Bimodality in the cooperative binding of ligands to molecules with miltiple binding sites // J. Phys. Chem. 1987. V. 91. P. 4813–4820.

32. *Reiter J., Epstein I. R.* Cooperative lattice ligand binding: approximate Gaussian binding distribution // Biophys. Chem. 1989. V. 33. P. 1–9.
33. *Wolfe A. R., Meehan T.* Use of binding site neighbor-effect parameters to evaluate the interactions between adjacent ligand on a linear lattice. Effects on ligand-lattice association // J. Mol. Biol. 1992. V. 223, P. 1063–1087.
34. *Lohman T. M., Mascotti D. P.* Thermodynamics of ligand-nucleic acids interactions // Methods in Enzymology. 1992. V. 212. P. 400–424.
35. *Evans J. W.* Random and cooperative sequential adsorption // Rev. Mod. Phys. 1993. V. 65. P. 1281–1329.
36. *Krapivsky P. L., Bennaim E.* Collective of adsorption-desorption processes // J. Chem. Phys. 1994. V. 100. P. 6778–6782.
37. *Saroff H. A.* Energetics of protein-DNA interactions – an exact calculation for binding of ligands to a lattice of overlapping sites // Biopolymers. 1995. V. 36. P. 121–134.
38. *DiCera E., Kong Y.* Theory of multivalent binding in one and two-dimensional lattices // Biophys. Chem. 1996. V. 61 P. 107–124.
39. *Kong Y.* Ligand binding on ladder lattices // Biophys. Chem. 1999. V. 81. P. 7–21.
40. *Munro P. D., Jackson C. M., Winzor D. J.* Consequences of the non-specific binding of a protein to a linear polymer: reconciliation of stoichiometric and equilibrium titration data for the thrombin-heparin interaction // J. Theor. Biol. 2000. V. 203. P. 407–418.
41. *Torralba A. S. Colmenarejo G. Montero F.* Sequence distribution and intercooperativity detection for two ligands simultaneously binding to DNA // Biopolymers. 2001. V. 58. P. 562–576.
42. *Tsodikov O. V., Holbrook J. A., Shkel I. A., et al.* Analytic binding isotherms describing competitive interactions of a protein ligand with specific and nonspecific sites on the same DNA oligomer // Biophys. J. 2001. V. 81. P. 1960–1969.
43. *Lando D., Teif V //* J. Biomol. Struct. & Dynamics. 2000. V. 17. P. 903–911.
44. *Teif V. B., Haroutiunian S. G., Vorob'ev V. I., et al.* Short-range interactions and size of ligands bound to DNA strongly influence adsorptive phase transition caused by long-range interactions // J. Biomol. Struct. and Dynam. 2002. V. 19. P. 1093–1100.
45. *Poland D.* Ligand binding distributions in biopolymers // J. Chem. Phys. 2000. V. 113. P. 4774–4784.
46. *Fisicaro E., Braibanti A., Lamb J. D., Oscaron J. L.* Calculation of site affinity constants and coperetivity coefficients for binding of ligands and/or protons to macromolecules. I. Generation of partition functions and mass balance equations // Biophys. Chem. 1990. V. 36, P. 1–14.
47. *Бабаян Ю., Аракелян В., Потикян Г., Казарян А //* Биофизика. 2001. Т. 46. С. 1003–1005.
48. *Ising E //* Z. Physik 1925. V. 31. P. 253.
49. *Steiner R. F //* Journ. Chem. Phys. 1954. V. 22. P. 1458–1459.
50. *Watson J. D. and Crick F. H.C //* Nature. 1953. V. 171. P. 737–738.

51. *Гурский Г. В., Туманян Г. В., Заседателев А. С., Жузе А. Л., Гроховский С. Л. и Готтих Б. П //* Мол. биология, 1975, Т. 9, С. 635–651, см. также. *Gursky G. V., Tumanyan V. G. Zasedatelev A. S., Zhuze A. L., Grokhovsky S. L., and Gottikh B.P //* Mol. Biol. Report. 1976, V. 2, P. 413–425.
52. *Livshitz M. A., Gursky G. V., Zasedatelev A.M, Volkenstein M. V //* Nucleic Acids Res. 1979. V. 6. P. 2217 –2236.
53. *Костюков В. В., Евстигнеев М. П.* Энергетика комплексообразования биологически активных соединений и нуклеиновых кислот в водном растворе. Севастополь, 2012.
54. *Gursky G. V., Zasedatelev A. S., Zhuze A. L., Khorlin A. A., Grokhovsky S. L., Streltsov S. A., Surovaya A.N., Nikitin A. M., Krylov A. S., Retchinsky V. O., Beabealashvili R. S. and Gottikh B. P.//* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1983. V. 47. P. 367–378.
55. *Gursky G. V., Surovaya A. N., Kurochkin A. V., Chernov B. K., Volkov S. K., Kirpichnikov M. P //* J. Biomol. Struct. Dyn. 1992. V. 10. P. 15–33.
56. *Zasedatelev A. S., Borodulin V. B., Grokhovsky S. L., Nikitin A. M., Salmanova D. V., Zhuze A. L., Gursky G. V., Shafer R. H.//* FEBS Lett. 1995. V. 375. P. 304–306.
57. *Nikolaev V. A., Grokhovsky S.L, Surovaya A. N., Leinsoo T. A., Sidorova N.Yu., Zasedatelev A. S., Zhuze A. L., Strahan G. A., Shafer R. H., Gursky G. V //* J. Biomol. Struct. Dyn. 1996. V. 14. P. 31–47.
58. *Grokhovsky S. L., Surovaya A. N., Burckhardt G. et al //*FEBS Lett. 1998. V. 439. P. 346–350.
59. *Marques M. A., Doss R. M., Foister S., Dervan P. B.* Expanding the repertoire of heterocycle ring pairs for programmable minor groove DNA recognition // J. Am. Chem. Soc. 2004. V. 126, P. 10339–10349.
60. *Fechter E. J., Olenyuk B., Dervan P. B.* Design of a sequence-specific DNA bisintercalator // Angew Chem Int Ed Engl. 2004. V. 43. P. 3591–3594.
61. *Krylov A. S., Grokhovsky S. L., Zasedatelev A. S., Zhuze A. L., Gursky G. V., Gottikh B. P //* Nucleic Acids. Res. 1978. V. 6. P. 289.
72. *Livolant, F., Leforestier, A //* Prog. Polymer Sci. 1996. V. 21. P. 1115–1164.
63. *Sikorav J.-L., Church, G. M //* J. Mol. Biol. 1991. V. 222. P. 1085–1108.
64. *Курганов Б. И.* Аллостерические ферменты М., 1978.
65. *Hogan M., Dattagupta N., Crothers D. M //* Nature. 1979.V. 278. P. 521–524, см. также *Dattagupta N., Hogan M., Crothers D. M.* Interaction of netropsin and distamycin with deoxyribonucleic acid: electric dichroism study //Biochemistry. 1980. V. 19. P. 5998–6005.
66. *Burd J. F., Wartell R. M., Dodgson J. B., & Wells R. D.* Transmission of stability (telestability) in deoxyribonucleic acid. Physical and enzymatic studies on the duplex block polymer d(C15A15)-d(T15G15) //Journal of Biological Chemistry. 1975. V 250. P. 5109–5113.
67. *Manning G.* The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides // Q. Rev. Biophys. 1978. V. 11. P. 2.

68. *Воробьев Е.А, Нечипуренко Ю. Д., Салянов В.И и Евдокимов Ю. М.* Описание связывания хитозана с ДНК при разных ионных силах в рамках теории ионной конденсации и теории адсорбции. Биофизика, 2007, Т. 52, С. 636–642.
69. *Porschke D.* Nature of protamine-DNA complexes. A special type of ligand binding cooperativity // J. Mol. Biol. 1991. V. 222, P. 423–433.
70. *Porschke D.* Dynamics of DNA condensation // Biochemistry. 1984. V. 23. P. 4821–4828.
71. *Lando D., Teif V.* Modeling of DNA condensation and decondensation caused by ligand binding // J. Biomol. Struct. & Dynamics. 2002. V. 20, P. 215–222.
72. *Teif V.* Ligand-Induced DNA Condensation: Choosing the Model // Biophysical J. 2005. V. 89, P. 2574–2587.
73. *Стрельцов С. А., Михейкин А. Л., Нечипуренко Ю. Д.* Взаимодействие топотекана — ингибитора ДНК-топоизомеразы I с двунитевыми полидезоксирибонулеотидами //Мол. биология 2001. Т. 35, С. 442–450.
74. *Streltsov S. A., Oleinikov V., Ermishov M., Mochalov K., Sukhanova A., Nechipurenko Yu.D., Grokhovsky S., Zhuze A., Pluot M., Nabiev I.* Interaction of clinically important human DNA Topoisomerase I poison, Topotecan, with double-stranded DNA // Biopolymers (Biospectroscopy), 2003, V. 72, P. 442–454.

Глава 2
ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ И МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

2.1. Метод термодинамических потенциалов: подход Скетчарда

Рассмотрим следующую систему: в растворе при постоянной температуре T и постоянном давлении p находятся в равновесии полимеры нуклеиновых кислот, на которых связаны лиганды, и свободные молекулы лиганда, которые имеют химический потенциал $\mu = \mathrm{RT} \ln m$. Здесь m — активность свободного лиганда в растворе (далее, не ограничивая общности рассмотрения, будем считать, что раствор идеальный и активность свободного лиганда равна его концентрации).

Каждую молекулу полимера представим как матрицу из N эквивалентных реакционных центров. Вначале рассмотрим случай, когда лиганд при связывании занимает один реакционный центр. Тогда при равновесии в растворе сосуществуют молекулы матрицы без лигандов, с одним, двумя, … — и N адсорбированными лигандами.

Свободная энергия является тем термодинамическим потенциалом системы, который позволяет описать ее поведение при изменении концентрации лиганда в растворе. Запишем уравнение (1) из работы Скетчарда [1] для изменения свободной энергии в реакции связывания q лигандов A на матрице из N центров:

Реакция: $M_0 + qA = M_q$,

$$\Delta F(q, N) / RT = \ln\left[M(q) / M(0)\right] - \ln[N! / q!(N-q)!] - q \ln K - q \ln m. \qquad (1)$$

Здесь $M(q)$ концентрация в растворе матриц с q адсорбированными лигандами, m — концентрация свободного лиганда в растворе, K — константа равновесия в реакции взаимодействия одного лиганда с одним связывающим местом матрицы, RT — произведение универсальной газовой постоянной на температуру. Заметим, что в оригинальной работе Скетчарда в уравнении (1) присутствовал еще один член, связанный с взаимодействиями между адсорбированными на матрице лигандами. На таком взаи-

модействии мы остановимся более подробно ниже, сейчас же рассмотрим случай, когда взаимодействие отсутствует.

В случае химического равновесия связывание лигандов (как переход лигандов из свободного состояния в связанное, то есть из одной фазы в другую), не изменяет свободную энергию системы: $\Delta F(q, N) = 0$. В этом случае из (1) можно получить уравнение, связывающее между собой концентрации матриц с различным числом адсорбированных лигандов:

$$M(q) / M(0) = (K\ m)^q\ N!/\ q!(N-q)!. \tag{2}$$

Отсюда можно получить соотношение для среднего числа адсорбированных на полимере лигандов:

$$\langle q \rangle = NKm / (1 + Km). \tag{3}$$

Обозначим через r среднее заполнение матрицы лигандом, $r = \langle q \rangle / N$, тогда из (3) можно получить:

$$r = Km(1 - r). \tag{4}$$

Это хорошо известное уравнение Ленгмюра [2]. Для лиганда, который занимает при связывании один центр, r изменяется от 0 до 1. Заметим, что это уравнение справедливо для матрицы любой длины, что означает, что с точки зрения таких общих характеристик системы, как концентрация связанного лиганда в растворе или степень заполнения матрицы лигандами, не имеет никакого значения, какова длина матриц. Измеряя эти характеристики, экспериментатор с одинаковым успехом может пользоваться моделью, когда молекула ДНК содержит миллион пар оснований или всего одну пару оснований. То есть он может разрезать ДНК на короткие фрагменты, может иметь набор фрагментов разной длины — результаты эксперимента по связыванию лиганда, который закрывает одну пару оснований, не изменяются. Ниже мы рассмотрим характеристику, которая позволит различать ситуации, когда матрица имеет разную длину.

Если мы рассмотрим случай $N = 1$, то из (2) получим уравнение действующих масс: $K = M(1)/M(0)\ m$. С учетом соотношения $M(1) + M(0) = C_{NA}$, где C_{NA} — концентрация реакционных центров в растворе, получаем соотношение:

$$C_b / C_{NA} = Km(1 - C_b / C_{NA}), \tag{5}$$

где C_b — концентрация связанного лиганда, в этом случае $C_b = M(1)$, с учетом выражения для среднего заполнение реакционных центров лигандами: $r = C_b / C_{NA}$, соотношение (5) эквивалентно (4).

Уравнение (4) называют уравнением Скетчарда, но обычно имя Скетчарда связывают с более общим уравнением:

$$r = Km(n - r). \tag{6}$$

Здесь n — число молекул лиганда, которые могут адсорбироваться на одном реакционном центре матрицы. Таким образом, уравнение (6) подразумевает определенную модель адсорбции. В рамках этой модели на каждом реакционном центре матрицы может быть связано 0, 1, 2, … или n молекул лиганда. В этом случае можно представить каждый реакционный центр в качестве матрицы длиной n звеньев и для такого центра записать уравнение, эквивалентное (4). Суммирование уравнений типа (4) приводит к соотношению (6). Можно говорить о перенормировке — матрицу длиной в N центров, каждый из которых, в свою очередь, содержит n связывающих мест, мы можем заменить матрицей размером $N\,n$ центров.

Большинство биологически активных соединений попадает в рамки другой модели адсорбции: когда один лиганд при связывании закрывает L центров (рис. 2.1). В этом случае говорят о связывании протяженных лигандов с нуклеиновыми кислотами.

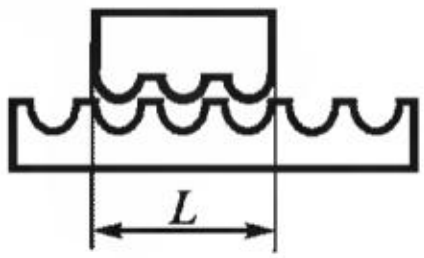

Рис. 2.1 Схема связывания, по которой лиганд занимает на матрице L реакционных центров

В рамках подхода Скетчарда можно найти соотношения для описания связывания и в рамках такой модели. Основная задача в таком случае заключается в подсчете степени вырожденности состояния системы (матрица с q адсорбированными лигандами), иными словами, в расчете той части энтропии системы, которая связана с выделенной механической степенью свободы, а именно, с возможностью молекул лиганда занимать разные места связывания на матрице. Эту специфическую часть энтропии системы мы будем называть статистической энтропией. В случае, когда лиганд занимает один центр матрицы, статистическая энтропия определяется вторым членом в формуле (1), а именно:

$$\Delta S(q, N) = R\ln \frac{N!}{q!(N-q)!} = R\ln C_N^q. \tag{7}$$

В данном случае статистическая энтропия обусловлена числом размещений на матрице из N центров q лигандов, что равно числу перестановок

в последовательности элементов двух типов: $N-q$ свободных центров и q центров, покрытых лигандом. Это число принято называть числом перестановок C_N^q. В случае, когда один лиганд покрывает при связывании L центров матрицы, выражение для статистической энтропии изменится.

Предположим, что лиганды не могут «свешиваться» на концах матрицы (это предположение эквивалентно тому, что концы матрицы ограничены непроницаемыми стенками, см. ниже). В этом случае q лигандов покрывают qL центров матрицы и остается $N-qL$ свободных центров. Чтобы найти статистическую энтропию в этом случае, следует рассчитать число перестановок в последовательности элементов двух типов: q связывающих мест, покрытых лигандами и $N-qL$ свободных центров. Можно показать, что статистическая энтропия в данном случае равна:

$$\Delta S(q, N) = R\ln \frac{(N-qL+q)!}{q!(N-qL)!} = R\ln C_{N-qL+q}^{q}. \tag{8}$$

Таким образом, для связывания протяженных лигандов для изменения свободной энергии при связывании q лигандов на матрице вместо уравнения (1) следует записать:

$$\begin{aligned}\Delta F(q, N)/RT = \ln\left[M(q)/M(0)\right] - \\ -\ln\left[(N-qL+q)!/q!(N-qL)!\right] - q\ln Km.\end{aligned} \tag{9}$$

Ниже мы покажем, к каким уравнениям связывания приводит это уравнение для изменения свободной энергии системы.

2.2. Метод статистических сумм

Стейнер рассмотрел адсорбцию лигандов на линейном полимере с помощью метода статистических сумм [3]. Этот метод применил к адсорбционной системе также Террел Хилл [4,5]. Проиллюстрируем этот подход в случае, когда с матрицей связывается протяженный лиганд, покрывающий L реакционных центров при связывании. В растворе сосуществуют матрицы с разным числом адсорбированных лигандов. Рассмотрим матрицу из N центров: такая матрица способна адсорбировать в насыщении $q_{\max} = N/L$ молекул лиганда (лиганды не «свешиваются»). Равновесные свойства системы полностью определяются, если рассчитана большая статистическая сумма, которая может быть представлена в следующем виде (см. [3–8]):

$$\Xi_N = \sum_{q=0}^{q_{\max}} Z_q (Km)^q. \tag{10}$$

Здесь Z_q — каноническая статистическая сумма для матрицы, на которой адсорбировано q молекул лиганда, m — концентрация свободного лиганда в растворе. Мы здесь не будем рассматривать постоянные множители статистической суммы, соответствующие внутренним степеням свободы матрицы и свободных лигандов в растворе, и тогда величина Z_q будет определяться степенью вырожденности состояния системы {матрица с q адсорбированными молекулами лиганда} и будет равна числу микросостояний, посредством которых реализуется это состояние. В данной системе Z_q является числом возможных различных размещений q адсорбированных лигандов на матрице длиной N:

$$Z_q = C^q_{N-qL+q} = \frac{(N-qL+q)!}{(N-qL)!q!}. \tag{11}$$

Условимся, что $Z_0 = 1$.

Построив большую статистическую сумму, можно найти выражения для всех равновесных характеристик системы. Например, среднее число адсорбированных лигандов:

$$\langle q \rangle = \frac{1}{\Xi_N}\sum_{q=1}^{q_{max}} qZ_q(Km)^q = \frac{Km}{\Xi_N}\frac{\partial \Xi_N}{\partial (Km)} = \frac{\partial \ln \Xi_N}{\partial \ln (Km)}. \tag{12}$$

2.3. Методы получения уравнений связывания

Задача получения уравнений, описывающих связывание, сводится к поиску выражения для свободной энергии системы или выражения для большой статистической суммы. В случае, когда рассматривается связывание на гомополимере, эти задачи решаются аналитически для целого ряда моделей адсорбции, учитывающих весьма сложные кооперативные взаимодействия между адсорбированными лигандами. Первым методом, который был применен для расчета термодинамических характеристик, был матричный метод. Этот метод был развит для расчета характеристик ферромагнетиков в рамках модели Изинга. Позже Лифсон развил метод генерирующих функций [9], а Заседателев и соавторы применили к решению задач теории адсорбции комбинаторный метод [6]. Этот метод является, с нашей точки зрения, наиболее наглядным. По существу, когда мы рассчитывали степень вырожденности термодинамического состояния системы (полимер с q адсорбированными лигандами), мы уже использовали комбинаторный метод.

2.3.а Комбинаторный метод

Комбинаторный метод можно использовать как в случае, когда рассчитывается термодинамический потенциал системы, так и в случае, когда

рассматривается статистическая сумма системы. Проиллюстрируем применение этого метода, следуя работе Заседателева и соавт. [6] в случае, когда между адсорбированными лигандами существуют контактные кооперативные взаимодействия (рис. 2.2).

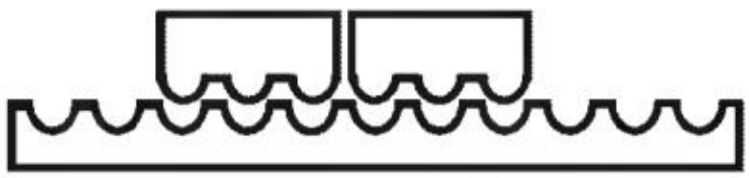

Рис. 2.2. Два лиганда адсорбированы так, что их ближайшие концы сближены (находятся в контакте)

Назовем изолированным связывающим местом место матрицы, отделенное от связывающих мест, на которых адсорбированы лиганды справа и слева, по меньшей мере одним свободным реакционным центром. Рассмотрим следующую модель: пусть связывание лиганда на изолированном связывающем месте происходит с константой K, связывание на месте, которое граничит с одним адсорбированным лигандом, происходит с константой $K\omega$, а связывание на месте, которое граничит с двумя адсорбированными лигандами, происходит с константой $K\omega^2$.

Рассмотрим связывание лиганда на матрице длиной N. Пусть всего на такой матрице адсорбировано q лигандов и между ними существует b контактов. Большая статистическая сумма системы будет рассчитана, если мы сможем рассчитать каноническую статистическую сумму $Z_q(b)$, соответствующую числу размещений q лигандов, имеющих b контактов на матрице:

$$\Xi_N = \sum_{q=0}^{q_{max}} (Km)^q \sum_b Z_q(b)\omega^b. \qquad (13)$$

Суммирование по b в (13) проходит от 0 до $q-1$ (в случае $q > 1$). Действительно, в случае, когда на матрице адсорбировано q лигандов, максимально возможное число контактов между лигандами составляет $q-1$ и реализуется в ситуации, когда все лиганды выстроены в цепочку так, что связывающие места на матрице расположены подряд, и все лиганды контактируют со своими соседями. Всего между q лигандами, размещенными в линейной цепочке, существуют $q-1$ пар ближайших соседей. Любые из них могут находиться в контакте. Итак, в общем числе размещений $Z_q(b)$ можно выделить две составляющих: во-первых, следует разместить b контактов между $q-1$ парами лигандов (и тем самым разбить адсорбированные лиганды на $q-b$ групп, в каждой из которых находится либо один изолированный лиганд, либо цепочка взаимодействующих между собой лигандов, изолированных от других групп), и во-вторых — разместить

в линейной последовательности $N-qL$ свободных реакционных центров и $q-b$ групп ближайших соседних лигандов. Эти размещения независимы, поэтому общее число размещений представляет собой произведение двух сомножителей. Первый сомножитель соответствует величине

$$\frac{(q-1)!}{(q-1-b)!b!},$$

второй — величине

$$\frac{(N-qL+q-b)!}{(N-qL)!(q-b)!}.$$

Итак,

$$Z_q(b)=\frac{(N-qL+q-b)!(q-1)!}{(N-qL)!(q-b)!(q-1-b)!b!}. \tag{14}$$

В случае, когда $N \gg q \gg 1$, можно применить формулу Стирлинга $\ln x! = x \ln x$ и с помощью соотношения (12) получить уравнения, описывающие кооперативное связывание лиганда. Вообще в таком случае удобно рассматривать связывание лигандов не на линейной матрице, а на матрице, замкнутой в кольцо: результат от изменения граничных условий не меняется, а расчеты числа перестановок несколько упрощаются.

Аналогично уравнению (12) можно записать уравнение, определяющее среднее число контактов между адсорбированными лигандами:

$$\langle b\rangle=\frac{1}{\Xi_N}\sum_{q=2}^{q_{max}}(Km)^q\omega b\sum_{b=1}bZ_q(b)=\frac{\omega}{\Xi_N}\frac{\partial\,\Xi_N}{\partial\,\omega}=\frac{\partial\ln\Xi_N}{\partial\ln\omega}. \tag{15}$$

Из (12)–(15) получаем систему уравнений адсорбции:

$$\begin{cases}\left(\dfrac{1-rL}{1-r(L+1)+\gamma}\right)^L\dfrac{(r-\gamma)^2}{r(1-r(L+1)+\gamma)}=Km,\\ \gamma^2(1-\omega)+\gamma[1-r(L+1-2\omega)]-\omega\,r^2=0.\end{cases} \tag{16}$$

Здесь $r=\langle q\rangle/N$, $\gamma=\langle b\rangle/N$.

Еще один путь получения таких уравнений — приравнивание к нулю вариации максимального члена большой статистической суммы.

2.3.б Метод рекуррентных соотношений

Метод рекуррентных соотношений построения большой статистической суммы для получения уравнений адсорбции чрезвычайно удобен, он

оказывается гораздо проще матричного метода и метода производящих функций. Впервые этот метод применил к задачам адсорбции Гурский, и здесь мы кратко изложим суть этого метода, следуя оригинальной работе [7]. Идея метода состоит в том, что статистическую сумму для термодинамической системы, содержащей молекулы лиганда и полимер, состоящий из N звеньев, можно представить в виде линейной комбинации статистических сумм, рассчитанных для систем, содержащих тот же лиганд и полимерные цепи с меньшим числом мономерных звеньев [7]. В случае некооперативного связывания рекуррентное соотношение имеет вид:

$$\Xi_N = \Xi_{N-1} + K_N m \Xi_{N-L}.$$

Это уравнение имеет ясный физический смысл. Статистическая сумма для системы, содержащей полимер из N звеньев, описывает все состояния системы, в том числе и состояния, когда N-е звено полимера является свободным, и когда оно занято лигандом. Так как лиганд не может «свешиваться» на концах полимера, то все состояния, при которых N-е звено полимера является свободным, учитываются в Ξ_{N-1}, а состояния, при которых N-ое звено занято лигандом, описываются $\Xi_N - \Xi_{N-1}$. Статистический вес всех состояний, при которых лиганд связывается на конце полимера и «накрывает» L последовательных звеньев равен $K_N m \Xi_{N-L}$.

Граничные условия:

$$\Xi_j = 1,\ j < L,$$
$$\Xi_L = m.$$

Здесь K_j — константа связывания лиганда с j-м связывающим местом, которое начинается с $j - L + 1$ и заканчивается j-м нуклеотидом.

При специфическом связывании на гетерополимере K_j зависит от нуклеотидной последовательности на участке ДНК, занимаемом лигандом. Вероятность того, что i-й участок ДНК занят лигандом, можно рассчитать с помощью стандартного соотношения:

$$P(i) = \frac{\partial \ln \Xi_N}{\partial \ln(K_i m)}. \tag{17}$$

При связывании на гомополимере все связывающие места являются эквивалентными: $K_i = K$.

В случае кооперативного связывания на гомополимере, когда кооперативные эффекты вызываются взаимодействиями между ближайшими соседними связанными молекулами лиганда, рекуррентное соотношение имеет вид:

$$\Xi_N = \Xi_{N-1} + K m \Xi_{N-L-1} + \omega K m (\Xi_{N-L} - \Xi_{N-L-1}), \tag{18}$$

с граничными условиями:

$$\Xi_j = 1 \quad (j < L),$$
$$\Xi_j = (j - L + 1)Km \quad (L < j < 2L),$$
$$\Xi_{2L} = \omega(K\,m)^2 + (L + 1)K\,m.$$

Здесь ω — константа, описывающая взаимодействие между связанными молекулами лиганда. K — константа связывания лиганда на изолированном связывающем месте. Заполнение матрицы лигандами может быть рассчитано при помощи следующего уравнения:

$$r = \frac{1}{N}\frac{\partial \ln \Xi_N}{\partial \ln (Km)}.$$

Если $N \gg L$, то $\Xi_N \to X_1^N$, где X_1 — наибольший корень алгебраического уравнения (19), которое является предельной формой уравнения (18) при $N \to \infty$:

$$X^{L+1} - X^L - Km - \omega Km(X - 1) = 0. \tag{19}$$

В этом случае заполнение матрицы лигандами вычисляется по формуле:

$$r = \frac{\partial \ln X_1}{\partial \ln (Km)}.$$

Дисперсия заполнения матрицы лигандами в случае матрицы конечной длины:

$$D_N(r) = \frac{1}{N}\frac{\partial r}{\ln (Km)} = \frac{1}{N}\frac{\partial^2 \Xi}{\partial (\ln Km)^2}. \tag{20}$$

Из уравнения (19) легко получить уравнения для расчета изотерм для кооперативного и некооперативного ($\omega = 1$) связывания.

Важно отметить значительную общность и гибкость метода рекуррентных соотношений. Рекуррентные соотношения могут быть легко получены для различных моделей адсорбции и широкого класса кооперативных систем. Их можно использовать для расчета изотерм связывания лиганда на гомополимере и описания связывания лигандов на гетерополимере — матрице с реакционными центрами различных типов. Последнее представляет значительный интерес для определения термодинамических параметров связывания таких биологически важных ДНК-связывающих лигандов как транскрипционные факторы, бактериальные репрессоры и активаторы транскрипции, специфичные синтетические ДНК-связываю-

щие соединения и др. В работах [10, 11] даны примеры практического использования рекуррентных соотношений для расчета изотерм адсорбции и профилей связывания лиганда на рестриктных фрагментах ДНК с заданной нуклеотидной последовательностью.

2.4. Анализ кривых связывания лигандов с биополимерами

2.4.а Представление экспериментальных кривых по Скетчарду

Скетчард предложил способ представления экспериментальных данных, который позволяет определять константу взаимодействия лиганда с макромолекулой и оценить число мест связывания [1]. Речь идет о возможности ответить на вопросы «Как сильно?» и «Сколько?», которые интересуют экспериментатора при изучении связывании макромолекулы с лигандами. Уравнение (6) позволяет ответить на эти вопросы следующим образом: представим, что мы можем измерить концентрацию адсорбированных лигандов в растворе C_b и измерить заполнение одного связывающего центра матрицы лигандами $r = C_b / C_{NA}$. Тогда уравнение (6) можно записать в виде:

$$r / m = K(n - r),$$

Рассмотрим асимптотическое поведение этого уравнения: при $r \to 0$ отношение степени заполнения к концентрации свободного лиганда в растворе r / m стремится к величине $K\,n$. Максимальное значение степени заполнения r_{max} соответствует величине n, поэтому если представить экспериментальные данные в координатах $(r / m, r)$, то можно легко определить как максимальное число лигандов, которые связываются на одном связывающем месте матрицы n, так и константу связывания одного лиганда K.

2.4.б Представление кривых по Хиллу

Арчибальд Хилл предложил способ анализа экспериментальных данных, основанный на представлении $\ln(r / (1 - r))$ от $\ln m$ [12]. Этот способ применяется для анализа кооперативных взаимодействий между адсорбированными лигандами в ситуации, когда исследователи обходят стороной вопрос о теоретической модели адсорбции и предпочитают описывать данные при помощи полуэмпирического уравнения Хилла:

$$r = \frac{K^n m^n}{(1 + K^n m^n)}.$$

Нетрудно показать, что такое уравнение будет справедливо в случае, когда на матрице связывается одновременно n молекул лиганда с бесконечной кооперативностью (то есть в соответствии с моделью «все или ничего» — в растворе в равновесии находятся либо матрицы без лигандов, либо матрицы с n адсорбированными лигандами). Подробно уравнение Хилла рассматривается в руководстве Кантора и Шиммеля [13]. На наш взгляд, это уравнение (которое было предложено почти сто лет назад) применяется некритично в тех случаях, когда можно описать систему при помощи более детальной модели адсорбции. Однако с этим уравнением связаны и реальные достижения в тех случаях, когда необходимо описать системы такого рода, о которых мало что известно. Так, уравнение Хилла используется в методах нейролингвистического программирования, позволяющих описывать сложные системы. Интересным свойством этого уравнения является тот факт, что при $n < 1$ оно совпадает с уравнением Сипса ([14, 15] которое используется сейчас для описания гибридизации мРНК на чипах (см., например, [16]). Сипс опубликовал своё уравнение в 1948 году, оно было предложено для описания связывания лигандов на гетерогенных поверхностях, и нам не удалось найти в работах, которые ссылаются на уравнение Сипса, упоминания уравнения Хилла. Это свидетельствует о том, что данная область науки — теория адсорбции — является относительно молодой и связи между отдельными её областями ещё не установлены.

1.4.в Анализ начального наклона кривых по Гурскому–Заседателеву

В случае, когда лиганд связывается некооперативно, анализ начального хода кривой позволяет оценить размер связывающего места. Из уравнения (16) при $\omega = 1$ можно получить оценку начального хода кривой

$$\frac{d(r/m)}{dr} = 2L - 1.$$

Гурский и Заседателев с соавторами [7,8], а также Лившиц и соавторы [17] рассмотрели также случай, когда лиганд связывается на гетерополимере и константы связывания лиганда на разных местах матрицы различаются в зависимости от нуклеотидной последовательности этих мест. Были получены уравнения, описывающие константы связывания и наклоны начального хода кривых в этом случае. Эти соотношения позволили оценить число реакционных центров при связывании дистамицина А с ДНК и, в конечном счете, оценить параметры молекулярной модели адсорбции.

В Главе 4 нами будет развит асимптотический метод анализа изотерм адсорбции, рассматривающий поведение кривых связывания в области заполнений матрицы лигандом, близким к насыщающему значению. Этот

метод был предложен нами в работе [18] и позволил в дальнейшем провести классификацию моделей адсорбции в соответствии с поведением кривых связывания.

Литература

1. *Scatchard G.* The attractions of proteins for small molecules and ions. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1949. V. 15. P. 660–672.
2. *Грег С., Синг К.* Адсорбция. Удельная поверхность. Пористость. — М.: Мир, 1984. — 310 с.
3. *Steiner R. F.* // Journ. Chem. Phys. 1954. V. 22. P. 1458–1459.
4. *Hill T. L.* Some statistical problems concerning linear macromolecules // J. Polymer Sci. 1957. V. 23. P. 549–562.
5. *Hill T. L.* // Statistical Mechanics. McGraw-Hill. N. Y. 1956. Имеется перевод: Хилл Т., Статистическая механика. — М., 1960.
6. *Заседателев А. С., Гурский Г. В. и Волькенштейн М. В.* Теория одномерной адсорбции. 1. Адсорбция малых молекул на гомополимере // Мол. биология. 1971. Т. 5. С. 245–490.
7. *Гурский Г. В., Заседателев А. С. и Волькенштейн М. В.* Теория одномерной адсорбции. II. Адсорбция малых молекул на гетерополимере. // Мол. биология. 1972. Т. 6. С. 479–489.
8. *Гурский Г. В., Заседателев А. С.* Точные соотношения, описывающие связывание регуляторных белков и других решеточных лигандов на двухспиральных полинуклеотидах // Биофизика. 1978. Т. 23. С. 932–946. См. также *Гурский Г. В., Заседателев А. С.* // В кн. Итоги науки и техники. Сер. Молекулярная биология. М. ВИНИИТИ, 1982, с. 190–237, *Gursky G. V., Zasedatelev A. S.* Thermodynamic and stereochemical aspects of binding interactions between sequence-specific ligands and DNA // Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol. 1984. V. 5, P. 53–139.
9. *Lifson S.* Partition function of linear-chain molecules // J. Chem. Phys. 1964. V. 40. P. 3705–3710.
10. *Рябоконь В. Ф., Нечипуренко Ю. Д., Гурский Г. В.* Количественные методы анализа диаграмм фут-принтинга для комплексов лигандов с фрагментом ДНК с известной последовательностью. ДАН, 2004, Т. 398, С. 832–837.
11. *Nechipurenko Y. D., Jovanovic B., Riabokon V. F., Gursky G. V.* Quantitative methods of analysis of footprinting diagrams for the complexes formed by a ligand with a DNA fragment of known sequence. Ann N Y Acad Sci., 2005, V. 1048, P. 206–214.
12. *Hill A. V.* The combination of hemoglobin with oxygen and with carbon monoxide // Biochemistry J. 1913 V. 7. P. 471–480.
13. *Кантор Ч., Шиммел П.* Биофизическая химия. — М.: Мир, 1984.
14. *Sips R.* On the structure of catalyst surface // J. Chem. Phys. 1948. V. 16. P. 490–495.

15. *Ходыков М. В., Анашкина А. А., Головкин М. В., Матвеева О. В., Нечипуренко Ю. Д.,* Анализ связывания лигандов в растворе и на микрочипах, Биофизика, 56, 1053–1061 (2011).
16. *Peterson A. W., Wolf L. K., Georgiadis R. M.,* Hybridization of Mismatched or Partially Matched DNA at Surfaces, J. Am. Chem. Soc.,124(49), 14601–14607 (2002).
17. *Livshitz M. A., Gursky G. V., Zasedatelev A.M, Volkenstein M. V.* // Nucleic Acids Res. 1979. V. 6. P. 2217–2236.
18. *Нечипуренко Ю. Д.* Термодинамические параметры, характеризующие взаимодействия между молекулами лиганда, адсорбированными на полимере // Биофизика. 1982. Т. 27. С. 91–398.

Глава 3
ФУНКЦИИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ

В этой главе будет рассмотрен общий метод описания некооперативного и кооперативного связывания лигандов с матрицами НК при помощи функций распределения адсорбированных лигандов. Заметим, что метод функций распределения рассмотрел Хилл в руководстве по статистической механике [1].

3.1. Модель адсорбции

Пусть в растворе при постоянной температуре T и постоянном давлении p находятся молекулы лиганда и молекулы матрицы, на которой может адсорбироваться лиганд. Рассмотрим случай, когда матрица представляет собой линейную цепочку из N связывающих центров, и лиганд при связывании покрывает L центров, расположенных подряд. Эти L центров мы будем называть связывающим местом лиганда (см. рис. 2.1).

Химический потенциал лиганда в растворе равен:

$$\mu = \mu^0 + RT \ln m. \tag{21}$$

Обозначим химический потенциал адсорбированного лиганда μ', тогда изменение свободной энергии при связывании одного лиганда равно:

$$\Delta G = \mu' - \mu = \mu' - \mu^0 - RT \ln m = \Delta G^0 - RT \ln m. \tag{22}$$

Константа химического равновесия в реакции связывания одного лиганда с одним связывающим местом на матрице равна:

$$K = \exp\left(-\Delta G^0 / RT\right). \tag{23}$$

Взаимодействие одной молекулы лиганда с одним связывающим местом на матрице, если рассматривать этот процесс изолировано от прочих процессов адсорбции и десорбции лигандов, характеризуется константой K. Эту константу в англоязычной научной литературе называют «intrinsic binding constant», мы будем назвать ее константой связывания, вкладывая в это наименование тот смысл, что изменение свободной энергии ΔG^0 при связывании лиганда в этом случае рассматривается отдельно

от других процессов в системе (т. е. не учитывается ни изменение числа размещений лигандов на матрице, ни взаимодействие с другими адсорбированными лигандами). Изменение свободной энергии адсорбционной системы при связывании q лигандов на матрице длиной N мы обозначаем вслед за Скетчардом посредством $\Delta F(q, N)$ (смотри (1)). В случае химического равновесия адсорбция лиганда (как переход лиганда из свободного состояния в связанное), не изменяет свободную энергию системы: $\Delta F(q, N) = 0$.

3.2. Функция распределения адсорбированных лигандов

В качестве подсистемы описанной выше системы рассмотрим одну матрицу с адсорбированными лигандами. Свойства такой подсистемы определяются наличием неопределенности, обусловленной статистической энтропией. Действительно, если известно, что на одной матрице связано q лигандов, существует неопределенность: какие именно из N реакционных центров заняты лигандами, а какие свободны? Мерой такой неопределенности служит статистическая (или конфигурационная) энтропия матрицы с адсорбированными лигандами. Эта часть энтропии обусловлена числом размещений в линейной последовательности q связывающих мест, покрытых адсорбированными лигандами и $N - qL$ реакционных центров, не взаимодействующих с лигандами (мы их будем называть «свободными»).

Статистическая энтропия задается степенью вырожденности макросостояния матрицы с адсорбированными лигандами, она пропорциональна логарифму числа перестановок:

$$\Delta S(q, N) = R\ln \frac{(N - qL + q)!}{q!\ (N - qL)!} = R\ln C^{q}_{N-qL+q}.$$

Запишем уравнение (9) в виде:

$$\ln\left[M(q) / M(0)\right] = -\Delta f(q, N) / RT, \tag{24}$$

где

$$-\Delta f(q, N) / RT = \ln\left[(N - q\,L + q)!/\ q!(N - qL)!\right] + q\ln Km.$$

Напомним, что $M(q)$ обозначает концентрацию матриц, на которых адсорбировано q молекул лиганда. Величина $\Delta f(q, N)$ определяет изменение свободной энергии, которое приходится в расчете на одну молекулу матрицы при связывании на ней q молекул лиганда. В этом уравнении первый член соответствует появлению в нашей подсистеме, при связывании на матрице q лигандов, статистической энтропии.

Зная концентрацию свободного лиганда в растворе m, эти же характеристики можно рассчитать теоретически с помощью соотношения (24). Действительно, если концентрация матриц, на которых не адсорбировано ни одного лиганда, равна $M(0)$, то из (25) можем найти концентрацию матриц, на которых адсорбировано q лигандов:

$$M(q) = M(0)\exp(-\Delta f(q, N) / RT). \tag{25}$$

Это соотношение соответствует распределению Больцмана.

Обозначим через C_M полную концентрация матриц в растворе, тогда:

$$\sum_{q=0}^{N} M(q) = \sum_{q=0}^{N} M(0)\exp(-\Delta f(q, N) / RT) = C_M. \tag{26}$$

Представим следующую ситуацию: среди всех матриц в растворе мы наугад выбираем одну. Какова вероятность того, что на этой матрице будет адсорбировано q лигандов? Если разделить концентрацию матриц с q лигандами на общую концентрацию матриц в растворе C_M , мы получим искомую величину:

$$\Phi(q) = M(q) / C_M.$$

Для каждой концентрации свободного лиганда в растворе m существует определенное распределение матриц по состояниям $\Phi(q)$. Это распределение детально характеризует нашу систему. Мы будем называть эту функцию функцией распределения адсорбированных лигандов по матрицам, или сокращенно **функцией распределения.** Запишем эту функцию в явном виде:

$$\Phi(q) = \frac{C_{N-qL+q}^{q}(Km)^{q}}{\sum_{i=0}^{q_{max}} C_{N-iL+i}^{i}(Km)^{i}}. \tag{27}$$

Функция распределения не зависит от концентрации матриц в растворе, но имеет явственную зависимость от длины матрицы N, что же касается зависимости от концентрации свободных молекул лиганда m, то область значений концентрации, при которых происходят значимые изменения в функции распределения, определяется величиной константы равновесия K. Действительно, $\Phi(q)$ зависит от произведения Km.

Из (27) можно получить:

$$\langle q \rangle = \sum_{q=1}^{q_{max}} q\Phi(q) = \frac{\sum_{q=1}^{q_{max}} qC_{N-qL+q}^{q}(Km)^{q}}{\sum_{i=0}^{q_{max}} C_{N-iL+i}^{i}(Km)^{i}}. \tag{28}$$

Еще одна важная характеристика системы — дисперсия, или мера отклонения распределения от среднего значения:

$$\sigma_N{}^2 = \sum_{q=0}^{q_{\max}} \left[q - \langle q \rangle \right]^2 \Phi(q). \tag{29}$$

Функция распределения (27) соответствует нормальному распределению, или распределению Гаусса:

$$\Phi(q) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\,\sigma_N} \exp\left[-\frac{(q - \langle q \rangle)^2}{2\sigma_N{}^2} \right]. \tag{30}$$

При увеличении размера матрицы N дискретное распределение $\Phi(q)$ сходится к непрерывному распределению Гаусса $f(x)$, где x — степень заполнения матрицы лигандом, $x = q / N$:

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi D_N(r)}} \exp\left[\frac{-(x - r)^2}{2D_N(r)} \right]. \tag{31}$$

Здесь r соответствует среднему заполнению матрицы лигандами, то есть среднему числу адсорбированных лигандов в расчете на один реакционный центр: $r = \langle q \rangle / N$, величина $D_N(r)$ соответствует дисперсии r.

При связывании на матрице q лигандов возникает та неопределенность, которую нельзя разрешить с помощью измерения общих физико-химических характеристик системы в растворе. Действительно, предположим, что мы можем измерить концентрацию фракции тех матриц в растворе, на которых связано q молекул лиганда. В ряде случаев это наиболее детальная информация о системе, которую можно получить. Мы не сможем определить, как именно расположены лиганды на одной матрице в какой-то момент времени (то есть не сможем сделать «мгновенное фото» матрицы, из которого было бы ясно, какие реакционные центры закрыты лигандом, а какие свободны). При проведении эксперимента по специальной методике (скажем, при помощи метода фут-принтинга) можно измерить профили вероятности связывания лиганда на отдельных местах матрицы — по-видимому, это наиболее детальная информация об адсорбционной системе, которую можно получить (см. Главу 7).

Представим на простейшем примере, как может выглядеть наиболее полная информация о взаимодействии лиганда с ДНК в случае физико-химического эксперимента в растворе, в котором изменяются не детальные, а общие характеристики связывания.

3.2.а Связывание лиганда, который занимает один реакционный центр матрицы

Предположим, что лиганд несет положительно заряженную группу атомов, которая нейтрализует заряды сахаро-фосфатного остова ДНК, соответствующие одной паре оснований. Матрицы ДНК с разным числом зарядов будут по-разному двигаться в геле под воздействием электрического поля — и при помощи гель электрофореза или подобной техники мы можем измерить концентрацию матриц, на которых связано q молекул лиганда.

Рассмотрим систему, состоящую из одной матрицы. Эта система может находиться в $N+1$ состоянии: матрица может быть пуста, может содержать один, два, ... N лигандов. Вероятность того, что матрица будет находиться в определенном состоянии, экспоненциально зависит от свободной энергии, соответствующей этому состоянию. Эта вероятность определяет число матриц в растворе, на которых связано q лигандов.

Для случая, когда лиганд при связывании закрывает один реакционный центр, $L=1$, из (29) можно получить соотношение для дисперсии:

$$\sigma_N^2 = NKm/(1+Km)^2.$$

Из сравнения (30) и (31) для случая, когда лиганд при связывании закрывает один реакционный центр, $L=1$, можно получить:

$$D_N(r) = \sigma_N^2 / N^2 = Km/N(1+Km)^2. \qquad (32)$$

Среднее заполнение матрицы лигандами для этого случая определяется, как мы и писали выше, тем же соотношением, что для $N=1$:

$$r = \langle q \rangle / N = Km/(1+Km). \qquad (33)$$

Сравним функции распределения (30) и (31). При переходе от величин, соответствующих числу лигандов q к значениям заполнения x, функция распределения сжимается в N раз, а ее величина возрастает в N раз. Это связано с нормировкой функции плотности вероятности — сумма вероятностей равна 1:

$$\sum_{q=1}^{N} \Phi(q) = 1 = \int_0^1 f(x)\mathrm{d}x.$$

Из (32) следует, что дисперсия r уменьшается с ростом длины матрицы. Мы остановимся на этом факте более подробно. Согласно (33), уравнение связывания для случая, когда лиганд при связывании закрывает один реакционный центр, $L=1$, можно записать в виде:

$$r = Km(1-r),$$

или

$$K = r / \left[m(1-r) \right]. \tag{34}$$

Это уравнение можно интерпретировать с точки зрения теории вероятностей. Рассмотрим одну матрицу, на которой адсорбировано $q = rN$ лигандов. Вероятность обнаружить на этой матрице свободный центр $(N-q)/N = (1-r)$, вероятность обнаружить лиганд $q/N = r$. Уравнение (34) имеет форму условия химического равновесия: в расчете на один реакционный центр, r соответствует концентрации комплексов (или занятых центров), $(1-r)$ соответствует концентрации свободных центров (см. ниже). При такой интерпретации в правой части уравнения (34) в числителе стоит концентрация комплексов, в знаменателе — произведение концентрации свободных реакционных центров на концентрацию свободных лигандов.

О том, что уравнения связывания могут иметь довольно простую вероятностную интерпретацию, писали Мак-Ги и фон Хиппель [3]. Связывание лигандов на одном месте матрицы они рассмотрели при помощи метода условных вероятностей. Вероятностная интерпретация уравнений связывания для более сложных случаев была дана нами совместно с Гурским, Заседателевым и Йовановичем в работах [2, 4, 5]. Ранее Рейтер и Эпштейн показали [6, 7], что функция распределения лигандов является прекрасным инструментом для понимания происходящих на матрицах процессов. Они же получили выражение для дисперсии функции распределения для случая, когда лиганд связывается с матрицами НК кооперативно. Однако, на наш взгляд, необходимо более подробно изучить основополагающие статистические свойства системы в случае некооперативного связывания (в нашей работе с Йовановичем были исследованы интересные особенности системы в этом случае [2]).

Рассмотрим все реакционные центры в растворе. Вероятность того, что выбранный наугад реакционный центр занят адсорбированным лигандом, равна r. Дисперсия r определяется соотношением (32). Если матрица имеет длину $N = 1$, то неопределенность в величине заполнения матрицы лигандом r может превосходить саму величину r. Действительно, если рассматривать ширину функции распределения $D_1(r)^{1/2}$ как меру такой неопределенности, то при $Km < 1$ получаем $D_1(r)^{1/2} > r$.

Неопределенность в заполнении матрицы лигандами уменьшается с ростом длины матрицы. Чтобы это показать, пронумеруем реакционные центры матрицы от 1 до N. Каждый центр матрицы может находиться в двух состояниях: свободном и занятом лигандом. Вероятность обнаружить центр занятым равна r, свободным — $(1-r)$. Предположим, что мы

движемся от начала матрицы к концу и рассматриваем состояние каждого следующего центра. Данная ситуация соответствует схеме испытаний Бернулли с двумя исходами: успехом будем называть обнаружение центра, занятого лигандом, неудачей — свободного центра. Тогда с возрастанием числа таких независимых повторных испытаний n частота успехов дает все более точную оценку вероятности r. Пусть на одной матрице в серии испытаний длиной n нам встретится t раз занятый центр, тогда интервал $(t / n - r)$ будет сужаться по мере роста n пропорционально $n^{1/2}$.

Тем самым одна матрица по мере роста своей длины заполняется лигандом с все большей точностью. Предположим, что $Km = 1$. Если матрица, состоящая из одного центра, может быть с одинаковой вероятностью занята или свободна, то длинная матрица будет с известной точностью наполовину закрыта лигандом. Это может позволить ей в целом определенным образом отреагировать на добавление в раствор лиганда.

Добавление лигандов в раствор нуклеиновых кислот можно рассматривать с информационной точки зрения как передачу сообщения. Лиганды сообщают молекуле матрицы определенный сигнал, который матрица способна дешифровать — и отреагировать определенным образом (например, перейти в компактное состояние, см. Приложение А). Конечно, и короткая молекула тоже может воспринимать сигналы, но на ее основе невозможно строить количественную регуляцию: переход короткой молекулы из свободного состояния в связанное более хаотичен. Точное количественное описание регуляции состояния молекул требует применения аппарата общей теории информации, здесь мы лишь намечаем пути к такому подходу.

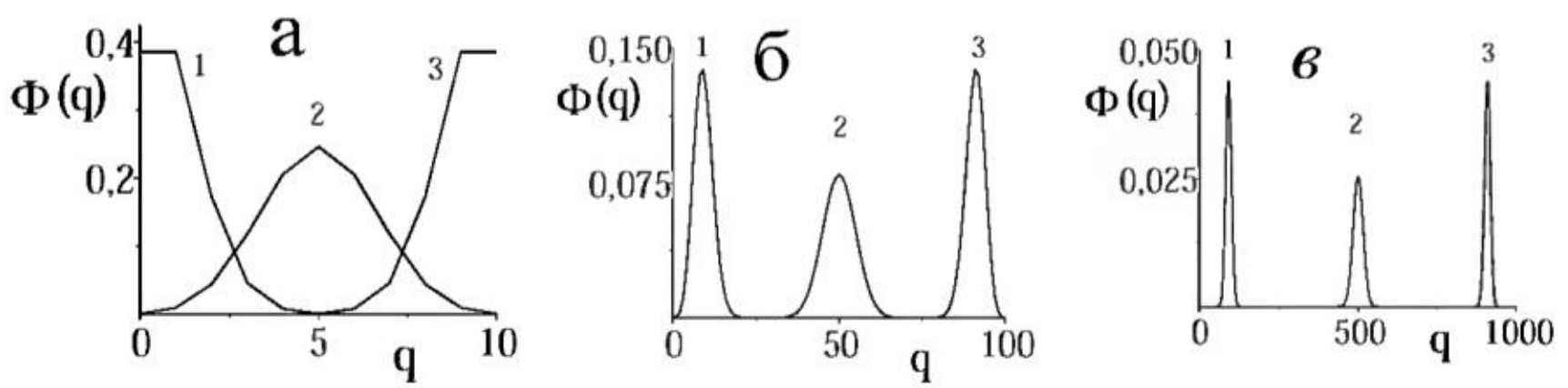

Рис. 3.1. Функции распределения для матриц разной длины в случае, когда лиганд занимает при связывании один реакционный центр матрицы $L = 1$. Функции рассчитаны для трех значений произведения константы связывания на концентрацию свободного лиганда в растворе: $Km = 0{,}1$, 1 и 10 (распределения 1, 2 и 3, соответственно). а) $N = 10$; б) $N = 100$; в) $N = 1000$

На рис. 3.1 показаны примеры функций распределения, когда длина матрицы равна 10, 100 и 1000 парам нуклеотидов. Сравнивая случаи $N = 10$, 100 и 1000, можно заметить, что относительная ширина функции

распределения плавно сужается с ростом N. Это свойство системы может иметь весьма важное значение, если рассматривать информационную стратегию передачи с помощью лигандов определенных сигналов отдельной матрице и всему геному в целом.

Наиболее широкое и «размазанное» распределение наблюдается при $Km = 1$, при увеличении или уменьшении Km функция распределения становится более узкой. Распределения для $Km = y$ и $Km = 1 / y$ для всех значений y зеркально симметричны относительно центра $N / 2$ в случае, когда лиганд при связывании закрывает один реакционный центр, $L = 1$.

3.2.б Адсорбция лиганда, который при связывании закрывает несколько реакционных центров

На рис. 3.2 показаны функции распределения для лигандов разной длины, рассчитанные в случае матрицы длиной $N = 1000$ при помощи соотношения (27). Можно заметить, что по мере увеличения длины лиганда функция распределения все более «сужается», а ее максимальное значение вырастает. Эта тенденция продолжается по мере роста длины лиганда. Следовательно, задав концентрацию свободного лиганда в растворе m, в случае протяженного лиганда можно более точно определить число адсорбированных лигандов. В целом же функция распределения (27) оказывается близка к распределению Гаусса (смотри ниже).

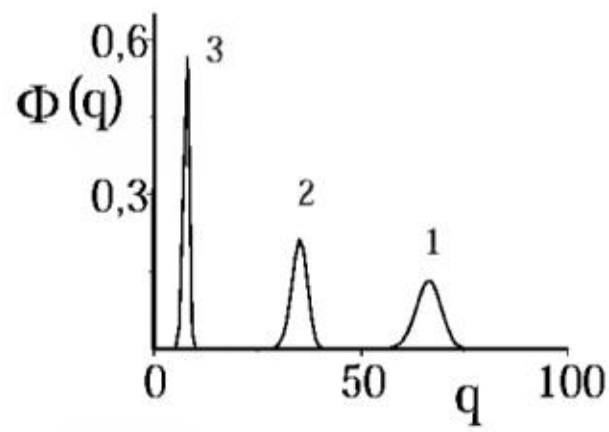

Рис. 3.2. Функции распределения для лигандов разной длины. Функции (1)–(3) рассчитаны в случае матрицы длиной $N = 1000$ для лигандов, которые закрывают при связывании 10, 20 и 100 центров матрицы, соответственно, для одного и того же значения $Km = 1$

Еще одно важное свойство системы, которое обнаруживается при связывании протяженных лигандов, заключается в том, что по мере увеличения длины лиганда функция распределения становится все более асимметричной: если при $L = 1$ функция $\Phi(q)$ для $K\,m = 1$ симметрична относительно значения $q = N / 2L$, то при $L > 1$ равновесные значения $\langle q \rangle$ смещаются в сторону больших значений. Это означает, что степень покрытия матрицы лигандами $\langle q \rangle L$ увеличивается по мере увеличения длины лиганда L.

На рис. 3.3 показаны функции распределения в случае $L = 10$ для значений Km =0,1, 1 и 10.

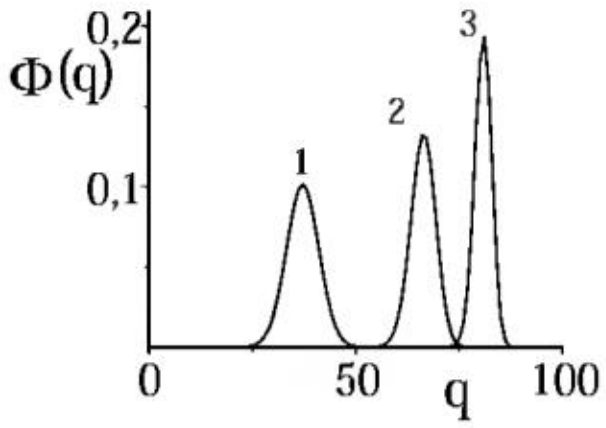

Рис. 3.3. Функции распределения для лиганда, который закрывает при связывании $L = 10$ реакционных центров матрицы. Функции (1)–(3) рассчитаны для значений $Km = 0{,}1$, 1 и 10, соответственно в случае матрицы размером $N = 1000$.

В случае $N \gg 1$ из (24), приравняв к нулю вариацию свободной энергии $\Delta f(q,\ N)$ можно получить уравнение для изотермы адсорбции:

$$\frac{r}{Km} = \left(\frac{1 - rL}{1 - rL + r}\right)^{L} (1 - rL + r). \tag{35}$$

Это уравнение, описывающее некооперативное связывание протяженного лиганда, является центральным в теории адсорбции применительно к молекулярной биофизике. В такой форме записи оно было получено впервые Заседателевым и соавторами в работе [8]. Заметим, что данная модель — связывание протяженного лиганда рассматривалась и до работ Заседателева с соавторами, уравнения, описывающие такое связывание, были получены Брэдли и Лифсоном [9] (см. также работу Латта и Собера [10]), однако эти уравнения имели другою, параметрическую форму записи — так же как и уравнения, полученные позже Крозерсом [11]. Связь между двумя формами записи этих уравнений была показана нами в [12].

Вероятностная интерпретация уравнения (35) заключается в следующем: если рассмотреть одну матрицу, то правая часть уравнения соответствует относительному числу свободных связывающих мест для лиганда на этой матрице (одно место составляют L расположенных подряд свободных реакционных центров). Величина r дает относительное число адсорбированных лигандов. В таком случае (35) можно рассматривать как условие химического равновесия для лиганда длины L, аналогично уравнению равновесия (34) для лиганда длины $L = 1$. Как и в случае лиганда длины $L = 1$, мы можем построить схему испытаний Бернулли и оценить сходимость величины q/N к значению r — вероятности обнаружить на матрице лиганд.

С другой стороны, сама величина r имеет определенную дисперсию, которую можно оценить либо с помощью соотношения (29), либо, используя следующее уравнение (которое следует из (29):

$$D_N(r) = \frac{\sigma_N^2}{N^2} = \frac{1}{N^2}\frac{\partial\langle q\rangle}{\partial\ln(Km)} = \frac{1}{N}\frac{\partial r}{\partial\ln(Km)}. \qquad (36)$$

Из (36) следует важное наблюдение: если представить кривую связывания в полулогарифмическом масштабе, как зависимость r от $\ln(Km)$, то дисперсия заполнения r определяет наклон этой кривой (см. [7]).

Из (35), используя (36), получаем:

$$D_N(r) = r(1 - rL)(1 - rL + r) / N. \qquad (37)$$

Отсюда следует, что дисперсия распределения лигандов на матрице линейно уменьшается с ростом длины матрицы, а ширина функции распределения пропорциональна $1/\sqrt{N}$. В руководствах по теории вероятностей величина, обратная ширине распределения, называется точностью: $h=1/(2\ D_N\ (r))^{1/2}$. Таким образом, из (37) следует принципиально важный вывод: точность процесса адсорбции, проявляющаяся в точности заполнения матрицы лигандами, растет с ростом длины матрицы как $N^{1/2}$. Заметим, что уравнение (37) совпадает с выражением для дисперсии, полученным в случае некооперативного связывания в работе Рейтера и Эпштейна (смотри таблицу 1 из [7]).

В работе Бабаяна и соавторов предложен метод измерения характеристик связывания на основании измерения дисперсии [13]. Однако такие измерения требуют специальной методики: необходимо построить систему измерения так, чтобы удалось фиксировать связывание одиночного лиганда на одном месте матрицы. Такая методика была построена в работе Еловица и соавторов [14], где в рамках эксперимента по связыванию *lac*-репрессора с оператором был измерен шум экспрессии репортерного гена. Нами вместе с Георгием Гурским, Александром Вольфом и Михаилом Головкиным позже было показано, что большая часть такого шума может быть обусловлена дисперсией функции распределения, описывающей связывание *lac*-репрессора на операторном участке ДНК [15, 18].

В соответствии с (37), дисперсия заполнения матрицы уменьшается с ростом длины матрицы, и для матрицы бесконечной длины дисперсия стремится к нулю. Этот вывод прямо противоположен результатам работы [13], где дисперсия не зависит от длины матрицы.

Возможности измерения дисперсии заполнения одного связывающего места матрицы и оперирования характеристиками, связанными с одной молекулой НК, весьма ограничены. Мы писали выше, что при физико-

химических экспериментах в растворе исследователи имеют дело с числом связывающих мест, соответствующим 10^{15} в миллилитре раствора и в этом случае дисперсия заполнения таких мест лигандом будет исчезающе малой.

Уравнения (35,36) позволяют рассчитывать первый и второй моменты функции распределения и тем самым оценивать точность, с которой реализуется связывание. Неточность адсорбции как случайного процесса (или неопределенность в степени заполнения матрицы лигандами) обусловлена статистическими свойствами системы. Сам термин «точность» происходит из теории ошибок, здесь ему можно построить следующую аналогию: лиганды из раствора случайным образом адсорбируются на матрице («бомбардируют» эту пространную мишень) — и среднее число связанных лигандов определяет заданное число «попаданий», а отклонение от среднего — статистическую неточность данного случайного процесса.

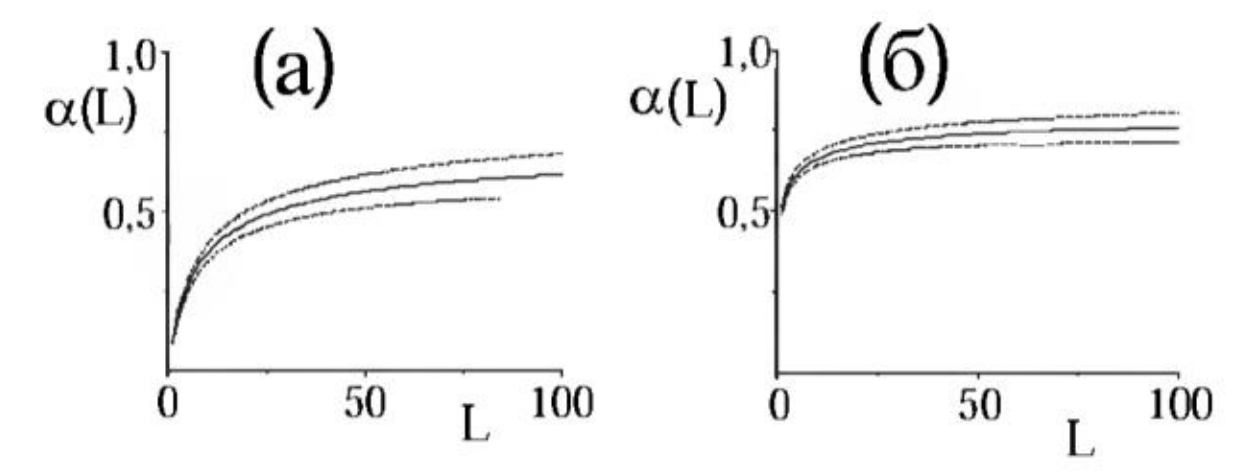

Рис. 3.4. Зависимость покрытия матрицы лигандом от размера связывающего места. Длина матрицы $N = 1000$. Кривые соответствуют зависимостям $\boldsymbol{\alpha}$, $\boldsymbol{\alpha} + \sqrt{D_N(r)}\, L$, $\boldsymbol{\alpha} - \sqrt{D_N(r)}\, L$, соответственно. а) $K\,m = 0,1$. б) $K\,m = 1$.

Уравнение (35), описывающее связывание протяженных лигандов, обладает еще целым рядом интересных свойств. В частности, оно позволяет предсказать зависимость покрытия матрицы протяженными лигандами от длины лиганда. Пусть α соответствует величине покрытия матрицы лигандами: $\alpha = L\,r$. Величина α изменяется от 0 до 1. На рис. 3.4 (а) и рис. 3.4 (б) показаны зависимости покрытия матрицы лигандами α от длины лиганда, рассчитанные для значений $Km = 0,1$ и $Km = 1$, соответственно. Мы обнаруживаем весьма любопытное свойство системы — для протяженных лигандов $L > 50$ в широком интервале значений Km покрытие матрицы лигандами оказывается примерно одинаковым. При $Km = 0,1$ и $Km = 1$ можно заметить, что величина $\alpha \sim 0,65$–$0,75$ для $L = 100$. По мере роста длины лиганда «стабилизирующие» свойства системы увеличиваются.

Протяженные лиганды выступают в роли своеобразного «буфера» — при изменениях концентрации свободных лигандов в растворе на один-два порядка они позволяют поддерживать постоянный и значительный про-

цент реакционных центров, покрытых лигандом. Это свойство обусловлено существованием в системе статистической энтропии (можно даже сказать, что такая энтропия обеспечивает покрытие матрицы протяженными лигандами). Действительно, при малой длине лиганда в случае $Km < 1$ покрытие матрицы лигандами оказывается малым (для $L = 1$ величина $\alpha \sim Km$). По мере роста длины лиганда L покрытие матрицы лигандами увеличивается.

Можно ввести в рассмотрение функцию $g(\alpha)$, соответствующую распределению плотности вероятности покрытия матрицы лигандами α:

$$g(\alpha) = \frac{1}{L\sqrt{2\pi D_N(r)}} \exp\left[\frac{-(\alpha - Lr)^2}{2L^2 D_N(r)}\right]. \tag{38}$$

Представим эксперимент следующего вида: пусть в раствор, где находятся матрицы большой длины, добавляются лиганды. Если эксперимент проводится так, что измеряется покрытие матрицы лигандами $\alpha = L\,r$ по мере добавления лиганда в раствор, то можно построить зависимость α от величины Km. На рис. 3.5 (а) и на рис. 3.5 (б) показаны такие зависимости для разных значений L. Видно, что при росте длины лиганда L при малых Km такая зависимость становится все более крутой. Это означает, что при небольших изменениях концентрации лиганда в растворе величина покрытия матрицы лигандами изменяется сильно: то есть обнаруживается большая «чувствительность» нашей системы. Одновременно с ростом L увеличивается дисперсия величины $r\,L$ — то есть матрица все менее «точно» покрывается лигандами.

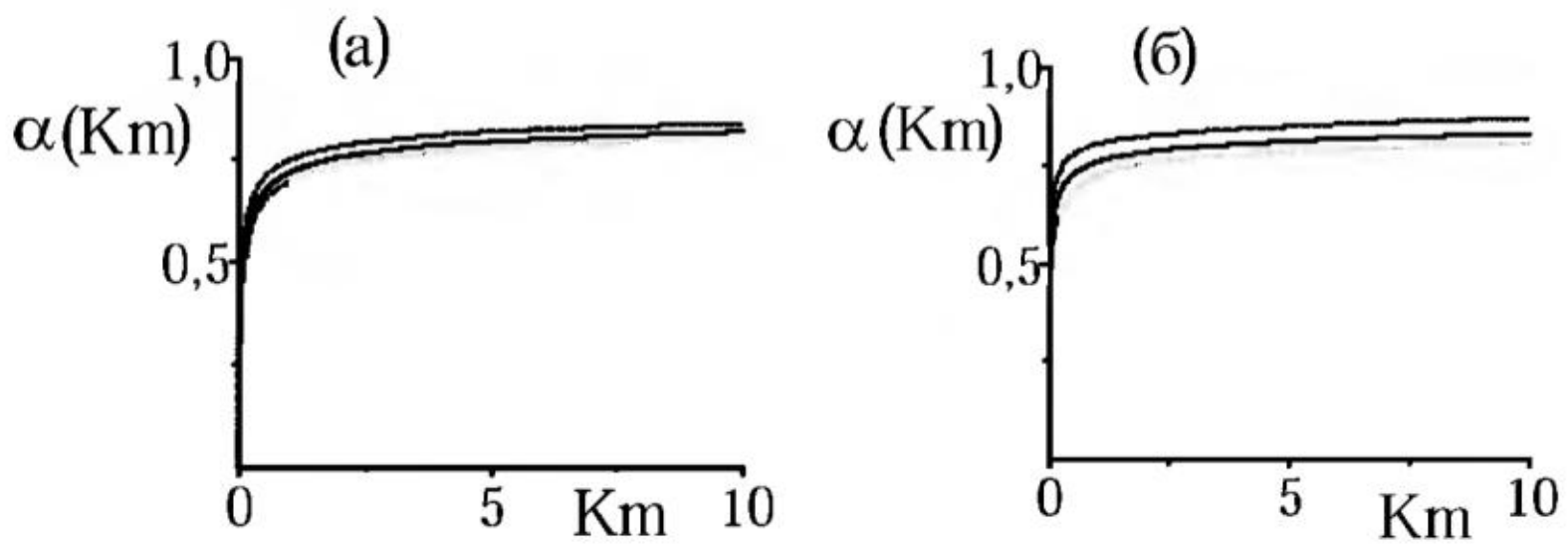

Рис. 3.5. Зависимости величины покрытия матрицы лигандом α от Km для лигандов разной длины. Зависимости рассчитаны для матрицы размером $N = 1000$. Кривые соответствуют зависимостям $\alpha(r)$, $\alpha(r) + D_N(r)^{1/2}\,L$, $\alpha(r) - D_N(r)^{1/2}\,L$. *а*) Размер связывающего места L=30; б) размер места L=100

При малых значениях концентрации свободного лиганда в растворе m, в случае $Km \ll 1/L$ связывание протяженных лигандов приводит к быст-

рому росту покрытия матрицы лигандами. В этой ситуации матрица в целом может весьма дискриминировано реагировать на небольшие изменения концентрации свободного лиганда в растворе. По мере увеличения m, ситуация быстро меняется — и протяженные лиганды способствуют поддержанию постоянного значения покрытия матрицы лигандами в большом диапазоне концентраций.

3.3. Некооперативное связывание протяженного лиганда: подход с помощью метода статистических сумм

Метод статистических сумм позволяет рассмотреть некооперативное связывание протяженного лиганда под другим углом. Каждый член большой статистической суммы Ξ_N пропорционален вероятности описываемого им состояния термодинамической системы. Обозначим эту вероятность через $\Phi(q)$:

$$\Phi(q) = \frac{Z_q (Km)^q}{\Xi_N}. \tag{39}$$

Здесь $q = 0, 1, 2 \ldots q_{\max}$.

Функция $\Phi(q)$ описывает вероятность обнаружить на рассматриваемой нами матрице q адсорбированных лигандов. С другой стороны, если рассмотреть всю совокупность матриц, находящихся в растворе, то величина $\Phi(q)$ определяет вероятность того, что на выбранной нами наугад матрице будет адсорбировано ровно q лигандов. Мы называем $\Phi(q)$ функцией распределения. Очевидно, что сумма всех вероятностей:

$$\sum_{q=0}^{q_{\max}} \Phi(q) = 1.$$

Среднее число адсорбированных лигандов:

$$\langle q \rangle = \sum_{q=0}^{q_{\max}} q\Phi(q) = \frac{\partial \ln \Xi_N}{\partial \ln (Km)}. \tag{40}$$

Дисперсия среднего числа лигандов:

$$\sigma_N{}^2 = \sum_{q=0}^{q_{\max}} \left[q - \langle q \rangle \right]^2 \Phi(q) = \frac{\partial^2 \ln \Xi_N}{\partial (\ln Km)^2}. \tag{41}$$

Рассмотрим пример стандартной ситуации, которая возникает при измерении заполнения матрицы лигандом в физико-химических экспериментах,

которые проводятся в растворе. Пусть длина матрицы ДНК соответствует $N = 100$, и лиганд при связывании закрывает половину витка ДНК ($L = 5$). Рассмотрим случай, когда матрица ДНК заполнена лигандом примерно наполовину ($r = 0{,}1$ и $\langle q \rangle = 10$). В этом случае из (36,37) можно получить значение $\sigma_N{}^2 = 3$, то есть в растворе наряду с матрицами, на которых связано 10 лигандов, достаточно часто встречаются матрицы, на которых связано на 8, 9, 11 или 12 лигандов.

Дисперсия заполнения матрицы лигандом $D_N(r)$ в этом случае равна величине $3\ 10^{-4}$, а корень из дисперсии $D_N(r)^{1/2}$ соответствует значению 0,017. Итак, можно сказать, что величина заполнения $r = 0{,}1 \pm 0{,}017$. Иными словами, существует принципиальная ошибка в измерении величины заполнения матрицы ДНК лигандом, которая связана не с неточностью приборов, а обусловлена статистическими свойствами исследуемой системы.

Представим, что эксперимент построен так, что можно измерить в растворе концентрацию матриц ДНК, на которых адсорбировано определенное число лигандов (например, посредством измерения относительного содержания разных фракций с помощью метода футпринтинга). В таком случае можно детально исследовать связывание: проверить правомочность рассматриваемой модели и восстановить стерические и энергетические параметры модели адсорбции. Однако в большинстве случаев исследователи вынуждены довольствоваться измерениями только значений заполнения матрицы лигандом, усредненных по всем фракциям с разным числом частиц. Обычно применяется приближение «бесконечного полимера» и о дисперсии связывания или флуктуациях речь не идет: значение дисперсии оказывается бесконечно малым в теории (измерение его в эксперименте не представляется возможным). Приближение «бесконечного полимера» хорошо описывает связывание лиганда в случае, когда длина матрицы в десяток и более раз превосходит длину лиганда [16]. Гораздо более сложная ситуация возникает в случае, когда адсорбированные лиганды могут взаимодействовать между собой: тогда в системе при определенных соотношениях длины полимера и параметра кооперативности наблюдается фазовый переход [6,17]. Однако описание таких систем выходит за рамки данного рассмотрения.

Заметим, что в экспериментах по измерению изотерм адсорбции концентрация матриц ДНК C_{M} примерно соответствуют значениям 10^{-7} М или 10^{13} макромолекул в миллилитре раствора, и если длина одной матрицы составляет $N = 100$ пар нуклеотидов, то при заполнении $r = 0{,}1$ число адсорбированных лигандов составляет 10^{14} в миллилитре раствора. Такая «астрономическая» величина не позволяет обнаружить флуктуации концентрации адсорбированных лигандов в растворе.

Однако в живой клетке регуляция экспрессии генов осуществляется на уровне единичных мест связывания и при наличии в растворе небольшого числа регуляторных белков. В этом случае можно связать уравнения для функции распределения $\Phi(q)$ с реальными экспериментальным данными (см. [15, 18]).

3.4. Давление решеточного газа

Обозначим через P вероятность обнаружить в последовательности из незакрытых лигандом центров и адсорбированных на матрице лигандов один центр:

$$P=\left(\frac{N-qL}{N-qL+q}\right)=\left(\frac{1-rL}{1-rL+r}\right). \tag{44}$$

Уравнение (35) можно записать в виде (см. также (2)):

$$P^{-L}-P^{-L+1}=Km. \tag{45}$$

Величина P связана с большой статистической суммой следующим соотношением:

$$p^{-N}=\Xi_N. \tag{46}$$

Рассматриваемая система адсорбированных на матрице молекул эквивалентна решеточному газу. Можно ввести в рассмотрение «давление» такого газа x (см. [19]) при помощи соотношения:

$$xN=kT\ln\Xi_N. \tag{47}$$

Из (46) в этом случае получаем:

$$x=-kT\ln P. \tag{48}$$

Таким образом, давление решеточного газа имеет размерность энергии и прямо связано с вероятностью обнаружить в последовательности из незакрытых лигандом центров и лигандов незакрытый реакционный центр. Чем ниже такая вероятность, тем выше давление одномерного решеточного газа адсорбированных лигандов. При изменении длины матрицы на единицу такой газ совершит определенную работу. Если концы рассматриваемой матрицы ограничены белками, которые прочно связаны с ДНК, то при сдвиге одного из таких белков в системе произойдет изменение свободной энергии. Белки, ограничивающие матрицу ДНК по краям, можно сравнить со стенками, а саму матрицу — с одномерным сосудом, в котором заключен газ. Иными словами, система стремится к увеличению своего объема (в одномерном случае этот объем соответствует размеру мат-

рицы). По мере добавления лигандов в раствор и увеличения $K\,m$, давление одномерного газа адсорбированных лигандов на «стенки» увеличивается. Это явление может быть использовано для регуляции генетической экспрессии, когда речь идет о включении и выключении целых хромосомных доменов, состоящих из участков ДНК, покрытых адсорбированными лигандами и ограниченных связанными молекулами белков.

Рассмотрим простейший пример: пусть матрица плотно заполнена адсорбированными лигандами первого типа, которые имеют длину $L_1 = 1$. Предположим, что они закрывают 90% размера матрицы, тогда $P_1 = 0.1$. Тогда из (35) следует $K_1\,m_1 = 10$. В этом случае из (48) получаем $x = 2.3$ kT. Если адсорбированный на краю матрицы белок (который мы будем считать лигандом 2-го типа) закрывает $L_2 = 10$ реакционных центров матрицы, то изменение энергии системы (матрица с адсорбированными лигандами 1-го типа) при его диссоциации будет равно 10 kT ln 10 = 23 kT. Для того чтобы такой белок оставался связанным с ДНК, произведение константы связывания на концентрацию свободного белка в растворе должно соответствовать соотношению $K_2\,m_2 > 10^{10}$. Даже если константа связывания такого белка равна 10^{14} M^{-1}, тогда концентрация его в растворе должна быть $m_2 > 10^{-4}$ M, что представляется малореальным. При рассматриваемой плотности заполнения матрицы адсорбированными неспецифическим образом лигандами она будет стремиться увеличить свой размер и «сбросить» лиганды, связанные по специфическому механизму.

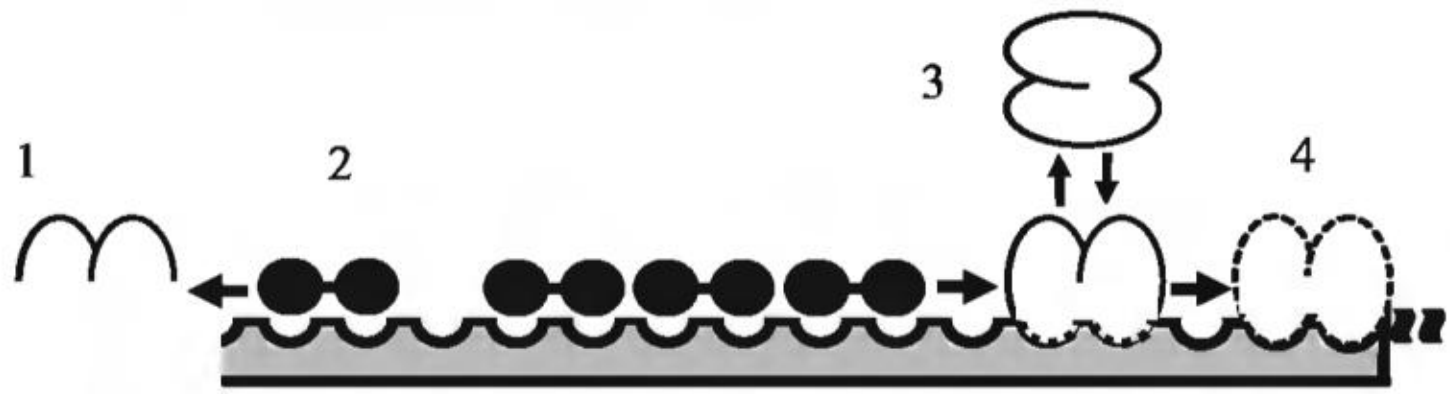

Рис. 3.6. Схема, иллюстрирующая конкурентное связывание двух типов лигандов с ДНК. Молекула белка- лиганда (1) ограничивает размеры матрицы, на которой происходит неспецифическое связывание низкомолекулярного лиганда (2). Такие лиганды оказывают давление на связанные молекулы белка и вынуждают их диссоциировать (3) или сдвигаться (4), что приводит к увеличению эффективных размеров матрицы, освобождая новые участки для связывания второго лиганда.

На Рис. 3.6 схематически показан пример регуляции такого рода. В данном случае «стенки» могут двигаться или даже исчезать, что соответствует смещению или диссоциации молекул белка, связанных с ДНК. Для того чтобы получить уравнения связывания, соответствующие данной схеме, требуется в модели адсорбции учесть возможность конкурентного

связывания на матрицах ДНК лигандов двух и более типов. Уравнения, позволяющие описывать такое связывание, получены в работах ряда авторов [5, 10, 20, 21].

Связывание лиганда является процессом вероятностным и поэтому характеризуются определенной дисперсией. Ранее мы показали, что вероятность обнаружить адсорбированный лиганд на конце матрицы возрастает, то же самое касается и дисперсии этой вероятности [2]. Заметим, что (37) задает выражение для дисперсии в случае связывания протяженного лиганда и при $N \to \infty$ дисперсия стремится к нулю. Этот результат отличается от тех оценочных соотношений для дисперсии при связывании лигандов на полимере, которые были получены недавно в работах Аракеляна и соавт. [15, 22, 23]. Дело в том, что при выводе своих соотношений эти авторы рассматривали только связывание на одном месте полимера, неточно учитывая усреднение, которое возникает при рассмотрении связывания на длинной матрице.

Соотношение (37) дает точное аналитическое выражение для дисперсии, которое легко проверить численно с помощью соотношения (29). Мы получили выражение для положения максимума зависимости $D_N(r)$, определяющее максимальную неопределенность величины заполнения при связывании лиганда с матрицей.

$$\frac{\partial D_N(r)}{\partial \ln Km} = \frac{1}{N} r(1 - Lr)(1 - (L-1)r)\left[3L(L-1)r^2 + 2(2L-1)r + 1\right] = 0. \quad (49)$$

Отсюда находим:

$$r_m = \frac{L + (L-1) - \sqrt{L(L-1)+1}}{3L(L-1)}. \quad (50)$$

Подставляя это значение r в (35), получим значение $(K\,m)_{\max}$, которое соответствует максимуму неопределенности в заполнении матрицы лигандами.

Можно показать, что зависимость значений $K\,m$, которые соответствуют максимуму дисперсии, от величины $1/\,L$ близка к линейной. Чем больше длина лиганда, тем меньше значение $K\,m$, при котором реализуется максимальное значение неопределенности в заполнении матрицы лигандами.

Выше мы показали, что протяженные лиганды могут выступать в роли своеобразного «буфера» – при изменении концентрации свободного лиганда в растворе на один-два порядка степень покрытия олигомера ДНК лигандом изменяется в относительно небольших пределах. Относительное постоянство покрытия матрицы лигандами обусловлено существованием в системе статистической энтропии. Действительно, при малой длине ли-

ганда в случае $Km < 1/L$ степень покрытия матрицы лигандами оказывается малой (для малых Km величина $\alpha \sim L\,Km$). По мере роста длины лиганда L степень покрытия матрицы лигандами быстро увеличивается — и далее уже почти не изменяется.

При значениях $Km < 1/L$ покрытие матрицы резко возрастает при небольших изменениях концентрации свободного лиганда в растворе, при возрастании концентрации свободного лиганда в растворе поддерживается постоянное значение покрытия матрицы лигандами в большом диапазоне концентраций.

В целом следует отметить, что статистические свойства рассматриваемой системы таковы, что в случае, когда размер матрицы N конечен, не может быть достигнута сколь угодно большая точность заполнения матрицы лигандом. Еще менее определенной характеристикой оказывается степень покрытия матрицы лигандами, от которой могут зависеть важные свойства комплексов ДНК с лигандами (например, способность ДНК переходить в другие состояния при связывании с лигандами, несущими заряженные группы).

Дисперсия является характеристикой функции распределения и представление о вероятности обнаружения в растворе матрицы с заданным числом адсорбированных лигандов позволяет не только более детально описать процесс связывания, но и промоделировать процессы, обусловленные взаимодействием лигандов с ДНК. Например, известно, что при достижении некоторого критического уровня покрытия ДНК лигандами, несущими заряды, происходит переход молекулы ДНК как целого в другое состояние. Если в растворе в равновесии сосуществуют матрицы ДНК с разным числом адсорбированных лигандов, то будут сосуществовать матрицы в разных состояниях. В Приложении А продемонстрировано применение модели, описывающей переход ДНК в компактное состояние при определенной степени покрытия лигандом для анализа связывания хитозана с ДНК [24, 25].

Учёт одновременного взаимодействия нескольких лигандов с ДНК может позволить подойти к моделированию процессов регуляции генетической активности. При изучении связывания лигандов только одного типа с ДНК, как мы показали выше, возникают определенные противоречия: достижение большого уровня меры точности связывания на определенном месте требует высокой концентрации свободного лиганда в растворе, а в клетке регуляция происходит при малых концентрациях лиганда. Одновременное связывание нескольких лигандов с матрицами рассмотрено в ряде работ, однако изучение конкуренции между специфическим и неспецифическим связыванием требует новых подходов: здесь мы лишь про-

иллюстрировали на одном примере, какими возможностями для регуляции специфического связывания обладает матрица, на которой происходит неспецифическое связывание (рис. 3.6).

С информационной точки зрения матрицу ДНК с адсорбированными лигандами можно рассматривать как сообщение, в котором значимую информацию несет не только среднее число связанных лигандов, но и дисперсия — мера отклонения числа лигандов от этого среднего значения. Заметим, что такой подход базируется на методах, развитых ранее, и ставших актуальными в самое последнее время, когда, с одной стороны, появился ряд работ, посвященных функциям распределения и дисперсии связывания [26, 27], а с другой, стали доступны данные как об информационной структуре генома в целом, так и о деталях связывания лигандов разной природы с матрицами нуклеиновых кислот.

Литература

1. *Hill T. L.* // Statistical Mechanics. McGraw-Hill. N. Y. 1956. Имеется перевод: Хилл Т., Статистическая механика. — М., 1960.
2. *Йованович Б., Нечипуренко Ю. Д.* Анализ распределения лигандов, адсорбированных на фрагментах ДНК // Мол. биология. 1990. Т. 24. С. 478–486.
3. *McGhee J. D. and von Hippel P. H.* Theoretical Aspects of DNA-Protein Interactions: Co-operative and Non-co-operative Binding of Large Ligands to a One-dimensional Homogeneous Lattice. // J. Mol. Biol. 1974. V. 86. P. 469–489.
4. *Нечипуренко Ю. Д., Заседателев А. С., Гурский Г. В.* // Кооперативные взаимодействия при связывании протяженных лигандов с ДНК. 1 Неконтактные кооперативные взаимодействия. // Мол. биология 1984. Т. 18. С. 798–812.
5. *Нечипуренко Ю. Д.* Кооперативные взаимодействия при связывании протяженных лигандов с ДНК. П. Контактные кооперативные взаимодействия между адсорбированными лигандами // Мол. биология. 1984. Т. 18. С. 1066–1079.
6. *Reiter J., Epstein I. R.* Bimodality in the cooperative binding of ligands to molecules with miltiple binding sites // J. Phys. Chem. 1987. V. 91. P. 4813–4820.
7. *Reiter J., Epstein I. R.* Cooperative lattice ligand binding: approximate Gaussian binding distribution. // Biophys. Chem. 1989. V. 33. P. 1–9.
8. *Заседателев А. С., Гурский Г. В. и Волькенштейн М. В.* Теория одномерной адсорбции. 1. Адсорбция малых молекул на гомополимере // Мол. биология. 1971. Т. 5. С. 245–490.
9. *Bradley D. F., Lifson S.,* in Molecular associations in biology, Pullman B., Ed., New York, N. Y., Academic.
10. *Latt S. A., Sober L. H.* Protein-nucleic acid interactions. Oligopeptide- polyribonucleotide binding studies // Biochemistry. 1967. V. 6. P. 3293–3306.
11. *Crothers D.* Calculation of binding isotherms for heterogeneous polymers // Biopolymers. 1968. V. 6. P. 575–584.

12. *Нечипуренко Ю. Д.* Термодинамические параметры, характеризующие взаимодействия между молекулами лиганда, адсорбированными на полимере // Биофизика. 1982. Т. 27. С. 391–398.
13. *Бабаян Ю., Аракелян В., Потикян Г., Казарян А.* // Биофизика. 2001. Т. 46. С. 1003–1005.
14. *Elowitz M. B., Levine A. J., Siggia E. D., Swain P. S.* // Science. 2002. V. 297, P. 16.
15. *Нечипуренко Ю. Д., Вольф А. М., Гурский Г. В.* Статистические флуктуации в процессах регуляции генов: рассмотрение с точки зрения статистической механики // Биофизика. 2003. Т. 48. С. 986–997.
16. *Epstein I. R.* Cooperative and Non-Cooperative Binding of Large Ligands to a Finite One-dimensional Lattice. A Model for Ligand-Oligonucleotide Interactions. // Biophys. Chemistry. 1978. V. 8. P. 327–339.
17. *Lando D., Teif V.* // J. Biomol. Struct. Dynamics. 2002. V. 20, P. 215–222.
18. *Головкин М. В., Нечипуренко Ю. Д., Гурский Г. В.* Статистические флуктуации в уровне заполнения репрессором оператора определяют величину экспрессии репортерного гена // Биофизика. 2009, т. 54, С. 581–588.
19. *Нечипуренко Ю. Д., Гурский Г. В.* Термодинамические модели связывания лигандов с ДНК. // Биофизика. 2003. Т. 48. С. 773–796.
20. *Hill T. L.* Some statistical problems concerning linear macromolecules. // J. Polymer Sci. 1957. V. 23. P. 549–562.
21. *Schwarz G., Stankovsky S.* Linear cooperative binding of large ligands involving mutual exclusion of different binding modes. // Biophys. Chemistry. 1979. V. 10. P. 173–181.
22. *Arakelyan V. B., Babayan Yu., Potikyan G.* Determination of constant rates of adsorption of ligand on DNA: Analysis of correlation functions // J. of Biomol. Struct. Dyn. 2000. V. 18. P. 231–235.
23. *Arakelyan V. B., Haroutiunianyan S. G., Arakelyan H. V., Haroutiunianyan T. S.* Adsorption of Ligands on macromolecules in the fluctuating medium // J. of Biomol. Struct. Dyn. 2002. V. 20. P. 135–139.
24. *Нечипуренко Ю. Д., Вольф А. М., Евдокимов Ю. М.* Функция распределения, описывающая связывание протяженных лигандов с молекулами ДНК. Возможное применение для случая конденсации ДНК // Биофизика. 2003. Т. 48, С. 635–643.
25. *Нечипуренко Ю. Д., Вольф А. М., Салянов В. И., Евдокимов Ю. М.* Равновесная адсорбция лигандов на молекулах ДНК (на примере хитозана). // ЖЭТФ. 2004. Т. 125. С. 103–111.
26. *Poland D.* Ligand binding distributions in nucleic acids // Biopolymers. 2001. V. 58. P. 477–490.
27. *Poland D.* Ligand binding distributions in biopolymers // J. Chem. Phys. 2000. V. 113. P. 4774–4784.

Глава 4
КООПЕРАТИВНОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ. АСИМПТОТИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА ИЗОТЕРМ АДСОРБЦИИ

4.1. Асимптотический метод анализа изотерм адсорбции

Рассмотрим связывание протяженного лиганда на матрице в рамках модели, описанной выше (см. раздел 2.1). Если на матрице длиной N реакционных центров адсорбировано q молекул лиганда и эти лиганды не могут «свешиваться» с концов матрицы, то матрицу с адсорбированными лигандами можно представить как последовательность из элементов двух типов: свободных центров и связывающих мест, покрытых лигандами. Зададимся вопросом: сколько раз в этой последовательности будет встречаться участок из L свободных реакционных центров, расположенных подряд? Иными словами, сколько будет в такой последовательности свободных связывающих мест, на которых может адсорбироваться лиганд из раствора? Вероятность встретить в последовательности из q занятых связывающих мест и $N-qL$ свободных центров один свободный центр равна:

$$P=\left(\frac{N-qL}{N-qL+q}\right). \tag{51}$$

В случае, когда общее число элементов двух типов в последовательности — свободных центров и покрытых лигандом связывающих мест — равно $N-qL+q$, число связывающих мест, не покрытых адсорбированными лигандами (потенциальных мест для связывания), можно определить следующим образом. Представим, что последовательность свободных центров и покрытых мест связывания является результатом проведения испытаний по схеме Бернулли с двумя исходами. Тогда число свободных связывающих мест длиной L определяется двумя сомножителями, из которых первый соответствует вероятности обнаружить в серии из L испытаний свободные центры, расположенные подряд (эти L центров служат потенциальным местом связывания лиганда), а второй задает объем выборочно-

го пространства, то есть общее число испытаний:

$$P^L(N - q\,L + q).$$

При $N \gg L$ связывание протяженного лиганда описывается уравнением (35), которое можно записать в виде условия химического равновесия:

$$r = Kmn(r). \tag{52}$$

В этом случае величина P, задаваемая уравнением (51), преобразуется к виду:

$$P = \frac{1 - rL}{1 - rL + r}. \tag{53}$$

Здесь $r = q / N$.

Число свободных связывающих мест в расчете на один реакционный центр матрицы равно:

$$n(r) = \left(\frac{1 - rL}{1 - rL + r}\right)^L (1 - rL + r). \tag{54}$$

Рассматривая асимптотику уравнения (52) с учетом (54), обнаруживаем, что величина r/m, соответствующая ординате кривой связывания в представлении Скетчарда, при $r \to 1/L$ стремится к нулю, как $(1 - r\,L)^L$:

$$r / m \sim (1 - rL)^L. \tag{55}$$

Ниже мы покажем, что это свойство изотерм адсорбции в представлении Скетчарда определяется базовыми свойствами модели адсорбции, которая описывает связывание протяженного лиганда и является общим для широкого класса моделей, в том числе и для моделей, которые учитывают кооперативные взаимодействия между адсорбированными лигандами.

В более или менее широкой области заполнений $r \sim r_{\max} = 1 / L$ изотерма адсорбции, соответствующая кооперативному связыванию лиганда, будет подобна изотерме, соответствующей некооперативному связыванию лиганда той же длины L. Коэффициент этого подобия и размер области, где такое подобие сохраняется, несут информацию о кооперативных взаимодействиях между адсорбированными лигандами.

Рассмотрим изотерму адсорбции в представлении Скетчарда в случае, когда между адсорбированными лигандами существуют кооперативные взаимодействия. В общем виде такая изотерма представляет собой зависимость $r / m = y(r)$. Константу связывания лиганда с изолированным связы-

вающим местом на полимере K и размер лиганда L можно определить по пересечению такой кривой с осью ординат и по максимально возможному заполнению $r_{\max} = 1/L$, соответственно (см., например, [1, 2]). При помощи (52) и (54) в этом случае можно рассчитать изотерму, соответствующую некооперативному связыванию лиганда, которое характеризуется теми же параметрами (K, L). Эту изотерму мы будем называть опорной (представление об опорной изотерме было введено нами в [3]).

Коэффициент подобия между анализируемой нами кривой $r/m = y(r)$ и соответствующей ей опорной изотермой определяется с помощью соотношения:

$$Q(r) = \frac{y(r)}{Kn(r)} = \frac{y(r)}{K}\frac{(1 - rL + r)^{L-1}}{(1 - rL)^{L}}. \tag{56}$$

Для анализа изотерм адсорбции можно использовать логарифмическое представление:

$$H(r) = \ln Q(r) = \ln \frac{y(r)}{Kn(r)} = \ln\frac{y(r)}{K}\frac{(1 - rL + r)^{L-1}}{(1 - rL)^{L}}. \tag{57}$$

Можно преобразовать (56) к виду:

$$y(r) = \frac{r}{m} = K_{\text{eff}}\frac{(1 - rL)^{L}}{(1 - rL + r)^{L-1}}. \tag{58}$$

Здесь $K_{\text{eff}} = KQ(r_{\max})$ — «эффективная» константа связывания. Уравнение (58) имеет следующий смысл: в области заполнений $r \sim r_{\max} = 1/L$ связывание протяженного лиганда в случае, когда между адсорбированными лигандами существуют кооперативные взаимодействия, происходит так же, как некооперативное связывание лиганда с некоторой эффективной константой $K_{\text{eff}} = KQ(r_{\max})$

4.2. Неконтактные взаимодействия между адсорбированными лигандами

Существование неконтактных кооперативных взаимодействий между адсорбированными лигандами было обнаружено довольно давно (см., например, [4–6]). Такие взаимодействия могут возникать, в частности, в случае, когда ДНК образует различные третичные структуры, так, что удаленные в линейной последовательности адсорбированные молекулы лиганда оказываются пространственно сближенными. На некоторые расстояния вдоль матрицы могут распространяться взаимодействия, обусловленные

искажениями конформации ДНК в месте связывания лиганда, локальными изменениями сольватации ДНК и т. п. Все взаимодействия такого рода мы будем называть неконтактными взаимодействиями, в отличие от контактных взаимодействий, которые возникают только в том случае, когда концы двух ближайших соседних лигандов занимают два последовательных реакционных центра матрицы.

Система уравнений адсорбции в случае, когда между адсорбированными лигандами существуют неконтактные взаимодействия, была получена впервые Заседателевым и соавт. [1]. Здесь мы построим решение этой системы и покажем, как можно рассчитывать и анализировать изотермы адсорбции, соответствующие неконтактным взаимодействиям.

4.2.а Характер расположения лигандов на матрице

Заполнение матрицы лигандом r является интегральной характеристикой адсорбции. Для того чтобы более детально описать расположение лигандов, рассмотрим величину $\gamma(i)$ — число пар лигандов, адсорбированных на расстоянии i свободных центров матрицы друг от друга. Величины $\gamma(i)$ нормированы на один реакционный центр матрицы.

Определенному расположению лигандов на полимере будет соответствовать определенная зависимость $\gamma(i)$. Зависимость такого типа была введена для одномерных систем в работе Клейна и Пригожина [7], в применении к задачам адсорбции значения $\gamma(i)$ рассматривались в работе Заседателева и соавт. [1]. Зависимость $\gamma(i)$ является важной характеристикой адсорбции, позволяющей установить связь между формой изотермы адсорбции и характером расположения лигандов на матрице.

Числа пар ближайших соседних лигандов, адсорбированных на полимере, равно числу лигандов $(q \gg 1)$:

$$\sum_{i=0}^{\infty} \gamma(i) = r. \tag{59}$$

Суммарная длина всех расстояний между парами адсорбированных лигандов равна числу свободных центров матрицы (в приближении бесконечного полимера свободными центрами, расположенными на концах матрицы, можно пренебречь):

$$\sum_{i=0}^{\infty} i\gamma(i) = 1 - rL. \tag{60}$$

Для некооперативного связывания протяженных лигандов $\gamma(i)$ легко найти: вероятность встретить подряд i свободных центров матрицы равна P^i. Вероятность встретить i свободных центров между двумя адсорби-

рованными лигандами равна:

$$P^i \left(\frac{r}{1-rL+r}\right)^2,$$

отсюда:

$$\gamma(i) = P^i\left(\frac{r}{1-rL\ +r}\right)^2 (1-rL+r). \tag{61}$$

Введем обозначение:

$$\gamma = \gamma(0) = P^i\left(\frac{r^2}{1-rL+r}\right), \tag{62}$$

Тогда

$$\gamma(i) = \gamma P^i. \tag{63}$$

При любых значениях заполнения r эта зависимость в случае некооперативного связывания монотонно убывает.

Пусть между адсорбированными лигандами существуют кооперативные взаимодействия. Обозначим через $\Delta f(i)$ свободную энергию взаимодействия между двумя адсорбированными молекулами лиганда, ближние концы которых разделяют i свободных центров матрицы. Если все $\Delta f(i)$ равны нулю, то характер расположения лигандов на матрице определяется соотношением (63). Запишем это соотношение в виде:

$$\frac{\gamma(i)}{\gamma(i+1)} = P. \tag{64}$$

Если энергия взаимодействия между лигандами, адсорбированными на расстоянии i центров, $\Delta f(i)$ отличается от $\Delta f(i+1)$, то в распределении пар лигандов по расстояниям (74) появится больцмановский фактор [1, 3]:

$$\frac{\gamma(i)}{\gamma(i+1)} = P\, e^{(\Delta f(i+1)-\Delta f(i))/RT}. \tag{65}$$

Отсюда

$$\ln\gamma(i) = \ln\gamma(0) + f(0)\,/\,RT - \Delta f(i)\,/\,RT + i\ln P. \tag{66}$$

Отклонение зависимости $\ln\gamma(i)$ от линейного хода повторяет форму потенциала $\Delta f(i)$ (см. рис. 4.1).

Заметим, что величина P в соотношениях (64)–(66) не соответствует (53). Когда между адсорбированными лигандами существуют кооперативные взаимодействия, все различные расположения лигандов на матрице

уже не будут равновероятны и, чтобы найти выражение для P, и получить уравнения адсорбции, необходимо немного изменить математическую модель, находящуюся в основании нашего подхода.

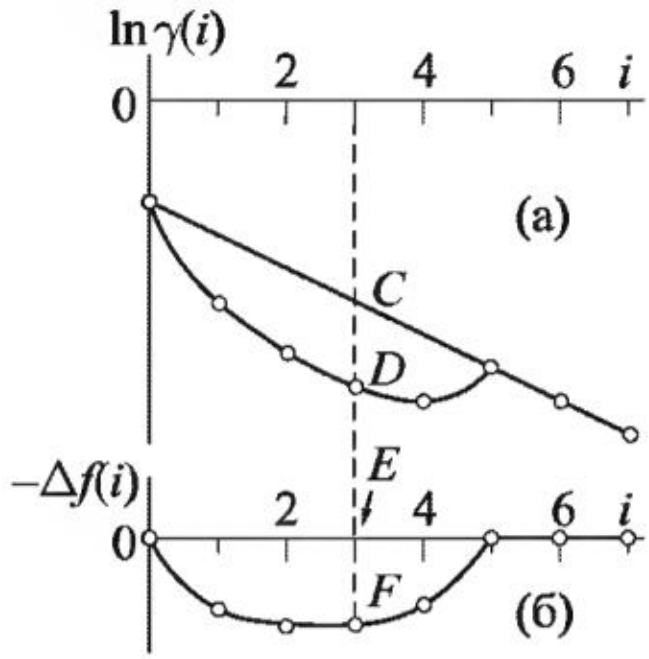

Рис. 4.1. Связь между числом пар ближайших соседних лигандов на матрице и потенциалом взаимодействий между лигандами. *а*) Зависимость логарифма числа пар ближайших соседних лигандов от расстояния i между ними. Отклонение зависимости $\ln \gamma(i)$ от линейного хода в области $i < 5$ обусловлено кооперативными взаимодействиями между адсорбированными лигандами. *б*) Потенциал кооперативных взаимодействий между адсорбированными лигандами $\Delta f(i)$, соответствующий зависимости $\ln \gamma(i)$, показанной на рис. 24 *а*. Значение потенциала $\Delta f(3) = EF = CD$ (в единицах RT), где CD — величина отклонения зависимости $\ln \gamma(i)$ от линейного хода при $i = 3$

4.2.б Уравнения адсорбции

Представим матрицу с адсорбированными лигандами как последовательность из элементов двух типов: свободных центров матрицы и групп лигандов. В группу может входить один или большее число лигандов так, что все ближайшие соседние лиганды в группе взаимодействуют между собой. Число таких групп равно (напомним, что мы используем величины, нормированные на один центр матрицы):

$$r - \sum_{i=0}^{l} \gamma(i).$$

Число центров матрицы, не накрытых лигандами и не расположенных между парами взаимодействующих лигандов, равно:

$$1 - rL - \sum_{i=0}^{l} i\gamma(i).$$

Каждой группе предшествует участок из $l + 1$ центров матрицы, не взаимодействующих с лигандами. Эти $l + 1$ центров «закреплены» за груп-

пой, и их не следует учитывать при подсчете свободных центров матрицы. Число свободных центров матрицы равно:

$$1 - rL - \sum_{i=0}^{l} i\gamma(i) - (l+1)\left(r - \sum_{i=0}^{l}\gamma(i)\right).$$

Все различные расположения на матрице групп лигандов и свободных центров, определенных таким образом, равновероятны.

Вероятность встретить в последовательности из свободных центров матрицы и групп лигандов свободный центр (по аналогии с (53) равна:

$$P = \frac{1 - rL - \sum_{i=0}^{l} i\gamma(i) - (l+1)\left(r - \sum_{i=0}^{l}\gamma(i)\right)}{1 - rL - \sum_{i=0}^{l} i\gamma(i) - l\left(r - \sum_{i=0}^{l}\gamma(i)\right)}. \qquad (67)$$

Рассмотрим условие химического равновесия для адсорбции лиганда на изолированном связывающем месте (на таком месте лиганд адсорбируется некооперативно: расстояния до ближайших соседних лигандов больше l). Для того чтобы лиганд адсорбировался некооперативно, необходим участок в $l + 1 + L$ свободных центров матрицы: L центров матрицы занимает и $l + 1$ центров должны ему предшествовать (иначе лиганд вступит во взаимодействие с адсорбированным слева соседом).

Число мест для некооперативного связывания лиганда на матрице равно (по аналогии с (54)):

$$P^{L+l+1}\left(1 - rL - \sum_{i=0}^{l} i\gamma(i) - l\left(r - \sum_{i=0}^{l}\gamma(i)\right)\right). \qquad (68)$$

Число адсорбированных лигандов, не взаимодействующих со своими соседями, подсчитаем следующим образом: вероятность того, что выбранный наугад адсорбированный лиганд не взаимодействует с ближайшим соседом с одной стороны, равна:

$$\frac{r - \sum_{i=0}^{l}\gamma(i)}{r}.$$

Число лигандов, не взаимодействующих со своими ближайшими соседями с обеих сторон, равно:

$$r\left(\frac{r - \sum_{i=0}^{l}\gamma(i)}{r}\right)^2. \qquad (69)$$

С учетом (68) и (69) условие химического равновесия для некооперативного связывания лиганда можно записать в виде:

$$\left(\frac{r-\sum_{i=0}^{l}\gamma(i)}{r}\right)^2\frac{r}{m}=KP^{L+l+1}\left(1-rL-\sum_{i=0}^{l}i\gamma(i)-l\left(r-\sum_{i=0}^{l}\gamma(i)\right)\right). \qquad (70)$$

Обозначим через $\omega(i)$ параметр кооперативных взаимодействий, соответствующий энергии $\Delta f(i)$:

$$\omega(i)=e^{-\Delta f(i))/RT}. \qquad (71)$$

из (65) получаем:

$$\gamma(i)=\frac{\gamma(0)}{\omega(0)}\omega(i)P^i. \qquad (72)$$

Рассмотрим совокупность значений $\{\gamma(i)\}$ при $i \le l$ как набор независимых переменных. Тогда (70), (72) с учетом (67) представляют собой систему из $l+2$ уравнений для $l+2$ неизвестных $\{\gamma(i)\}$, r. Эта система совпадает с уравнениями, полученными ранее в работе Заседателева и соавт. [1], и до настоящего момента мы в целом следовали подходу, развитому в этой работе. Однако Заседателевым и соавторами не было показано, как можно решить эту систему в общем случае, здесь мы построим такое решение.

Введем обозначения $\gamma=\gamma(0)$, $\omega=\omega(0)$. Из (72) и (59), (60) получаем:

$$\begin{cases}\left(r-\sum_{i=0}^{l}\gamma(i)\right)=\dfrac{\gamma}{\omega}\dfrac{P^{l+1}}{1-P},\\ 1-rL-\sum_{i=0}^{l}i\gamma(i)=\dfrac{\gamma}{\omega}P^{l+1}\left(\dfrac{l+1}{1-P}+\dfrac{P}{(1-P)^2}\right).\end{cases} \qquad (73)$$

Подставив (73) в (70), находим

$$\frac{r}{m}=KP^L\frac{\omega}{\gamma}r^2. \qquad (74)$$

Используя (59), (60) можно получить уравнения для γ, r:

$$\frac{\gamma}{\omega}=\left\{L\left(\sum_{i=0}^{l}\omega(i)P^i+\frac{P^{l+1}}{1-P}\right)+\sum_{i=0}^{l}i\omega(i)P^i+P^{l+1}\left(\frac{l+1}{1-P}+\frac{P}{(1-P)^2}\right)\right\}^{-1}, \qquad (75)$$

Уравнения (74)–(76) позволяют рассчитывать изотермы адсорбции для потенциала $\Delta f(i)$ любого вида; с помощью (71) вычисляется набор $\omega(i)$. Задавая значения параметра P ($0 < P < 1$) из (75) можно определить γ/ω, а затем, используя (74), (76), найти соответствующие значения r, r/m. Заметим, что наше параметрическое решение уравнений адсорбции (74)–(76) используют Ландо и соавторы в работе [19].

$$r = \frac{\gamma}{\omega}\left\{\sum_{i=0}^{l}\omega(i)P^i + \frac{P^{l+1}}{1-P}\right\}. \tag{76}$$

4.2.в Анализ изотерм адсорбции

Данные о кооперативных взаимодействиях между адсорбированными лигандами можно получить, рассматривая поведение изотермы при малых заполнениях матрицы лигандом [1]. Из (74)–(76) находим:

$$\frac{d(r/Km)}{dr} \to (2L-1) - 2\sum_{i=0}^{l}(\omega(i)-1). \tag{77}$$

В случае $l > 0$ с помощью одного соотношения (77) нельзя восстановить параметры потенциала $\Delta f(i)$, применяя асимптотический метод анализа к изотерме (74), (76) получаем:

$$H(r_{\max}) = -(L+1)\Delta f(0)/RT + L\Delta f(1)/RT. \tag{78}$$

Физический смысл соотношения (78) можно понять, рассматривая характер расположения лигандов на матрице при больших заполнениях. В области заполнений $r_{\max} = 1/L$ при связывании одного лиганда образуется $L + 1$ новый контакт между адсорбированными лигандами, а число пар лигандов, разделенных одним звеном полимера, уменьшится на L.

Используя (54), для случая $r \to 0$, соотношение (77) можно преобразовать к виду:

$$\frac{dH(r)}{dr} = 2\sum_{i=0}^{l}(\omega(i)-1) \quad (r \to 0). \tag{79}$$

Из (74)–(76) находим:

$$\frac{\mathrm{d}H(r)}{\mathrm{d}r} = -2L^3\frac{\omega(0)}{\omega(1)}\left(\frac{\omega(1)}{\omega(0)} - \frac{\omega(2)}{\omega(1)}\right) \quad (r \to 1/L). \tag{80}$$

Величина $H(r)$ при $r \to r_{\max}$ возрастает, если потенциал $\Delta f(i)$ таков, что изменение энергии взаимодействия при сближении адсорбированных лиган-

дов на один центр матрицы больше для лигандов, разделенных одним центром матрицы, чем для лигандов, разделенных двумя центрами матрицы.

Строго говоря, в случае, если при $r \to r_{max}$ величина $dH(r)/dr \neq 0$, анализируемая изотерма не содержит сколько-нибудь протяженного участка, подобного в геометрическом смысле опорной изотерме. Имеет место сходство в асимптотическом поведении обеих изотерм: отношение ординат этих изотерм при $r \to r_{max}$ изменяется незначительно, в то время как величина $(1 - r\ L)^L$, характеризующая значение ординаты каждой из изотерм в отдельности, изменяется во много раз. Мы говорим о подобии изотерм для того, чтобы сделать более наглядным геометрически сходство в асимптотическом поведении различных изотерм.

Соотношения (78)–(80) позволяют определить значения $\Delta f(0)$, $\Delta f(1)$ и $\Delta f(2)$ в случае $l = 2$. Если длина потенциала $l > 2$, то этих соотношений недостаточно для определения параметров потенциала $\Delta f(i)$. Для того чтобы получить данные о взаимодействии между адсорбированными лигандами в этом случае, необходимо сделать некоторые предположения о виде потенциала. Предположения такого рода могут основываться на определенных представлениях о механизме кооперативных взаимодействий между адсорбированными лигандами.

При связывании ряда антибиотиков на ДНК в ряде работ [8–10] отмечалось наличие у изотерм адсорбции в представлении Скетчарда протяженного участка, подобного кривой, соответствующей некооперативному связыванию (опорной изотерме). Существование такого участка связывают с аллостерическим эффектом ДНК — способностью молекулы ДНК при взаимодействии с лигандом изменять свою конформацию на протяженных участках, примыкающих к месту связывания молекулы лиганда [4–6]. Такое свойство изотерм накладывает ограничения на класс потенциалов $\Delta f(i)$, с помощью которых можно описать кооперативные взаимодействия между лигандами, обусловленные аллостерическим эффектом ДНК. Для того чтобы существовал протяженный участок изотермы, подобный опорной кривой, необходимо выполнение условия $dH(r)/dr = 0$.

Из (80) получаем в этом случае $\omega(0)/\ \omega\ (1) = \omega\ (1)/\ \omega\ (2)$. Отсюда следует, что $\Delta f(i)$ линейно зависит от расстояния и в области малых i. Чем больше расстояние, на которое распространяется такая зависимость, тем больше область заполнений, для которых наблюдается подобие между изотермой, соответствующей потенциалу $\Delta f(i)$, и опорной кривой. Представим потенциал, соответствующий такой зависимости, в общем виде:

$$\Delta f(i) = \begin{cases} \Delta f + (l + 1 - i)h, & i \leq l, \\ 0, & i > l. \end{cases} \tag{81}$$

Можно выделить два простых частных случая такого потенциала:

1. $\Delta f = 0$ (линейно затухающий потенциал);

2. $h = 0$ (потенциал с прямоугольной ямой).

На рис. 4.2 показаны изотермы адсорбции, соответствующие этим двум случаям. Различие таких изотерм легко проследить при помощи представления $H(r)$. В случае потенциала с прямоугольной ямой, зависимость $H(r)$ в области заполнений $r \sim 1/(l + L)$ имеет максимум, а для линейно затухающего потенциала такой максимум отсутствует: зависимость $H(r)$ монотонно возрастает от 0 до $H(r_{max})$.

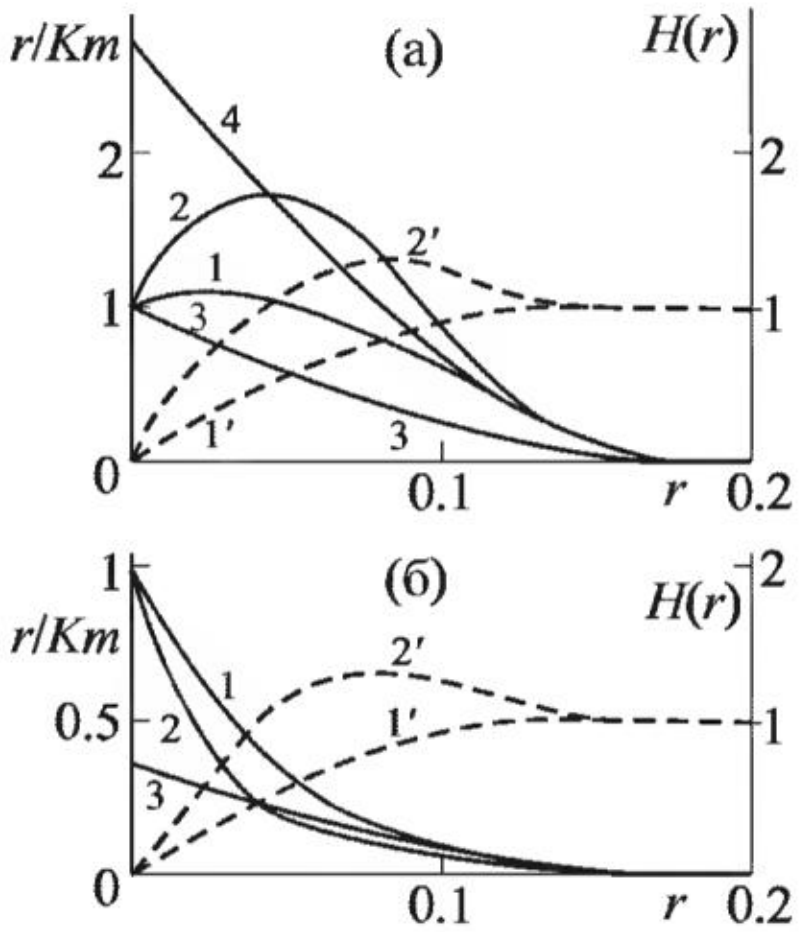

Рис. 4.2. Изотермы адсорбции, соответствующие неконтактным кооперативным взаимодействиям. Изотермы рассчитаны при помощи (74)–(76), длина потенциала $l = 14$. Длина лиганда $L = 5$. а) Положительные кооперативные взаимодействия. 1 соответствует линейно затухающему потенциалу: $\Delta f = 0$, $h = -0{,}05$ RT, 2 — потенциалу с прямоугольной ямой: $h = 0$, $\Delta f = -1$ RT. Кривые 3, 4 рассчитаны для некооперативного связывания лиганда с константами $K' = K$ и $K' = e\,K = 2{,}7\,K$, соответственно. Кривые 1', 2' соответствуют 1, 2 в представлении $H(r)$. б) Отрицательные кооперативные взаимодействия. 1 соответствует линейно затухающему потенциалу: $\Delta f = 0$, $h = 0{,}05$ RT, 2 — потенциалу с прямоугольной ямой: $h = 0$, $\Delta f = 1$ RT. Кривая 3 рассчитана для некооперативного связывания лиганда с константой $K' = K/e$. Кривые 1', 2' соответствуют 1, 2 в представлении $H(r)$

Асимптотический анализ позволяет определить параметры таких потенциалов. В случае линейно затухающего потенциала из (78), (79) полу-

чаем:

$$\begin{cases} H(r_{\max}) = -(l + L + 1)\ h / RT\ , \\ \dfrac{dH(r)}{dr} = 2\left\{\dfrac{\exp\left[-(l+1)\,h / RT - 1\right]}{1 - \exp(h / RT)} - (l+1)\right\} \quad (r \to r_{\max}). \end{cases} \tag{82}$$

В случае потенциала с прямоугольной ямой:

$$\begin{cases} H(r_{\max}) \ = -\Delta f\ / RT, \\ \dfrac{dH(r)}{dr} = 2(l+1)[\exp(-\Delta f / RT) - 1] \quad (r \to r_{\max}). \end{cases} \tag{83}$$

При помощи представления $H(r)$ можно определить форму потенциала (81) и найти его параметры.

Для иллюстрации характерных особенностей изотерм адсорбции, соответствующих неконтактным кооперативным взаимодействиям, остановимся более подробно на рассмотрении потенциала с прямоугольной ямой.

4.2.г Потенциал с прямоугольной ямой

Ранее была предложена следующая модель, описывающая аллостерический эффект ДНК [4, 10, 11]. Пусть взаимодействие молекулы лиганда со связывающим метом на матрице, удаленным от других адсорбированных лигандов, характеризуется константой K. В процессе связывания молекула лиганда переводит в возмущенное состояние участок матрицы, простирающийся на l пар оснований в обе стороны от места связывания лиганда. Связывание последующих лигандов на участке, находящемся в возмущенном состоянии, проходит с измененной константой $K' = K\omega$. Это приводит к возникновению кооперативных взаимодействий между адсорбированными лигандами (см. рис. 1.8). Такие взаимодействия можно описать при помощи потенциала с прямоугольной ямой:

$$\Delta f(i) = \begin{cases} \Delta f = -RT \ln K' / K = -RT \ln w,\ i \le l, \\ 0, i > l. \end{cases} \tag{84}$$

где ω — параметр кооперативных взаимодействий.

Рассмотрим систему уравнений (74)–(76) в случае, когда кооперативные взаимодействия между лигандами описываются потенциалом (84). Из (72) находим:

$$\gamma(i) \ = \begin{cases} p^i \gamma,\ i \le l \\ p^i \gamma / w,\ i > l. \end{cases}$$

Из (74)–(76) получаем:

$$\begin{cases} r = \gamma + \left(1 - \dfrac{1-\omega}{\omega} P^{l+1}\right) \dfrac{1}{(1-P)}, \\ \gamma = \dfrac{(1-P)^2}{L(1-P)\left(1 + \dfrac{1-\omega}{\omega} P^{l+1}\right) + P\left[1 + \dfrac{1-\omega}{\omega}(1 + l(1-P))\right]}, \\ \dfrac{r}{Km} = \gamma\omega P^L \left(1 - \dfrac{1-\omega}{\omega} P^{l+1}\right)^2 \dfrac{1}{(1-P)^2}. \end{cases} \tag{85}$$

Уравнения (85) позволяют легко рассчитать изотерму адсорбции: задавая различные p ($0 < p < 1$) можно найти соответствующие значения r и r/m. Рассчитанные изотермы показаны на рис. 4.3. При $r \to r_{max}$ каждая из изотерм совпадает с кривой, соответствующей некооперативному связыванию лиганда с константой связывания $K\omega$. Форму таких изотерм можно объяснить следующим образом.

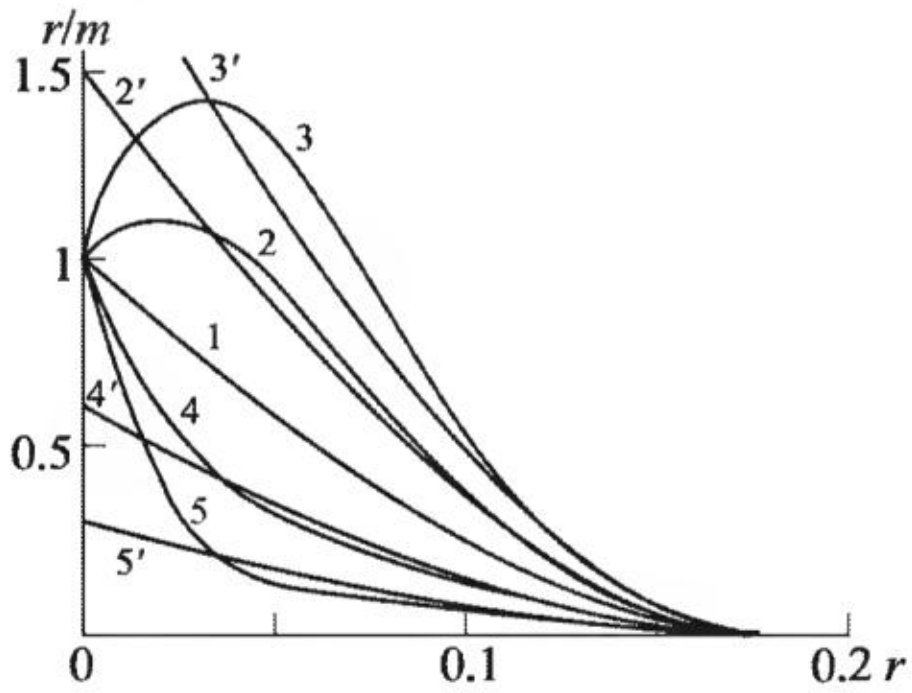

Рис. 4.3. Изотермы адсорбции, соответствующие потенциалу с прямоугольной ямой. Длина лиганда $L = 5$, константа связывания $K = 1$. **1** — изотерма, соответствующая некооперативному связыванию; **2–5** рассчитаны с помощью (85) в случае, когда потенциал (84) имеет длину $l = 20$, а параметр кооперативности ω варьируется: **2** — $\omega = 1{,}5$; **3** — $\omega = 2$; **4** — $\omega = 0{,}6$; **5** — $\omega = 0{,}3$. Каждая кривая близка к соответствующей изотерме, рассчитанной для некооперативного связывания лиганда с константой $K' = K\omega$ (**2′–5′**).

При связывании лиганда на матрице, на которой есть адсорбированные лиганды, новый лиганд может вступить во взаимодействие со своим соседом справа или слева или одновременно с двумя соседями, адсорбиро-

ванными с двух сторон. При ненулевом заполнении матрицы лигандом связывание последующих молекул лиганда может происходить с константами K, $K\omega$ или $K\omega^2$ — если при связывании лиганда образуются соответственно ноль, одна или две новых пары взаимодействующих лигандов. Ранее нами были получены соотношения, позволяющие рассчитать как число мест связывания, на которых происходит связывание с разными константами, так и степень заполнения матрицы комплексами, которые связаны с константами K, $K\omega$ или $K\omega^2$ [11].

При рассмотрении связывания лигандов, вызывающих аллостерический эффект ДНК, удобной может оказаться еще одна характеристика: доля участков ДНК, находящихся в возмущенном состоянии β. Из (64) получаем:

$$\beta = \sum_{i=1}^{l} i\gamma(i) = \frac{\gamma}{\omega}\sum_{i=1}^{l} i\omega\,(i)\,P^i. \tag{87}$$

На Рис. 4.4 показана зависимость β от заполнения матрицы лигандами r.

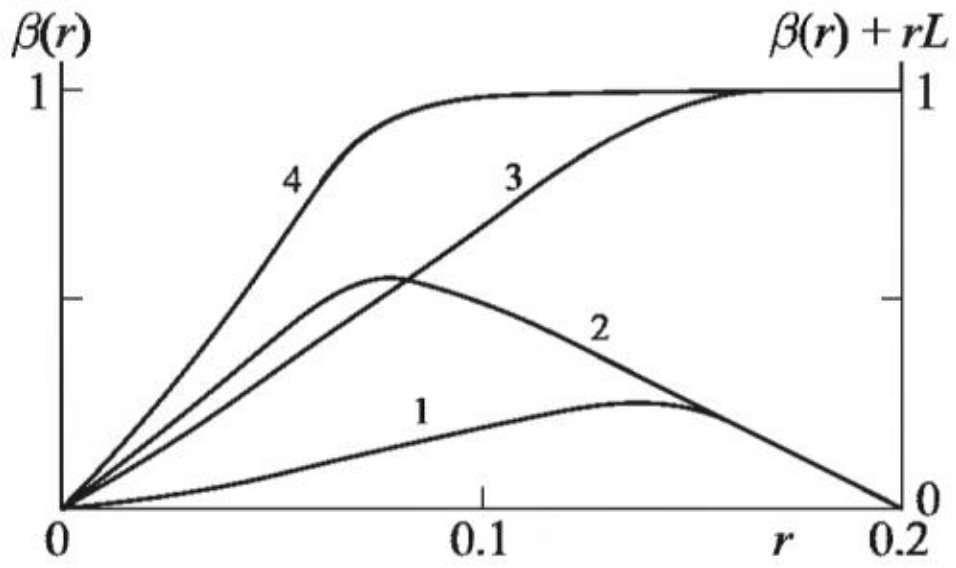

Рис. 4.4. Зависимость числа свободных звеньев матрицы, находящихся в возмущённом состоянии β, от величины заполнения матрицы лигандом r. Зависимость $\beta(r)$ соответствует потенциалу с прямоугольной ямой (84), описывающему аллостерический эффект ДНК. Длина лиганда $L = 5$, параметр кооперативных взаимодействий $\omega = 10$. Варьируется длина потенциала l: 1 — $l = 5$, 2 — $l = 20$; 3 и 4 — зависимости $\beta(r) + r\,L$, рассчитанные при тех же значениях l, что и кривые 1 и 2, соответственно.

Полученные здесь соотношения позволяют рассчитывать изотермы адсорбции для потенциалов любых форм аналитически, что упрощает анализ экспериментальных кривых связывания.

В совместных работах с Гурским, Заседателевым и Крыловым при помощи развитых выше методов нами были проанализированы семейства экспериментальных кривых, характеризующих связывание дистамицина А и его аналогов с ДНК. Рассматривались аналоги различной длины, несу-

щие флуоресцентную метку. На Рис. 4.5 в качестве примера показана экспериментальная изотерма адсорбции аналога дистамицина А, закрывающего при связывании семь пар нуклеотидов на poly (dA)• poly (dT) (см. работу Крылова и соавторов [4]) и теоретическая кривая, рассчитанная при помощи (85). Видно, что потенциал с прямоугольной ямой позволяет хорошо описать экспериментальные данные.

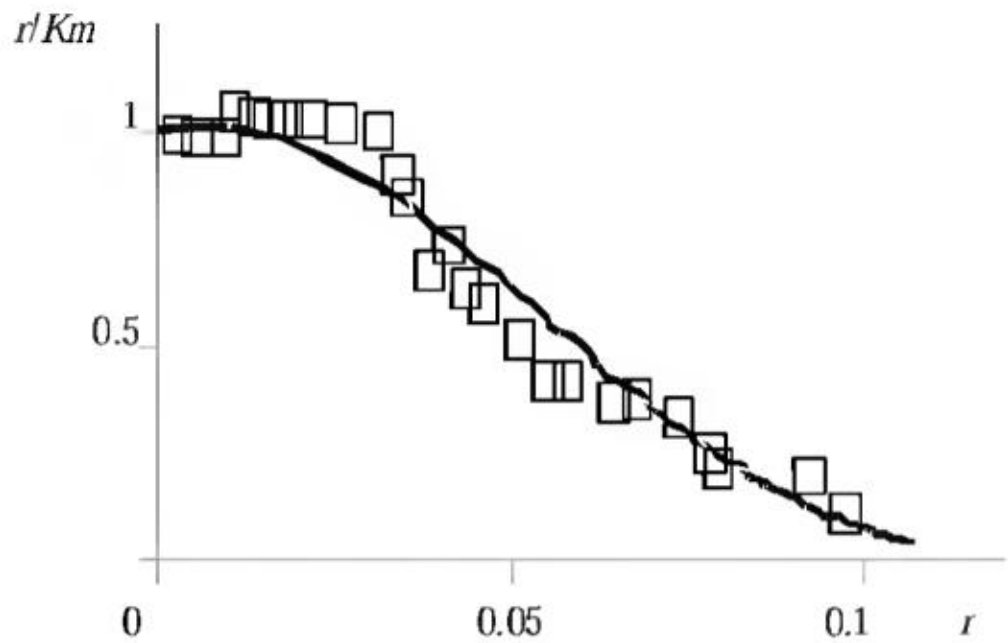

Рис. 4.5. Связывание аналога дистамицина А с полимером poly (dA)• poly (dT). Экспериментальные данные взяты из работы [4]. Теоретическая кривая рассчитана при помощи (85) для значений параметров: $L = 7$, $\omega = 1.4$, $l = 20$

4.3. Взаимодействие лигандов с матрицами НК, имеющими третичную структуру

В клетке молекулы ДНК и РНК часто образуют третичные структуры. При связывании антибиотиков, красителей и ионов с нуклеиновыми кислотами (НК) третичная структура и внутренняя энергия макромолекулы НК могут изменяться. Такого рода изменения наблюдаются, например, при связывании бромида этидия с кольцевыми суперспиральными ДНК [12, 13] или с ДНК в составе нуклеосом [14]. Здесь мы покажем, как, основываясь на разработанных в теории сложных химических равновесий представлениях [15] и используя развитый в этой главе метод анализа изотерм адсорбции, можно восстановить зависимость внутренней энергии НК от степени заполнения НК лигандом.

Рассмотрим модель адсорбции, описанную выше. Пусть в растворе при постоянных температуре и давлении находятся молекулы НК с адсорбированными лигандами и свободные молекулы лиганда. Представим совокупность участков матрицы НК, на которых может происходить связывание лиганда, как непрерывную последовательность из N центров. При связывании лиганд занимает L центров НК, расположенных подряд, закрывая доступ

к ним для других молекул лиганда. Эти L звеньев мы будем называть местом связывания лиганда на полимере НК.

Обозначим через K константу равновесия при связывании лиганда из раствора на линейном полимере НК. Эта константа не зависит от третичной структуры и числа адсорбированных на макромолекуле НК лигандов. Значение K можно определить из эксперимента по связыванию лиганда с линейным полимером НК, у которого отсутствуют элементы третичной структуры. Обозначим через $U(q)$ внутреннюю энергию макромолекулы НК, на которой адсорбировано q молекул лиганда. Зависимость $U(q)$ может иметь произвольный вид. В рамках нашего подхода все влияние третичной структуры на связывание лиганда моделируется с помощью потенциала $U(q)$.

Суммарная свободная энергия макромолекулы НК, на которой адсорбировано q лигандов, равна $DF(q,N) = qRT\ln Km + U(q) - TDS(q,N)$, (в отличии от соотношения (1), здесь появился член $U(q)$). Здесь $DS(q,N)$ — энтропия, обусловленная вырожденностью энергетического состояния адсорбционной системы: различные перестановки лиганда по полимеру соответствуют одному и тому же значению $DF(q,N)$. Число таких перестановок определяется соотношением (8).

Уравнение, связывающее между собой равновесные значения q и m, можно получить, приравнивая к нулю вариацию $\Delta F(q,N)$:

$$U(q+1) - U(q) - (DS(q+1,N) - DS(q,N)) = 0. \qquad (88)$$

В случае, когда $N \gg L$, параметры, характеризующие связывание, удобно нормировать на один центр матрицы. Пусть $w(r)$ — внутренняя энергия НК в расчете на один центр:

$$w(r) = U(q) / N.$$

Число мест связывания на полимере, остающихся свободными при некотором заполнении полимера лигандом $n(r)$ определяется соотношением (54).

Из (88) получаем:

$$\frac{dw(r)}{dr} = -RT\ln\frac{r/m}{Kn(r)}. \qquad (89)$$

Правая часть этого уравнения может быть определена на основании эксперимента и соответствует (с точностью до множителя RT) способу представления изотерм адсорбции, развитому нами выше (см. (57)).

Такое представление позволяет восстановить потенциал $w(r)$:

$$w(r) - w(0) = -RT\int_0^r H(r)\,dr.$$

Из (89) получаем:

$$\frac{r}{m\,n(r)} = Ke^{-\frac{dw(r)}{dr}\frac{1}{RT}} = K(r). \qquad (90)$$

Уравнение (90) можно рассматривать как условие химического равновесия для такого связывания лигандов с макромолекулой НК, при котором константа связывания лиганда $K(r)$ изменяется в зависимости от заполнения НК лигандом.

Такое описание связывания малых молекул на макромолекулах для случая $L = 1$ хорошо известно [15]. Связь между $K(r)$ и производной от внутренней энергии по величине заполнения $w(r)$ в общем случае была установлена в работе [3]. Позже Сиволоб и Храпунов показали, что это уравнение, поученное нами, связано с уравнением Тэнфорда (см. [16, 17]). Ландо и Тэйф в ряде работ продемонстрировали, что определенные формы потенциала $w(r)$ приводят к фазовым переходам (см., например, [18]).

Литература

1. *Заседателев А. С., Гурский Г. В. и Волькенштейн М. В.* Теория одномерной адсорбции. 1. Адсорбция малых молекул на гомополимере // Мол. биология. 1971. Т. 5. С. 245–490.
2. *Кантор Ч., Шиммел П.* Биофизическая химия. — М.: Мир, 1984.
3. *Нечипуренко Ю. Д.* Термодинамические параметры, характеризующие взаимодействия между молекулами лиганда, адсорбированными на полимере // Биофизика. 1982. Т. 27. С. 391–398.
4. *Krylov A. S., Grokhovsky S. L., Zasedatelev A. S., Zhuze A. L., Gursky G. V., Gottikh B. P.* // Nucleic Acids. Res. 1978. V. 6. P. 289.
5. *Hogan M., Dattagupta N., Crothers D. M.* // Nature. 1979.V. 278. P. 521–524. см. также *Dattagupta N., Hogan M., Crothers D. M.* //Biochemistry. 1980. V. 19. P. 5998–6005.
6. *Burd J. F., Wartell R. M., Dodgson J. B., & Wells R. D.* Transmission of stability (telestability) in deoxyribonucleic acid. Physical and enzymatic studies on the duplex block polymer d(C15A15)-d(T15G15) // Journal of Biological Chemistry. 1975. V 250. P. 5109–5113.
7. *Klein G., Prigogine I.* // Physica. 1958. V. 19. P. 74–89.
8. *Winkle R. A., Krugh T. L.* // Nucl. Acids. Res. 1981. V. 9. P. 3175–3186.
9. *Genest D., Wahle P.* // Biochimie. 1981. V. 63. P. 561–564.
10. *Нечипуренко Ю. Д., Крылов А. С., Заседателев А. С., Гурский Г. В.* Взаимодействия между аналогами антибиотика дистамицина А, адсорбированными на ДНК // Мол. биология. 1984. Т. 18. С. 332–342.
11. *Нечипуренко Ю. Д., Заседателев А. С., Гурский Г. В.* // Мол. биология 1984. Т. 18. С. 798–812.

12. *Bauer W., Vinograd L.* // J. Mol. Biol., 1968, V. 33, P. 141.
13. *Hsieh T., Wang J. C.* // Biochemistry, 1975, V. 14, P. 527.
14. *Bresloff J. L., Crothers D. M.* Equilibrium studies of ethidium-polynucleotide interactions // Biochemistry, 1981, V. 20, P. 3547.
15. *Тенфорд Ч.* Физическая химия полимеров. — М.: Химия, 1975. — С. 595.
16. *Сиволоб А. В., Храпунов С. Н.* // Биофизика. 1989. Т. 34. С. 28–33.
17. *Нечипуренко Ю. Д.* Связывание малых молекул с нуклеиновыми кислотами, имеющими третичную структуру // Биофизика. 1985. Т. 30. С. 231–232.
18. *Lando D. Y., Teif V. B.* Long-range interactions between ligands bound to a DNA molecule give rise to adsorption with the character of phase transition of the first kind // J. Biomol. Struct. Dyn. 2000. V. 17. P. 903–911.
19. *Lando D. Y., Fridman A. S., Haroutiunian S. G., Vardanyan V. I.* Representation of binding parameters for DNA-ligand complexes using two infinite series characterizing long-range ligand-ligand interactions along the double helix // Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus, 2006. V. 50, P. 46–50.

Глава 5
КОНТАКТНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ АДСОРБИРОВАННЫМИ ЛИГАНДАМИ (ДВА ТИПА КОМПЛЕКСА ИЛИ ДВА ЛИГАНДА)

5.1. Система уравнений адсорбции

Пусть в растворе находятся в равновесии матрицы ДНК с адсорбированными лигандами двух типов и свободные молекулы лигандов. ДНК представляет собой матрицу из N эквивалентных центров (пар оснований). Связываясь, лиганд типа α $(\alpha = 1,\ 2)$ закрывает подряд L_α мономерных центров матрицы так, что ни одно звено матрицы не может быть занято двумя молекулами лиганда. Эти L_α центров мы будем называть связывающим местом лиганда α на матрице. Обозначим через m_α концентрацию свободного лиганда α в растворе, r_α — заполнение матрицы лигандом α (число адсорбированных лигандов в расчете на одно звено матрицы). Если $N \gg L_1$, L_2 (приближение бесконечной матрицы), уравнения адсорбции не будут зависеть от N. Все величины, характеризующие матрицу с адсорбированными лигандами, удобно нормировать в этом случае на один центр матрицы. Например, число адсорбированных лигандов на матрице $r = r_1 + r_2$, число центров матрицы, не закрытых адсорбированными лигандами $\left(1 - r_1 L_1 - r_2 L_2\right)$.

Пусть K_α — константа связывания лиганда α с изолированным связывающим местом, при связывании на котором не образуется контактов с другими адсорбированными лигандами (Рис. 5.1 *а*). Если центр матрицы, граничащий справа со связывающим местом лиганда α, занят левым концом лиганда β $(\beta = 1,\ 2)$, то при связывании лиганда α образуется контакт между правым концом лиганда α и левым концом лиганда β (Рис. 5.1 *б*). Константа связывания лиганда α на таком месте равна $K_\alpha \omega_{\alpha\beta}$. Множитель $\omega_{\alpha\beta}$ мы будем называть параметром кооперативных взаимодействий между лигандами (α, β), находящимися в контакте.

Имеется всего четыре параметра $\omega_{\alpha\beta}$, описывающих кооперативные взаимодействия между адсорбированными лигандами: ω_{11}, ω_{12}, ω_{21} и ω_{22}. Если при связывании лиганда α образуется два контакта — с адсорбиро-

ванным слева лигандом β и адсорбированным справа лигандом ν (ν =1, 2), то константа связывания равна $\omega_{\beta\alpha} K_\alpha \omega_{\alpha\nu}$.

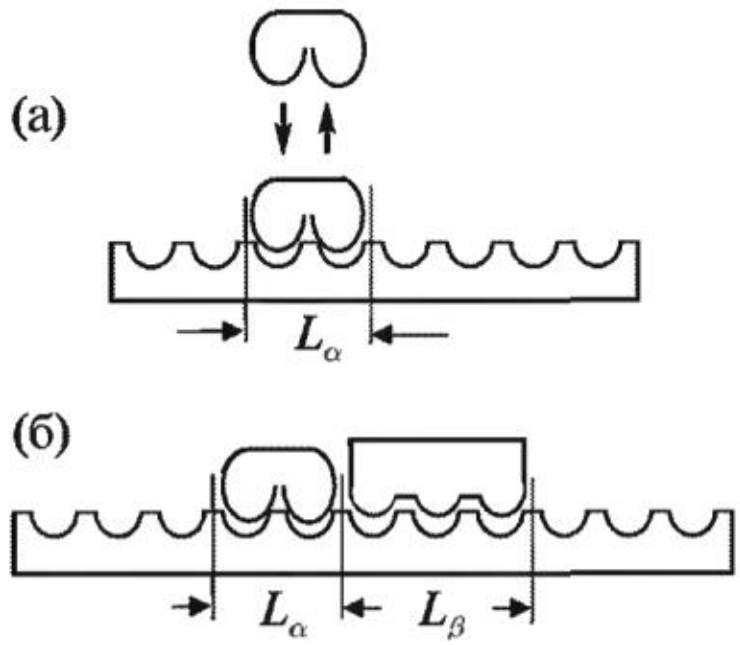

Рис. 5.1. Связывание на матрице двух лигандов. (а) Лиганд α адсорбируется из раствора на изолированном связывающем месте матрицы. L_α — длина лиганда. (б) Два лиганда адсорбированы так, что правый конец лиганда α образует контакт с левым концом лиганда β. (α, β) обозначает два ближайших соседних лиганда, адсорбированных так, что лиганд β предшествует лиганду α

Обозначим через $\gamma_{\beta\alpha}$ число пар лигандов (β, α), в которых правый конец лиганда β контактирует с левым концом лиганда α. Число лигандов α, левый конец которых не контактирует с другими лигандами, равно $r_\alpha - \gamma_{1\alpha} - \gamma_{2\alpha}$ (напомним, что r_α и $\gamma_{\beta\alpha}$ нормированы на одно звено матрицы).

Вероятность того, что адсорбированный на матрице лиганд α не контактирует с адсорбированным слева лигандом, равна

$$\left(r_\alpha - \gamma_{1\alpha} - \gamma_{2\alpha}\right) / r_\alpha .$$

Число лигандов α, не имеющих контактов ни справа, ни слева, равно

$$\left[\left(r_\alpha - \gamma_{1\alpha} - \gamma_{2\alpha}\right) / r_\alpha\right]\left[\left(r_\alpha - \gamma_{\alpha 1} - \gamma_{\alpha 2}\right) / r_\alpha\right] r_\alpha . \qquad (91)$$

Чтобы найти уравнение адсорбции, запишем условие химического равновесия для связывания лиганда с изолированным связывающим местом. Число лигандов типа α, адсорбированных на таких местах, задается при помощи (91). Число изолированных связывающих мест, остающихся свободными при некотором заполнении матрицы лигандами, найдем следующим образом. Представим матрицу с адсорбированными лигандами как последовательность элементов двух типов: свободных центров матрицы и групп лигандов. Группой лигандов мы будем называть один лиганд, адсорбированный на изолированном связывающем месте или несколько лигандов, адсорбированных так, что все ближайшие соседние лиганды на-

ходятся в контакте. Если на матрице адсорбировано r_1 лигандов типа 1 и r_2 лигандов типа 2, то число пар ближайших соседних лигандов равно $r = r_1 + r_2$. Из этого числа $\gamma = \gamma_{11} + \gamma_{12} + \gamma_{21} + \gamma_{22}$ пар лигандов находятся в контакте. Число пар лигандов, не образующих контакта между собой, $r - \gamma$, равно числу групп (в приближении бесконечной матрицы).

Каждая группа отделена от соседней по крайней мере одним центром матрицы. Учтем этот факт при помощи специального приема: будем считать центр матрицы со следующей за ним группой элементом одного класса, а свободный центр матрицы, не предшествующий группе лигандов — элементом другого класса. Число свободных центров матрицы, определенных таким образом, равно

$$1 - r_1 L_1 - r_2 L_2 - (r - \gamma) .$$

Все различные расположения групп лигандов и свободных центров равновероятны.

Вероятность встретить в последовательности свободный центр матрицы равна:

$$P = \frac{1 - r_1 L_1 - r_2 L_2 - (r - \gamma)}{1 - r_1 L_1 - r_2 L_2}. \tag{92}$$

Изолированное связывающее место на матрице для лиганда α представляет собой последовательность из $L_\alpha + 1$ расположенных подряд центров матрицы (L_α центров занимает лиганд, и одно звено ему должно предшествовать, иначе может образоваться контакт с адсорбированным слева лигандом). Число изолированных связывающих мест для лиганда α равно:

$$P^{L\alpha+1}(1 - r_1 L_1 - r_2 L_2). \tag{93}$$

Условие химического равновесия для связывания лиганда α на изолированном связывающем месте запишется в виде

$$\frac{(r_\alpha - \gamma_{1\alpha} - \gamma_{2\alpha})}{r_\alpha} \frac{(r_\alpha - \gamma_{\alpha 1} - \gamma_{\alpha 2})}{r_\alpha} \frac{r_\alpha}{m_\alpha} = K_\alpha P^{L\alpha+1}(1 - r_1 L_1 - r_2 L_2). \tag{94}$$

Аналогично можно записать условие химического равновесия для связывания лиганда α с константой $K_\alpha \omega_{\beta\alpha}$. Число лигандов α, левый конец которых находится в контакте с лигандом β, а правый конец не взаимодействует с другими лигандами, равно:

$$\frac{\gamma_{\beta\alpha}}{r_\alpha} \frac{(r_\alpha - \gamma_{\alpha 1} - \gamma_{\alpha 2})}{r_\alpha} r_\alpha. \tag{95}$$

Число свободных связывающих мест на полимере, при адсорбции на которых лиганда α образуется описанная выше ситуация, равно:

$$P^{L\alpha}(r_\beta - \gamma_{\beta 1} - \gamma_{\beta 2}). \tag{96}$$

Из (95), (96) получаем:

$$\frac{\gamma_{\beta\alpha}}{r_\alpha}\frac{(r_\alpha - \gamma_{\alpha 1} - \gamma_{\alpha 2})}{r_\alpha} r_\alpha = K_\alpha \omega_{\beta\alpha} P^{L\alpha}(r_\beta - \gamma_{\beta 1} - \gamma_{\beta 2}).$$

Уравнения (94), (97), где P выражается при помощи (92), представляют собой систему из шести уравнений для шести неизвестных r_α, $\gamma_{\alpha\beta}$.

Из (94) и (97) можно получить несколько простых соотношений.

$$(r_\beta - \gamma_{\beta 1} - \gamma_{\beta 2})(r_\alpha - \gamma_{1\alpha} - \gamma_{2\alpha}) = \frac{\gamma_{\beta\alpha}}{\omega_{\beta\alpha}}((1 - r_1 L_1 - r_2 L_2) - (r - \gamma)). \tag{98}$$

$$\frac{(r_\alpha - \gamma_{\alpha 1} - \gamma_{\alpha 2})}{(r_\beta - \gamma_{\beta 1} - \gamma_{\beta 2})} = \frac{\gamma_{\alpha\alpha}}{\gamma_{\beta\alpha}}\frac{\omega_{\beta\alpha}}{\omega_{\alpha\alpha}}. \tag{99}$$

$$\frac{\gamma_{11}}{\omega_{11}}\frac{\gamma_{22}}{\omega_{22}} = \frac{\gamma_{12}}{\omega_{12}}\frac{\gamma_{21}}{\omega_{21}}. \tag{100}$$

$$\frac{\gamma_{11}}{\gamma_{22}}\frac{\omega_{22}}{\omega_{11}}\frac{r_2}{r_1} = \frac{K_1 m_1}{K_2 m_2} P^{L_1 - L_2}.$$

Уравнения (98)–(100) были получены впервые нами в работе [1], они сходны с общими уравнениями химического равновесия, выведенными для одномерных ансамблей из взаимодействующих систем Рашбруком и Урселлом [2].

5.2. Характер расположения лигандов на матрице. Решение уравнений адсорбции

Введем в рассмотрение $\gamma_{\alpha\beta}(i)$ — число пар лигандов (α, β) таких, что лиганды α и β разделяют i свободных звеньев полимера. Тогда $\gamma_{\alpha\beta}(0) = \gamma_{\alpha\beta}$. Зависимости $\gamma_{\alpha\beta}(i)$ детально характеризуют расположение лигандов на полимере. Эти зависимости можно найти следующим образом: в случае $i \geq 1$ число пар лигандов (α, β), разделенных $i + 1$ звеном полимера, в P раз отличается от $\gamma_{\alpha\beta}(i)$:

$$\gamma_{\alpha\beta}(i + 1) = \gamma_{\alpha\beta}(i) P, \tag{102}$$

где P — вероятность встретить свободный центр матрицы (см. (92)). Если между адсорбированными лигандами существуют кооперативные взаимодействия, то в распределении пар лигандов по расстояниям (102) появится

больцмановский множитель. Для контактных кооперативных взаимодействий:

$$\gamma_{\alpha\beta}(1) = P\gamma_{\alpha\beta}(0) / \omega_{\alpha\beta}. \tag{103}$$

Из (102), (103) следует $\gamma_{\alpha\beta}(i) = P^{i}\gamma_{\alpha\beta} / \omega_{\alpha\beta}$, или

$$\ln\gamma_{\alpha\beta}(i) = \ln\gamma_{\alpha\beta} - \ln\omega_{\alpha\beta} + i\ln P. \tag{104}$$

Графическое представление $\ln\gamma_{\alpha\beta}(i)$ позволяет определить параметры кооперативности $\omega_{\alpha\beta}$ (рис. 5.2).

Величины $\gamma_{\alpha\beta}(i)$ связаны с заполнениями r_1, r_2 простыми соотношениями: полное число пар лигандов (1, 2) и (1, 1) равно числу лигандов r_1:

$$\sum_{i=0}^{\infty}(\gamma_{12}(i) + \gamma_{11}(i)) = r_1. \tag{105}$$

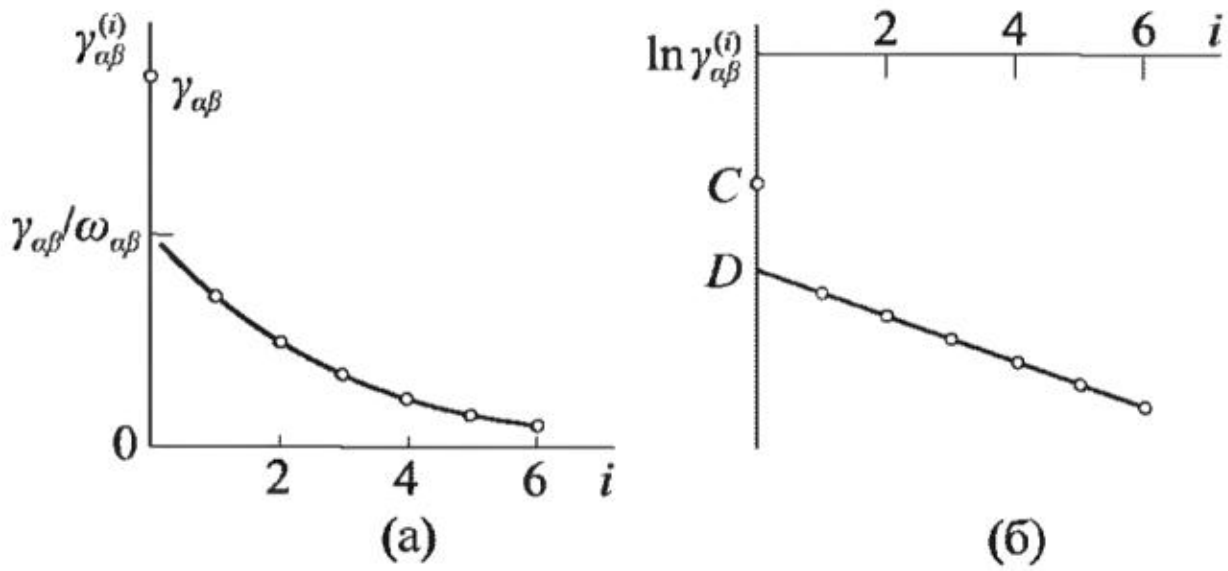

Рис. 5.2 Связь между распределением числа пар соседних лигандов и параметром кооперативных взаимодействий между ними. (а) Зависимость числа пар ближайших соседних лигандов, в которых лиганд α предшествует лиганду β, от расстояния i между лигандами. Величина $\gamma_{\alpha\beta} = \gamma_{\alpha\beta}(0)$. (б) Зависимость $\ln\gamma_{\alpha\beta}(i)$ представляет собой при $i > 1$ отрезок прямой. Наклон этого отрезка равен $\ln P$. Продолжая отрезок до пересечения с осью ординат, получим величину $\ln\gamma_{\alpha\beta}$ — $\ln\omega_{\alpha\beta}$. Таким образом можно определить параметр кооперативности $\omega_{\alpha\beta}$: величина отрезка CD равна $\ln\omega_{\alpha\beta}$

Аналогично получаем:

$$\sum_{i=0}^{\infty}(\gamma_{21}(i) + \gamma_{22}(i)) = r_2. \tag{106}$$

Число пар лигандов (1,2) равно числу пар лигандов (2,1):

$$\sum_{i=0}^{\infty}\gamma_{12}(i) = \sum_{i=0}^{\infty}\gamma_{12}(i). \tag{100}$$

Из (92) получаем:

$$P^{L\alpha}(1r_1 - L_1 - r_2\ L_2) = (r-\gamma)\,/\,(1-P). \tag{108}$$

Используя (102), (103), из (105)–(107) находим:

$$\begin{cases} r_1 = \gamma_{12}\left(1 + \dfrac{P}{\omega_{12}(1-P)}\right) + \gamma_{11}\left(1 + \dfrac{P}{\omega_{11}(1-P)}\right), \\ r_2 = \gamma_{22}\left(1 + \dfrac{P}{\omega_{22}(1-P)}\right) + \gamma_{21}\left(1 + \dfrac{P}{\omega_{21}(1-P)}\right), \end{cases} \tag{109}$$

$$r_2 = \gamma_{22}\left(1 + \frac{P}{\omega_{22}(1-P)}\right) + \gamma_{21}\left(1 + \frac{P}{\omega_{21}(1-P)}\right),$$

$$\gamma_{12}\left(1 + \frac{P}{\omega_{12}(1-P)}\right) = \gamma_{21}\left(1 + \frac{P}{\omega_{21}(1-P)}\right), \tag{110}$$

$$1 - r_1 L_1 - r_2 L_2 = \sum_{\alpha,\beta} \frac{\gamma_{\alpha\beta}}{\omega_{\alpha\beta}} \frac{P}{(1-P)^2}. \tag{111}$$

Соотношения (108)–(111) позволяют построить решение системы (97), (98) в общем случае (см. [1]). Такое решение будет параметрическим: задавая значение P ($0 < P < 1$) можно рассчитать значения r_1, r_2 и r_1/m_1, r_2/m_2 для любого типа кооперативных взаимодействий между адсорбированными лигандами.

5.3. Связывание лиганда, образующего два типа комплексов с матрицей

Многие лиганды при связывании с ДНК образуют два различных типа комплексов. Если эти комплексы имеют различную длину $L_1 \neq L_2$, то при заполнениях ДНК лигандом, близких к насыщающему значению r_{max}, комплексы, имеющие большую длину, будут вытесняться. Это вытекает из того факта, что заполнение ДНК комплексом типа α соответствует $r_\alpha \sim P^{L}$. Если $r_\alpha \to r_{max}$, то $P \to 0$ и $r_1 \gg r_2$ при $L_1 < L_2$. Заметим, что суммарное заполнение матрицы лигандом $r = r_1 + r_2$ при возрастании концентрации свободного лиганда в растворе не может убывать.

Если $L_1 = L_2$, при $r_\alpha \to r_{max}$ на матрице сосуществуют оба типа комплекса. Случай $L_1 = L_2$ представляет особый интерес, потому что двойная спираль ДНК имеет ось симметрии второго порядка и два типа комплексов

лиганда с ДНК могут быть обусловлены связыванием лиганда на матрице ДНК в двух альтернативных ориентациях. Эти случаи были рассмотрены Гурским и соавторами (см. [3–5]). Было обнаружено, что этом случае возможны два способа упорядоченного расположения лигандов на ДНК, соответствующие двум различным типам кооперативных взаимодействий между адсорбированными лигандами [1, 5]).

5.3.а Кооперативные взаимодействия, приводящие к образованию цепочек из лигандов на матрице

Рассмотрим случай, когда при связывании лиганда на матрице образуется один тип комплекса: $r_2 = 0$, $\gamma_{22} = \gamma_{12} = \gamma_{21} = 0$. Подставив в (97), (98) величины m, K, L и ω вместо m_1, K_1, L_1 и ω_{11} получаем:

$$\left(\frac{r-\gamma}{r}\right)^2 \frac{r}{m} = K\left(\frac{1-rL-(r-\gamma)}{1-rL}\right)^L (1-rL-(r-\gamma)), \tag{112}$$

$$(r-\gamma)^2 = \frac{\gamma}{\omega}(1-rL-(r-\gamma)), \tag{113}$$

где r —заполнение полимера лигандом, γ — число контактов между адсорбированными лигандами. Уравнения (112), (113) впервые получены Заседателевым и соавт. (см. уравнение (16) из работы Заседателева и соавт. [6]). Ранее эти уравнения в виду их важности мы уже упоминали (см. (16)). Детально эти уравнения рассматривались в ряде работ [7–11]. В случае $\omega = 1$ из (112), (113) получаем уравнение, соответствующее некооперативному связыванию протяженного лиганда [1,6,9]:

$$\frac{r}{m} = Kn(r), \tag{114}$$

где

$$n(r) = \left(\frac{1-rL}{1-rL+r}\right)^L (1-rL+r). \tag{115}$$

Здесь $n(r)$ — число свободных связывающих мест в расчете на один центр матрицы в случае некооперативного связывания лиганда.

В Главе 4 мы показали, что при $r \to r_{\max}$ кооперативное связывание лиганда можно представить как некооперативное связывание лиганда той же длины, которое характеризуется некоторой эффективной константой K_{eff} (см. также [9]). Это означает, что при $r \to r_{\max}$ уравнения (112), (113) можно представить в виде:

$$\frac{r}{m} \approx K_{\text{eff}} n(r). \tag{116}$$

Такое представление основано на сходстве асимптотического поведения (112) и (114), (25) при $r \to r_{\max} = 1/L$. Используя (113), преобразуем (112) к виду:

$$\frac{r}{m} = K\left(\frac{1-rL}{1-rL+r-\gamma\frac{\omega-1}{\omega}}\right)^{L}\frac{\omega}{\gamma}r^{2}. \tag{117}$$

При $r \to 1/L$ величина $\gamma \to 1/L$. Из (117) следует, что в этом случае:

$$\frac{r}{m} \sim (1-rL)^{L} \sim n(r).$$

Используя (116), (117), находим K_{eff}:

$$K_{\text{eff}} = \lim\frac{r/m}{n(r)} = K\omega^{L+1}. \tag{118}$$

При некотором ненулевом заполнении r связывание лиганда на матрице может происходить с константами K, $K\omega$ или $K\omega^2$. Пусть v_i — число лигандов, образующих на полимере $i-1$ контакт со своими ближайшими соседями, n_i — число свободных мест, на которых связывание происходит с константой $K\omega^{i-1}$ ($i = 1, 2, 3$). Можно записать условия химического равновесия для связывания лиганда с различными связывающими местами: $v_i/m = K\omega^{i-1}n_i$.

Используя представления, развитые при выводе (94), (97), находим:

$$\begin{cases} \upsilon_1 = \dfrac{(r-\gamma)^2}{r}, \quad n_1 = \left(\dfrac{1-rL-(r-\gamma)}{1-rL}\right)^{L+1}(1-rL), \\ \upsilon_2 = \dfrac{2\gamma(r-\gamma)}{r}, \quad n_2 = 2\left(\dfrac{1-rL-(r-\gamma)}{1-rL}\right)^{L}(r-\gamma), \\ \upsilon_3 = \dfrac{\gamma^2}{r}, \quad n_3 = \left(\dfrac{1-rL-(r-\gamma)}{1-rL}\right)^{L-1}\dfrac{(r-\gamma)^2}{1-rL}. \end{cases} \tag{119}$$

Изотерма адсорбции (112, 113) представляет собой сумму трех изотерм (119):

$$\frac{r}{m} = \sum_{i=1}^{3}\frac{\upsilon_i}{m} = \sum_{i=1}^{3}K\omega^{i-1}n_i.$$

На рис. 5.3 показано разложение изотермы адсорбции на составляющие. Такое разложение изотермы полезно для интерпретации кинетических экспериментов.

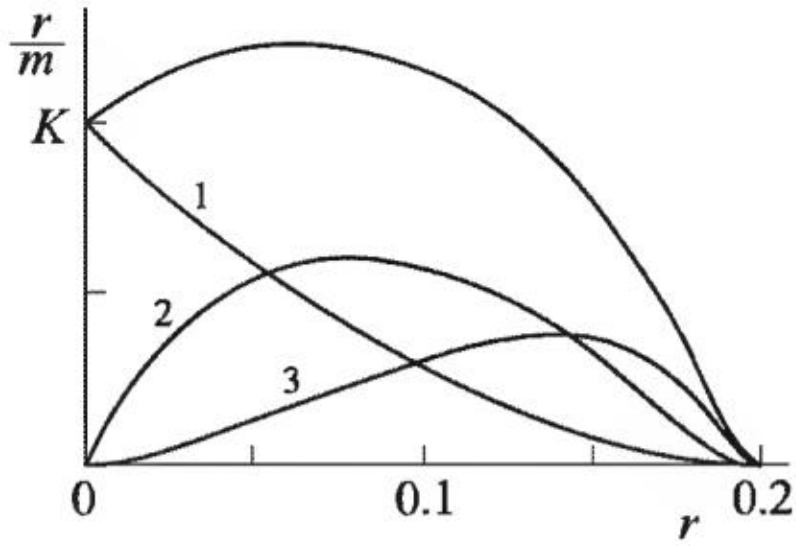

Рис. 5.3. Разложение изотермы адсорбции для кооперативного связывания лиганда на составляющие. Изотерма адсорбции лиганда, образующего один тип комплекса с ДНК, представляет собой сумму трёх изотерм, соответствующих связыванию лиганда с константами K, $K\,\omega$ и $K\,\omega^2$ (кривые **1–3** соответственно). Кривые рассчитаны на основании уравнений (119). Длина лиганда $L = 5$, параметр кооперативности $\omega = 10$

При $r \to 1/L$ все лиганды адсорбируются на полимере с константой $K\,\omega^2$ (в этом случае $n_3 \gg n_1,\ n_2$), и число свободных связывающих мест в случае кооперативного связывания, $n_3 + n_2 + n_1$, в ω^{L+1} раз превышает число свободных связывающих мест для некооперативного связывания лиганда той же длины, $n(r)$ (рис. 5.4). Из-за этого эффективная константа связывания K_{eff} в ω^{L-1} раз превосходит реальную константу связывания $K\,\omega^2$ (см. (118)).

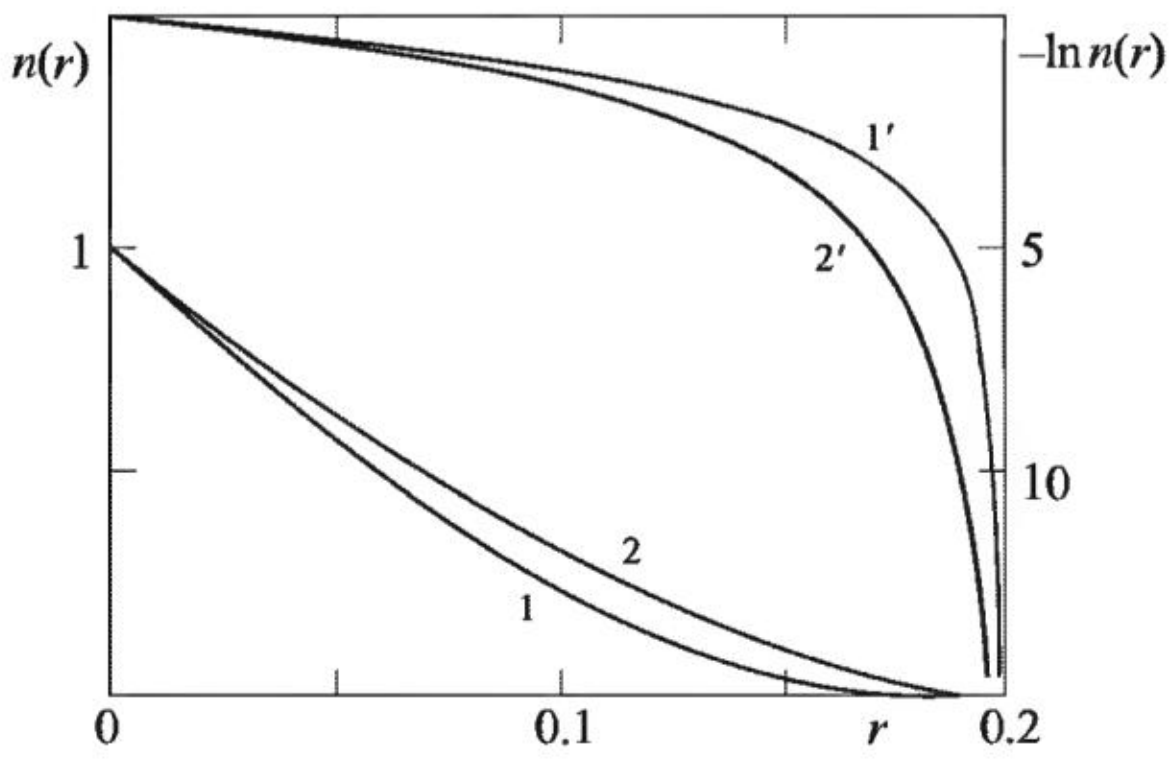

Рис. 5.4. Зависимости числа свободных связывающих мест, $n(r)$, от заполнения полимера лигандом для некооперативного связывания лиганда (1) и для кооперативного связывания (2). Кривые **1′**, **2′** соответствуют **1, 2** в логарифмическом представлении. Расчёты проводили по формулам (112), (113), (115) при $\omega = 10$, $L = 5$

Асимптотический анализ позволяет объяснить характерную форму изотермы (112), (113): при $\omega > 1$ в области заполнений $r \sim r_{max}$ изотерма (112), (113) ведет себя так же, как кривая, соответствующая некооперативному связыванию лиганда с большой константой K_{eff}. Если ω=10 и $L = 5$, из (118) получаем $K_{eff} = 10^6\ K$.

Энергию кооперативных взаимодействий между адсорбированными лигандами удобно определять с помощью представления $H(r)$ (см. Главу 4):

$$H(r) = \ln \frac{r / Km}{n(r)}. \tag{120}$$

где r/Km — значение ординаты анализируемой изотермы, $n(r)$ рассчитывается с помощью (115). Из (120), (116), (117) находим:

$$H(r_{max}) = \ln \frac{K_{eff}}{K} = -(L+1)\frac{\Delta f}{kT}. \tag{121}$$

где Δf — энергия контактных кооперативных взаимодействий между адсорбированными лигандами, $\omega = \exp(-\Delta f/kT)$. Из (120) получаем при $r \to 0$:

$$\frac{dH(r)}{dr} = 2(\omega - 1) \quad (r \to 0). \tag{122}$$

В случае $\omega > 1$ зависимость $H(r)$ для изотермы (112), (113) при увеличении заполнения r монотонно возрастает от 0 до $H(r_{max})$, причем вторая производная $H(r)$ по r положительна для всех r (рис. 5.5). Такое возрастание обусловлено тем, что адсорбированные лиганды образуют на матрице цепочки, в которых все ближайшие соседние лиганды взаимодействуют между собой. Такие взаимодействия соответствуют изологичным кооперативным взаимодействиями по классификации Моно и др. [12]. Они приводят к формированию на матрице неограниченных цепочек–ассоциатов из взаимодействующих лигандов, что соответствует изотерме адсорбции характерной формы (рис. 5.5).

Соотношение (121) легко объяснить, если рассмотреть характер расположения лигандов на полимере при $r \to 1/L$. В этом случае почти все лиганды находятся в контакте: $\gamma(0) = r - (1 - rL)$. Лишь небольшое число одиночных центров матрицы разделяет группы взаимодействующих лигандов. При связывании лиганда длины L несколько групп лигандов сдвинутся так, чтобы образовалось связывающее место из L центров матрицы. Число одиночных центров, разделяющих группы лигандов, уменьшится на L и образуется $L + 1$ новый контакт между группами адсорбированных лигандов. Образованию одного контакта соответствует энергия кооператив-

ных взаимодействий — $\Delta f/kT$. При образовании $L + 1$ контакта константа связывания за счет кооперативных взаимодействий возрастет в K_{eff}/K раз: $\ln\left(K_{\text{eff}}/K\right) = -\left(L+1\right)\left(\Delta f/kT\right)$, что соответствует соотношению (121).

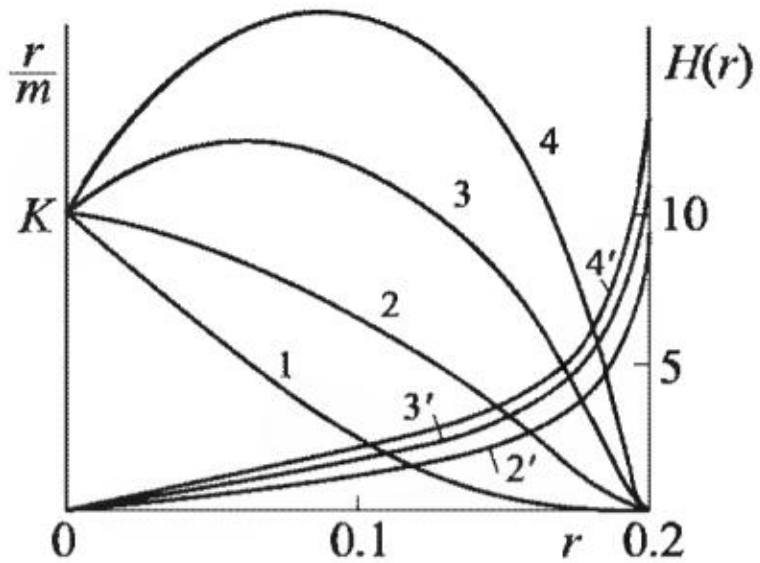

Рис. 5.5. Изотермы адсорбции, соответствующие кооперативным взаимодействиям, приводящим к образованию цепочек из лигандов на матрице. Изотермы адсорбции рассчитаны с помощью уравнений (112), (113) для лиганда длины $L = 5$: **1** — $\omega = 1$, некооперативное связывание; **2** — $\omega = 5$; **3** — $\omega = 10$; **4** — $\omega = 15$. Кривые **2'–4'** соответствуют кривым **2–4** в представлении $H(r)$, см. (57)

Рассмотрим случай, когда при связывании лиганда на матрице может образовываться два различных типа комплексов. Если кооперативные взаимодействия между адсорбированными лигандами не зависят от их взаимного расположения: $\omega_{11} = \omega_{12} = \omega_{21} = \omega_{22} = \omega$, то система уравнений (94), (97), (98) преобразуется в уравнения, совпадающие по форме с (112), (113), где следует положить $K = K_1 + K_2, r = r_1 + r_2,\ \gamma = \gamma_{11} + \gamma_{12} + \gamma_{21} + \gamma_{22}$.

Форма изотермы адсорбции в этом случае при любых значениях K_1, K_2 неотличима от изотермы, показанной на Рис. 5.5.

Если кооперативные взаимодействия существуют только между различными типами комплекса: $\omega_{11} = \omega_{22} = 1$, $\omega_{12} = \omega_{21} = \omega$, то из (94), (97), (98) получаем:

$$\begin{cases} \left(\dfrac{r_1 - \gamma\frac{\omega-1}{\omega}}{r_1}\right)^2 \dfrac{r_1}{m} = K_1\left(\dfrac{1-rL}{1-rL+r-2\gamma\frac{\omega-1}{\omega}}\right)^L \left(1-rL+r-2\gamma\frac{\omega-1}{\omega}\right), \\ \left(\dfrac{r_2 - \gamma\frac{\omega-1}{\omega}}{r_2}\right)^2 \dfrac{r_2}{m} = K_2\left(\dfrac{1-rL}{1-rL+r-2\gamma\frac{\omega-1}{\omega}}\right)^L \left(1-rL+r-2\gamma\frac{\omega-1}{\omega}\right), \\ \left(r_1 - \gamma\frac{\omega-1}{\omega}\right)\left(r_2 - \gamma\frac{\omega-1}{\omega}\right) = \gamma\left(1-rL+r-2\gamma\frac{\omega-1}{\omega}\right). \end{cases} \qquad (123)$$

В случае $K_1 = K_2$ уравнения (123) легко решаются. Эффективная константа связывания равна:

$$K_{\text{eff}} = \left(\frac{\omega+1}{\omega}\right)^{L+1} (K_1 + K_2). \tag{124}$$

Такая зависимость $K_{\text{eff}}(\omega)$ характерна для кооперативных взаимодействий, при которых адсорбированные лиганды образуют на матрице цепочки. Действительно, если комплексы 1-го и 2-го типов на матрице чередуются, то все ближайшие соседние лиганды будут взаимодействовать между собой. При $K_1 = K_2$ изотерма адсорбции имеет форму, характерную для кооперативных взаимодействий, соответствующих образованию таких цепочек. При изменении отношения констант K_1/K_2 от 1 до 0 форма изотермы плавно изменяется, но характерный рост кривой в представлении $H(r)$ сохраняется (см. рис. 5.6).

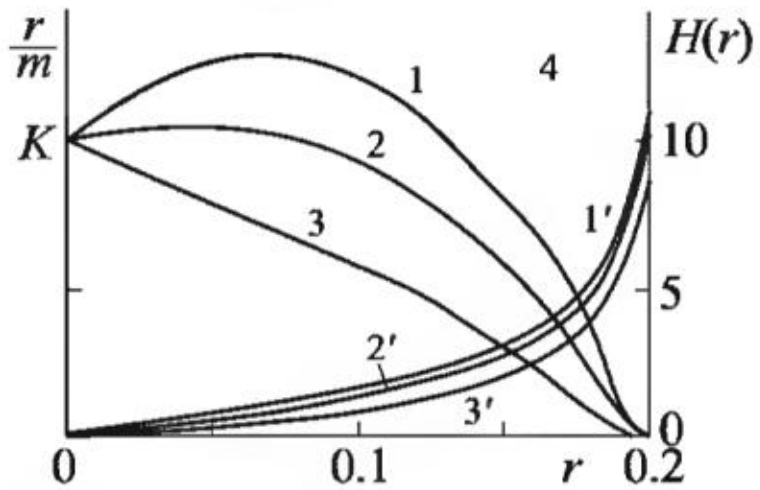

Рис. 5.6. Изотермы адсорбции, соответствующие образованию цепочек из чередующихся типов комплекса. Изотермы рассчитаны в случае, когда лиганд образует с ДНК два типа комплексов одинаковой длины $L = 5$ и между различными комплексами существуют кооперативные взаимодействия: $\omega_{11} = \omega_{22} = 1$, $\omega_{12} = \omega_{21} = 20$. Кривые **1** — **3** рассчитаны при помощи (123) для различных отношений величин констант связывания и постоянной сумме констант $K_1 + K_2 = K$: **1** — $K_1/K_2 = 1$, **2** — $K_1/K_2 = 0.2$, **3** — $K_1/K_2 = 0.05$. Кривые **1'** — **3'** соответствуют изотермам **1** — **3** в представлении $H(r)$

Рассмотрим случай, когда кооперативные взаимодействия возможны только между комплексами одного типа, например $\omega_{11} = \omega_{12} = \omega_{21} = 1$, $\omega_{22} = \omega$. В этом случае из (94), (97), (98) получаем:

$$\begin{cases} \dfrac{r_1}{m} = K_1\left(\dfrac{1-rL}{1-rL+r-\gamma\frac{\omega-1}{\omega}}\right)^L \left(1-rL+r-\gamma\frac{\omega-1}{\omega}\right), \\ \left(r_2-\gamma\frac{\omega-1}{\omega}\right)^2 = \dfrac{\gamma}{\omega}\left(1-rL+r-\gamma\frac{\omega-1}{\omega}\right), \\ \dfrac{r_2}{m} = K_2\left(\dfrac{1-rL}{1-rL+r-\gamma\frac{\omega-1}{\omega}}\right)^L \dfrac{\omega r_2^2}{\gamma}. \end{cases} \tag{125}$$

где $\gamma = \gamma_{22}$ — число контактов между комплексами 2-го типа. В зависимости от соотношения констант K_1/K_2 и параметра ω на матрице будут преобладать комплексы 1-го или 2-го типа. При $r \to 1/L$ в случае $K_2\,\omega > K_1$ матрица заполнена комплексами 2-го типа и изотерма адсорбции имеет вид, характерный для кооперативных взаимодействий, соответствующих образованию цепочек (Рис. 5.7). По мере уменьшения отношения $K_2\,\omega/K_1$ форма изотермы изменяется, и при $K_2\,\omega < K_1$ изотерма имеет вид, характерный для некооперативного связывания лиганда с константой K_1.

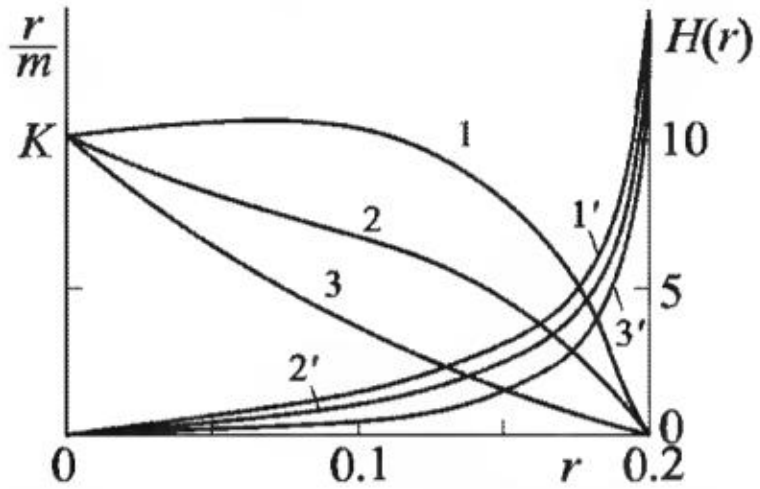

Рис. 5.7. Изотермы адсорбции, соответствующие образованию цепочек из комплексов одного типа. Изотермы рассчитаны в случае, когда лиганд образует с ДНК два типа комплексов одинаковой длины $L = 5$ и кооперативные взаимодействия существуют между комплексами 2-го типа: $\omega_{11} = \omega_{12} = \omega_{21} = 1$, $\omega_{22} = 20$. Кривые **1** — **3** рассчитаны при помощи (125) для различных отношений величин констант связывания: **1** — $K_1/K_2 = 1$, **2** — $K_1/K_2 = 2$, **3** — $K_1/K_2 = 5$. Кривые **1'** — **3'** соответствуют изотермам **1** — **3** в представлении $H(r)$

5.3.б Кооперативные взаимодействия, приводящие к образованию димеров из адсорбированных на матрице лигандов

Пусть кооперативные взаимодействия между адсорбированными лигандами возникают только в том случае, когда правый конец комплекса 1 приходит в контакт с левым концом комплекса 2: $\omega_{12} = \omega$, $\omega_{11} = \omega_{22} = \omega_{21} = 1$. Подставив эти значения параметров кооперативности в (94), (97), (98), получаем:

$$\begin{cases} \dfrac{r_1 - \gamma\frac{\omega-1}{\omega}}{m} = K_1\left(\dfrac{1-rL}{1-rL+r-\gamma\frac{\omega-1}{\omega}}\right)^L\left(1-rL+r-\gamma\frac{\omega-1}{\omega}\right), \\ \dfrac{r_2 - \gamma\frac{\omega-1}{\omega}}{m} = K_2\left(\dfrac{1-rL}{1-rL+r-\gamma\frac{\omega-1}{\omega}}\right)^L\left(1-rL+r-\gamma\frac{\omega-1}{\omega}\right), \\ \gamma^2(1-\omega) + \gamma(1-rL+\omega r) - \omega r_1 r_2 = 0. \end{cases} \qquad (126)$$

где $\gamma = \gamma_{12}$, m — концентрация свободного лиганда в растворе. Уравнения (36) были получены нами [1,9] в случае, когда рассматривалось связывание лиганда в двух альтернативных ориентациях относительно полимера, эта модель была предложена Гурским и Заседателевым в работе [3], позже она была подробно описана и исследована в работе Вольфе и Михана [11].

Изотермы адсорбции, вычисленные при помощи (126), показаны на рис. 5.9. При изменении отношения K_1/K_2 форма изотермы плавно изменяется.

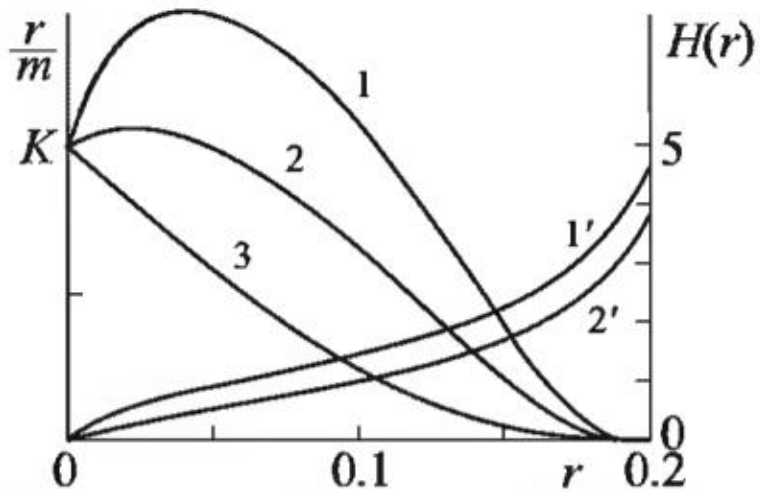

Рис. 5.8. Изотермы адсорбции, соответствующие образованию димеров из адсорбированных на матрице лигандов. Рассматривается случай $\omega_{11} = \omega_{21} = \omega_{22} = 1$, $\omega_{12} = 100$. Лиганд образует при связывании с ДНК два комплекса, имеющих одинаковую длину $L = 5$. Изотермы рассчитаны при помощи (126) при различных отношениях констант связывания: 1 — $K_1/K_2 = 1$, 2 — $K_1/K_2 = 0{,}1$, 3 — $K_1/K_2 = 0$. Кривые 1', 2' соответствуют изотермам 1, 2 в представлении $H(r)$

Если $K_1 \gg K_2$, то изотерма (36) совпадает с кривой, соответствующей некооперативному связыванию лиганда длины L с константой K. При любых значениях K_1, и K_2 поведение изотермы (126) резко отличается от поведения кривой (112), (113), соответствующей кооперативным взаимодействиям «цепочечного» типа. Для того чтобы выяснить причину такого различия, рассмотрим характер расположения лигандов на полимере.
В случае $K_1 = K_2$ при $r \to 1/L$ из (126) получаем:

$$\gamma \to \sqrt{\omega} / 2L\left(\sqrt{\omega} + 1\right), \tag{127}$$

$\gamma = 1/2L$ соответствует полностью упорядоченному расположению адсорбированных лигандов, когда комплексы 1-го и 2-го типов чередуются. Такая упорядоченность обеспечивает максимально возможное число взаимодействующих лигандов. Из (127) следует, что столь высокая степень упорядоченности реализуется при $\omega \to \infty$. При конечных значениях ω энтропийно более выгодна разупорядоченная последовательность лигандов. В пределе $r \to 1/L$ изотерма адсорбции ведет себя так же, как кривая (114),

(115), соответствующая некооперативному связыванию лиганда длины L с константой:

$$K_{\text{eff}} = \lim \frac{r/m}{n(r)} = (K_1 + K_2)\,\omega^{1/2}\left(\frac{2\omega^{1/2}}{1+\omega^{1/2}}\right)^{L-1}. \qquad (128)$$

При $\omega \to \infty$, когда цепочка адсорбированных лигандов полностью упорядочена, эффективная константа связывания в $(2\,\omega)^{(L-1)/2}$ раз превышает константу $K_1 + K_2$, соответствующую некооперативному связыванию. Такая асимптотика обусловлена тем, что при связывании двух лигандов образуется один контакт между адсорбированными лигандами, соответствующий энергии кооперативных взаимодействий — kT ln ω. На один лиганд приходится половина этой энергии: $^1/_2$ kT ln ω = kT ln $\sqrt{\omega}$. При связывании одного лиганда константа взаимодействия увеличится в ~ $\sqrt{\omega}$ раз по сравнению с некооперативным связыванием.

Для уравнений адсорбции (126) при $r \to 1/L$ повышение K_{eff} за счет кооперативных взаимодействий между лигандами относительно невелико (~$\sqrt{\omega}$). Это обусловлено тем, что на полимере не могут образовываться длинные цепочки, все ближайшие соседние молекулы в которых взаимодействуют между собой. Образуются «димеры» — пары взаимодействующих лигандов, таких, что комплекс 1-го типа предшествует комплексу 2-го типа. Мы будем называть взаимодействия, приводящие к образованию таких «димеров», кооперативными взаимодействиями локального типа (они соответствуют гетерологичным кооперативным взаимодействиями по классификации Моно и др. [12]). По виду изотермы адсорбции можно легко определить тип кооперативных взаимодействий между адсорбированными лигандами.

Заметим, что изотермы адсорбции, соответствующие локальным кооперативным взаимодействиям, имеют некоторое сходство с кривыми, соответствующими неконтактным кооперативным взаимодействиям (см. Главу 4). При положительных кооперативных взаимодействиях максимум на изотерме в случае взаимодействий локального типа, как и в случае неконтактных взаимодействий, смещен в область малых заполнений r. Однако более детальное рассмотрение поведения изотерм позволяет легко отличить изотермы, соответствующие локальным кооперативным взаимодействиям: в представлении $H(r)$ значение ординаты монотонно возрастает по мере увеличения r. Для любых отношений K_1/K_2 зависимость $H(r)$ имеет характерный вид (Рис. 5.8). В частности, производная $H(r)$ при $r \to 1/L$ не стремится к нулю, в то время как для неконтактных кооперативных взаимодействий, описываемых простейшими модельными потенциалами, такая производная равна нулю (см. Главу 4).

5.4. Образование димеров, тримеров и тетрамеров при связывании лиганда на матрице

Многие лиганды могут связываться на ДНК не только в мономерной, но и в димерной формах, нередко наблюдается связывание в виде агрегатов более высокого порядка. Общие уравнения для кооперативного связывания мономеров и димеров можно получить из (94)–(101), если положить $m_2 = K_d\, m^2$, где $m = m_1$ — концентрация свободных мономеров в растворе, m_2 — концентрация димеров, K_d — константа димеризации. Ниже мы рассмотрим случай, когда нет контактных кооперативных взаимодействий между ближайшими соседними адсорбированными мономерами и димерами: $\omega_{\alpha\beta} = 1$, однако само связывание второго мономера на уже адсорбированном на ДНК первом мономере, которое приводит к образованию адсорбированного димера, можно рассматривать как своего рода кооперативное связывание.

Схема связывания для этого случая проиллюстрирована на рис. 5.9.

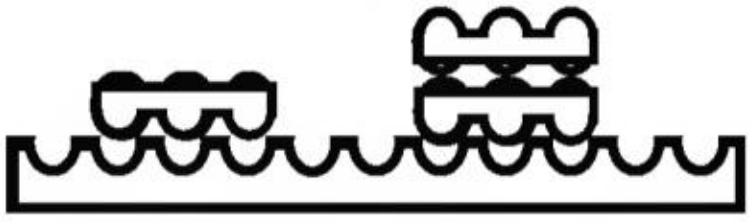

Рис. 5.9 Схема связывания, соответствующая модели, когда лиганд на матрице может адсорбироваться в виде мономера и димера

Уравнения связывания в этом случае получаются легко из общих соображений: обозначим суммарное покрытие матрицы комплексами первого типа (мономерами) и комплексами второго типа (димерами) $r = r_1 + r_2$, тогда для связывания мономеров можно записать:

$$\frac{r_1}{m} = K_1\left(\frac{1-rL}{1-rL+r}\right)^L (1-rL+r). \tag{129}$$

Число свободных связывающих мест для димеров будет тем же самым, что и для мономеров

$$\frac{r_2}{K_d m^2} = K_2\left(\frac{1-rL}{1-rL+r}\right)^L (1-rL+r). \tag{130}$$

Отсюда получаем:

$$\frac{r_2}{r_1} = \frac{K_2}{K_1} K_d m. \tag{131}$$

На рис. 5.10 показаны изотермы адсорбции, соответствующие этому случаю. Видна любопытная «лукообразная» форма изотермы, соответствующей связыванию мономеров.

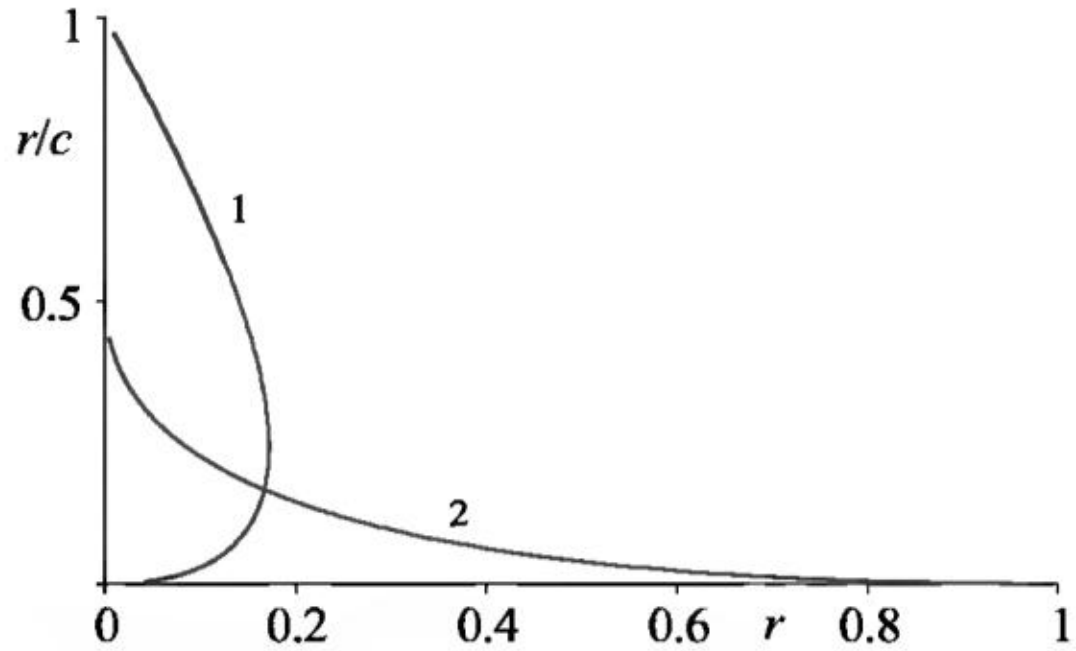

Рис. 5.10. Изотермы в представлении Скетчарда для случая, когда лиганд связывается на ДНК в форме мономера и димера. Расчеты проводились по формулам (129)–(131) для $L = 2, K_1 = K_2 = K_d = 10^4$. Кривая 1 соответствует связыванию мономера (в этом случае по осям абсцисс и ординат представлены величины r_1/m и r_1, соответственно), кривая 2 — связыванию димера (по осям $r_2/Kd\ m^2$ и 2 r_2, соответственно)

По мере роста концентрации свободного лиганда в растворе число адсорбированных мономеров вначале растет, а потом падает, так как их вытесняют димеры. Подобная необычная форма изотермы наблюдается также, если за связывающие места на ДНК конкурируют два различных лиганда (сообщение Кругловой Е.Б., см. также [13]). Заметим, что насыщение матрицы димерами в этом случае равно r_2, а полное насыщение лигандами равно $r_1 + 2\ r_2$ (так как в состав каждого димера входят два мономера). Ещё одно интересное наблюдение над этой системой состоит в том, что если представлять изотерму адсорбции в координатах (концентрация лиганда — по оси X и концентрация комплекса по оси У), то для димеров изотерма имеет S-образный вид (см. рис. 5.11).

Следует отметить, что S-образная форма кривых связывания в координатах (концентрация лиганда — по оси X и концентрация комплекса по оси У) исследователи обычно считают свидетельством такого рода кооперативных взаимодействий, которые описаны в классических работах по связыванию кислорода с гемоглобином (см. [12, 14–16]. В этом случае речь идет о взаимодействиях между реакционными центрами, занятыми лигандом (или о взаимодействиях между соседними на матрице адсорбированными лигандами). Однако в экспериментах по связыванию бис-нетропсина с поли(dA-dT) поли(dA-dT) были получены кривые S-образной формы, которые можно объяснить в рамках принципиально другой модели. Ниже мы кратко опишем эту модель, следуя работам [17–19].

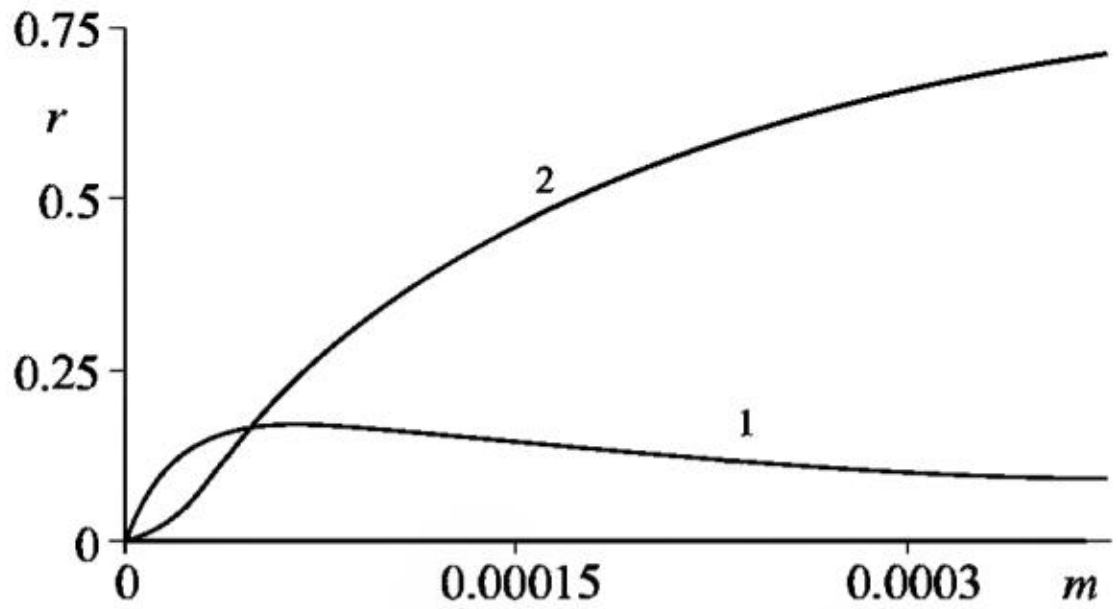

Рис. 5.11. Конкурентное связывание на ДНК димеров и мономеров. Кривые 1, 2 соответствуют 1, 2 на рис. 5.10 в другом представлении: по оси абсцисс отложена концентрация мономеров в растворе (в молях/литр), по оси ординат — заполнение ДНК мономерами (1) и димерами (2).

5.4.а Образование тримеров при связывании бис-нетропсина на ДНК

Известно, что бис-нетропсин связывается с ДНК в форме мономера и тримера, и суммарная изотерма адсорбции складывается из кривых, соответствующих связыванию этих форм. В этом случае, если следить за концентрацией связанных тримеров в растворе, можно обнаружить характерную кривую S-образной формы [17]. Ниже мы использовали схему связывания, показанную на рис. 5.12.

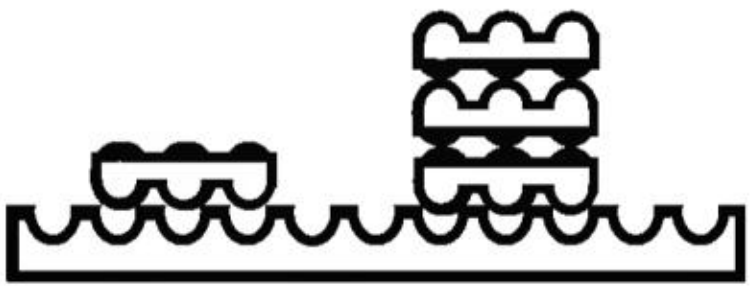

Рис. 5.12. Схема связывания, соответствующая адсорбции лиганда на матрице в форме мономера и тримера

Мы рассчитали кривые связывания мономерных и тримерных форм лиганда с ДНК для этого случая в работах [18, 19]. Результаты расчетов показаны на Рис. 5.13. Видно хорошее совпадение результатов расчетов с экспериментальными данными. Появление S-образной формы кривых можно объяснить следующим образом: при малых заполнениях матрицы лигандом образуется предпочтительно комплекс мономера лиганда с матрицей, так как этот комплекс характеризуется более высокой константой связывания. По мере роста концентрации лиганда в растворе этот комплекс вытесняется тримером, который занимает меньшее место при связывании на матрице и поэтому более выгоден с точки зрения статистической энтропии системы.

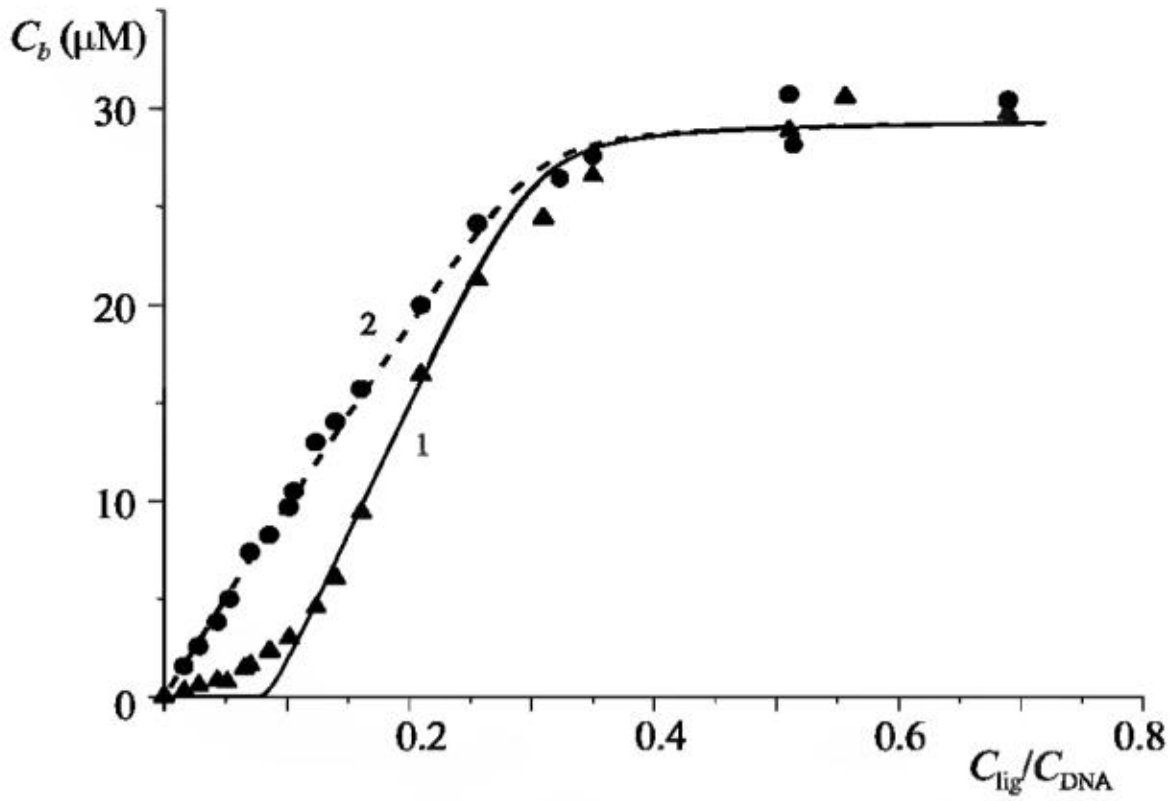

Рис. 5.13. Зависимость концентраций разных комплексов бис-нетропсина (C_b) с поли(dA-dT) поли(dA-dT) от концентрации лиганда. Экспериментальные концентрации связанных с полимером тримеров лиганда и тотальной концентрации комплексов (тримеры и мономеры) обозначены посредством ▲ и ●, соответственно. Условия эксперимента описаны в [17]. Кривые показывают концентрации комплекса лиганда на поли(dA-dT) поли (dA-dT), рассчитанные с помощью соотношений (94), (97), (98) в случае некооперативного конкурентного связывания лигандов двух типов: мономеров и тримеров бис-нетропсина, каждый из которых занимает 10 пар оснований полимера. Концентрация комплексов тримеров рассчитана как $3 \cdot r_2 \cdot C_{DNA}$ (кривая 1). Общая концентрация связанных с ДНК мономеров и тримеров лиганда равна $(r_1 + 3 \cdot r_2) \cdot C_{DNA}$ (кривая 2).

5.5. Связывание двух разных лигандов

Уравнения адсорбции для различных случаев кооперативных взаимодействий между адсорбированными лигандами можно легко получить из уравнений (94), (97), (98) аналогично тому, как были получены уравнения (112), (113), и др.

Например, в случае, когда лиганд 1-го типа адсорбируется некооперативно и не взаимодействует с лигандом 2-го типа ($\omega_{11} = \omega_{12} = \omega_{21} = 1$), а лиганд 2-го типа связывается кооперативно ($\omega_{22} = \omega$), из уравнений (94), (97), (98) получаем уравнения, аналогичные уравнениям (125):

$$\begin{cases} \dfrac{r_1}{m_1} = K_1 \left(\dfrac{1 - r_1 L_1 - r_2 L_2}{1 - r_1 L_1 - r_2 L_2 + r - \gamma \frac{\omega - 1}{\omega}} \right)^L \left(1 - r_1 L_1 - r_2 L_2 + r - \gamma \frac{\omega - 1}{\omega}\right), \\ \dfrac{r_2}{m_2} = K_2 \left(\dfrac{1 - r_1 L_1 - r_2 L_2}{1 - r_1 L_1 - r_2 L_2 + r - \gamma \frac{\omega - 1}{\omega}} \right)^L \dfrac{\omega r_2^2}{\gamma}, \end{cases} \tag{132}$$

$$(r_2 - \gamma\tfrac{\omega-1}{\omega})^2 = \frac{\gamma}{\omega}\left(1 - r_1L_1 - r_2L_2 + r - \gamma\tfrac{\omega-1}{\omega}\right), \qquad (133)$$

где $\gamma = \gamma_{22}$ — число контактов между лигандами 2-го типа. Задавая r_1 и r_2 из (133) можно найти γ, а затем при помощи системы уравнений (132) определить r_1/m_1 и r_2/m_2. Решения (132), (133) удобно представлять в трехмерном пространстве (рис. 5.13). Сечение поверхности r_2/m_2 (r_1, r_2) плоскостью r_1 =0 соответствует связыванию только второго типа лиганда. Изотерма адсорбции описывается в этом случае уравнениями (112), (113), соответствующими кооперативным взаимодействиям, при которых образуются цепочки из адсорбированных лигандов. Сечения поверхности r_2/m_2 (r_1,r_2) плоскостями r_1 = const с ростом r_1 дают кривые, имеющие все менее выраженный кооперативный характер.

Аналогичным образом можно рассмотреть уравнения $r_2/m_2(r_1, r_2)$ и $r_1/m_1(r_1, r_2)$ для различных типов кооперативных взаимодействий между адсорбированными лигандами. Они будут отличаться от уравнений (112), (113), (123), (126) только заменой K_1m на K_1m_1 и K_2m на K_2m_2.

Заметим, что уравнения, полученные нами в этой главе, были использованы в ряде работ по анализу связывания лигандов с ДНК (см., например, [20,21]). Вывод этих уравнений с помощью другого метода был повторен также в работах [11, 22].

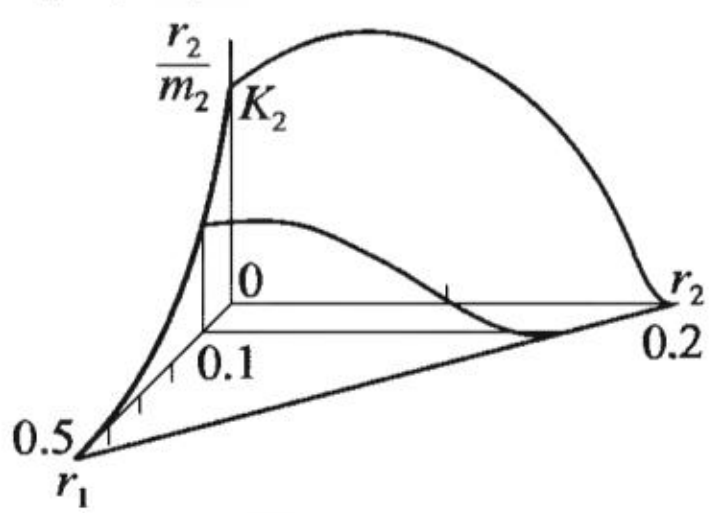

Рис. 5.14. Изотерма адсорбции лиганда 2-го типа в случае, когда между адсорбированными лигандами 2-го типа существуют кооперативные взаимодействия: ω_{22} = 10, $\omega_{11} = \omega_{12} = \omega_{21}$ =1. r_1, r_2 — заполнения матрицы лигандами 1-го и 2-го типов, m_2 — концентрация свободного лиганда 2-го типа в растворе. Поверхность $r_2/m_2(r_1, r_2)$ рассчитана при помощи уравнений (129), (130) для связывания лигандов различной длины: L_1 = 2, L_2 = 5. Показано сечение плоскостью r_1 = 0,1.

Литература

1. *Нечипуренко Ю. Д.* Кооперативные взаимодействия при связывании протяженных лигандов с ДНК. II. Контактные кооперативные взаимодействия между адсорбированными лигандами // Мол. биология. 1984. Т. 18. С. 1066–1079.

2. *Rushbrooke G. S., Ursell H. D.* // Proc. Cambr. Phil. Soc. 1948, V. 44, P. 263–271.
3. *Гурский Г. В., Заседателев А. С.* Точные соотношения, описывающие связывание регуляторных белков и других решеточных лигандов на двухспиральных полинуклеотидах // Биофизика. 1978. Т. 23. С. 932–946, см. также *Гурский Г. В., Заседателев А. С.* // В кн. Итоги науки и техники. Сер. Молекулярная биология. М. ВИНИИТИ, 1982, с. 190–237 и *Gursky G. V., Zasedatelev A. S.* Thermodynamic and stereochemical aspects of binding interactions between sequence-specific ligands and DNA // Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol. 1984. V. 5, P. 53–139.
4. *Нечипуренко Ю. Д., Заседателев А. С., Гурский Г. В.* Теория одномерной адсорбции на гомополимере. Учет различных ориентаций молекул лиганда // Биофизика. 1979. Т. 24. С. 351–361.
5. *Nechipurenko Yu.D., Gursky G. V.* Cooperative effects on binding of proteins to DNA. // Bioph. Chem. 1986. V. 24. P. 195–209.
6. *Заседателев А. С., Гурский Г. В. и Волькенштейн М. В.* Теория одномерной адсорбции. 1. Адсорбция малых молекул на гомополимере // Мол. биология. 1971. Т. 5. С. 245–490.
7. *McGhee J. D. and von Hippel P.H.* Theoretical Aspects of DNA-Protein Interactions: Co-operative and Non-co-operative Binding of Large Ligands to a One-dimensional Homogeneous Lattice // J. Mol. Biol. 1974. V. 86. P. 469–489.
8. *Epstein I. R.* Cooperative and Non-Cooperative Binding of Large Ligands to a Finite One-dimensional Lattice. A Model for Ligand-Oligonucleotide Interactions // Biophys. Chemistry. 1978. V. 8. P. 327–339.
9. *Нечипуренко Ю. Д.* Термодинамические параметры, характеризующие взаимодействия между молекулами лиганда, адсорбированными на полимере // Биофизика. 1982. Т. 27. С. 391–398.
10. *Нечипуренко Ю. Д., Заседателев А. С., Гурский Г. В.* // Кооперативные взаимодействия при связывании протяженных лигандов с ДНК. 1 Неконтактные кооперативные взаимодействия // Мол. биология 1984. Т. 18. С. 798–812.
11. *Wolfe A. R., Meehan T.* Use of binding site neighbor-effect parameters to evaluate the interactions between adjacent ligand on a linear lattice. Effects on ligand-lattice association // J. Mol. Biol. 1992. V. 223, P. 1063–1087.
12. *Monod J., Wiman J., Changeux J.-P.* // J.Mol. Biol. 1965, V. 12, P. 88.
13. *Круглова Е. Б.* // Биофизика, 2008, в печати.
14. *Hill A. V.* The possible effects of the aggregation of the molecules of the molecules of hemoglobin on the dissociation curves // J. Physiol. (London) 1910. V. 40. P. iv-vii. См. также *Hill A. V.* The combination of hemoglobin with oxygen and with carbon monoxide // Biochemistry J. 1913 V. 7. P. 471–480.
15. *Кантор Ч, Шиммел П.* Биофизическая химия. — М.: Мир, 1984, см. также *Волькенштейн М. В.* Молекулярная биофизика. — М., 1975.
16. *Wyman J., Gill S. J.* Binding and linkage. Mill Valley, California 1990.
17. *Zasedatelev A. S., Borodulin V. B., Grokhovsky S. L., Nikitin A. M., Salmanova D. V., Zhuze A. L., Gursky G. V., Shafer R. H.* // FEBS Lett. 1995. V. 375. P. 304–306.

18. *Нечипуренко Ю. Д., Стрельцов С. А., Михейкин А. Л.* Новая физическая интерпретация S-образных кривых: конкуренция между разными типами связывания лиганда с ДНК // Биофизика. 2000. Т. 45. С. 1044–1048.
19. *Nechipurenko Yu.D., Mikheikin A. L., Streltsov S. A., Zasedatelev A. S., and Nabiev I. R.* Mixed mode of ligand-DNA binding results in S-shaped binding curves // J. Biomol. Struct. and Dynam. 2001. V. 18. P. 703–708.
20. *Круглова Е. Б.* // Мол. биология. 1990. Т. 24. С. 514–523.
21. *Круглова Е. Б.* // Биофизика. 1994. Т. 39. С. 280–288.
22. *Torralba A. S. Colmenarejo G. Montero F.* Sequence distribution and intercooperativity detection for two ligands simultaneously binding to DNA // Biopolymers. 2001. V. 58. P. 562–576.

Глава 6
КЛАССИФИКАЦИЯ МОДЕЛЕЙ АДСОРБЦИИ, ОПИСЫВАЮЩИХ СВЯЗЫВАНИЕ ЛИГАНДОВ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

Применение теории адсорбции к широкому классу систем, которое продемонстрировано нами в Главах 1–5 (см. также Приложения), позволяет предложить две классификации моделей адсорбции. В первой классификации рассматриваются типы взаимодействий между лигандами, во второй - типы изменений в матрицах, происходящих при связывании лигандов. Таким образом, эти две классификации дополняют друг друга.

6.1. Типы взаимодействий между лигандами

Мы можем разделить модели адсорбции на два больших класса в зависимости от того, рассматриваются ли в модели кооперативные (антикооперативные) взаимодействия между адсорбированными по соседству на матрице лигандами (Рис. 6.1**а**) или же рассматривается взаимодействие лиганда непосредственно с лигандом, уже связанным на матрице (Рис. 6.1 **б**). Заметим, что для классификации не важен сам механизм взаимодействий между лигандами, как не важны и конкретные черты молекулярной модели комплекса лиганда с матрицей НК. Очевидно, что в зависимости от того, может ли каждый последующий лиганд связываться только на матрице или же он способен связываться «поверх» уже связанного на матрице лиганда, зависит такая важная характеристика адсорбции, как насыщающий уровень заполнения матрицы лигандом.

Когда лиганд может связываться непосредственно не только с матрицей, но и с лигандом, уже адсорбированным на матрице, наблюдается не «горизонтальное» (вдоль матрицы), а «вертикальное» (перпендикулярно матрице) взаимодействие между лигандами. Заметим, что эта ситуация весьма распространена: например, антибиотики дистамицин А, нетропсин и их производные связываются в малой бороздке ДНК в виде «сэндвича», димеров или тримеров (см. ниже, на схеме такой вариант соответствует случаю **и**)). С другой стороны, ситуация образования мостиков между мо-

лекулами НК в составе жидкокристаллической дисперсии, которая подробно описана в Приложении Б, тоже находит место в этой схеме: мостики можно рассматривать как комплексы, составленные из лигандов разного типа (на схеме такой вариант соответствует случаю (к)).

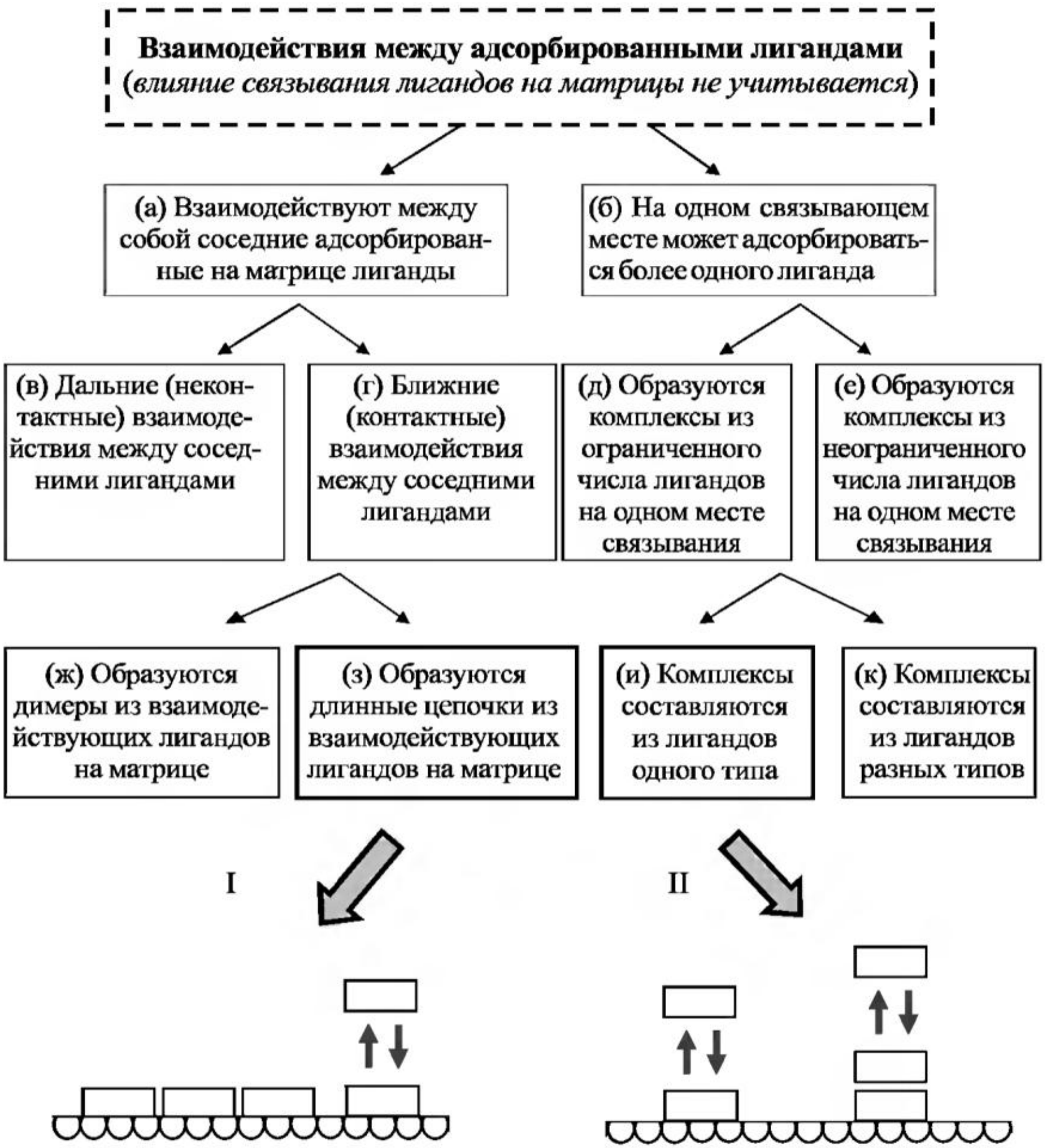

Рис. 6.1/ Классификация моделей адсорбции, описывающих взаимодействия между адсорбированными лигандами. Вверху показана схема классификации, внизу (I и II) — два примера расположения лигандов на матрице, соответствующие пунктам (з) и (и) этой классификации

Собственно кооперативные взаимодействия, как они определяются в рамках подхода ЗГВ, см. [1–4], когда речь идет о взаимодействии между ближайшими соседними адсорбированными лигандами, соответствуют на этой схеме ситуации **а)**, которая имеет несколько «конечных» вариантов — (**в, ж, з**). Все эти случаи подробно рассмотрены в Главах 4 и 5. На нижней части Рис. 6.1 проиллюстрированы два варианта взаимодействий между лигандами, соответствующих случаям **з)** и **и)** нашей классификации. Заметим, что случаю **и)** соответствует рассмотренное в Главе 5 связывание с ДНК бис-нетропсина (см. раздел 5.4 а), когда на матрице образуется тример из молекул лиганда.

Модель кооперативных взаимодействий между адсорбированными лигандами, которая лежит в основании полуэмпирического уравнения А. Хилла (см. [5–8] и Главу 1, далее мы будем называть ее «модель Хилла»), предполагает координацию адсорбированных лигандов по типу «все или ничего»: действительно, в основании этой модели полагается, что в растворе находятся в равновесии матрицы без лигандов и матрицы сразу с n адсорбированными лигандами. Нетрудно заметить, что этой модели родственна развитая нами в Приложении Б модель образования мостиков между реакционными центрами двух молекул ДНК, сближенными в пространстве и фазированными в пределах одной матрицы.

Родственные модели Хилла подходы представлены в двух классификациях: на Рис. 6.1 (см. **з)** и **и)**) и на рис. 6.2, где продемонстрированы варианты влияния связывания лиганда на матрицы (см. **е)** и **ж)**).

6.2. Типы изменений, происходящих с матрицами

Рассмотрим классификацию, представленную на Рис. 6.2. Здесь показаны варианты изменений, которые происходят с матрицей при взаимодействии её с лигандами. На первом уровне классификации можно выделить три варианта: или связывание лиганда приводит к переходу участка матрицы, граничащего с местом связывания лиганда в возмущенное состояние **(а)**, либо матрица в целом при связывании с лигандами плавно переходит из одного состояния в другое (**б**), либо матрицы, покрытые лигандами, могут вступить во взаимодействие друг с другом (или матрица при связывании лиганда становится способной к внутримолекулярным взаимодействиям), в результате взаимодействий подобного рода может происходить компактизация ДНК (**в**). Рассмотрим этот вариант более подробно: взаимодействия между матрицами могут реализоваться здесь по двум сценариям:

I. При достижении некоторого порогового значения заполнения лигандом матрица как целое переходит в измененное состояние, и уже мат-

рицы в таком состоянии взаимодействуют между собой (см. Рис. 6.2, П). Этот вариант модели применяется для описания связывания нуклеиновых кислот с полианионами, в данной работе он был применен для описания связывания ДНК с хитозаном (см. Приложение А).

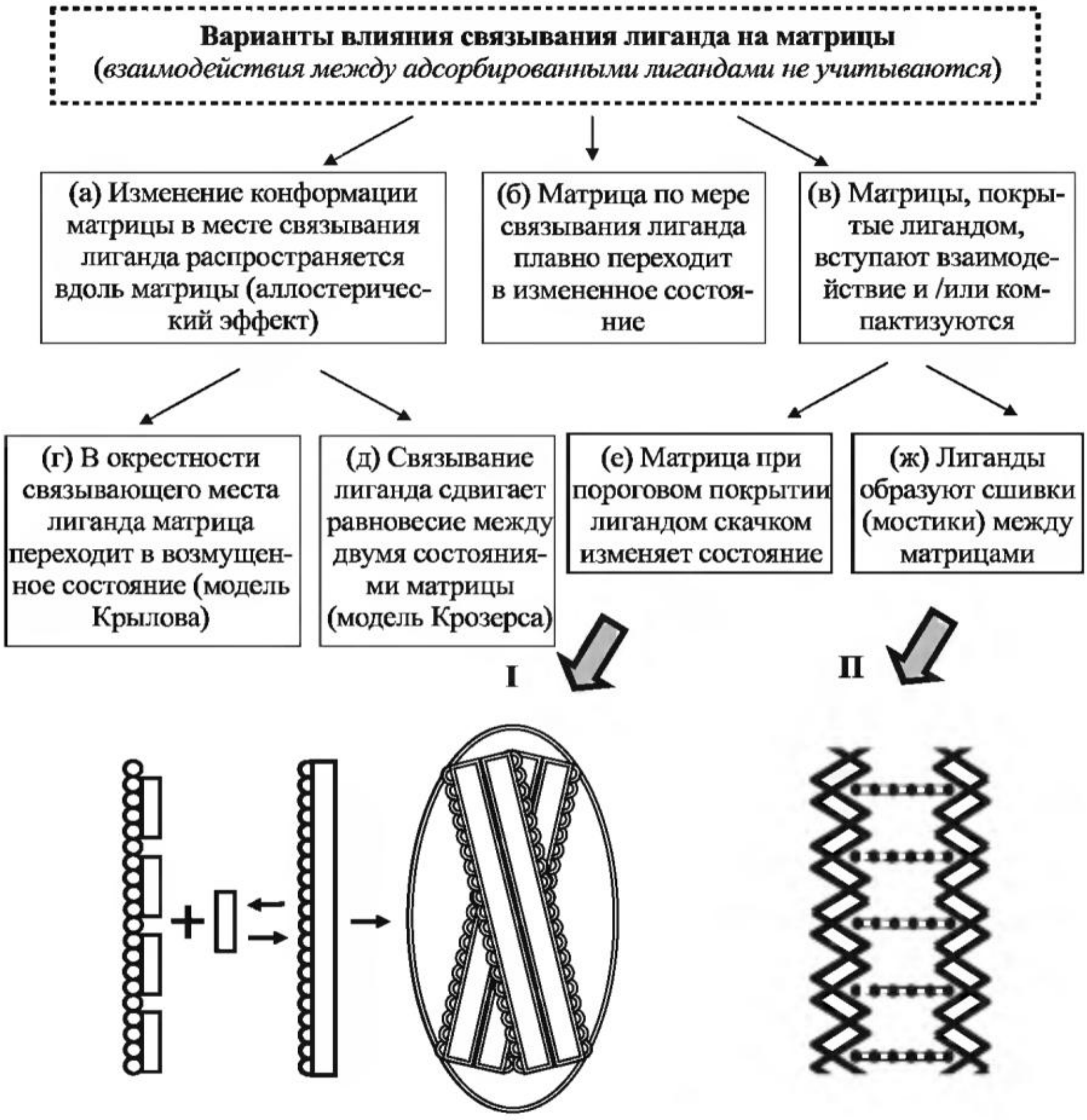

Рис. 6.2. Классификация моделей адсорбции, учитывающих влияние связывания лигандов на матрицы. Вверху показана схема классификации, внизу (I и П) — примеры, соответствующие пунктам е) и ж) этой схемы (см. также Приложения А и Б)

II. Лиганд образует сшивки (или мостики) между отдельными молекулами ДНК. Этот вариант модели применялся нами в Приложении Б для

описания связывания нуклеиновых кислот в составе ЖК дисперсии с даунномицином и ионами меди.

В работах Крылова и соавторов [9] и Крозерса и соавторов [10] было обнаружено явление, получившее название «аллостерический эффект ДНК» (по-видимому, это тот же эффект, который описали Бурд, Веллс и соавторы под именем «телестабильность» [11], мы писали об этом эффекте в Главе 4, смотри также [12–15]). Речь идет о том, что лиганд при связывании может влиять на конформационное состояние ДНК. Крылов и соавторы описали это влияние в рамках модели, в которой лиганд при связывании переводит участок ДНК в возмущенное состояние. Это возмущение может распространяться вдоль молекулы ДНК на определенное расстояние. Связывание последующих лигандов с ДНК, находящейся в возмущенном состоянии, характеризуется измененной константой (см. Главу 1, Рис. 1.8). Подобным образом аллостерический эффект описали также и Крозерс с соавторами [10]. Отличие модели Крылова от модели Крозерса заключается в том, что в первом случае предполагается, что связывание лиганда обязательно переводит участок ДНК в возмущенное состояние, а во втором предполагается, что такое связывание лишь сдвигает равновесие между двумя состояниями, в которых может находиться ДНК. В модели Крозерса постулируется, что каждая пара оснований ДНК может находиться в двух состояниях: обычном и возмущенном, оба этих состояния могут наблюдаться и в ДНК, на которой не адсорбировано ни одного лиганда. При связывании лиганда равновесие сдвигается в сторону возмущенного состояния. Переход пары оснований ДНК из обычного в возмущенное состояние характеризуется определенной энергией, возникновение границы между возмущенным и обычным состоянием тоже описывается с помощью энергетического сомножителя [10].

В нашей классификации мы включили модели Крылова и Крозерса в пункты **г)** и д), описывающие варианты аллостерического эффекта ДНК. Следует отметить, что здесь можно было бы продолжить классификацию: дело в том, что аллостерическим эффектом также принято сейчас называть влияние связывания лигандов по узкой бороздке на связывание по широкой бороздке. Такое влияние было обнаружено еще в 1992 году в работе, сделанной под руководством Гурского и Кирпичникова [12], недавно этому эффекту была посвящена работа, сделанная в лаборатории Дервана [13].

Модель Крылова и соавторов [9] формально описывается при помощи потенциала парных взаимодействий между ближайшими соседними адсорбированными лигандами, который был введен в рассмотрение Заседателевым и соавторами (см. также главу 4). При таком описании неважно,

каков механизм взаимодействия между адсорбированными лигандами: рассматривается ли переход матрицы в возмущенное состояние или какой-то иной механизм взаимодействия между лигандами. Мы уже замечали, что классификации, представленные на схемах 1 и 2, частично перекрываются: так некоторые события, происходящие с матрицей, можно формально описать в виде потенциалов, характеризующих связывание лигандов.

Для иллюстрации возможного механизма аллостерических взаимодействий между адсорбированными на ДНК белками на рис. 6.3 мы приведем схему связывания, соответствующую модели Рудника и Брунсмы [16]. В этой работе развиты представления о связывании с ДНК так называемых «архитектурных белков», которые создают при связывании локальные изгибы в ДНК (известно, что подобным образом ведут себя, например, гистоны). Авторы показали, что изгибы в ДНК приводят к появлению кооперативных взаимодействий между удаленными адсорбированными белками. Эти взаимодействия обусловлены возникновением напряжений в двойной спирали ДНК. Использование для ДНК модели червеобразной цепочки ("worm-like chain" [17, 18]) позволяет оценить энергии взаимодействий между лигандами. При связывании с ДНК белков, которые вызывают упругие напряжения в ДНК, могут возникать как кооперативные, так и антикооперативные взаимодействия между белками — в зависимости от взаимного расположения белков. Рис. 6.3 демонстрирует два типа расположения белков на ДНК, приводящие к кооперативным эффектам разного рода.

Такие кооперативные эффекты могут быть описаны формально при помощи дальнодействующих потенциалов или в рамках той или иной модели, описывающей аллостерический эффект ДНК. Заметим, что в работе Рудника и Брунсмы [16] сформулированы представления о том, что есть два типа влияния адсорбированного лиганда на ДНК — искажение структуры двойной спирали непосредственно в месте связывания (например, изломы длинной оси двойной спирали — «кинки») и изменение модуля жесткости молекулы ДНК, которое распространяется на некоторое расстояние от связывающего места. Сейчас эти представления можно считать общепринятыми, однако впервые возможность подобного «двойного» эффекта влияния связывания лиганда на свойства молекулы ДНК была показана в нашей работе в соавторстве с Крыловым, Гурским и Заседателевым [15]. В этой работе речь шла о том, что при детальном описании кооперативных взаимодействий между адсорбированными на ДНК молекулами дистамицина А прослеживается зависимость такого рода эффектов от АТ состава молекулы ДНК и обнаруживаются взаимодействия между адсорбированными молекулами дистамицина А, которые имеют разный характер на близких и дальних расстояниях. Отметим также известный

факт, что способность ДНК к изгибам связана с наличием А-трактов (последовательностей из аденинов) [19] и таким образом, АТ состав молекулы ДНК с одной стороны определяет модуль жесткости двойной спирали, а с другой — характер кооперативных взаимодействий между лигандами.

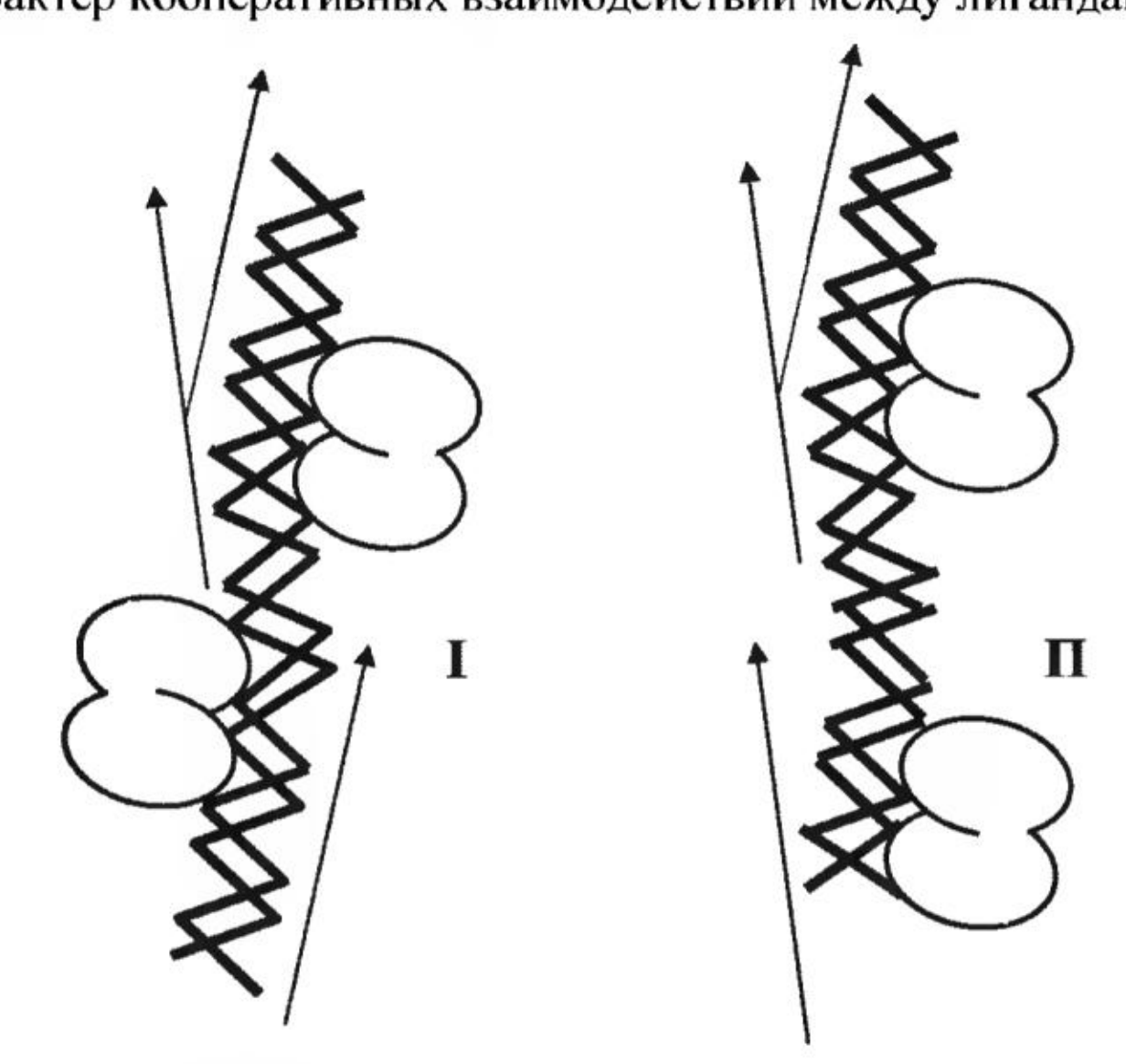

Рис. 6.3. Два типа взаимного расположения белков на ДНК. Связывание каждого белка вызывает излом длинной оси ДНК. Слева показано расположение двух молекул белка на ДНК, связанных осью симметрии П порядка, проходящей перпендикулярно плоскости рисунка, справа — расположение, когда молекулы связаны трансляционной симметрией. В работе [16] показано, что эти два различных расположения приводят к возникновению кооперативных и антикооперативных взаимодействиям между адсорбированными белками

Большая часть позиций в классификациях на схемах, представленных на рис. 6.1 и рис. 6.2 являются независимыми в том смысле, что событиям, которые происходят с матрицей, могут сопутствовать разные потенциалы взаимодействия между лигандами. Например, матрицы могут взаимодействовать между собой независимо от того, кооперативно или некооперативно связываются на каждой из них лиганды. Одна позиция **е)** на Рис. 6.2 может быть сопряжена с тремя разными позициями **ж), з), и)** на Рис. 6.1.

Аллостерический эффект можно рассматривать как особый случай, который может быть представлен в двух классификациях. Интересно, что в каждой из классификаций есть случаи взаимодействий, соответствующие

фазовым переходам. Возможность существования фазового перехода при наличии определенного типа дальних кооперативных взаимодействий (Рис. 6.1 в) показали в своих работах Рейтер и Эпштейн [20], а возможность существования фазового перехода при существовании общего потенциала взаимодействий (Рис. 6.2 б) показали Ландо и Тэйф [21, 22]. Существование фазового перехода может быть обусловлено также наличием взаимодействий между матрицами, покрытыми лигандом (случай **е)** на Рис. 6.2), этот случай мы рассмотрели в Приложении А и более подробно в работе [23]. Такие явления в живой клетке, как переход хроматина из нетранскрибируемого в транскрибируемое состояние напоминают фазовый переход, поэтому модели, в которых возможен такой переход, заслуживают особого внимания.

Несомненно, что предложенная здесь классификация кооперативных взаимодействий не претендует на окончательность и завершенность. С изучением разнообразных экспериментальных систем связывания лигандов с нуклеиновыми кислотами наши представления о вариантах кооперативных взаимодействий между лигандами будут расширяться. До настоящего времени нами была обнаружена лишь одна классификация кооперативных взаимодействий между разными адсорбированными на ДНК лигандами. В работе Миллера и Виндома [24] такая классификация была приведена для объяснения конкурентных взаимодействий регуляторных белков с нуклеосомами. Следует заметить, что эта классификация весьма неполна — она вводит в рассмотрение только два типа взаимодействий между лигандами: контактные и опосредованные конкуренцией за одни и те же места связывания.

Наша классификация в свернутой, простейшей форме была предложена впервые еще в середине 1980-х годов в серии публикаций в журналах «Биофизика» и «Молекулярная биология» ([25, 26], см. также [14]). Эта классификация родилась из наблюдений над экспериментальными системами, в которых изучалось связывание лекарственных веществ и искусственно сконструированных соединений с ДНК. Анализ изотерм адсорбции, проведенный в работах [9, 15] показал, что разного рода кооперативным взаимодействиям соответствуют, вообще говоря, разные формы изотерм адсорбции. Встал вопрос о том, как можно на основании формы кривой связывания сделать вывод о типе модели адсорбции и оценить параметры кооперативных взаимодействий между адсорбированными лигандами. В данном случае речь идет о так называемой «обратной» задаче — восстановлении модели адсорбции по кривым связывания. Классификация кооперативных взаимодействий представляется необходимым этапом решения этой задачи.

В работе Бергруна и Сауэра [27] показано, что кооперативные взаимодействия играют принципиально важную роль при связывании репрессора Mnt с оператором в бактериофаге P22. Репрессор может образовывать тетрамерную форму и в растворе и на ДНК, но при связывании с двумя операторными участками ДНК происходит более эффективная кооперативная тетрамеризация репрессора. Связывание второго димера репрессора со вторым оператором вызывает релаксацию напряжения в комплексе первый димер репрессора -первый оператор и выделяется значительная энергия (около 5 ккал/моль), которая позволяет более точно отличить специфичное связывание от неспецифичного. Авторами была построена точная количественная модель, описывающая связывание репрессора Mnt с операторными участками и проведены физико-химические эксперименты в растворе с интактным и мутантным репрессорами. Эти эксперименты позволили оценить энергии связывания димеров Mnt с операторами и энергии кооперативных взаимодействий между димерами.

Связывание лигандов, когда образуются цепочки из чередующихся лигандов двух типов, соединяющих между собой две матрицы (см. Приложение Б), можно также рассмотреть как пример, который отчасти принадлежит двум схемам классификации: (Рис. 6.1, вариант **к)**, рис. 6.2, вариант **ж)**). В этом случае цепочки из лигандов начинаются на одном реакционном центре матрицы и заканчиваются на другом, расположенном напротив первого. Матрица составляется из двух молекул ДНК, расположенных параллельно в квазинематической плоскости жидкокристаллической дисперсии. Для такой ситуации мы ввели представление о «координированной» адсорбции, в том смысле, что направление роста цепочки из чередующихся лигандов координируется взаимным расположением реакционных центров матрицы (см. Приложение Б).

Связывание факторов, регулирующих экспрессию на ДНК, можно рассматривать как пример координированной адсорбции. Адсорбция в данных случаях может координироваться не только расположением мест связывания: благодаря кооперативным взаимодействиям происходит взаимная координация разных молекул лиганда, адсорбированных на ДНК. Дальнейшее развитие представлений о координированной адсорбции кажется нам необходимым для описания реальной ситуации в клетке, где молекулы ДНК покрыты большим числом разного рода лигандов. В этом случае может оказаться полезным привлечение представлений, развитых в монографии Анатолия Власова [28].

В работах Владимира Тэйфа [29] проведена обширная классификация взаимодействий между лигандами: факторами транскрипции, активаторами и репрессорами экспрессии генов. В значительной степени классифика-

ция Тэйфа повторяет представленную выше, новым в этой классификации является рассмотрение большего числа регуляторов («введение новых игроков», обусловленное сложными процессами регуляции экспрессии) и учет механизма регуляции по типу «свиного хвостика», предложенного Ченом и соавторами для ДНК-гиразы [30]. Хотелось бы также обратить внимание на недавнюю работу Папаценко и соавторов [31] , в которой рассматривается модель регуляции, позволяющая успешно описать эмбриональное развитие зародыша дрозофилы. Однако во всех этих работах не учитываются факторы, связанные со статистическим характером адсорбции (см. [32]).

Литература

1. *Заседателев А. С., Гурский Г. В. и Волькенштейн М. В.* Теория одномерной адсорбции. 1. Адсорбция малых молекул на гомополимере // Мол. биология. 1971. Т. 5. С. 245–490.
2. *Гурский Г. В., Заседателев А. С. и Волькенштейн М. В.* Теория одномерной адсорбции. II. Адсорбция малых молекул на гетерополимере // Мол. биология. 1972. Т. 6. С. 479–489.
3. *Гурский Г. В., Заседателев А. С.* Точные соотношения, описывающие связывание регуляторных белков и других решеточных лигандов на двухспиральных полинуклеотидах // Биофизика. 1978. Т. 23. С. 932–946. см. также *Гурский Г. В., Заседателев А. С.* // В кн. Итоги науки и техники. Сер. Молекулярная биология. — М. ВИНИИТИ, 1982. — С. 190–237.
4. *Gursky G. V., Zasedatelev A. S.* Thermodynamic and stereochemical aspects of binding interactions between sequence-specific ligands and DNA // Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol. 1984. V. 5, P. 53–139.
5. *Hill A. V.* The possible effects of the aggregation of the molecules of the molecules of hemoglobin on the dissociation curves // J. Physiol. (London) 1910. V. 40. P. iv–vii.
6. *Hill A. V.* The combination of hemoglobin with oxygen and with carbon monoxide // Biochemistry J. 1913. V. 7. P. 471–480.
7. *Кантор Ч, Шиммел П.* Биофизическая химия. — М.: Мир, 1984.
8. *Wyman J., Gill S. J.* Binding and linkage. Mill Valley, California 1990.
9. *Krylov A. S., Grokhovsky S. L., Zasedatelev A. S., Zhuze A. L., Gursky G. V., Gottikh B. P.* // Nucleic Acids. Res. 1978. V. 6. P. 289.
10. *Hogan M., Dattagupta N., Crothers D. M.* // Nature. 1979.V. 278. P. 521–524, см. также *Dattagupta N., Hogan M., Crothers D. M.* Interaction of netropsin and distamycin with deoxyribonucleic acid: electric dichroism study // Biochemistry. 1980. V. 19. P. 5998–6005.
11. *Burd J. F., Wartell R. M., Dodgson J. B., & Wells R. D.* Transmission of stability (telestability) in deoxyribonucleic acid. Physical and enzymatic studies on the du-

plex block polymer d(C15A15)-d(T15G15) //Journal of Biological Chemistry. 1975. V. 250. P. 5109–5113.
12. *Gursky G. V., Surovaya A. N., Kurochkin A. V., Chernov B. K., Volkov S. K., Kirpichnikov M. P.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 1992. V. 10. P. 15–33.
13. *Nguyen-Hackley D. H., Ramm E., Taylor C. M., Joung J. K., Dervan P. B., Pabo C. O.* Allosteric inhibition of zinc-finger binding in the major groove of DNA by minor-groove binding ligands. // Biochemistry. 2004. V. 43. P. 3880–3890.
14. *Нечипуренко Ю. Д., Гурский Г. В.* Термодинамические модели связывания лигандов с ДНК // Биофизика. 2003. Т. 48. С. 773–796.
15. *Нечипуренко Ю. Д., Крылов А. С., Заседателев А. С., Гурский Г. В.* // Мол. биология. 1984. Т. 18. С. 332–342.
16. *Rudnick J., Bruinsma R.* DNA-Protein Cooperative Binding through Variable-Range Elastic Coupling // Biophys. J. 1999. V. 76. P. 1725–1733.
17. *Hagerman P. G.* Investigation of the flexibility of DNA using transient electric birefringence // Biopolymers. 1981. V. 20. P. 1503–1535.
18. *Kam Z., Borochev N., Eisenberg H.* Dependence of laser light backscattering of DNA on NaCl concentration // Biopolymers 1981.V. 20. P. 2671–2690.
19. *Goodsell D. S., Dickerson R. E.* Bending and curvature calculations in B-DNA. //NAR. 1994. V. 22. P. 5497–5503.
20. *Reiter J., Epstein I. R.* Bimodality in the cooperative binding of ligands to molecules with miltiple binding sites. // J. Phys. Chem. 1987. V. 91. P. 4813–4820.
21. *Lando D., Teif V.* // J. Biomol. Struct. & Dynamics. 2000. V. 17. P. 903–911.
22. *Teif V. B., Haroutiunian S. G., Vorob'ev V. I., et al.* Short-range interactions and size of ligands bound to DNA strongly influence adsorptive phase transition caused by long-range interactions. // J. Biomol. Struct. and Dynam. 2002. V. 19. P. 1093–1100.
23. *Нечипуренко Ю. Д., Вольф А. М., Салянов В. И., Евдокимов Ю. М.* Равновесная адсорбция лигандов на молекулах ДНК (на примере хитозана) // ЖЭТФ. 2004. Т. 125. С. 103–111.
24. *Miller J. A., Widom J.* Collaborative competition mechanism for gene activation in vivo // Mol Cell Biol. 2003 V. 23. P. 1623–1632.
25. *Нечипуренко Ю. Д., Заседателев А. С., Гурский Г. В.* // Кооперативные взаимодействия при связывании протяженных лигандов с ДНК. 1 Неконтактные кооперативные взаимодействия. // Мол. биология 1984. Т. 18. С. 798–812.
26. *Нечипуренко Ю. Д.* Кооперативные взаимодействия при связывании протяженных лигандов с ДНК. П. Контактные кооперативные взаимодействия между адсорбированными лигандами. // Мол. биология. 1984. Т. 18. С. 1066–1079.
27. *Berggrun A., Sauer R. T.* Contributions of distinct quaternary contacts to cooperative operator binding by Mnt repressor // PNAS. 2001. V. 98. P. 2301–2305.
28. *Власов А. А.* Нелокальная статистическая механика. — М., 1978.
29. *Teif V. B.* General transfer matrix formalism to calculate DNA–protein–drug binding in gene regulation: application to O_R operator of phage λ // NAR, 2007, V. 35,

e80. 30. см. также *Teif VB.* Predicting gene-regulation functions: lessons from temperate bacteriophages. Biophys J. 2010 98. P. 1247–1256.
30. *Chen Y., Maxwell A., Westerhoff H. V.* // J. Mol. Biol.,1986, V. 190, P. 201–214.
31. *Zinzen R. P., Papatsenko D.* Enhancer responses to similarly distributed antagonistic gradients in development // PLoS Comput. Biol., 2007, 3, e84.
32. *Головкин М. В., Нечипуренко Ю. Д., Гурский Г. В.* Статистические флуктуации в уровне заполнения репрессором оператора определяют величину экспрессии репортерного гена. Биофизика 2009, Т. 54, С. 581–588.

Глава 7
РАСЧЁТ ПРОФИЛЕЙ ВЕРОЯТНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ С ДНК И АНАЛИЗ ДИАГРАММ ФУТ-ПРИНТИНГА

7.1. Неспецифическое связывание протяженных лигандов

Метод фут-принтинга позволяет получать информацию о расположении белков и биологически активных лигандов на фрагментах ДНК. Анализ такой информации затруднен в том случае, если белок может занимать много альтернативных мест связывания на ДНК и в суммарную картину вносит вклад множество различно расположенных белков на фрагменте ДНК. Тогда следует учитывать статистические факторы, обусловленные конкуренцией мест связывания за молекулу белка. В ряде работ были развиты модели и получены соотношения, позволяющие количественно анализировать диаграммы фут-принтинга и восстанавливать энергии взаимодействий белков и белковых комплексов с разными местами связывания на ДНК и между собой [1–3].

Особый интерес представляет тот случай, когда рассматривается расположение гистоновых октамеров на ДНК. Большое число работ посвящено проблеме фазировки расположения гистоновых октамеров на ДНК (см., например, обзор Тейфа [4]). В классической работе Корнберга [5] было высказано предположение, что определенная упорядоченность расположения октамеров на ДНК будет наблюдаться и в том случае, когда сами октамеры неспецифичны к последовательности нуклеотидов, а фазировка обусловлена специальными регуляторными белками, которые, связываясь на ДНК, создают граничные условия для расположения октамеров. Благодаря таким, например, стерическим условиям будет наблюдаться определенная периодичность в расположении октамеров на некотором расстоянии от адсорбированного регуляторного белка. Корнберг и Страйер промоделировали такую ситуацию теоретически [6]. Они рассматривали связывание гистоновых октамеров на фрагментах ДНК при условии, что белки не могут «свешиваться» с края фрагмента (это условие аналогично ситуации, когда границу фрагмента задает прочно связанный на ДНК регуля-

торный белок). Однако метод, развитый в их работе, не позволял рассчитывать разброс между наблюдениями расположения гистоновых октамеров на ДНК от фрагмента к фрагменту, обусловленный тем, что на разных фрагментах может быть адсорбировано, вообще говоря, разное число молекул белка. В таком случае возникает неоднозначность в картинах расположения белков на ДНК.

Ниже будет развит метод, позволяющий учитывать влияние такой неоднозначности и вычислять дисперсии вероятностей расположения лигандов на ДНК. Мы промоделируем ситуацию, когда эксперимент по анализу расположения белков на ДНК проводится в растворе, однако общие принципы анализа расположения белков в ситуации, когда на одном фрагменте ДНК может быть связано разное число молекул белка, могут быть применены и для анализа расположения белков на ДНК *in vivo*.

Вначале мы рассмотрим связывание на гомополимере, затем продемонстрируем применение развитого метода для анализа связывания биснетропсина на фрагменте ДНК с известной последовательностью пар нуклеотидов.

Рассмотрим стандартную физическую модель адсорбции. Пусть в растворе при постоянной температуре и постоянном давлении находятся молекулы ДНК с адсорбированными лигандами и свободные молекулы белка-лиганда. Молекула ДНК представляет собой линейную матрицу из N центров (в качестве таких центров могут выступать элементы пар оснований или сахаро-фосфатного остова ДНК). При связывании каждый лиганд занимает подряд L центров матрицы, которые становятся недоступными для связывания с другими молекулами лиганда. Мы будем называть эти L центров местом связывания, причем первое из таких мест представляет собой непрерывную последовательность из первых L центров матрицы. Заметим, что последние два условия означают, что запрещено перекрывание мест связывания адсорбированных лигандов и запрещено «свешивание» лиганда на концах матрицы.

Обозначим через K константу химического равновесия для связывания лиганда на произвольном месте связывания. Мы рассмотрим ситуацию, когда константы связывания одинаковы для всех мест на ДНК. Эта модельная ситуация позволит нам подробно исследовать влияние граничных условий на расположение лигандов на фрагменте ДНК.

Обозначим через $P(i)$ вероятность того, что i-е место связывания занято адсорбированной молекулой лиганда, т. е. лиганд закрывает с $(i - L + 1)$-го по i-й центр полимера. Тогда из каждых 100 молекул ДНК, находящихся в растворе, в среднем у 100 $P(i)$ такое место занято лигандом.

Обозначим через $F(i)$ вероятность того, что i-й центр матрицы не закрыт лигандом.

В силу того обстоятельства, что в растворе сосуществуют молекулы ДНК с различным числом адсорбированных лигандов, сами величины вероятностей будут принимать разные значения в зависимости от того, сколько молекул лиганда адсорбировано на молекуле ДНК, для которой мы измеряем эти величины. Из-за этого появляется неопределенность в значениях $P(i)$ и $F(i)$. Мерой такой неопределенности будут выступать в нашем рассмотрении величины дисперсий $D_P(i)$ и $D_F(i)$ соответственно.

Рассмотрим ансамбль невзаимодействующих систем, каждая из которых представляет собой молекулу ДНК длиной из N центров и способна адсорбировать в насыщении $q_{\max} = [N/L]$ молекул лиганда. В главе 2 мы писали, что равновесные свойства такого ансамбля систем полностью определяются, если рассчитана большая статистическая сумма Ξ_N, которая для случая неспецифического связывания может быть представлена в следующем виде [7]:

$$\Xi_N = \sum_{q=0}^{q_{\max}} (Km)^q Z_q, \tag{134}$$

где Z_q — каноническая статистическая сумма для полимера, на котором адсорбировано q молекул лиганда, m — абсолютная активность лиганда в растворе. Для данной системы Z_q является числом различных возможных расположений q адсорбированных лигандов на матрице длины N:

$$Z_q = C^q_{N-qL+q}, \tag{135}$$

Условимся, что $Z_0 = 1$.

Каждый член статистической суммы (134) пропорционален вероятности описываемого им состояния термодинамической системы. Мы обозначили такую вероятность в главе 3 через $\Phi(q)$ (см. соотношение (27)):

$$\Phi(q) = \frac{C^q_{N-qL+q}(Km)^q}{\sum\limits_{n=0}^{q_{\max}} C^q_{N-nL+n}(Km)^n}, \tag{136}$$

где $q = 0, 1, \ldots, q_{\max}$.

Функция $\Phi(q)$ задает статистический вес комплекса {ДНК + q адсорбированных лигандов}.

Пусть $P_q(i)$ — вероятность того, что i-е место связывания занято лигандом при условии, что на ДНК адсорбировано ровно q лигандов. Вероятностные картины расположения адсорбированных лигандов на ДНК $P_q(i)$ для каждого q назовем модами.

Число возможных расположений q белков на ДНК равно Z_q (см. (135). Зафиксируем один белок на i-ом месте. Пусть $Z_q(i)$ — число возможных

расположений q белков на ДНК при условии, что на i-ом месте связан один из q белков. В работе [2] дан вывод соотношения, позволяющего рассчитывать $Z_q(i)$.

Вероятность того, что при заданном q на i -м месте связан лиганд, равна:

$$P(i) = \frac{Z_q(i)}{Z_q}, \tag{137}$$

где $i = L, L+1, ..., N$.

Просуммировав все моды с учетом их статистического веса, можно получить вероятностную картину распределения связанных лигандов на ДНК при заданной концентрации свободных лигандов в растворе m:

$$P(i) = \sum_{q=0}^{q_{\max}} \Phi(q) P_q(i), \tag{138}$$

где $i = L, L+1, ..., N$.

Звено полимера может быть либо свободным, либо занятым:

$$F_q(i) + \sum_{j=0}^{L-1} P_q(i+j) = 1. \tag{139}$$

Из уравнения (139) можно получить вероятность того, что i-е звено полимера свободно при условии, что на полимере связано ровно q лигандов. Принимая во внимание вес каждого комплекса в растворе (136) и вероятность того, что данное звено полимера свободно,

$$F(i) = \sum_{q=0}^{q_{\max}} \Phi(q) F_q(i), \tag{140}$$

где $i = 1, 2, ..., N$.

Соотношения (136)–(140) позволяют вычислить дисперсии величин $P(i)$ и $F(i)$:

$$D_P(i) = \sum_{q=0}^{q_{\max}} \Phi(q) P_q^2(i) - P^2(i), \tag{141}$$

$$D_F(i) = \sum_{q=0}^{q_{\max}} \Phi(q) F_q^2(i) - F^2(i), \tag{142}$$

Среднее число адсорбированных на полимере лигандов в расчете на пару оснований (заполнение ДНК лигандом) r равно:

$$r = \frac{\langle q \rangle}{N} = \sum_{i=L}^{N} P(i), \tag{143}$$

Рассмотрим на примере, как получается суммарная картина распределения $P(i)$. Пусть длина ДНК $N = 40$ парам нуклеотидов и белок закрывает при связывании $L = 8$ пар нуклеотидов. Тогда при максимальном заполнении на ДНК будет связано $q_{\max} = [N / L] = 5$ белков. При некоторой концентрации белка в растворе будут встречаться фрагменты ДНК без адсорбированных белков, с одним, двумя, ..., и пятью адсорбированными белками (см. рис. 7.1). Каждому из таких фрагментов будет соответствовать свой профиль вероятностей расположения белков $P_q(i)$ (рис. 7.1 б). Суммарный, или усредненный, профиль вероятностей расположения белков на ДНК получается в результате суммирования отдельных профилей, или мод, $P_q(i)$ для каждого из таких фрагментов.

На рис. 7.2 показано, как меняются профили вероятности расположения белков при изменении длины фрагмента ДНК и постоянной концентрации свободного белка-лиганда в растворе. В точках, далеких от границ фрагмента, при $N \to \infty$ вероятность $P(i) \to r$, а дисперсия $D_P(i) \to 0$. Из рис. 7.2 видно, что при увеличении N суммарная картина $P(i)$ расположения белков постепенно переходит в моду $P_q(i)$ и что дисперсия уменьшается и в точках вблизи границ фрагмента. Дело в том, что при увеличении N соседние моды все менее отличаются друг от друга, и ширина функции распределения $\Phi(q)$ в расчёте на одну пару оснований ДНК, которую мы обозначаем $f(x)$, уменьшается: ширина $\Phi(q)$ пропорциональна $\sqrt{\sigma^2_N}$ (смотри выражение (29) из главы 3), $\sqrt{\sigma^2_N} \sim \sqrt{N}$, в то время как ширина $f(x) \sim 1/\sqrt{N}$.

На рис. 7.2 *г* представлена мода, соответствующая фрагменту ДНК размером $N = 2000$ пар нуклеотидов и числу адсорбированных лигандов $q = 30$. Характерное чередование минимумов и максимумов на картинах вероятностного расположения белков вблизи границ является следствием влияния граничных условий на места связывания. Для объяснения таких чередований введем в рассмотрение условный параметр системы — силу давления, с которой лиганды действуют друг на друга. Эта сила обусловлена статистическими свойствами системы, она имеет энтропийный характер. Адсорбированные лиганды ведут себя как решеточный газ частиц с исключенным объемом (связывающие места соседних лигандов на матрице не могут перекрываться).

На лиганд, который находится вблизи границы, «давят» все остальные лиганды и «подталкивают» его к границе, в которую он «упирается» (поскольку не может свешиваться). Поэтому самая большая вероятность связывания лиганда — на первом и последнем местах связывания полимера ($i = L$ и $i = N$, см. рис. 7.2 *г*).

Вероятность связывания в области от $i = L$ до $i = 2\,L$ уменьшается тем быстрее, чем больше лигандов адсорбировано на полимере, потому что

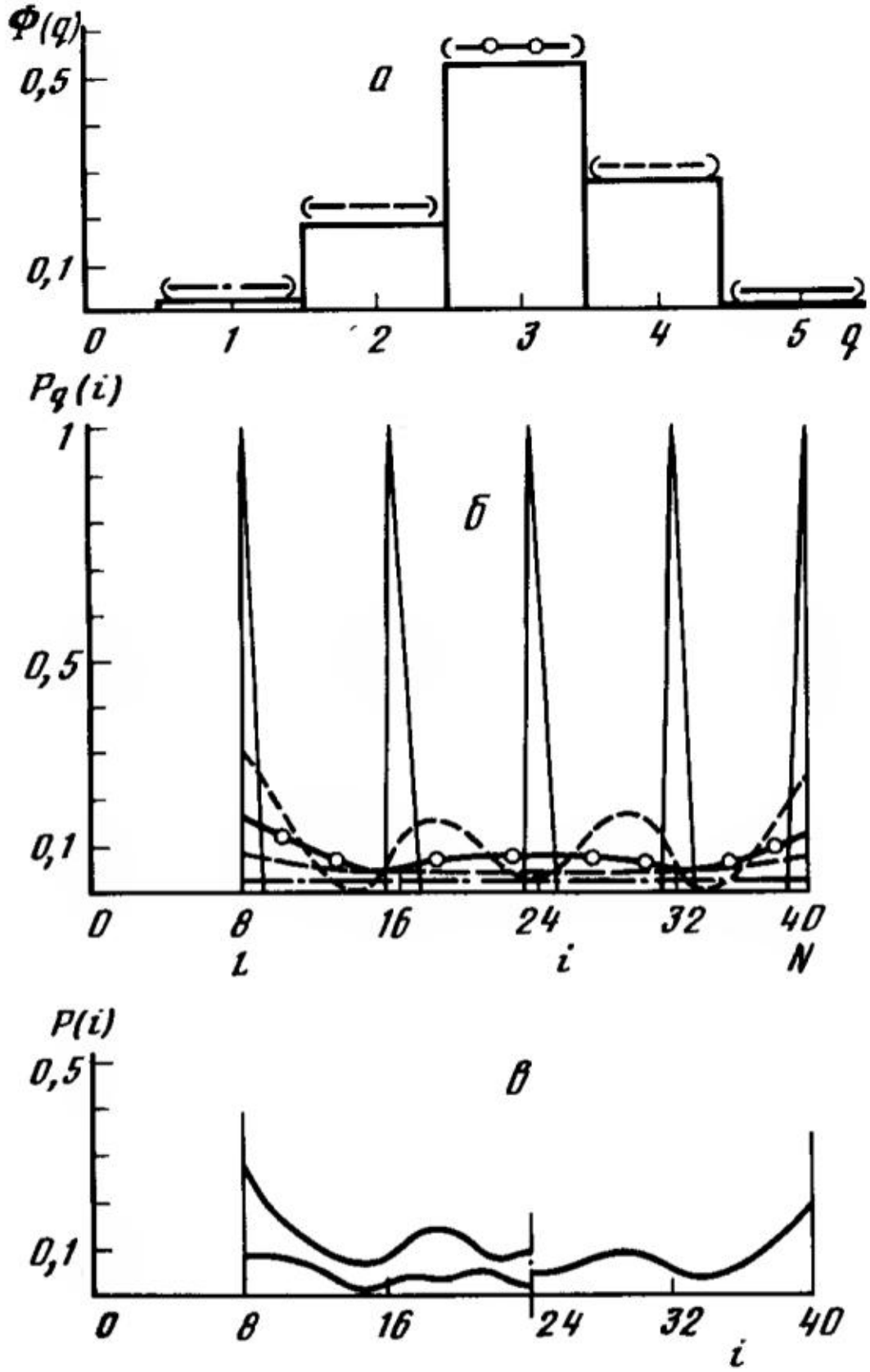

Рис. 7.1. Профили вероятностей расположения белков на матрице.
Рассматривается случай, когда длина матрицы 40 пар нуклеотидов, белок закрывает при связывании 5 нуклеотидов, $Km \sim 1$:

а — в растворе встречаются матрицы без адсорбированных белков, с одним, двумя, тремя, четырьмя и пятью адсорбированными белками ($q = 1 - 5$ соответственно). $\Phi(q)$ — вероятность обнаружить в растворе матрицу с q связанными белками;

б — профили вероятностей расположения белка на i-м месте матрицы $P_q(i)$ для каждой из таких матриц;

в — профиль вероятности расположения белка на i-м месте связывания, полученная суммированием вероятностей $P_q(i)$ с учетом их статистических весов $\Phi(q)$. Справа — вероятность $P(i)$, слева — $P(i) + \sqrt{\sigma^2_P(i)}$ и $P(i) - \sqrt{\sigma^2_P(i)}$

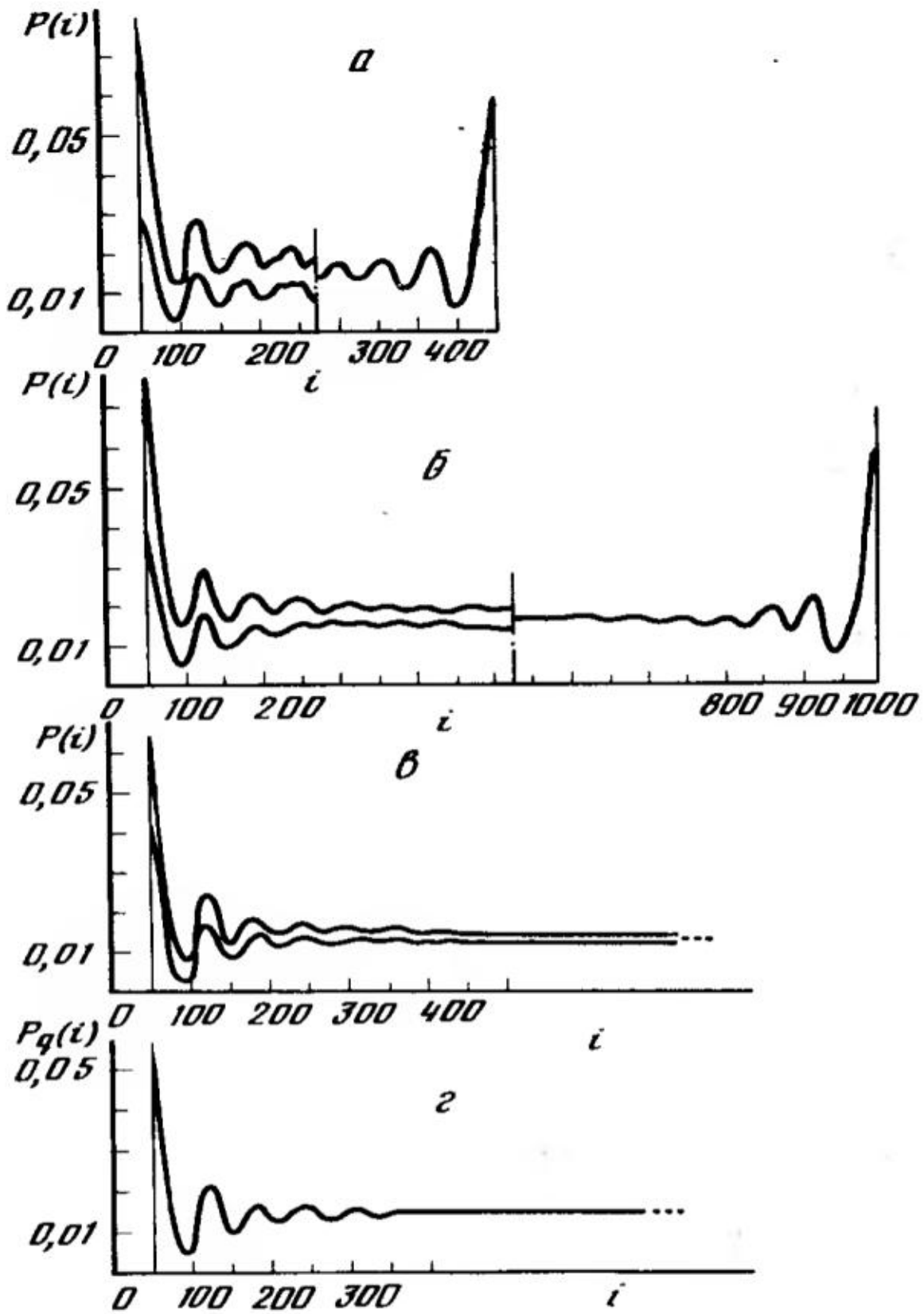

Рис. 7.2. Профили вероятностей расположения белков на матрицах различной длины, позволяющие определять области влияния на связывание граничных условий. Кривые рассчитаны при следующих значениях параметров: $L = 50$, $Km = 1$, $r = \langle q \rangle / N = 0{,}015$. *а–в* — значения $P(i)$ и $P(i) \pm \sqrt{\sigma^2_P(i)}$ для фрагментов ДНК длиной $N = 500$, 1000 и 2000 пар нуклеотидов соответственно; *г* — вероятности $P_q(i)$ расположения белков на фрагменте ДНК длиной $N = 2000$, когда на фрагменте адсорбировано $q = 30$ белков (что соответствует $\langle q \rangle = r\,N$ на рис. 7.1в)

со стороны границы на лиганд, который связан между $i = L$ и $i = 2\,L$, нет никакого давления (там ничего не может поместиться), а со стороны, где находятся остальные $q - 1$ лигандов, существует сильное «давление». На

лиганд, который находится от $i = 2\ L$ до $i = 3\ L$, «давит» один лиганд от границы и q — 2 лигандов с другой стороны, и поэтому второй максимум на картине распределения вероятности для данной моды $P_q(i)$ всегда меньше, чем первый (рис. 7.2 *г*). В точках, далеких от границ, «давление» с обеих сторон выравнивается, и это приводит к тому, что вероятность связывания $P_q(i)$ становится постоянной величиной (не зависит от i).

Рассмотрим картины расположения лигандов на ДНК при изменении концентрации свободных лигандов в растворе (меняется параметр Km). Из рис. 7.3 *а* видно, что в области $L < i < 3L$ дисперсия регулярно следует за значениями $P(i)$. Около границы более «жесткие» условия связывания, и у всех мод со значениями q, вносящими основной вклад в суммарную картину вероятностей $P(i)$, поведение похоже (хотя в целом эти моды могут значительно отличаться, периодичность чередования минимумов и максимумов мало отличается). Из-за этого дисперсия вблизи концов фрагмента ДНК регулярно следует за графиком $P(i)$. В средней области ($i \sim N/2$) максимумы у разных мод сдвинуты друг относительно друга, вследствие чего дисперсия нерегулярно следует за суммарным профилем расположения лигандов.

При увеличении концентрации лиганда в растворе начинает чувствоваться влияние моды $P_q(i)$, соответствующей $q = q_{max}$, и тогда наблюдаются интересные особенности в картинах расположения лигандов на ДНК. При повышении концентрации лигандов в растворе вначале восстанавливается регулярность поведения дисперсии (рис. 7.3 *б*), а затем при дальнейшем росте Km на картине расположения лигандов обнаруживаются особые точки, в которых дисперсия резко возрастает (рис. 7.3 *в*). Такой рост происходит в точках $i = n\ L$ ($n = 1,2, ..., [N/L]$), где должны появиться новые максимумы, соответствующие моде с $q = q_{max}$.

Из рис. 7.3 *в* видно, что в то время как на картине вероятностей $P(i)$ максимумы только начинают проявляться, на кривых $P(i) \pm \sqrt{D_P(i)}$ они уже чётко прослеживаются. Это связано с тем, что дисперсия как момент второго порядка является более чувствительным параметром системы, чем сама вероятность. Когда концентрация свободного лиганда в растворе настолько велика, что на суммарный профиль распределения влияют только две последние моды, соответствующие q_{max} и q_{max} — 1 адсорбированным лигандам, то дисперсия сильно возрастает (рис. 7.3 *г*). При дальнейшем увеличении Km функция $\Phi(q)$ превращается в дельта-функцию: $\Phi(q) = \{0$ при $q \neq q_{max}$; 1 при $q = q_{max}\}$, а дисперсия стремится к нулю.

Вероятность обнаружить i-е звено свободным $F_q(i)$ является суммой по вероятностям $P_q(i + j)$ для L расположенных подряд мест связывания на ДНК (140). Ясно, что $F(i)$ должна вести себя более регулярно, чем $P(i)$,

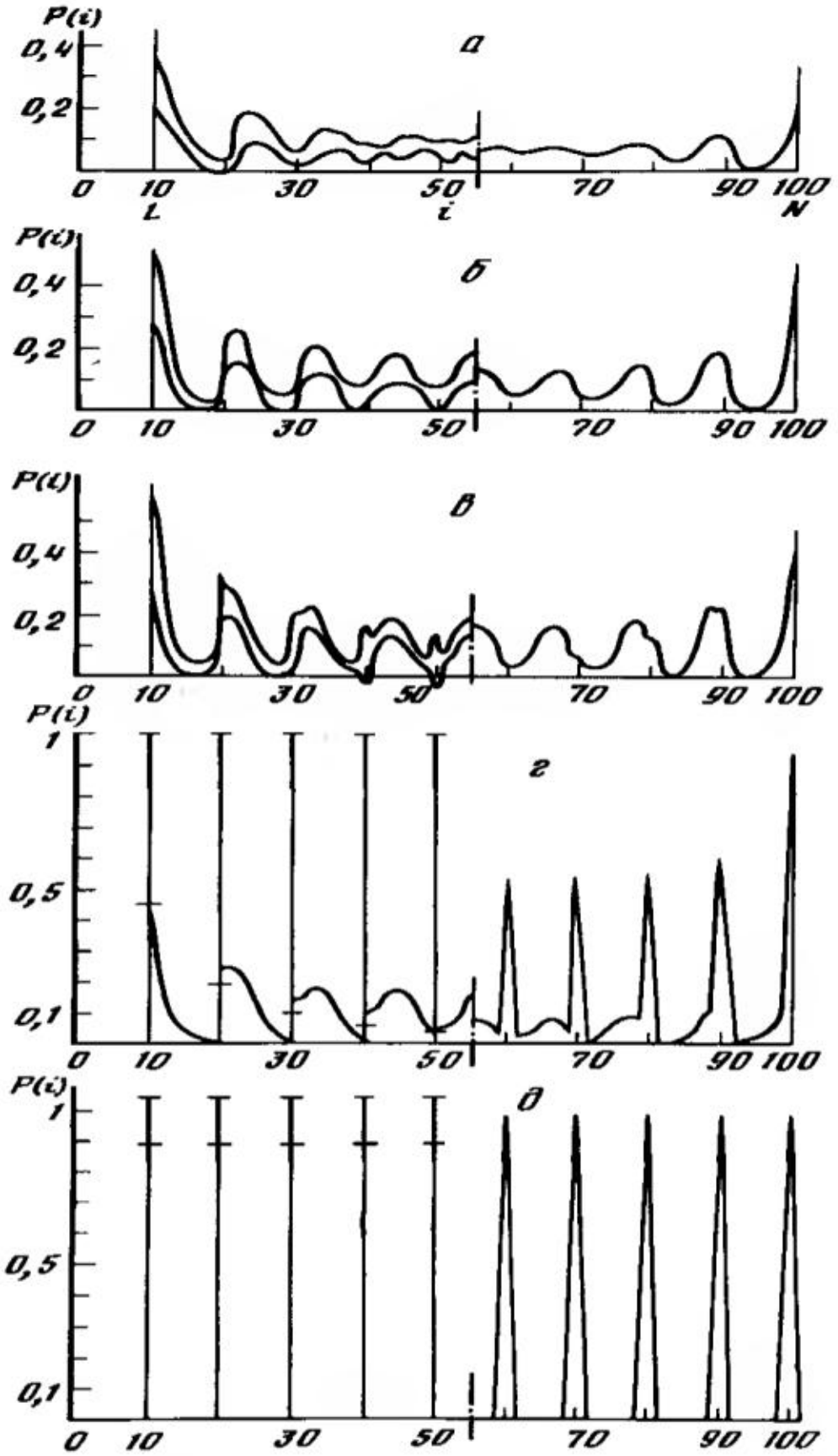

Рис. 7.3. Профили вероятности расположения белков на матрице для разных концентраций свободного белка в растворе. Кривые рассчитаны при значениях параметров $N = 100$, $L = 10$. $Km = 10$ ($<q> = 7{,}94$) (*а*); $Km = 100$ ($<q> = 8{,}74$) (*б*); $Km = 1000$ ($<q> = 8{,}98$) (*в*); $Km = 10^5$ ($<q> = 9{,}52$) (*г*); $Km = 10^7$ $<q> = 9{,}99$) (*д*)

и что $F(i)$ — более устойчивая величина при изменении параметров системы. То же самое относится и к дисперсии $D_F(i)$ (но она не является простой суммой $D_F(i + j)$ потому, что вероятности $P(i + j)$ зависят одна от другой). На рис. 7.4 показаны вероятности $F(i)$, соответствующие тем же модельным расчетам, которые проводились для картин вероятностей $P(i)$ и проиллюстрированы на рис. 7.3. Заметим, что в экспериментальной схеме фут-

принтинга измеряются как раз величины $F(i)$, и реально происходящие при увеличении концентрации свободного лиганда в растворе на фрагменте ДНК процессы, оказываются из-за этого отчасти замаскированы. Для понимания таких процессов удобно рассматривать величины $P(i)$ и обращаться к разложению суммарных картин вероятностей на отдельные моды, методика которого развита в этой главе.

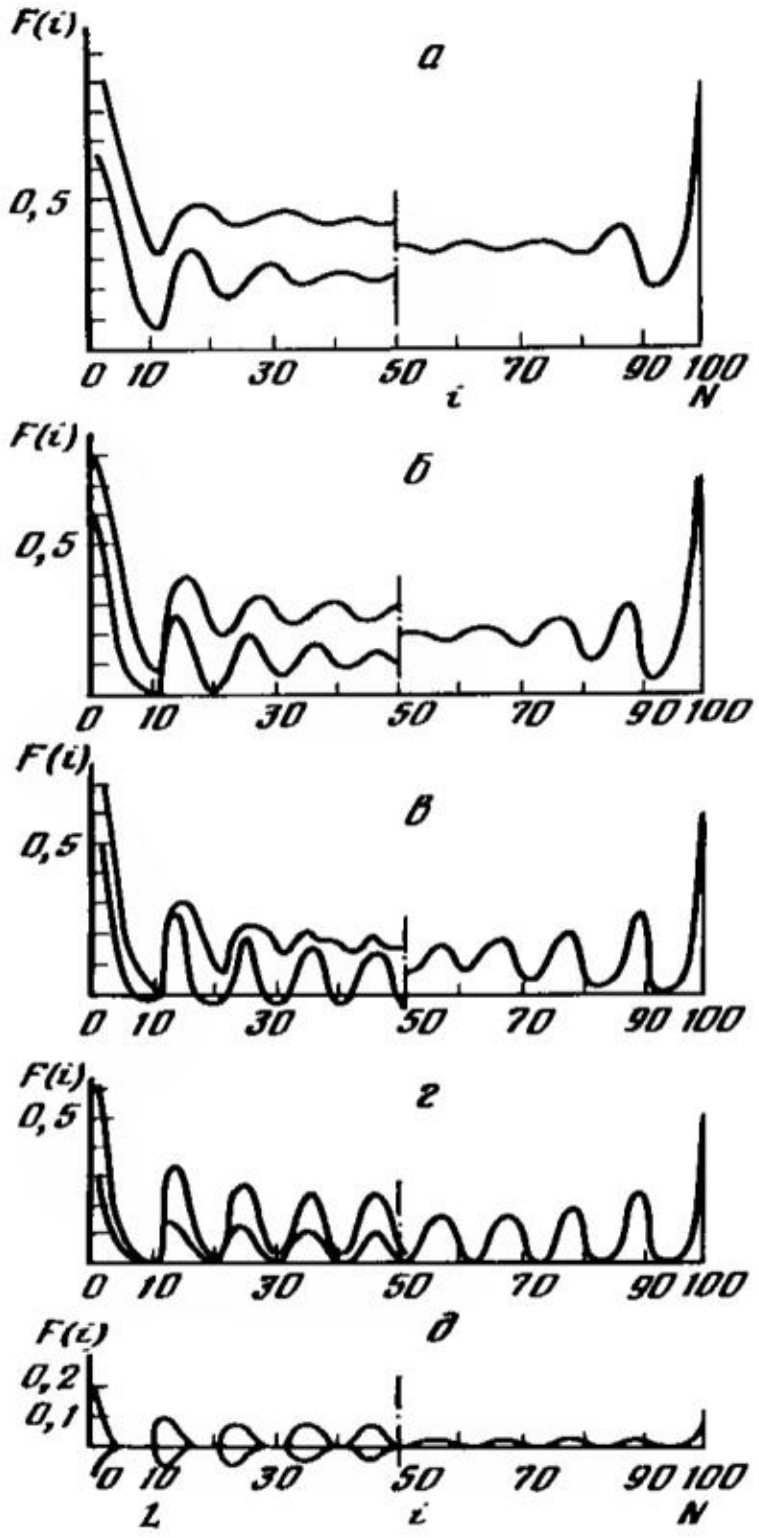

Рис. 7.4. Вероятности обнаружить центры матрицы свободными (не закрытыми связанным белком) при разных концентрациях белка в растворе. Справа — вероятность $F(i)$, слева — $F(i) \pm \sqrt{\sigma^2_F(i)}$. $N = 100$, $L = 10$. $Km = 1$ ($<q> = 6{,}44$) *(а)*; $Km = 10$ ($<q> = 7{,}94$) (б); $Km = 100$ ($<q> = 8{,}74$) *(в)* ; $Km = 10^4$ ($<q> = 9{,}09$) (*г*); $Km = 10^6$ ($<q> = 9{,}82$) (*д*)

В работе Корнберга и Страйера [6] моделировалось расположение нуклеосом на фрагментах ДНК. Авторы рассчитывали вероятности $F(i)$ то-

го, что пара оснований ДНК свободна при заданных значениях средней длины линкера (т. е. расстояния между ближними краями соседних нуклеосом). Мы повторили их расчет, подобрав соответствующее значение параметра Km. Картина вероятностей $F(i)$ (рис. 7.5) показала полное совпадение с результатами расчета Корнберга и Страйера (см. рис. 3 из работы [6]). В левой части рисунка показаны значения $F(i) + \sqrt{D_F}(i)$ и $F(i) - \sqrt{D_F}(i)$. Видно, что величины отклонений от среднего значения равны приблизительно половине перепада между минимумами и максимумами на картине самих средних значений $F(i)$. Однако такое большое значение дисперсии вовсе не означает, что в эксперименте по фут-принтингу от случая к случаю будет наблюдаться разброс значений $F(i)$ в пределах коридора, определяемого величиной $\sqrt{D_F}(i)$. Дело в том, что в самом эксперименте фут-принтинга происходит усреднение и значения $F(i)$ поэтому могут быть измерены точно. Величины отклонений $D_F(i)$ позволяют понять, как от одного фрагмента к другому будут колебаться вероятности $F_q(i)$ обнаружить данную пару оснований ДНК свободной.

Если бы мы могли следить за отдельно взятой молекулой ДНК, на которой адсорбировано некоторое постоянное число белков, способных с течением времени перераспределяться вдоль ДНК, то по истечении достаточного промежутка времени мы обнаружили бы некоторую картину распределения $F_q(i)$. Эту же картину можно получить и другим способом — отбирая из раствора фрагменты ДНК, несущие одинаковое число адсорбированных молекул, и проводя эксперимент по фут-принтингу для этих фрагментов отдельно. Такого рода эксперимент, который мы предлагаем назвать двумерным фут-принтингом, потому что разделение фрагментов ДНК происходит в двух измерениях: по длине и по числу адсорбированных на фрагменте белков, может пролить свет на ситуацию, касающуюся отдельного фрагмента ДНК.

Информация, усредненная относительно большого числа молекул, которая получается с помощью стандартного фут-принтинга, не позволяет понять некоторых простых аспектов регуляции распределения белков вдоль ДНК. Действительно, предположим, что определенное расположение гистоновых октамеров на ДНК соответствует активно транскрибируемому хроматину (например, при этой конфигурации обнажаются места связывания некоторых регуляторных белков). Однако такая конфигурация может вовсе не соответствовать усредненному расположению гистонов вдоль ДНК. Частота, с которой в клетке может реализоваться искомая конфигурация, зависит от статистического вклада, который она вносит в общий пул возможных состояний. Такой вклад можно оценить, используя метод разложения усредненной картины расположения белков вдоль

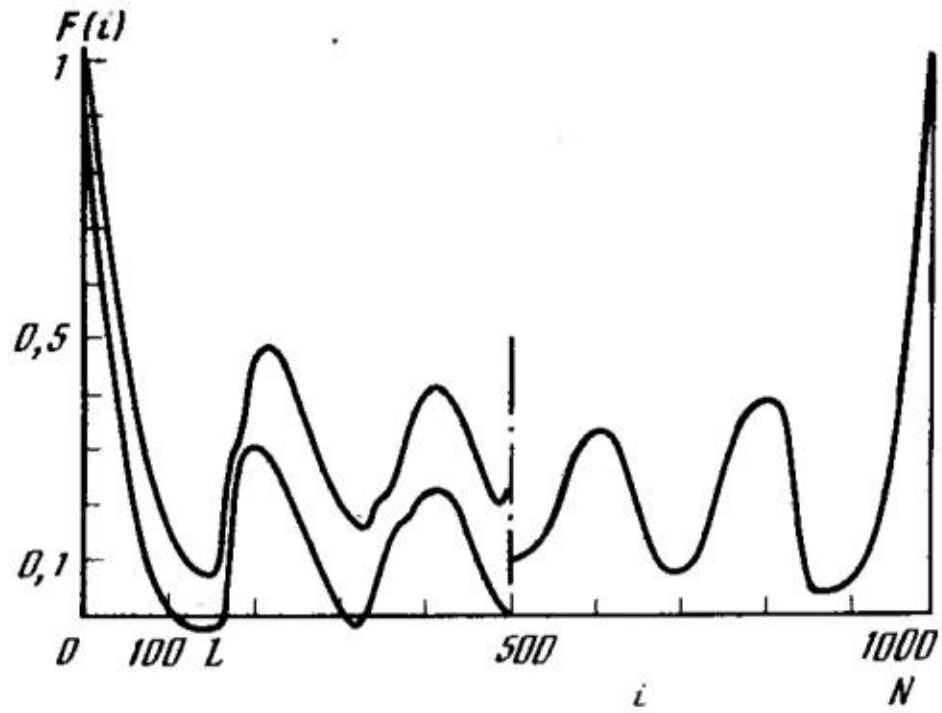

Рис. 7.5. Моделирование расположения гистоновых октамеров (L = 155) на фрагменте ДНК длиной N = 1000 пар нуклеотидов. Произведение концентрации свободных октамеров в растворе на константу связывания подобрано таким образом, чтобы средняя длина линкеров совпадала со значением, использованным в работе [6]: Km = 2,05: $<q>$ = 5, $(N - <q>L)/q$ = 45. В этом случае величина $F(i)$, рассчитанная по формуле (140), точно совпадает с результатами расчётов работы [6]. Слева — значения $F(i) \pm \sqrt{\sigma^2_F(i)}$, которые характеризуют разброс вероятностей от фрагмента к фрагменту, обусловленный тем, что на разных фрагментах адсорбировано, вообще говоря, разное число гистоновых октамеров

ДНК на отдельные составляющие, соответствующие разному числу адсорбированных белков, который развит в настоящей работе. Суммируя информацию, полученную с помощью двумерного фут-принтинга, можно представить, как расположены белки на одном отдельно взятом фрагменте ДНК. Это принципиально важно, потому что регуляция генетической активности происходит именно на уровне одной молекулы ДНК. Возникновение неоднозначности в расположении белков вдоль ДНК обусловлено конкуренцией между различными конфигурациями, характеризуемыми разным числом адсорбированных белков. Мерой такой неоднозначности является дисперсия значений вероятности связывания белка в разных местах. Интересно, что в модельных расчетах на картинах расположения белков вдоль ДНК обнаруживаются особые точки, дисперсия в которых оказывается очень большой. Такого рода «чувствительные точки» могут быть использованы для регуляции генетической активности. Заметим, что в работах Тэйфа и соавторов проведены расчеты, подобные нашим [8, 9] и развиты методы, позволяющие рассчитывать профили вероятности расположения на ДНК гистоновых октамеров, которые могут занимать на ДНК различные размеры (в этом случае вместо одного значения L будет существовать целый набор $\{L\}$ [10]).

7.2. Специфическое связывание лиганда с ДНК, несущей заданную последовательность пар нуклеотидов

Метод фут-принтинга даёт возможность получить детальную информацию о связывании лиганда, определить вероятности связывания лиганда с разными участками фрагмента ДНК. Здесь мы продемонстрируем сравнение количественных предсказаний, полученных на основании моделирования адсорбции и экспериментальных данных о локализации молекулы бис-нетропсина на местах связывания фрагмента ДНК с известной последовательностью пар оснований. Мы получим соотношения, позволяющие рассчитывать вероятности связывания бис-нетропсина с различными местами связывания и оценить относительные ошибки измерения таких вероятностей.

Молекулярное конструирование ДНК — связывающих лигандов, способных узнавать заданную последовательность нуклеотидов и избирательно воздействовать на экспрессию генов, является одним из направлений генной инженерии. Синтетические лиганды могут связываться с разными последовательностями ДНК [11–13]. Некоторые лиганды могут избирательно влиять на экспрессию гена в культуре клеток [14]. Небольшие молекулы лигандов, специфично связывающиеся с определенными последовательностями ДНК, являются инструментом воздействия на экспрессию генов.

Как было указано в Главе 1, антивирусный антибиотик нетропсин специфически связывается с АТ-кластерами в малой бороздке ДНК [15]. Антибиотик этот связывается по малой бороздке ДНК в местах расположения четырех или пяти АТ-пар [16–19]. Специфичность связывания определяется наличием водородных связей между амидными NH-группами нетропсина и атомами O2 тимина и N3 аденина, а также вандерваальсовыми контактами и электростатическими взаимодействиями. Образование водородных связей с атомами N3-группы гуанина стерически затруднено из-за присутствия NH_2-группы гуанина, выступающей в узкую бороздку ДНК.

Для повышения специфичности связывания в ряде работ, выполненных Гроховским, Гурским и соавторами [11, 20–23], были синтезированы димерные производные нетропсина и проведены эксперименты по связыванию таких лигандов с ДНК. В частности, в работе [11] два мономерных фрагмента нетросина были соединены различными способами, а именно: «голова-к-голове», «голова-к-хвосту» и «хвост-к-хвосту».

В работе [11] показано, что тип димерного соединения, по стехиометрии связывания соответствующий ковалентному связыванию двух молекул нетропсина в ориентации «хвост-к-хвосту» коротким линкером с остатком

платины, (далее — бис-нетропсин), обладает преимущественным сродством к псевдосимметричной последовательности 5'-TTTTAAAA-3'.

Короткие 8 членные ДНК-олигонуклеотиды, содержащие симметричные последовательности: 5'-TTTTAAAA-3' и 5'-AAAATTTT-3' , имеют различные константы связывания с бис-нетропсином [22]. Данные по связыванию бис-нетропсина с двумя различными олигонуклеотидами:

5'-CGTTTTAAAACG-3' (**I**) и

5'-CGAAAATTTTCG-3'(**II**)

при анализе кривых титрования показывают, что константа связывания бис-нетропсина с олигонуклеотидом (**I**) в четыре раза больше, чем с (**П**).

Рассмотрим стандартную физическую модель адсорбции. Пусть в растворе при постоянной температуре и постоянном давлении находятся молекулы ДНК с адсорбированными лигандами, а также свободные молекулы лиганда. Молекула ДНК представляет собой линейную матрицу из N центров (в качестве таких центров могут выступать элементы пар оснований или сахарофосфатного остова ДНК). При связывании каждый лиганд занимает L центров полимера, которые становятся недоступными для связывания с другими молекулами лиганда. Мы будем называть эти L центров местом связывания, причем первое из таких мест представляет собой непрерывную последовательность из первых L центров полимера. Предположим, что лиганд не может «свешиваться» на концах полимера ДНК.

Пронумеруем центры полимера от 1 до N, тогда первое место связывания представляет непрерывную последовательность из первых L центров, второе место связывания начинается со второго звена и заканчивается $L + 1$ и т.д. Обозначим через $K(i)$ константу химического равновесия для связывания лиганда на месте, начинающемся с $i - L + 1$ и заканчивающемся i-м звеном полимера. Пусть $P(i)$ обозначает вероятность того, что такое место связывания занято лигандом.

Все термодинамические характеристики системы можно рассчитать, если известно выражение для большой статистической суммы системы Ξ_N . Для расчета большой статистической суммы системы в случае, когда лиганд связывается на матрице ДНК неспецифично и (или) специфично, можно использовать метод рекуррентных соотношений. Рекуррентные соотношения для описания некооперативного связывания протяженных лигандов на гомо- и гетерополимере были впервые получены в работах [24–27]. В случае некооперативного связывания рекуррентное соотношение имеет вид (смотри Главу 2):

$$\Xi_i = \Xi_{i-1} + K(i) \cdot m\Xi_{i-L}, \qquad (144)$$

с граничными условиями:

$$\Xi_i = 1, \quad i < L,$$

$$\Xi_L = K(L)m + 1.$$

Здесь $K(i)$ — константа связывания лиганда с i-м связывающим местом. В нашем случае при связывании на гетерополимере $K(i)$ зависит от нуклеотидной последовательности в участке ДНК, занимаемом лигандом. Вероятность того, что i-е место ДНК занято лигандом, можно рассчитать с помощью стандартного соотношения (смотри, например, [28]):

$$P(i) = \frac{\partial \ln \Xi_N}{\partial \ln(K(i)m)}, \tag{145}$$

Согласно экспериментальным данным, размер места связывания бис-нетропсина с ДНК соответствует $L = 8$ пар нуклеотидов. Константы связывания бис-нетропсина с несколькими последовательностями известны благодаря измерениям, проведённым в [22]:

$$\left.\begin{aligned} K_1(\text{TTTTAAAA}) &= 4 \cdot 10^7\ \text{M}^{-1}, \\ K_2(\text{AAAATTTT}) &= 10^7\ \text{M}^{-1}, \\ K_3(\text{TTTTGAAAA}) &= 10^6\ \text{M}^{-1}. \end{aligned}\right\} \tag{146}$$

Назовем места связывания, соответствующие данным участкам ДНК, «сильными». Будем считать, что все прочие места связывания характеризуются «усредненной» константой связывания K. Для неспецифического места связывания численное значение $K\,m$ должно быть много меньше 1. Мы приняли численное значение для усредненной константы равным $K = 5\ 10^5\ \text{M}^{-1}$. Таким образом, усредненной константе K дано такое численное значение, чтобы для неспецифического места связывания при концентрации лиганда равной $m = 1$ μM величина произведения $K\,m$ была меньше соответствующего для «сильного» места связывания значения по меньшей мере в два раза.

Результаты расчётов вероятностей $P(i)$ показаны на рис. 7.6. Видны резкие пики, соответствующие трём местам специфического связывания. Если самый высокий пик незначительно уменьшается при понижении концентрации (он близок к насыщению), то третий по величине пик снижаются линейно при уменьшении концентрации лиганда в растворе.

Заметим, что мы провели оценочные расчеты, в которых выяснилось, что выбор меньшего значения усредненной константы слабо влияет на значения вероятностей, соответствующих связыванию с «сильными» мес-

тами связывания, но может влиять на значения вероятностей связывания с неспецифическими местами. Однако, относительное распределение минимумов и максимумов вероятностей останется прежним.

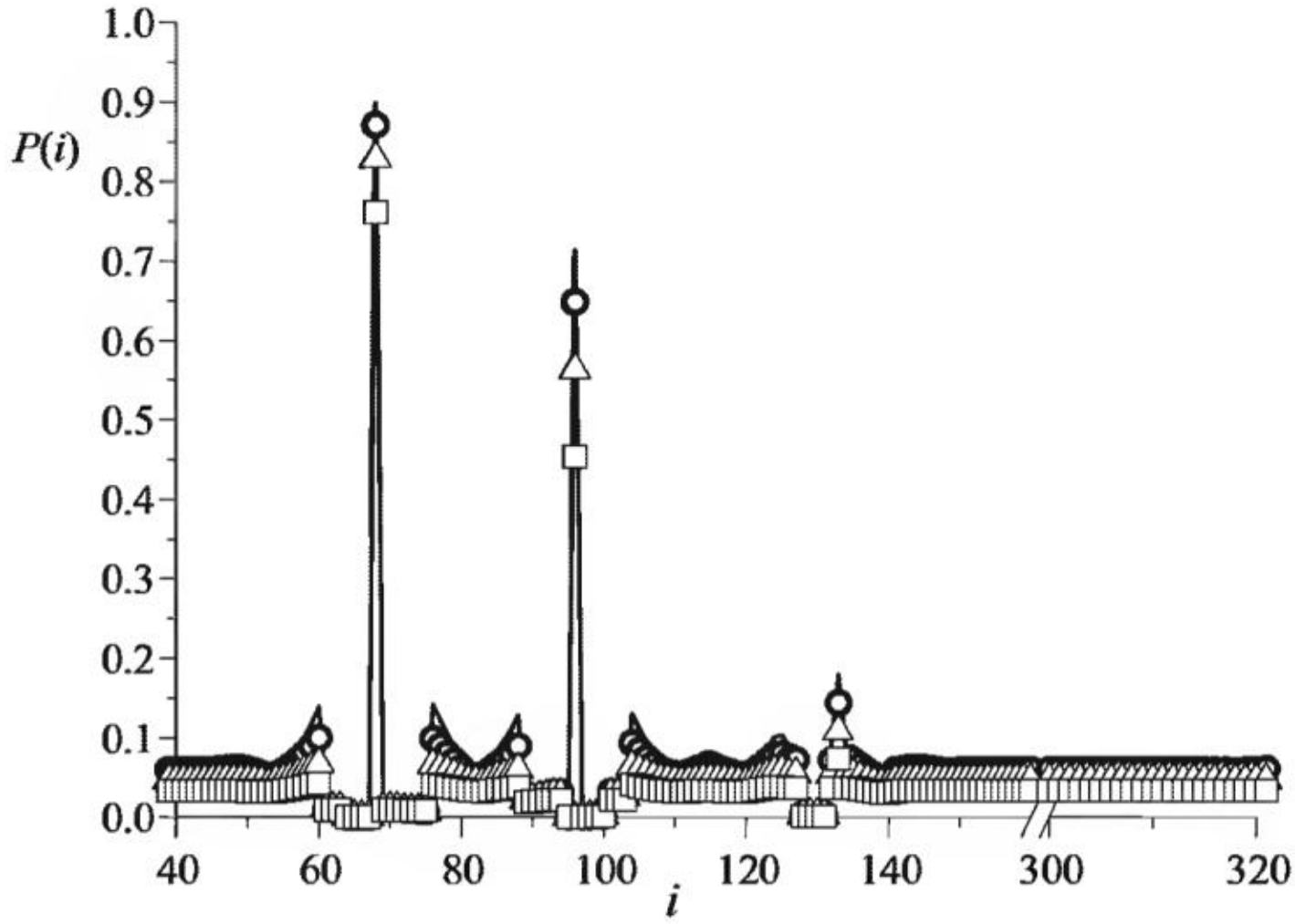

Рис. 7.6. Значения вероятности обнаружить i-е связывающее место P(i) занятым для разных мест связывания. Приведены результаты расчетов для различных концентраций свободного лиганда: 0.125 μM, 0.25 μ M и 0.5 μM (графики показаны посредством □, Δ и ○, соответственно), сплошная линия соответствует m = 1 μM.

Известно, что бис-нетропсин может связываться с ДНК в виде «сэндвича», то есть складываться так, что пиррольные группы одной половины молекулы (одного нетропсина) образуют стекинг-контакты с группами другой половины. Такой «сэндвич» может входить в малую бороздку ДНК и связываться с пятью расположенными подряд АТ-парами. Связывание такого типа тоже можно было бы учесть при расчетах (модели, описывающие подобное связывание, были развиты ранее [24–30]). Однако экспериментальные данные показывают, что для последовательностей типа TATAT, TTATT, TTAAT, TTTTT, AATTT, на которых бис-нетропсин связывается в форме «сэндвича», константы связывания на 2–3 порядка ниже, чем K_1, K_2, K_3. Таким образом, этим связыванием можно пренебречь.

Обозначим посредством $F(i)$ вероятность того, что i-й центр матрицы не занят лигандом. Тогда условия нормировки приводят к следующему соотношению (см. [1]):

$$F(i) + \sum_{j=0}^{L-1} P(i+j) = 1. \qquad (147)$$

Величины $F(i)$ непосредственно связаны с информацией, получаемой при помощи метода фут-принтинга. Действительно, рассмотрим связывание белка-агента, способного расщеплять фосфорно-эфирные связи, с фрагментом ДНК, на котором адсорбированы молекулы лиганда. Если агент может расщеплять связи между соседними свободными нуклеотидами и концентрация его выбрана столь низкой, что наблюдается не более одного разрыва на фрагмент ДНК, число таких разрывов будет пропорционально вероятности того, что соседние нуклеотиды, с которыми взаимодействует агент, являются свободными в комплексе фрагмента ДНК с адсорбированными лигандами. Если разрыв происходит между i и $i+1$ нуклеотидами, то среднее число одно-тяжевых цепей длиной i нуклеотидов, получаемых после денатурации ДНК, пропорционально вероятности $F(i)$ того, что i-я пара оснований в комплексе ДНК с лигандом была свободна. Сравнение распределения олигонуклеотидов по длинам с теоретическим распределением $F(i)$ позволяет проверить применимость используемой модели для описания связывания лиганда с фрагментом ДНК и оценить микроскопические константы, характеризующие взаимодействия лиганда с индивидуальными местами связывания на ДНК.

Мы рассчитали $F(i)$, соответствующие заданным $P(i)$ и сравнили результаты расчётов с данным эксперимента. Видно, что наблюдается значительная корреляция между рассчитанными значениями и экспериментальными диаграммами фут-принтинга (рис. 7.7.).

Дисперсия, или мера отклонения величины вероятности от среднего значения $P(i)$ на i-ом месте связывания, вычисляется при помощи соотношения:

$$D_P(i) = \frac{\partial \langle P(i) \rangle}{\partial \ln(K(i)m)}. \qquad (148)$$

Изменение отношения корня квадратного из дисперсии вероятности связывания молекулы бис-нетропсина к величине самой вероятности связывания вдоль нуклеотидной последовательности показано на рис.7.8. Из рисунка видно, что в местах, определяющих «сильное» связывание, значение относительной ошибки вероятности связывания минимально. Максимальна такая ошибка для связывающих мест, частично перекрывающихся с «сильными» местами связывания. Это легко понять: именно в таких местах значение самой вероятности связывания $P(i)$ минимально: «сильные» места связывания почти наверняка закрыты адсорбированным лигандом, и он не дает возможности связаться другому лиганду на соседних, частично перекрывающихся с ним местах.

Заметим, что значения вероятностей связывания на отдельных участках гетерополимера $P(i)$ демонстрирует профили распределения, известные

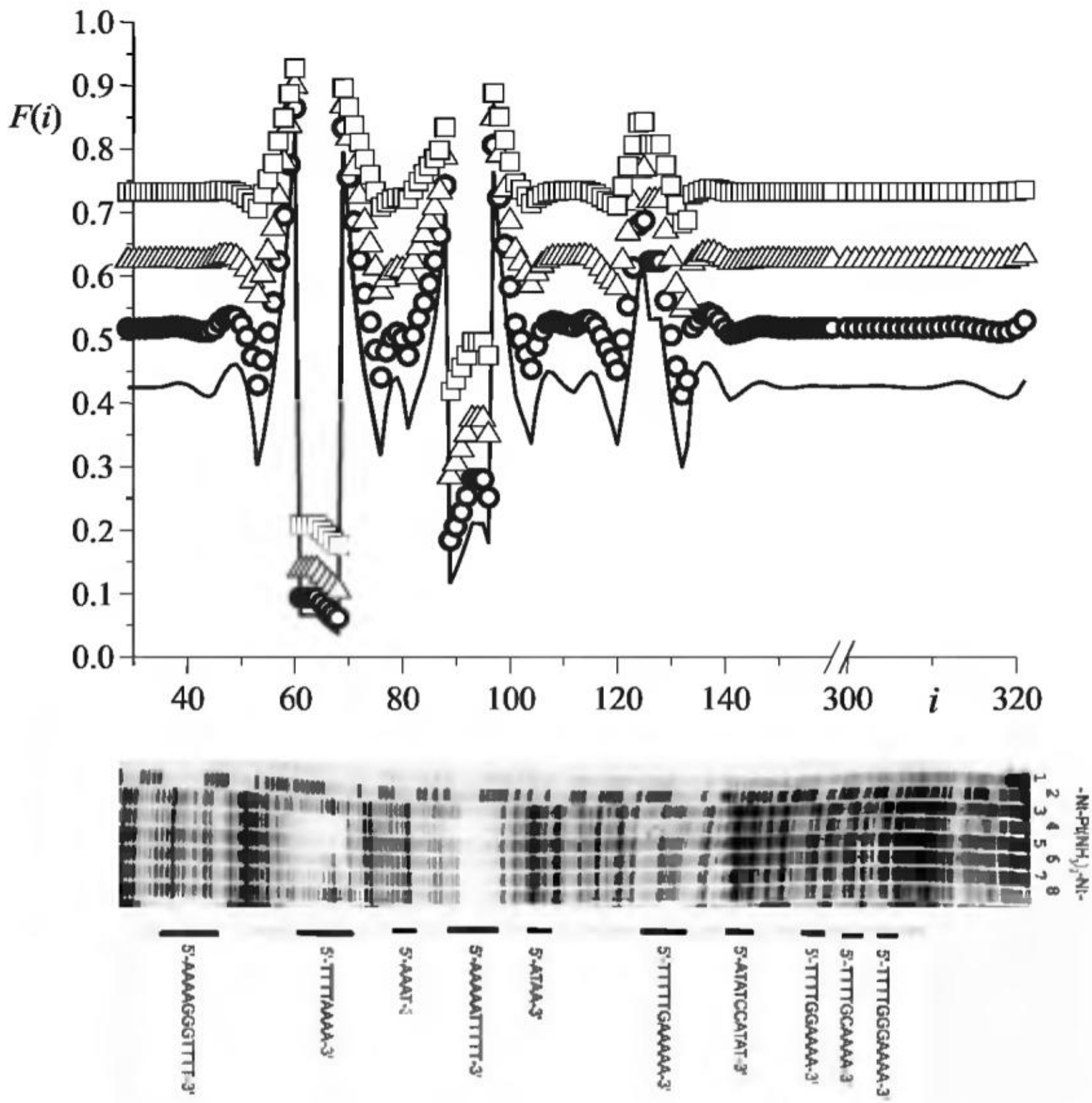

Рис. 7.7. Зависимость вероятности обнаружить i-ю пару оснований ДНК не закрытой адсорбированным лигандом $F(i)$ от номера пары оснований i. Приведены графики для различных концентраций лиганда: 0.125 μM, 0.25 μM и 0.5 μM (данные показаны посредством □, Δ и O, соответственно), сплошная линия соответствует m = 1 μM. Ниже показан снимок фут-принтинга также для различных концентраций бис-нетропсина. Дорожка 1 соответствует свободной ДНК; 2 — связыванию по пуринам; 3,8 — продукты расщепления ДНКазой 1 свободной ДНК; 4–7 — продукты расщеплению ДНКазой 1 при связанном бис-нетропсине в концентрации 1, 0.5, 0.25 и 0.125 μM, соответственно

по анализу связывания на гомополимере и описанные нами выше (см. также [2]). Действительно, три «сильных» места связывания разбивают фрагмент ДНК на четыре отдельных части. В каждой такой части наблюдается профиль вероятности, соответствующий гомополимерному связыванию

с характерными максимумами по краям и периодической структурой, затухающей в центре фрагмента. Дело в том, что лиганды, связанные на «сильных» местах размечают в рамках нашей модели границы суб-фрагментов, которые ведут себя независимо. С точки зрения нашей модели неважно, ограничен ли фрагмент прочно связанным лигандом или концом, с которого нельзя «свешиваться» — в обоих случаях действуют одинаковые граничные условия.

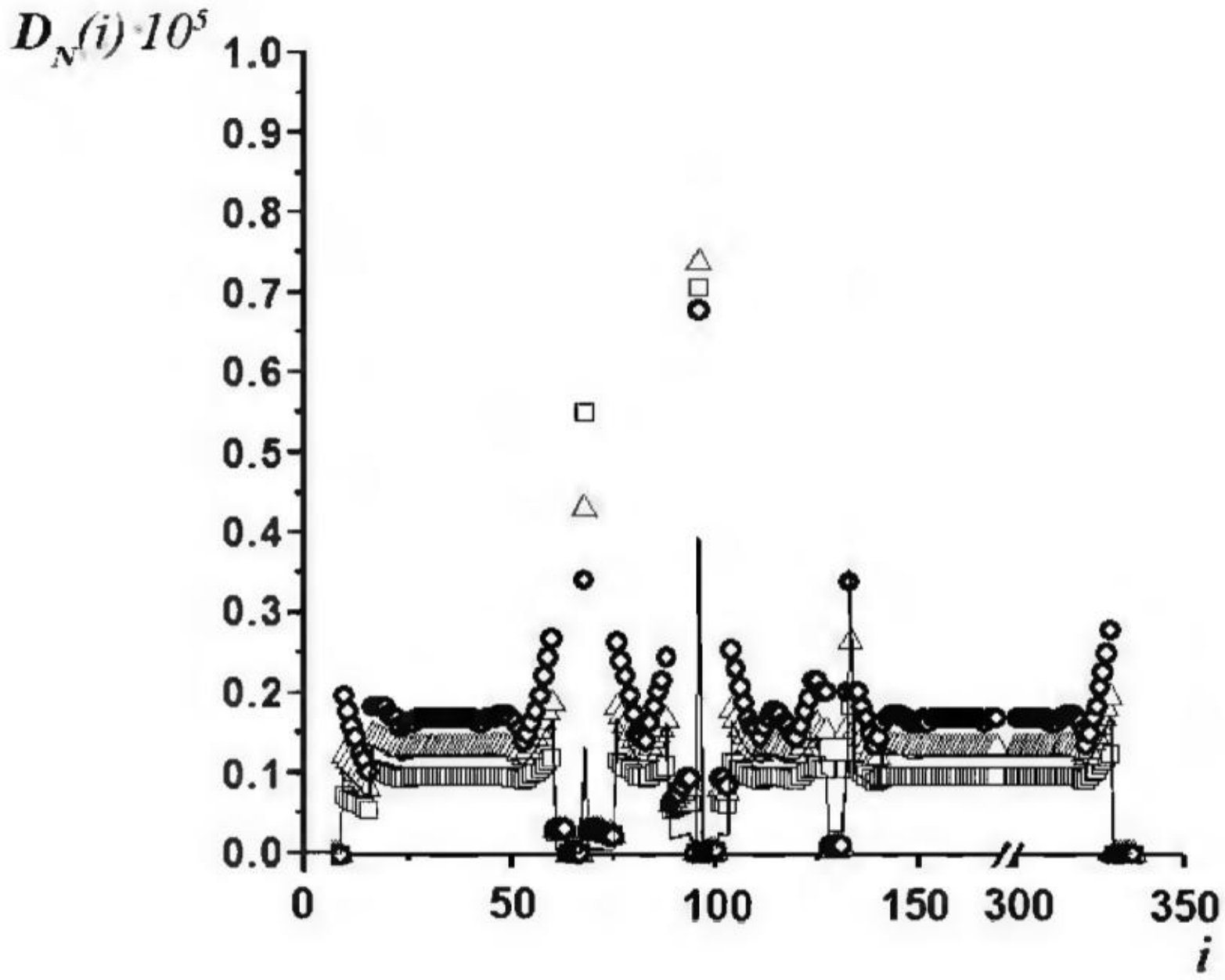

Рис. 7.8. Дисперсия $D_N(i) = \sigma_N(i)^2 / N^2$ для разных мест связывания i. Приведены графики для различных концентраций свободного лиганда в растворе: 0.125 μM, 0.25 μM и 0.5 μM (данные показаны посредством □, Δ и O, соответственно), сплошная линия соответствует $m = 1$ μM

Представленный здесь метод позволяет, основываясь на информации о константах связывания лиганда с отдельными местами ДНК произвести количественный расчет вероятностей связывания лиганда с фрагментом ДНК, несущим заданную последовательность нуклеотидов. Этот метод можно назвать методом «расчетного фут-принтинга», его применение для анализа данных по связыванию лигандов позволяет расширить возможности применения экспериментального фут-принтинга для количественного

анализа адсорбции биологически активных соединений на ДНК. Данный метод позволяет учитывать как кооперативные взаимодействия между лигандами, так и связывание димеров и тримеров на одном связывающем месте. Заметим, что модификация этого метода может позволить описать и более сложные случаи, скажем, когда лиганды могут «свешиваться» на концах полимера или «наползать» друг на друга — подобные модели рассмотрел недавно Владимир Тэйф в работах [31, 32].

При изучении связывания лигандов с ДНК важно количественно оценить соотношение вероятностей связывания лигандов на разных участках последовательности ДНК. В клетке регуляция происходит на уровне одной молекулы ДНК, и поэтому значения дисперсии вероятности связывания лиганда могут определять существенные черты экспрессии генов. Недавно было показано, что экспериментально измеренный «шум экспрессии» может быть обусловлен в значительной степени статистическим шумом самого процесса адсорбции [33, 34].

Заметим, что данная глава базируется на работах, изложенных нами ранее в [2, 35, 36] совместно с Георгием Гурскими, Бошко Йовановичем и соавторами.

Литература

1. *Нечипуренко Ю. Д., Гурский Г. В.* Анализ связывания белков и антибиотиков с фрагментами ДНК. // ДАН СССР. 1985. Т. 281. С. 213–216, см. также *Нечипуренко Ю. Д., Волькенштейн М. В.* Анализ расположения нуклеосом на сателлитной ДНК. // ДАН СССР. 1986. Т. 286. С. 216–220.
2. *Йованович Б., Нечипуренко Ю. Д.* Анализ распределения лигандов, адсорбированных на фрагментах ДНК // Мол. биология. 1990. Т. 24. С. 478–486.
3. *Нечипуренко Ю. Д.* Антикооперативные взаимодействия между ближайшими соседними хроматосомами. // Биофизика. 1988. Т. 33. С. 580–583.
4. *Тейф В. Б., Шкробков А. В., Егорова В. П., Крот В. И.* Нуклеосомы в генной регуляции: теоретические подходы. Молекулярная биология. 2012. Т. 46. С. 3.
5. *Kornberg R.* // Nature. 1981. V. 292. P. 579–580.
6. *Kornberg R. D., Stryer L.* // Nucleic Acids Res. 1988. V. 16. P. 6677–6688.
7. *Гурский Г. В., Заседателев А. С. и Волькенштейн М. В.* Теория одномерной адсорбции. II. Адсорбция малых молекул на гетерополимере // Мол. биология. 1972. Т. 6. С. 479–489.
8. *Teif V. B., Rippe K.* Predicting nucleosome positions on the DNA: combining intrinsic sequence preferences and remodeler activities. NAR, 2009 V. 37, P. 5641–5655.
9. *Teif V. B., Rippe K.* Statistical–mechanical lattice models for protein–DNA binding in chromatin Journal of Physics: Condensed Matter. 2010. V. 22. P. 414105.

10. *Teif V. B., Ettig, R., Rippe K.* A Lattice Model for Transcription Factor Access to Nucleosomal DNA Biophys J. 2010, V. 99 P. 2597–2607.
11. *Gursky G. V., Zasedatelev A. S., Zhuze A. L., Khorlin A. A., Grokhovsky S. L., Streltsov S. A., Surovaya A. N., Nikitin A. M., Krylov A. S., Retchinsky V. O., Beabealashvili R. S. and Gottikh B. P.* // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1983. V. 47. P. 367–378.
12. *Trauger J. W., Baird E. E., Dervan P. B.* Recognition of DNA by designed ligands at subnanomolecular concentrations // Nature. 1996. V. 382. P. 559–561.
13. *Swalley S. E., Eldon E., Baird E. E., Dervan P. B.* Recognition of a 5' (A,T)GGG(A,T)2–3' sequence in the minor groove of DNA by eight-ring hairpin polyamide // J. Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 6953–6961.
14. *Dickinson L. A., Gulizia R. J., Trauger J. W., Baird E. E., Mosier D. E., Gottesfeld J. M., Dervan P. B.* Anti-repression of RNA Polymerase II Transcription by Pyrrol-Imidazole Polyamides. // PNAS USA. 1998. V. 95. P. 1280–1289.
15. *Zasedatelev A. S., Gursky G. V., Zimmer Ch., Thrum H.* Binding of netropsin to DNA and synthetic polynucleotides // Mol. Biol. Reports. 1974. V. 1. P. 337–342, см. также *Заседателев А. С., Жузе А. Л., Циммер К., Гроховский С. Л., Туманян В. Г. Гурский Г. В., Готтих Г. П.* Стереохимическая модель молекулярного механизма узнавания АТ-пар при связывании с ДНК антибиотиков дистамицина и нетропсина // ДАН СССР. 1976. Т. 231. С. 1006–1009.
16. *Kopka M. L., Yoon C., Goodsell D., Pjura P., Dickerson R. E.* The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin // PNAS. 1985. V. 82. P. 1376–1380.
17. *Coll M., Frederick C. A., Wang A. H.-J, Rich A.* A bifurcated hydrogen bonded conformation in the d (AT) base pairs of the DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG) and its complex with distamycin // PNAS USA. 1987. V. 84. P. 8385–8389.
18. *Taberno L., Verdaquer N., Coll M., Fita I., Van Der Marel G. A., Van Boom J. H., Rich A., Aymami J.* Molecular structure of the A-tract DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG) complexed with the minor groove binding drug netropsin // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 8403–8411.
19. *Klevit R. E., Wemmer D. E. and Reid B. R.* Proton NMR studies on the interaction between distamycin A and a symmetrical DNA dodecamer // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 3296–3303.
20. *Khorlin A. A., Krylov A. S., Grokhovsky S. L., Zhuze A. L., Zasedatelev A. S., Gursky G. V. and Gottikh B. P.* // FEBS Lett. 1980. V. 118. P. 311–314.
21. *Surovaya A. N., Burckhardt G., Grokhovsky S. L., Birch-Pirschfeld E., Gursky G. V., Zimmer C.* Hairpin Polyamides That use Parallel and Antiparallel Side-by-Side Peptide Motifs in Binding to DNA // J. Biomol. Struct. Dyn. 1997. V. 14. P. 595–606.
22. *Grokhovsky S. L., Surovaya A. N., Burckhardt G. et al.* DNA sequence recognition by bis-linked netropsin and distamycin derivatives // FEBS Lett. 1998. V. 439. P. 346–350.

23. *Grokhovsky S. L., Zubarev V. E.* Sequence-specific cleavage of double-stranded DNA caused by X-ray ionization of the platinum atom in the Pt-Bis-netropsin—DNA complex // Nucleic acids research. 1991. V. 19. P. 257–264.
24. *Гурский Г. В., Заседателев А. С. и Волькенштейн М. В.* Теория одномерной адсорбции. II. Адсорбция малых молекул на гетерополимере. // Мол. биология. 1972. Т. 6. С. 479–489.
25. *Гурский Г. В., Заседателев А. С.* Точные соотношения, описывающие связывание регуляторных белков и других решёточных лигандов на двухспиральных полинуклеотидах // Биофизика. 1978. Т. 23. С. 932–946.
26. *Гурский Г. В., Заседателев А. С.* // В кн. Итоги науки и техники. Сер. Молекулярная биология. — М.: ВИНИИТИ, 1982. — С. 190–237.
27. *Gursky G. V., Zasedatelev A. S.* Thermodynamic and stereochemical aspects of binding interactions between sequence-specific ligands and DNA // Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol. 1984. V. 5, P. 53–139.
28. *Shafer R. H.* DNA bis-intercalation: Theoretical calculation of binding curves // Biopolymers. 1980. V. 19. P. 419–430.
29. *Нечипуренко Ю. Д., Стрельцов С. А., Михейкин А. Л.* Новая физическая интерпретация S-образных кривых: конкуренция между разными типами связывания лиганда с ДНК // Биофизика. 2000. Т. 45. С. 1044–1048.
30. *Nechipurenko Yu.D., Mikheikin A. L., Streltsov S. A., Zasedatelev A. S., and I. R. Nabiev I. R.* Mixed mode of ligand-DNA binding results in S-shaped binding curves // J. Biomol. Struct. and Dynam. 2001. V. 18. P. 703–708.
31. *Teif V. B.* General transfer matrix formalism to calculate DNA–protein–drug binding in gene regulation: application to O_R operator of phage λ // NAR, 2007, V. 35, e80. 30.
32. *Teif V. B.* Predicting gene-regulation functions: lessons from temperate bacteriophages. Biophys J. 2010 98. P. 1247–1256.
33. *Нечипуренко Ю. Д., Вольф А. М., Гурский Г. В.* Статистические флуктуации в процессах регуляции генов: рассмотрение с точки зрения статистической механики. // Биофизика. 2003. Т. 48. С. 986–997.
34. *Головкин М. В., Нечипуренко Ю. Д., Гурский Г. В.* Статистические флуктуации в уровне заполнения репрессором оператора определяют величину экспрессии репортерного гена. Биофизика 2009, т. 54, С. 581–588.
35. *Рябоконь В. Ф., Нечипуренко Ю. Д., Гурский Г. В.* Количественные методы анализа диаграмм фут-принтинга для комплекса лиганда с ДНК с известной последовательностью. Доклады Академии Наук 2004, Т. 398, С. 832–837.
36. *Nechipurenko Y. D., Jovanovic B., Riabokon V. F., Gursky G. V.* Quantitative methods of analysis of footprinting diagrams for the complexes formed by a ligand with a DNA fragment of known sequence. Ann N Y Acad Sci., 2005, V. 1048, P. 206–214.

Всё следует упрощать до тех пор, пока это возможно, но не более того.
Альберт Эйнштейн

Заключение

Связывание биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами рассматривается нами здесь при помощи представлений физической адсорбции. Другой способ рассмотрения, более привычный молекулярным биологам и биохимикам — при помощи условий химического равновесия — имеет весьма ограниченную область применимости. По мере развития экспериментальных методов анализа макромолекул мы получаем всё более полную количественную информацию о системе и можем увидеть более детальный портрет её. Такими «деталями», которыми нельзя пренебречь при количественном описании системы могут быть, к примеру, кооперативные взаимодействия между адсорбированными лигандами. Конечно, не во всякой системе и не всегда присутствуют кооперативные взаимодействия, однако исследователю-экспериментатору необходимо быть готовым, к тому, что его система окажется сложной.

На рис. 8.1 продемонстрировано сравнение детального количественного и упрощённого качественного анализа сложной системы. Взгляд сквозь призму уравнений химического равновесия не позволяет увидеть те детали сложной системы, который можно увидеть, как через увеличительное стекло, сквозь «линзу» теории адсорбции.

В случае сложной системы может быть «необходимо вызвать мастера» - пригласить для анализа данных специалиста, который владеет современными методами анализа связывания биологически активных соединений с молекулами-мишенями. В роли таких мишеней могут выступать как одиночные молекулы ДНК и РНК, как и сложные их комплексы или даже специальные конструкции — скажем, биочипы. Специалистов высокого уровня по анализу связывания лигандов с нуклеиновыми кислотами во всём мире немного — «по пальцам можно пересчитать». Однако любой студент, аспирант и выпускник физической специальности университета может без особого труда овладеть этой специальностью: для этого достаточно освоить данную монографию. Родилась она из восьми десятков работ, которые выполнил автор в Институте Молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН. Автор принадлежит научной школе Гурского, За-

седателева и Волькенштейна, в задачу которой входит изучение связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами. Изучение это — не чисто теоретическое, не абстрактное: задачи ставились на основании анализа реальных изотерм адсорбции, полученных в экспериментах по связыванию лигандов с ДНК. Более того, результатов анализа связывания лиганда зависела стратегия: поиска такой химической модификации лиганда, которая будет лучше связываться с ДНК и более эффективно выполнять заданную биологическую функцию (см., например, [1]).

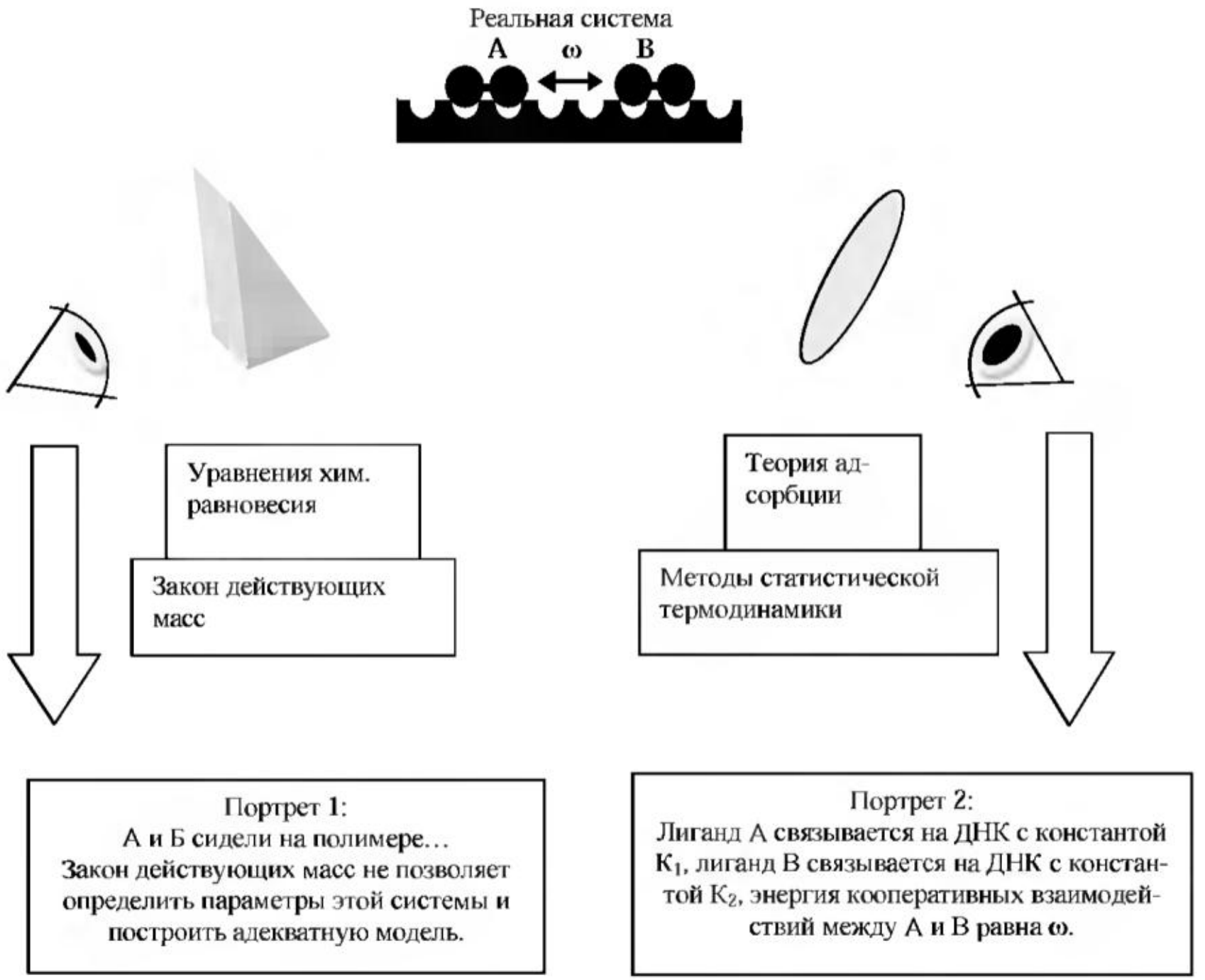

Рис. 8.1 Реальная система (вверху) и два способа её описания. Слева — взгляд сквозь «призму» условий химического равновесия, справа — взгляд через «линзу» теории адсорбции, которая позволяет описать кооперативные взаимодействия между адсорбированными лигандами.

В клетке с молекулами ДНК и РНК связывается большое число различных соединений, и при связывании на матрицах НК может задействоваться одновременно несколько систем реакционных центров. В монографии мы рассмотрели как конкуренцию лигандов за одни и те же связы-

вающие места, так и координацию при связывании лигандов на одной или двух системах реакционных центров.

Сложность реальной ситуации затрудняется тем, что матрица представляет собой трёхмерный объект, и система реакционных центров на матрице может не укладываться в одномерную или двумерную схему. Несмотря на это, применение теории адсорбции для описания связывания лигандов с НК позволяет решать практические задачи анализа связывания с НК ряда биологически активных веществ: восстанавливать на основании анализа изотерм адсорбции как геометрические, так и энергетические параметры связывания. В Приложениях А и Б показано, как можно проводить такой анализ на примере связывания с ДНК молекул хитозана, дауномицина и ионов меди (эти работы выполнены совместно с Ю. М. Евдокимовым).

По-видимому, первым примером плодотворного применения теории адсорбции в молекулярной биофизике можно назвать анализ связывания с ДНК антибиотиков дистамицина А и нетропсина, который был проведен в работах Заседателева и соавторов [2,3]. По сути, только на основании анализа изотерм адсорбции была предложена молекулярная модель комплекса дистамицина А с ДНК, которая была подтверждена позже при помощи рентгеноструктурного анализа [4].

Эффективность применения теории адсорбции для описания биологических систем в целом обусловлена, с одной стороны, участием специалистов в области статистической физики в решении задач, связанных с биополимерами, а с другой, привлечением внимания со стороны молекулярных биологов и биофизиков к теории адсорбции. Однако, несмотря на достижения в этой области, до последнего времени в отечественной и мировой литературе не существовало крупных обзорных работ, в которых с единой точкой зрения рассматривались бы сотни и тысячи примеров применения теории адсорбции к описанию взаимодействия лигандов с НК. Не существует ни современных руководств, ни монографий, в которых бы излагались подходы к описанию взаимодействия лигандов с НК. Такие подходы были изложены более 30 лет назад в отдельных главах учебника по молекулярной биофизике М. В. Волькенштейна [5] и руководства по биофизической химии Кантора и Шиммела [6] (можно отметить также монографию Ваймана и Гилла [7], однако в ней рассматриваются более общие вопросы описания связывания лигандов с макромолекулами).

За последние годы вышел ряд работ, в которых содержится описание систем, где связывание лигандов с матрицами НК происходит по новым схемам, не известным ранее [8]. Развиты новые модели адсорбции, получены уравнения связывания. В этой книге такие модели впервые изложены

системно: с единой точки зрения, в рамках общего подхода. Здесь впервые в наиболее полном виде изложена совокупность методов и подходов статистической термодинамики, позволяющих описывать и анализировать биологические системы, в которых изучается связывание лигандов с нуклеиновыми кислотами *in vitro*. Нами также было показано на ряде примеров, как такие подходы работают, какие параметры связывания они позволяют оценить. Развитые нами методы анализа данных дают в руки исследователя разнообразный теоретический «инструментарий», позволяющий анализировать как реальные биологические системы, так и модельные системы, в которых изучается связывание лигандов с нуклеиновыми кислотами.

Такой инструментарий насущно необходим, так как исследователь решает обычно так называемую «обратную задачу» — по изотермам адсорбции восстанавливает основные свойства модели связывания. Разного рода модели, как мы показали в этой работе, могут приводить к похожим кривым — но всё же в ряде случаев удается связать между собой характеристические черты модели адсорбции и вид соответствующих кривых связывания.

Теория адсорбции на протяжении ста лет своего применения к биологическим системам накопила уже достаточно опыта, чтобы выступить в этой области в роли вспомогательной научной дисциплины (см. наши обзоры [9–11]). Эта дисциплина выработала свой язык, который позволяет сформулировать такие фундаментальные проблемы биологии, как регуляция генетической экспрессии в рамках представлений статистической физики. С другой стороны, применение теории адсорбции к анализу экспериментальных данных позволяет связать наблюдаемые величины со свойствами молекулярно-биологических систем: определять энергии взаимодействия лигандов с нуклеиновыми кислотами, энергии взаимодействия между адсорбированными лигандами и т. п. Описание реальных систем при помощи теории адсорбции даёт возможность как предсказывать их поведение при изменении внешних условий, так и уточнять черты моделей связывании лигандов с ДНК. Без применения теории адсорбции невозможно сейчас представить эффективное решение и таких прикладных задач, как испытание лекарственных соединений и создание биосенсоров.

В монографии показано, как можно решать обширный класс фундаментальных и прикладных задач молекулярной биофизики при помощи теории адсорбции. Мы старались показать в своих работах, что в настоящее время такое применение имеет черты системности. Статистическая термодинамика связывания лигандов с ДНК и РНК находится на переднем крае науки, в области развития новых технологий постгеномной эры. Модели адсорбции оказываются необходимыми и востребованными в объяс-

нении экспериментов по гибридизации геномных ДНК и РНК на биочипах, в конструировании новых лекарственных соединений, в создании биосенсоров — во многих областях науки. В связи с развитием новых методов и технологий в молекулярной биологии появилась надежда решить здесь и фундаментальные задачи: разобраться в том, что же происходит в клетке «вокруг ДНК» — иными словами, как работают факторы транскрипции, малые РНК и лекарственные соединения, которые регулируют процессы экспрессии генов. Недавно появилась монография Гарри Стормо, в одной из глав которой рассматриваются термодинамические аспекты связывания белков с ДНК [12], однако в ней нет систематического изложения совокупности методов анализа такого связывания.

От теории адсорбции можно перебросить мостики к смежным областям молекулярной биофизики, описывающим события, которые происходят в ДНК и РНК при отклике на разного рода воздействия. К примеру, анализ расщепления ДНК при помощи ультразвука и ультрафиолетового излучения [12–16] позволяет выявить гетерогенность структурно-динамических свойств ДНК, те аспекты физики ДНК, которые могут быть востребованы в процессе её взаимодействия с лигандами. Множество процессов, происходящих в живой клетке, являются обратимыми: например, связывание с образованием ряда контактов между микротрубочками и белками-переносчиками, сборка самих микротрубочек и филаментов… Подход к подобным явлениям при помощи представлений теории физической адсорбции также может быть плодотворным.

Автор считает своим приятным долгом поблагодарить сотрудников, с которыми он разделил увлекательный труд исследованию «главной молекулы»: своих учителей Георгия Гурского, Александра Заседателева и Наталью Есипову, учеников и коллег Ольгу Матвееву, Сергея Гроховского, Александра Крылова, Юрия Евдокимова и многих других....

Литература

1. *Gursky G. V., Zasedatelev A. S., Zhuze A. L., Khorlin A. A., Grokhovsky S. L., Streltsov S. A., Surovaya A. N., Nikitin A. M., Krylov A. S., Retchinsky V. O., Beabealashvili R. S. and Gottikh B. P.* Synthetic sequence-specific ligands // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1983. V. 47. P. 367–378.
2. *Zasedatelev A. S., Gursky G. V., Zimmer Ch., Thrum H.* Binding of netropsin to DNA and synthetic polynucleotides // Mol. Biol. Reports. 1974. V. 1. P. 337–342.
3. *Заседателев А. С., Жузе А. Л., Циммер К., Гроховский С. Л., Туманян В. Г. Гурский Г. В., Готтих Г. П.* Стереохимическая модель молекулярного механизма узнавания АТ-пар при связывании с ДНК антибиотиков дистамицина и нетропсина. // ДАН СССР. 1976. Т. 231. С. 1006–1009.

4. *Kopka M. L., Yoon C., Goodsell D., Pjura P., Dickerson R. E.* The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin // PNAS. 1985. V. 82. P. 1376–1380.
5. *Волькенштейн М. В.* Молекулярная биофизика. — М., 1975.
6. *Кантор Ч, Шиммел П.* Биофизическая химия. — М.: Мир, 1984.
7. *Wyman J., Gill S. J.* Binding and linkage. Mill Valley, California 1990.
8. *Bujalowski W.* Thermodynamic and kinetic methods of analyses of protein-nucleic acid interactions. From simpler to more complex systems // Chemical reviews. 2006. V. 106. P. 556–606., *Teif V. , B. Kepper, N., Yserentant, K., Wedemann, G., & Rippe, K.* Affinity, stoichiometry and cooperativity of heterochromatin protein 1 (HP1) binding to nucleosomal arrays // Journal of Physics: Condensed Matter. 2015. V 27. P. 064110.
9. *Нечипуренко Ю. Д., Гурский Г. В.* Термодинамические модели связывания лигандов с ДНК // Биофизика. 2003. Т. 48. С. 773–796, см. также *Нечипуренко Ю. Д.* Статистическая термодинамика связывания лигандов с ДНК и РНК. Дисс. на соискание ученой степени доктора физ.-мат. наук., М. 2005.
10. *Нечипуренко Ю. Д.* Статистическая термодинамика связывания лигандов с ДНК. Российский химический журнал (Ж. Росс. Хим. Общества им. Д. И.Менделеева), 2007. Т. 51, С. 23–30.
11. *Нечипуренко Ю. Д.* Анализ связывание лигандов с нуклеиновыми кислотами. Биофизика 2014. Т. 59, С. 12–36.
12. *Stormo G. D.* Introduction to protein-DNA interactions: structure, thermodynamics and bioinformatics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2013.
13. *Втюрина Н. Н., Гроховский С. Л., Филимонов И. В., Медведков О. И., Нечипуренко Д. Ю., Васильев В. А., Нечипуренко Ю. Д.* Расщепление фрагментов ДНК наносекундным лазером с длиной волны 193 нм. Биофизика 2011. Т. 56. С. 410–414.
14. *Втюрина Н. Н., Гроховский С. Л., Васильев А. Б., Титов И. И., Понаморенко П. М., Понаморенко М. П., Пельтек С. Е., Нечипуренко Ю. Д., академик Колчанов Н. А.* Контекстные характеристики ДНК, значимые для ее повреждения ультрафиолетовым лазерным излучением с длиной волны 193 нм. // ДАН. Биохимия, биофизика, молекулярная биология, 2012. Т. 447, С. 217–222.
15. *Grokhovsky Sergei L., Il'icheva Irina A., Nechipurenko Dmitry Yu., Golovkin Michail V., Panchenko Larisa A., Polozov Robert V. and Nechipurenko Yury D.* Sequence-Specific Ultrasonic Cleavage of DNA // Biophysical Journal, 2011, Vol.100, N1, P. 117–125.
16. *Poptsova M. S., Il'icheva I. A., Nechipurenko D. Y., Panchenko L. A., Khodikov M. V., Oparina N. Y., Polozov R. V., Nechipurenko Y. D., Grokhovsky S. L.* // Non-random DNA fragmentation in next-generation sequencing. Sci Rep. 2014; 4:4532.

Приложение А
СВЯЗЫВАНИЕ ХИТОЗАНА С ДНК

Данное приложение основано на работах, сделанных в соавторстве с А. М. Вольфом, Ю. М. Евдокимовым и В. И. Саляновым (см. [1, 2]).

Рассмотрим следующую термодинамическую систему: в растворе в равновесии при постоянной температуре и постоянном давлении находятся молекулы ДНК определённой длины и молекулы лиганда. Некооперативное связывание лигандов с ДНК приводит к тому, что в растворе находятся в равновесии молекулы ДНК с разным числом адсорбированных лигандов. Для заданной концентрации свободного лиганда в растворе m такое равновесие характеризуется функцией распределения (27), которая описывает вероятность обнаружить в растворе молекулу ДНК с определенным числом адсорбированных лигандов. В случае, когда в качестве лигандов выступают поликатионы, молекулы ДНК, на которых связано достаточное для нейтрализации зарядов на фосфатах число лигандов, могут претерпевать фазовый переход. Примером такого перехода является образование жидкокристаллических дисперсий (ЖКД) при связывании ДНК с хитозаном.

Если предположить, что связывание хитозана с ДНК обусловлено процессом равновесной адсорбции, то при определенной концентрации хитозана в растворе находятся в равновесии молекулы ДНК с разным числом адсорбированных молекул хитозана. Если число адсорбированных лигандов превышает некоторую критическую величину, молекула ДНК, покрытая хитозаном, становится способной к взаимодействию с другими молекулами ДНК. В результате такого взаимодействия (притяжения) формируются ЖКД ДНК.

В ряде работ (см., например, [3, 4]) было показано, что при связывании хитозана образуется жидкокристаллическая фаза НК. В этом приложении предпринята попытка теоретически описать связывание молекул ДНК (имеющих размер несколько сотен пар нуклеотидов) с поликатионом в случае, когда он является протяженным лигандом, занимающим при связывании несколько десятков пар нуклеотидов ДНК, и сопоставить полученные теоретические результаты с экспериментальными данными. При таком описании мы исходим из следующих представлений:

а) лиганд связывается с ДНК некооперативно, в растворе находятся в равновесии молекулы ДНК, на которых нет лигандов и молекулы, на которых адсорбирован один лиганд, два… и так далее — до максимального заполнения ДНК лигандами (в предположении, что лиганды не перекрываются при связывании и не «свешиваются» с концов ДНК);

б) при связывании лиганда с ДНК происходит взаимодействие его заряженных групп с фосфатами ДНК, благодаря чему по мере покрытия ДНК лигандом происходит нейтрализация фосфатов;

в) при достижении «критической» степени покрытия лигандом молекула ДНК спонтанно переходит в «измененное» состояние, которое необходимо для образования холестерической жидкокристаллической фазы;

г) в нашем подходе не рассматриваются механизмы взаимодействий между молекулами ДНК, покрытыми лигандом (например, «сшивки», обусловленные связыванием одной молекулы лиганда с двумя разными молекулами ДНК), мы лишь оцениваем число молекул ДНК, которые способны вступить в такие взаимодействия.

В рамках таких представлений можно сформировать простую теоретическую модель связывания хитозана с ДНК, которая служит подходом к описанию конденсации ДНК. Далее будет показано, что существует соответствие между предсказаниями такой модели и экспериментальными данными по образованию ЖКД по мере добавления хитозана в раствор.

A1.a Связывание поликатионов с ДНК, равновесие между двумя состояниями

Пусть при связывании на одной жесткой двухцепочечной молекуле ДНК (молекулярная масса которой не превышает 10^6 Да), некоторого «критического» числа лигандов q_{crit}, молекула ДНК становится способной к взаимодействию с другими молекулами ДНК, и это обеспечивает, в конечном счете, их переход в конденсированное состояние. Условимся называть здесь далее состояние матрицы ДНК, на которой связано q_{crit} или более лигандов (то есть заряды которой компенсированы в достаточной степени) «измененным» состоянием или состоянием 2 (обозначая обычное состояние матрицы ДНК как состояние 1). По мере возрастания концентрации хитозана в растворе все большее число молекул ДНК переходит в состояние 2, что делает возможным их взаимодействие и образование частиц ЖКД (рис. A1). Мы не описывали сам процесс образования дисперсии, мы оценили при помощи функции распределения долю молекул ДНК, способных участвовать в образовании ЖКД.

Пусть матрица ДНК, на которой адсорбировано менее q_{crit} молекул хитозана, находится в состоянии 1, а при адсорбции дополнительного числа

молекул хитозана, по мере того, как суммарное число адсорбированных молекул хитозана превышает q_{crit}, матрица переходит в состояние 2 (рис. А1).

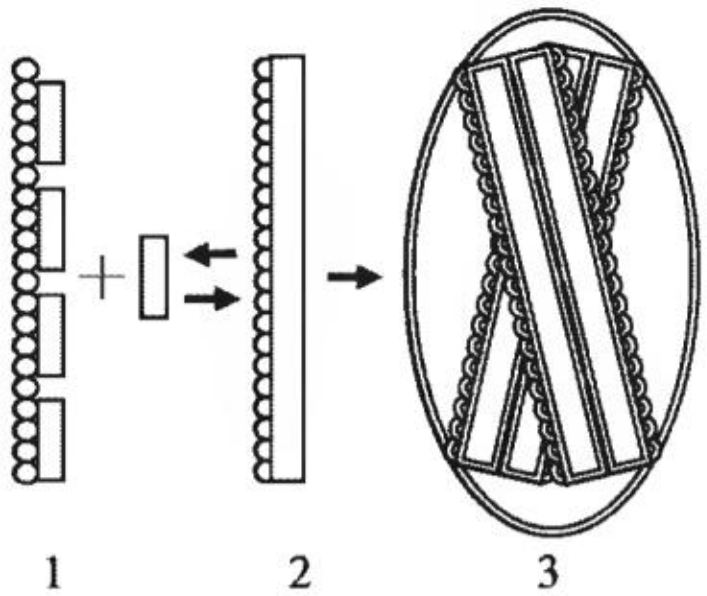

Рис. А1. Состояния ДНК с разной степенью «покрытия» лигандом и конденсация комплексов ДНК-лиганд при достижении «критической» степени покрытия. ДНК может существовать в трех состояниях: обычном — при степени покрытия лигандом, меньшем критического значения (1), измененном — при покрытии больше критического значения (2) и в составе холестерика (3), образованного соседними молекулами комплекса ДНК-лиганд

Состояние 2 характеризуется тем, что матрица ДНК, покрытая хитозаном, начинает вести себя как молекула, обладающая новыми свойствами: она проявляет способность к переходу в ЖКД (состояние 3). Если подавляющее число молекул ДНК, которые перешли в такое состояние, оказались в составе ЖКД, то можно считать, что доля молекул ДНК в составе ЖКД является параметром, позволяющим оценить соотношение между молекулами ДНК, находящимися в состояниях 1 и 2. Состояние 3 легко обнаруживается по величине аномального оптического сигнала в спектре КД [3].

Чтобы рассчитать концентрацию молекул ДНК, находящихся в состоянии 2 теоретически, надо воспользоваться соотношениями, позволяющими восстановить вероятность обнаружить в растворе молекулу ДНК, на которой адсорбировано лигандов больше, чем q_{crit} . Обозначим через $R(q_{crit})$ вероятность обнаружить в растворе молекулу ДНК с числом лигандов больше критического значения:

$$R(q_{crit}) = \sum_{q=q_{crit}}^{q_{max}} \Phi(q) = \frac{\sum_{q=q_{crit}}^{q_{max}} C_{N-qL+q}^{q} (Km)^{q}}{\sum_{q=0}^{q_{max}} C_{N-qL+q}^{q} (Km)^{q}}. \qquad (A1)$$

Пусть C_{DNA} обозначает полную концентрацию молекул ДНК (в парах оснований): $C_{DNA} = N\,C_M$. Обозначим через C_{lig} полную концентрацию ли-

ганда в растворе. Тогда

$$C_{\text{lig}} = m + \sum_{q=1}^{q_{\max}} \Phi(q)\, C_M = m + \frac{\sum_{q=1}^{q_{\max}} q C_{N-qL+q}^{q} (Km)^q}{N \sum_{q=0}^{q_{\max}} C_{N-qL+q}^{q} (Km)^q} C_{DNA}. \qquad \text{(A2)}$$

Уравнения (A1), (A2) позволяют рассчитать долю молекул ДНК, которые перешли в состояние 2, в зависимости от концентрации лиганда в растворе.

Действительно, зная величины K, L можно решить эти уравнения при помощи численных методов и для известных значений длины матрицы N и концентрации ДНК в растворе C_{DNA} построить зависимость $R(C_{\text{lig}})$. Заметим, что проще всего это можно сделать посредством параметрического решения: следует задать набор значений концентрации свободного лиганда в растворе m, который простирается примерно от $m = 0{,}05/K$ до $m = 1/K$, то есть в той области, в которой происходит связывание. В результате мы получим кривую $R(C_{\text{lig}})$, которая описывает переход ДНК из состояния, когда в среднем на одной молекуле полимера адсорбировано менее q_{crit} лигандов в состояние, когда среднее число лигандов $<q>$ больше q_{crit} . На рис. A2 показан пример того, как движется функция распределения $\Phi(q)$ вдоль оси q по мере увеличения концентрации свободного лиганда m: все большее число молекул ДНК несет на себе число лигандов $q > q_{\text{crit}}$, и, соответственно, возрастает величина $R(C_{\text{lig}})$.

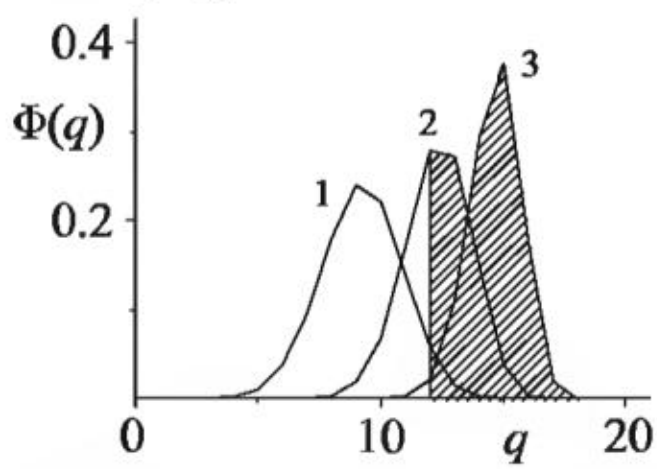

Рис. A2. Функция распределения, характеризующая связывание лиганда с молекулами ДНК для разных значений концентрации свободного лиганда в растворе. ДНК имеет размер $N = 800$ пар оснований, лиганд покрывает при связывании $L = 40$ пар оснований. Кривые 1, 2 и 3 рассчитаны по формуле (A1) для значений Km, равных 0,01, 0,163, и 0,872, соответственно. Заштрихованная область соответствует доле молекул ДНК, на которых связано 12 или более лигандов (такие молекулы ДНК переходят в состояние 2, в соответствии с моделью на рис. A1)

Однако на практике перед исследователями чаще стоит другая задача, — а именно, зная экспериментальную зависимость $R(C_{\text{lig}})$, нужно оце-

нить размер связывающего места L, которое занимает лиганд при связывании на ДНК и величину константы взаимодействия лиганда со связывающим местом K. Ниже мы покажем, как можно решать эту задачу для случая связывания хитозана с молекулами ДНК в том случае, когда в результате такого связывания образуется ЖКД ДНК.

А1.б Сопоставление кривых связывания с данными по образованию жидкокристаллической дисперсии

В работе [3] были получены данные о связывании хитозана с ДНК и последующем образовании ЖКД ДНК при помощи методов кругового дихроизма (КД) и «кажущейся» оптической плотности. Каждая из характерных кривых, описывающих такое связывание, имеет S-образный вид (см. ниже). Описание методики эксперимента содержится в [3].

Размер молекул ДНК составлял примерно 800 пар нуклеотидов. Молекулы хитозана в разных опытах имели вес от 2 кДа до 32 кДа, т. е. в их составе было примерно от 10 до 160 аминосахарных остатков (молекулярный вес одного остатка — 200 Да).

Мы провели расчеты теоретических кривых связывания хитозана для каждого из экспериментов, используя данные независимых измерений кругового дихроизма и «кажущейся» оптической плотности. На основании литературных данных было сделано предположение, согласно которому одна молекула ДНК при значении покрытия ее лигандом $\alpha = 0{,}8$ переходит в измененное состояние (также проводились расчеты для значения $\alpha = 0{,}7$). Для определенных L находилось значение константы связывания K, которое соответствовало наилучшему совпадению теоретической кривой с экспериментальными данными. Зная величину α, при заданных L и N можно найти значение $q_{\text{crit}} = \alpha\, N/L$ и при помощи (А1), (А2) рассчитать теоретическую кривую.

Критерием выбора значений константы связывания K служила сумма квадратичных отклонений теоретических значений доли молекул ДНК, перешедших в ЖК-состояние, от экспериментальных значений. Для каждой экспериментальной кривой мы оценили, что такая доля для точек кривой, соответствующих максимуму сигнала, примерно равна 1 (при дальнейшем увеличении концентрации молекул хитозана в растворе начинались необратимые процессы, связанные с осаждением частиц ЖКД).

Проиллюстрируем наш подход на примере анализа двух кривых, полученных при помощи измерения КД и «кажущейся» оптической плотности и соответствующих связыванию молекул хитозана весом 13,6 кДа. Одна такая молекула содержит примерно 68 аминосахарных остатков. Один

остаток имеет длину около 5 Å. Учитывая тот факт, что две ближайших соседних пары ДНК разделяют 3,4 Å, можно представить, что максимально возможный размер связывающего места, которое занимает молекула из 68 остатков на ДНК в случае, когда она располагается параллельно длинной оси ДНК, составляет $L = 68 \times 5/3{,}4 = 100$ пар нуклеотидов (реакционных центров матрицы).

Заметим, что эта величина завышена: молекула хитозана может «обвивать» молекулу ДНК по спирали, изогеометричной ходу фосфатного остова; в этом случае длина связывающего места должна быть примерно в два раза меньше ($L \sim 50$ пар нуклеотидов). При данном чисто стерическом подходе мы рассматриваем хитозан как физическое тело и не учитываем того факта, что лишь каждая вторая группа молекулы несет заряд, т. е. не учитываем деталей и природы взаимодействия хитозана с ДНК: нас интересует только размер места, который покрывает молекула хитозана на ДНК. В рамках нашего подхода размер этого места измеряется числом реакционных центров матрицы, которые становятся недоступными для связывания другой молекулы лиганда.

На рис. А3 показаны значения среднеквадратичных отклонений, которые рассчитаны для значений L от 10 и до 120 пар нуклеотидов (то есть в том интервале, куда заведомо должен попадать искомый размер связывающего места одной молекулы хитозана). Видно, что наилучшее совпадение теории с экспериментом получается при значении $L = 40$ пар оснований. Для каждого значения L мы находили то значение K, которое минимизировало сумму среднеквадратичных отклонений — и именно эту сумму показывали на рисунке. Минимизация производилась при помощи пакета программ МАТЛАБ.

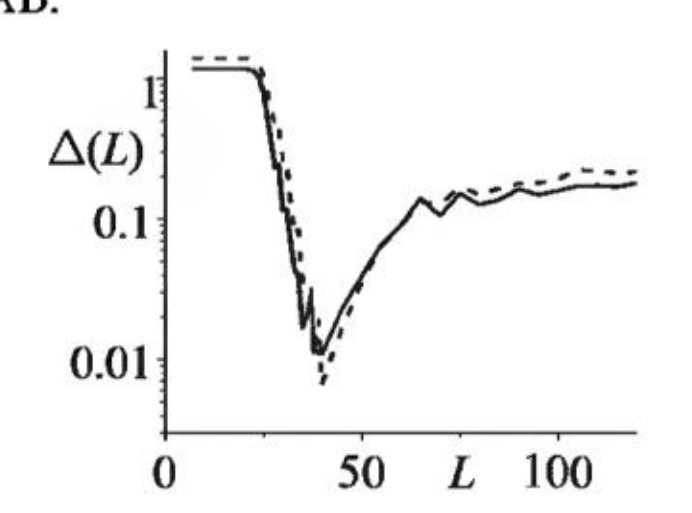

Рис. А3. Зависимость суммы квадратов отклонений экспериментальной кривой от теоретической $\Delta(L)$ для молекулы хитозана массой 13,6 кДа. Каждая точка рассчитана для определенного значения L (размера связывающего места хитозана на ДНК), причем величина константы связывания K выбрана так, что достигается наилучшее совпадение теоретической кривой с экспериментальными данными. Расчеты для данных по поглощению показаны непрерывной линией, для данных КД — прерывистой линией

В таблице А1 показаны результаты расчетов для всех экспериментальных кривых. В верхней части суммированы значения величин K и L, которые мы определили на основании экспериментальных данных, полученных при помощи метода КД, в нижней части — при помощи поглощения. L_{min} и L_{max} соответствуют минимальному и максимальному размеру связывающего места, K_{min} и K_{max} соответствуют минимальному и максимальному значениям константы, которые мы определяли с помощью метода наименьших квадратов.

Таблица А1. Оценки значений размеров связывающих мест L, которые покрывают при связывании на ДНК молекулы хитозана, имеющие различную молекулярную массу и оценки констант взаимодействия таких молекул хитозана со связывающими местами на ДНК. В верхней половине таблицы показаны результаты анализа экспериментальных данных, полученных при помощи метода КД, в нижней — результаты анализа данных, полученных при помощи измерений поглощения

Масса (кДа)	L	L_{min}	L_{max}	$\alpha = 0,7$		$\alpha = 0,8$	
				K_{min} (M^{-1})	K_{max} (M^{-1})	K_{min} (M^{-1})	K_{max} (M^{-1})
2	7	3	20	2,0E+04	6,0E+04	2,0E+05	2,0E+05
2,1	10	3	25	2,0E+04	5,0E+04	2,0E+05	2,0E+05
4,1	12	7	24	3,0E+05	1,0E+06	1,0E+06	6,0E+06
7,8	17	11	33	4,0E+05	1,0E+07	3,0E+06	2,0E+10
13,6	40	32	60	2,0E+06	5,0E+07	1,0E+07	4,0E+10
19	55	39	95	6,0E+05	8,0E+09	4,0E+06	4,0E+10
26,7	70	60	110	2,0E+06	8,0E+07	8,0E+06	3,0E+09
31	90	70	150	2,0E+06	6,0E+08	5,0E+06	9,0E+10
Масса (кДа)	L	L_{min}	L_{max}	$\alpha = 0,7$		$\alpha = 0,8$	
				K_{min} (M^{-1})	K_{max} (M^{-1})	K_{min} (M^{-1})	K_{max} (M^{-1})
2	5	3	16	2,0E+04	6,0E+04	2,0E+05	2,0E+05
2,1	9	6	20	2,0E+04	4,0E+04	9,0E+04	2,0E+05
4,1	9	8	12	2,0E+05	1,0E+06	4,0E+06	6,0E+06
7,8	17	13	20	1,0E+06	9,0E+06	8,0E+06	9,0E+09
13,6	40	32	65	2,0E+06	4,0E+10	9,0E+06	4,0E+10
19	50	40	75	1,0E+06	7,0E+07	2,0E+07	4,0E+10
26,7	80	60	120	1,0E+06	3,0E+09	1,0E+07	3,0E+10
31	75	60	110	1,0E+06	9,0E+10	6,0E+06	9,0E+10

На рис. А4 продемонстрированы результаты анализа экспериментальных данных, полученных при помощи методов КД и оптического поглощения, соответственно. Видно, что эти данные близки и дают примерно

один и тот же результат: длина связывающего места, которое занимает молекула хитозана на ДНК прямо пропорциональна молекулярной массе хитозана. Это факт свидетельствует в пользу того, что связывание с ДНК длинных молекул хитозана происходит тем же способом, что и связывание коротких молекул хитозана.

Таблица А2. Значения энергетических параметров связывания хитозана с ДНК, получаемые в результате анализа экспериментальных данных

		a	b (x 10^4 M^{-1})
α=0,7	КД	(0,13±0,08)	(1,9±1,2)
	Поглощение	(0,09±0,05)	(2,8±1,9)
α=0,8	КД	(0,14±0,08)	(8,7±5,6)
	Поглощение	(0,10±0,07)	(11,8±4)

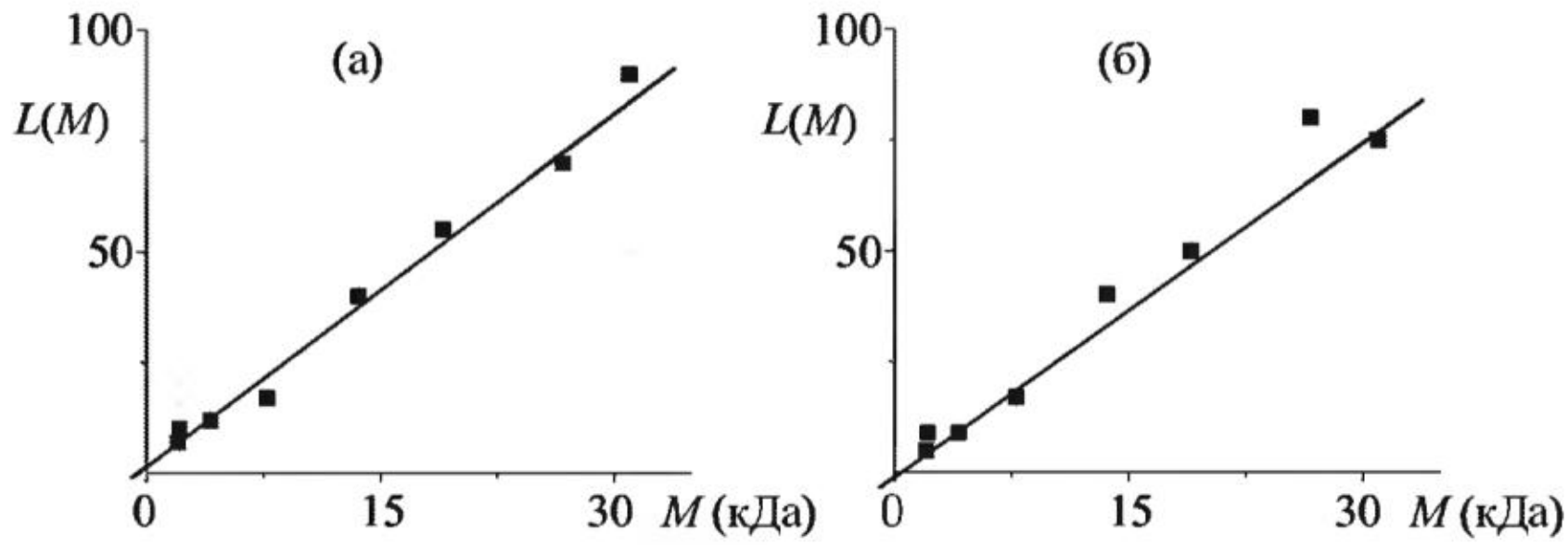

Рис. А4. Значения размеров связывающих мест, дающие наилучшее соответствие теории и эксперимента для адсорбции на ДНК молекул хитозана разной молекулярной массы M — молекулярная масса хитозана, $L(M)$ — размер связывающего места (в парах оснований). (а) результаты, полученные на основании анализа данных КД, (б) результаты, полученные на основании анализа измерения «кажущейся» оптической плотности

Таким образом, соотношение между длиной связывающего места и массой молекулы хитозана можно записать в виде:

$$L = cM.$$

Здесь c — коэффициент пропорциональности. Анализ данных по КД позволяет оценить величину c = (2,64 ± 0,25) кДа$^{-1}$, анализ данных по поглощению позволяет оценить эту величину более точно: c = (2,79 ± 0,15) кДа$^{-1}$. Если принять эту вторую оценку, то можно посчитать, что 5 аминосахарных остатков, которые весят примерно 1 кДа, занимают около 2,8 пар ос-

нований ДНК. Длина сахарофосфатного остова ДНК, соответствующего 1 паре оснований, равна примерно 7,2 ангстрем. Итак, 5 аминосахарных остатков покрывают на ДНК участок в 20 ангстрем. Сами собой эти 5 остатков имеют несколько большую длину — 25 ангстрем (возможно, такое отличие обусловлено тем, что аминосахарная цепь хитозана может примерно на 1/5 часть «свешиваться» с молекулы ДНК, т. е. образовывать петли или другие структуры).

Если предположить, что способ связывания хитозана с ДНК не зависит от длины молекулы хитозана, то энергия такого связывания должна аддитивно меняться в зависимости от длины связывающего места, которое занимает хитозан, и константа связывания должна экспоненциально зависеть от длины. Мы можем предположить, что должно выполняться соотношение

$$K = b\exp(aL).$$

В таблице А2 показаны оценки величин a и b, полученные в результате нашего анализа для двух значений критического покрытия ДНК хитозаном $\alpha = 0{,}7$ и $\alpha = 0{,}8$.

Заметим, что в целом значения констант, получаемые при таком анализе, не контрастируют с данными, характеризующими связывание поликатионов с ДНК, полученными в работах разных авторов. Изменение свободной энергии связывания в расчете на одну пару оснований в соответствии с данными таблицы А2 оказывается небольшим, так что при увеличении размера связывающего места хитозана на 10 пар оснований константа связывания возрастает в 2,8 раз.

Следует добавить, что для описания образования ЖКД ДНК в результате связывания молекул хитозана с ДНК были предприняты попытки использовать ряд других моделей, в частности, вторую модель Поршке из работы [5], в которой компактизация нуклеиновых кислот происходит посредством образования комплексов, в которых одна молекула лиганда связывает между собой две молекулы ДНК. Однако, на этом пути мы не смогли построить удовлетворительного описания имеющихся экспериментальных данных. Что неудивительно, так как в нашем случае образуется ЖК фаза, в которой молекулы ДНК сохраняют подвижность, т. е. они не связаны хитозановыми «сшивками».

На рис. А5 приведены примеры расчетов, проведенных для молекул хитозана разной молекулярной массы [2]. Видно, что наблюдается хорошее совпадение теоретических кривых с экспериментальными.

Здесь нами развита модель, в рамках которой при достижении определенного критического покрытия ДНК лигандом в растворе начинается переход молекул ДНК в состояние, при котором возможно взаимодействие

между молекулами комплексов (лиганд-ДНК) и образование ЖКД. Заметим, что эта модель близка модели Поршке, предложенной для связывания протаминов с ДНК [5]. Однако в отличие от модели Поршке, мы не вводим в рассмотрение константу перехода ДНК из обычного состояния в «измененное» и не рассматриваем равновесие между двумя этими формами, а считаем, что такой переход происходит спонтанно и необратимо.

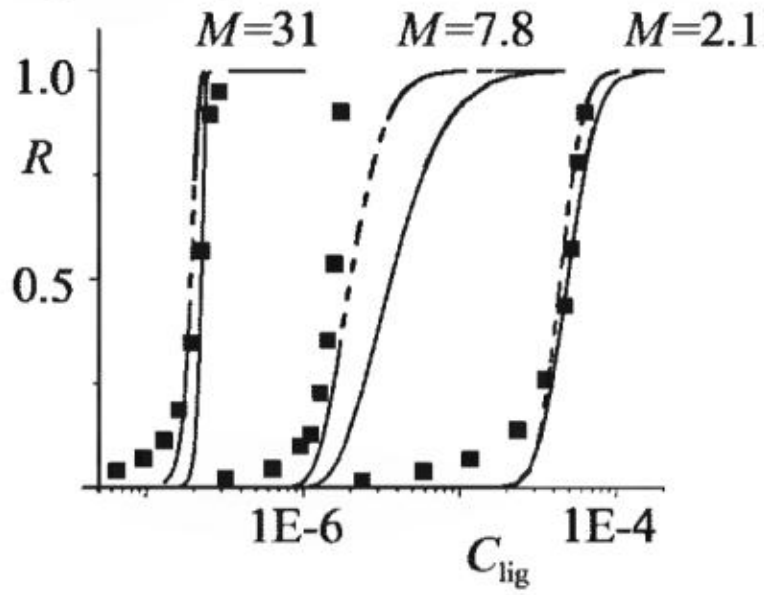

Рис. А5. Экспериментальные и теоретические кривые, описывающие связывание молекул хитозана различной молекулярной массы с ДНК. R — величина сигнала, нормированная на максимальное значение сигнала для измерений поглощения. C_{lig} — концентрация хитозана в растворе, M — молекулярная масса хитозана. Сплошными линиями показаны результаты теоретических расчетов соответствующих кривых для случая, когда молекула ДНК переходит в измененное состояние при степени покрытия ДНК хитозаном, равной $\alpha = 0{,}8$, штриховыми линиями показаны кривые, рассчитанные для $\alpha = 0{,}7$

Заметим, что для описания образования ЖКД ДНК в результате связывания с ДНК молекул хитозана были предприняты попытки использовать ряд других моделей, в частности, вторую модель Поршке из работы [5], в которой компактизация нуклеиновых кислот происходит посредством образования комплексов, в которых одна молекула лиганда связывает между собой две молекулы ДНК. Однако на этом пути мы не смогли построить удовлетворительного описания имеющихся экспериментальных данных. Что и неудивительно, так как в нашем случае образуется ЖК фаза, в которой молекулы ДНК сохраняют подвижность, т. е. они не связаны сшивками.

В рамках построенной выше модели мы смогли объяснить также и зависимость константы связывания хитозана с ДНК от ионной силы (см. [6]).

Литература

1. *Нечипуренко Ю. Д., Вольф А. М., Евдокимов Ю. М.* Функция распределения, описывающая связывание протяженных лигандов с молекулами ДНК. Воз-

можное применение для случая конденсации ДНК // Биофизика. 2003. Т. 48, С. 635–643.

2. *Нечипуренко Ю. Д., Вольф А. М., Салянов В. И., Евдокимов Ю. М.* Равновесная адсорбция лигандов на молекулах ДНК (на примере хитозана) // ЖЭТФ. 2004. Т. 125. С. 103–111.
3. *Евдокимов Ю. М., Салянов В. И., Семенов С. В., Ильина А. В., Варламов В. П.* // Мол. биология. 2002. Т. 36. С. 532–541.
4. *Yevdokimov Yu.M., Salyanov V. I.* Liquid crystalline dispersions of complexes formed by chitosan with double-stranded nucleic acids // Liquid Crystals. 2003.V. 30. P. 1057–1074.
5. *Porschke D.* Nature of protamine-DNA complexes. A special type of ligand binding cooperativity // J. Mol. Biol. 1991. V. 222, P. 423–433.
6. *Воробьев Е. А., Нечипуренко Ю. Д., Салянов В.И и Евдокимов Ю. М.* Описание связывания хитозана с ДНК при разных ионных силах в рамках теории ионной конденсации и теории адсорбции // Биофизика, 2007, Т. 52, С. 636–642.

Приложение Б
ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ, ОПИСЫВАЮЩИЕ ОБРАЗОВАНИЕ «МОСТИКОВ» МЕЖДУ МОЛЕКУЛАМИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ЖИДКИХ КРИСТАЛЛАХ

Это приложение основывается на цикле работ, проведенных совместно с Ю. М. Евдокимовым, М. А. Захаровым, В. И. Саляновым, С. В. Семеновым, В. Ф. Рябоконем и опубликованных в [1–5].

Рассмотрим связывание лигандов на частицах жидкокристаллической дисперсии (далее — ЖК дисперсии), образованных из молекул нуклеиновых кислот длиной 1000 пар нуклеотидов. В одной частице дисперсии находятся примерно десять тысяч молекул НК, эти молекулы упорядочены; расстояние между соседними молекулами может меняться от 30 до 45 ангстрем [6]. Частицы ЖКД, в которых соседние молекулы НК «сшиты» при помощи «наномостиков», можно рассматривать как молекулярные конструкции. «Наномостиком» или просто «мостиком» мы будем называть полимерный хелатный комплекс, состоящий из чередующихся ионов меди и молекул антибиотика антрациклинового ряда — дауномицина (далее — ДАУ, см. рис. Б1). За образованием мостиков между молекулами НК, фиксированными в структуре холестерической ЖКД, можно следить при помощи метода кругового дихроизма (КД). Хромофоры молекул ДАУ в мостиках упорядочены определенным образом, а система мостиков в целом обладает собственной оптической активностью, которая проявляется в виде аномальной полосы в спектре КД.

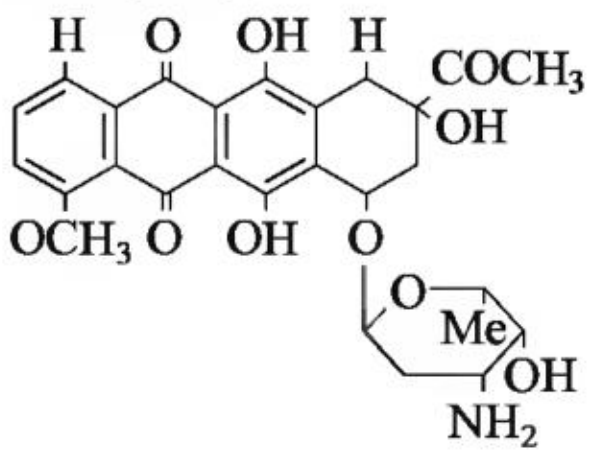

Рис. Б1. Структурная формула дауномицина

Зависимости сигнала КД от концентраций ионов меди и молекул ДАУ в растворе при образовании молекулярной конструкции представляет собой кривые S-образной формы. Такие кривые могут быть описаны не только качественно, но и количественно в рамках теоретической модели, учитывающей связывание ДАУ и ионов меди с НК в составе ЖКД и образование мостиков между молекулами НК [1–4].

Здесь будет рассмотрен ряд моделей, описывающих образование мостиков и будет показано, что примерно с одинаковым успехом можно описать количественно экспериментальные данные в рамках трех разных вариантов модели адсорбции.

Б1. Модель адсорбции

Пусть в растворе при постоянном давлении и постоянной температуре находятся в равновесии частицы ЖКД, состоящие из молекул НК, на которых адсорбированы молекулы ДАУ и ионы меди, а также свободные молекулы ДАУ и свободные ионы меди.

Рассмотрим один квазинематический слой частицы ЖКД в качестве адсорбента. Предположим, что все пары ближайших соседних молекул НК, которые расположены параллельно друг другу в таком слое, лежат относительно друга таким образом, что их можно назвать «фазированными». Здесь это понятие вводится для описания расположения молекул НК в слое частицы ЖКД впервые, поэтому остановимся на нем более подробно. Для этого следует рассмотреть определенную модель образования мостика между ближайшими соседними молекулами НК, расположенными в одной плоскости.

В молекулярной модели образования мостика, которая была предложена Евдокимовым и соавторами предполагалось, что «мостик» крепится к молекуле ДНК посредством образования «внешнего» комплекса между молекулой ДАУ и связывающим местом на ДНК [6]. В этом комплексе плоскость молекулы ДАУ перпендикулярна длинной оси молекулы ДНК. В настоящее время основные черты этой модели остаются неизменными, однако все больше данных свидетельствуют о том, что мостик может начинаться с иона меди, который связывается с парами оснований ДНК. Такое связывание может осуществляться, например, с N7 атомом аденина, выходящим в широкую бороздку ДНК [7].

Рассмотрим вектор $\bar{l}$, проведенный в плоскости молекулы ДАУ, которая образует комплекс с таким ионом меди, который связан с ДНК, и проходящий между двумя парами атомов кислорода в направлении от этой молекулы ДАУ к следующей молекуле ДАУ в мостике (рис. Б2). В направлении этого вектора $\bar{l}$ образуется мостик, который соединяет молекулы

ДНК. Рассмотрим мостик, образованный между двумя молекулами ДНК: пусть ему соответствует вектор $\bar{I}_1$. Если переместить ион меди, лежащий в основании этого вектора и связанный с ДНК, на одну пару оснований (так, чтобы тип комплекса Cu^{2+} — ДНК сохранился), вектор $\bar{I}_1$ повернется в пространстве на 36° , согласно спиральной симметрии ДНК, и займет положение $\bar{I}_2$.

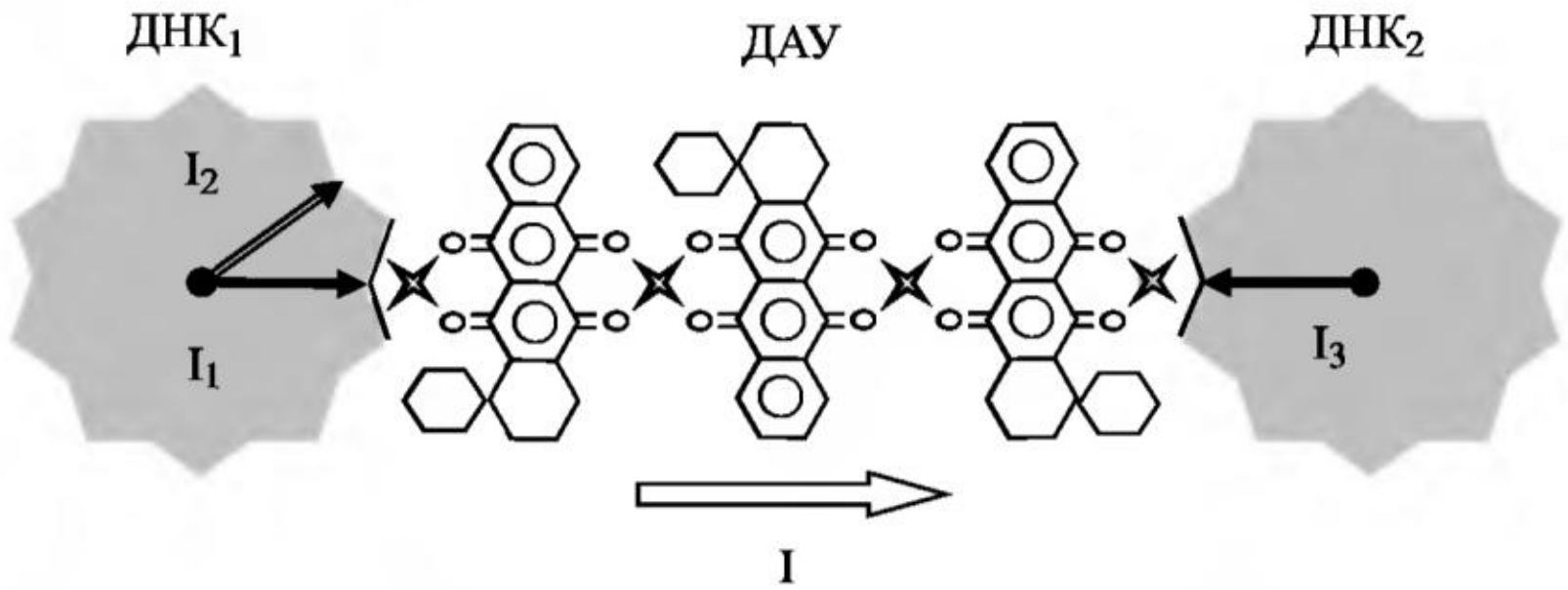

Рис. Б2. Схема образования мостика между двумя молекулами ДНК. Молекулы ДНК показаны так, что длинные оси их перпендикулярны плоскости рисунка. Места связывания иона меди с симметричными парами оснований этих молекул ДНК выделены жирным. Мостик составляется из трех молекул дауномицина. **I** – вектор, соответствующий направлению образования мостика. Вектор $\mathbf{I_3}$ повернут на 180° по отношению к $\mathbf{I_1}$. В силу спиральной симметрии ДНК вектор $\mathbf{I_2}$, соответствующий месту связывания иона меди со следующей в последовательности парой оснований, сдвинут на 36°

Если мостик составляется из 3–5 молекул ДАУ, то длина его равна 15–25 ангстрем и, соответственно, при повороте вектора у основания мостика на 36° его конец опишет дугу длиной в 8–12 ангстрем. Таким образом, вектор $\bar{I}_2$ пройдет мимо той молекулы ДНК, в которую «попадал» $\bar{I}_1$. Из этого следует, что в рамках рассматриваемой модели между двумя соседними молекулами ДНК не может быть образовано два мостика, соединяющих две последовательные пары оснований одной молекулы с двумя последовательными парами оснований другой молекулы. Заметим, что этот вывод основан на предположении о «жесткой» фиксации при взаимодействии иона меди со связывающим местом на ДНК (однако даже и при отсутствии такой фиксации трудно себе представить, чтобы молекула ДАУ могла бы иметь большие возможности для «люфта» при связывании на ДНК). Нетрудно заметить, что благодаря спиральной симметрии в случае ДНК лишь через 10 пар оснований рассматриваемый нами вектор $\bar{I}$, совпадающий с направлением мостика, опишет полный круг и станет возможным

образование мостика между ближайшими соседними молекулами ДНК, расположенными в одной плоскости. Из этого следует, что два ближайших витка пары соседних молекул ДНК могут быть соединены только одним мостиком (конечно, следует иметь в виду, что мы предполагаем здесь существование одного типа комплекса иона меди с ДНК, который может служить основанием мостика: однако, наличие двух или даже трех разных типов комплекса не меняет логику нашего рассмотрения: в этом случае возможно два или три мостика между молекулами ДНК в расчете на один виток).

Предположим, что рассматриваемый комплекс, соответствующий образованию мостика, обусловлен связыванием иона меди по большой бороздке ДНК. В этом случае мостик, начавшийся с иона меди, «утопленного» в большую бороздку одной молекулы ДНК, должен закончиться также ионом меди, эквивалентным образом «утопленным» в большую бороздку ближайшей соседней молекулы ДНК. Однако для этого вторая молекула ДНК должна быть повернута в этом месте таким образом, чтобы вектор $\bar{I}$, начавшийся с большой бороздки, встретил на своем пути также большую бороздку ближайшей соседней молекулы. Поворот первой молекулы ДНК относительно второй молекулы ДНК должен составлять 180°, такой поворот мы будем называть «фазированием» ближайших соседних молекул. Если рассмотреть одну плоскость, то каждая последующая молекула ДНК должна быть повернута относительно предыдущей на этот угол, и тогда мы будем называть все молекулы ДНК фазированными. В этом случае между каждой парой ближайших соседних молекул может образоваться один мостик на виток.

Заметим, что можно представить иную ситуацию — мостики могут начинаться и заканчиваться молекулами ДАУ, связанными с парами оснований ДНК. Однако и в этом случае (если рассматривается только один тип комплекса, который образует молекулы ДАУ с парами оснований ДНК), будут справедливы приведенные выше рассуждения о необходимой для образования мостиков фазировке молекул НК в слое.

С точки зрения теории адсорбции один квазинематический слой, который образуют молекулы НК, можно рассмотреть как набор эквивалентных матриц, каждая из которых состоит из двух решеток реакционных центров. Один полный виток НК можно представить в рамках решетки как один реакционный центр, и две ближайших соседних молекулы НК составляют матрицу реакционных центров (рис. Б3 а и б).

Матрица реакционных центров является удобной моделью адсорбента, позволяющей свести задачу о связывании молекул ДАУ и ионов меди на плоскости к рассмотрению одномерной адсорбции. Заметим, что матрица в этом случае не является простой цепочкой реакционных центров и не

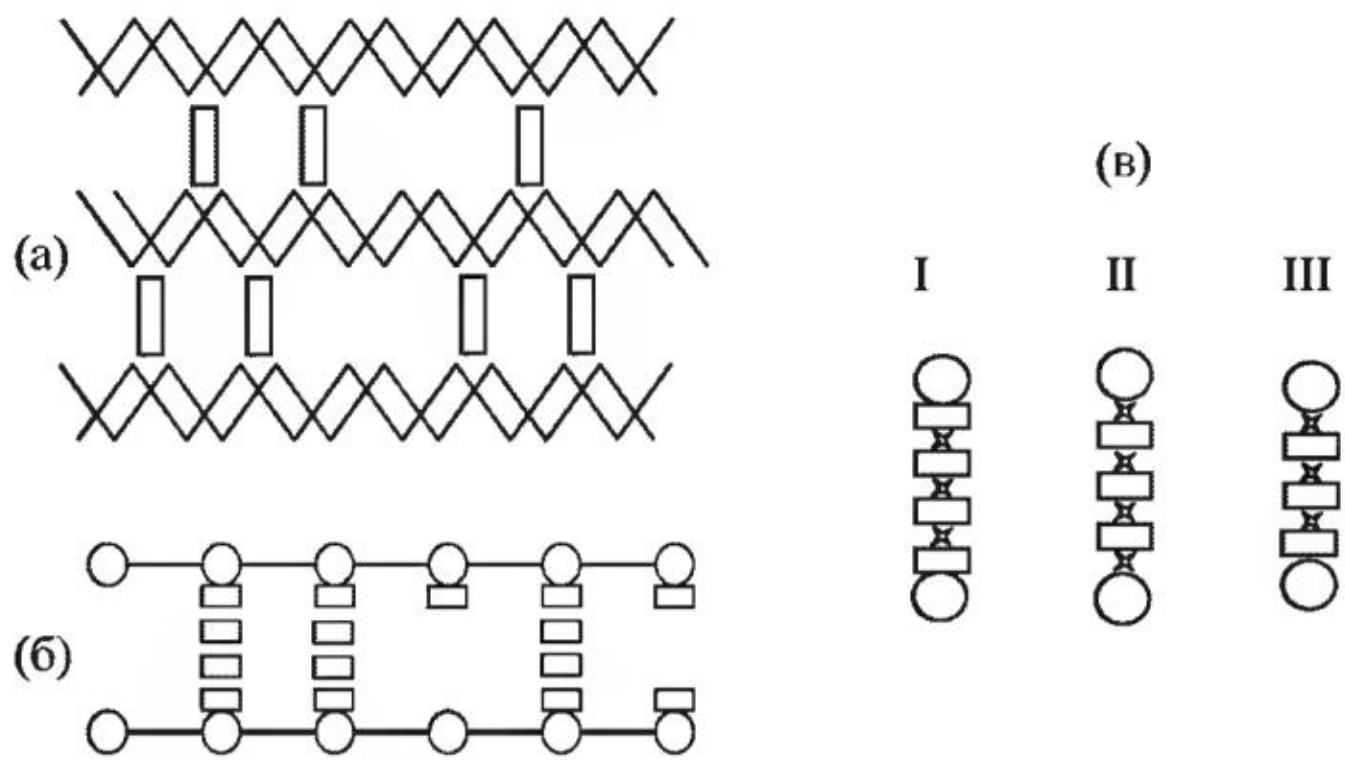

Рис. Б3. Схемы связывания, описывающие образование мостиков между молекулами НК. (а) Показаны мостики между ближайшими соседними молекулами НК, расположенными в одной плоскости. (б) Две ближайшие соседние молекулы НК образуют решетку реакционных центров — матрицу для связывания лигандов. Один реакционный центр (кружок на рисунке) соответствует одному периоду НК. Мостики и молекулы дауномицина конкурируют за реакционные центры. (в) Возможные структуры мостиков между двумя молекулами НК. Кружками показаны реакционные центры, прямоугольниками — молекулы ДАУ, четырехугольными звездочками — ионы меди. Всего возможно три варианта образования «мостика» (I, II, III)

сводится к линейному полимеру. Такая матрица составляется из двух полимеров (двух молекул ДНК в данном случае) и несет в себе возможность моделирования двумерной адсорбции. Строго говоря, мы имеем в данном случае еще более сложную ситуацию: связывание происходит не на поверхности, а между поверхностями сближенных молекул ДНК. Мостик является наноструктурой, которая возникает между сближенными поверхностями двух молекул ДНК в процессе координированной адсорбции. Координированная адсорбция возникает в ситуации, когда реакционные центры, принадлежащие разным молекулам, составляющим адсорбент (в данном случае — молекулам ДНК) и служащие центрами связывания лиганда сближены и расположены определенным регулярным образом (это подразумевает, что сами молекулы фазированы или коллинеарны).

Один реакционный центр способен связывать молекулу ДАУ и может служить основанием мостика. Каждые две соседние молекулы НК формируют одну такую матрицу. Еще одно предположение модели состоит в том, что связывание ДАУ и образование мостиков на одной матрице не влияет на связывание на соседней матрице. Действительно, адсорбированная по типу внешнего присоединения молекула ДАУ не может стерически

занимать больше, чем полвитка НК. Таким образом, она не может влиять на связывание ДАУ на следующей половине витка молекулы НК, которая формирует реакционный центр, входящий в соседнюю матрицу (конечно, если не имеет место аллостерический эффект НК). Еще меньшее место занимает на ДНК адсорбированный ион меди [7].

Пусть каждая матрица имеет N стерически возможных мест связывания с ДАУ (т. е. N — число реакционных центров). Существуют три разных варианта образования «мостика» в рамках вышеизложенной модели адсорбции (рис. Б3 в).

I. Мостик начинается и заканчивается молекулами ДАУ, связанными с НК — тогда он будет состоять из n молекул ДАУ и $n-1$ ионов меди ($n > 1$).

II. Мостик начинается и заканчивается ионами меди, связанными с НК: тогда он состоит из n молекул ДАУ и $n+1$ ионов меди ($n \geq 1$).

III. Мостик начинается ионом меди и заканчивается молекулой ДАУ, тогда он содержит n молекул ДАУ и n ионов меди.

Рассмотрим сначала первый вариант, который следует из гипотетической молекулярной модели образования мостиков, предложенной в [6].

Пусть Δf — свободная энергия взаимодействия молекулы ДАУ с реакционным центром НК (энергия здесь будет измеряться в единицах RT, и константа связывания ДАУ с одним реакционным центром будет равна $K_D = \exp(-\Delta f)$; стандартное изменение свободной энергии выбрано так, чтобы константа измерялась в M^{-1}, где М обозначает моль/литр). Предположим, что энергия взаимодействия ДАУ с реакционным центром НК не зависит от того, входит ли эта молекула в состав мостика или связана отдельно. Обозначим посредством Δg свободную энергию взаимодействия молекулы ДАУ с ионом меди в мостике. Тогда образование «мостика» между двумя реакционными центрами НК будет характеризоваться константой равновесия

$$K_1 = \exp(-2(Df + (n-1)Dg)).$$

Пусть между реакционными центрами рассматриваемой матрицы (рис. Б3 а) образовано Q мостиков — и по q молекул ДАУ связано еще на каждой из составляющих матрицу молекул НК. Тот факт, что на каждой нити реакционных центров связано по одинаковому числу молекул ДАУ, следует из симметрии системы. Заметим, что каждая из молекул НК входит в две соседних матрицы, так что в сумме на каждой молекуле НК адсорбировано по 2 q молекул ДАУ. Следуя подходу Скетчарда (см. Главу 2), можно написать уравнение для изменения свободной энергии системы $\Delta F(Q, q)$ в реакции образования Q мостиков и связывания 2 q молекул ДАУ. Как показано в работе [2], приравнивая к нулю вариацию свободной энергии

по переменным Q и q, можно прийти к уравнениям следующего вида (для первого варианта — когда в мостик входит n молекул ДАУ и $n-1$ ионов меди, здесь $n>1$; заметим, что в работе [2] уравнения записаны для случая, когда n обозначает число ионов меди).

$$r = K_D C_f (1 - r - R), \tag{Б1}$$

$$R(1-R) = K_1 C_f^n C_u^{n-1} (1 - r - R)^2. \tag{Б2}$$

Здесь $r = q/N$ — степень заполнения одной нити реакционных центров молекулами ДАУ, $R = Q/N$ — степень заполнения матрицы мостиками. C_f, C_u свободные концентрации лиганда ДАУ и ионов меди в растворе соответственно, $K_D = \exp(-\Delta f)$, $K_1 = \exp(-2(\Delta f + (n-1)\Delta g))$.

Уравнения (Б1), (Б2) позволяют рассчитывать теоретические кривые связывания: зная энергию связывания ДАУ с НК и энергию образования координационных связей между молекулами ДАУ и ионами меди в мостике Δg, для любого набора концентраций свободных молекул ДАУ и свободных ионов меди в растворе, можно рассчитать значения заполнений матрицы НК мостиками и молекулами ДАУ.

Однако обычно решается обратная задача: только часть констант (или энергий) известна из независимых источников, и необходимо восстановить из экспериментальных данных неизвестные энергетические и стерические параметры связывания. Экспериментаторы оперируют в большинстве случаев не свободными концентрациями компонентов в растворе, а общими («суммарными») концентрациями. Для анализа экспериментальных данных необходимо дополнить уравнения (Б1), (Б2) соотношениями материального баланса.

$$C_{DAU} = (Rn + 2r) C_{NA} d + C_f, \tag{Б3}$$

$$C_{Cu} = (n-1) R\, C_{NA} d + 0{,}25 C_{NA} K_u C_u / (1 + K_u C_u) + C_u. \tag{Б4}$$

Эти уравнения были получены нами в работе [2]. Здесь $C_{NA}\, d$ - концентрация реакционных центров в растворе, C_{NA} — концентрация нуклеиновой кислоты (в парах нуклеотидов), d - параметр фазировки [1]. В нашем случае, когда все ближайшие соседние молекулы НК синфазны, $d = 1/h$, где h — число пар оснований, которые приходятся на один реакционный центр: для В формы ДНК $h = 10$, для РНК $h = 11$. Далее, K_u — константа неспецифического связывания ионов меди с одним связывающим местом на НК. Величину K_u можно оценить на основании анализа данных по связыванию ионов меди с ДНК, мы использовали значение $K_u \sim 5 \times 10^6$ M^{-1} [2]. Коэффициент 0,25 в уравнении (Б4) стоит потому, что в качестве «сильно-

го» связывающего места двойной спирали НК для иона меди могут выступать четыре пары оснований полимера.

Соответственно, для второго варианта модели можно получить уравнения:

$$r = K_D C_f (1 - r - R), \qquad (Б1')$$

$$R(1 - R) = K_2 C_f^{\,n} C_u^{\,n+1} (1 - r - R)^2, \qquad (Б2')$$

$$C_{DAU} (Rn + 2r) C_{NA} d + C_f, \qquad (Б3')$$

$$C_{Cu} = (n+1) R C_{NA} d + 0,25 C_{NA} K_u C_u / (1 + K_u C_u) + C_u. \qquad (Б4')$$

Здесь K_2 = exp (–2 ($n\,\Delta g + \Delta u$)). Отличие этого варианта от предыдущего заключается в том, что мостик начинается и заканчивается ионами меди, связанными с НК. Мы предположили, что энергия этого связывания примерно равна той энергии, которая характерна для связывания ионов меди с молекулой НК вне мостика, то есть характеризуется величиной $\Delta u = -\ln K_u$.

Третий вариант модели соответствует уравнениям:

$$r = K_D C_f (1 - r - R), \qquad (Б1'')$$

$$R(1 - R) = K_3 C_f^{\,n} C_u^{\,n} (1 - r - R)^2, \qquad (Б2'')$$

$$C_{DAU} = (Rn + 2r) C_{NA} d + C_f, \qquad (Б3'')$$

$$C_{Cu} = nRC_{NA} d + 0,25 C_{NA} K_u C_u / (1 + K_u C_u) + C_u. \qquad (Б4'')$$

Здесь $K_3 = \exp(-(2n-1) Dg - Du - Df)$.

Б2. Анализ экспериментальных данных

Экспериментальные данные образования мостиков на поли (И) х поли (Ц), полученные в работе [2], были проанализированы при помощи каждого из трех вариантов модели образования мостиков. Выбор молекул поли (И) х поли (Ц) обусловлен тем, что в этом случае нет интеркаляции молекул ДАУ между парами оснований НК, что существенно упрощает модель адсорбции. Решение уравнений (Б1)–(Б4), (Б1')–(Б4'), (Б1'')–(Б4'') осуществлялось при помощи численных методов: была написана программа на языке Фортран, которая рассчитывала теоретические значения степени заполнения полимера мостиками в заданном интервале значений суммарной концентрации ионов меди в растворе. Определялась сумма отклонений экспериментальных заполнений НК мостиками от соответствующих им теоретических значений. Расчеты проводились для трех наборов значений суммарной концентрации C_{Cu}, соответствующих семейству, состоящему из трех экспериментальных кривых. В качестве нормировоч-

ной кривой для сигнала КД выбиралась экспериментальная кривая, полученная для значения концентрации ДАУ в растворе, при котором сигнал КД соответствовал своему максимальному значению. Паре значений энергии (Δf, Δg) для каждого n соответствовало свое семейство теоретических кривых. Таким образом, для разных пар значений (Δf, Δg) определялась величина

$$D(Df, Dg) = SS(R_{\text{exp}} - R_{\text{theor}})^2, \qquad \text{(Б5)}$$

где R_{exp} — экспериментальные значения заполнения матрицы мостиками, R_{theor} — соответствующие теоретические значения. Суммирование здесь проходит по трем наборам экспериментальных значений суммарной концентрации ионов меди в растворе (что соответствует оси абсцисс рис. Б4), для семейства кривых. Минимальное значение среднеквадратичного отклонения $D(\Delta f, \Delta g)$ являлось критерием выбора оптимальных значений (Δf, Δg) для каждого варианта модели связывания (при заданном значении длины мостика n). Так как нарастание сигнала для экспериментальных кривых начинается во всех случаях при $C_{Cu} \sim 5\ 10^{-6}$ М, интервал концентрации ионов меди, для которого мы проводили расчеты, начинался именно с этого значения. Максимальное значение концентрации ионов меди в растворе выбиралось равным $9.0\ 10^{-6}$ М (оно примерно соответствует максимальному значению заполнения для каждой из трех кривых). Для каждого из вариантов модели (I, II, III) задавалось значение n и находились те значения (Δf, Δg), которые соответствовали минимуму суммы квадратичных отклонений.

Результаты расчетов приведены на рис. Б4 и в таблице Б1.

Из таблицы Б1 видно, что если в мостике больше двух молекул ДАУ, все три варианта модели адсорбции примерно с одинаковым успехом описывают экспериментальные кривые. Заметим, что наилучшее совпадение теории и эксперимента наблюдается для варианта модели, когда в мостик входит 4 иона меди и 5 молекул ДАУ.

Однако, если не считать значимыми различия в значениях $D(\Delta f, \Delta g)$ в пределах [0,1–0,3], то в этом случае математическая процедура анализа экспериментальных данных показывает, что все три варианта модели адсорбции достаточно хорошо описывают эксперимент. Этот факт свидетельствует в пользу того, что рассмотренные нами варианты модели принадлежат к некоторому классу, который в общих чертах соответствует реальности. Более того, из таблицы Б1 можно заметить, что величины энергий Δf и Δg, соответствующие разным вариантам модели, при n = 3–5 незначительно отличаются друг от друга. Можно также предположить, что в рассматриваемой нами системе реализуется не какой-то один вариант

модели адсорбции, а сразу два — или даже три варианта. При таком предположении ослабляются жесткие ограничения, которые накладывают условия фазировки на взаимное расположение ближайших соседних молекул НК [1].

Действительно, если возможны все варианты модели, то почти при любом взаимном расположении ближайших соседних молекул НК в псевдонематическом слое между ними могут образовываться мостики. В таком случае также снимаются ограничения на образование мостиков между соседствующими в пространстве молекулами НК, принадлежащими разным слоям.

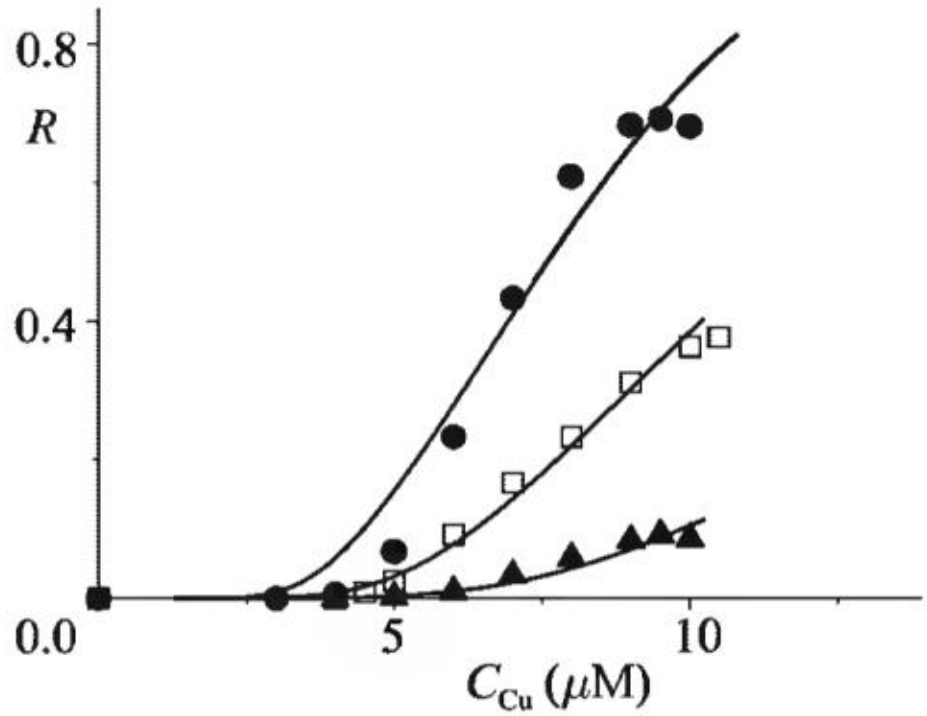

Рис. Б4. Экспериментальные и теоретические кривые, описывающие заполнение поли (И) х поли (Ц) мостиками. Экспериментальные данные показаны в относительных единицах (величина аномального сигнала КД при 270 нм нормирована на максимальное значение сигнала, полученное при концентрации дауномицина 60 μM). По оси X — концентрация ионов меди в растворе, по оси $У$ — степень заполнения реакционных центров мостиками. Эксперименты проводились при трех значениях концентрации дауномицина в растворе 9, 15.6 и 27.8 μM (данные показаны посредством ▲, □ и ●, соответственно). Теоретические кривые (непрерывные линии) рассчитаны при n = 4 и значениях энергий Δf = 10.85 RT и Δg = 13.28 RT для указанных выше значений концентрации дауномицина в растворе при помощи (Б1)–(Б4). Константа связывания ионов меди с поли (И) х поли (Ц) $K_u \sim 5 \times 10^6$ M^{-1}

Заметим, что рассмотренная в данной работе модель в целом основана на определенных «упрощениях» реальной ситуации. Она применима в случае, когда реакционные центры сближены и образуют регулярную структуру (подобную узлам кристаллической решетки). Сближение и фазировка молекул НК в дисперсии во многом обеспечивается диффузионным ориентированием молекул, входящих в систему. Как было указано выше, этому способствует осмотическое давление воднополимерного раствора.

Таблица Б1. Параметры, позволяющие наилучшим образом описать экспериментальные данные в рамках трех вариантов модели связывания. Здесь *n* обозначает число молекул ДАУ, входящих в наномостик. Приведены только те значения параметров, которые дают минимальные значения квадратичных отклонений $D(\Delta f, \Delta g)$ для каждого *n*. Введены в рассмотрение три варианта модели образования мостиков между молекулами нуклеиновых кислот, фиксированными в структуре частиц жидкокристаллических дисперсий. Энергии измеряются в единицах RT.

Вариант	*N*	Δf	Δg	Δu	$D(\Delta f, \Delta g)$
I Модель связывания n ДАУ, n-1 Cu	1				
	2	–11.25	–18.19	–15.42	0.75
	3	–11.25	–14.80	–15.42	0.26
	4	–11.07	–13.78	–15.42	0.12
	5	–10.85	–13.28	–15.42	0.08
	6	–11.33	–12.91	–15.42	0.09
	7	–10.85	–12.44	–15.42	0.09
	8	–11.16	–12.90	–15.42	0.13
II Модель связывания n ДАУ, n+1 Cu	1	–11.16	–1.82	–15.42	2.37
	2	–11.16	–6.99	–15.42	0.81
	3	–11.25	–8.64	–15.42	0.3
	4	–11.07	–9.46	–15.42	0.18
	5	–11.25	–9.96	–15.42	0.14
	6	–11.16	–10.29	–15.42	0.14
	7	–11.25	–10.54	–15.42	0.16
	8	–11.07	–10.73	–15.42	0.2
III Модель связывания n ДАУ, n Cu	1	–11.07	–3.72	–15.42	32.66
	2	–11.40	–10.60	–15.42	1.54
	3	–10.85	–11.10	–15.42	0.57
	4	–11.47	–11.11	–15.42	0.28
	5	–10.71	–11.40	–15.42	0.14
	6	–11.33	–11.40	–15.42	0.14
	7	–11.07	–11.78	–15.42	0.11
	8	–10.96	–11.83	–15.42	0.13

Однако при повышении концентрации молекул ДАУ и концентрации ионов меди в растворе молекулярная конструкция начинает стабилизироваться уже благодаря самому процессу образования мостиков. Этот процесс подобен процессу самоорганизации: действительно, образование первых мостиковых структур приводит к увеличению фазировки реакционных

центров, и к облегчению образования следующих мостиков. Формально такой эффект можно описать в рамках теории, учитывающей кооперативные взаимодействия между лигандами или комплексами лигандов, адсорбированными на молекулах НК. Учет кооперативных взаимодействий при образовании молекулярных конструкций требует привлечения большего числа параметров для описания данной системы. Здесь мы показали, что простая модель, оперирующая тремя параметрами, позволяет с достаточной степенью точности количественно описать семейство экспериментальных кривых. Заметим, что здесь мы ввели в рассмотрение и подробно изучили ситуацию, когда мостики могут начинаться и кончаться ионами меди. Не исключена возможность, что мостики конкурируют именно с ионами меди, а не с молекулами ДАУ за связывающие места на НК. В таком случае наша модель потребует определенной модификации. Более точное описание образования молекулярных конструкций требует привлечения новых экспериментальных данных.

Для того, чтобы проверить «предсказательные» свойства нашей модели, мы проанализировали образование мостиков в ЖКД поли(И) х поли(Ц) с помощью другой схемы эксперимента. В этом случае после приготовления ЖКД в раствор вначале добавляли определенное количество $CuCl_2$, а затем титровали посредством ДАУ. На рис. Б5 показаны данные, полученные при измерении амплитуды аномальной полосы в спектре КД при 270 нм, в области поглощения ДАУ при двух значениях концентрации ионов меди – 5μM и 10μM. Концентрация поли(И) х поли(Ц) в этом случае была та же, что и для первой схемы эксперимента. Для данной схемы эксперимента можно предположить, что кривая, соответствующая 10 μM ионов меди, приводит к максимально возможному заполнению полимера НК мостиками в области своего насыщения: действительно, из рис. Б4 можно сделать вывод, что при более высокой концентрации ионов меди наблюдается спад заполнения полимера мостиками. Приняв, что последняя экспериментальная точка кривой на рис. Б5 соответствует уровню заполнения матрицы мостиками $R = 0.8$, мы можем нормировать экспериментальные кривые и сравнить их с теоретическими. Действительно, такие кривые легко рассчитать с помощью уравнений (3–6) для тех же значений энергетических параметров, которые были определены нами на основании анализа данных, представленных на рис. Б4. Из рис. Б5 видно, что эти значения энергетических параметров позволяют очень хорошо предсказывать поведение кривых при новой схеме эксперимента.

В рамках простого класса моделей, учитывающих равновесное связывание лигандов с НК и не вводящей в рассмотрение ни кооперативных взаимодействий между мостиками, ни нелинейных членов в зависимости

свободной энергии от заполнения матрицы НК лигандами, нам удалось описать поведение двух семейств экспериментальных кривых, соответствующих образованию мостиков между молекулами НК в частицах ЖКД, не только качественно, но и количественно.

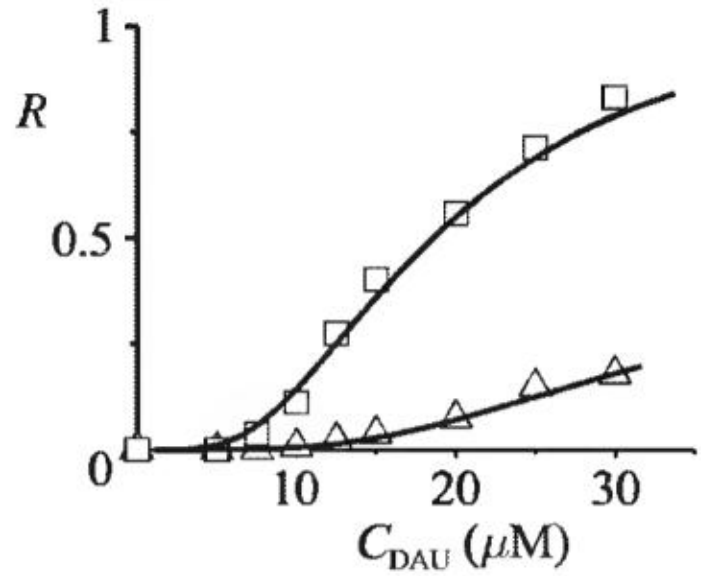

Рис. Б5. Экспериментальные и теоретические кривые, описывающие возрастание степени заполнения поли(И) х поли(Ц) мостиками при добавлении в раствор, содержащий жидкокристаллические дисперсии полимера, молекул дауномицина. Экспериментальные данные показаны в относительных единицах. По оси *X* — концентрация молекул дауномицина в растворе, по оси *У* — степень заполнения реакционных центров мостиками. Эксперименты проводились при двух значениях концентрации ионов меди в растворе: 5 и 10 μM (данные показаны посредством Δ и □, соответственно). Теоретические кривые (непрерывные линии) рассчитаны при помощи (Б1)–(Б4) при тех же значениях параметров, что и кривые, показанные на рис. Б4

Заметим, что конкурирующие с мостиками за реакционные центры НК молекулы ДАУ могут быть адсорбированы с небольшим сдвигом по отношению к «правильному» связыванию (т. е. такому, которое приводит к образованию мостиков). Весьма объемная молекула ДАУ может делать недоступными для связывания по типу внешнего присоединения соседние пары оснований НК. Однако точное выяснение молекулярной модели комплекса ДАУ–НК в составе ЖКД требует специальных экспериментов. Наша модель учитывает лишь самые общие черты как наномостиков, так и конкурирующих с ними комплексов, которые образует молекула ДАУ с полимером.

После того, как эти расчеты были проведены, нами совместно с Никифоровым В. Н. был предложен специальный тип эксперимента по определению числа ионов меди, связанных на ДНК в расчете на один мостик. Этот эксперимент был проведен на магнитометре СКВИД, было показано, что на один мостик приходится в среднем шесть ионов меди [8], получены также данные в пользу схемы связывания, в которой мостик начинается

и заканчивается ионами меди. Таким образом, данные расчетов из таблицы Б1 хорошо согласуются с новыми экспериментальными данными.

Более подробное описание ЖКД содержится в монографии «Жидкокристаллические дисперсии и наноконструкции ДНК» [9].

Литература

1. *Нечипуренко Ю. Д., Стрельцов С. А. и Евдокимов Ю. М.* Термодинамическая модель образования мостиков между нуклеиновыми кислотами в жидком кристалле // Биофизика. 2001. Т. 46. С. 428–435.
2. *Нечипуренко Ю. Д., Захаров М. А., Салянов В. И. и Евдокимов Ю. М.* «Мостиковые» структуры между молекулами нуклеиновых кислот, фиксированными в структуре жидкого кристалла // Биофизика. 2002. Т. 47. С. 600–606.
3. *Евдокимов Ю. М., Салянов В. И., Нечипуренко Ю. Д., Скуридин С. Г., Захаров М. А., Спенер Ф., Палумбо М.* Молекулярные конструкции (суперструктуры) на основе двухцепочечных нуклеиновых кислот // Мол. биология. 2003. Т. 37. С. 340–355.
4. *Нечипуренко Ю. Д., Рябоконь В. Ф., Семенов С. В., Евдокимов Ю. М.* Термодинамические модели образования «мостиков» между молекулами нуклеиновых кислот в жидких кристаллах // Биофизика. 2003. Т. 48. С. 802–811.
5. *Yevdokimov Y. M., Skuridin S. G., Nechipurenko Y. D., Zakharov M. A., Salyanov V. I., Kurnosov A. A., Kuznetsov V. D., Nikiforov V. N.* Nanoconstructions based on double–stranded nucleic acids // Int. J. Biol. Macromol. 2005 V. 36 P. 103–115.
6. *Yevdokimov Yu. M., Salyanov V. I., Spener F., Palumbo M.* // Internat. J. Biol. Macromol. 1996. V. 19. P. 247.
7. *Yevdokimov Yu.M., Salyanov V. I., Buligin L. V., Dembo A. T., Gedig E., Spener F., Palumbo M.* // J. Biomol. Struct. and Dynam. 1997. V. 15. P. 97–105.
8. *Никифоров В. В., Кузнецов В. Д., Нечипуренко Ю. Д., Салянов В. И., Евдокимов Ю. М.* Магнитные свойства меди в составе наномостиков, образованных между фиксированными в пространстве молекулами // Письма в ЖЭТФ, 2005, Т. 81, С. 327–329.
9. *Евдокимов Юрий и др.* Жидкокристаллические дисперсии и наноконструкции ДНК. — М., 2008. — 286 с.

Приложение В
СВЯЗЫВАНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ НА МИКРОЧИПАХ

Данное приложение основано на цикле работ, которые были выполнены в соавторстве с М. В. Головкиным, М. В. Ходыковым, Я. В. Стирмановым и О. В. Матвеевой [1–3].

Энергетическая Изотерма Гибридизации (ЭИГ)

Расфсмотрим следующую термодинамическую систему: в растворе находятся олигонуклеотиды-мишени, которые могут образовывать комплексы с молекулами олигонуклеотидов-зондов, пришитых к поверхности биологического микрочипа (Рис. В1).

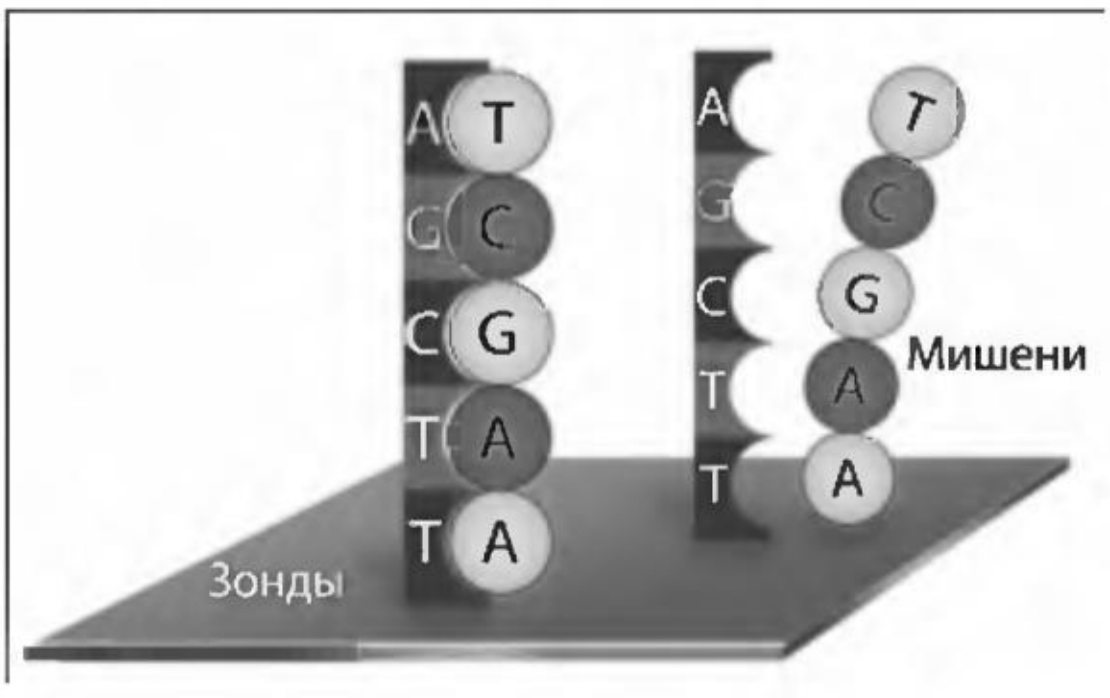

Рис. В1. Схематическое изображение связанных и свободных мишеней в отдельной ячейке микрочипа

Сам микрочип состоит из ряда ячеек, которые находятся в неразделенном объеме, так что свободные молекулы мишени могут перемещаться из ячейки в ячейку. В каждую ячейку микрочипа иммобилизовано большое число олигонуклеотидов-зондов с определённой последовательностью нуклеотидов. Одни зонды содержат последовательности нуклеотидов, полностью комплементарные мишени, другие зонды — частично некомплементарные последовательности. Таким образом, комплексы «мишень-

зонд» в разных ячейках имеют разные энергии гибридизации и, соответственно, разные равновесные константы связывания. В этой ситуации при наступлении в системе равновесия при постоянной температуре и постоянном давлении зонды, находящиеся в разных ячейках, будут с разной вероятностью связаны с молекулами мишени.

Пронумеруем ячейки $i = 1,\ldots N$, причем $i = 1$ будет соответствовать ячейке, в которой находятся зонды, последовательность нуклеотидов которых полностью комплементарна последовательности нуклеотидов мишени.

Если молекула мишени несёт флуоресцентную метку, то интенсивность сигнала флуоресценции в определённой ячейке микрочипа будет характеризовать вероятность связывания мишени с зондом, находящимся в этой ячейке. Можно измерить интенсивности сигнала флуоресценции в разных ячейках и представить зависимость такой интенсивности от энергии гибридизации. В работе [2] такая зависимость была названа энергетической изотермой гибридизации (ЭИГ), и было показано, что при низких концентрациях мишеней ЭИГ с высокой степенью точности может быть аппроксимирована при помощи уравнения Ленгмюра. Для нашего случая такая зависимость будет иметь следующий вид:

$$I_i = I_{\max} \frac{C_{\text{free}} \exp(-\Delta G_i / RT)}{1 + C_{\text{free}} \exp(-\Delta G_i / RT)}, \tag{B1}$$

где I_i — интенсивность флуоресценции, ΔG_i — энергия гибридизации в i-й ячейке, C_{free} — концентрация свободных мишеней в растворе, T — температура, R — газовая постоянная, $I_{\max}$ соответствует максимальному значению интенсивности флуоресценции (случай, когда все олигонуклеотид-мишени связаны с молекулами зондов или все зонды заняты мишенями, см. [2]). Энергия гибридизации ΔG_i по известной последовательности нуклеотидов мишени может быть рассчитана для каждого зонда при помощи известной динуклеотидной параметризации [4] с точностью до константы.

Отметим, что ЭИГ, представленная в виде (B1) (в том виде, как она рассматривалась в работах [1, 2]), основывается на изотерме Ленгмюра. Однако ЭИГ принципиально отличается от изотермы Ленгмюра, так как последняя демонстрирует зависимость сигнала флуоресценции от физически измеряемого параметра — концентрации мишени, в то время как для ЭИГ концентрация мишеней является постоянной, и рассматривается зависимость интенсивности сигнала от рассчитываемой энергии гибридизации.

В настоящее время ЭИГ часто используется для анализа данных по связыванию мишени с разными зондами на биологических микрочипах [5–15].

Относительная энергетическая изотерма гибридизации

В работе Хойбергса, Карлона и соавторов [9] рассмотрена экспериментальная система, которая была описана выше: в растворе находится молекулы мишени одного типа, а зонды (число различных зондов $N = 1006$) подобраны таким образом, что могут связываются с мишенями как комплементарно, так и частично некомплементарно (имея одну или две замены в последовательности нуклеотидов). Для описания процесса такого связывания авторы используют специальное представление данных: зависимость интенсивности флуоресценции от разницы энергий гибридизации частично некомплементарного ΔG_i и комплементарного ΔG_1 связывания. В работе [2] было показано, что зависимость имеет следующий вид:

$$I_i = I_{\max} \frac{C_{\text{free}} \exp(-(\Delta G_1 + \Delta\Delta G_i) / RT)}{1 + C_{\text{free}} \exp(-(\Delta G_1 + \Delta\Delta G_i) / RT)}, \tag{B2}$$

здесь

$$\Delta\Delta G_i = \Delta G_i - \Delta G_1. \tag{B3}$$

Заметим, что значения $\Delta\Delta G_i$ положительны, по смыслу своему — это энергетический «штраф» за мутацию в молекуле зонда. Мы будем называть зависимость I_i от $\Delta\Delta G_i$ относительной энергетической изотермой гибридизации (ОЭИГ). Вдали от насыщения, когда связана лишь малая часть олигонуклеотидных зондов, может быть использовано следующее приближение:

$$I_i \approx I_{\max} C_{\text{free}} \exp(-(\Delta G_1 + \Delta\Delta G_i) / RT). \tag{B4}$$

В этой области логарифм интенсивности флуоресценции линейно зависит от значений энергии (что имеет экспериментальное подтверждение [9]). Однако вид ОЭИГ в целом содержит много информации о системе, для получения которой необходимо развить как физическую модель, описывающую адсорбцию на микрочипах, так и специальные методы анализа ОЭИГ. Развитие методов анализа ЭИГ и ОЭИГ важно для создания алгоритмов по определению концентрации мишеней (в частности, транскриптов в клетке) на основе данных экспериментов. Кроме того, изучение таких изотерм важно для оптимизации дизайна биологических чипов, т. к. помогает решить задачи расширения линейности диапазона зависимости гибридизационного сигнала от концентрации мишени и дизайна оптимизированно выбранных олигонуклеотидов (для определения нуклеотидных замен в молекулах мишенях).

Введём в рассмотрение термодинамическую модель, описывающую гибридизацию олигонуклеотидов на биологических микрочипах в модель-

ном эксперименте, проведённом в работе Хойбергса, Карлона и соавторов [9] (подробное описание системы содержится в Дополнении). Мишень представляет олигонуклеотид с определённой последовательностью, зонды — набор олигонуклеотидов, полностью комплементарных или частично некомплементарных мишени (возможны одна-две замены). Мы рассматриваем систему, где на одном микрочипе расположено 1006 ячеек с зондами ($N = 1006$).

Модель основывается на предположении, что в рассматриваемой системе при постоянном давлении и постоянной температуре установилось термодинамическое равновесие, и связывание мишени на одном зонде никак не влияет на связывание на соседних зондах. В этом случае заполнение зонда в i –й ячейке определяется уравнением Ленгмюра:

$$\theta_i = \frac{n_i}{N_p} = \frac{K_i C_{\text{free}}}{1 + K_i C_{\text{free}}}, \tag{B5}$$

где θ_i — заполнение i-го зонда, N_p — полное число зондов в одной ячейке микрочипа, n_i — число дуплексов, образованных зондами i-го типа соответственно. K_i — константа равновесия для комплексов, образованных зондами i-го типа.

Предположим, что интенсивность флуоресценции ячейки i-го типа линейно зависит от заполнения ячейки:

$$I_i = A\theta_i. \tag{B6}$$

Константы равновесия K_i соответствуют константам гибридизации мишеней на микрочипе:

$$K_i = \exp(-\Delta G_i / RT) = \exp(-(\Delta G_1 - \Delta\Delta G_i) / RT). \tag{B7}$$

Концентрацию свободных мишеней можно получить из следующей формулы:

$$C_{\text{free}} = C - (P/1006)\sum_{i=1}^{1006}\theta_i, \tag{B8}$$

где P — общая концентрация зондов в микрочипе (которую мы определяем как число зондов в единице объема микрочипа), C — общая концентрация мишеней.

Используя уравнения (B7)–(B8), из (B5) получаем заполнение зонда i-го типа:

$$\theta_i = \frac{C_{\text{free}}\exp(-\Delta G_i / RT)}{1 + C_{\text{free}}\exp(-\Delta G_i / RT)} = \left(\frac{\exp(-\Delta G_i / RT)}{C - (P/1006)\sum_{i=1}^{1006}\theta_i} + 1\right)^{-1}. \tag{B9}$$

Соотношения (B6) и (B9) представляют собой систему из 1006 уравнений, позволяющую рассчитывать ОЭИГ и определять параметры модели, которые дают наилучшее соответствие теоретических и экспериментальных значений I_i. Для поиска параметров модели, при которых аппроксимация экспериментальных данных решением системы уравнений наилучшая, были рассчитаны значения коэффициента детерминации R^2 (см. дополнение). В данном расчёте варьировалось два параметра: полная концентрация зондов P и энергия гибридизации полностью комплементарных зондов ΔG_1.

На рис. B2 представлено сравнение экспериментальных данных (точки) с кривыми, полученными при помощи нашей модели. Параметры, использованные в расчетах соответствуют эксперименту: температура $T = 60°$, полная концентрация зондов $P = 6000$ пМ, энергия гибридизации полностью комплементарных зондов $\Delta G_1 = -17$ ккал/моль·К, концентрации мишеней в двух экспериментах $C = 50$ пМ (кривая 1), 500 пМ (кривая 2). Видно хорошее количественное совпадение результатов расчёта с данными эксперимента.

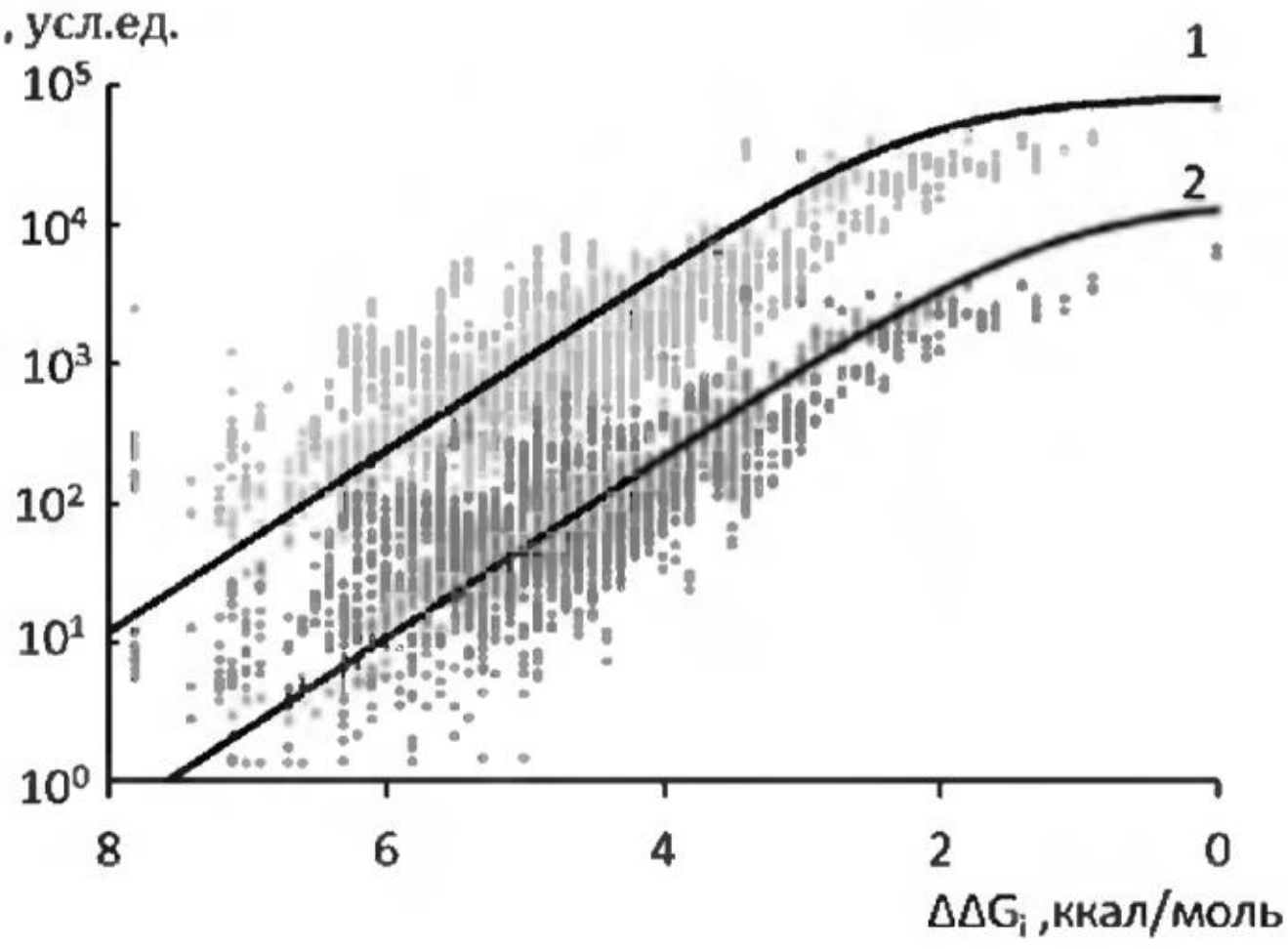

Рис. B2. Сравнение относительных энергетических изотерм гибридизации (линии) с экспериментальными данными (точки). I_i — интенсивности флуоресценции в i-ой ячейке микрочипа, $\Delta\Delta G_i$ — разность энергий дуплексов, образованных с мишенью i-м зондом и совершенным дуплексом. Изотермы рассчитаны при помощи уравнений (B6), (B9) при следующих параметрах: температура $T = 60°$, полная концентрация зондов $P = 6000$ пМ, энергия гибридизации полностью комплементарных зондов $G_1 = -17$ ккал/моль·К, концентрации мишеней $C = 50$ пМ (кривая 1), 500 пМ (кривая 2)

Энергетическая изотерма гибридизации (ЭИГ) — зависимость интенсивности сигнала флуоресценции ячеек микрочипа от энергии гибридизации олигонуклеотидного дуплекса мишень-зонд является удобным инструментом для количественного анализа гибридизации. В настоящее время ЭИГ интенсивно используется для анализа данных по связыванию мишени с разными зондами на биологических микрочипах [5–15].

Выше развита модель, описывающая процесс гибридизации ДНК на биологических микрочипах и учитывающая, что образование дуплексов мишень-зонд происходит параллельно на многих зондах разных типов. Предложенная модель позволяет объяснить вид ЭИГ при низких (в сравнении с концентрацией зондов) концентрациях мишеней. Заметим, что при концентрациях мишеней сравнимых с концентрациями зондов, возникают трудности при описании экспериментальных данных при помощи предложенной модели — по-видимому, при высоких концентрациях мишеней возникают новые явления, обусловленные кооперативностью связывания мишеней с зондами в приповерхностном слое микрочипа.

Ряд авторов [12,13] предполагают, что особенности ЭИГ могут быть объяснены в рамках кинетической модели. Здесь мы показали, что можно описать экспериментальные данные в предположении равновесного связывания.

Хотелось бы поблагодарить Джефа Хойбергса, любезно предоставившего экспериментальные данные, опубликованные в работе [9].

Дополнение

Описание эксперимента

Хойбергс, Карлон и соавторы [9] провели эксперимент по гибридизации олигонуклеотидных зондов с молекулами мишени на подложке биологического микрочипа. В качестве мишени использовалась последовательность, состоящая из 30 нуклеотидов:

5' GTTTTCGAAGATTGGGTGGCACTGTTGTAA 3'.

На 3'-конце мишени имеется флуоресцентная метка Cy3 на основе цианина. Интенсивность такой метки свидетельствует о числе связанных молекул мишеней олигонуклеотидными зондами. Зонды представлены следующими последовательностями:

1) Последовательность, полностью комплементарная мишени;
2) Последовательности, содержащие одну нуклеотидную замену в пределах средней части последовательности (с 6го по 25-й нуклеотиды). Всего возможны 60 вариантов таких последовательностей;

3) Последовательности, содержащие две нуклеотидные замены в пределах средней части последовательности (с 6го по 25-й нуклеотиды). Нуклеотидные замены отстоят друг от друга как минимум на 5 нуклеотидов. Всего возможно 945 вариантов таких последовательностей.

В пределах микрочипа представлены 1006 типов зондов, образующие с мишенями дуплексы с различными энергиями гибридизации.

Эксперимент проводился на микрочипах производства Agilient. Измерение интенсивности флуоресценции происходит после отмывания — процесса, при котором из раствора удаляются свободные и слабо закрепленные мишени. Приведём далее описание устройства микрочипа Agilient. Слайд Agilent 8X15K содержит 8 микрочипов. Размер одного микрочипа: 10,35 мм на 7,00 мм, площадь — 72,47 мм^2. Микрочип содержит 15744 ячейки, расположенные в узлах прямоугольной сетки. Сетка состоит из 96 горизонтальных рядов, расположенных друг от друга на расстоянии 0,073323 мм и 82 вертикальных ряда на расстоянии 0,127 мм. Микрочип состоит из двух смещенных сеток, так что все ряды смещены друг относительно друга.

Каждая ячейка микрочипа содержит только зонды одного типа. Каждый из 1006 типов зондов представлен в 15 идентичных ячейках в пределах одного микрочипа. Линейный размер одной ячейки микрочипа 0,065 мм, т.о. площадь ячейки составляет приблизительно 10^{-3} мм^2.

Оценка числа мишеней и зондов в экспериментах по гибридизации

Концентрация мишеней в двух экспериментах, рассмотренных нами, принимает значения 50 пМ и 500 пМ. Мишени находятся в растворе объемом V = 40 мкл. Число мишеней составляет $2\cdot10^{-15}$ и $2\cdot10^{-14}$ моль или $1.2\cdot10^{9}$ и $1.2\cdot10^{10}$ олигонуклеотидов соответственно.

Оценим число зондов в пределах одного микрочипа. Линейный размер одной ячейки микрочипа l = 0,065 мм. Среднее расстояние между двумя зондами d = 10 нм [12]. Таким образом количество зондов в пределах ячейки N_{pcell} можно оценить:

$$N_{pcell} = \left(\frac{l}{d}\right)^2 = \left(\frac{6.5\cdot10^{-5}}{10^{-8}}\right)^2 = 4.2\cdot10^{7}.$$

С учетом того, что каждый тип зондов представлен 15 одинаковыми ячейками, имеем, что каждый тип зондов имеет порядка $6{,}3\cdot10^{8}$ копий. Всего в пределах микрочипа около $N_p = 6{,}4\cdot10^{11}$ зондов, что превышает максимальное рассматриваемое число мишеней. Введем понятие объемной концентрации зондов:

$$P = \frac{N_p}{VN_A} = \frac{6.4\cdot10^{11}}{40\cdot10^{-6}\cdot6\cdot10^{23}} = 2.6\cdot10^{-8}\ \text{М}.$$

Заметим, что эти оценки могут отличаться от реальных значений величины концентрации зондов в растворе на порядок. Так, в наших расчетах значение конце унтрации зондов, которое дает наилучшее соответствие с экспериментом, оказалось примерно в пять раз ниже: P= 6000 пМ.

Критерий наилучшей аппроксимации экспериментальных данных

Для поиска параметров модели, при которых аппроксимация экспериментальных данных решением системы уравнений модели наилучшая, мы вычисляли значения коэффициента детерминации R^2 при допустимых значениях параметров:

$$R^2 = 1 - \frac{ESS}{TSS} R^2 = 1 - \frac{ESS}{TSS},$$

где $ESS = \sum_{t=1}^{n} (y_t - \hat{y}_t)^2$ — сумма квадратов остатков регрессии, $y_t, \hat{y}_t$ — экспериментальные и модельные значения интенсивности флуоресценции, $TSS = \sum_{t=1}^{n} (y_t - \overline{y}_t)^2$ — общая сумма квадратов.

Среди параметров модели можно выделить: концентрацию зондов (P), коэффициент связи между интенсивностью флуоресценции и долей заполненных зондов (A), энергию гибридизации полностью комплементарного комплекса мишень-зонд (ΔG_1).

Нам удалось установить, что высокие значения коэффициента R^2 достигаются в широком диапазоне значений параметров. Однако, необходимо отметить, что во-первых, только значения энергии гибридизации $\Delta G_1 > 17$ обеспечивают высокие значения коэффициента детерминации ($R^2 > 0.5$), во-вторых, только значения концентрацию зондов $P > 10^{-9}$ М обеспечивают высокие значения коэффициента детерминации ($R^2 > 0.5$).

Литература

1. *Головкин М. В., Матвеева О. В., Нечипуренко Ю. Д.* // Биофизика, 2009, Т. 54, С. 820–823.
2. *Ходыков М. В., Анашкина А. А., Головкин М. В., Матвеева О. В., Нечипуренко Ю. Д.* // Биофизика, 2011., Т. 56, С. 1053–1061.
3. *Стирманов Я. В., Ходыков М. В., Матвеева О. В., Нечипуренко Ю. Д.* Анализ связывания олигонуклеотидов на микрочипах: энергетические изотермы гибридизации Биофизика, 2013, Т. 58, С. 981–986.
4. *SantaLucia John, Jr., Allawi Hatim T., and Seneviratne P. Ananda* // Biochemistry. 1996. V. 35, P. 3555–3562.

5. *Held G.* et al. // Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2003. V. 100, P. 7575–7580.
6. *E. Carlon, T.Heim* // Physica A: Statistical Mechanics and its Applications 2006. V. 362(2), P. 433–449.
7. *Heim T., Tranchevent L.-C., Carlon E., Barkema G. T.,* J. Phys. Chem. B, 110(45), 22786–22795 (2006).
8. *Kroll K. M., Barkema G. T., Carlon E.* // Physical review. 2008.V. 77(6), P. 1–8.
9. *Hooyberghs J., Carlon E., Hummelen P. Van* // Nucl. Acids Res., 2009. V. 37 (7), P. 53.
10. *Mulders G. C., Barkema G. T., Carlon E.* // BMC Bioinformatics. 2009. V. 10, P. 64.
11. *Ohrmalm C., Jobs M., Eriksson R., Golbob S.* // Nucleic Acids Research. 2010. V. 38(21), P. 195.
12. *Hooyberghs J., Baiesi M., Ferrantini A., Carlon E.* // Phys. Rev., 2010. V. 81, 012901.
13. *Walter J. C., Kroll K. M., Hooyberghs J., Carlon E.* // J. Phys. Chem. B, 2011. V. 115 (20), P. 6732–6739.
14. *Hadiwikarta W. W., Walter J.-C., Hooyberghs J., Carlon E.* // Nucleic Acids Research. 2012.Vol. 40, e138.
15. *Harrison A., Binder H., Buhot A., Burden C. J., Carlon E., Gibas C., Gamble L. J., Halperin A., Hooyberghs J., Kreil D. P., Levicky R., Noble P. A., Ott A., Pettitt B. M., Tautz D., Pozhitkov A. E.* // Nucleic Acids Research. 2013. V. 41. P. 1–18.