

А. Т. Карапетян, П. О. Вардеванян,  
Г. А. Терзикян, М. Д. Франк-Каменецкий

## ВЛИЯНИЕ ДВУХ СПОСОБОВ СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ НА ПАРАМЕТРЫ ПЕРЕХОДА СПИРАЛЬ — КЛУБОК ДНК \*

*Рассмотрена задача о переходе спираль — клубок в комплексах ДНК со скрепками для случая двух типов связывания, отличающихся друг от друга константами связывания лиганда с нативной ДНК. Получены формулы, связывающие экспериментально определяемые параметры кривой плавления комплексов ДНК со скрепками с параметрами теории. Показано, что формула для определения энтальпии плавления ДНК ( $\Delta H$ ) универсальна и справедлива при самых общих предположениях.*

Исследования последних лет показали, что антибиотики и красители могут избирательно связываться лишь с определенными участками нативной ДНК (см. обзоры [1—3] и цитируемую там литературу). При этом взаимодействие с клубкообразными участками может оставаться неспецифическим, и число мест связывания на расплетенной ДНК может быть гораздо большим, чем на спиральной. Аналогичными свойствами обладают также и ионы металлов, причем один и тот же металл в зависимости от валентности, концентрации и ионной силы может как стабилизировать, так и дестабилизировать спиральную структуру ДНК [4, 5].

Теоретическому изучению плавления комплексов ДНК с лигандами посвящен ряд публикаций [5—8]. В работе [9] проведен анализ объединяющей модели, созданной на основе рассмотренных в [5—8]. В большинстве случаев удается получить аналитическое выражение для зависимостей температуры и ширины интервала плавления от относительной концентрации лигандов, адсорбированных на спиральных и расплавленных участках ДНК одним способом. Однако, как показано в [10], а также независимыми исследованиями в работах [1, 2, 11, 12], актиномицин Д (АМД) и бромистый этидий (БЭ) обладают по крайней мере двумя способами связывания с ДНК, отличающимися друг от друга термодинамическими параметрами взаимодействия. Поэтому возникает необходимость рассмотрения такой теоретической модели плавления комплексов ДНК с лигандами, где учитываются указанные особенности комплексообразования.

Выбранная в настоящей работе модель заключается в следующем (рисунок). Пусть в растворе имеются молекулы полимера в некотором состоянии с фиксированными значениями  $N_1$  (число звеньев в клубкообразном состоянии),  $N_2$  (число звеньев в спиральном состоянии) и  $n$  (число спиральных и клубкообразных областей), причем общее число звеньев  $N$  остается постоянным:

$$N_1 + N_2 = N. \quad (1)$$

Предположим, что  $k_1$  из общего числа лигандов связаны с клубкообразной частью полимера,  $k'_2$  и  $k''_2$  — со спиральной частью (два способа связывания) и  $k_0$  не связаны с полимером, причем общее количество скрепок  $k$  в растворе удовлетворяет условию:

$$k_0 + k_1 + k'_2 + k''_2 = k. \quad (2)$$

Обозначим число пар оснований, приходящихся на одно место связывания, на денатурированной и нативных частях молекулы ДНК соответственно  $r_1$ ,  $r'_2$  и  $r''_2$ . Тогда число мест связывания соответственно будет равно  $N_1/r_1$ ,  $N_2/r'_2$  и  $N_2/r''_2$ . Для «неравновесной свободной энергии» имеем

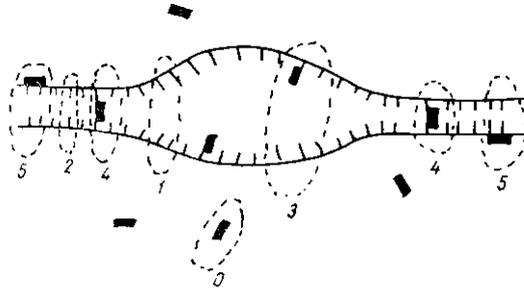
$$F = \varepsilon_1 N_1 + \varepsilon_2 N_2 + \varepsilon_0 n + \psi_0 k_0 + \psi_1 k_1 + \psi'_2 k'_2 + \psi''_2 k''_2 -$$

\* Представлена членом редколлегии В. И. Даниловым.

$$-T \left[ \ln W(N, n) + \ln W\left(\frac{N_1}{r_1}, k_1\right) + \ln W\left(\frac{N_2}{r_2}, k_2\right) + \right. \\ \left. + \ln W\left(\frac{N_2}{r_2'}, k_2'\right) + \ln W(N_0, k_0) \right], \quad (3)^*$$

где  $\varepsilon_1$  и  $\varepsilon_2$  — энергии клубкообразных и спиральных участков;  $\psi_1$ ,  $\psi_2$  и  $\psi_2'$  — свободные энергии связи скрепки с клубкообразными и спиральными участками молекулы;  $W(M, m)$  — число способов, которыми

Схематическое изображение модели ДНК со скрепками при температуре  $T: 0$  — свободная скрепка; 1 — разорванная пара; 2 — связанная пара; 3 — разорванные пары со скрепкой; 4 — скрепка, взаимодействующая со связанными парами первым способом; 5 — скрепка, взаимодействующая со связанными парами вторым способом



A model of DNA with ligands at the temperature  $T: 0$  — an unbounded ligand; 1 — a melted pair; 2 — an unmelted pair; 3 — the ligand bound to the melted pairs; 4 — the ligand bound to the unmelted pairs by the first method; 5 — the ligand bound to the unmelted pairs by the second method

можно расположить  $M$  одинаковых элементов по  $m$  группам, причем каждая группа должна содержать хотя бы один элемент.

Как видно из формулы (3), каждой границе между спиральными и клубкообразными звеньями приписывается энергия  $\varepsilon_0/2$ . Тем самым учитывается взаимодействие между соседними звеньями.

Величину  $W(M, m)$  можно вычислить, решая комбинаторную задачу [13]:

$$W(M, m) = \frac{(M-1)!}{(m-1)!(M-m)!} \quad (4)$$

Так как для предлагаемой модели имеется в виду предельный переход ( $N \rightarrow \infty$ ), вместо (3) будем иметь:

$$F = \varepsilon_1 N_1 + \varepsilon_2 N_2 + \varepsilon_0 n + \psi_0 k_0 + \psi_1 k_1 + \psi_2' k_2' + \psi_2'' k_2'' - \\ - T \ln \frac{N!}{n!(N-n)!} \cdot \frac{N_1/r_1!}{(k_1!(N_1/r_1 - k_1)!)} \cdot \frac{N_2/r_2!}{k_2'!(N_2/r_2' - k_2')!} \times \\ \times \frac{N_2/r_2''!}{k_2''!(N_2/r_2'' - k_2'')!} \cdot \frac{N_0!}{k_0!(N_0 - k_0)!} \quad (5)$$

Задача состоит в нахождении минимума функции  $F$  при ограничениях (1) и (2) и постоянстве полной энергии системы:

$$E = \varepsilon_1 N_1 + \varepsilon_2 N_2 + \varepsilon_0 N_0.$$

Равновесные значения величин  $N_1$ ,  $N_2$  и  $n$  определяются из условий:

$$\left. \frac{\partial F}{\partial n} \right|_{N_1, N_2} = 0; \quad (6)$$

$$\left. \frac{\partial F}{\partial N_1} \right|_n = 0. \quad (7)$$

Применив формулу Стирлинга для факториалов, из (6) получим

$$(N_1/n - 1)(N_2/n - 1) = 1/\sigma,$$

где  $\sigma = \exp\{-\varepsilon_0 T\}$ , а из (7) следует

$$\frac{1 - n/N_2}{1 - n/N_1} = S \frac{(1 - c_1 r_1)^{1/r_1}}{(1 - c'_2 r'_2)^{1/r'_2} (1 - c''_2 r''_2)^{1/r''_2}}, \quad (8)$$

где  $S = \exp\{(\varepsilon_1 - \varepsilon_2)/T\}$ ,  $c_1 = k_1/N_1$ ,  $c'_2 = k'_2/N_2$ ,  $c''_2 = k''_2/N_2$ .

Таким образом, в рассматриваемом случае двух способов связывания лиганда с нативной ДНК вместо (2) из [7] получим:

$$S^* = S \frac{(1 - c_1 r_1)^{1/r_1}}{(1 - c'_2 r'_2)^{1/r'_2} (1 - c''_2 r''_2)^{1/r''_2}}. \quad (9)$$

Концентрация скрепок на клубкообразной и спиральной частях гомополимера  $c_1$ ,  $c'_2$  и  $c''_2$  находится из условий:

$$\partial F / \partial k_1 = \psi_1 - \psi_0 - T \ln(1/c_1 r_1 - 1) c_0 = 0;$$

$$\partial F / \partial k'_2 = \psi'_2 - \psi_0 - T \ln(1/c'_2 r'_2 - 1) c_0 = 0;$$

$$\partial F / \partial k''_2 = \psi''_2 - \psi_0 - T \ln(1/c''_2 r''_2 - 1) c_0 = 0,$$

которые вместе с условием (2) приводят к уравнениям

$$\frac{c_1 r_1}{c_0(1 - c_1 r_1)} = K_1, \quad \frac{c'_2 r'_2}{c_0(1 - c'_2 r'_2)} = K'_2, \quad \frac{c''_2 r''_2}{c_0(1 - c''_2 r''_2)} = K''_2, \quad (10)$$

где  $c_0 = k_0/N_0 \ll 1$ , а  $K_1$ ,  $K'_2$  и  $K''_2$  — константы связывания скрепки с денатурированной и нативной ДНК соответственно.

Пусть  $D$  — полная концентрация скрепок в растворе;  $P$  — концентрация фосфатных групп, входящих в состав полинуклеотида; тогда из (10) и условия

$$D = c_0 + (P/2)(1 - \vartheta)c_1 + (P/2)\vartheta c'_2 + (P/2)\vartheta c''_2$$

получим уравнения:

$$\frac{c_1 r_1}{1 - c_1 r_1} = \frac{PK_1}{2} \left[ \frac{2D}{P} - (1 - \vartheta)c_1 - \vartheta c'_2 - \vartheta c''_2 \right]; \quad (11)$$

$$\frac{c'_2 r'_2}{1 - c'_2 r'_2} = \frac{PK'_2}{2} \left[ \frac{2D}{P} - (1 - \vartheta)c_1 - \vartheta c'_2 - \vartheta c''_2 \right]; \quad (12)$$

$$\frac{c''_2 r''_2}{1 - c''_2 r''_2} = \frac{PK''_2}{2} \left[ \frac{2D}{P} - (1 - \vartheta)c_1 - \vartheta c'_2 - \vartheta c''_2 \right]. \quad (13)$$

Найдем выражения для изменений температуры  $\delta T_m$  и ширины интервала плавления  $\delta \Delta T$  под действием скрепок.

Пусть  $\vartheta = f(S)$  — зависимость степени спиральности от  $S$  для чистого полимера. Предположим, для определенности, что кривая плавления симметрична, т. е. при  $S=1$   $\vartheta=0,5$ . Согласно (9) для полимера со скрепками будем иметь  $\vartheta = f(S^*)$ . Значения  $S_m$  и  $T_m$  определяются из условия  $S^*=1$ , т. е.

$$S_m = \frac{(1 - c'_2 r'_2)^{1/r'_2} (1 - c''_2 r''_2)^{1/r''_2}}{(1 - c_1 r_1)^{1/r_1}}, \quad (14)$$

\* Здесь и ниже полагается, как обычно, что энергия и температура измеряются в одних и тех же единицах.

откуда

$$\delta \frac{1}{T_m} = \frac{1}{\Delta H} \ln \left[ \frac{(1 - c_1 r_1)^{1/r_1}}{(1 - c'_2 r'_2)^{1/r'_2} (1 - c''_2 r''_2)^{1/r''_2}} \right] \Big|_{\vartheta=1,2}; \quad (15)$$

$$\delta \frac{\Delta T}{T_m^2} = - \frac{1}{\Delta H} \left[ \frac{\partial}{\partial \vartheta} \ln \frac{(1 - c_1 r_1)^{1/r_1}}{(1 - c'_2 r'_2)^{1/r'_2} (1 - c''_2 r''_2)^{1/r''_2}} \right] \Big|_{\vartheta=1,2}; \quad (16)$$

$$\delta \frac{1}{T_m} = \frac{1}{T_0} - \frac{1}{T_m}; \quad \delta \frac{\Delta T}{T_m^2} = \frac{\Delta T}{T_m^2} - \frac{\Delta_0 T}{T_0^2}.$$

$T_0$  — температура плавления чистого полимера;  $\Delta_0 T$  — ширина плавления чистого полимера;  $T_m$  и  $\Delta T$  — соответствующие параметры для комплексов.

Рассмотрим два наиболее интересных случая.

1.  $K_1 P \gg 1$  или  $K'_2 P \gg 1$ ,  $K''_2 P \gg 1$ , т. е. суммарное количество скрепок на полимере не меняется в ходе плавления. Из уравнений (11) — (13) имеем:

$$\frac{c'_2 r'_2}{1 - c'_2 r'_2} \frac{1 - c_1 r_1}{c_1 r_1} = p'; \quad (17)$$

$$\frac{c''_2 r''_2}{1 - c''_2 r''_2} \frac{1 - c_1 r_1}{c_1 r_1} = p'', \quad (18)$$

где  $p' = K'_2/K_1$ ;  $p'' = K''_2/K_1$  и  $(1 - \vartheta)c_1 + \vartheta c'_2 + \vartheta c''_2 = 2D/P$ .

Введем новые переменные

$$x = (1/c_1 r_1) - 1; \quad y = (1/c'_2 r'_2) - 1; \quad z = (1/c''_2 r''_2) - 1. \quad (19)$$

Относительно этих переменных получим уравнения:

$$x = p' y, \quad x = p'' z; \quad (20)$$

$$(1 - \vartheta)(y + 1)(z + 1) r'_2 r''_2 + \vartheta(x + 1)(z + 1) r_1 r''_2 + \vartheta(x + 1)(y + 1) r_1 r'_2 = \\ = c(x + 1)(y + 1)(z + 1) r_1 r'_2 r''_2, \quad (21)$$

где для кратности введено обозначение  $c \equiv 2D/P$ . Выразив  $y$  и  $z$  в (20) через  $x$  и подставив в (21), получим кубическое уравнение относительно  $x$ . Если  $x_0$  есть значение, отвечающее точке  $\vartheta = 0,5$ , то из (15) и (16) получим:

$$\delta \frac{1}{T_m} = \frac{1}{\Delta H} \ln \left[ \frac{(x_0 + p')^{1/r'_2} (x_0 + p'')^{1/r''_2} x_0^{1/r_1 - 1/r'_2 - 1/r''_2}}{(x_0 + 1)^{1/r_1}} \right]; \quad (22)$$

$$\delta \frac{\Delta T}{T_m^2} = \frac{1}{\Delta H} \left[ \frac{p'}{r'_2 x_0 (x_0 + p')} + \frac{p''}{r''_2 x_0 (x_0 + p'')} - \frac{1}{r_1 x_0 (x_0 + 1)} \right] \frac{\partial x}{\partial \vartheta} \Big|_{\vartheta=1,2}. \quad (23)$$

С точностью до членов первого порядка по  $c$  имеем:

$$\delta \frac{1}{T_m} = 2 \frac{p' (r_1/r'_2) + p'' (r_1/r''_2) - 1}{p' (r_1/r'_2) + p'' (r_1/r''_2) + 1} \frac{c}{\Delta H}; \quad (24)$$

$$\delta \frac{\Delta T}{T_m^2} = 4 \left[ \frac{p' (r_1/r'_2) + p'' (r_1/r''_2) - 1}{p' (r_1/r'_2) + p'' (r_1/r''_2) + 1} \right]^2 \frac{c}{\Delta H}. \quad (25)$$

II.  $2D/P \ll 1$ , т. е. концентрация скрепок очень мала. В этом случае

уравнения (11)–(13) упрощаются:

$$\begin{aligned}c_1 r_1 &= \frac{PK_1}{2} \left[ \frac{2D}{P} - (1 - \vartheta) c_1 - \vartheta c'_2 - \vartheta c''_2 \right]; \\c'_2 r'_2 &= \frac{PK'_2}{2} \left[ \frac{2D}{P} - (1 - \vartheta) c_1 - \vartheta c'_2 - \vartheta c''_2 \right]; \\c''_2 r''_2 &= \frac{PK''_2}{2} \left[ \frac{2D}{P} - (1 - \vartheta) c_1 - \vartheta c'_2 - \vartheta c''_2 \right];\end{aligned}$$

откуда следует, что

$$\frac{c_1 r_1}{K_1} = \frac{c'_2 r'_2}{K'_2} = \frac{c''_2 r''_2}{K''_2}. \quad (26)$$

Уравнения (10) в свою очередь дают:

$$\frac{c_1 r_1}{c_0} = K_1; \quad \frac{c'_2 r'_2}{c_0} = K'_2; \quad \frac{c''_2 r''_2}{c_0} = K''_2. \quad (27)$$

Используя (26), (27), а также формулы (15) и (16), находим:

$$\begin{aligned}\delta \frac{1}{T_m} &= 2 \frac{p'(r_1/r'_2) + p''(r_1/r''_2) - 1}{p'(r_1/r'_2) + p''(r_1/r''_2) + 1} \times \\&\times \frac{P(K_1/r_1) + P(K'_2/r'_2) + P(K''_2/r''_2)}{4 + P(K_1/r_1) + P(K'_2/r'_2) + P(K''_2/r''_2)} \frac{c}{\Delta H};\end{aligned} \quad (28)$$

$$\begin{aligned}\delta \frac{\Delta T}{T_m^2} &= 4 \left[ \frac{p'(r_1/r'_2) + p''(r_1/r''_2) - 1}{p'(r_1/r'_2) + p''(r_1/r''_2) + 1} \times \right. \\&\times \left. \frac{P(K_1/r_1) + P(K'_2/r'_2) + P(K''_2/r''_2)}{4 + P(K_1/r_1) + P(K'_2/r'_2) + P(K''_2/r''_2)} \right]^2 \frac{c}{\Delta H}.\end{aligned} \quad (29)$$

Формулы (28) и (29) имеют глубокую аналогию с (24) и (25). Действительно, если удовлетворяется условие, при котором получены (24) и (25) ( $K_1 P \gg 1$  или  $K'_2 P \gg 1$  и  $K''_2 P \gg 1$ ), то (28) и (29) совпадают соответственно с (24) и (25). В случае отсутствия одного из типов связывания скрепки с нативной ДНК ( $c'_2 = 0$  или  $c''_2 = 0$ ) указанные формулы переходят в соответствующие соотношения работы [6], где рассмотрена модель связывания лиганда с ДНК только одним способом.

Как и ожидалось, зависимости, определяемые формулами (15) и (16), отличаются от таковых, являющихся простыми суммами соответствующих кривых, рассчитанных при помощи теории [6]. Это еще раз подтверждает предположение о том, что «скрепочное действие» лиганда, связывающегося с ДНК двумя различными способами, не может быть сведено к рассмотрению «скрепочного действия» двух разных лигандов, обладающих способностью взаимодействовать с полимером только одним способом.

Формулы (24), (25) и (28), (29) для теплоты перехода  $\Delta H$  дают:

$$\Delta H = \frac{\delta(\Delta T)}{[\delta(T_m)]^2} \cdot T_0^2 c. \quad (30)$$

Формула (30) совпадает с соответствующей формулой работы [6], что показывает ее универсальность для определения энтальпии перехода спираль–клубок ДНК с использованием скрепок, обладающих способностью взаимодействовать различными способами с полинуклеотидом. Единственным требованием применимости этой формулы является условие  $c \rightarrow 0$ .

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Поletaев А. И. Круговой дихроизм комплексов ДНК // Итоги науки и техники.— М.: ВИНТИ, 1976.— С. 180—241 (Сер. молекуляр. биология; Т. 8; Ч. 2).
2. Wakelin L. P. C. Polyfunctional DNA interacting agents // *Med. Res. Rev.*— 1986.— 6, N 3.— P. 375—390.
3. Zimmer Ch., Wahnert U. Non-intercalating DNA-binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigation of the genetic material // *Progr. Biophys. and Mol. Biol.*— 1986.— 47.— P. 31—112.
4. Иванов В. И., Минченкова Л. Е. Влияние ионов металлов на тепловую денатурацию ДНК // *Биохимия.*— 1965.— 30, № 6.— С. 1213—1217.
5. Effect of calcium and manganese I on the helix-coil transition of DNA // Yu. P. Blagoi. V. A. Sorokin, G. O. Gladchenko, V. A. Valeev // *Biopolymers.*— 1983.— 22, N 7.— P. 1641—1656.
6. Франк-Каменецкий М. Д. Теория перехода спираль—клубок для дезоксирибонуклеиновой кислоты с дополнительными связями между цепями // *Высокомолекуляр. соединения.*— 1965.— 7, № 2.— С. 354—361.
7. Франк-Каменецкий М. Д., Карапетян А. Т. К теории плавления комплексов ДНК с низкомолекулярными веществами // *Молекуляр. биология.*— 1972.— 6, № 4.— С. 621—627.
8. Веденов А. М., Дыхне А. М., Франк-Каменецкий М. Д. Переход спираль—клубок в ДНК // *Успехи физ. наук.*— 1971.— 105, № 3.— С. 479—519.
9. Ландо Д. Ю., Крот В. Н., Франк-Каменецкий М. Д. Плавление комплексов ДНК с протяженными лигандами // *Молекуляр. биология.*— 1975.— 9, № 6.— С. 856—860.
10. Термодинамические исследования комплексов ДНК с красителями / А. Т. Карапетян, В. И. Пермагоров, М. Д. Франк-Каменецкий, Ю. С. Лазуркин // *Там же.*— 1972.— 6, № 6.— С. 867—874.
11. Изучение структурной организации РНК фага MS2 с использованием флуоресцирующих красителей / О. Ф. Борисова, В. В. Гречко, Л. А. Алешкина, Н. В. Кузнецова // *Там же.*— 1984.— 18, № 6.— С. 1617—1624.
12. Сравнение пространственной организации РНК фага MS2 и 16S рРНК. Взаимодействие с красителями, специфичными ко вторичной структуре нативной РНК и после гидролиза нуклеазой S1 / О. Ф. Борисова, В. В. Гречко, Н. В. Кузнецова и др. // *Там же.*— 1987.— 21, № 2.— С. 515—528.
13. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Статистическая физика.— М.: Наука, 1964.— 568 с.

Кировский гос. пед. ин-т

Ереван. гос. ун-т

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва

Получено 17.04.89

## THE EFFECT OF TWO TYPES OF BINDING OF THE LIGANDS ON THE PARAMETERS OF THE DNA HELIX-COIL TRANSITION

A. T. Karapetyan, P. O. Vardevanyan, G. A. Terzikyan, M. D. Frank-Kamenetskii

State Pedagogical Institute, Kirovakan

State University, Yerevan

Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

### Summary

A theory of the helix-coil transition in DNA complexes with ligands is developed for the case of two types of interaction differing from each other in the binding constants of the ligand to the unmelted DNA. The formulas connecting the experimentally found parameters of the melting curves of the DNA-ligand complexes with the parameters of the theory are derived. It is shown that the formula for the enthalpy of the helix-coil transition of DNA ( $\Delta H$ ) is universal and valid at the very general assumptions.