

**ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ПАР ОСНОВАНИЙ
НА КИНЕТИКУ ПЛАВЛЕНИЯ ДНК*****В. В. Аншелевич, А. В. Вологодский**

Введение. Изучение релаксационных процессов в плавлении ДНК началось во второй половине 60-х годов. Наиболее обстоятельное исследование кинетики плавления ДНК было проведено в работе Шлатца и Крозера [1], где показано, что в плавлении ДНК имеются очень медленные релаксационные процессы, и высказано предположение, что они связаны с выплавлением спиральных участков ДНК, окруженных уже расплавленными областями. В работах [2, 3] было предположено, что именно эти процессы ответственны за необратимость плавления ДНК при низкой ионной силе раствора.

Дальнейший прогресс в развитии представлений о кинетике перехода спираль — клубок в ДНК связан с открытием в середине 70-х годов эффекта тонкой структуры кривых плавления [4—6]. Это открытие положило начало новому этапу в исследованиях перехода спираль — клубок в ДНК. Теоретический и экспериментальный анализы этого явления позволили получить детальную картину термодинамики процесса плавления [7—10]. Согласно современным представлениям, плавление ДНК происходит путем кооперативного выплавления участков длиной в несколько сотен пар оснований, границы которых определяются последовательностью пар оснований в ДНК. Кооперативно плавающиеся участки можно разбить на три типа: 1) участки, выплавающиеся внутри спиральных областей; 2) участки, расположенные на границе расплавленных и спиральных областей; 3) участки, расположенные между уже расплавленными областями. На основе этих представлений было показано, что наиболее медленные релаксационные процессы при плавлении ДНК связаны с выплавлением участков 3-го типа [8, 11].

В работе [12] была построена количественная теория медленных релаксационных процессов при плавлении ДНК, которая основана на представлении о независимом плавлении удаленных вдоль цепи участков двойной спирали. Такое рассмотрение является справедливым лишь при кинетических измерениях вблизи равновесной температуры плавления, где, как было показано еще в работе [1], время релаксации не зависит ни от длины ДНК, ни от вязкости раствора. В таком случае выплавление отдельных участков можно рассматривать как процесс миграции границ спиральных областей внутри этих участков. При плавлении участков 3-го типа, окруженных уже расплавленными областями, задача сводится, таким образом, к исследованию процесса миграции двух границ спиральной области. При этом термодинамическую стабильность пар оснований внутри рассматриваемого участка можно считать одинаковой и равной средней стабильности пар для этого участка. Такую модель изучали ранее в работах [13, 14].

Так как выплавление участка 3-го типа приводит к уменьшению числа спиральных областей, то, как показано в работе [12], время релаксации при плавлении участка этого типа в точке, отвечающей его равновесной температуре плавления, определяется эффективным фактором кооперативности процесса. При этой температуре смещение границ спиральной области навстречу друг другу термодинамически невыгодно вплоть до момента их столкновения, так как связано с увеличением свободной энергии участка. Это и приводит к очень большим временам релаксации при плавлении такого участка.

Теория медленных релаксационных процессов позволила объяснить ряд наблюдавшихся на опыте эффектов. На ее основе была предсказана зависимость профилей плавления ДНК от скорости нагрева

* Представлена членом редколлегии В. И. Ивановым

образца, которая полностью подтвердилась в более поздних экспериментах [15].

В 1984 году появилась работа Суямы и Вады [16], в которой методом температурного скачка исследовалась кинетика плавления отдельных участков, расположенных на границе между спиральными и расплавленными областями (участков 2-го типа). В этой работе показано, что сравнительно медленное расплетание этих участков не связано с гидродинамическим трением при раскручивании комплементарных нитей двойной спирали. Поэтому естественной была попытка интерпретировать экспериментальные данные в рамках представления о миграции границ спиральных областей в ходе плавления. Применение к этой ситуации приближения, в котором средняя стабильность пар в пределах данного кооперативно выплавляющегося участка считается одинаковой, дает времена релаксации, измеряемые сотыми долями секунды [12]. Эта оценка находится в резком противоречии с экспериментальными результатами работы [16]. Суяма и Вада высказали предположение, что скорость процесса определяется внутренней гетерогенностью кооперативно выплавляющихся участков.

В настоящей работе мы провели теоретический анализ времени релаксации кооперативно выплавляющихся участков 2-го типа, учитывающий реальную последовательность пар оснований внутри таких участков. Анализ показал, что учет внутренней гетерогенности этих участков приводит к радикальному увеличению оценки времени релаксации при их плавлении. Полученные теоретические оценки находятся в хорошем согласии с экспериментальными данными. Проведенный анализ процесса плавления рассматриваемых участков позволил выделить характеристики последовательности, определяющие кинетику процесса, и на этой основе получить простые соотношения для вычисления скорости процесса. Анализ позволил также объяснить, почему учет внутренней гетерогенности участков не существен при рассмотрении кинетики плавления участков 3-го типа и очень важен для участков 2-го типа.

Теория. Рассмотрим участок молекулы, состоящий из N звеньев, каждое из которых может находиться в одном из двух состояний: расплавленном или спиральном. Так как процесс плавления высококооперативен, мы будем предполагать, что в каждый момент времени в этом участке существует лишь одна расплавленная область, примыкающая к его левому концу. Мгновенное состояние участка характеризуется единственным параметром n — числом расплавленных пар оснований. Переход из состояния $n - 1$ в состояние n связан с выплавлением n -й пары оснований. Ему отвечает константа скорости k_b , а обратному процессу — k_f . Значения этих элементарных констант были определены экспериментально в работах [17, 18]. Их отношение, k_f/k_b , равно термодинамической константе стабильности n -й пары s_n . Поскольку значения констант k_b и k_f определены с невысокой точностью, в отличие от их отношения, мы будем для определенности считать, что константа k_f не зависит от сорта пары, а $k_b = k_f/s_n$.

Пусть $p_n = p_n(t)$ — вероятность нахождения участка в состоянии n в момент времени t . Вероятности p_n подчиняются следующей системе кинетических уравнений:

$$p_n = k_f (s_n^{-1} p_{n-1} - (s_{n+1}^{-1} + 1) p_n + p_{n+1}), \quad n = 0, 1, 2, \dots, N. \quad (1)$$

причем выполняются граничные условия:

$$s_0^{-1} p_{-1} - p_0 = 0, \quad s_{N+1}^{-1} p_N - p_{N+1} = 0. \quad (2)$$

Так как в начальный момент времени $t=0$ участок полностью спиралец, выполняются начальные условия:

$$p_n(0) = \delta_{n0}, \quad n = 0, 1, \dots, N. \quad (3)$$

Процесс плавления участка характеризуется временем релаксации:

$$\tau = \int_0^{\infty} F'(t) dt, \quad (4)$$

где

$$F(t) = 1 - (m(t) - \bar{m}) / (m(0) - \bar{m}); \quad (5)$$

$$m(t) = \sum_{n=0}^N n p_n, \quad \bar{m} = \sum_{n=0}^N n \bar{p}_n, \quad m(0) = 0; \quad (6)$$

$$\bar{p}_n = Z^{-1} \prod_{j=1}^n s_j^{-1}, \quad Z = \sum_{n=0}^N \prod_{j=1}^n s_j^{-1}. \quad (7)$$

Здесь $m(t)$ — среднее число раскрытых пар в момент времени t , а \bar{m} — равновесное число раскрытых пар.

Можно показать, что из уравнений (1)–(7) следует:

$$\tau = k_f^{-1} \sum_{n=1}^N (\bar{p}_n)^{-1} (\bar{q}_n)^2 \left((\bar{m} \bar{q}_n)^{-1} \sum_{k=n}^N k \bar{p}_k - 1 \right), \quad (8)$$

где

$$\bar{q}_n = \sum_{k=n}^N \bar{p}_k \quad (9)$$

есть равновесная вероятность расплавления n -й пары оснований.

Соотношение (8) позволяет рассчитать время релаксации для любой заданной последовательности звеньев, характеризующейся цепочкой констант стабильности пар оснований s_n .

Результаты расчетов. Для проведения расчетов мы выбрали те последовательности звеньев, которые отвечают кооперативно плавящимся участкам 2-го типа. Такие участки выбирали из случайных последовательностей путем расчета равновесных карт плавления. Расчеты были также проведены для участка ДНК *ColE1*, выплавляющегося на конце спиральной области, кинетика плавления которого была исследована в работе [16]. Последовательность этого участка взята из работы [19]. Термодинамические параметры ДНК выбраны в соответствии с работой [16]: $\Delta H_{\text{ЛТ}} = 6,31$ ккал/моль, $\Delta H_{\text{ГС}} = 7,29$ ккал/моль, $\Delta S = 22$ кал/моль·град. При генерировании случайных последовательностей их среднее ГС-содержание полагали равным 0,3.

Результаты расчетов времени релаксации τ_m в середине интервала плавления $\left(\prod_{k=1}^N s_k = 1 \right)$ каждого участка из 16 рассмотренных отмечены точками на рис. 1. Одна из точек соответствует участку ДНК *ColE1*. Сплошная кривая на этом же рисунке отвечает времени релаксации участков с усредненной стабильностью пар ($s_n = 1$) в зависимости от их длины [12]:

$$\tau_m k_f = N^2 / 12. \quad (10)$$

Из этого рисунка мы видим, прежде всего, что замена реальной последовательности на цепочку такой же длины с усредненной стабильностью звеньев приводит к занижению времени релаксации на несколько порядков. В частности, для участка, кинетику плавления которого изучали в работе [16], время релаксации, полученное в нашей модели, на три порядка превышает оценку, следующую из формулы (10). Поскольку величина $k_f = 10^6 - 10^7$ с⁻¹ [17, 18], мы находим, что время релаксации этого участка $\tau_m \sim 1 - 10$ с. Это хорошо согласуется с результатами работы [16]. Таким образом, учет внутренней гетерогенности кооперативно плавящихся участков 2-го типа позволяет устранить имевшееся расхождение между теорией и экспериментом.

Мы видим, что времена релаксации τ_m участков 2-го типа определяются не только длиной, но существенным образом зависят от конкретной последовательности пар оснований в каждом участке. Ниже мы попытались найти те характерные особенности последовательности, которые определяют кинетику процесса.

Анализ результатов расчетов. Обозначим через $F_n = RT \sum_{i=1}^n \ln s_i$

изменение свободной энергии участка при выплавлении n пар оснований с его левого конца. Типичный профиль изменения этой свободной энергии в интервале плавления кооперативно плавящегося участка 2-го типа приведен на рис. 2. Подобные профили изменения свободной энергии при плавлении ДНК рассматривались ранее в работах [20, 21].

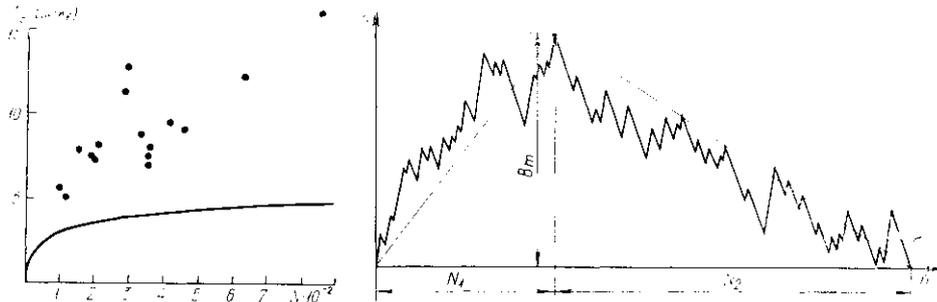


Рис. 1. Расчетное время релаксации τ_m для 16 различных участков, кооперативно выплавляющихся на границе спиральной области. Последовательности 15 участков, содержащих различное число пар оснований N , были сгенерированы на ЭВМ с помощью датчика случайных чисел (●); одна последовательность (○) отвечает кооперативно плавящемуся участку ДНК *ColE1*, кинетика плавления которого была исследована в работе [16]. Расчеты отвечают середине плавления каждого участка

Fig. 1. The calculated relaxation time τ_m for 16 different regions located at the end of the helix. Sequences of 15 regions were obtained by computer with the aid of a generator of random digits (●). One sequence (○) corresponds to the cooperatively melting region of *ColE1* studied in [16]. The data correspond to the middle of melting interval for each region. The solid line is the length dependence of the relaxation time for regions with averaged stability of base pairs ($s_n = 1$)

Рис. 2. Типичный профиль изменения свободной энергии участка при выплавлении n пар оснований с одного конца при $T = T_m$. Показана также используемая в тексте аппроксимация этого профиля

Fig. 2. A typical profile of free energy change due to melting out of n pairs from one end at $T = T_m$. The approximation of the profile used in the text is also shown

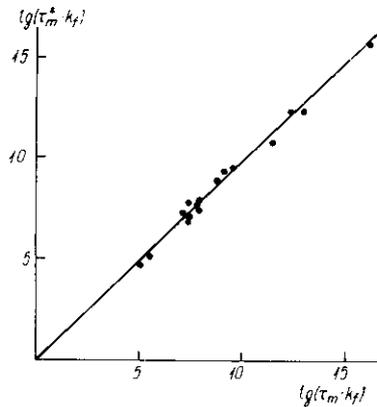
Совпадение F_0 и F_N отвечает условию, что температура соответствует середине интервала плавления T_m данного участка длины N . Тот факт, что $F_n > 0$ для всех частично расплавленных состояний, означает, что все промежуточные состояния участка менее выгодны, чем полностью спиральное и полностью расплавленное, и плавление участка происходит кооперативно.

Из самых общих соображений ясно, что в первом приближении время релаксации процесса плавления рассматриваемого участка должно определяться высотой энергетического барьера $B_m = \max F_n$ (рис. 2), т. е. $\tau_m \sim k_f^{-1} \exp(B_m/RT_m)$. Такое приближение качественно правильно описывает процесс, однако неудовлетворительно с количественной точки зрения. Его можно значительно улучшить за счет приближенного учета энтропийных поправок, связанных с многостадийностью процесса плавления.

Для этого рассмотрим следующую модель. Пусть максимум F_n достигается при $n = n_B$. Разобьем весь участок на два отрезка: от 1 до n_B и от $n_B + 1$ до N . Обозначим длины этих отрезков через N_1 и N_2 соответственно. Будем считать, что стабильность пар оснований в каждом из этих отрезков равна средней стабильности пар в каждом из них. Графически это означает, что мы аппроксимируем профиль F_n двумя линейными функциями, показанными на рис. 2. В рамках этой модели время релаксации τ_m можно выразить в явном виде на основании формулы (8). Имея в виду, что для типичных последовательностей выполняются условия: $\exp(B_m/RT_m) \gg 1$, $B_m/RT_m \ll N_1$, $B_m/RT_m \ll N_2$, мы получаем для времени релаксации τ_m^* в этой модели:

$$\tau_m^* = k_f^{-1} \exp(B_m/RT_m) N_1 N_2 (RT_m/B_m)^2. \quad (11)$$

Мы сопоставили величины τ_m , рассчитанные по формуле (8), с величинами τ_m^* для тех же 16 последовательностей, что и в предыдущем разделе. При этом величины B_m , N_1 и N_2 находили, анализируя эти последовательности. Результаты сравнения представлены на рис. 3. Этот рисунок описывает корреляции величин τ_m и τ_m^* . Каждая точка соответствует одной из 16 последовательностей, а отклонение точек от



прямой характеризует различие между величинами τ_m и τ_m^* . Мы видим, что формула (11) соответствует результатам численных расчетов, выполненных в

Рис. 3. Корреляция величин τ_m и τ_m^* для тех же 16 участков, что и на рис. 1. Отклонение точек от прямой характеризует различие между величинами τ_m и τ_m^*

Fig. 3. The correlation of values τ_m and τ_m^* for the same 16 regions as in Fig. 1. The difference between τ_m and τ_m^* is characterized by the deviation of the straight line

рамках детальной модели. Поэтому ее можно принять в качестве оценки для истинного времени релаксации плавления участка 2-го типа.

Проведенное исследование наглядно показывает, почему учет внутренней гетерогенности совершенно необходим при анализе кинетики плавления участков 2-го типа. Как мы видим, время релаксации участков этого типа определяется, прежде всего, величиной энергетического барьера B_m . В приближении, когда стабильности пар оснований в рассматриваемом участке считаются одинаковыми и равными средней стабильности, мы полностью пренебрегаем существованием этого барьера. В отличие от этого случая, величина энергетического барьера на профиле изменения свободной энергии для участков 3-го типа определяется значением эффективного фактора кооперативности, а не их внутренней гетерогенностью. Так, при температуре, отвечающей равновесной точке плавления участка 3-го типа, величина B_m равна [12]:

$$B_m \propto RT \ln (\sigma^{-1} N^{3/2}),$$

где σ — фактор кооперативности. Поэтому учет внутренней гетерогенности не должен оказать существенного влияния на время релаксации участков 3-го типа.

Заключение. Проведенный нами анализ показал, что учет внутренней гетерогенности участков, выплавляющихся на границе спиральных и расплавленных областей, совершенно необходим при количественном рассмотрении кинетики процесса плавления. Такое рассмотрение приводит к существенно большему времени релаксации для плавления участков этого типа по сравнению с теорией, в которой не учитывается внутренняя гетерогенность участков, и позволяет устранить имевшееся расхождение между теорией и экспериментом [16]. Анализ профилей свободной энергии при плавлении этих участков позволил сформулировать простую модель, учитывающую главные особенности распределения АТ- и ГС-пар в данном кооперативно плавящемся участке. В рамках этой модели кинетические особенности процесса приобретают наглядное истолкование, и для времени релаксации процесса получается простое соотношение, практически совпадающее с результатами точных расчетов.

Мы благодарим М. Д. Франк-Каменецкого и Б. Р. Амирикяна за полезные обсуждения и замечания.

EFFECT OF NUCLEOTIDE SEQUENCE ON KINETICS OF DNA MELTING

V. V. Anshelevich, A. V. Vologodskii

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

Summary

Kinetics of cooperative melting of DNA regions located at the edge of the helix is considered. Exact calculations show that a nucleotide sequence of such regions exerts a considerable effect on the process. Internal heterogeneity may increase the relaxation time by a few orders of magnitude as compared with the value when stability of base pairs throughout the region is assumed to be the same. Simple characteristics of the sequence which determine relaxation time of the process are presented.

1. Spatz H. Ch., Crothers D. M. The rate of DNA unwinding // *J. Mol. Biol.*—1969.—42, N 2.—P. 191—219.
2. Hoff A. J., Ross A. L. Hysteresis of denaturation of DNA in the melting range // *Biopolymers.*—1972.—11, N 6.—P. 1289—1294.
3. Michel F. Hysteresis and partial irreversibility of denaturation of DNA as a means of investigation of the topology of base distribution constraints: Application to a yeast ρ^- (petite) mitochondrial DNA // *J. Mol. Biol.*—1974.—89, N 2.—P. 305—326.
4. Yabuki S., Gotoh O., Wada A. Fine structure in denaturation curves of bacteriophage lambda DNA. Their relation to the intramolecular heterogeneity in base composition // *Biochim. et biophys. acta.*—1975.—395, N 3.—P. 258—273.
5. Fine structure of DNA melting curves / Y. L. Lyubchenko, M. D. Frank-Kamenetskii, A. V. Vologodskii et al. // *Biopolymers.*—1976.—15, N 6.—P. 1019—1036.
6. Vizard D. L., Ansevin A. T. High resolution thermal denaturation of DNA // *Biochemistry.*—1976.—15, N 4.—P. 741—750.
7. Lyubchenko Y. L., Vologodskii A. V., Frank-Kamenetskii M. D. Direct comparison of theoretical and experimental melting profiles for RF11ØX174 DNA // *Nature.*—1978.—271, N 5640.—P. 28—31.
8. Wada A., Yabuki S., Husimi Y. Fine structure in the thermal denaturation of DNA. High temperature-resolution spectrophotometric studies // *Crit. Revs Biochem.*—1980.—9.—P. 87—144.
9. Gotoh O. Prediction of melting profiles and local helix stability for sequenced DNA // *Adv. Biophys.*—1983.—16.—P. 1—52.
10. Allowance for heterogeneous stacking in the DNA helix-coil transition theory / A. V. Vologodskii, B. R. Amirikyan, Y. L. Lyubchenko et al. // *J. Biomol. Struct. Dyn.*—1984.—2, N 1.—P. 131—148.
11. A study of the reversibility of helix-coil transition in DNA / M. P. Perelroyzen, V. I. Lyamichev, Y. A. Kalambet et al. // *Nucl. Acids Res.*—1981.—9, N 16.—P. 4043—4059.
12. Slow relaxational processes in the melting of linear biopolymers: A theory and its application to nucleic acids / V. V. Anshelevich, A. V. Vologodskii, A. V. Lukashin, M. D. Frank-Kamenetskii // *Biopolymers.*—1984.—23, N 1.—P. 39—58.
13. Schwarz M., Poland D. Random walk with two interacting walkers // *J. Chem. Phys.*—1975.—63, N 1.—P. 557—568.
14. Schwarz M., Poland D. Relaxation in biological macromolecules: Properties of some exact solutions // *Ibid.*—1976.—65, N 7.—P. 2620—2633.
15. Kozyavkin S. A., Lyubchenko Y. L. The nonequilibrium character of DNA melting: Effects of the heating rate on the fine structure of melting curves // *Nucl. Acids Res.*—1984.—12, N 10.—P. 4339—4349.
16. Suyama A., Wada A. Unwinding kinetics of cooperatively melting regions in DNA // *Biopolymers.*—1984.—23, N 2.—P. 409—433.
17. Porschke D., Eigen M. Co-operative non-enzymic base recognition. 3. Kinetics of the helix-coil transition of the oligoribouridylic-oligoriboadenylic acid system and oligoriboadenylic acid alone at acid pH // *J. Mol. Biol.*—1971.—62, N 2.—P. 361—381.
18. Craig M. E., Crothers D. M., Doty P. Relaxation kinetics of dimer formation by self complementary oligonucleotides // *Ibid.*—P. 383—401.
19. Nucleotide sequence of small *ColE1* derivatives: Structure of the region essential for autonomous replication and colicin E1 immunity / A. Oka, N. Nomura, M. Morita et al. // *Mol. and Gen. Genet.*—1979.—172, N 2.—P. 151—159.
20. Лифшиц И. М. К статистической термодинамике плавления длинных гетерополимерных цепей // *Журн. эксперим. и теор. физики.*—1973.—65, № 3.—С. 1100—1110.
21. Azbel M. Y. DNA sequencing and helix-coil transition. 1. Theory of DNA melting // *Biopolymers.*—1980.—19, N 1.—P. 61—80.

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва

Получено 10.02.86