

УСПЕХИ ФИЗИЧЕСКИХ НАУК

СОВЕЩАНИЯ И КОНФЕРЕНЦИИ

{541.6+57К048}

**НАУЧНАЯ СЕССИЯ ОТДЕЛЕНИЯ ОБЩЕЙ ФИЗИКИ
И АСТРОНОМИИ
И ОТДЕЛЕНИЯ ЯДЕРНОЙ ФИЗИКИ
АКАДЕМИИ НАУК СССР**

(19 декабря 1985 г.)

19 декабря 1985 г. в Институте физических проблем им. С. И. Вавилова АН СССР состоялась совместная научная сессия Отделения общей физики и астрономии и Отделения ядерной физики АН СССР. На сессии были заслушаны доклады:

1. А. Ю. Г р о с б е р г, А. Р. Х о х л о в. Фазовые переходы в полимерных и биополимерных системах.
2. М. В. В о л ь к е н ш т е й н. Эволюция биополимеров и биологическая эволюция.
3. М. Д. Ф р а н к - К а м е н е ц к и й. Топология и структурные переходы в ДНК.

Краткое содержание докладов приводится ниже.

М. Д. Франк-Каменецкий. Топология и структурные переходы в ДНК. Пожалуй, наиболее важный факт, выясненный относительно ДНК со времени работы Уотсона и Крика, заключается в том, что биологически функциональной является не линейная, а кольцевая форма. Это приводит к важной роли топологии.

Разделяют два уровня топологии молекулы ДНК¹. Во-первых, кольцо ДНК может быть незаузленным или образовывать узел того или иного типа. Во-вторых, каждая из комплементарных цепей замкнута сама на себя, и в результате они образуют, в математическом смысле, зацепление высокого порядка. Количественно степень зацепленности характеризуется величиной порядка зацепления Lk (от английского *linking number*), которая определяется как число протыканий одной цепью поверхности, натянутой на другую цепь.

Тип узла и порядок зацепления являются топологическими инвариантами ДНК, так как они не могут меняться ни при каких деформациях и структурных перестройках молекулы, происходящих без разрыва цепей. Существование этих топологических инвариантов приводит к целому ряду важных последствий. Прежде всего, поскольку заузленные молекулы не могут реплицироваться, клетка должна уметь «развязывать» заузленные молекулы ДНК². Как оказалось, это делают специальные ферменты, получившие название топоизомераз. Эти ферменты разрезают двойную спираль ДНК, протаскивают удаленную вдоль цепи часть молекулы через образовавшуюся брешь, а затем вновь «залечивают» брешь. Топоизомеразы меняют также и величину порядка зацепления ДНК Lk.

Существование топологического инварианта Lk приводит к важнейшему понятию сверхспирализации ДНК. Число сверхвитков определяется как разность $\Delta Lk = Lk - (N/\gamma)$, где N — число пар нуклеотидов в ДНК, γ — число пар нуклеотидов на виток двойной спирали при заданных внешних условиях. Удельная величина сверхспирализации, т. е. плотность сверхвитков, определяется как $\sigma = 10\Delta Lk/N$. Сверхспиральная ДНК находится в напряженном состоянии, энергия сверхспирализации $G = 11RTN\sigma^2$ запасена как в изгибах, так и в осевой закрутке двойной спирали³.

Фундаментальный факт состоит в том, что функционирующая в клетке ДНК всегда оказывается не только замкнутой, но и отрицательно сверхспирализованной. Причем величина σ для всех ДНК приблизительно одинакова и составляет около — 0,05. Этот факт означает, что в клетке работает специальный механизм, поддерживающий ДНК в состоянии сверхспирализации. Как оказалось, эту роль играют ферменты из класса топоизомераз, ДНК-гиразы. Используя энергию АТФ, эти ферменты переводят релаксированную, несверхспирализованную ДНК в отрицательно сверхспирализованное состояние.

Открытие ДНК-гираз рассеяло последние сомнения в том, что состояние сверхспирализации очень важно для функционирования ДНК. Многочисленные биологические эксперименты показали, что сверхспирализация необходима для репликации, рекомбинации и правильной регуляции транскрипции. Для выяснения причин столь большой биологической роли сверхспирализации было необходимо установить, чем отличается структура сверхспирализованной ДНК от структуры релаксированной молекулы, т. е. от В-формы ДНК, открытой Уотсоном и Криком.

С этой целью в лаборатории Ю. С. Лазуркина (Институт молекулярной генетики АН СССР) была начата работа по выяснению влияния сверхспирализации на структуру ДНК. Прежде всего этот вопрос был подвергнут теоретическому анализу⁴. К тому времени уже был детально изучен переход спираль — клубок в ДНК. Поэтому теоретически можно было выяснить, возможно ли образование раскрытых участков при сверхспирализации. Построив соответствующую теорию и проведя расчеты для молекул ДНК, последовательности которых были к тому времени известны, мы пришли к выводу, что при физиологических значениях плотности сверхспирализации образование раскрытых участков не происходит, хотя вероятность раскрытия значительно возрастает по сравнению с релаксированной двойной спиралью. Затем мы включили в теорию возможность образования крестообразных структур в участках, последовательность которых имеет ось симметрии второго порядка (палиндромы). Оказалось, что в реальных последовательностях встречаются достаточно протяженные палиндромы, которые могут переходить в крестообразные структуры при физиологических напряжениях сверхспирализации.

Выводы теории были вскоре подтверждены экспериментально. Наиболее плодотворным методом исследования образования альтернативных, отличных от регулярной В-формы, структур (крестов и других структур, о которых речь будет ниже) оказался метод двумерного гель-электрофореза⁵.

^{1/2} 10 УФН, т. 149, вып. 4

Суть метода состоит в следующем. Если набор топоизомеров, т. е. молекул ДНК идентичных в химическом отношении, но различающихся значением Lk , поместить в гель (полимерную сетку, насыщенную растворителем) и приложить постоянное электрическое поле, то произойдет разделение топоизомеров. С ростом сверхспирализации молекулы становятся более компактными и быстрее движутся в электрическом поле. Однако если в сильно сверхспирализованных топоизомерах произойдет структурный переход, скажем, в крест, эти топоизомеры начнут двигаться медленнее, чем им положено, так

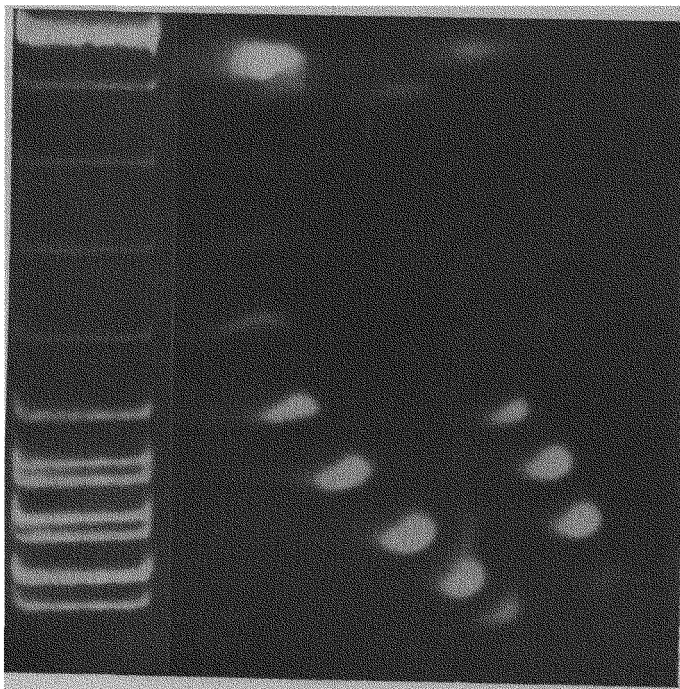


Рис. 1

как раскручивание двойной спирали на участке, где произошел переход, повлечет за собой частичное снятие сверхспирального напряжения. В результате получается запутанная картина полос, показанная на рис. 1 слева. Чтобы выяснить, что происходит, меняют направление электрического поля. Теперь молекулы движутся слева направо, причем в гель добавляют специальные добавки, которые снижают на определенную величину сверхспиральное напряжение. В результате существование альтернативных структур становится невыгодным, и во втором направлении все топоизомеры движутся в соответствии с числом сверхвитков. Результирующая картина двумерного гель-электрофореза приведена на рис. 1. Образование альтернативной структуры ясно видно по скачку в подвижности топоизомеров в первом направлении.

В конце 70-х годов перед исследователями, занимающимися структурой ДНК, открылись совершенно новые возможности в связи с возникновением генной инженерии. До этого времени мы вынуждены были довольствоваться теми препаратами ДНК, которые удавалось извлечь из клеток и вирусов, причем не знали последовательности нуклеотидов в них. Теперь мы получаем от генных инженеров специально «скроенные» молекулы ДНК с точно известными последовательностями нуклеотидов, несущие те или иные вставки, структуру которых хотим изучать. Это с неизбежностью должно было

привести к новым открытиям в области структуры ДНК, и такие открытия не заставили себя долго ждать.

В 1979 г. А. Рич с сотрудниками (Массачусетский технологический институт, США) сообщили об открытии новой формы ДНК, названной Z-формой. Эта форма ДНК во многих отношениях отличается от классической В-формы, хотя в ней сохраняется уотсон-криковский принцип комплементарности. Самое главное отличие состоит в том, что двойная спираль в ней не правая, а левая ⁶. Это немедленно привело к предположению, что образованию Z-формы должна сильно способствовать отрицательная сверхспирализация. Методом двумерного гель-электрофореза было показано, что вставки, в которых чередуются пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, $(GC)_n \cdot (GC)_n$ и $(GT)_n \cdot (AC)_n$, действительно переходят в Z-форму под действием отрицательной

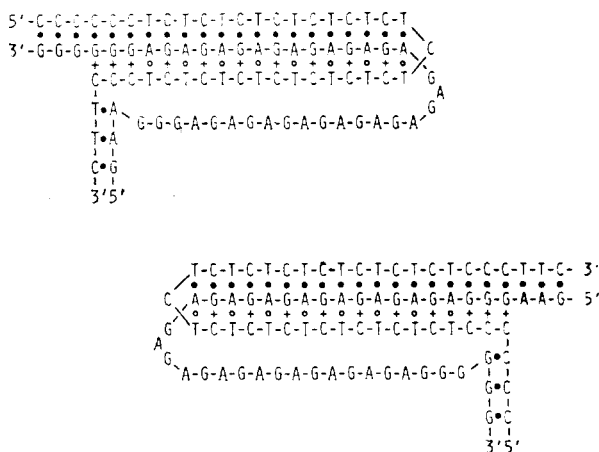


Рис. 2

сверхспирализации. Именно исследование вставок в кольцевых ДНК методом двумерного гель-электрофореза позволило, вместе с использованием соответствующей теории, определить основные энергетические параметры В — Z-перехода ⁷.

Недавно мы приступили к изучению вопроса о структуре, возникающей под влиянием отрицательной сверхспирализации, в участках ДНК, в одной цепи которых находятся только пуриновые, а в другой только пиримидиновые нуклеотиды ⁸. С этой целью в удобную для исследования методом двумерного гель-электрофореза кольцевую ДНК был встроен участок, содержащий последовательность $(GA)_{16} \cdot (TC)_{16}$. Методом двумерного гель-электрофореза был обнаружен структурный переход в этом участке. Особенностью этого структурного перехода, отличающей его от ранее изученных переходов в крест и Z-форму, является резкая зависимость от pH среды. Это говорит о том, что исследованная последовательность переходит в совершенно новую структуру, стабилизированную протонами. Мы назвали эту новую структуру ДНК Н-формой.

Каково строение Н-формы? На этот счет пока можно строить лишь догадки. Наши данные дают весьма определенные количественные характеристики Н-формы, сильно ограничивающие возможные модели. Именно: в Н-форме нити не переплетены, подобно случаю крестов, и одно место протонирования приходится на четыре пары нуклеотидов. Наиболее вероятной нам кажется структура, показанная на рис. 2. Основным элементом структуры является тройной комплекс, включающий нормальную уотсон-криковскую двойную спираль, в большом желобке которой располагается пиримидиновая цепь, образующая с пуриновой цепью Хугстеновские пары, в которых цитозин

протонирован. Имеются данные, что такого рода тройные комплексы образуются модельными полинуклеотидами при кислых значениях pH⁹.

Итак, мы теперь знаем, что отрицательная сверхспирализация может приводить к образованию в ДНК по крайней мере трех типов альтернативных структур: крестов в палиндромных участках, Z-формы в чередующихся пурин-пиримидиновых последовательностях и H-формы в гомопурин-гомопиримидиновых последовательностях. В ближайшее время выяснится, исчерпывается ли этим набором многообразие альтернативных структур, к образованию которых приводят топологические ограничения. Полным ходом идет также выяснение вопроса о возможной биологической роли альтернативных структур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Франк-Каменецкий М. Д., Вологодский А. В. // УФН. 1981. Т. 134. С. 641.
2. Frank-Kamenetskii M. D., Lukashin A. V., Vologodskii A. V. // Nature. 1975. V. 258. P. 398.
3. Vologodskii A. V., Anshelevich V. V., Lukashin A. V., Frank-Kamenetskii M. D. // Nature, 1979. V. 280. P. 294.
Frank-Kamenetskii M. D., Lukashin A. V., Anshelevich V. V., Vologodskii A. V. // J. Biomol. Struct. Dyn. 1985. V. 2. P. 1005.
4. Vologodskii A. V., Lukashin A. V., Anshelevich V. V., Frank-Kamenetskii M. D. // Nucl. Acids Res. 1979. V. 6. P. 967.
Anshelevich V. V., Vologodskii A. V., Lukashin A. V., Frank-Kamenetskii M. D. // Biopolymers. 1979. V. 18. P. 2733.
Vologodskii A. V., Frank-Kamenetskii M. D. // FEBS Lett. 1982. V. 143. P. 257.
5. Wang J. C., Peck L. J., Becherer K. // Cold Spring Harbor Symp. Quantit. Biol. 1983. V. 47. P. 85.
Lyamichev V. I., Panyutin I. G., Frank-Kamenetskii M. D. // FEBS Lett. 1983. V. 153. P. 298.
6. Rich A., Nordheim A., Wang A. H. J. // Ann. Rev. Biochem. 1984. V. 53. P. 791.
7. Peck L. J., Wang J. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 1983. V. 80. P. 6206.
Frank-Kamenetskii M. D., Vologodskii A. V. // Nature., 1984. V. 307. P. 481.
Vologodskii A. V., Frank-Kamenetskii M. D. // J. Biomol. Struct. Dyn. 1984. V. 1. P. 1325.
8. Lyamichev V. I., Mirkin S. M., Frank-Kamenetskii M. D. // Ibidem. 1985. V. 2. P. 327; 1986. V. 3. P. 667.
Лямичев В. И., Миркин С. М., Франк-Каменецкий М. Д. // Биополимеры и клетка.—1986. Т. 2. С. 115.
9. Lee J. S., Johnson D. A., Morgan A. R. // Nucl. Acids Res. 1979. V. 6. P. 3073.