

УДК 541.64

## **ФЛУКТУАЦИИ НА ПЕРЕХОДАХ ПОРЯДОК–БЕСПОРЯДОК В КОМПЛЕКСАХ ДНК–ЛИГАНД С РАЗЛИЧНЫМИ МЕХАНИЗМАМИ СВЯЗЫВАНИЯ**

**Е.Ш. МАМАСАХЛИСОВ\*, А.П. АНТОНЯН, А.Е. МАМАСАХЛИСОВ,  
Ш.А. ТОНОЯН, П.О. ВАРДЕВАНЯН**

Ереванский государственный университет, Ереван, Армения

\*e-mail: y.mamasakhlisov@ysu.am

(Поступила в редакцию 28 декабря 2016 г.)

Теоретически рассмотрено плавление комплексов ДНК–лиганд для лигандов, связывающихся с ДНК посредством двух механизмов. Полученные результаты описывают поведение таких экспериментально наблюдаемых величин, как степень денатурации и корреляционная длина, в зависимости от концентрации лигандов. Показано, что имеющие место для комплексов ДНК–лиганд тепловая и холододенатурации демонстрируют такую же кооперативность, как и тепловая денатурация чистой ДНК. При этом, температурный интервал холододенатурации существенно уже такового для тепловой денатурации как чистой ДНК, так и комплексов ДНК–лиганд.

### **1. Введение**

Явление перехода спираль–клубок в биополимерах известно с 1960-х годов [1–3] и до сих пор продолжает активно исследоваться [4–9]. Такой неослабевающий интерес обусловлен двумя факторами. С биологической точки зрения разворачивание двойной спирали ДНК связано с такими генетически важными процессами, как транскрипция и трансляция. С физической точки зрения двойная спираль ДНК является примером одномерной кооперативной системы с крупномасштабными корреляциями [1]. Теория переходов порядок–беспорядок в ДНК рассматривалась в работах [2, 10, 11]. При исследовании структуры и функции ДНК особенно важными являются взаимодействия с водой, ионами и низкомолекулярными соединениями, растворенными в воде (лигандами). Эффект таких взаимодействий исследовался в работах [12, 13]. Взаимодействие лигандов с двойной спиралью ДНК является одним из фундаментальных факторов для многих внутриклеточных процессов. Так, например, лиганды с пониженной специфичностью к последовательности часто обладают способностью к регуляции экспрессии генов, трансляции и транскрипции [14]. Из-за сложной структуры

двойной спирали ДНК возможны различные способы нековалентного связывания лигандов с ДНК: интеркаляция [15], бис-интеркаляция [16], связывание в узкой бороздке [17], связывание в широкой бороздке [18], их комбинация [19], а также связывание посредством неклассических механизмов [20].

Настоящая работа посвящена эффекту флуктуаций на переходе спираль-клубок двойной спирали ДНК, связывающейся с лигандами двумя способами, с нативной и денатурированной ДНК. Нами изучено влияние лигандов, связывающихся с ДНК посредством двух механизмов, на поведение корреляционной длины и степени денатурации ДНК.

## 2. Теория плавления комплексов ДНК-лиганд

Была использована стандартная модель плавления комплексов ДНК-лиганд [1, 21]. Предполагалось, что молекула ДНК состоит из  $N$  пар оснований. В области перехода спираль-клубок каждая пара оснований может находиться в одном из двух состояний: спиральном или клубкообразном. Предполагается, что молекула разбивается на  $n$  участков, содержащих  $N_1$  клубкообразных пар оснований и  $N_2$  спиральных пар оснований. Общее число пар оснований постоянно в процессе плавления, так что

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

Раствор также содержит два типа лигандов с различными параметрами связывания. Предположим, что константы связывания лигандов с денатурированной ДНК имеют значения  $K'_1$  и  $K''_2$ , а константы связывания с нативной ДНК –  $K'_2$  и  $K''_1$ . Общее число лигандов  $k$ , число молекул лигандов, связанных с одонитевыми участками по первому механизму равно  $k'_1$  и по второму –  $k''_2$ , а число молекул, связанных с двунитевыми участками по первому и второму механизмам, составляет  $k'_2$  и  $k''_1$ , соответственно. Пусть  $F_1$  и  $F_2$  – свободные энергии клубкообразного и спирального состояний из расчета на пару оснований, соответственно,  $F_0$  – свободная энергия инициализации спирали,  $\Psi_i^\alpha$  – свободная энергия связывания лиганда ( $i = 1, 2$  и  $\alpha = ', ''$ ) и  $W$  – число микросостояний макромолекулы, соответствующих данной энергии. Таким образом, свободная энергия системы может быть оценена как [21, 22]

$$F = F_1 N_1 + F_2 N_2 + n F_0 + \sum_{i=1,2} \sum_{\alpha=', ''} k_i^\alpha \Psi_i^\alpha - T \ln W . \quad (2)$$

Используя метод наиболее вероятного распределения, была получена следующая система уравнений для концентраций  $c_i^\alpha = k_i^\alpha / N_i$ :

$$\begin{aligned}
\frac{c_1' r_1' / 2}{1 - c_1' r_1' / 2} &= \frac{PK_1'}{2} \left[ \frac{2D}{P} - 2(1 - \vartheta) c_1' - 2(1 - \vartheta) c_1'' - \vartheta c_2' - \vartheta c_2'' \right], \\
\frac{c_1'' r_1'' / 2}{1 - c_1'' r_1'' / 2} &= \frac{PK_1''}{2} \left[ \frac{2D}{P} - 2(1 - \vartheta) c_1' - 2(1 - \vartheta) c_1'' - \vartheta c_2' - \vartheta c_2'' \right], \\
\frac{c_2' r_2'}{1 - c_2' r_2'} &= \frac{PK_2'}{2} \left[ \frac{2D}{P} - 2(1 - \vartheta) c_1' - 2(1 - \vartheta) c_1'' - \vartheta c_2' - \vartheta c_2'' \right], \\
\frac{c_2'' r_2''}{1 - c_2'' r_2''} &= \frac{PK_2''}{2} \left[ \frac{2D}{P} - 2(1 - \vartheta) c_1' - 2(1 - \vartheta) c_1'' - \vartheta c_2' - \vartheta c_2'' \right],
\end{aligned} \tag{3}$$

где  $K_i^\alpha$  – константы связывания,  $D$  – полная концентрация лигандов,  $r_i^\alpha$  – число центров связывания одного лиганда,  $P$  – общая концентрация фосфатных групп и  $\vartheta$  – степень спиральности. Уравнение для эффективного параметра роста спирали имеет вид

$$S^* = S \frac{(1 - c_1' r_1' / 2)^{2/r_1'} (1 - c_1'' r_1'' / 2)^{2/r_1'}}{(1 - c_2' r_2')^{2/r_2'} (1 - c_2'' r_2'')^{2/r_2'}}, \tag{4}$$

где  $S = \exp\left(\frac{F_1 - F_2}{T}\right) = \exp\left(-\frac{\Delta H}{RT} + \Delta S\right)$  – параметр роста спирали чистой ДНК,

$\Delta H$  – изменение энтальпии,  $\Delta S$  – изменение энтропии при образовании одной пары оснований. Фактически, модель со свободной энергией (2) сводится к модели чистой ДНК с переопределенным параметром роста спирали (4), зависящим от концентрации лигандов и параметров связывания лигандов с ДНК.

Степень спиральности  $\vartheta$  является параметром порядка, описывающим переход спираль–клубок, который определяется как

$$\vartheta = \frac{1}{N} \langle N_2 \rangle, \tag{5}$$

где  $\langle \dots \rangle$  означает термодинамическое среднее. Таким образом, степень спиральности – это средняя доля пар оснований, находящихся в спиральной фазе. В то же время флуктуационные эффекты также являются существенными, особенно для описания кооперативности перехода спираль–клубок, средней длины спирального участка и т. д.

Для учета флуктуационных эффектов мы рассмотрели поведение корреляционной длины двунитевой ДНК, определяемой как масштаб экспоненциального затухания флуктуаций вдоль цепи. Для этого была использована модель, эквивалентная (2) и разработанная для описания перехода спираль–клубок в полипептидах и ДНК [23–25], но более пригодная для описания флуктуационных

эффектов, нежели (2). Энергия модели может быть представлена как

$$H\{\gamma\} = U \sum_{i=1}^N \delta_i^{(\Delta)}, \quad (6)$$

где  $N$  – число повторяющихся единиц,  $U$  – энергия стабилизации пары оснований,  $\delta_j^{(\Delta)} = \prod_{k=0}^{\Delta-1} \delta(\gamma_{j+k}, 1)$ ,  $\delta(x, 1)$  – символ Кронекера и  $\gamma_i = 1, \dots, Q$ . Переменная  $\gamma_i$  описывает состояние  $i$ -ой повторяющейся единицы. Предполагается, что общее число конформаций равно  $Q$ ,  $\gamma_i = 1$  соответствует спиральной, а остальные  $(Q-1)$  – конформациям в клубкообразном состоянии. При этом параметры моделей (2) и (6) связаны между собой соотношениями

$$U(\{c\}, \{r\}) = -RT \ln S^* + RT \ln(Q-1), \quad (7)$$

$$\exp\left(-\frac{F_0}{RT}\right) = Q^{1-\Delta}. \quad (8)$$

Здесь  $S^*$  – параметр роста спирали (4). Таким образом, энергия стабилизации пары оснований  $U$  становится концентрационно-зависимой. Параметр  $\Delta$  имеет смысл персистентной длины одноцепочечной ДНК и оценивается как  $\Delta \approx 7$ .

Флуктуационные эффекты могут быть описаны с использованием парной корреляционной функции

$$g_2(r) = \langle \delta_j^{(\Delta)} \delta_{j+r}^{(\Delta)} \rangle - \langle \delta_j^{(\Delta)} \rangle \langle \delta_{j+r}^{(\Delta)} \rangle, \quad (9)$$

которая в данном случае описывает статистическую взаимозависимость образования двух пар оснований, удаленных друг от друга на  $r$  пар оснований вдоль цепи. Как известно, для одномерной системы парная корреляционная функция затухает как [24]

$$g_2(r) \sim \exp\left(-\frac{r}{\xi}\right), \quad (10)$$

где  $\xi$  – корреляционная длина. Как было показано в работе [24], корреляционная длина одномерной системы удовлетворяет соотношению

$$\coth\left(\frac{1}{2\xi}\right) = \frac{\partial \vartheta}{\partial \ln S}. \quad (11)$$

Максимальное значение корреляционной длины достигается при температуре плавления (в точке полуперехода,  $\vartheta = 1/2$ ) и оценивается как [24]

$$\xi_0 \approx \frac{1}{2} Q^{\frac{\Delta-1}{2}}. \quad (12)$$

### 3. Результаты и их обсуждение

Для учета влияния лигандов, описанных выше, степень спиральности и корреляционная длина были рассчитаны на основании уравнений (3)–(6). В настоящей работе мы сосредоточились на влиянии лигандов, имеющих большее сродство к нативной ДНК, чем к расплавленной. Решение системы уравнений (3) было получено численно.

Если полная концентрация лигандов в растворе сопоставима с концентрацией фосфатных групп, т. е.  $2D/P \sim 1$  и  $PK'_1 \gg 1, PK''_1 \gg 1, PK'_2 \gg 1, PK''_2 \gg 1$ , то комплексы ДНК–лиганд демонстрируют высоко- и низкотемпературную денатурацию в сочетании с широким «окном» стабильности двойной спирали ДНК, совпадающим с областью перехода спираль–клубок чистой ДНК (рис.1, кривая 1). В этом случае ключевым моментом является более высокое сродство лигандов к нативной ДНК, чем к денатурированной. При этом высокотемпературная денатурация комплексов ДНК–лиганд существенно сдвигается в область высоких температур по сравнению с чистой ДНК. В то же время при температурах, когда чистая ДНК остается денатурированной, комплексы ДНК–лиганд находятся в нативном состоянии. При понижении температуры комплекс ДНК–лиганд претерпевает «холодовую» денатурацию, в то время как чистая ДНК становится спиральной (рис.1, кривая 2).

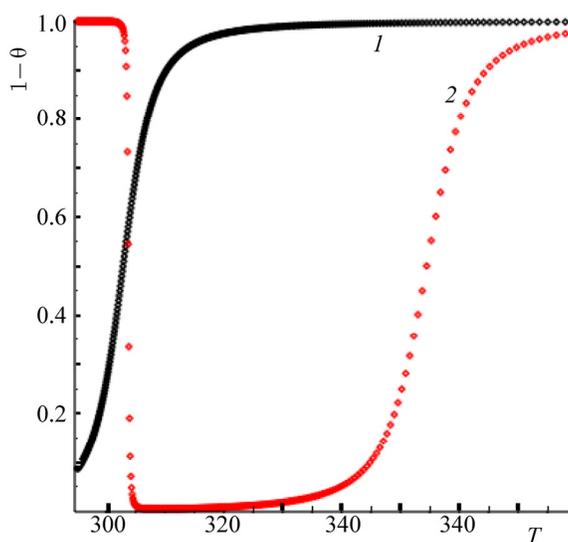


Рис.1. Зависимость степени денатурации  $1 - \theta$  от температуры: 1 – для чистой ДНК, 2 – для комплекса ДНК–лиганд с параметрами связывания  $r'_1 = 2, r''_1 = 2, r'_2 = 4, r''_2 = 4, K'_1 = 2.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}, K''_1 = 10^2 \text{ M}^{-1}, K'_2 = 9.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}, K''_2 = 10^7 \text{ M}^{-1}$ .

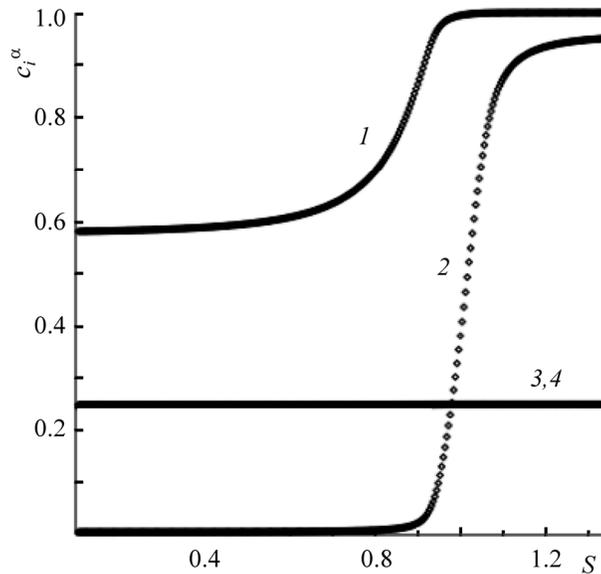


Рис.2. Зависимость концентрации лигандов  $c_i^\alpha$  от параметра роста спирали  $S$ . Кривые 1, 2, 3 и 4 описывают поведение концентраций  $c_1$ ,  $c_1''$ ,  $c_2$  и  $c_2''$ , соответственно. Результаты получены для значений параметров связывания:  $r'_1 = 2$ ,  $r''_1 = 2$ ,  $r'_2 = 4$ ,  $r''_2 = 4$ ,  $K'_1 = 2.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ,  $K''_1 = 10^2 \text{ M}^{-1}$ ,  $K'_2 = 9.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  и  $K''_2 = 10^7 \text{ M}^{-1}$ .

Явление «холодовой» денатурации наблюдалось экспериментально для белков и нуклеиновых кислот [26–29]. Механизм данного явления рассматривался в большом количестве публикаций [25, 26, 28–30]. «Холодовая» денатурация комплексов ДНК–лиганд сопровождается перераспределением лигандов, связанных с расплавленными областями ДНК (рис.2, кривая 3). В то время как концентрация лигандов, связанных с нативными областями  $c_2^\alpha$ , остается постоянной при тепловой и холодной денатурации, концентрация лигандов, связанных с расплавленными участками, резко понижается в области холодной денатурации. Таким образом, стабилизация расплавленной фазы происходит из-за лигандов, связывающихся с денатурированной ДНК.

Корреляционная длина была рассчитана на основании уравнений (3)–(6) и (11). Как видно из рис.3, температурная зависимость корреляционной длины комплекса ДНК–лиганд характеризуется двумя пиками, соответствующими холодной и тепловой денатурации. Высокотемпературный пик при этом сдвинут в сторону высоких температур по сравнению с чистой ДНК. Как следует из соотношений (8) и (12), кооперативность перехода определяется максимальным значением корреляционной длины и является практически одинаковой как для чистой ДНК, так и для комплексов ДНК–лиганд в областях холодной и тепловой денатурации. Температурный интервал тепловой денатурации не отличается от

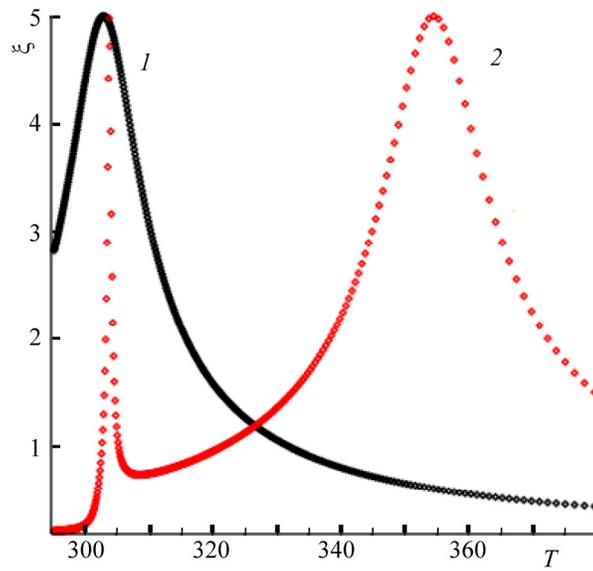


Рис.3. Зависимость корреляционной длины  $\xi$  от температуры: 1 – для чистой ДНК, 2 – для комплекса ДНК–лиганд с параметрами связывания:  $r'_1 = 2$ ,  $r''_1 = 2$ ,  $r'_2 = 4$ ,  $r''_2 = 4$ ,  $K'_1 = 2.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ,  $K''_1 = 10^2 \text{ M}^{-1}$ ,  $K'_2 = 9.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  и  $K''_2 = 10^7 \text{ M}^{-1}$ .

такового для тепловой денатурации чистой ДНК и комплексов ДНК–лиганд. В то же время интервал перехода для холодной денатурации комплексов ДНК–лиганд является существенно более узким. Таким образом, можно утверждать, что интервал перехода не является однозначным показателем кооперативности перехода порядок–беспорядок.

#### 4. Заключение

Рассмотрены флуктуационные эффекты, возникающие при плавлении комплексов ДНК–лиганд. Предполагается, что лиганды связываются с ДНК посредством двух механизмов. Рассчитаны температурные зависимости степени денатурации и корреляционной длины, характеризующие переход порядок–беспорядок. В частности, показано, что максимальное значение корреляционной длины в точке перехода, характеризующее кооперативность тепловой и холодной денатурации, имеющей место для комплексов ДНК–лиганд, не отличается от таковой для тепловой денатурации чистой ДНК. При этом температурный интервал холодной денатурации существенно уже такового для тепловой денатурации как чистой ДНК, так и комплексов ДНК–лиганд, что, в свою очередь, означает, что узость интервала перехода не является однозначной характеристикой кооперативности перехода порядок–беспорядок.

## ЛИТЕРАТУРА

1. **А.А. Веденов, А.М. Дыхне, М.Д. Франк-Каменецкий.** УФН, **105**, 479 (1971).
2. **D. Poland, H.A. Scheraga.** J. Chem. Phys., **45**, 1456 (1966).
3. **D.C. Poland, H.A. Scheraga.** The Theory of Helix–Coil Transition. New York, Academic Press, 1970.
4. **T. Chalikian.** Biopolymers, **70**, 492 (2003).
5. **T. Garel, C. Monthus, H. Orland.** Europhys. Lett., **55**, 138 (2001).
6. **D. Cule, T. Hwa.** Phys. Rev. Lett., **79**, 2375 (1997).
7. **M. Barbi, S. Lepri, M. Peyrard, N. Theodorakopoulos.** Phys. Rev. E, **68**, 061909 (2003).
8. **M. Takano, K. Nagayama, A. Suyama.** J. Chem. Phys., **116**, 2219 (2001).
9. **V. Munoz, L. Serrano.** Biopolymers, **41**, 495 (1997).
10. **R.M. Wartell, A.S. Benight.** Phys. Reports, **126**, 67 (1985).
11. **M.D. Frank-Kamenetskii.** Phys. Reports, **288**, 13 (1997).
12. **N.C. Garbett, P.A. Ragazzon, J.B. Chaires.** Nature Protocols, **2**, 3166 (2007).
13. **Ch. Zimmer, U. Wahnert.** Progress Biophys. Molecul. Biology, **47**, 31 (1986).
14. **S.M. Nelson, L.R. Ferguson, W.A. Denny.** Mutat. Res., **623**, 24 (2007).
15. **D. Reha, M. Kabelac, F. Ryjacek, J. Sponer, J.E. Sponer, M. Elstner, S. Suhai, P. Hobza.** J. American Chem. Soc., **124**, 3366 (2002).
16. **G. Krishnamoorthy, G. Duportail, Y. Mely.** Biochemistry, **41**, 15277 (2002).
17. **B.S. Reddy, S.K. Sharma, J.W. Lown.** Current Medic. Chem., **8**, 475 (2001).
18. **T. Niidome, N. Ohmori, A. Ichinose, A. Wada, H. Mihara, T. Hirayama, H. Aoyagi.** J. Biol. Chem., **272**, 15307 (1996).
19. **A. Larsson, C. Carlsson, M. Jonsson, B. Albinsson.** J. American Chem. Soc., **116**, 8459 (1994).
20. **L.A. Lipscomb, F.X. Zhou, S.R. Presnell, R.J. Woo, M.E. Peek, R.R. Plaskon, L.D. Williams.** Biochemistry, **35**, 2818 (1996).
21. **A.T. Karapetian, N.M. Mehrabian, G.A. Terzikian, P.O. Vardevanian, A.P. Antonian, O.F. Borisova, M. Frank-Kamenetskii.** J. Biomolec. Struct. Dynamics, **14**, 275 (1996).
22. **З.А. Григорян, Е.Ш. Мамасакхлисов, А.Т. Карапетян.** Доклады НАН РА, **114**, 123 (2014).
23. **Sh.A. Hairyan, E.Sh. Mamasakhlirov, V.F. Morozov.** Biopolymers, **35**, 75 (1995).
24. **V.F. Morozov, A.V. Badasyan, A.V. Grigoryan, M.A. Sahakyan, Y.Sh. Mamasakhlirov.** Biopolymers, **75**, 434 (2004).
25. **A. Badasyan, Sh.A. Tonoyan, A. Giacometti, R. Podgornik, V.A. Parsegian, Y.Sh. Mamasakhlirov, V.F. Morozov.** Phys. Rev. E, **89**, 022723 (2014).
26. **D.N. Dubins, A. Lee, R.B. Macgregor Jr., T.V. Chalikian.** J. Am. Chem. Soc., **123**, 9254 (2001).
27. **P.J. Mikulecky, A.L. Feig.** J. Am. Chem. Soc., **124**, 890 (2002).
28. **P.J. Mikulecky, A.L. Feig.** Nucl. Acids Res., **32**, 3967 (2004).
29. **P.L. Privalov.** Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., **25**, 281 (1990).
30. **G.N. Hayrapetyan, F. Iannelli, J. Lekscha, V.F. Morozov, R.R. Netz, Y.Sh. Mamasakhlirov.** Phys. Rev. Lett., **113**, 068101 (2014).

ՖԼՈՒԿՏՈՒԱՑԻՄԱՆԵՐԸ ՏԱՐԲԵՐ ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԻ ԿԻՐԱՌՄԱՄԲ ԱՌԱՋԱՑՈՂ  
ԴՆԹ-ԼԻԳԱՆԴ ՀԱՄԱԼԻԲՆԵՐՈՒՄ ԿԱՐԳ-ԱՆԿԱՐԳԱՎՈՐՎԱԾՈՒԹՅՈՒՆ  
ԱՆՑՈՒՄՆԵՐԻ ԴԵՊՔՈՒՄ

Ե.Շ. ՄԱՄԱՍԱԽԼԻՍՈՎ, Ա.Պ. ԱՆՏՈՆՅԱՆ, Ա.Ե. ՄԱՄԱՍԱԽԼԻՍՈՎ,  
Շ.Ա. ՏՈՆՈՅԱՆ, Պ.Հ. ՎԱՐԴԵՎԱՆՅԱՆ

Տեսականորեն ուսումնասիրված է երկու մեխանիզմներով կապվող ԴՆԹ-լիգանդ համալիրների հալումը: Մտացված արդյունքները նկարագրում են այնպիսի էքսպերիմենտալ դիտվող մեծությունների վարքը, ինչպիսին են դենատուրացիայի աստիճանը և կոռելյացիոն երկարությունը՝ կախված լիգանդի կոնցենտրացիայից: Ցույց է տրված, որ ԴՆԹ-լիգանդ համալիրների համար տեղի ունեցող սառը դենատուրացիան դրսևորում է այնպիսի կոոպերատիվություն, ինչպիսին մաքուր ԴՆԹ-ի ջերմային դենատուրացիան է: Ընդ որում սառը դենատուրացիայի ջերմաստիճանային միջակայքը էապես ավելի նեղ է, քան այդ միջակայքը ինչպես մաքուր ԴՆԹ-ի, այնպես էլ ԴՆԹ-լիգանդ համալիրների ջերմային դենատուրացիայի համար:

FLUCTUATIONS IN ORDER-DISORDER TRANSITIONS  
IN THE DNA-LIGAND COMPLEXES  
WITH VARIOUS BINDING MECHANISMS

Y.SH. MAMASAKHLISOV, A.P. ANTONYAN, A.Y. MAMASAKHLISOV,  
SH.A. TONOVAN, P.H. VARDEVANYAN

The melting of DNA-ligand complex is theoretically considered for the ligands binding with DNA by means of two mechanisms. The obtained results describe the experimentally observed behavior of such quantities as the denaturation degree and the correlation length, depending on the concentration of ligands. It is shown that the heat and cold denaturations of DNA-ligand complexes exhibit the same cooperativity, as the thermal denaturation of pure DNA. At the same time, the temperature range of the cold denaturation significantly narrower than those for the thermal denaturation of a pure DNA and DNA-ligand complexes.