



# Структура и функция биополимеров

ББК 577.323.1

## ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ $B \rightarrow A$ -ПЕРЕХОДА В КОЛЬЦЕВЫХ ДНК \*

Д. В. Шахов, А. В. Вологодский

**Введение.** Сверхспирализация кольцевых ДНК оказывает существенное влияние на конформационные перестройки в этой молекуле, если они сопровождаются изменением закрутки одной нити двойной спирали относительно другой. К таким конформационным изменениям относятся  $B \rightarrow Z$ -переход и образование крестообразных структур. Хотя и  $Z$ -форма, и крестообразные структуры термодинамически невыгодны в линейных ДНК при физиологических условиях, они могут образовываться в кольцевых замкнутых (КЗ) ДНК под действием отрицательной сверхспирализации. Именно это обстоятельство делает возможным участие таких неканонических структур в процессе функционирования ДНК в клетке. Экспериментальное и теоретическое изучение  $B \rightarrow Z$ -перехода и образования крестообразных структур привлекает в настоящее время очень большое внимание исследователей [1--7].

$B \rightarrow A$ -переход отличается от образования крестообразных структур и перехода в  $Z$ -форму тем, что он сопровождается очень небольшими изменениями закрутки одной нити относительно другой в расчете на пару оснований [8, 9]. Поэтому, как показывают простые оценки, никакая сверхспирализация не может вызвать переход ДНК в  $A$ -форму при физиологических условиях. С другой стороны, на  $B \rightarrow A$ -переход сравнительно слабо влияет последовательность оснований [10--11], и этот переход захватывает всю молекулу ДНК. При этом суммарное изменение закрутки одной нити относительно другой может существенно изменить напряжение сверхспирализации ДНК. В этом случае топологические ограничения должны оказать заметное влияние на  $B \rightarrow A$ -переход, происходящий при увеличении концентрации спирта в растворе. Теоретическому рассмотрению этого вопроса и посвящена настоящая работа.

**Теория.** Мы будем рассматривать молекулу ДНК, состоящую из  $N$  одинаковых звеньев. Каждое звено этой молекулы может находиться в одном из двух состояний: в  $B$ - или  $A$ -форме. Свободная энергия перехода звена из  $B$ -формы в  $A$ -форму,  $F_A - F_B$ , определяется соотношением [9]

$$F_A - F_B = (a_0 - a) RT/Q, \quad (1)$$

где  $a_0$  — концентрация спирта, отвечающая середине  $B \rightarrow A$ -перехода в линейной ДНК;  $a$  — концентрация спирта в данных условиях;  $Q$  — коэффициент, характеризующий скорость изменения  $F_A - F_B$  при изменении концентрации спирта;  $R$  — газовая постоянная;  $T$  — абсолютная температура. Считая параметр  $a_0$  одинаковым для всех звеньев, мы тем самым ограничиваемся моделью  $B \rightarrow A$ -перехода в гомополимере. Как показывают

\* Представлена членом редколлегии В. И. Ивановым.

экспериментальные данные, эта модель является хорошим приближением к реальной ситуации [11].

Свободную энергию  $F$  кольцевой замкнутой молекулы можно представить в следующем виде

$$F = N_A F_A + N_B F_B + n F_{AB} - TS + G, \quad (2)$$

где  $N_A$  и  $N_B$  — число звеньев в  $A$ - и  $B$ -формах соответственно;  $n$  — число участков в  $A$ -форме;  $F_{AB}$  — свободная энергия пары границ между  $A$ - и  $B$ -спиралями;  $S$  — энтропия смещения участков в  $A$ - и  $B$ -формах;  $G$  — энергия сверхспирализации. Как показывает комбинаторный анализ, величина  $S$  равна [12]

$$S = R [N_A \ln N_A - 2n \ln n - (N_A - n) \ln (N_A - n) + N_B \ln N_B - (N_B - n) \ln (N_B - n)]. \quad (3)$$

Отметим, что первые четыре члена в (2) представляют собой свободную энергию набора микросостояний линейной ДНК, состоящей из  $N = N_A + N_B$  звеньев, в котором  $N_A$  звеньев находятся в  $A$ -форме и  $N_B$  — в  $B$ -форме. Последний член появляется только в КЗ ДНК и обусловлен топологическими ограничениями, возникающими в этой молекуле [13]. Как известно, энергия сверхспирализации может быть представлена в виде [13]

$$G = gNRT\sigma^2, \quad (4)$$

где  $\sigma$  — плотность сверхвитков в данной молекуле КЗ ДНК, состоящей из  $N$  звеньев;  $g$  — коэффициент жесткости (для  $N > 3000$   $g \approx 10$  [14]).

Формула (4) справедлива в том случае, когда все звенья КЗ ДНК находятся в канонической  $B$ -форме. В том случае, когда  $N_A$  пар оснований переходят в  $A$ -форму, величина  $\sigma$  в формуле (4) должна быть заменена на

$$\sigma + \kappa \frac{N_A}{N},$$

где параметр  $\kappa$  характеризует изменение угла спирального вращения при  $B$ — $A$ -переходе. Он выражается через число пар оснований, приходящихся на виток двойной спирали в  $A$ - и  $B$ -формах,  $\gamma_A$  и  $\gamma_B$  соответственно

$$\kappa = 10 (1/\gamma_B - 1/\gamma_A). \quad (5)$$

Таким образом, выражение для  $G$  приобретает вид

$$G = gRTN \left( \sigma + \kappa \frac{N_A}{N} \right)^2. \quad (6)$$

Выражение (6) справедливо в предположении, что жесткость ДНК не меняется в процессе конформационного перехода. Это предположение, вообще говоря, неверно в случае  $B$ — $A$ -перехода в кольцевой ДНК [15]. Границы между участками, находящимися в  $A$ - и  $B$ -формах, могут играть роль дополнительных шарниров и уменьшать изгибную жесткость двойной спирали. Это, в свою очередь, должно приводить к уменьшению параметра  $g$ . Мы проанализируем в «Приложении» влияние этого обстоятельства на  $B$ — $A$ -переход в КЗ ДНК, а пока будем считать коэффициент  $g$  постоянным, не зависящим от степени перехода. Как будет показано в «Приложении», учет зависимости параметра  $g$  от степени  $B$ — $A$ -перехода не меняет существенным образом получаемых результатов.

В равновесном состоянии свободная энергия молекулы КЗ ДНК минимальна, следовательно, величины  $N_A$ ,  $N_B$ ,  $n$  могут быть определены, исходя из условий минимума функции  $F$  (см. (2)). Эти условия имеют вид:

$$\left( \frac{dE}{dn} \right)_{N, N_A} = 0; \quad (7)$$

$$\left( \frac{dF}{dN_A} \right)_{n, N} = 0. \quad (8)$$

Условие (7) приводит к уравнению

$$\left( \frac{N_A}{n} - 1 \right) \left( \frac{N_B}{n} - 1 \right) = 1/\sigma_0, \quad (9)$$

где  $\sigma_0 = \exp\left(-\frac{F_{AB}}{RT}\right)$  — фактор кооперативности, а условие (8) дает уравнение

$$\frac{1 - n/N_B}{1 - n/N_A} = s \cdot \exp(20\kappa\sigma + 20\kappa^2\theta), \quad (10)$$

где  $s = \exp\left(\frac{F_A - F_B}{RT}\right)$  — константа равновесия для перехода одного звена из состояния  $B$  в состояние  $A$ ;  $\theta = \frac{N_A}{N}$  — степень  $B \rightarrow A$ -перехода. Исключая из (9) и (10)  $n$ , получаем следующее уравнение:

$$\frac{2\theta - 1}{\sqrt{\theta(1-\theta)}} = \frac{1}{\sqrt{\sigma_0}} \frac{1 - s \cdot \exp(20\kappa\sigma + 20\kappa^2\theta)}{\sqrt{s} \cdot \exp(10\kappa\sigma + 10\kappa^2\theta)}. \quad (11)$$

Это уравнение дает решение рассматриваемой задачи. Зависимость степени  $B \rightarrow A$ -перехода от концентрации спирта  $a$ , которая входит в (11) через параметр  $s = \exp\left(\frac{a_0 - a}{Q}\right)$ , может быть получена путем численного решения уравнения (11). Удобнее, однако, решать это уравнение аналитически относительно величины  $a$ , рассматривая степень перехода  $\theta$  в качестве параметра.

**Результаты и их обсуждение.** Рассмотрим прежде всего вопрос о том, как влияет сверхспирализация на точку полуперехода  $a_{1/2}$  КЗ ДНК из  $B$ - в  $A$ -форму. Подстановка в уравнение (11) значения  $\sigma = 0,5$  приводит к следующему соотношению

$$\frac{a_0 - a_{1/2}}{Q} + 20\kappa\sigma + 10\kappa^2 = 0. \quad (12)$$

Параметр  $Q$ , входящий в уравнение (12), был определен в работах [9, 11] и равен  $\approx 20$ . Значение параметра  $\kappa$ , характеризующего изменение угла спирального вращения при  $B \rightarrow A$ -переходе, до сих пор неизвестно. Для  $B$ -формы ДНК, находящейся в водном растворе, средний угол спирального вращения определен в настоящее время с высокой точностью [14]. Этот угол отвечает параметру  $\gamma_B = 10,5$ . При увеличении концентрации спирта в растворе от 0 до 30% угол спирального вращения ДНК в  $B$ -форме несколько уменьшается [16], а его значение в области  $B \rightarrow A$ -перехода неизвестно. Для  $A$ -формы ДНК существуют лишь рентгеноструктурные данные, полученные для волокон [8]. Согласно этим данным  $\gamma_A = 11$ . Если принять приведенные выше значения  $\gamma_B$  и  $\gamma_A$  для области  $B \rightarrow A$ -перехода, получим  $\kappa = 0,0435$ . Можно ожидать, что истинное значение  $\kappa$  по модулю не превышает 0,1. В дальнейшем будем рассматривать величину  $\kappa$  в качестве неизвестного параметра.

На рис. 1. представлена зависимость величины  $a_0 - a_{1/2}$  от параметра  $\kappa$  для КЗ ДНК с различной плотностью сверхвитков, отвечающая уравнению (12). Видно, что сдвиг  $B \rightarrow A$ -перехода в КЗ ДНК по сравнению с линейной двойной спиралью не может превышать некоторого максимального для заданной плотности сверхвитков значения. Это связано с тем, что при большом положительном  $\kappa$  все напряжение сверхспирализации будет сниматься задолго до окончания  $B \rightarrow A$ -перехода, и в дальнейшем топологические ограничения будут препятствовать завершению перехода.

Наряду со сдвигом точки перехода топологические ограничения приводят к увеличению ширины перехода  $\Delta a = 1/\left.\frac{d\theta}{da}\right|_{\theta=\frac{1}{2}}$ . Связь между величиной  $\Delta a$  и параметрами перехода может быть найдена из уравнения (11) путем его дифференцирования по  $a$ . Полученное выражение имеет вид

$$\Delta a = 4Q \sqrt{\sigma_0} + 20\kappa^2 Q. \quad (13)$$

Мы видим прежде всего, что ширина перехода не зависит от значения плотности сверхвитков в КЗ ДНК, а определяется лишь величиной  $\kappa$ . Однако само существование топологических ограничений заметным образом увеличивает ширину перехода. Так, при  $\sigma_0 = 2,5 \cdot 10^{-3}$  (значение этого параметра также было определено в работе [9]) ширина В—А-перехода в КЗ ДНК вдвое превышает ширину перехода в линейной двойной спирали при  $\kappa = 0,1$ .

На рис. 2 приведены полные кривые В—А-перехода в КЗ ДНК, рассчитанные по уравнению (11) для двух значений плотности сверхвитков. Параметр  $\kappa$  для этих кривых выбран равным 0,0435. Как следует из уравнения (11), форма этих кривых не зависит от значения  $\sigma$ , однако при увеличении отрицательной сверхспирализации кривые перехода сдвигаются в область более низких concentra-

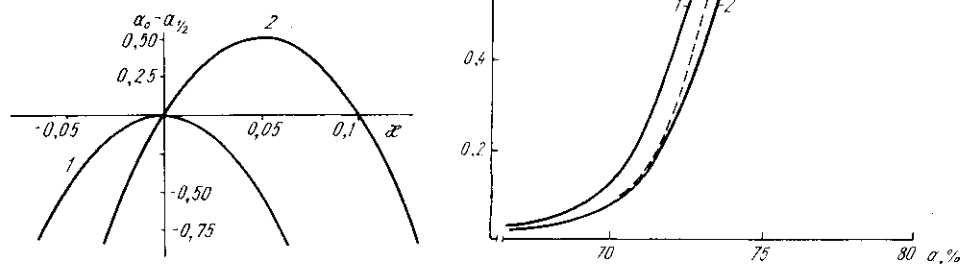


Рис. 1. Зависимость сдвига точки В—А-перехода в КЗ ДНК по сравнению с линейной формой от параметра  $\kappa$ : 1 —  $\sigma = 0$ ; 2 —  $\sigma = -0,05$ .

Fig. 1. Dependence of the shift of the difference in the B-A transition point of closed circular and linear DNA molecules on the  $\kappa$  value: 1 —  $\sigma = 0$ ; 2 —  $\sigma = -0,05$ .

Рис. 2. Зависимость степени В—А-перехода от концентрации спирта для КЗ ДНК с различной плотностью сверхвитков: 1 —  $\sigma = -0,05$ ; 2 —  $\sigma = 0$ . Расчет проводили для  $\kappa = 0,0435$ . Пунктирная кривая отвечает В—А-переходу в линейной ДНК. Сдвиг середины перехода для кривой 1 относительно кривой 2 составляет 0,87 %.

Fig. 2. Theoretical dependence of the B-A transition degree on the alcohol concentration for cc DNA with different superhelical density: 1 —  $\sigma = -0,05$ , 2 —  $\sigma = 0$ . The  $\kappa$  value was 0,0435. The dashed curve corresponds to the linear DNA. The shift of the transition point for curve 1 with respect to curve 2 is 0,87 %.

ций спирта. На этом же рисунке для сравнения приведена кривая В—А-перехода в линейной ДНК. Мы видим, что она лежит между кривыми перехода в КЗ ДНК с  $\sigma = 0$  и  $\sigma = -0,05$ . Таким образом, наибольшие различия в кривых перехода можно наблюдать не между линейной и КЗ ДНК, а между двумя кольцевыми ДНК с максимально различающейся плотностью сверхвитков. Сдвиг между точками В—А-перехода в двух КЗ ДНК с плотностью сверхвитков  $\sigma^{(1)}$  и  $\sigma^{(2)}$  может быть найден из соотношения (12)

$$a_{1/2}^{(1)} - a_{1/2}^{(2)} = 20Q\kappa(\sigma^{(1)} - \sigma^{(2)}). \quad (14)$$

Проведенный теоретический анализ В—А-перехода в КЗ ДНК показывает, что хотя топологические ограничения в этой форме ДНК не меняют радикальным образом рассматриваемый конформационный переход, они могут вносить вполне заметные изменения в регистрируемые на опыте кривые перехода. Количественный анализ этих изменений может позволить определить важный структурный параметр В—А-перехода в ДНК,  $\kappa$ , характеризующий различие в угле спирального вращения между В- и А-формами двойной спирали. Наиболее точное определение этого параметра возможно из сравнения кривых В—А-перехода в кольцевых ДНК с максимально различающейся плотностью сверхвитков.

В настоящее время имеются всего две работы [10, 18], где исследовали В—А-переход в КЗ ДНК. В работе [18] В—А-переход регистрировали по изменению спектров КД. К сожалению, точность из-

мерения кривой перехода в этой работе совершенно недостаточна для обнаружения эффектов, о которых шла речь выше. В работе [10] переход регистрировали по изменению подвижности ДНК в геле в интервале перехода. В этой работе обнаружен сдвиг перехода по концентрации спирта в КЗ ДНК по сравнению с открытыми кольцевыми молекулами. Полученные данные, однако, свидетельствуют о двухфазности перехода, которую никогда не наблюдали при других методах регистрации В—А-перехода. Поэтому мы считаем количественный анализ этих экспериментов преждевременным.

**Приложение.** Образование границ между участками в А- и В-формах двойной спирали может приводить к изменению изгибной жесткости ДНК. Такое явление наблюдалось экспериментально в работе [15]. Это обстоятельство может приводить, в свою очередь, к уменьшению энергии сверхспирализации КЗ ДНК в области перехода. Ниже мы проведем оценку возможного влияния этого эффекта на В—А-переход в КЗ ДНК.

Как известно [13], энергия сверхспирализации складывается из энергии торсионных и изгибных деформаций двойной спирали. Недавно было показано [17], что основную роль в структурной реализации сверхвитков играет изгибная деформация оси ДНК. Поэтому можно считать, в первом приближении, что коэффициент  $g$  в формуле (6) пропорционален изгибной жесткости ДНК, определяемой значением ее статистического сегмента  $b$ . При возникновении дополнительных шарниров в местах границ между В- и А-формами значение статистического сегмента можно представить в виде

$$b = 1 / \left( \frac{1}{b_0} + \frac{n}{N} \alpha \right) = \frac{b_0}{1 + \frac{b_0 n}{N} \alpha}, \quad (\text{П1})$$

где  $\alpha$  — параметр, характеризующий эффективность каждого стыка;  $b_0$  — значение статистического сегмента в регулярной двойной спирали, находящейся в А- или В-форме. Таким образом, энергию сверхспирализации можно представить в виде

$$G = \frac{g}{1 + \frac{b_0 n}{N} \alpha} RTN \left( \sigma + \kappa \frac{N_A}{N} \right)^2. \quad (\text{П2})$$

Отметим, что при  $\alpha=0$  формула (П2) переходит в (6).

Мы провели расчеты для нашей исходной модели с использованием выражения (П2) вместо формулы (6). В этом случае уравнения, получаемые из условий (7), (8), не могут быть решены аналитически, и для анализа рассматриваемого эффекта мы использовали численные решения соответствующих уравнений на ЭВМ. Как показали результаты расчетов, кривые В—А-перехода в КЗ ДНК, полученные с использованием (П2), мало меняются по сравнению с исходными, рассчитанными без учета образования шарниров в стыках А- и В-форм. Так, при  $\kappa=0,0435$  кривая В—А-перехода сдвигается в сторону более высоких концентраций спирта всего на 0,4 % даже при  $\alpha=0,5$ . В то же время, согласно оценкам, полученным в работе [15], значение параметра  $\alpha$  близко к 0,02. Такое значение этого параметра вообще не приводит к сколько-нибудь заметным эффектам.

Авторы выражают благодарность М. Д. Франк-Каменецкому, В. И. Иванову, Ю. С. Лазуркину за полезные обсуждения и советы.

#### A THEORETICAL STUDY OF THE B-A TRANSITION IN SUPERHELICAL DNA

*D. V. Pakhomov, A. V. Vologodskii*

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

#### Summary

The influence of DNA superhelicity on the alcohol-induced B-A transition in the solution is theoretically studied. Simple equations are obtained for the B-A transition point in circular DNA and for the width of transition curve. The theoretical predictions radically depend on the  $\alpha$  parameter which characterizes the change in DNA winding angle as a re-

sult of the B-A transition. The shift of the transition point in circular DNA as compared with linear molecule depends also on the superhelical density. The shift of the transition point cannot exceed some limiting value. The possibilities to determine the  $\alpha$  value on the basis of dependence of the B-A transition curve on the superhelical density in circular DNA are discussed.

1. Lilley D. M. J. The inverted repeat as a recognizable structural feature in supercoiled DNA molecules // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1980.—77, N 11. — P. 6468—6472.
2. Panayotatos N., Wells R. D. Cruciform structures in supercoiled DNA // Nature. — 1981.—289, N 5797. — P. 466—470.
3. Wang J. C., Peck L. J., Becherer K. DNA supercoiled and its effects on DNA structure and function // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. — 1982.—47. — P. 85—91.
4. Peck L. J., Wang J. C. The energetics of B to Z transition in DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1983.—80, N 20. — P. 6206—6210.
5. Panyutin I., Lyamichev V., Mirkin S. A structural transition in d(AT) d(AT) inserts within superhelical DNA // J. Biomol. Struct. and Dynam. — 1985.—2, N 6. — P. 1221—1234.
6. Vologodskii A. V., Frank-Kamenetskii M. D. Theoretical study of cruciform states in superhelical DNA // FEBS Lett. — 1982.—143, N 2. — P. 257—260.
7. Frank-Kamenetskii M. D., Vologodskii A. V. Thermodynamics of B-Z transition in superhelical DNA // Nature. — 1984.—307, N 5950. — P. 481—482.
8. The molecular configuration of deoxyribonucleic acid. IV. X-ray diffraction study of the A-form / W. Fuller, M. H. F. Wilkins, H. R. Wilson et al. // J. Mol. Biol. — 1965.—12, N 1. — P. 60—80.
9. The B to A transition of DNA in solution / V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, E. E. Minyat et al. // Ibid. — 1974.—87, N 3. — P. 817—833.
10. Shlyakhtenko L. S. A study of B-A transition in DNA by gel electrophoresis // J. Biomol. Struct. and Dynam. — 1984.—1, N 6. — P. 1511—1516.
11. B — A transition in DNA / V. I. Ivanov, D. Y. Krylov, E. E. Minyat, L. E. Minchenkova // Ibid. — 1983.—1, N 2. — P. 453—460.
12. Веденов А. А., Дыхне А. М., Франк-Каменецкий М. Д. Переход спираль — клубок в ДНК // Успехи физ. наук. — 1971.—105, № 2. — С. 479—519.
13. Франк-Каменецкий М. Д., Вологодский А. В. Топологические аспекты физики полимеров: теория и ее биофизические приложения // Там же. — 1981.—134, № 4. — С. 641—673.
14. Horowitz D. S., Wang J. C. Torsional rigidity of DNA and length dependence of the free energy of DNA supercoiling // J. Mol. Biol. — 1984.—173, N 1. — P. 75—91.
15. On the flexibility of the boundaries between the A-form and B-form sections in DNA molecule / S. K. Zavriev, L. E. Minchenkova, M. D. Frank-Kamenetskii, V. I. Ivanov // Nucl. Acids Res. — 1978.—5, N 7. — P. 2657—2670.
16. Lee C.-H., Mizusawa H., Kakefuda T. Unwinding of double-stranded DNA helix by dehydration // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1981.—78, N 5. — P. 2838—2842.
17. Torsional and bending rigidity of double helix from data on small DNA rings / M. D. Frank-Kamenetskii, A. V. Lukashin, V. V. Anshelevich, A. V. Vologodskii // J. Biomol. Struct. and Dynam. — 1985.—2, N 5. — P. 1005—1012.
18. Gray D. M., Taylor T. N., Lang D. Dehydrated circular DNA: circular dichroism of molecules in ethanolic solutions // Biopolymers. — 1978.—17, N 1. — P. 145—166.

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва

Получено 10.12.85