

1. Kunz I. D., Kauzmann W. Hydration of proteins and polypeptides // *Adv. Protein Chem.*—1974.—28.— P. 239—346.
2. Финкельштейн А. В. Стереохимический анализ вторичной структуры полипептидной цепи при помощи пространственных моделей Курто. I. Разрешенные конформации дипептидов // *Молекуляр. биология.*—1976.—10, № 3.— С. 507—513.
3. Hodes Z. I., Nemethy G., Scheraga H. A. Model for the conformational analysis of hydrated peptides. Effect of hydration on the conformational stability of the terminally blocked residues of the 20 naturally occurring amino acids // *Biopolymers.*—1979.—18, N 7.— P. 1565—1610.
4. Rossky P. J., Karplus M. A model for the simulation of an aqueous dipeptide solution // *Ibid.*— N 4.— P. 825—854.
5. Lee B., Richards F. M. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility // *J. Mol. Biol.*—1971.—55, N 3.— P. 379—400.
6. Eisenberg D., Kauzmann W. The structure and properties of water.— London: Oxford Univ. press, 1969.—296 p.
7. Drost-Hansen W. Structure and properties of water at biological interfaces.— New York: Acad. press, 1971.—184 p.
8. Water structure in a protein crystal: rubredoxin at 1,2 Å resolution / K. D. Watenpaugh, T. N. Margulis, L. C. Sieker, L. H. Jensen // *J. Mol. Biol.*—1978.—122, N 2.— P. 175—190.
9. Sakabe N., Sakabe K., Sasaki K. Hydrogen atoms and hydrogen bonding in rhombohedral 2 Zn insulin crystals by X-ray analysis at 1,2 Å resolution // *Structural studies on molecules of biological interest.*— Oxford: Clarendon press, 1981.— P. 509—526.
10. Blake C. C. F., Pulford W. C. A., Artymiuk P. J. X-ray studies of water in crystals of lysozyme // *J. Mol. Biol.*—1983.—167, N 3.— P. 693—723.
11. Чиргадзе Ю. Н., Шеголева Т. Ю. Гидратация полипептидной цепи рубредоксина по данным пространственной структуры // *Молекуляр. биология.*—1984.—18, № 4.— С. 994—1000.
12. Ramachandran G. N. Conformation of polypeptides and proteins // *Peptides, polypeptides and proteins.*— New York: Wiley Interscience, 1974.— P. 14—34.
13. Алексанян В. И., Скворцов А. М. Расчет регулярной β -структуры полипептидов и свобода внутреннего вращения в плоской антипараллельной β -структуре // *Молекуляр. биология.*—1974.—8, № 2.— С. 182—189.
14. Raghavendra K., Sasisekharan V. Conformational analysis of the right-hand twisted antiparallel β -structure // *Int. J. Peptide and Protein Res.*—1979.—14, N 4.— P. 326—338.
15. Structure of β -sheets. Origin of the right-handed twist and of the increased stability of antiparallel over parallel sheets / K.-C. Chou, M. Pottle, G. Nemethy et al. // *J. Mol. Biol.*—1982.—162, N 1.— P. 89—112.
16. Nishikawa K., Scheraga H. A. Geometrical criteria for formation of coiled-coil structures of polypeptide chains // *Macromolecules.*—1976.—9, N 3.— P. 395—407.
17. Salemme F. R., Weatherford D. W. Conformational and geometrical properties of β -sheets in proteins. 1. Parallel β -sheets // *J. Mol. Biol.*—1981.—146, N 1.— P. 101—117.
18. Salemme F. R., Weatherford D. W. Conformational and geometrical properties of β -sheets in proteins. 2. Antiparallel and mixed β -sheets // *Ibid.*— P. 119—141.
19. Chothia C. Coiling of β -pleated sheets // *Ibid.*—1983.—163, N 1.— P. 107—117.

Ин-т белка АН СССР, Пушкино

Получено 27.08.86

УДК 577.323.5

ВЛИЯНИЕ ОБЪЕМНЫХ ЭФФЕКТОВ НА ТОПОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОЛЬЦЕВЫХ ДНК *

К. В. Кленин, А. В. Вологодский, В. В. Аншелевич,
А. М. Дыхне, М. Д. Франк-Каменецкий

Введение. Для описания статистических свойств двунитевых молекул ДНК часто используется модель бесконечно тонкой полимерной цепи. Долгое время такая модель представлялась достаточно хорошим приближением, по крайней мере в условиях высокой ионной силы раствора, поскольку длина статистического сегмента двойной спирали ДНК почти на два порядка превышает ее геометрический диаметр. Однако высокая линейная плотность отрицательных зарядов на ДНК

* Представлена членом редколлегии В. И. Ивановым.

может приводить к значительному электростатическому отталкиванию цепей в растворах низкой и даже умеренной ионной силы. Это должно вызывать появление значительных объемных эффектов, сказывающихся на статистических характеристиках двунитевой ДНК.

В последнее время появились количественные экспериментальные и теоретические данные [1—3], свидетельствующие о том, что в условиях низкой и умеренной ионной силы эффективный диаметр двойной спирали значительно превышает ее геометрический диаметр. Так, согласно данным работ [1—3], эффективный диаметр двойной спирали при $0,01 \text{ M Na}^+$ составляет около 20 нм, что лишь в 5 раз меньше длины статистического сегмента ДНК. В то же время при концентрации Na^+ выше $0,01 \text{ M}$ длина статистического сегмента двойной спирали практически не меняется [4].

Ранее предпринимались попытки учета влияния объемных эффектов на среднестатистический размер клубков линейных молекул ДНК и зависящие от него экспериментально наблюдаемые характеристики (см., например, [5—10]).

Настоящая работа посвящена теоретическому анализу влияния объемных эффектов на топологические характеристики кольцевых молекул ДНК. Изучению топологических свойств кольцевых ДНК уделялось в последнее время большое внимание как теоретиками [11—15], так и экспериментаторами [16—20]. Это связано с тем, что кольцевая форма ДНК является основной при функционировании этой молекулы в клетке, а для замкнутых полимерных цепей топология становится определяющим фактором.

До сих пор зависимость топологических свойств замкнутых цепей от величины объемных эффектов исследовалась лишь в работе Лебре [12]. Так же, как и Лебре, мы изучали влияние объемных эффектов на вероятность образования узлов при случайном замыкании цепи, на дисперсию райзинга и коэффициент набухания замкнутых незаузленных цепей. Однако в отличие от работы [12] мы получили значительно более резкую зависимость этих параметров от величины эффективного диаметра цепи.

Методы расчета. Все расчеты в настоящей работе проводили методом Монте-Карло.

Молекулу ДНК моделировали свободносочлененной замкнутой цепью, состоящей из n звеньев единичной длины ($l=1$). Одно звено соответствует статистическому сегменту ДНК, равному 100 нм [4, 15]. Для построения цепи использовали следующий алгоритм.

С помощью генератора случайных чисел получили набор, состоящий из четного числа n единичных векторов e_i , причем векторы с нечетными номерами были ориентированы случайно и независимо, а для четных i выполнялось соотношение: $e_i = -e_{i-1}$.

Таким образом, $\sum_{i=1}^n e_i = 0$. Далее с целью устранения попарных корреляций между векторами для каждого e_i случайно выбирали вектор e_j из имеющегося набора, и пару векторов e_i и e_j поворачивали на случайный угол вокруг биссектрисы угла между ними

(при этом сумма $e_i + e_j$ не изменялась, и, следовательно, общая сумма векторов оставалась равной нулю). Из полученного нового набора в случайном порядке выстраивали

цепь, замкнутость которой была обусловлена сохранением равенства $\sum_{i=1}^n e_i = 0$.

Мы считали, что сегменты взаимодействуют между собой как непроницаемые цилиндры диаметра d .

Коэффициент набухания $\alpha^2 = \langle S^2 \rangle / \langle S^2 \rangle_0$ (где $\langle S^2 \rangle$ — средний квадрат радиуса инерции, а $\langle S^2 \rangle_0$ — значение этой величины в отсутствие объемных эффектов), дисперсию райзинга $\langle Wr^2 \rangle$ и вероятность образования узлов при случайном замыкании цепи p определяли при $n=14, 20$ и 30 для значений d , расположенных в интервале от 0 до 0,2 (в единицах длины сегмента l).

Для заданной длины цепи n мы генерировали выборку, содержащую не менее 15000 случайных цепей, по которой определяли искомые характеристики в отсутствие

объемных эффектов ($d=0$). Прежде всего, каждую цепь проверяли на заузленность. Процедура такой проверки, основанная на вычислении полиномов Александра, подробно описана в обзоре [21]. Если цепь оказывалась незаузленной, определяли для нее квадрат радиуса инерции

$$S^2 = \frac{1}{n^2} \sum_{i>j} (r_i - r_j)^2 \quad (1)$$

и райзинг

$$Wr = \frac{1}{4\pi} \oint \oint \frac{[ds_1, ds_2] (s_2 - s_1)}{[s_1 - s_2]^3}, \quad (2)$$

где r_i — концы сегментов, а s_1 и s_2 пробегает вдоль цепи. Как отмечалось в работе [11], интеграл формулы (2) разбивается на сумму интегралов по парам прямолинейных сегментов, вычисляемых аналитически.

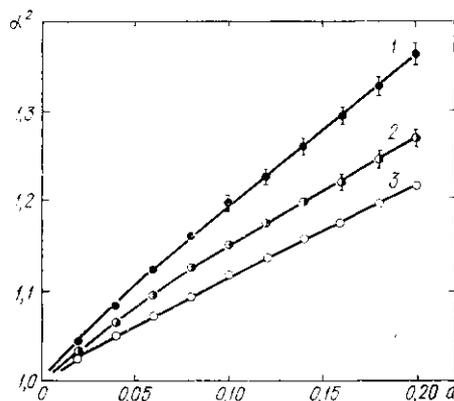
Искомые характеристики в случае $d>0$ определяли аналогичным образом, принимая в расчет только те цепи из исходной выборки, у которых минимальное расстояние между несмежными сегментами превосходило заданное значение d .

Результаты расчетов. На рис. 1 представлены результаты расчетов коэффициента набухания α^2 в зависимости от диаметра сегмента d . Эти результаты паходятся в качественном согласии с данными для линейных цепей с исключенным объемом [5—7, 9, 10]. Отметим, что полученная нами зависимость α^2 от d радикально отличается от той, которую дает интерполяционная формула, предложенная Лебре [12].

Вероятность образования узла при случайном замыкании цепи p

Рис. 1. Зависимость коэффициента набухания α^2 от диаметра сегмента d для замкнутых цепей длиной 30 (1), 20 (2) и 14 (3) сегментов

Fig. 1. Dependence of the squared expansion factor α^2 on the segment diameter d for closed chains comprising 30 (1), 20 (2) and 14 (3) segments



является одной из важнейших топологических характеристик полимерных цепей. Величина p впервые рассчитана в работе [22], где был развит подход, в дальнейшем использовавшийся целым рядом авторов [12, 23—25]. Полученные ими результаты паходятся в количественном согласии с данными работы [22]. Во всех этих работах, за исключением [12], рассматривались бесконечно тонкие полимерные цепи.

В настоящей работе исследовали зависимость величины p от диаметра сегмента d . Эта зависимость представлена на рис. 2. Мы не анализировали типов образующихся узлов, однако можно утверждать, что основная их масса принадлежит к трилистникам (тип 3₁). Как показано в работах [22, 24], для бесконечно тонких цепей, не превышающих по длине 30 сегментов, практически все узлы относятся к этому типу. Зависимость p от d удовлетворительно аппроксимируется формулой

$$p = p_0 e^{-\gamma d}, \quad (3)$$

где γ не зависит от длины цепи и равно 27 ± 2 . Формула (3) была впервые предложена Лебре [12], однако найденное им значение γ примерно в два раза меньше. Как видно из рис. 2, вероятность образования узла очень резко падает с увеличением эффективного диаметра цепи.

Величина дисперсии райзинга $\langle Wr^2 \rangle$, вычисленная для множества незаузленных замкнутых цепей, имеет важное значение для анализа конформационных характеристик двойной спирали ДНК [21, 26, 27]. В первом приближении райзинг Wr характеризует хиральность кон-

формации кольцевой молекулы. Ранее величину $\langle Wr^2 \rangle$ рассчитывали для бесконечно тонких полимерных цепей [11, 12, 24]. В работе [12] впервые было рассмотрено влияние объемных эффектов на дисперсию райзинга замкнутых цепей.

Полученные нами данные по зависимости величины $\langle Wr^2 \rangle$ от диаметра сегмента d представлены на рис. 3. Оказалось, что эта зависимость может быть хорошо аппроксимирована формулой

$$\langle Wr^2 \rangle = \langle Wr^2 \rangle_0 / (1 + cd), \quad (4)$$

где c не зависит от длины цепи и равно $6,4 \pm 0,1$. Заметим, что полученная нами зависимость является значительно более резкой по сравнению с данными Лебре [12].

Обсуждение результатов. Как было показано в экспериментальных [1, 2] и теоретической [3] работах, при понижении ионной силы рас-

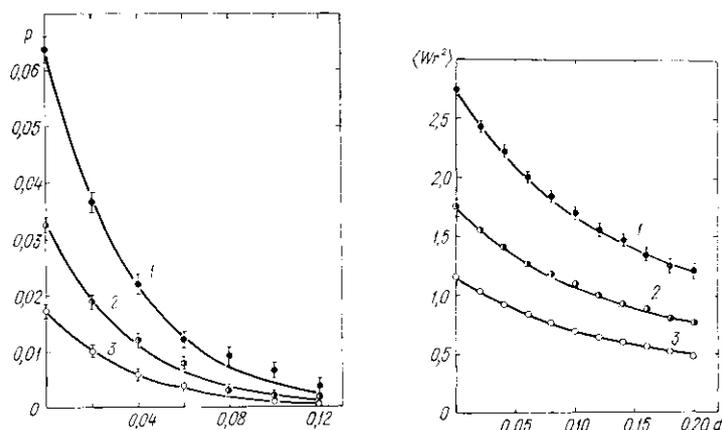


Рис. 2. Зависимость вероятности p образования заузленной цепи при ее случайном замыкании от диаметра сегмента d для цепей длиной 30 (1), 20 (2) и 14 (3) сегментов. Кривые отвечают интерполяционной формуле (3)

Fig. 2. Dependence of probability p of the formation of a knotted chain on the segment diameter d for chains comprising 30 (1), 20 (2) and 14 (3) segments. The curves correspond to Eq. (3)

Рис. 3. Зависимость дисперсии райзинга $\langle Wr^2 \rangle$ от диаметра сегмента d для замкнутых цепей длиной 30 (1), 20 (2) и 14 (3) сегментов. Кривые отвечают интерполяционной формуле (4)

Fig. 3. Dependence of the variance of the writhing number $\langle Wr^2 \rangle$ on segment diameter d for closed chains comprising 30 (1), 20 (2) and 14 (3) segments. The curves correspond to Eq. (4)

творя эффективный диаметр ДНК резко возрастает и при концентрации Na^+ , равной 0,01 М, составляет ≈ 20 нм. Этот очень важный вывод, однако, нуждается в более прямой проверке. Такая проверка становится возможной благодаря полученным нами результатам, показывающим, что топологические характеристики кольцевых ДНК должны очень сильно зависеть от эффективного диаметра. Так, при его изменении от 2 до 10 нм вероятность образования узла при случайной циклизации цепей в растворе падает почти в 10 раз (рис. 2). Экспериментальные методы для исследования этой характеристики в настоящее время хорошо разработаны [28].

Особый интерес представляет зависимость дисперсии райзинга $\langle Wr^2 \rangle$ от эффективного диаметра, поскольку величина $\langle Wr^2 \rangle$ непосредственно связана с энергией сверхспирализации G кольцевой замкнутой ДНК.

Энергию сверхспирализации можно представить в виде [16, 17, 20]:

$$G = KRT (\Delta Lk)^2, \quad (5)$$

где

$$(2K)^{-1} = \langle (\Delta Lk)^2 \rangle = \langle (Wr)^2 \rangle + \langle (\Delta Tw)^2 \rangle. \quad (6)$$

Здесь Lk — порядок зацепления, $T\omega$ — осевая закрутка, а символ Δ означает отклонение соответствующей величины от ее равновесного значения. Как показано в работе [15], относительный вклад $\langle(\Delta T\omega)^2\rangle$ в $\langle(\Delta Lk)^2\rangle$ составляет не более 30% для молекул ДНК, состоящих более чем из 2500 пар оснований. Поэтому энергия сверхспирализации в значительной степени определяется величиной дисперсии райзинга $\langle(Wr)^2\rangle$.

Из результатов работ [1—3], в которых исследовалась зависимость эффективного диаметра двойной спирали от ионной силы, и полученных нами данных следует, что при уменьшении концентрации Na^+ от 0,2 до 0,01 М значение коэффициента K должно увеличиваться примерно в 1,5 раза.

Точное выражение для энергии сверхспирализации играет очень важную роль при изучении образования неканонических структур в кольцевых замкнутых ДНК (см., например, [29—31]). Как показывают экспериментальные данные, плотность сверхвитков в кольцевых ДНК, при которой происходит образование крестообразных структур и участков в левоспиральной Z-форме, падает с уменьшением ионной силы [32—34]. Хотя этот факт находится в качественном согласии с предсказываемой нами зависимостью константы K от ионной силы, он может быть связан и с другими причинами, а именно, с изменением термодинамических параметров самих этих структур при уменьшении концентрации Na^+ в растворе. Окончательное выяснение этого вопроса требует прямых измерений зависимости энергии сверхспирализации от ионной силы.

TOPOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CIRCULAR DNA: EXCLUDED VOLUME EFFECTS

*K. V. Klenin, A. V. Vologodskii, V. V. Anshelevich, A. M. Dykhne,
M. D. Frank-Kamenetskii*

Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow
I. V. Kurchatov Institute of Atomic Energy, Moscow

Summary

The Monte Carlo method is used to calculate the probability p of knots formation, the variance of the writhing number $\langle Wr^2 \rangle$ and the expansion factor α for a closed polymer chain as a function of its effective diameter d . The results are presented in a form of simple interpolation equations and applied for DNA. The dependence of DNA superhelix energy on its effective diameter is evaluated. Theory predicts significant dependence of the superhelix energy on ionic strength.

1. Brian A. A., Frish H. L., Lerman L. S. Thermodynamics and equilibrium sedimentation analysis of the close approach of DNA molecules and a molecular ordering transition // *Biopolymers*.—1981.—20, N 6.—P. 1305—1328.
2. Yarmola E. G., Zarudnaya M. I., Lazurkin Yu. S. Osmotic pressure of DNA solutions and effective diameter of the double helix // *J. Biomol. Struct. Dynam.*—1985.—2, N 5.—P. 981—993.
3. Stigter D. Interactions of the highly charged colloidal cylinders with applications to double-stranded DNA // *Biopolymers*.—1977.—16, N 7.—P. 1435—1448.
4. Hagerman P. J. Investigation of the flexibility of DNA using transient electric birefringence // *Ibid.*—1981.—20, N 7.—P. 1503—1535.
5. Kirste R. G. Radius of gyration of stiff chain molecules as a function of the chain length and the interactions with the solvent // *Discuss. Faraday Soc.*—1970.—49.—P. 51—59.
6. Yamakawa H., Stockmayer W. H. Statistical mechanics of wormlike chains. II. Excluded volume effects // *J. Chem. Phys.*—1972.—57, N 7.—P. 2843—2854.
7. Webman I., Lebowitz J. L., Kalos M. H. Excluded-volume expansion of polymer chains: a Monte Carlo study of the scaling properties // *Phys. Rev. B.—Solid State.*—1980.—21, N 12.—P. 5540—5543.
8. Расчет характеристической вязкости синтетических и биологических полиэлектролитов различной жесткости / С. В. Слонцкий, Э. В. Фрисман, А. К. Валеев, А. М. Ельяшевич // *Молекуляр. биология*.—1980.—14, № 3.—С. 484—495.
9. Manning G. S. A procedure for extracting persistence lengths from light-scattering data on intermediate molecular weight DNA // *Biopolymers*.—1981.—20, N 8.—P. 1751—1755.

10. Post C. B. Excluded volume of an intermediate-molecular-weight DNA. A Monte Carlo analysis // *Ibid.*—1983.—22, N 4.— P. 1087—1096.
11. Statistical mechanics of supercoils and the torsional stiffness of the DNA double helix / A. V. Vologodskii, V. V. Anshelevich, A. V. Lukashin, M. D. Frank-Kamenetskii // *Nature.*—1979.—280, N 5720.— P. 294—298.
12. Le Bret M. Monte Carlo computation of the supercoiling energy, the sedimentation constant and the radius of gyration of unknotted and knotted circular DNA // *Biopolymers.*—1980.—19, N 3.— P. 619—637.
13. Shimada J., Yamakawa H. Ring-closure probabilities for twisted wormlike chains. Applications to DNA // *Macromolecules*—1984.—17, N 4.— P. 689—698.
14. Shimada J., Yamakawa H. DNA-topoisomer analysis on the basis of the helical wormlike chain // *Biopolymers.*—1984.—23, N 5.— P. 853—857.
15. Torsional and bending rigidity of the double helix from data on small DNA rings / M. D. Frank-Kamenetskii, A. V. Lukashin, V. V. Anshelevich, A. V. Vologodskii // *J. Biomol. Struct. Dynam.*—1985.—2, N 5.— P. 1005—1012.
16. Depew R. E., Wang J. C. Conformational fluctuations of DNA helix // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1975.—72, N 11.— P. 4275—4279.
17. Action of nicking-closing enzyme on supercoiled and nonsupercoiled closed circular DNA: formation of a Boltzmann distribution of topological isomers / D. E. Pulleyblank, M. Shure, D. Tang et al. // *Ibid.*— P. 4280—4284.
18. Shore D., Baldwin R. L. Energetics of DNA twisting. I. Relation between twist and cyclization probability // *J. Mol. Biol.*—1983.—170, N 4.— P. 957—981.
19. Shore D., Baldwin R. L. Energetics of DNA twisting. II. Topoisomer analysis // *Ibid.*— P. 983—1007.
20. Horowitz D. S., Wang J. C. Torsional rigidity of DNA and length dependence of the free energy of DNA supercoiling // *Ibid.*—1984.—173, N 1.— P. 75—91.
21. Франк-Каменецкий М. Д., Вологодский А. В. Топологические аспекты физики полимеров: теория и ее биофизические приложения // *Успехи физ. наук.*—1981.—134, № 4.— С. 641—673.
22. Проблема узлов в статистической механике полимерных цепей / А. В. Вологодский, А. В. Лукашин, М. Д. Франк-Каменецкий, В. В. Аншелевич // *Журн. эксперим. и теорет. физики.*—1974.—66, № 6.— С. 2153—2163.
23. Cloizeaux J., Mehta M. L. Topological constraints on polymer rings and critical indices // *J. phys. Lett.*—1979.—40, N 7.— P. 665—670.
24. Chen Y.-D. Monte Carlo study of freely jointed ring polymers. II. The writhing number // *J. Chem. Phys.*—1981.—75, N 5.— P. 2447—2453.
25. Michels J. P. J., Wiegand F. W. Probability of knots in a polymers ring // *Phys. Lett. A.*—1982.—90, N 7.— P. 381—384.
26. White J. H. Self-linking and the Gauss integral in higher dimensions // *Amer. J. Math.*—1969.—91, N 5.— P. 693—728.
27. Fuller F. B. The writhing number of a space curve // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1971.—68, N 4.— P. 815—819.
28. Spengler S. J., Stasiak A., Cozzarelli N. R. The stereostructure of knots and catenanes produced by phage λ integrative recombination: implications for mechanism and DNA structure // *Cell.*—1985.—42, N 1.— P. 325—334.
29. Vologodskii A. V., Frank-Kamenetskii M. D. Theoretical study of cruciform states in superhelical DNAs // *FEBS Lett.*—1982.—143, N 2.— P. 257—260.
30. Frank-Kamenetskii M. D., Vologodskii A. V. Thermodynamics of the B-Z transition in superhelical DNA // *Nature.*—1984.—307, N 5950.— P. 481—482.
31. Peck L. J., Wang J. C. Energetics of the B-to-Z transition in DNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1983.—80, N 20.— P. 6206—6210.
32. Left-handed Z-DNA is induced by supercoiling in physiological ionic conditions / C. K. Singleton, J. Klysik, S. M. Stirdivant, R. D. Wells // *Nature.*—1982.—299, N 5881.— P. 312—316.
33. Singleton C. K. Effects of salts, temperature and stem length on supercoil-induced formation of cruciforms // *J. Biol. Chem.*—1983.—258, N 12.— P. 7661—7668.
34. Nordheim A., Rich A. The sequence (dC-dA)_n·(dG-dT)_n forms left-handed Z-DNA in negatively supercoiled plasmids // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1983.—80, N 7.— P. 1821—1825.

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва
Ин-т атом. энергии им. И. В. Курчатова, Москва

Получено 15.07.86