

УДК: 538.9: 577.31

Теоретические и экспериментальные исследования открытых состояний ДНК

Шигаев А.С.^{*}, Пономарёв О.А.^{**}, Лахно В.Д.^{***}

*Институт математических проблем биологии, Российская академия наук, Пущино,
Московская область, 142290, Россия*

Аннотация. Работа посвящена обзору и анализу литературных данных, касающихся свойств открытых состояний ДНК. Данные состояния возникают вследствие крупных флуктуаций дуплекса и оказывают большое влияние на целый ряд биохимических процессов, в том числе на перенос электрического заряда в ДНК. Проведён сравнительный анализ экспериментальных данных по кинетике и термодинамике открытых состояний ДНК в широком интервале температур. Объяснены противоречия между результатами разных экспериментов. На основе различия термодинамических свойств и других характеристик выделено три типа открытых состояний ДНК, а также дано современное определение термина «открытое состояние». Представлен краткий обзор простых математических моделей ДНК, в большинстве которых состояние каждой пары оснований описывается одной-двумя переменными. Рассмотрены основные проблемы исследования гетерогенной ДНК в рамках подходов данного уровня. Обсуждается роль каждой из групп моделей в интерпретации экспериментальных данных. Особое внимание уделено изучению процессов переноса и локализации энергии колебаний нуклеотидных пар в дуплексе при помощи механических моделей. Показано, что данные процессы играют ключевую роль в динамике гетерогенного дуплекса, а их теоретическое исследование крайне важно для развития современной молекулярной биологии и биофизики. Рассмотрены основные особенности теоретических подходов, благодаря которым удалось описать различные экспериментальные данные. Описаны перспективы развития моделей, предложены конкретные детали оптимизации, а также возможные способы модернизации некоторых экспериментальных методик.

Ключевые слова: модели ДНК, динамика ДНК, перенос энергии, локализация энергии, открытое состояние ДНК, пузырьрёк денатурации, открывание одиночной пары оснований.

*shials@yandex.ru

**olegpon36@mail.ru

***lak@impb.ru

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	555
1. Равновесная термодинамика тепловой денатурации ДНК	561
1.1. Ранние экспериментальные и теоретические исследования денатурации	561
1.2. Изменение энтропии при переходе спираль-клубок. Модель Поганда-Шераги	565
1.3. Модели ближайших соседей и их роль в исследованиях плавления гетерогенных ДНК	569
2. Механические модели ДНК. модель Пейярда-Бишопа-Доксуа	572
2.1. Первые механические модели ДНК.....	572
2.2. Ввод радиальной степени свободы для пары оснований. Модель Пейярда-Бишопа-Доксуа.....	574
2.3. Подходы с использованием комбинации торсионной и радиальной степеней свободы	577
2.4. Области применения радиальных подходов. Проблемы моделирования гетерогенной ДНК.....	580
3. Исследования микромеханической денатурации единичных дуплексов	584
3.1. Экспериментальные данные.....	584
3.2. Теоретические исследования микромеханической денатурации. Анализ равновесных свойств моделей	586
3.3. Роль переноса и локализации энергии в динамике силового расплетания дуплекса	588
4. Экспериментальные и теоретические исследования пузырьков денатурации при различных температурах	591
4.1. Поведение пузырьков в коротких ДНК. Метод закалки самокомплементарных олигомеров	591
4.2. Исследование пузырьков денатурации методом ферментативного гидролиза. Роль переноса и локализации энергии.....	596
4.3. Диапазон времён жизни пузырьков денатурации. Метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии.....	602
5. Исследования открываний ДНК при низких температурах	606
5.1. Исследования выхода оснований из уотсон-криковской спирали методами ¹ H-ЯМР.....	606
5.2. Кинетика и термодинамика одиночных открываний.....	610
5.3. Термодинамические различия флип-аутов и пузырьков денатурации. Объяснение расхождений результатов ФКС с данными других методов.....	615
5.3.1. Секвенциальный фактор. Роль первичной структуры ДНК.....	618
5.3.2. Методический фактор и некоторые особенности ¹ H-ЯМР	619
5.3.3. Бризерный фактор	621
5.3.4. Флуктуационный фактор и оценка его вклада	622
5.4. Внутренний катализ и доступность протонов иминогрупп	624
6. Обобщение данных по низкотемпературной динамике дуплекса	629
6.1. Число пар оснований, одновременно участвующих в зарождении пузырька.....	630
6.2. Сравнение подходов с точки зрения описания пузырьков при умеренных температурах	631
6.3. Проблема стандартных термодинамических параметров	633

6.4. Локализация энергии угловых колебаний нуклеотидных пар.....	634
6.5. Гипотеза взаимодействия открытых состояний ДНК и проблема «кода пузыря».....	636
Заключение	641
Благодарности	647
Список литературы	647

ВВЕДЕНИЕ

Главной функцией ДНК является хранение генетической информации живого организма на молекулярном уровне. Её молекула обладает сложной структурой. ДНК состоит из двух полимерных цепей, связанных между собой системой водородных связей, или Н-связей. Подобную структуру обычно называют дуплексом. Каждая его цепь состоит из нуклеотидов, связанных фосфодиэфирными мостиками. Данные мостики соединяют 3'-гидроксильную группу каждого нуклеотида с 5'-фосфатной группой соседнего. Строение одиночной цепи проиллюстрировано на схеме 1.

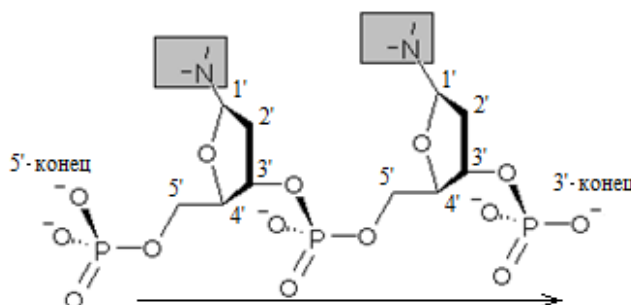


Схема 1. Строение сахарофосфатного остова ДНК. Цифры указывают номера атомов углерода дезоксирибозы. Стрелка показывает принятое направление цепи ДНК – от 5'-конца к 3'-концу. Серыми прямоугольниками обозначены азотистые основания ДНК: показаны только их атомы азота (буквы N), присоединённые через гликозидную связь к атому С-1' фуранозного кольца.

Часть полимерной молекулы, показанную на схеме 1, называют сахарофосфатным остовом. Считается, что одиночная цепь ДНК имеет направление – от 5'-конца к 3'-концу. Последовательность нуклеотидов в этом направлении называется первичной структурой ДНК. Обычно в ДНК присутствуют четыре типа оснований – аденин, тимин, гуанин и цитозин. В нашей работе они будут обозначаться, соответственно, как А, Т, G и С.

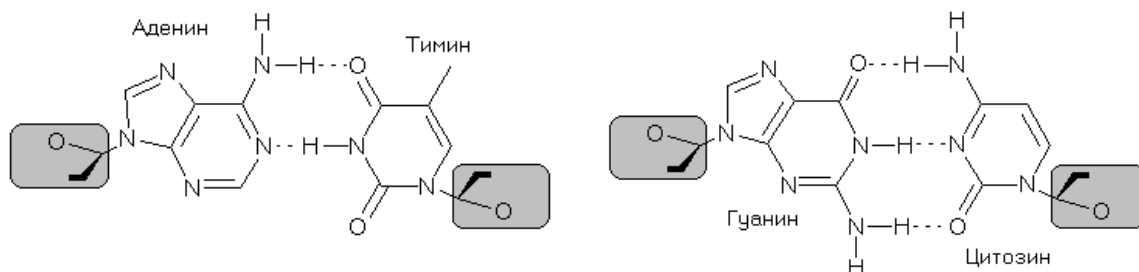


Схема 2. Взаимодействие оснований ДНК по принципу комплементарности. Комплементарные Н-связи показаны пунктирными линиями. Из сахарофосфатного остова показаны (в серых прямоугольниках) только атомы С-1' и С-2' фуранозных колец дезоксирибозы, а также атомы кислорода.

Объединение одиночных цепей в дуплекс происходит за счёт специфического водородного связывания аденина с тиминном, а гуанина – с цитозином. Принцип такого соединения называется комплементарностью, а сами Н-связи – комплементарными. Комплементарное взаимодействие оснований ДНК представлено на схеме 2.

Цепи ДНК соединяются антипараллельно: основание, находящееся на 5'-конце одной цепи, комплементарно связано с основанием 3'-конца другой цепи. Дуплекс цепей называют вторичной структурой, а комплементарно соединённые нуклеотидные пары, показанные на схеме, – соответственно, АТ- и ГС-парами. В дальнейшем мы будем называть комплементарные Н-связи просто Н-связями.

Помимо Н-связей, стабильность вторичной структуры дуплекса поддерживается ещё одним типом нековалентного притяжения – так называемым стэкингом, или стэкинг-взаимодействиями. Этот вид слабого взаимодействия возникает между соседними основаниями одной цепи. Ориентация Н-связей и стэкинг-взаимодействий в пространстве на примере короткого участка дуплекса показана на схеме 3.

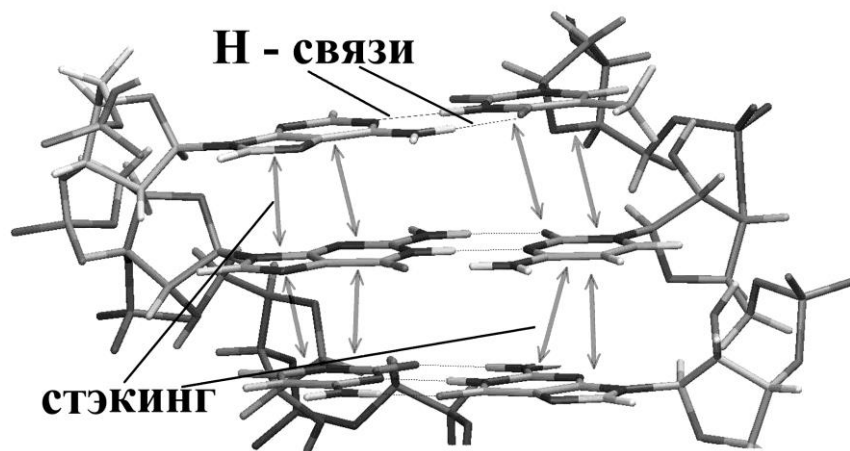


Схема 3. Относительное пространственное расположение Н-связей и стэкинг-взаимодействий в дуплексе ДНК.

Как видно из схемы 3, плоскости соседних оснований располагаются почти параллельно, напоминая стопку монет. Поэтому структуру одиночной цепи в составе дуплекса нередко называют стэком (англ. – «stack»). Отсюда же происходит и название этих взаимодействий.

По данным квантовохимических расчётов, основной вклад в свободную энергию стэкинга вносят так называемые ароматические взаимодействия [1–3]. Данные связи обусловлены частичной делокализацией π -электронов, возникающей в результате перекрывания р-орбиталей при контакте плоскостей азотистых оснований [4]. Плотность этого контакта дополнительно зависит от электростатического притяжения, дисперсионных лондоновских сил и гидрофобных эффектов. Тем не менее, все эти силы играют лишь вспомогательную роль и определяют, главным образом, ориентацию оснований. Как правило, для каждой пары гетероциклов существует некоторая оптимальная ориентация (см. [5, 6]). Роль стэкинг-взаимодействий в формировании и поддержании структуры дуплекса подробно рассмотрена в ряде обзорных работ [7–9].

Цепи образуют правозакрученную спираль, строение которой показано на схеме 4. Буквами S и P обозначены, соответственно, остатки сахара и фосфодиэфирные мостики. Полный оборот спирали включает 10 пар оснований в кристалле и 10,5 пар – в водном растворе [10]. Однако в живой клетке дуплекс нередко находится под воздействием внешнего напряжения, способного изменять длину его витков [11]. В этом случае говорят, что ДНК является суперскрученной, или суперспирализованной. Если направление внешней силы совпадает с направлением спирали,

суперспирализацию называют положительной. При этом длина полного витка получается меньше 10,5 пар оснований. В противоположном случае суперспирализацию ДНК называют отрицательной.

Целостная структура, в которой сохранены все связи, называется нативной ДНК. Ковалентные связи сахарофосфатного остова являются достаточно прочными – их энергия составляет около 250 кДж/моль [12]. Данные связи можно разорвать только ионизирующими излучениями, воздействием свободных радикалов или некоторых модифицирующих реагентов. При отсутствии активных форм кислорода одноцепочечная молекула способна выдерживать многочасовой нагрев до 200°C без разрыва ковалентных связей.

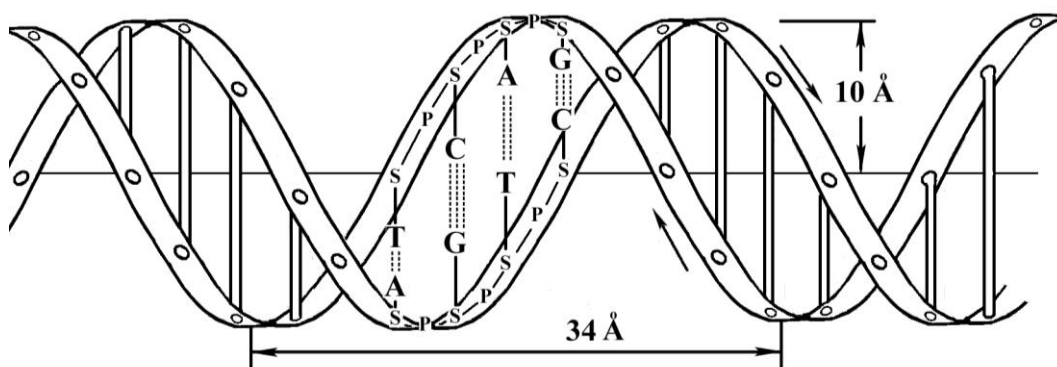


Схема 4. Относительное пространственное расположение Н-связей и стэкинг-взаимодействий в дуплексе ДНК.

Нековалентные взаимодействия, поддерживающие вторичную структуру дуплекса, стабильны только при умеренных температурах. ДНК длиной свыше 100 пар диссоциирует на отдельные цепи в интервале температур 70–112°C, в зависимости от нуклеотидного состава. Для коротких молекул эти температуры ещё ниже. Более того, Н-связи и стэкинг-взаимодействия чувствительны к снижению ионной силы раствора и экстремальным значениям рН, а спектр веществ, способных привести к их нарушению, достаточно широк.

Денатурацией ДНК называют разрушение большей части стэкинг-взаимодействий и всех комплементарных Н-связей при сохранении ковалентных. Самый простой способ нарушения вторичной структуры ДНК – нагрев её раствора, из-за чего денатурацию часто называют плавлением. Во время плавления ДНК диссоциирует на две одиночные цепи, имеющие беспорядочную структуру. Поэтому термин «денатурация» имеет ещё один синоним – «переход спираль-клубок».

При плавлении ДНК проходит через промежуточное состояние, в котором она состоит из денатурированных областей, соседствующих с нативными участками. Процесс плавления показан на схеме 5 [13].

Плавление ДНК происходит в определённом интервале температур, границы которого зависят от целого ряда факторов. В данном интервале разрыв Н-связей, приводящий к локальному расхождению цепей дуплекса, обычно сопровождается разрушением стэкинга. Поэтому в случае состояний ДНК, образующихся при переходе спираль-клубок, название «участки локальной денатурации» или «денатурированные области» является правильным. В литературе эти области чаще всего называют локальными расплетаниями, петлями, пузырьками денатурации, или просто пузырьками.

Тем не менее, Н-связи способны разрываться даже в условиях, при которых подавляющее большинство нековалентных взаимодействий в молекуле ДНК остаются ненарушенными. Кратковременные разрывы Н-связей могут происходить как в

отдельной паре оснований, так и в нескольких соседних парах. В последнем случае цепи ДНК, как правило, расходятся. Строго говоря, участок, в котором произошло подобное разделение цепей, далеко не всегда является денатурированной областью. В большинстве одноцепочечных ДНК при низких температурах и нормальной ионной силе раствора основания связаны стэкинг-взаимодействиями. Следовательно, и при кратковременном расхождении цепей дуплекса стэкинг вполне способен сохраняться, либо реассоциировать. Данный вопрос подробно обсуждается в главе 5.

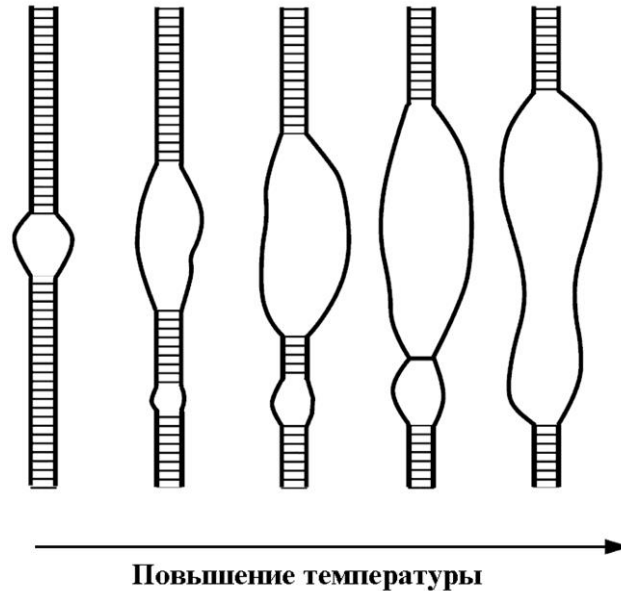


Схема 5. Денатурация ДНК, вызванная ростом температуры: расплетённые области (пузырьки денатурации), сливаясь, приводят, в конечном счёте, к полному разделению цепей дуплекса.

Из определения денатурации следует, что название «денатурированные области» не совсем подходит для участков ДНК с разорванными Н-связями, образующихся при умеренных температурах. Для подобных участков более правильным является другой, более общий термин – «открытые состояния ДНК». Здесь и далее *под открытым состоянием ДНК мы понимаем любое изменение участка дуплекса, возникающее в результате полного или частичного разрыва комплементарных Н-связей в одной или нескольких соседних нуклеотидных парах, которое делает протоны, участвующие в образовании этих связей, доступными для молекул раствора.* Как мы покажем в главе 5, именно это определение согласуется с большинством экспериментальных данных, касающихся низкотемпературной динамики ДНК.

Длиной открытого состояния будем считать число соседних пар оснований, в которых разорваны Н-связи. Аналогично одному из общепринятых терминов, мы будем называть открытое состояние длиной в несколько пар оснований «пузырьком», не интересуясь при этом степенью нарушения стэкинг-взаимодействий. Однако, когда нужно будет подчеркнуть, что речь идёт именно о денатурированном участке, мы будем использовать название «пузырёк денатурации». Сам процесс возникновения открытого состояния будет называться «открыванием». В англоязычной литературе этот термин часто употребляют и как существительное – синоним открытого состояния. Данный синоним будет использоваться и в нашей работе.

Актуальность изучения открытых состояний ДНК обусловлена целым рядом факторов. Закономерности перехода спираль-клубок, наблюдаемые в экспериментах *in vitro*, оказались полезными для теоретического исследования проблемы фазовых переходов в квазиодномерных системах. Открытые состояния играют огромную роль и *in vivo* – даже несмотря на то, что при умеренных температурах их концентрация ничтожна. Например, разрушение нековалентных связей в пузырьке приводит к

уменьшению механической жёсткости ДНК. Это облегчает её изгибание, «складывание». Показано, что упаковка ДНК в нуклеосомы происходит посредством её кратковременного открывания [14, 15]. Результаты экспериментов по образованию кольцевой ДНК из олигомеров длиной 100 пар оснований указывают на возможность самопроизвольного образования в них «гибких» участков [14, 16, 17]. Предполагается, что эти участки представляют собой пузырьки, которые возникают за счёт тепловых флуктуаций [14, 16].

Открывание ДНК обеспечивает доступ ферментов к её основаниям. Поэтому открытые состояния активно участвуют в специфических ДНК-белковых взаимодействиях. В последнее время эта точка зрения получила прямые экспериментальные подтверждения [18, 19]. Кроме того, полное или частичное нарушение стэкинга при открывании дуплекса может существенно замедлять или полностью блокировать перенос в нём катион-радикалов (дырок). Миграция дырки по стэку оснований является возможной благодаря тому, что он является π -сопряжённой системой [20], см. выше. Перенос заряда в ДНК играет важную роль не только в процессах мутагенеза [21–23]. и канцерогенеза [21, 24], но и при репарации её повреждений [25–27].

Термодинамические особенности открытых состояний ДНК являются ключом к пониманию многих закономерностей её поведения. Как будет показано далее, существует несколько типов открываний. Их термодинамические свойства сильно зависят от вида открытого состояния и первичной структуры участка, в котором оно возникает – подробнее см. главу 5. Есть даже открывания с отрицательной энтальпией активации [28]. Более того, поскольку любое открывание ДНК начинается с разрыва комплементарных Н-связей, открытые состояния разных типов, видимо, способны между собой взаимодействовать. Поэтому расчёты кинетических величин открываний как функций температуры могут быть достаточно сложными. Анализ термодинамических характеристик каждого из типов открытого состояния необходим для оценки:

- 1) вероятности образования и среднего времени жизни каждого из типов открытого состояния,
- 2) степени их взаимодействия между собой и его влияния на кинетику каждого из открываний в любом фрагменте гетерогенной ДНК для широкого интервала температур.

Помимо стереохимических факторов и энергии нековалентных взаимодействий, немалый вклад в термодинамику открываний вносят неравновесные процессы. Из них наиболее хорошо изучены перенос и нелинейная локализация энергии колебаний нуклеотидных пар. Важную роль в исследовании этих процессов сыграли математические модели, в которых состояние каждой пары оснований описывается небольшим числом переменных – от одной до четырёх. В данном обзоре основное внимание уделено именно моделям этого уровня, которые мы условно называем «простыми подходами» или «простыми моделями». Несмотря на свою простоту, эти подходы позволили изучить физико-химические основы целого ряда особенностей динамики ДНК. Многие из этих моделей удобны для аналитического исследования, а если оно невозможно, то даже соответствующие численные расчёты требуют относительно малых затрат машинного времени. Это позволяет изучать поведение простых моделей в масштабе больших времён, по сравнению с молекулярной динамикой.

Развитие моделей ДНК необходимо для решения целого ряда задач. Одной из них является разработка методов поиска промоторных областей в природных ДНК с известной последовательностью нуклеотидов. По-видимому, любая ДНК имеет температурный интервал, в котором относительная вероятность её открывания максимальна именно в биологически активных участках. Поэтому моделирование

неравновесных эффектов с учётом термодинамических особенностей открытых состояний может дать весьма точные результаты.

Не менее важной является проблема участков ДНК особой первичной структуры, легко переходящих в открытое состояние. Как будет показано в главе 4, самые нестабильные участки дуплекса далеко не всегда характеризуются наименьшей суммарной энергией Н-связей и стэкинг-взаимодействий [29, 30]. Видимо, существует некоторый «код пузырька» – специфическая последовательность нуклеотидов, способствующая открыванию. По крайней мере, для открывания отдельных оснований зависимость термодинамических свойств от контекста последовательности давно доказана, см. главу 5.

Проблема связи термодинамических свойств открытых состояний ДНК с её первичной структурой имеет большое прикладное значение. Например, в последние годы растёт интерес к разработке нанобиоэлектронных устройств на основе ДНК [31, 32]. При моделировании последовательностей ДНК, которые имели бы максимальную электрическую проводимость, важным критерием является стабильность их вторичной структуры. Поскольку открывание связано с нарушением стэкинга, высокая концентрация открытых состояний может заметно снизить проводимость дуплекса и увеличивает риск окисления оснований. Поэтому при поиске стабильных последовательностей необходимо решать «противоположную» задачу. Её можно назвать задачей поиска «анти-кода пузырька» – первичной структуры с определёнными свойствами:

- 1) минимальной относительной вероятностью образования любого из открытых состояний,
- 2) равномерным распределением этой вероятности,
- 3) сохранением указанных выше свойств в максимально широком интервале температур.

Предположение о влиянии динамики открываний ДНК на перенос заряда определило специфику теоретических исследований, рассмотренных в данном обзоре. Во-первых, в большинстве описанных моделей невозможен учёт изменений суперспирализации дуплекса. Очевидно, создавать нанобиоэлектронные устройства на основе релаксированной ДНК намного проще. Кроме того, открывание пузырьков само по себе способно приводить к частичному сбросу суперспирализационного напряжения [33–35]. Это дополнительно затрудняет сравнение расчётных данных с экспериментом. Во-вторых, мы не рассматриваем исследования открытых состояний на концах ДНК при умеренных температурах. *In vivo* длина дуплексов настолько велика, что концевые эффекты пренебрежимо малы, а *in vitro* концевые пары оснований легко соединить ковалентными связями.

Целями нашей работы являются:

- 1) краткий обзор простых моделей и экспериментальных методик, используемых для изучения открытых состояний ДНК;
- 2) обзор и частичный анализ литературных данных по термодинамическим свойствам открытых состояний;
- 3) выделение отдельных типов открываний на основе термодинамических величин и других критериев;
- 4) объяснение кажущихся противоречий между результатами различных экспериментов;
- 5) предложение, на основе сравнения современных данных, путей развития теоретических и экспериментальных методов исследования динамики дуплекса.

В главе 1 описаны простые методы изучения денатурации ДНК. Дано представление о профилях плавления и их зависимости от свойств дуплекса. Рассмотрены Изинг-подобные модели, суть их параметров, а также применение этих подходов в исследованиях перехода спираль-клубок в ДНК. В главе 2 приведён краткий

обзор механических моделей, в которых состояние каждой пары оснований описывается одной или несколькими переменными. На примере подхода Пейярда–Бишопа–Доксуа показано, что локализация энергии колебаний нуклеотидных пар во многом определяет динамику открытых состояний. Это подтверждается материалом главы 3, где представлены исследования денатурации единичных дуплексов под действием внешнего усилия. В данной главе продемонстрирован вклад Изинг-подобных и механических моделей в изучение особенностей микромеханического расплетания ДНК, наблюдаемых в экспериментах.

В главе 4 основное внимание уделено свойствам пузырьков в условиях, при которых большая часть дуплекса остаётся нативной. Обсуждается ряд экспериментальных данных, а также исследования модели Пейярда–Бишопа–Доксуа для случая умеренных температур (28 °С). Описан метод спектроскопии молекулярных маячков, позволяющий изучать кинетику закрывания пузырьков. В главе 5 представлен обзор экспериментальных данных по кинетике открываний при температурах ниже 35°С. Предложен механизм влияния первичной структуры ДНК на активационные термодинамические параметры открывания одиночных пар оснований. Объяснены противоречия результатов спектроскопии молекулярных маячков с данными ЯМР и других методов. Проанализированы свойства открытых состояний, способных возникать при малых угловых смещениях нуклеотидных пар.

Глава 6 посвящена обобщению данных по низкотемпературной динамике ДНК. Показано, что в образовании открытых состояний различных типов участвуют, прежде всего, разные степени свободы оснований. Обоснована необходимость модернизации механических моделей для улучшения согласия расчётных данных с экспериментом. Рассмотрена роль локализации энергии малых угловых смещений оснований в открывании. Предложена гипотеза взаимодействия открытых состояний и различных флуктуаций дуплекса.

В заключении представлен совокупный анализ материала, изложенного в обзоре. На его основе:

- 1) выделены основные критерии классификации открытых состояний;
- 2) указаны характерные черты моделей ДНК, являющиеся ключевыми для интерпретации различных экспериментальных данных;
- 3) предложен ряд улучшений простых теоретических подходов и оценены перспективы их развития;
- 4) описана общая схема экспериментов, необходимых для дальнейшей разработки одной из групп простых механических моделей.

1. РАВНОВЕСНАЯ ТЕРМОДИНАМИКА ТЕПЛОЙ ДЕНАТУРАЦИИ ДНК

1.1. Ранние экспериментальные и теоретические исследования денатурации

Расшифровка двухцепочечной структуры ДНК в 1953 году [36] дала начало огромному количеству исследований свойств этой молекулы. Значительная часть ранних экспериментов была посвящена денатурации ДНК под действием экстремальных значений рН, низкой ионной силы раствора, повышенной температуры и различных денатурирующих агентов. Ранние физико-химические исследования в этой области подробно описаны в ряде обзоров [37–39].

В первых экспериментах установлено значительное изменение физических свойств раствора ДНК при воздействии денатурирующих факторов. Например, относительное поглощение в ультрафиолетовой части спектра возрастало на треть [40], а вязкость раствора снижалась в 12 раз [41, 42]. По данным светорассеяния, молекулярная масса полимера при этом не менялась [41]. Был сделан вывод, что причиной изменений вязкости и светопоглощения является переход спираль-клубок.

Наиболее популярным методом изучения этого перехода стало измерение поглощения света с длиной волны 260–268 нм при медленном нагревании раствора ДНК. Расхождение цепей дуплекса приводит к заметному возрастанию интенсивности поглощения. В основе этого эффекта лежит нарушение контакта соседних оснований в каждой из цепей. Плотная упаковка оснований в дуплексе обуславливает его гипохромизм – снижение молярного коэффициента экстинкции. Снижение плотности упаковки приводит и к уменьшению гипохромного эффекта.

Явление гипохромизма объясняют векторным сложением индуцированных светом дипольных моментов квантового перехода соседних оснований из основного состояния в возбуждённое. В нативной двойной спирали каждый индуцированный диполь взаимодействует с диполем комплементарного ему основания, расположенного на другой цепи, который противоположен по направлению момента. Вообще говоря, при низких температурах одноцепочечная ДНК также закручена в спираль, однако для неё гипохромизм выражен намного меньше. Это связано с тем, что антипараллельные векторы наведённых диполей сильнее удалены друг от друга. Для двухцепочечной ДНК гипохромизм обычно составляет 30–40%, для одноцепочечной – 15–20%, а для динуклеозидфосфатов он не превышает 10% [43].

Математическая модель, описывающая гипохромизм, была впервые предложена I. Tinoco в 1960 году [44]. Автор описал снижение поглощения для антипараллельных индуцированных дипольных моментов по сравнению с набором случайных ориентаций, расположенных в непосредственной близости друг от друга. Для параллельного расположения поглощение, напротив, должно возрасти по сравнению со случайным. Похожая модель была независимо введена W. Rhodes [45]. Теория гипохромизма получила дальнейшее развитие в ряде исследований, где предлагались различные модели [46–51].

Кривая зависимости поглощения от температуры называется профилем плавления ДНК. Типичный профиль плавления гетерогенной ДНК длиной несколько тысяч пар оснований показан на рис. 1.1 [52]. Он отражает кооперативную денатурацию ДНК, во время которой разрушаются Н-связи и стэкинг. Долю оснований, утративших комплементарные Н-связи, вычисляют по формуле

$$\theta_B = \frac{A(T) - A(0)}{A(100) - A(0)}, \quad (1.1)$$

где $A(T)$ – значение сигнала при температуре T , а $A(0)$ и $A(100)$ – значения при 0 и 100°C.

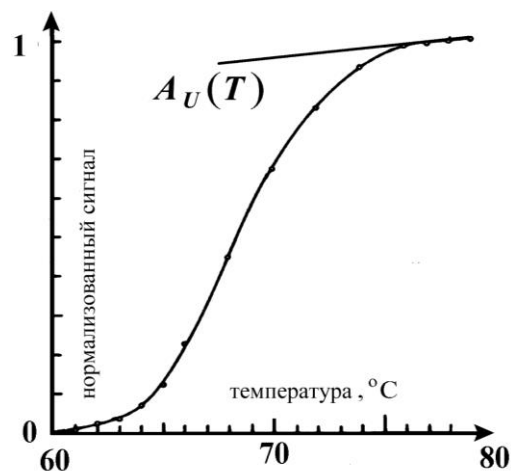


Рис. 1.1. Профиль плавления ДНК длиной 16–32 тыс. пар оснований [52]. Длина волны света – 260 нм. Функция $A_U(T)$ описывает квазилинейный рост сигнала после полного разделения цепей.

На рисунке 1.1 хорошо видно, что в интервале 76–80 °С, когда цепи уже разошлись, фотометрический сигнал растёт квазилинейно. Этот эффект обусловлен частичным сохранением стэкинг-взаимодействий в расплетённой ДНК. При дальнейшем нагревании они окончательно разрушаются. Рост поглощения после разделения цепей описывается эмпирической функцией $A_U(T)$.

По мнению Wartell и Benight, при малых температурах фотометрический сигнал также растёт квазилинейно [53]. Это происходит за счёт постепенного уменьшения площади контакта оснований в стэке, хотя Н-связи при этом не нарушаются. Рост сигнала при малых температурах аппроксимируется функцией $A_L(T)$, а θ_B , согласно работе Wartell и Benight, описывается выражением [53]:

$$\theta_B = \frac{A(T) - A_L(T)}{A_U(T) - A_L(T)}. \quad (1.2)$$

Однако угол наклона $A_L(T)$ настолько мал, что её вполне можно принять постоянной и равной $A(0)$. Более того, вместо функции $A_U(T)$ или $A(100)$ нередко используют величину сигнала при температуре, выше которой $A(T)$ соответствует $A_U(T)$ (см., напр., [54, 55]).

Область температур между началом расхождения цепей и его завершением называют интервалом плавления. Температура, при которой величина нормированного сигнала составляет 0,5, называется критической, или температурой плавления. Она обозначается как $T_{пл}$. Данная величина зависит главным образом от массы ДНК и соотношения в ней концентраций АТ- и GC-пар. Анализируя профили плавления нескольких десятков образцов, Marmur и Doty [56] впервые вывели простое линейное соотношение между долей GC-пар [GC] и $T_{пл}$. Оно имело вид: $T_{пл} = 69.3 + 41 \cdot [GC]$.

Зависимость $T_{пл}$ и интервала плавления от рН раствора, его ионной силы, молекулярной массы ДНК и присутствия различных стабилизирующих и дестабилизирующих реагентов хорошо изучены. Помимо фотометрии в УФ-области, для исследования денатурации применялись такие методы как круговой дихроизм (см. [43]), вискозиметрия, денатурирующий гель-электрофорез [57, 58], обработка формальдегидом, микрокалориметрия и другие. Результаты ранних исследований перехода спираль-клубок в ДНК систематизированы в работах Веденова с соавт. [12], Wada et al. [59], Лазуркина и Франк-Каменецкого [60], а также в книге Bloomfield et al. [43]. Более поздний материал описан в работе Wartell и Benight [53].

Хороший обзор теоретических исследований плавления ДНК представлен в работе O. Gotoh [61]. Мы рассмотрим подробнее только исследования первых математических моделей денатурации, поскольку их простые аналоги используются до сих пор [62].

Теоретические исследования денатурации ДНК начались почти сразу после получения первых экспериментальных данных. Rice и Wada [63] исследовали однородную модель дуплекса, в которой Н-связи разрывались независимо друг от друга. Для исследования модели использовались стандартные методы статистической физики.

Было показано, что при каждой температуре существует равновесная концентрация разорванных водородных связей, соответствующая минимуму свободной энергии. В работе T. Hill впервые были учтены взаимодействия между соседними основаниями и повышенная энтропия крупных денатурированных участков [64]. T. Hill рассчитал статистические суммы для различных состояний ДНК. Он показал, что её денатурация происходит кооперативно, однако не имеет ничего общего с фазовым переходом – по крайней мере, с переходом первого рода. В. Zimm, при помощи более строгих расчётов, подтвердил как кооперативность расплетания ДНК, так и отсутствие фазового перехода в данной модели [65].

Общей чертой первых теоретических исследований ДНК являлось описание пары оснований при помощи бинарной переменной. Другими словами, для нуклеотидной пары допускалось лишь два состояния – закрытое и открытое. Стоит заметить, что определение открытого состояния в ранних моделях отличается от того, которое дано нами во Введении. В данном случае в открытом состоянии полностью отсутствуют как Н-связи с комплементарным партнёром, так и стэкинг. Энергия, необходимая для открывания пары оснований, определяется только состоянием соседних с ней пар. Подобные феноменологические модели получили название моделей ближайших соседей. Их суть показана на рис. 1.2.

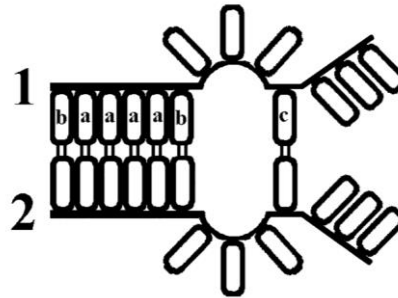


Рис. 1.2. Схематическое изображение модели ближайших соседей. Наибольшей стабильностью обладает пара **a**, наименьшей – пара **c**, не связанная стэкинг-взаимодействиями ни с одним из соседей.

Поскольку подобное описание было аналогично модели Изинга для ферромагнетизма [66], эту группу моделей называли также Изинг-подобными (англ. – «Ising-like models»).

Модели ближайших соседей оказались полезны для описания некоторых общих закономерностей денатурации. В частности, было воспроизведено уширение интервала плавления и снижение $T_{пл}$ при уменьшении длины дуплекса [67, 68]. Исследовалось также влияние на $T_{пл}$ ионной силы раствора [69]. Была изучена зависимость доли закрытых пар оснований от концентрации ДНК, её длины и усреднённой энергии Н-связей [70]. Благодаря своей простоте, модели этого типа внесли важный вклад в разработку базовой теории перехода спираль-клубок в ДНК [71, 12].

В то же время было очевидно, что предсказательная сила этих моделей без точных значений их параметров невелика, особенно когда речь идёт о гетерогенной ДНК. Прежде всего, не были известны энергии стэкинга для разных пар соседних оснований. При моделировании они предполагались одинаковыми [72, 73]. Тем не менее, экспериментальные данные, полученные для димеров РНК, указывали на достаточно широкий диапазон значений данных параметров [74, 75].

Кроме того, даже для модели ДНК с регулярной структурой была показана существенная зависимость формы профиля плавления от длины чередующихся участков, состоящих из АТ- и GC-пар [72]. Для природных же ДНК зависимость процесса денатурации от первичной структуры представлялась ещё более сложной. Впоследствии было показано, что профили их плавления имеют тонкую структуру, см. раздел 1.3.

Таким образом, для оптимизации и улучшения моделей ближайших соседей, определения точных значений их параметров, нужны были профили плавления, полученные для дуплексов с известной первичной структурой. Поэтому следующий виток в развитии этих моделей произошёл только в конце 1970-х годов, с появлением методов секвенирования нуклеиновых кислот. Модели ближайших соседей, а также влияние первичной структуры ДНК на форму профиля её плавления будут описаны подробнее в разделе 1.3.

Другим важным направлением, в котором использовались Изинг-подобные модели, стало изучение физических основ денатурации, её механизма. В ранних экспериментах

на гомогенных ДНК было показано, что полное разделение цепей дуплекса может происходить в очень узком температурном интервале – не более 1–2 К [76, 77]. В качестве примера на рис. 1.3. показан профиль плавления poly(G):poly(C) длиной несколько тысяч пар оснований.

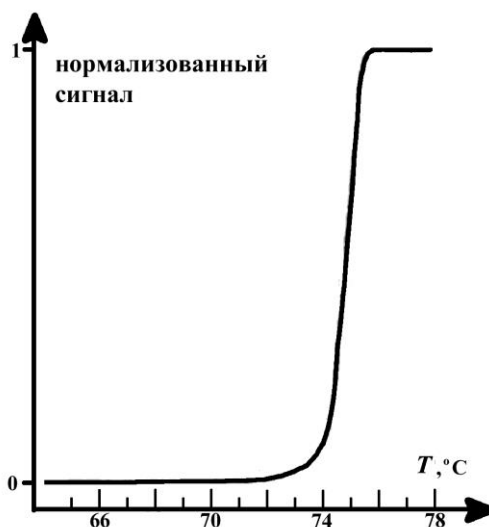


Рис. 1.3. Типичный пример профиля плавления гомополимерной ДНК (адаптировано из работы [76]). По оси ординат отложено поглощение при 260 нм, в относительных единицах. Ср. рис. 1.1.

Резкий, кооперативный переход спираль-клубок, характерный для гомогенных ДНК, интерпретировался теоретиками по-разному. Одни считали, что денатурация дуплекса соответствует фазовому переходу [78, 79], другие придерживались противоположного мнения [12, 65, 72].

Одной из главных задач в теоретическом исследовании перехода спираль-клубок стало вычисление удельной конфигурационной энтропии крупных денатурированных областей – петель. Характер изменения этой величины с ростом размера петли является важнейшей характеристикой, способной указать на род фазового перехода в квазиодномерной решётке, какой является ДНК. Ниже мы рассмотрим этот вопрос более подробно.

1.2. Изменение энтропии при переходе спираль-клубок. Модель Поланда–Шераги

Молекулу ДНК можно рассматривать как квазиодномерную решётку, находящуюся в трёхмерном пространстве. Исследование проблемы фазового перехода в подобной системе очень важно для развития теоретической физики. Невозможность подобного перехода в одномерных пространствах является общеизвестным фактом [80–82]. Однако если такие системы обладают бесконечной длиной, то в условиях бесконечного радиуса взаимодействия, при строго определённой температуре, фазовый переход может происходить [82]. Он наблюдается также в случае, когда потенциал взаимодействия является многочастичным, то есть зависит более чем от одной разности координат. Для случая ДНК в трёхмерном растворе данное приближение является вполне физическим.

Изменения энтропии дуплекса при разделении его цепей впервые подробно исследованы в модели Poland и Scheraga [83, 84]. В этой Изинг-подобной модели ДНК представлена в виде нативного дуплекса, в котором могут возникать крупные петли. Авторы установили, что для бесконечно длинных цепочек ДНК при её денатурации может иметь место настоящий фазовый переход (второго рода), в отличие от бесконечно длинных полипептидных альфа-спиралей [83]. В работе [84]. Poland и Scheraga использовали формулу Flory [85] для энтропии петли, состоящей из M статистических сегментов:

$$S(M) = R \left\{ M \cdot \ln \Omega - \left[A_0 + \frac{3}{2} \ln M \right] \right\}. \quad (1.3)$$

Здесь A_0 – константа, зависящая от критериев, определяющих динамику закрывания пузырька денатурации (её точное значение не известно), а R – универсальная газовая постоянная; $M \cdot \ln \Omega$ соответствует удельной конформационной энтропии участка одноцепочечной ДНК в пузырьке.

Poland и Scheraga использовали методы комбинаторики для анализа числа конформаций петли в двух- и трёхмерном пространстве. Участок из M статистических сегментов при денатурации образует петлю длиной $2 \cdot M$ статистических сегментов. Длина статистического сегмента одноцепочечной ДНК зависит от свойств раствора и в нормальных условиях составляет около семи нуклеотидов [12]. Poland и Scheraga моделировали петлю как совокупность идеальных случайных блужданий под прямыми углами; совпадение по координатам исключалось. Алгебраическая сумма перемещений, параллельных каждой координатной оси, равнялась нулю, чтобы петля была замкнутой. Для двух- и трёхмерного пространства было получено, соответственно:

$$\begin{aligned} \ln(\text{числа конф.}) &= M \cdot \ln 2 - \left\{ \ln \left(\frac{\pi}{4} \right) + \ln M \right\}, \\ \ln(\text{числа конф.}) &= M \cdot \ln 2 - \left\{ \ln \left(\frac{\pi}{6} \right)^{\frac{3}{2}} + \frac{3}{2} \ln M \right\} \end{aligned} \quad (1.4)$$

для больших длин петли. Под большой длиной понимается число статистических сегментов, позволяющее пренебречь граничными эффектами. Другим словами, считалось, что вся петля ведёт себя как свободная полимерная цепь.

Учитывая сходство этих формул с выражением (1.3), и вводя величину Z , пропорциональную M , авторы записали выражение для статистического веса ω_Z петли из Z единиц ($2 \cdot Z$ сегментов) как

$$\ln \omega_Z = a'Z - b' - c \ln Z, \quad (1.5)$$

где a' и b' – константы пропорциональности, зависящие от свойств полимера. Poland и Scheraga показали, что род фазового перехода (и само его наличие) определяется величиной c [84]:

- при $c \leq 1$ никакого фазового перехода не происходит;
- при $1 < c \leq 2$ происходит фазовый переход второго рода;
- при $c > 2$ имеет место фазовый переход первого рода.

При использовании идеальных случайных блужданий в качестве модели петли для c получается соотношение $c = d/2$, где d – размерность пространства. Таким образом, для трёхмерного пространства c составляет $3/2$, что даёт фазовый переход второго рода.

Впоследствии М. Fisher несколько уточнил расчётные результаты Poland и Scheraga, заменив идеальные случайные блуждания так называемыми самоизбегающими блужданиями. Этот термин обозначает случайные перемещения без возможности повторного попадания в координатную ячейку, которая уже один раз «посещалась» [86].

Блуждания такого типа, имитирующие поведение гибкой полимерной цепи, используются в физике для учёта взаимодействий исключённого объёма. Данные взаимодействия уменьшают число возможных конфигураций цепи.

Значения c , полученные М. Fisher для двух- и трёхмерного случаев, составили, соответственно, 1,46 и 1,75. Таким образом, впервые была показана возможность фазового перехода при плавлении ДНК в двух измерениях. Взаимодействия исключённого объёма снижают удельную конфигурационную энтропию петли при

увеличении её размеров. Поскольку длина петель вблизи $T_{пл}$ резко возрастает, этот эффект может приводить к скачку теплоёмкости, то есть фазовому переходу. Эффекты, связанные с притяжением цепей, М. Fisher не исследовал.

Модели ДНК, в которых её цепи рассматриваются в виде случайных блужданий, получили название моделей Поланда–Шераги или ПШ-типа (англ. «Poland–Scheraga type models», «PS-type models»). С 1967 до 2000 года эти модели не разрабатывались. Тем не менее, физика полимеров в этот период продолжала активно развиваться. Наряду с переходом спираль-клубок теоретиками был изучен ещё один вид фазового перехода – переход клубок-глобула [87, 88]. Состояние глобулы отличается некоторой «структурированностью» – оно имеет более плотную сердцевину, тогда как в наружном слое цепи расположены более рыхло.

Теория перехода клубок-глобула разработана И. М. Лифшицем, А. Р. Хохловым и другими для гибкоцепных полимеров [87–91]. Было показано, что глобула формируется в случае достаточно сильного притяжения между участками цепей полимера в клубке [87, 88]. Исследования физики данного перехода посвящён ряд обзоров [90–92]. В гетерополимерах переход имеет аномальные свойства [89]. В случае ДНК образование глобулы возможно только в присутствии поливалентных катионов [93].

Другим важным направлением физики полимеров стали исследования взаимодействия пары направленных полимерных цепочек. При помощи теории возмущений удалось вычислить кумулянтные функции распределения, учитывающие многочастичные взаимодействия [94, 95]. Благодаря этому стало возможным точное описание случайных взаимодействий цепей полимера. Успехи в области физики полимеров и улучшение расчётных методик способствовали новому витку развития моделей ПШ-типа.

В 2000 году Causo et al. разработали новую модель для денатурации ДНК конечной длины [96]. В этой модели две цепи полимера описываются суммами M сегментов-векторов

$$\omega^1 = \{\omega_0^1, \dots, \omega_M^1\} \text{ и } \omega^2 = \{\omega_0^2, \dots, \omega_M^2\}.$$

Они располагаются в трёхмерной координатной решётке и имеют общее начало:

$$\omega_0^1 = \omega_0^2 = (0,0,0).$$

Цепи ДНК были представлены как самоизбегающие блуждания, а совпадение их концов не являлось обязательным. В модели Causo et al. перекрывание (попадание в одну ячейку) было запрещено как для сегментов одной и той же цепи, так и для сегментов разных цепей [96]. В одной ячейке могли находиться только сегменты, имеющие одну и ту же линейную координату вдоль цепи ($\omega_i^1 = \omega_i^2$) и соответствующие комплементарным основаниям. Эти перекрывания являлись энергетически выгодными. Энергии связывания всех «комплементарных» пар сегментов были одинаковы, то есть гетерогенность ДНК не учитывалась.

Вообще говоря, при достаточно длинных цепях ДНК подобный подход может приводить к появлению нескольких чередующихся участков нативной и денатурированной структуры. Для длинного дуплекса подобная модель подходит намного лучше, чем исходная модель Поланда–Шераги, рассчитывавших энтропию отдельной замкнутой цепи полимера. В работе Causo et al. показано, что при тепловой денатурации ДНК происходит фазовый переход первого рода [96]. Полученный результат согласовался с экспериментальными данными лучше, чем результаты М. Fisher. Это связано именно с учётом взаимодействия комплементарных участков цепей.

Kafri et al. подтвердили соответствие плавления ДНК фазовому переходу первого рода уже при помощи аналитических расчётов [97]. Авторы опирались на результаты В. Duplantier, исследовавшего число возможных конфигураций для общего случая

полимерной сетки с различным количеством ветвей и узлов [98–100]. В модели Kafri et al. учитывались взаимодействия исключённого объёма не только внутри замкнутой петли, но и между петлёй и остатком цепи. Предположив для простоты, что весь остаток цепи находится в нативной форме, Kafri et al. представили ДНК с пузырьком денатурации как полимерную сеть, включающую 4 узла и 4 ветви. Она схематически показана на рис. 1.4. Два узла в сети имеют по 3 отходящие ветви и два – по одной: отсюда их обозначения, V1 и V3.

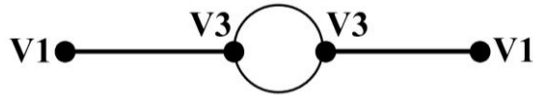


Рис. 1.4. Схематическое представление ДНК с пузырьком денатурации в виде полимерной сети [97].

Формулу (1.5) авторы использовали в виде

$$\omega_k = V \frac{s^k}{Z^c},$$

где s – неуниверсальная (зависящая от свойств полимера) константа, равная $\exp(a')$, а $V = \exp(-b')$ для простоты принята равной единице.

В своей работе Kafri et al. получили простое выражение для c :

$$c = dv - 2\sigma_3, \tag{1.6}$$

где d – размерность пространства, v – экспонента корреляционной длины для самоизбегающего блуждания, а σ_3 – показатель, связанный с узлом типа V3. Взяв из работы В. Duplantier [98] $v = 3/4$ и

$$\sigma_N = \frac{(2 - N)(9N + 2)}{64}$$

(то есть $\sigma_3 = -29/64$) для двух измерений, авторы получили $c \approx 2.4$ для $d = 2$. Формулы

$$\sigma_3 = -\frac{3\varepsilon}{16} + \frac{9\varepsilon}{512} \text{ и } v = \frac{1}{2} \left[1 + \frac{\varepsilon}{8} + \frac{15}{4} \cdot \left(\frac{\varepsilon}{8} \right)^2 \right]$$

в $d = 4 - \varepsilon$ измерениях дают для трёхмерного пространства значение $c \approx 2.115$. Найденная Кафри с соавт. формула

$$c = 2 + \frac{\varepsilon}{8} + \frac{5\varepsilon^2}{256} \tag{1.7}$$

в $d = 4 - \varepsilon$ измерениях также приводит к $c > 2$ в двух- и трёхмерном пространстве [97].

Аналогичный результат был получен также в модели, где не учитывались взаимодействия исключённого объёма внутри одной и той же цепи [101]. Авторы работы учли только взаимодействия исключённого объёма между двумя цепями. По их мнению, отношение длины статистического сегмента к типичной длине пузырька достаточно велико. Поэтому взаимодействия исключённого объёма между сегментами одной и той же цепи должны быть пренебрежимо малы по сравнению с аналогичными взаимодействиями между цепями.

Важная роль взаимодействий исключённого объёма между цепями была показана также в работе Carlon et al. [102]. В этой модели, аналогично работе Causo et al. [96], цепи были представлены в виде пары самоизбегающих блужданий с общим началом

$$\mathbf{r}_1(0) = \mathbf{r}_2(0) = (0,0,0)$$

и свободными концевыми точками. Попадание «комплементарных» сегментов в одну ячейку

$$r_1(i) = r_2(i)$$

было связано с энергетическим выигрышем. Авторы использовали метод Монте-Карло для исследования вероятности образования пузырька при критической температуре в зависимости от его длины [102]. Для демонстрации роли исключённого объёма между цепями рассматривались два варианта модели.

В первом варианте каждая цепь является самоизбегающей, но «некомплементарные» сегменты разных цепей могут занимать одну и ту же ячейку. Второй вариант включает взаимодействия исключённого объёма как внутри цепей, так и между ними. Для обеих моделей показано соотношение

$$Q(M) \sim M^{-c}, \quad (1.8)$$

где $Q(M)$ – вероятность образования пузырька, а M – его длина в сегментах. Даже для ДНК длиной не более 50 сегментов выражение (1.8) остаётся справедливым, по крайней мере, в интервале $2 \leq M \leq 10$. Тем не менее, условие фазового перехода первого рода соблюдается только для второго варианта, в случае которого $c = 2,1$. Для первого варианта c было равно 1,73.

Значение $c > 2$ в трёх измерениях было подтверждено в последующих работах [103–106]. Изучен также случай гетерогенной ДНК, для которого c , по одним данным, было 2,15 [106], а по другим не превышало 1,91 [107]. Пониженная c гетерогенной ДНК указывает на более высокую энтропию образующихся в ней крупных петель по сравнению со случаем гомополимера. Этот расчётный результат хорошо согласуется со многими экспериментальными данными по денатурации природных ДНК, см. следующий раздел.

С помощью моделей ПШ-типа исследовались также эффекты конечного размера [108] и равновесные свойства динамики крупных петель [109–111]. Однако, несмотря на широкие возможности этих моделей, большой размер исследуемых пузырьков денатурации серьёзно ограничивает область их применения. Даже если длина ДНК составляет десятки тысяч пар оснований, температурный интервал, в котором её поведение можно изучать при помощи подобного подхода, весьма узок. Исследование фазового перехода в коротких дуплексах дополнительно осложняется возможностью полного разделения и реассоциации комплементарных цепей. Поэтому для описания плавления ДНК небольшой длины использовались феноменологические модели ближайших соседей.

1.3. Модели ближайших соседей и их роль в исследованиях плавления гетерогенных ДНК

Главной проблемой, решаемой посредством подходов ПШ-типа, было изучение рода фазового перехода, происходящего при денатурации дуплекса. В то же время, с появлением эффективных методов секвенирования нуклеиновых кислот возникла новая задача. Необходимо было изучить связь тонкой структуры профилей плавления гетерогенных ДНК с их нуклеотидной последовательностью. Наиболее подходящими для решения этой задачи были модели ближайших соседей, уже описанные вкратце в разделе 1.1.

Исследования тонкой структуры профилей плавления имеют огромное прикладное значение. Общеизвестно, что плавление гетерогенной ДНК начинается с участков, наиболее богатых АТ-парами. Объектом первых исследований в этой области был бактериофаг λ [112, 113]. В то время в его геноме, имеющем длину около 48 тысяч пар оснований [114], были выделены 3 крупные области, заметно различающиеся по содержанию АТ-пар [113]. При исследовании денатурационного поведения ДНК

наиболее удобным оказалось анализировать не сам фотометрический сигнал, а его производную по температуре. Дифференцируя экстинкцию при 260 нм, Falkow и Cowie выявили несколько пиков [115]. Каждый пик соответствовал плавлению отдельного участка ДНК фага λ , или плавлению нескольких таких участков с близкими критическими температурами. Аналогичные свойства были показаны авторами и для ДНК некоторых других бактериофагов [115].

Анализ дифференциальных профилей плавления стал одним из самых простых и эффективных способов исследования свойств генома. Например, в сочетании с другими методами, он применялся для изучения взаимодействий ДНК хроматина с полипептидами: гистонами [116–118], негистоновыми белками [117, 119] и полилизинном [120]. Кроме того, этот анализ давно и успешно применяется в сравнительной геномике. Уже в конце 1970-х годов с его помощью были найдены существенные сходства в общей организации генома митохондрий [121] и хлоропластов [122] различных эукариот.

В настоящее время анализ плавления ДНК с высоким разрешением, HRMA (англ. high resolution melting analysis), является мощным инструментом сравнения небольших (100–600 пар оснований) фрагментов ДНК. Сочетание данного метода с ПЦР-амплификацией, использование флуоресцентных красителей, специфичных к двухцепочечной форме, позволяет работать с нанограммовыми количествами ДНК. Профили, получаемые методом HRMA, чувствительны даже к единичным заменам пар оснований. Подобный анализ используют для выявления мутаций, генотипирования возбудителей различных заболеваний и в других областях биологии и медицины [123–126]. Пример дифференциальных профилей плавления, получаемых при помощи HRMA, представлен на рис. 1.5.

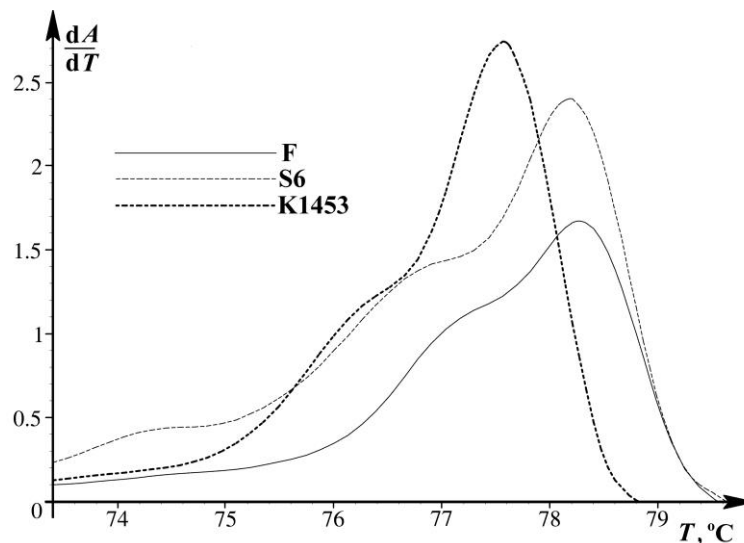
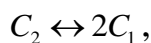


Рис. 1.5. Стандартные дифференциальные профили плавления промоторных регионов гена *vIhA* из различных штаммов *Mycoplasma gallisepticum* [127]. $A(T)$ – фотометрический сигнал. Разрешение составляет около 0.1 °C.

Важной составляющей HRMA является расчёт профилей плавления по нуклеотидной последовательности. Изучение количественной связи между денатурационным поведением ДНК и её первичной структурой стало возможным с развитием молекулярной биологии в конце 1970-х годов. Расшифровка нуклеотидной последовательности способствовала определению точных значений параметров для моделей ближайших соседей. Теоретическое описание профилей плавления играло важную роль в исследованиях связи термостабильности участков ДНК с их биологическими функциями, см., напр., [128]. Данная проблема крайне актуальна,

поскольку она была связана с выяснением роли локальной денатурации ДНК в её взаимодействиях с ферментами.

Подробное описание моделей ближайших соседей, а также сравнение расчётных данных с экспериментами дано в обзоре Wartell и Benight [53]. ДНК рассматривается как квазиодномерная решётка, состоящая из некоторого числа пар оснований. Диссоциация цепей описывается простейшим химическим уравнением



где C_1 – одиночные цепи, а C_2 – дуплекс, в котором хотя бы одна нуклеотидная пара осталась соединённой Н-связями. Таким образом, θ_{ext} – доля двухцепочечных ДНК – определяется как

$$\theta_{ext} = \frac{[C_2]}{[C_2] + 0,5 \cdot [C_1]}. \quad (1.9)$$

В свою очередь, общая фракция закрытых пар оснований $\theta(T)$ описывается выражением

$$\theta(T) = \theta_{ext} \theta_{int}, \quad (1.10)$$

где θ_{int} – доля закрытых пар в молекулах C_2 . В ДНК длиной более 200 нуклеотидных пар величина θ_{ext} близка к единице даже вблизи $T_{пл}$.

В моделях ближайших соседей выделяют три основных параметра: s_i – стабильность i -ой пары оснований, σ' – параметр кооперативности и $f_S(\mu)$ – энтропийный вклад петли, образовавшейся из μ пар оснований [53]. Первый параметр представляет собой константу равновесия для реакции закрывания i -ой пары оснований, находящейся на конце дуплекса. Поскольку при этом образуются не только Н-связи, но и стэкинг-взаимодействия, выражение для s_i записывается как [53]

$$s_i = \exp\left(-\left(G_i + \bar{G}^s\right) \cdot (RT)^{-1}\right), \quad (1.11)$$

где G_i – разность свободных энергий водородных связей между закрытым и открытым состоянием пары, \bar{G}^s – аналогичная разность энергии стэкинга, усреднённая по всем сочетаниям оснований, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура. Величины G_i и \bar{G}^s меньше нуля, так как при $T < T_{пл}$ открытое состояние энергетически менее выгодно, чем закрытое. Для краткости изложения мы принимаем энергию стэкинг-взаимодействий одинаковой для всех соседних пар оснований. Более сложный случай, в котором величина \bar{G}^s является гетерогенной, детально рассмотрен в обзоре Wartell и Benight [53].

Параметр σ' в приближении гомогенной \bar{G}^s имеет вид

$$\bar{\sigma}' = \exp\left(\bar{G}^s \cdot (RT)^{-1}\right). \quad (1.12)$$

Он является характеристикой не индивидуальной пары оснований, а последовательности открытых пар. Эта величина учитывает тот факт, что для открывания пары оснований, расположенной в середине дуплекса, требуется разрушение двух стэкинг-взаимодействий, в отличие от концевой пары. Хорошей иллюстрацией роли σ' может служить выражение для константы равновесия $K_{d,2}$ в реакции одновременного открывания двух соседних пар оснований [129]:

$$K_{d,2} = \frac{\sqrt{\sigma'_{i-1,i}} \cdot f_S(2) \cdot \sqrt{\sigma'_{i+1,i+2}}}{s_i \cdot s_{i+1}} = \frac{\bar{\sigma}' \cdot f_S(2)}{s_i \cdot s_{i+1}}. \quad (1.13)$$

Если эти пары находятся на конце, то есть $i = 1$, то $\sqrt{\sigma'_{i-1,i}} = 1$. Даже при $\bar{G}^s = -7,5$ кДж/моль замена $\bar{\sigma}'$ на $\sqrt{\sigma}'$ в числителе формулы (1.13) повышает значение $K_{d,2}$ при $T = 300$ К в 5 раз.

Параметр $f_s(\mu)$ учитывает разницу энтропии открытого и закрытого участков ДНК длиной μ пар оснований. Он отражает вероятность того, что комплементарные нити имеют благоприятную пространственную ориентацию для уменьшения размеров открытого участка на одну пару оснований. В самом простом случае эта величина определяется выражением

$$f_s(\mu) = (\mu + \gamma)^{-z}$$

где $1 \leq z \leq 2$, а γ часто выбирают равным единице [53]. Вообще, $f_s(\mu)$ является достаточно сложной функцией и в разных работах её определяют по-разному [там же].

Основной областью применения моделей ближайших соседей было описание плавления гетерогенных ДНК различной длины и определение энергий стэкинг-взаимодействий. Позднее эти феноменологические модели легли в основу ряда программ, специализированных для расчёта профилей плавления: POLAND [130], MELTSIM [131, 132], GeneFizz [133] и других [134]. Помимо своего прикладного значения (как составляющей HRMA и т. п.) расчёты профилей плавления имеют большое значение для развития эволюционной геномики [135, 136].

Хотя подходы ближайших соседей способны довольно точно описывать профили плавления, с их помощью невозможно изучать физические основы перехода спираль-клубок в ДНК. Этот недостаток не является общим для всех Изинг-подобных моделей. Так, благодаря подходам ПШ-типа изучена зависимость кооперативности плавления от изменения удельной конфигурационной энтропии пузырьков, сопровождающего их рост. Тем не менее, во всех Изинг-подобных моделях пара оснований описывается бинарной переменной. Это не позволяет изучать перенос и локализацию энергии нелинейных возбуждений в ДНК.

Процессы переноса энергии играют огромную роль в динамике открываний ДНК при температуре около 300 К. Вследствие неравномерной локализации энергии, вероятность появления пузырька в разных областях гетерогенной ДНК может различаться на несколько порядков [29]. В исследованиях динамики дуплекса при малых температурах ключевую роль сыграли так называемые механические модели. В этих моделях относительное удлинение водородной связи при открывании нуклеотидной пары описывается обычной переменной, которая может быть радиальной либо угловой. Подробное описание механических моделей приведено в следующей главе.

2. МЕХАНИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ДНК. МОДЕЛЬ ПЕЙЯРДА–БИШОПА–ДОКСУА

2.1. Первые механические модели ДНК

История механических моделей ДНК очень богата, однако их подробное описание выходит за рамки нашей работы. По этой теме написано достаточное количество хороших обзорных работ (см., например, [137]), в том числе монография Л. В. Якушевич «Нелинейная физика ДНК» [138]. Общей чертой механических моделей является описание поведения пар оснований посредством непрерывных, а не бинарных, переменных.

Исследования нуклеиновых кислот при помощи механических моделей были начаты в 80-х годах, когда исследователи впервые обратили внимание на возможность переноса энергии в дуплексе [139]. S. Englander впервые предположил, что энергия колебаний молекулярной решётки дуплекса может концентрироваться в уединённых

волнах (solitary-wave excitations). Его модель состоит из двух параллельных осей с прикреплёнными к ним крутильными маятниками – точечными массами на палочках определённой длины [140]. Водородные связи описываются через взаимное притяжение оснований-точек, для каждой из которых существует единственная степень свободы – торсионный угол φ . По этой причине полная денатурация ДНК в данном подходе исключена. Решения для уравнений движения модели хорошо известны, однако она является слишком грубой для описания динамики открытых состояний дуплекса.

Более реалистичная модель, названная впоследствии динамической моделью плоских оснований-роторов (англ. «the dynamic plane-base rotator, DPBR model») была предложена S. Yomosa [141, 142]. В этом подходе точки прикрепления P_n и P'_n n -ых комплементарных оснований к сахарофосфатному остову расположены, как и сами основания, в n -ой плоскости OXY. Векторы направления B_n и B'_n образуют с отрезком $P_nP'_n$ углы $\chi_n = \angle P'_nP_nB_n$ и $\chi'_n = \angle P_nP'_nB'_n$, которые и являются степенями свободы.

Схема данной модели представлена на рис. 2.1.

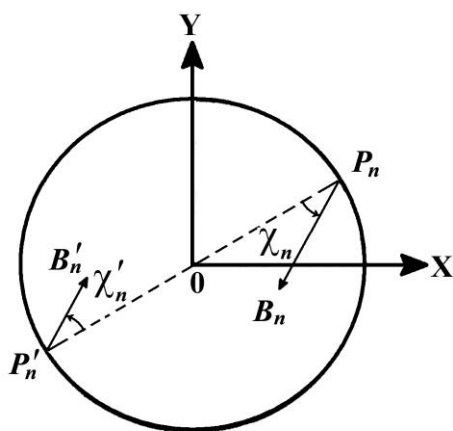


Рис. 2.1. Иллюстрация модели S. Yomosa [142]. Объяснения см. в тексте.

S. Yomosa предложил следующий гамильтониан:

$$\begin{aligned}
 H = & \left\{ \frac{1}{2} J (\dot{\chi}_n^2 + \dot{\chi}'_n{}^2) + \tilde{X} (1 - \cos \chi_n) + \right. \\
 & \tilde{X} (1 - \cos \chi'_n) + \tilde{Y} (1 - \cos \chi_n \cos \chi'_n) \\
 & \left. + S_0 [1 - \cos (\chi_n - \chi_{n-1})] + S_0 [1 - \cos (\chi'_n - \chi'_{n-1})] \right\},
 \end{aligned} \tag{2.1}$$

где J – средний момент инерции нуклеотидов в плоскости оснований вокруг осей P_n и P'_n , параметры \tilde{X} и \tilde{Y} учитывают влияние растворителя и взаимодействие оснований между собой, а S_0 – суммарную энергию стэкинг-взаимодействий и торсионного напряжения.

При аналитическом исследовании модели было использовано континуальное приближение. Данный подход позволял изучать перенос энергии, но не её локализацию. Как следует из полученных S. Yomosa решений, «континуальные» кинки и антикинки свободно проходят друг сквозь друга [142]. Тем не менее, для случая $X \neq 0$ были воспроизведены состояния локального выпадения оснований из спирали, что сделало возможным сравнение расчётных данных с экспериментом [142].

S. Yomosa исследовал статистическую механику модели, рассчитав удельную концентрацию солитонов в ДНК при разных температурах. Считая открытой пару оснований, находящуюся в середине солитона, в рамках модели можно принять число открытых пар равным числу солитонов.

Таким образом были оценены термодинамические параметры открывания отдельной пары оснований [142]. Результаты расчётов находились в согласии с данными, полученными методом обмена протонов в гомополимерной ДНК [143–145]. Впрочем, стоит заметить, что в то время времена жизни открытых состояний ДНК оценивались экспериментаторами неверно. Данный вопрос будет рассмотрен в разделе 5.2, а современные методы определения времён жизни открытых состояний отдельных пар оснований – в разделе 5.1.

Динамическая модель плоских оснований-роторов получила дальнейшее развитие в работах Takeno и Nomma [146, 147]. Гамильтониан их модели был аналогичен гамильтониану S. Yomosa, однако в подходе Takeno и Nomma были дополнительно учтены диполь-дипольные взаимодействия оснований. Авторы исследовали частный случай при $X = 0$. Подобные исследования проводились также С. Zhang [148], который отводил ключевую роль комбинации Н-связей с диполь-дипольными взаимодействиями.

Таким образом, в первых механических моделях состояние каждого основания описывали через торсионную степень свободы. Необходимо заметить, что в отношении ДНК слово «торсионный» обычно применяется как характеристика напряжений сахарофосфатного остова, связанных с изменением длины витков дуплекса. Поэтому, во избежание путаницы, мы также будем применять этот термин к степеням свободы, связанным со суперспирализацией. Смещения отдельных оснований вокруг оси сахарофосфатного остова, в свою очередь, будем называть угловыми. На наш взгляд, это же название хорошо подходит и для моделей, в которых используются данные степени свободы.

Второй особенностью подходов этой группы было неизменное расстояние между точками прикрепления оснований к сахарофосфатному остову. Поэтому полное разделение цепей в данных моделях было исключено. Следовательно, угловые модели можно использовать только для изучения низкотемпературной динамики локальных возбуждений в ДНК. Прямых экспериментальных подтверждений солитонной природы этих возмущений в то время не было. Вообще говоря, их нет и сейчас, однако современные знания о динамике ДНК указывают на возможность косвенного исследования вклада солитонов. Это можно сделать, например, подробно исследовав кинетику обмена протонов иминогруппы в отсутствие внешнего катализатора, см. разделы 5.4, 6.4, а также заключение.

Невозможность прямого сравнения расчётных данных с экспериментами сильно ограничивала применение угловых моделей и серьёзно затрудняла определение их параметров. Экспериментальные данные позволяли судить только о статистике открываний ДНК, но не давали никакой информации об их динамике. Так появилась необходимость в моделях, для которых помимо переноса энергии было бы удобно изучать статистическую механику, не прибегая при этом к континуальному приближению.

2.2. Ввод радиальной степени свободы для пары оснований. Модель Пейярда–Бишопа–Доксуа

В начале 1980-х годов наряду с угловыми моделями возник ещё один механический подход к изучению динамики ДНК, впервые использованный группой E. Prohofsky [149–151]. Изначально объектом исследования было поведение ансамбля водородных связей в молекулах аммиака [149] и цепочках гомополимерной ДНК [150] при повышении температуры. Для описания Н-связи в данной механической модели впервые был использован потенциал Морзе [149]. Впоследствии, с использованием модернизированного подхода самосогласованных фононов, было показано, что

нелинейность Н-связи является важным условием накопления энергии колебаний молекулярной решётки ДНК, необходимой для открывания [151].

Работы группы Е. Prohofsky стали важной предпосылкой возникновения новой модели, разработанной Peyrard и Bishop [152]. Это был первый механический подход, «специализированный» не для исследования солитонов в ДНК, а для изучения её денатурации. Введение радиальных переменных вместо угловых дало возможность исследовать динамику открытых состояний любой амплитуды.

Для анализа статистической механики и температурной зависимости среднего расстояния между цепями Peyrard и Bishop применили метод интеграла перехода (англ. «transfer integral technique»), который хорошо подходит для дискретных моделей. Это дало авторам возможность отказаться от континуального приближения, используемого в ранних механических моделях молекулы ДНК, и учесть дискретность её строения. Модель оказалась удобной для аналитического исследования.

Две цепи ДНК в данном подходе представлены через наборы координат u_n и v_n , а Н-связи внутри пар оснований описываются потенциалом Морзе. При этом стэкинг-взаимодействия учтены через обычный гармонический потенциал. Таким образом, гамильтониан системы имел вид:

$$H = \sum_n \frac{1}{2} m (\dot{u}_n^2 + \dot{v}_n^2) + \frac{1}{2} k [(u_n - u_{n-1})^2 + (v_n - v_{n-1})^2] + D (\exp[-a(u_n - v_n)] - 1)^2, \quad (2.2)$$

где m – эффективная масса нуклеотидов, k – жёсткость стэкинговой «пружинки», D и a , соответственно, глубина и ширина потенциальной ямы для взаимодействия внутри комплементарной нуклеотидной пары. Переписав гамильтониан в более простом виде и введя новые координаты по формулам

$$x_n = \frac{(u_n + v_n)}{\sqrt{2}} \quad \text{и} \quad y_n = \frac{(u_n - v_n)}{\sqrt{2}},$$

авторы получили

$$k \left((u_n - u_{n+1})^2 + (v_n - v_{n+1})^2 \right) = k \left((x_n - x_{n+1})^2 + (y_n - y_{n+1})^2 \right).$$

В новых координатах гамильтониан принял вид

$$H = \frac{1}{2} \sum_n \left[m \dot{x}_n^2 + k (x_n - x_{n-1})^2 \right] + \sum_n \left[\frac{m \dot{y}_n^2}{2} + \frac{1}{2} k (y_n - y_{n-1})^2 + D (\exp[-a y_n \sqrt{2}] - 1)^2 \right]. \quad (2.3)$$

Данная модель получила название модели Пейярда–Бишопа, далее ПБ [152].

Авторы не интересовались переносом дуплекса в пространстве как целого, а рассмотрели только расхождение его цепей. Поэтому для описания денатурации они использовали только координаты y_n .

Пейярд и Бишоп рассчитали $\langle y \rangle$ – среднее по ансамблю отклонение длины Н-связи от равновесной – как функцию температуры. Расчёт был выполнен для трёх значений k – 0.002, 0.003 и 0.004 Å⁻². Для каждого значения k была вычислена температура плавления ДНК в континуальном приближении. Авторы пришли к выводу, что денатурация ДНК может инициироваться за счёт локализации энергии, ведущей к возникновению высокоамплитудных нелинейных возбуждений [152].

Позднее было проведено численное определение собственных функций и собственных значений уравнения для интеграла перехода [153]:

$$\int dy_{n-1} e^{-\beta\psi(y_n, y_{n-1})} \phi_i(y_{n-1}) = e^{-\beta\epsilon_i} \phi_i(y_n), \quad (2.4)$$

где ψ – потенциал взаимодействия между парами оснований y_n и y_{n-1} , $\beta = 1/k_B T$ (k_B – константа Больцмана), а ϵ_i и ϕ_i – соответственно, собственные значения и собственные функции интегрального уравнения (2.4). Параллельно было получено аналитическое решение нелинейного уравнения Шредингера (НУШ) в континуальном приближении.

Численный расчёт был проведён без приближений, путём диагонализации матрицы интеграла перехода и замены интеграла суммами дискретных вкладов. Использовались формулы суммирования различных порядков. В работе [153] было показано возрастание роли локализованных возбуждений в денатурации ДНК при приближении температуры к критической. Несмотря на то, что модель ПБ чрезвычайно проста по сравнению с реальным дуплексом, она удовлетворительно описывала переход, полученный в экспериментах (см. рис. 1.3).

С возникновением модели ПБ появилась возможность напрямую сравнивать расчётные результаты с экспериментом. Более того, при численном моделировании с использованием термостата Нозе-Хувера была получена картина поведения пузырьков денатурации ДНК во времени. Зарождение, перемещение и слияние денатурированных областей ведут, в конечном счете, к полной денатурации дуплекса. Однако численная проверка аналитического решения НУШ, наряду с огромным влиянием дискретности, показала и несовершенство самой модели. Численные расчёты давали огромные значения $T_{пл}$ – примерно на 150 К выше экспериментальных данных [153]. Кроме того, сам переход оказался слишком плавным по сравнению как с аналитическим решением, так и с экспериментами.

В связи с этим в модель был феноменологически введён ангармонический потенциал, описывающий стэкинг-взаимодействия; в результате её гамильтониан принял следующий вид [154]:

$$H = \sum_n \left[\frac{1}{2} m \dot{y}_n^2 + V(y_n) + W(y_n, y_{n-1}) \right], \quad (2.5)$$

где

$$V(y_n) = D(e^{-ay_n} - 1)^2$$

и

$$W(y_n, y_{n-1}) = \frac{k}{2} (1 + \rho e^{-\chi(y_n + y_{n-1})}) (y_n - y_{n-1})^2. \quad (2.6)$$

В выражении (2.6) χ – коэффициент затухания для стэкинг-взаимодействий, а ρ – безразмерный параметр, через который вводится кооперативность денатурации.

Новый подход получил название модели Пейярда-Бишопа-Доксуа, далее ПБД [154]. Авторы исследовали статистическую механику модели методом интеграла перехода, определяя собственные функции и собственные значения уравнения типа (2.4) с новым потенциалом:

$$f(y_n, y_{n-1}) = W(y_n, y_{n-1}) + \frac{1}{2} [V(y_n) + V(y_{n-1})]. \quad (2.7)$$

В силу ангармоничности стэкингового потенциала, аналитическое исследование модели ПБД было невозможным. Поэтому авторы рассчитывали зависимость $\langle y \rangle$ от T численно, а также при помощи молекулярной динамики, аналогично работе [153]. Результаты, полученные при помощи этих методов, находились в хорошем соответствии между собой. Более того, они оказались намного ближе к

экспериментальным данным: полученная температура плавления составляла 361.5 К, а сам переход был весьма резким.

В работе [154] было показано, что причиной резкого перехода в модели ПБД является именно ангармоничность стэкинга. Роль ангармонического стэкинг-потенциала в описании резкого фазового перехода была подтверждена также путём моделирования цепей ДНК случайными блужданиями [155].

Позднее физические основы поведения модели ПБД были исследованы подробно, а ключевая роль возрастания энтропии при разрушении стэкинг-взаимодействий доказана строго [156]. Авторы данной работы провели сравнительное исследование моделей ПБ и ПБД. Они впервые показали фундаментальные различия в поведении этих моделей при возрастании температуры. Причиной резкого расхождения цепей ДНК при умеренных температурах в модели ПБД является именно кооперативность плавления, вводимая ангармоническим потенциалом (2.6). Работа [156] была также важным методическим вкладом в исследования свойств фазового перехода в олигонуклеотидах конечной длины.

Независимо от Пейярда и Бишопа, модель с радиальными степенями свободы была исследована L. Van Zandt [157]. В его подходе для описания Н-связей был использован потенциал, сходный с потенциалом Леннарда-Джонса. В модели Van Zandt на каждую нуклеотидную пару приходилось 2 степени свободы – по одной на основание. Это позволило учесть сдвиговые деформации. При помощи численного моделирования L. Van Zandt изучил поведение отдельных солитонобразных возбуждений в ДНК бесконечной длины. Дальнейшие исследования в этом направлении также не имели отношения к денатурации и касались, в основном, природы возбуждений и выбора параметров [158–160].

Введение радиальной степени свободы для нуклеотидной пары явилось закономерным шагом в развитии механических моделей ДНК. Однако подходы, в которых смещение оснований из равновесного положения описывается через углы поворота, актуальны до сих пор. Более того, последние данные упрощённой молекулярной динамики указывают на достаточно малый энергетический барьер выхода отдельных оснований из уотсон-криковской спирали, а также на выраженную нелинейность подобных конформационных изменений [161–163]. Это дополнительно подтверждает большое значение угловых моделей, из которых наиболее разработанной является модель Л. В. Якушевич, введённая в 1989 году [164]. Изучению топологических солитонов в ДНК при помощи этой модели и её модификаций посвящено большое число работ – см. [165–172] и ссылки в них.

Ещё одним важным инструментом изучения динамики ДНК стали модели, в которых наряду с радиальными переменными используются торсионные. Подобные подходы оказались более сложными для исследования, однако они предоставили теоретикам новые возможности.

2.3. Подходы с использованием комбинации торсионной и радиальной степеней свободы

Исследование моделей ДНК, в которых радиальные степени свободы сочетаются с торсионными, является перспективным направлением. Такие подходы позволяют учитывать спиральную геометрию молекулы ДНК и роль искажений сахарофосфатного остова. Впервые радиально-торсионная модель была предложена Barbi et al., которые задали для каждой пары оснований две степени свободы [173]. Помимо относительного удлинения водородной связи r_n , было введено φ_n – относительное изменение угла между линиями, соединяющими точки прикрепления оснований к сахарофосфатному остову. Как легко видеть, вторая составляющая отличается от степеней свободы пар в угловых моделях. Схема подхода приведена на рис. 2.2.

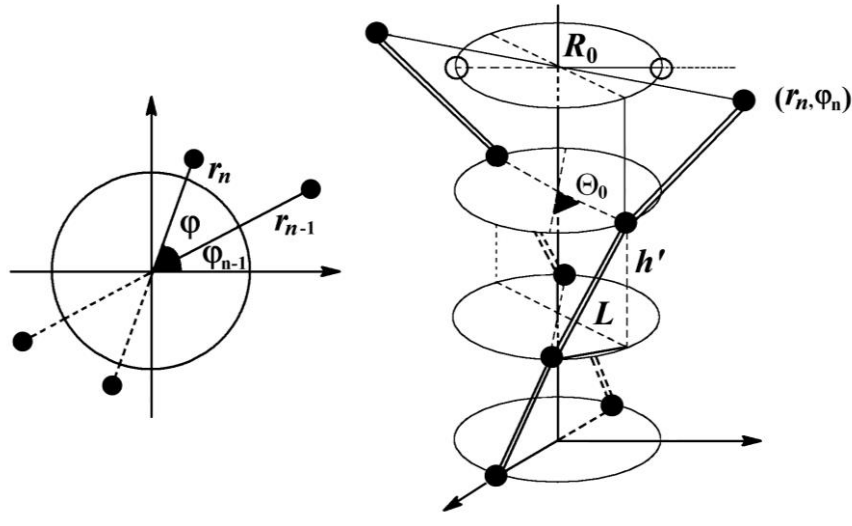


Рис. 2.2. Схема радиально-торсионной модели из работы [173]. r_n и φ_n – степени свободы для нуклеотидной пары, R_0 и Θ_0 – их равновесные значения; h' – постоянное расстояние между плоскостями оснований. Ср. рис. 2.1.

Равновесное расстояние L между точками прикрепления оснований составляло

$$L = \sqrt{h'^2 + (2R_0 \sin(0.5 \cdot \Theta_0))^2},$$

где h' – постоянное расстояние между плоскостями оснований, равно 3.4 \AA . Величины R_0 и Θ_0 также определялись из известных данных о структуре ДНК: $R_0 = 10 \text{ \AA}$, $\Theta_0 = 36^\circ$. Лагранжиан данной модели имел вид:

$$\begin{aligned} \mathfrak{L} = & \sum_n (mr_n^2 + mr_n^2 \varphi_n^2) - \sum_n D (\exp[-a(r_n - R_0)] - 1)^2 \\ & - \sum_n C_{el} \left(\sqrt{h'^2 + r_{n-1}^2 + r_n^2 - 2r_{n-1}r_n \cos(\varphi_n - \varphi_{n-1})} - L \right)^2 \\ & - \sum_n G_0 (\varphi_{n+1} + \varphi_{n-1} - 2\varphi_n)^2, \end{aligned} \quad (2.8)$$

где m – эффективная масса, D и a – соответственно глубина и ширина ямы потенциала Морзе, C_{el} – эластическая константа и G_0 – константа кривизны остова (англ. – «backbone curvature constant»). Первый член лагранжиана описывает кинетическую энергию системы, второй – взаимодействие пары комплементарных оснований. Третий и четвертый члены соответствуют потенциальной энергии ДНК, возникающей за счёт изменения её спиральности. Последующие модификации модели Varbi et al. касались изменения именно двух последних членов.

Солитонные решения, полученные при помощи данного подхода, топологически отличались от солитонов в «плоской» модели Пейярда-Бишопа, см. [174]. Учёт спиральной геометрии молекулы ДНК впервые позволил исследовать поведение пузырьков, инициированных отрицательной суперспирализацией дуплекса. Это было сделано в работе А. Самра, который несколько упростил первоначальную модель [175]. А. Самра ввёл ограничение небольших угловых деформаций $\varphi_n > \varphi_{n-1}$. Это позволило ему заменить четвертый член формулы (2.8) более простым гармоническим выражением

$$b_0 \cdot (r_{n+1} - r_n)^2 / 2,$$

где b_0 – некоторая эластическая константа. Пузырьки, индуцированные отрицательной суперспирализацией в этой модели, способны перемещаться на большие расстояния. На их стабильность не влияет ни тепловой шум, ни гетерогенность структуры ДНК. Однако, по-видимому, данное свойство отчасти является следствием гармоничности стэкинг-потенциала в подходе А. Самра [175].

Одной из важнейших областей применения радиально-торсионной модели стало изучение полной денатурации дуплекса под действием внешней силы – микромеханической денатурации. Разделение цепей ДНК путём микромеханического «раскручивания» изучено в ряде экспериментов, см. раздел 3.1. Тем не менее, описать этот процесс в радиальных моделях невозможно. Соссо и Monasson исследовали торсионную и тепловую денатурацию в радиально-торсионной модели, применив формализм матрицы перехода [176]. Рассчитав статистическую сумму, авторы получили свободную энергию денатурации в окрестности фазового перехода.

В варианте подхода, разработанном Соссо и Monasson, расстояние между точками прикрепления оснований к сахарофосфатному остову было фиксированным и равным, соответственно, L . Деформацию спирали учитывали через её продольное растягивание, то есть изменение величины h' . Часть гамильтониана, соответствующая четвёртому члену формулы (2.8), имела вид

$$E \cdot \exp[-\chi(r_n + r_{n-1} - 2R)] \cdot (r_n - r_{n-1})^2 + V_\Gamma(\varphi_n - \varphi_{n-1}), \quad (2.9)$$

где χ – коэффициент затухания стэкинг-взаимодействия, E – его эластическая константа, равная $4 \text{ эВ}/\text{Å}^2$, а V_Γ – угловая константа упругости. Эту модификацию применяли также для исследования различных колебательных мод в ДНК, интерпретации ряда рамановских спектров и некоторых данных по рассеянию нейтронов [177].

Введение ангармонического стэкинга, по аналогии с гамильтонианом Пейярда-Бишопа-Доксуа, существенно улучшило свойства модели и соответствие расчётных данных с экспериментальными. Новый подход позволил, например, воспроизвести силовой барьер в начале процесса микромеханической денатурации, см. раздел 3.3. Использованный при этом вариант модели, кроме того, позволял хорошо описывать макроскопическое поведение ДНК при её микромеханическом расплетании [178]. С помощью улучшенной модели также удалось описать фазовый переход первого рода, происходящий при тепловой денатурации ДНК [179]. Лагранжиан «окончательной» версии модели имел вид:

$$\begin{aligned} \mathfrak{S} = & m \sum_n (\dot{r}_n^2 + r_n^2 \dot{\varphi}_n^2) - \sum_n D (\exp[-\alpha(r_n - R_0)] - 1)^2 \\ & - \sum_n K \left(\sqrt{h^2 + r_{n-1}^2 + r_n^2 - 2r_{n-1}r_n \cos(\varphi_n - \varphi_{n-1})} - L \right)^2 \cdot \\ & \cdot \exp[-b(r_n + r_{n+1} - 2R_0)], \end{aligned} \quad (2.10)$$

где b – коэффициент затухания, учитывающий конечность стэкинг-взаимодействий.

Как легко видеть из сравнения формул (2.8) и (2.10), ангармонический стэкинг является единственным отличием этого лагранжиана от первоначально введённого [173]. Описанная модель Соссо et al. является далеко не единственным теоретическим подходом, учитывающим спиральную геометрию молекулы ДНК. Существует множество других исследований различных двух- и трёхмерных моделей [180–183]. В последнее время данное направление активно разрабатывается.

Хотя радиально-торсионные модели значительно сложнее в плане аналитического и численного изучения, они способны учитывать искажения структуры ДНК, вызванные внешним торсионным напряжением. Однако большинство физико-химических

экспериментов проводят на релаксированных ДНК, в которых эти искажения отсутствуют. Можно считать, что поведение таких молекул описывается радиальными и радиально-торсионными моделями одинаково хорошо. Действительно, резкий фазовый переход, к примеру, наблюдался как в подходе ПБД [154, 156], так и в модели Varbi et al. [179].

Второй отличительной чертой экспериментов по денатурации является то, что очень многие из них проводили на гетерогенных ДНК. В случае гетерогенного дуплекса аналитическая обработка моделей становится невозможной. В то же время, численные расчёты намного удобнее выполнять для простых уравнений движения. Радиально-торсионные подходы в случае гетерогенной ДНК имеют ещё один серьёзный недостаток – значительные трудности в подборе параметров на основе экспериментальных данных. Таким образом, простота уравнений движения и относительное удобство подбора параметров являются ключевым преимуществом радиальных моделей в теоретических исследованиях динамики релаксированной ДНК.

2.4. Области применения радиальных подходов. Проблемы моделирования гетерогенной ДНК

Одной из важных областей применения радиальных моделей стало теоретическое исследование поведения дуплекса при его тепловой денатурации. К примеру, процесс плавления изучали с помощью модифицированной теории возмущений в модели ПБ [184]. Аналогичный подход применяли в модели, где комплементарные Н-связи описываются кубичным потенциалом [185]. Поздние аналитические подходы более разнообразны. Например, денатурацию гомогенной ДНК в модели ПБД исследовали методом интегрирования по путям [186], который обычно не применяют для изучения биополимеров. В другой работе зависимость $T_{пл}$ гетерогенной ДНК от её нуклеотидного состава воспроизведена через сравнение поведения модели ПБ с моделями смачивания [187].

Проводилось также численное моделирование плавления ДНК конечной длины в реальном растворе. В этом случае предотвращение окончательного расхождения цепей на бесконечное расстояние достигалось путём модификаций гамильтониана (2.5). Модификации заключались в добавлении к плато потенциала Морзе малого положительного наклона [188] или бесконечной стенки, чтобы значения y_n не могли превысить некоторую максимальную величину [189].

Существует множество подходов, позволяющих воспроизвести резкий фазовый переход при критической температуре. Например, это можно сделать путём учёта конечности стэкинг-взаимодействий в явном виде

$$W(y_n, y_{n+1}) = \frac{\Delta H^\circ}{2} \left(1 - e^{-\alpha(y_n - y_{n+1})^2}\right) + k(y_n - y_{n+1})^2, \quad (2.11)$$

где ΔH° – стандартная энтальпия стэкинга, а k в 2000 раз меньше, чем та же величина в модели ПБД [190, 191]. Подобный результат можно получить и в модели Пейярда-Бишопа, путём ввода асимметрического двойного потенциала Морзе [192], или учёта взаимодействия ДНК с растворителем [193].

Второй областью, где применялись радиальные модели, является изучение поведения солитонов в гомогенной ДНК. Особенностью солитонов в радиальных моделях является то, что они тесно связаны с пузырьками денатурации в релаксированном дуплексе. В большинстве подобных работ исследовались модели ПБ [194–197] и ПБД [198–200]. Модификации модели ПБ здесь касались, в основном, учёта взаимодействий между соседними витками ДНК через молекулы воды [201, 202] и искажений дуплекса, вводимых через диполь-дипольные взаимодействия [203–205]. Существует также ряд работ, где поведение солитонов исследовалось в альтернативных

моделях. Среди них системы, использующие для описания водородных связей потенциал ϕ^4 [206, 207], квадратичный потенциал [208], плоская зигзагообразная модель [209] и другие.

Среди альтернативных подходов особое место занимает модель Тоды-Леннарда-Джонса [210] (см. [211] для обзора). На каждую пару оснований в данной модели приходится по 4 степени свободы (рис. 2.3). Смещения оснований вдоль оси дуплекса описываются потенциалами Тоды:

$$V_{T,I}(\lambda'_n - d_l) = a''/b'' \exp[-b''(\lambda'_n - d_l)] + a''(\lambda'_n - d_l), \quad (2.12)$$

где d_l – равновесное расстояние между плоскостями оснований ($d_l = 3,4 \text{ \AA}$), параметры a'' и b'' подбираются из экспериментальных данных, а λ'_n – расстояние между соседними основаниями одной цепи (см. рис. 2.3):

$$\lambda'_n = \sqrt{(d_l - (x'_n - x'_{n+1}))^2 + (u'_n - u'_{n+1})^2}$$

Выражения для потенциала второй цепи $V_{T,II}$ и λ''_n аналогичны. Комплементарные водородные связи в модели описываются потенциалом Леннарда-Джонса:

$$V_{LJ}(\tau_n - d_t + d_h) = 4\kappa \left[\left[\frac{q}{\tau_n - d_t + d_h} \right]^{12} - \left[\frac{q}{\tau_n - d_t + d_h} \right]^6 \right], \quad (2.13)$$

где параметры κ и q подбирают из экспериментальных данных, d_t – равновесный диаметр двойной спирали, а $d_h = 2^{1/6} \cdot q$ – равновесная длина водородной связи. Величина τ_n обозначает расстояние между основаниями двух цепей:

$$\tau_n = \sqrt{(d_t - v_n - u'_n)^2 + (y'_n - x'_n)^2}$$

и таким образом длина водородной связи соответствует $\tau_n - d_t + d_h$.

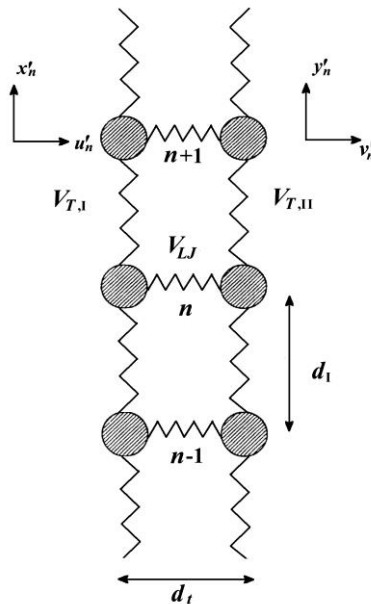


Рис. 2.3. Схема модели Тоды-Леннарда-Джонса [210].

Гамильтониан модели Тоды-Леннарда-Джонса имеет вид:

$$H = \sum_{n=1}^N \frac{1}{2} M (\dot{x}_n'^2 + \dot{u}_n'^2) + \frac{1}{2} M (\dot{y}_n'^2 + \dot{v}_n'^2) + V_{L,I} (\tau_n - d_i + d_h) + V_{T,I} (\lambda_n' - d_i) + V_{T,II} (\lambda_n'' - d_i). \quad (2.14)$$

Muto et al. исследовали динамику нетопологических солитонов в гомогенной кольцевой молекуле ДНК при различных значениях κ – глубины потенциальной ямы для водородной связи [210]. Авторами получена динамическая картина пузырьков при температуре 310 К. При этом глубина потенциальной ямы была равна 0.044 эВ, что близко к величине, использованной в работах Peyrard et al. – 0.04 эВ [153, 154]. Одним из важных результатов был временной масштаб локальной денатурации ДНК: пузырьки не закрывались в течение почти 100 пс [210]. Аналогичные расчёты для модели ПБД дают не более 4 пс даже для открытых состояний большой длины в гетерогенной ДНК [212]. Согласно экспериментальным данным, время жизни пузырьков достигает 1 мс [213]. Таким образом, модель Тоды-Леннарда-Джонса даёт результаты, которые почти на два порядка ближе к эксперименту. Поэтому дальнейшая разработка этой модели является перспективным направлением. К примеру, модифицировав потенциал Тоды, видимо, можно описывать конформационные переходы, возникающие при растягивании ДНК вдоль оси – так называемые β -премелтоны [214, 215].

На наш взгляд, наиболее интересной областью применения радиальных моделей является исследование поведения солитонов и пузырьков в гетерогенной ДНК. Зависимость динамики открываний от последовательности нуклеотидов представляет собой проблему, имеющую важное прикладное значение в молекулярной биологии. Первые исследования переноса энергии и взаимодействия квазисолитонов с «точечными» примесями в ДНК были выполнены Tschega et al. в модели ПБД [216]. Неоднородности массы и водородных связей вводились для отдельных пар оснований гомогенного дуплекса.

Для изучения динамики пузырьков в ДНК, содержащей длинный гетерогенный участок, впервые была использована модель Тоды-Леннарда-Джонса [217]. В работе [217] этот участок имел вид

.....НННННННSWSWSWSWSWSWSWSWNННННННН.....

где для пар Н в потенциале Леннарда-Джонса было принято среднее значение κ . Для W и S эта величина составляла $\kappa_W = 0.8 \cdot \kappa$ и $\kappa_S = 1.2 \cdot \kappa$, что приблизительно соответствует соотношениям энтальпии водородной связи в АТ- и GC-парах. Кроме того, гетерогенность была дополнительно учтена через изменение параметров потенциала Тоды.

После ввода гетерогенных участков в центр моделируемого дуплекса суммарная энергия связей на единицу его длины не менялась. Тем не менее, в численных расчётах было показано, что вероятность коллективного разрыва Н-связей при этом существенно возрастает. Работа [217] была первым шагом в теоретических исследованиях проблемы «кода пузырька», которые проводятся и в настоящее время.

Помимо исследований гетерогенности водородных связей, в 90-х годах изучали зависимость динамики ДНК от неоднородности масс и стэкинг-взаимодействий. Например, Forinash et al. изучали взаимодействие дискретных бризеров с дефектами масс в модели ПБ [218], а также в её модификации с кубичным потенциалом для водородных связей [219]. Chela-Flores и Migoni, вернувшись в модели ПБ к двум степеням свободы на нуклеотидную пару (см. выражение (2.2)), моделировали гомогенную ДНК, однако ввели неоднородность стэкинг-взаимодействий [220]. В их

«пуриново-пиримидиновой» модели для цепей были введены различные значения константы жёсткости стэкинга k : k_C и k_G .

Переломным моментом в моделировании гетерогенной ДНК стала работа итальянских исследователей Campa и Giansanti [221]. Авторы определили индивидуальные параметры модели ПБД для АТ- и GC-пар. Путём сравнения теоретических профилей плавления с экспериментальными данными по денатурации коротких олигомеров ДНК, авторы получили $D_{AT} = 0.05$ эВ, $a_{AT} = 4.2 \text{ \AA}^{-1}$ для АТ-пар и $D_{GC} = 0.075$ эВ, $a_{GC} = 6.9 \text{ \AA}^{-1}$ для GC-пар. Вычисленные характеристики стэкинг-взаимодействий не зависели от последовательности нуклеотидов и составляли: $k = 0.025 \text{ эВ} \cdot \text{\AA}^{-2}$ и $\chi = 0.35 \text{ \AA}^{-1}$. Во всех последующих работах, где модель ПБД использовалась для изучения гетерогенной ДНК, использовались именно эти величины параметров.

Результаты Campa и Giansanti дали возможность интерпретировать поведение гетерогенной ДНК в разнообразных экспериментах, которые мы опишем далее. Данные исследования подтвердили правильность подобранных параметров модели ПБД, особенности которой определили её значительную роль в исследовании динамики пузырьков.

В моделях, где присутствуют только угловые степени свободы, образование пузырьков невозможно. Радиально-торсионные подходы позволяют учитывать как радиальные смещения оснований, так и их взаимодействие с торсионным напряжением сахарофосфатного остова. Подобные модели незаменимы при изучении денатурации участков ДНК с ненулевой суперспирализацией. Динамику этих фрагментов невозможно описать при помощи радиальных моделей. Однако главным преимуществом последних является их относительная простота. Это становится очень важным фактором при переходе к численным расчётам для релаксированных гетерогенных дуплексов.

Таким образом, для описания большинства экспериментов по денатурации ДНК наиболее подходящими являются радиальные модели. Однако, за исключением ПБД, все модели этого типа характеризуются гармоническим межсайтовым потенциалом, то есть конечность стэкинг-взаимодействий в них не учитывается [201, 202, 204–210, 217]. Возможно, при соответствующей оптимизации и определении параметров некоторые из этих моделей описывали бы локальные расплетания ДНК лучше, чем модель Пейярда-Бишопа-Доксуа. Тем не менее, ни для одной из них такая оптимизация выполнена не была. Поэтому модель ПБД является на сегодняшний день единственным простым механическим подходом, используемым для исследования денатурации гетерогенной ДНК. Обычно эта модель позволяет воспроизводить профили плавления менее точно, чем модели ближайших соседей, описанные в разделе 1.3. Однако природа последних является феноменологической. Поэтому они не могут считаться полноценным инструментом изучения физических основ денатурации. Этот вопрос подробно рассмотрен в разделе 6.2.

Известно, что ни один из простых подходов не способен описать все аспекты денатурационного поведения. Тем не менее, в своей совокупности модели этого уровня позволили выяснить физико-химическую природу многих интересных свойств ДНК, изученных в экспериментах. До сих пор в данном обзоре мы рассматривали, в основном, работы по изучению тепловой денатурации ДНК. Однако этот тип экспериментов является далеко не единственным. Немалая часть закономерностей денатурации открыта в опытах по микромеханическому разделению цепей дуплекса. Можно сказать, что в этой области экспериментальные и теоретические исследования денатурации ДНК дополняли друг друга ещё более удачно. Материал по микромеханической денатурации подробно представлен далее.

3. ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОМЕХАНИЧЕСКОЙ ДЕНАТУРАЦИИ ЕДИНИЧНЫХ ДУПЛЕКСОВ

Эксперименты на отдельных молекулах полимеров удивительны тем, что они позволяют получать информацию о «механических» свойствах ансамбля химических связей. Эта информация является уникальным дополнением к сведениям о молекулярной структуре. Существует целый ряд интересных свойств ДНК, которые было бы невозможно открыть, если бы не были придуманы методики микромеханической денатурации. Теоретические модели, в свою очередь, позволили изучить физико-химическую основу свойств ДНК, установленных в механических экспериментах.

3.1. Экспериментальные данные

Несмотря на то, что методики механического расплетания двухцепочечной ДНК сложны и трудоёмки, экспериментальный материал в этой области достаточно богат. Исследования денатурации этого типа детально описаны в ряде тематических обзоров [222, 223]. Одни из первых микромеханических экспериментов были проведены Smith et al. [224]. Исследовано поведение дуплекса при его продольном растягивании под действием сил в интервале 0.1–10 пН. Сил этого диапазона вполне достаточно для преодоления энтропийной жёсткости ДНК, являющейся следствием её многочисленных естественных искривлений [225]. В результате расстояние между концами ДНК сначала достигает её контурной длины (длины оси спирали), а потом становится несколько больше – уже за счёт небольшой деформации самой спирали. В дальнейших экспериментах показано, что при внешней силе в 65–70 пН происходит кооперативный конформационный переход дуплекса в другую форму. Его длина при этом увеличивается в 1.7 раза по сравнению с нативной В-ДНК. Новая конформация получила название S-ДНК [215]. При уменьшении внешней силы S-ДНК релаксировала, образуя исходную В-ДНК. Данные конформационные переходы, так же как и денатурация, оказались чувствительными к ионной силе и pH раствора [226].

Поведение ДНК при её скручивании было изучено в похожих экспериментах Allemand et al. [227]. Авторы показали, что в отрицательно суперспирализованной молекуле повышена вероятность денатурации. Однако при положительном скручивании получен неожиданный результат: ДНК переходила в форму с очень малым шагом спирали и вывернутыми наружу основаниями. Подобная структура получила название Р-ДНК [227].

Впоследствии было показано, что ДНК можно денатурировать путём продольного растягивания только одной из её цепей [228, 229]. При этом полной денатурации точно так же предшествует переход в S-ДНК. Схема эксперимента представлена на рис. 3.1.

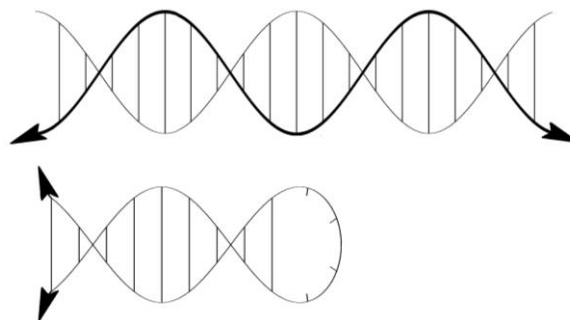


Рис. 3.1. Схематическое изображение эксперимента по денатурации ДНК продольным растягиванием. Сверху: денатурация нативной ДНК. Снизу: «поперечный» разрыв шпильки, возникшей при релаксации гомополимерной ДНК. Схема адаптирована из теоретической работы [180].

Один из концов цепи прикреплялся к подложке, другой – к кронштейну атомно-силового микроскопа. По его отклонению судили о сопротивлении ДНК [229]. Если растягиванию подвергали регулярный гетерополимер, релаксация сопровождалась заворачиванием (самокомплементарных) цепей в шпильки. Для разрыва аденин-тиминовой шпильки требовалось усилие в 9 ± 3 пН, для разрыва гуанин-цитозиновой – 20 ± 3 пН [229].

В экспериментах также показано, что ДНК бактериофага λ после В–S перехода при 65 пН расплетается на отдельные цепи при внешней силе более 150 пН [229]. Более того, оказалось, что при снижении скорости растягивания уменьшается и сила, необходимая для денатурации: при очень малых скоростях было достаточно 70–80 пН [228]. Эта особенность, как мы увидим далее, оказалась важной для понимания денатурационного поведения ДНК.

Эксперименты по скручиванию и растягиванию двухцепочечной ДНК дали важную информацию о её механических свойствах и характерных конформационных переходах. Однако главным направлением исследований были попытки «механического секвенирования» ДНК. В их основе лежала идея установления нуклеотидной последовательности по сопротивлению при растаскивании цепей за их концы. Первые эксперименты по денатурации ДНК путём «поперечного» растягивания проводились Bockelmann et al. в 1997 году [230]. Схематически эксперимент показан на рис. 3.2.

На конце молекулы одна из цепей прикрепляется через связку к стеклянной подложке, а другая – к полистирольной бусине, связанной со стеклянной микроиглой. Жёсткость иглы была очень мала – 1.7 пН/мкм. Прикреплённый к бусине кончик микроиглы служит плечом момента силы, который измеряют по отклонению кончика от равновесного положения.



Рис. 3.2. Схематическое изображение эксперимента по «поперечной» микромеханической денатурации ДНК [230]. Объяснения см. в тексте.

Bockelmann et al. показали, что механическое открывание дуплекса ДНК происходит скачкообразно, включая ряд выраженных циклов натяжения-скольжения (англ. «stick-slip cycles»), по аналогии с макроскопическим твёрдым трением. Сила, необходимая для разрыва одной пары оснований, варьирует в интервале 12–15 пН.

В другой работе установлена чёткая корреляция (с разрешением порядка сотен пар оснований) между нуклеотидным составом локальных участков ДНК и силой, необходимой для их денатурации, [231]. Профили денатурации, то есть кривые «координата–сила», оказались абсолютно симметричными при поперечном растягивании с концов [231]. Кроме того, при увеличении скорости разрыва от 20 до 800 нм/с они менялись незначительно. Авторы интерпретировали свои результаты на основе равновесных расчётов, в пределе нулевой скорости смещения. В масштабе сотен

и тысяч пар оснований такой подход вполне оправдан, так как по сравнению с молекулярными движениями поперечное растягивание происходит крайне медленно.

При помощи более совершенного оборудования – так называемого оптического пинцета – разрешение профиля было улучшено до масштаба десяти и менее пар оснований [232]. Однако на таком высоком разрешении локальные различия между сигналами проявлялись даже при скорости открывания в 20 нм/с. Эти результаты, по словам авторов, показывают, что тепловое равновесие не всегда наблюдается при измерениях, даже когда расплетание ДНК происходит с минимальной скоростью. При высоком разрешении наблюдаемый сигнал «скачет» между дискретными значениями. По мнению авторов, это было следствием переходов системы между различными минимумами в поверхности потенциальной энергии [232]. Поэтому «механическое секвенирование» невозможно выполнить современными методами. Впрочем, решение этой проблемы всё же найдено: описана модель «физического» секвенирования путём протаскивания дуплекса через нанопору [233]. Время задержки при этом определяется температурой, характером нуклеотидной пары и разностью потенциалов.

3.2. Теоретические исследования микромеханической денатурации. Анализ равновесных свойств моделей

Модели, используемые для описания конформационного перехода дуплекса при его продольном растягивании, обычно достаточно просты. ДНК представляют как цепочку элементов, для каждого из которых характерны два состояния с длинами l_1 и l_2 – см. [215] и ссылки в этой работе.

Изучению денатурации под действием торсионного напряжения и влияния суперспирализации на процесс плавления посвящено достаточное число работ. Этот вопрос исследовался при помощи Изинг-подобных подходов [33, 35, 234–239], а также в радиально-торсионных моделях [175, 176, 240].

Флуктуации суперспиральности ДНК возможны даже без внешней силы, однако они невелики. Суммарное торсионное напряжение дуплекса в этом случае близко к нулю, то есть ДНК релаксирована. Суперспирализация, вызванная внешней силой или взаимодействием со специфическими ферментами, может приводить к более выраженным изменениям динамики пузырьков. Тем не менее, подробное рассмотрение этого случая выходит за рамки нашей работы в силу причин, перечисленных ниже.

Во-первых, если на релаксированных молекулах *in vitro* путём эксперимента можно получить хотя бы косвенную информацию о свойствах пузырьков денатурации, то аналогичных методик исследования сверхспирализованной ДНК не существует.

Во-вторых, суперспирализованное состояние ДНК характерно, в основном, для живой клетки. Транспорту торсионного напряжения вдоль дуплекса могут препятствовать не только белки, связанные с ДНК, но и её естественные искривления [241]. Это может приводить к неравномерному распределению суперспирализации. В результате, её значение на том или ином участке становится неизвестным, а установить его невозможно. С другой стороны, по некоторым данным, от степени суперспирализации зависит само положение участков с наибольшей вероятностью локального расплетания [236, 242]. Кроме того, значительная часть ДНК в эукариотической клетке намотана на гистоны. Эти обстоятельства сильно затрудняют исследование динамики пузырьков *in vivo*.

В-третьих, как уже было сказано во введении, релаксированные ДНК более удобны в качестве проводников для наноэлектронных устройств. Динамика пузырьков в подобных дуплексах будет определяться исключительно последовательностью нуклеотидов.

Несмотря на всю сложность суперспирализованной ДНК, моделирование её динамики помогло понять многие характеристики поведения «торсионных»

расплетаний. В частности, оно оказалось полезным для предсказания мест наиболее вероятного возникновения пузырьков *in vivo*. Выяснилось, что они часто совпадают с местами специфического ДНК-белкового взаимодействия [235, 236, 243, 244]. Более того, недавно появились работы по крупномодульной молекулярной динамике, в которых поведение пузырьков в отрицательно суперспирализованной плазмиде исследовано на временах микросекундного масштаба [245].

Расплетание ДНК под действием «поперечного» усилия исследовалось при помощи моделей тех же типов, что и её плавление. Среди Изинг-подобных подходов центральное место в изучении микромеханической денатурации заняли модели ПШ-типа. Их главным преимуществом является «фундаментальность» расчёта изменений конфигурационной энтропии ДНК при увеличении длины денатурированной области. Исследования денатурации в моделях этой группы и сравнение теоретических результатов с экспериментальными данными хорошо описаны в обзоре Kumar и Li [246].

Подходы ПШ-типа позволили изучить многие закономерности денатурации, вызванной совместным действием внешней силы и повышенной температуры. Поведение моделей исследовано для широкого диапазона значений данных величин [247–252]. Подробно рассмотрены также варианты, когда внешняя сила приложена к комплементарным цепям в середине молекулы (так называемая «фаза глаза» – eye phase) [248–251] и к их 5'-концам [252]. В последнем случае усилие вызывает денатурацию за счёт сдвига.

Успеху изучения денатурации в моделях ПШ-типа дополнительно способствовало появление новых способов учёта взаимодействий исключённого объёма. К примеру, использование взаимопритягивающих самоизбегающих блужданий (англ. – «MASAW», «mutually-attracting-self-avoiding walks») позволило учесть возможность образования шпильчатых структур при микромеханической денатурации [250]. В блужданиях этого типа исключалось также попадание комплементарных статистических сегментов в одну ячейку («непересекающиеся» блуждания).

Проблема фазовых переходов в квазиодномерных системах является одной из важнейших в современной теоретической физике. Модели ПШ-типа занимают уникальную нишу среди теоретических инструментов её исследования. Однако динамика поперечной микромеханической денатурации имеет ряд важных особенностей, которые удобнее изучать в механических моделях. К примеру, это скачкообразное открывание дуплекса, описанное в предыдущем разделе. Одним из наиболее известных теоретических подходов, в которых исследовалась природа этого явления, является модель Lubensky и Nelson [253, 254].

Lubensky и Nelson исследовали поперечное расплетание ДНК, пользуясь методами равновесной статистической механики. Показателем степени денатурации являлось μ – число открытых пар оснований. В отсутствие внешней силы потенциальная энергия системы зависела только от μ : положения максимумов и минимумов этой функции определялись нуклеотидной последовательностью. В численных исследованиях модели показано, что приложенная сила создаёт «наклон» поверхности потенциальной энергии [254]. Это способствует необратимым скачкообразным переходам системы между минимумами, глубина которых растёт с повышением μ . Заметим, что приведённое объяснение является упрощённым. Исследовав равновесные свойства модели, Lubensky и Nelson продемонстрировали также существенные различия в кооперативности микромеханического расплетания гомогенной и гетерогенной ДНК [253, 254].

Тем не менее, ценность экспериментов, проводимых на единичных молекулах, заключается именно в том, что они позволяют получать информацию о динамических особенностях дуплекса. Одним из примеров являются быстрые осцилляции сигнала, наблюдаемые при микромеханической денатурации с высоким разрешением [232]. Установлено также, что воспроизводимость профилей ренатурации, получаемых при

постепенном снижении внешней силы, значительно ниже воспроизводимости обычных «силовых» профилей расплетания [232]. Ещё одним косвенным подтверждением вклада динамики является существенный разброс значений внешней силы, необходимой для расплетания гомогенных шпилек [229].

В основе подобных явлений лежит неравномерность распределения энергии колебаний нуклеотидных пар, «динамическая гетерогенность» дуплекса. Поэтому изучить их природу при помощи равновесной статистической механики невозможно. В данном случае необходимы теоретические исследования процессов переноса и нелинейной локализации энергии в дуплексе.

3.3. Роль переноса и локализации энергии в динамике силового расплетания дуплекса

Невозможность «микромеханического секвенирования» ДНК была показана теоретически за несколько лет до проведения соответствующих экспериментов [255, 256]. Согласно выводам ранних работ, точное определение последовательности нуклеотидов невозможно из-за тепловых флуктуаций одноцепочечных областей ДНК, связывающих дуплекс с микроиглой.

Вклад динамики самого дуплекса был исследован позднее, в модифицированной модели ПБД [257]. Модификация заключалась в добавлении к «стандартному» гамильтониану члена, описывающего внешнюю силу:

$$H = \sum_n \left[\frac{1}{2} m \dot{y}_n^2 + D_n (e^{-a_n y_n} - 1)^2 + \frac{k}{2} (1 + \rho e^{-\alpha(y_n + y_{n-1})}) (y_n - y_{n-1})^2 \right] - \frac{c_0}{2} (y_0 - y_1)^2, \quad (3.1)$$

где c_0 – жёсткость плеча момента сил, а $y_0 = v \cdot t$ – его смещение, скорость которого v известна и является постоянной.

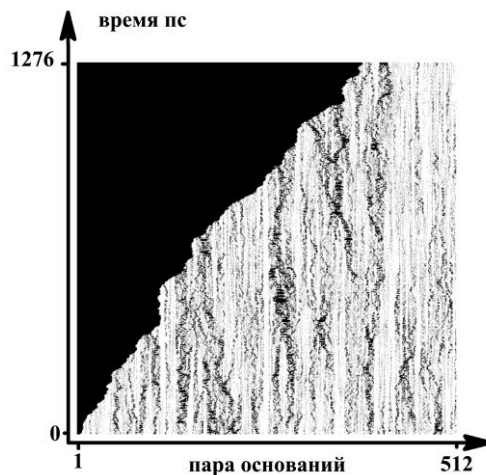


Рис. 3.3. Динамика поперечного разрыва дуплекса длиной 512 пар оснований под воздействием внешней силы. Объяснения см. в тексте.

В данной работе впервые показано, что флуктуации в профилях микромеханической денатурации проявились бы даже в случае гомополимерной ДНК. Причиной подобного поведения является «динамическая гетерогенность», создаваемая неравномерной локализацией энергии в дуплексе. Взаимодействие внешнего усилия с динамикой нелинейных колебаний нуклеотидных пар показано на рис. 3.3 [257]. По горизонтальной оси отложена координата пары оснований, по вертикальной – время в

пикосекундах. Представлена динамика 512 пар оснований в течение 1.276 нс. Состояние пар показано цветом: чёрный соответствует расхождению оснований более чем на 1.5 Å, белый – закрытым парам.

Из рисунка 3.3 видно, что когда фронт механического разрыва доходит до участка, в котором преобладают закрытые пары, происходит временная задержка денатурации, пока натяжение не станет достаточно большим для её продолжения. Возобновление разрыва приводит к освобождению напряжения и снижению измеряемой силы. Аналогичная релаксация происходит и в случае встречи фронта разрыва с открытой областью – разрыв ДНК резко ускоряется. В случае гомогенной ДНК описать скачкообразный характер микромеханического расплетания, основываясь на равновесной теории, невозможно.

Позднее было проведено более подробное исследование кинетики «поперечной» механической денатурации [13]. В указанной работе М. Peyrard представлен математический анализ этого процесса. В частности, изучено влияние скорости поперечного разрыва на сопротивление дуплекса в модели ПБД. Стоит отметить, что при исследованиях данной модели, из соображений экономии машинного времени, использовались очень высокие скорости денатурации [13, 257] – на 7–10 порядков выше, чем в экспериментах. Однако даже в этих условиях были получены весьма показательные результаты. При скоростях $2.5 \cdot 10^9 - 2.5 \cdot 10^{11}$ нм/с расчётное значение внешней силы достигало 64 пН, однако уже при $2.5 \cdot 10^8$ нм/с сопротивление дуплекса снижалось до 16 пН, приближаясь к экспериментальным данным (около 13 пН) [13]. Согласно выводам М. Peyrard, при достаточно медленной денатурации время разрыва одной пары оснований превышает время жизни локализованных мод настолько, что их влияние усредняется.

Если теперь вернуться к работам Rief с соавт. [228, 229], см. раздел 3.1, то очевидно, что похожий механизм действует и при микромеханической денатурации путём растягивания одной из цепей. По-видимому, если внешнее усилие невелико, оно всего лишь стабилизирует локальные конформационные изменения, возникающие за счёт тепловых флуктуаций. В этом случае S-ДНК денатурирует в результате накопления «критической концентрации» данных изменений. Внешняя сила всего лишь снижает вероятность обратных переходов локальных участков дуплекса в более стабильные конформации.

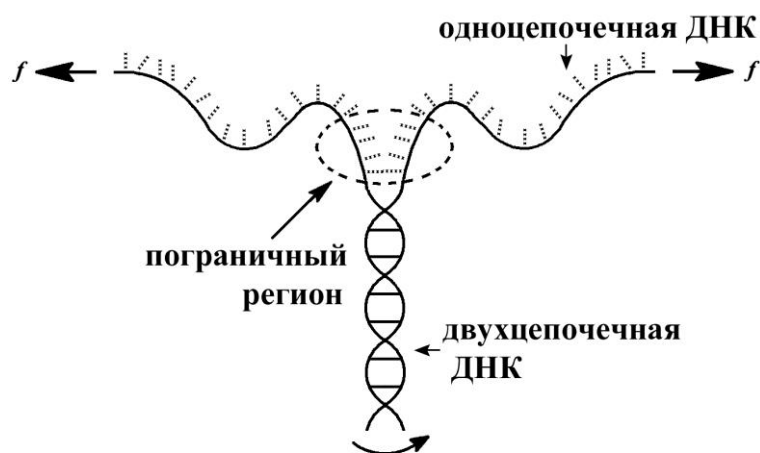


Рис. 3.4. Иллюстрация пограничной области расплетаемого дуплекса, существованием которой объясняется наличие силового барьера. Пограничный регион смещается вдоль дуплекса в процессе микромеханической денатурации ДНК, происходящей под воздействием внешней силы f [178].

Другим важным свойством дуплекса, открытым в экспериментах с одиночными молекулами, является наличие силового барьера, препятствующего началу поперечной

микромеханической денатурации [258]. Его существование было предсказано Соссо et al., использовавшими полумакроскопический вариант комбинированной модели [178]. По мнению авторов, наличие барьера легко объяснимо с термодинамической точки зрения, поскольку на небольшом участке, где в данный момент происходит поперечное растягивание дуплекса, сохраняются стэкинг-взаимодействия. Схема этого процесса показана на рис. 3.4. Последующее разрушение стэкинга частично компенсирует затраты свободной энергии на разрыв Н-связей (за счёт роста энтропии) в течение всего процесса денатурации, кроме, разумеется, его начала.

В микроскопическом масштабе барьер возникает в результате суммирования производных потенциала Морзе и ангармонического стэкинга по координате [178]. Позднее силовой барьер был воспроизведён в модели ПБД [259]. В работе Singh и Y. Singh была подробно изучена зависимость величины барьера F_c от температуры, энергии водородных связей в парах оснований и параметров ангармонического потенциала, описывающего стэкинг-взаимодействия [259]. Оказалось, что силовой барьер определяется только параметрами модели и не зависит, например, от участка дуплекса, к которому приложена внешняя сила. Вычисленные величины F_c для разрыва с конца и с середины практически не отличались между собой. Зависимость внешней силы от пути, пройденного силовым зондом, представлена на рис. 3.5.

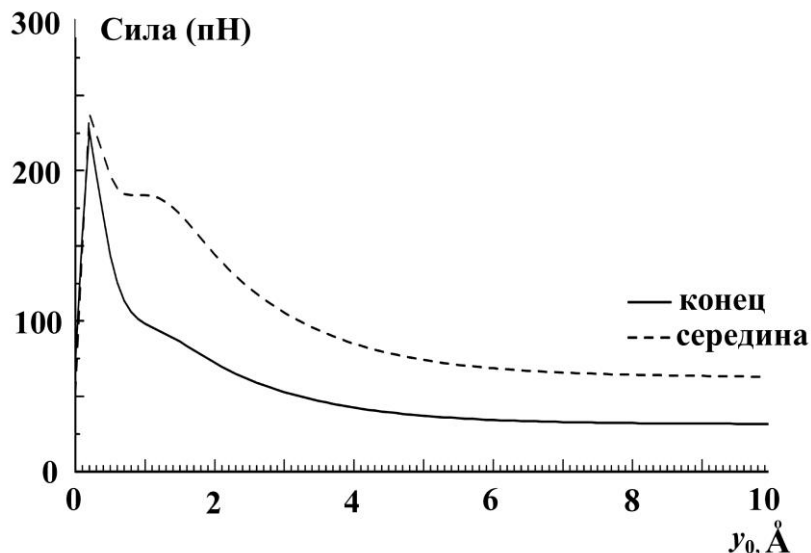


Рис. 3.5. Зависимость усреднённой внешней силы от смещения зонда в модели ПБД [259]. Сплошной линией показан график для разрыва с конца дуплекса, пунктирной — для разрыва с середины.

Ещё одним фактором, определяющим величину силового барьера, оказалась жёсткость зонда c_0 (см. выражение (3.1)), движущегося с постоянной скоростью. Эта зависимость была исследована методом Монте-Карло в работе Voulgarakis et al. [260]. Снижение c_0 приводило к постепенному уменьшению барьера, который полностью исчезал при $c_0 \leq 16$ пН/нм. По словам авторов, этот факт имеет простое объяснение. При смещении зонда с малой жёсткостью постепенно появляется второй энергетический минимум, соответствующий открытому состоянию первой нуклеотидной пары. Второй минимум постепенно увеличивается, а барьер, разделяющий две потенциальные ямы, сглаживается. При достижении $y_0 - y_1$ некоторой критической величины происходит разрыв концевых нуклеотидных пар и начало поперечной микромеханической денатурации. Величина 16 пН/нм соответствует примерно $0.001 \text{ эВ} \times \text{Å}^{-2}$, что, например, в 25 раз меньше, чем эластическая константа стэкинга, см. [221]. В другом предельном случае, то есть при очень большой жёсткости

зонда, второй минимум не образуется. При $c_0 \geq 10 \text{ эВ} \cdot \text{Å}^{-2}$ величина силового барьера определяется только максимальной производной суммарного потенциала по координате.

Теоретическое исследование скачкообразного микромеханического разрыва, силового барьера при его инициации, конформационных переходов дуплекса и других особенностей денатурационного поведения ДНК внесло значительный вклад в физику биополимеров. Оно позволило «дорисовать» многие тонкости микромеханической денатурации, не изученные экспериментаторами и осветить их физическую природу. В свою очередь, эксперименты по силовой денатурации единичных дуплексов позволили «испытать на прочность» различные модели ДНК и способствовали их дальнейшему улучшению.

В настоящее время продолжают активные исследования денатурационной динамики ДНК, требующие совместных усилий теоретиков и экспериментаторов. Одной из наиболее актуальных проблем в этой области является изучение динамики пузырьков в гетерогенной ДНК при температурах значительно ниже $T_{пл}$. Данной проблеме посвящены следующие главы.

4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПУЗЫРЬКОВ ДЕНАТУРАЦИИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Основной темой предыдущих глав были теоретические и экспериментальные исследования полной денатурации – процесса, в результате которого ДНК разделяется на две цепи. Даже в главе 2, посвящённой механическим моделям, центральное место заняли радиальные и радиально-торсионные подходы, в которых возможна полная денатурация. Экспериментальные исследования плавления ДНК позволили улучшить её модели и уточнить значения их параметров. В свою очередь, усовершенствованные модели помогли понять физические основы кооперативного разделения цепей ДНК. Однако применение теоретических подходов не ограничивается изучением полной денатурации. Математическое моделирование сыграло также огромную роль в исследовании открытых состояний, возникающих при температурах, существенно меньших $T_{пл}$.

4.1. Поведение пузырьков в коротких ДНК. Метод закалки самокомплементарных олигомеров

Как мы уже упоминали в разделе 1.3, области ДНК с различной концентрацией АТ-пар денатурируют при разных температурах. Это свойство гетеродуплекса оказалось полезным для изучения денатурации при помощи фотометрии в интервале длин волн от 260 до 268 нм. Среди теоретических исследований в этой области важную роль играло выяснение роли переноса и локализации энергии в динамике пузырьков при помощи модели ПБД.

Наиболее удобной для механического моделирования является короткая ДНК, состоящая из двух-трёх областей с выраженной разностью концентрации АТ-пар. В силу малой длины пузырьков, образующихся вначале в АТ-богатых доменах, эффекты исключённого объёма при денатурации таких ДНК незначительны, см. раздел 1.2. Поэтому расчётные профили плавления олигомеров удобны для сравнения с экспериментом.

Основным недостатком коротких дуплексов являются «эффекты конечного размера» (англ. «finite size effects»). Нормированный фотометрический сигнал приблизительно равен $1 - \theta_{ext} \cdot \theta_{int}$, см. выражение (1.10). Если длина молекул невелика, то доля недиссоциировавших дуплексов θ_{ext} начинает снижаться примерно при той же температуре, при которой впервые появляется сам сигнал. Другими словами, нельзя

определить, какой вклад в снижение гипохромизма вносят пузырьки денатурации, а какой – полностью диссоциировавшие молекулы.

Проблема конечного размера была успешно решена группой G. Zocchi в 2003 году [54, 55]. Разработанный метод получил название «методики закалки» (англ. – «quenching technique»). В основе метода лежит способность самокомплементарных олигомеров закручиваться в шпильчатые структуры.

При резком охлаждении раствора таких ДНК, нагретого прежде до заданной температуры, исходный дуплекс образуют только молекулы, не успевшие денатурировать полностью. Одиночные цепи за время охлаждения не успевают найти партнёра для образования двойной спирали. В силу своей самокомплементарности они сворачиваются в шпильки и образовывать исходный дуплекс уже не могут. Схема метода показана на рис. 4.1.

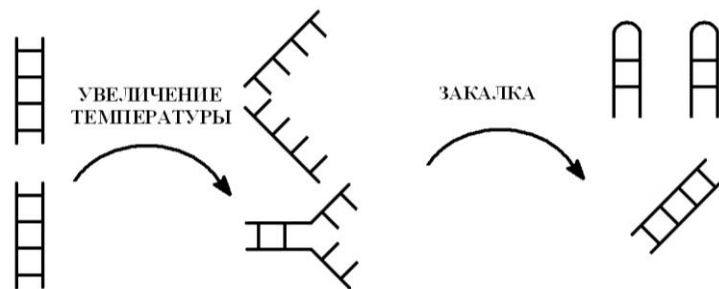


Рис. 4.1. Схема методики закалки самокомплементарных олигомеров. Объяснения см. в тексте.

Так как молекулярная масса шпилек меньше массы дуплексов в 2 раза, их можно разделять путём электрофореза в агарозном геле. После окраски гелей бромистым этидием легко получить флуоресцентный профиль – кривую зависимости флуоресценции от линейной координаты. По соотношению площадей, ограниченных соответствующими пиками на этом профиле, определяют относительную концентрацию шпилек и дуплексов.

Таким образом, комбинируя фотометрические измерения с закалкой шпилек, можно вычислить не только долю разрушенных пар $f(T)$, но и концентрацию полностью диссоциировавших молекул $p(T)$. Из этих величин легко найти $\langle l \rangle(T)$ – отношение усреднённой по ансамблю дуплексов длины пузырька к длине самого олигомера:

$$\langle l \rangle(T) = \frac{f(T) - p(T)}{1 - f(T)}. \quad (4.1)$$

Montrichok et al. изучили две последовательности, условно обозначенные ими как $L_{48}AS$ и $L_{42}V_1$ [54]. Шпильчатые структуры, образуемые этими олигомерами, обозначены на рис. 4.2.

В олигомере $L_{42}V_1$ АТ-богатый район расположен посередине. Длина GC-богатых областей на концах дуплекса невелика, всего 12 пар оснований. Поэтому полностью диссоциировавшие молекулы начинают появляться в растворе при относительно низких температурах. Уже при 60°C их доля достигает 0.1. Денатурационное поведение $L_{42}V_1$ может указывать на роль больших флуктуаций в АТ-богатых регионах: эти флуктуации «разрывают» GC-богатые концевые области [54].

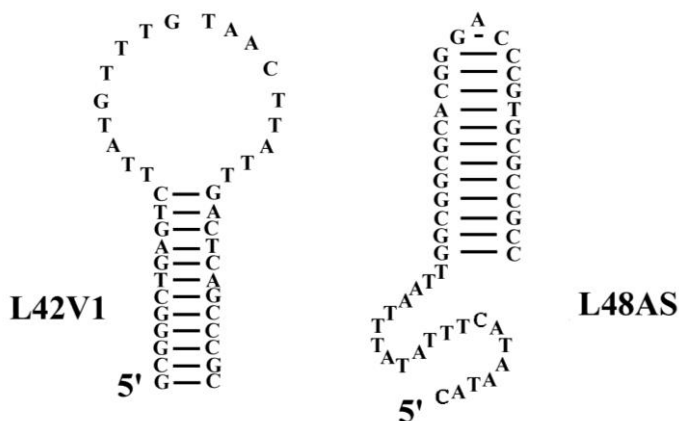


Рис. 4.2. Шпильчатые структуры, образуемые в результате заковки олигомеров L_{48AS} и L_{42V1} [54]. Длина L_{48AS} и L_{42V1} составляет, соответственно, 48 и 42 пары оснований.

В L_{48AS} GC-богатая область сосредоточена на одном из концов и имеет длину 27 пар оснований. Поэтому $p(T) \approx 0$ даже при 65°C , хотя $f(T)$ начинает возрастать уже около 45°C – при той же температуре, что и в L_{42V1} . Однако в интервале $75\text{--}80^\circ\text{C}$ наблюдается резкий скачок фракции диссоциировавших дуплексов – от 0.15 до 0.97. При этом температура, при которой $f(T) = 0.5$, составляет около 67°C . Другими словами, вклад полностью диссоциировавших молекул в общий фотометрический сигнал при $T_{пл}$ очень мал. Плавное нарастание $f(T)$ для L_{48AS} говорит о низкой кооперативности денатурации AT-богатых участков. Выход $\langle l \rangle(T)$ на плато (около 0.7) при 75°C и последующий резкий скачок $p(T)$ свидетельствует о том, что в GC-богатых областях кооперативность денатурации, напротив, очень высока.

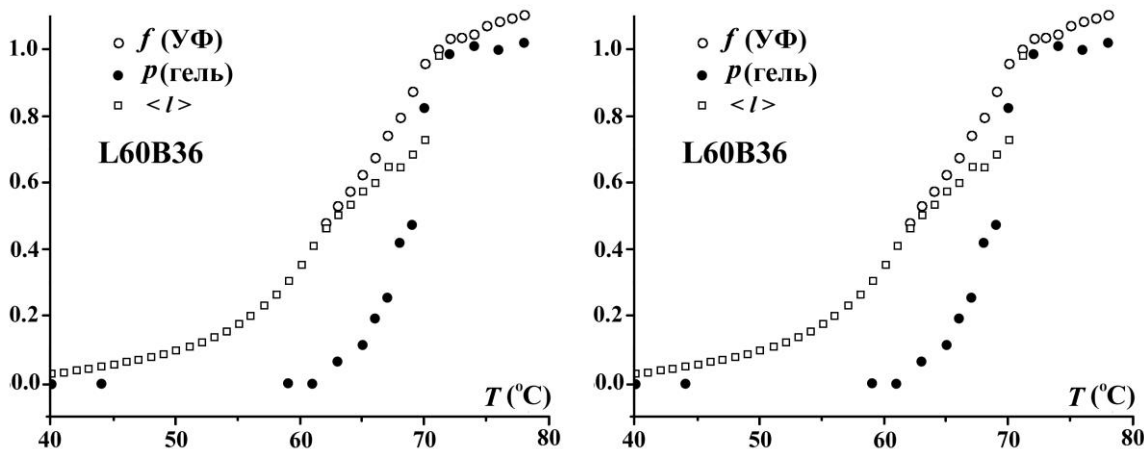


Рис. 4.3. Профили плавления олигомеров L_{60B36} и L_{42V18} [55]. Закрашенные кружки – $p(T)$, пустые кружки – $f(T)$, квадратики – $\langle l \rangle(T)$.

В следующих работах был сделан ряд усовершенствований методики, а также более подробно изучены свойства олигомеров с AT-богатой областью, расположенной в середине молекулы [55, 261]. В работе [55] исследовались два олигомера – L_{60B36} и L_{42V18} . Первый состоял из 60 пар оснований и включал AT-богатую область из 36 пар, для второго эти величины составляли, соответственно, 42 и 18.

Из профилей плавления, показанных на рис. 4.3, ясно видно, что длина пузырька $\langle l \rangle(T)$ в обоих олигомерах выходит на плато за счёт плавления AT-богатых районов, но при дальнейшем росте температуры испытывает резкий скачок. Это подтверждает данные о высокой кооперативности плавления GC-богатых участков ДНК.

Для $L_{60}V_{36}$ величина $\langle l \rangle(T)$ на плато составляет примерно 0.6. Это совпадает с относительной длиной АТ-богатого участка ($36/60 = 0.6$). При этом само плато было выражено довольно слабо. В качестве «обратной» характеристики кооперативности плавления была введена величина $\sigma(T) = f(T) - p(T)$. Эта величина отражает долю пар оснований, находящихся в составе пузырьков денатурации. Для $L_{60}V_{36}$ величина $\sigma(T)$ при 65°C достигала 0.5, то есть около $0.5/0.6 = 0.83$ всех молекул находились в состоянии дуплекса с расплетённой серединой. Дальнейшее плавление GC-богатых концевых участков происходит с высокой кооперативностью, как видно из рис. 4.3.

Денатурационное поведение $L_{42}V_{18}$ было другим. Плато, на которое выходила $\langle l \rangle(T)$ в интервале от 40 до 70°C , было хорошо выраженным. Величина $\langle l \rangle(T)$ на плато составляла около 0.3, тогда как отношение длины АТ-богатого домена к общей длине дуплекса было равно $18/42 \approx 0.43$. Максимальное значение $\sigma(T)$ составляло примерно 0.2. Эти отличия указывают на более высокую кооперативность денатурации $L_{42}V_{18}$ по сравнению с $L_{60}V_{36}$, хотя нарастание $\langle l \rangle(T)$ при нагревании выше 70°C происходит одинаково резко в обоих олигомерах. По мере уменьшения длины олигомера наблюдается дальнейшее снижение максимальной $\sigma(T)$. У олигонуклеотида $L_{33}V_9$, изученного в следующей работе группы, $\sigma(T)$ не превышала 0.1 – почти в 3 раза меньше, чем $9/33$ [261].

Для дуплексов, в которых АТ-богатая область окружена GC-богатыми концевыми участками равной длины, путём экстраполяции была выведена «критическая длина», составившая около 20 пар оснований. Более короткая ДНК, имеющая подобную структуру, расплетается «разом», без образования интермедиата с пузырьком посередине [261]. Олигомеры, в которых АТ-богатая область расположена на конце, проявляли совершенно другую зависимость денатурационного поведения от длины. Для подобных последовательностей экстраполяция на нулевое значение $\sigma(T)$ даёт критическую длину, близкую к нулю [261].

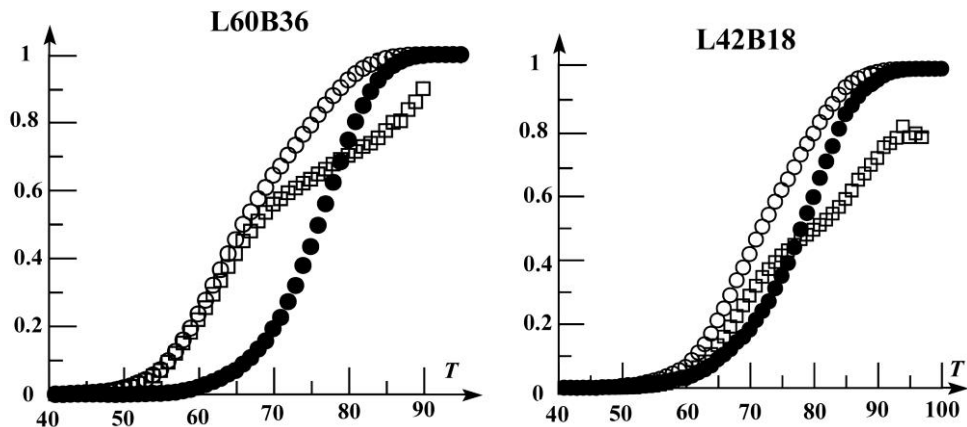


Рис. 4.4. Расчётные профили денатурации коротких самокомплементарных олигонуклеотидов $L_{60}V_{36}$ и $L_{42}V_{18}$ из работы [55], полученные Ares et al. [262]. Закрашенные кружки – $p(T)$, пустые – $f(T)$, квадратики – $\langle l \rangle(T)$.

Для описания результатов экспериментов группой G. Zocchi был использован подход ближайших соседей [62, 261]. Кроме того, эти результаты были интерпретированы Ares et al. в модели ПБД [262]. Используя стандартный алгоритм Метрополиса [263], Ares et al. исследовали модель ПБД методом Монте-Карло, проведя большое число коротких реализаций. На рис. 4.4 показаны расчётные профили денатурации олигонуклеотидов $L_{60}V_{36}$ и $L_{42}V_{18}$.

Как видно из сравнения рис. 4.3 и 4.4, данные, полученные для $L_{60}V_{36}$, находятся в согласии с экспериментом, хотя плато выражено не так чётко. Для $L_{42}V_{18}$ динамика

$\langle l \rangle(T)$ воспроизведена менее точно, хотя на качественном уровне основные черты этой зависимости совпадают с экспериментальными данными.

Ares et al. была также исследована зависимость характера денатурации коротких ДНК от их длины и состава [262]. В качестве характеристики статистической значимости пузырьков авторами была введена специфическая величина σ_{av} . Её значение отражает максимальную долю пар оснований, находящихся в пузырьках, но не в составе одиночных цепочек. Строго говоря, σ_{av} не является максимальной разностью $f(T) - p(T)$, а представляет собой разность площадей, ограниченных кривыми $f(T)$ и $p(T)$, делённую на полуширину температурного интервала.

На рис. 4.5 показана рассчитанная зависимость σ_{av} от длины ДНК для олигомеров с АТ-богатым участком, расположенным в середине дуплекса и для молекул с АТ-богатым участком на конце. Для первой группы экстраполяция даёт критическую длину, равную примерно 22 парам оснований. Для второй группы эта длина близка к нулю. Из рис. 4.5 хорошо видно, что вероятность разделения цепей без образования интермедиата для обоих типов последовательности фактически совпадает с экспериментом.

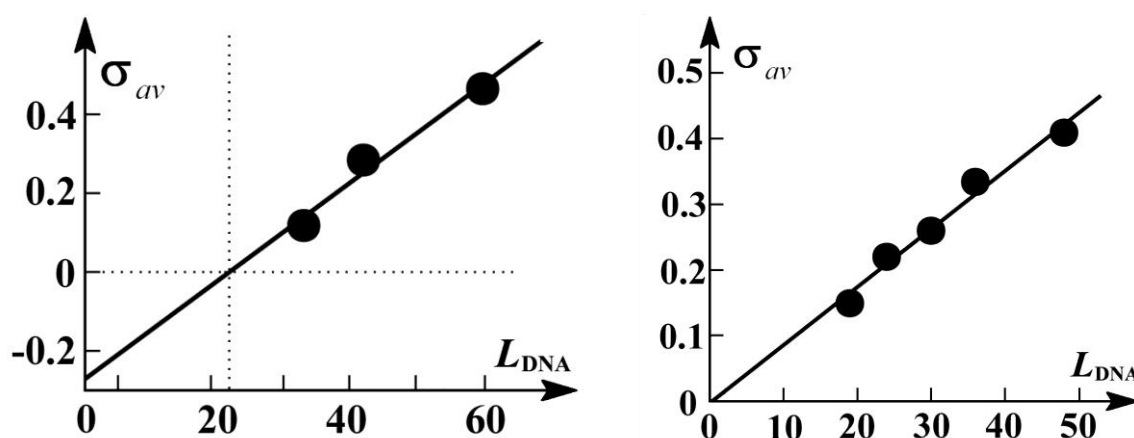


Рис. 4.5. Рассчитанная зависимость максимальной фракции открытых пар оснований σ_{av} от длины олигомеров L_{DNA} для молекул с АТ-богатой областью, расположенной в середине (слева) и в конце (справа) [262].

Удовлетворительное согласие расчётных и экспериментальных профилей позволило утверждать, что модель ПБД не нуждается в дополнительной подгонке имеющихся параметров или введении новых [262]. Однако вскоре van Erp et al. исследовали модель другим методом, получившим название прямого интегрирования (англ. – «direct integration method») [264], см. также [265]. Ввод потенциала смещения, препятствующего полному разделению цепей, позволил исследовать поведение дуплексов на длительных временах. Профили, полученные в результате расчётов, существенно расходились с экспериментом. Van Erp et al. сделали вывод, что для случая короткой ДНК модель ПБД нуждается в дополнительной оптимизации, хотя адекватность самого подхода сомнений не вызывает [264]. В частности, было предложено ввести гетерогенность стэкинг-взаимодействий.

С другой стороны, качественное согласие расчётов Ares et al. [262] с экспериментальными данными является ценным результатом, иллюстрирующим возможности подхода ПБД. В частности, одним из ключевых достижений является вычисление критической длины. Рассчитать её значение при помощи моделей ближайших соседей, было бы, по-видимому, невозможно. Также, на качественном уровне, описывается разница в кооперативности плавления АТ- и GC-богатых доменов,

однако влияние сильных флуктуаций денатурированных АТ-богатых областей не воспроизводится [262].

Таким образом, сочетание фотометрии с методикой закалки спижек позволило открыть важные характеристики процесса расплетания гетерогенной ДНК. Во-первых, это влияние денатурированных областей на удалённые закрытые участки. Во-вторых – сильная зависимость кооперативности плавления областей ДНК от их состава. Теоретические расчёты, в свою очередь, продемонстрировали важность учёта переноса и нелинейной локализации энергии при моделировании денатурационного поведения. Роль этих процессов в динамике дуплекса существенно возрастает при переходе в область температур, далёких от $T_{пл}$. Это было наглядно продемонстрировано в молекулярно-биологических исследованиях пузырьков денатурации, которые мы опишем далее.

4.2. Исследование пузырьков денатурации методом ферментативного гидролиза. Роль переноса и локализации энергии

Проблема прямого сравнения расчётных данных с экспериментом является одной из ключевых в моделировании ДНК. В исследованиях динамики дуплекса при малых температурах она была частично решена благодаря возможности ферментативного гидролиза «низкотемпературных» пузырьков денатурации [29]. Для гидролиза использовалась эндонуклеаза S_1 . Этот фермент эффективно расщепляет одноцепочечную молекулу, однако практически не проявляет активности в отношении дуплекса [266]. Гидролиз двухцепочечной ДНК эндонуклеазой S_1 происходит в 75000 раз медленнее, чем расщепление одноцепочечной [266]. Считается, что эта реакция обусловлена расщеплением денатурированных участков. Из-за большого размера (около 31 кДа) молекулы S_1 не может взаимодействовать с мелкими пузырьками денатурации, а расщепляет только большие.

Гидролиз пузырьков эндонуклеазой S_1 в сочетании с исследованием модели ПБД впервые был применён в работе Choi et al. [29]. Относительно низкая термостабильность промоторных областей ДНК является давно известным фактом, однако подобные исследования проводились только для температур, близких к $T_{пл}$ [128]. Таким образом, Choi et al. впервые исследовали открывание гетерогенной ДНК при умеренной температуре – 28 °С. Авторы предположили, что инициация транскрипции является следствием контакта фермента с возникшей на короткое время денатурированной областью ДНК.

Для проверки гипотезы авторы использовали стохастическую динамику (уравнение Ланжевена) в модели ПБД. В ходе стохастических вычислений событие возникновения пузырька регистрировалось всякий раз, когда группа из 10 или более пар оснований расходилась на величину выше пороговой, составлявшей 2.1 Å. При этом координатой пузырька считалось основание, расположенное в его центре. В ходе машинного эксперимента было проведено по 100 реализаций на образец, длительностью по 1 нс каждая. Усредняя вычисления по реализациям, Choi et al. получали профили нестабильности, представляющие зависимость вероятности образования пузырька от координаты (нуклеотидной пары) [29].

Расчётные профили нестабильности сравнивали с аналогичными графиками, полученными в эксперименте. После концевого мечения кодирующей цепи каждого образца изотопом фосфора ^{32}P , их инкубировали с S_1 -эндонуклеазой при 28 °С. После этого продукты гидролиза разделяли путём электрофореза. По массе фрагментов, получавшихся путём гидролиза, определяли места расщепления цепей. Отношение интенсивностей полос в геле указывало на соотношение вероятностей расщепления в разных участках.

В работе Choi et al. [29] были исследованы четыре образца ДНК с известной первичной структурой. Первый образец является фрагментом одного из генов человека и имеет длину 62 пары оснований. Он не содержит регуляторных областей, и использовался как контроль. Как в эксперименте, так и при расчётах было показано, что во всех участках этого образца вероятности образования пузырька денатурации приблизительно равны и очень малы.

Второй образец – фрагмент аденовирусной ДНК длиной 86 пар оснований, содержащий промотор AdMLP. Фрагмент включает точку начала транскрипции (TSS, англ. – «transcription start site») и ТАТА-блок (англ. – «TATA-box») – место связывания регуляторного TBP-белка. Первичная структура центральной области второго образца, включающей эти сайты, приведена как абсцисса профилей нестабильности, показанных на рис. 4.6 и 4.10.

Сравнение результатов моделирования с экспериментальными профилями нестабильности для второго образца приведено на рис. 4.6. Видно хорошее согласие результатов моделирования с экспериментом. В обоих профилях хорошо видны чёткие пики в TSS и ТАТА-блоке, а также небольшой пик в районе пары, 9-ой от TSS к 5'-концу. Положения расчётных пиков смещены на 2–3 пары оснований к 3'-концу, но ширина и относительная интенсивность практически совпадают.

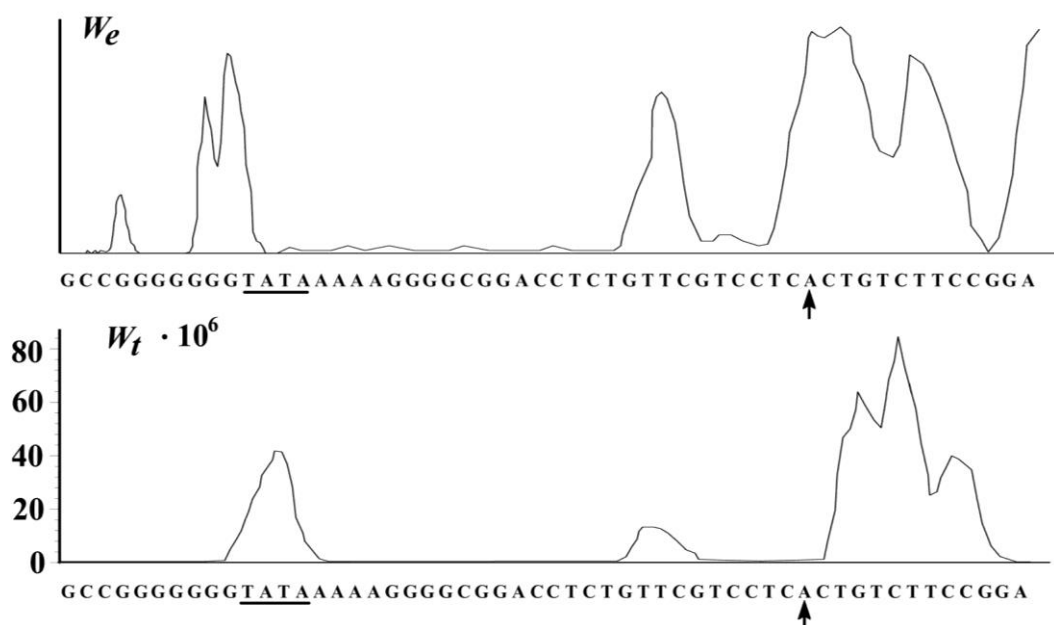


Рис. 4.6. Сравнение экспериментального (вверху) и расчётного (внизу) профилей нестабильности для второго образца [29]. Точка старта транскрипции указана стрелкой, сайт связывания TBP-белка (ТАТА-блок) подчёркнут. W_t – расчётная вероятность нахождения данной пары оснований в составе пузырька длиной 10 или более пар; W_e – относительная величина данной вероятности, полученная экспериментально.

Третий и четвёртый образцы представляют фрагмент вирусной ДНК с промотором AAV P5 и его мутантный вариант, в TSS которого основания А и Т заменены соответственно на G и С. Помимо TSS фрагменты включают сайт связывания регуляторного белка YY1.

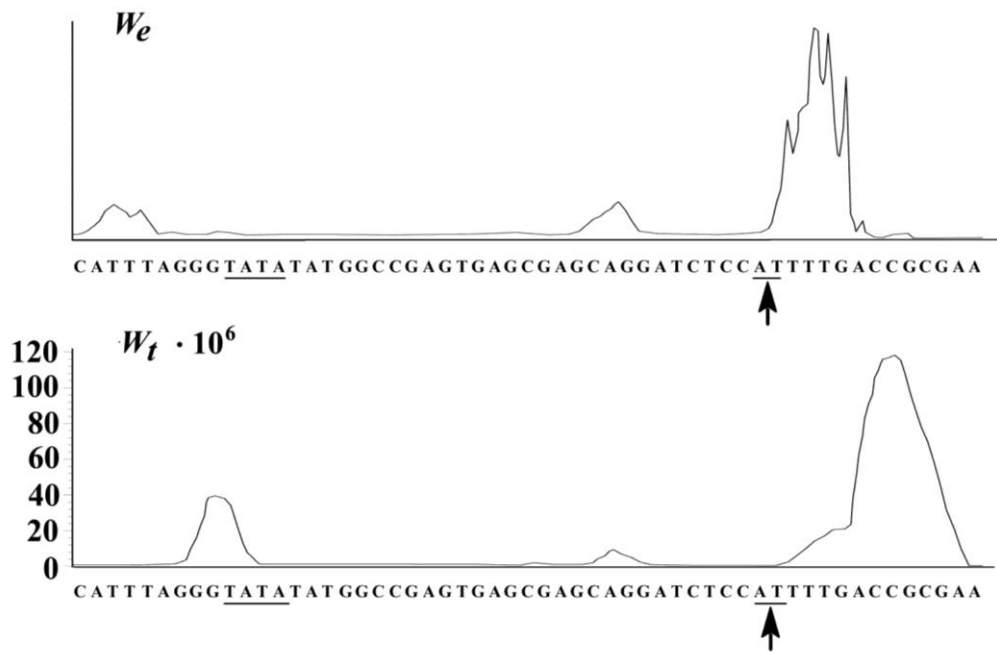


Рис. 4.7. Сравнение экспериментального (вверху) и расчётного (внизу) профилей нестабильности для третьего образца. Сайт связывания белка YY1 подчёркнут. TSS подчёркнут и отмечен стрелкой. W_t – расчётная вероятность нахождения данной пары оснований в составе пузырька длиной 10 или более пар; W_e – относительная величина данной вероятности, полученная экспериментально.

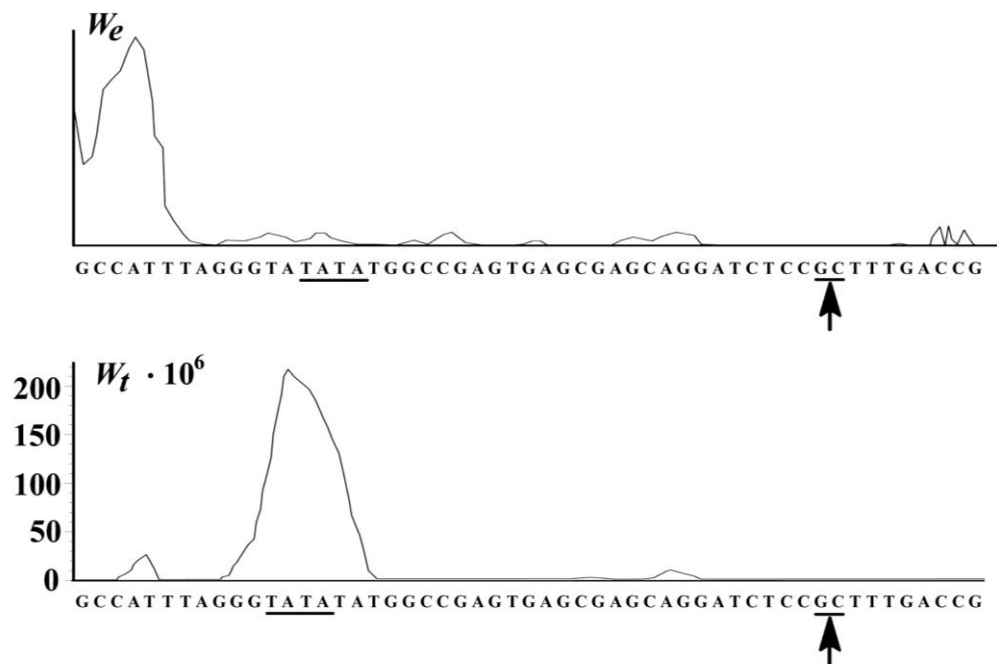


Рис. 4.8. Сравнение экспериментального (вверху) и расчётного (внизу) профилей нестабильности для четвёртого образца. Сайт связывания белка YY1 подчёркнут. TSS подчёркнут и отмечен стрелкой. W_t – расчётная вероятность нахождения данной пары оснований в составе пузырька длиной 10 или более пар; W_e – относительная величина данной вероятности, полученная экспериментально.

Нуклеотидная последовательность центральных частей фрагментов, включающих эти сайты, служит абсциссой для профилей, изображённых на рис. 4.7, 4.8 и 4.9. На последнем показаны расчётные профили обеих ДНК.

На рис. 4.7 и 4.8 также хорошо заметно согласие результатов моделирования с экспериментом, за исключением положения пика в сайте связывания YY1. Как в

модели, так и в эксперименте мутация приводила к исчезновению пика в TSS, однако при этом резко снижалась стабильность в регионе места связывания YY1. Авторы объясняют это снижением конкуренции различных участков промотора за доступную тепловую энергию.

Из работы Choi et al. [29] следует ряд выводов. Прежде всего, показано, что участки преимущественного открывания ДНК совпадают с областями, важными для инициации её транскрипции. По мнению авторов, повышенная вероятность открывания заложена в самой последовательности нуклеотидов. *Иными словами, возможно, существует некоторый «код пузырька».* Кроме того, утверждается, что модель ПБД хорошо подходит для успешного предсказания промоторных свойств тех или иных участков ДНК, не нуждаясь в каких-либо модернизациях [29].

Спустя некоторое время были опубликованы дополнительные результаты, касающиеся этой проблемы [30]. Во-первых, к промоторным областям AdMLP и AAV P5 был добавлен промотор из бактериофага T7, для которого также было получено хорошее соответствие модельных и экспериментальных данных. Во-вторых, в работе была в 10 раз улучшена статистика исследований: на каждый из образцов было проведено по 1000 реализаций. Наконец, было продемонстрировано, что именно нелинейность стэкинг-взаимодействий в гамильтониане ПБД ($\rho \neq 0$) играет ключевую роль в соответствии расчётных и экспериментальных данных. Приравнивание ρ нулю кардинально меняло вид профилей нестабильности, получаемых в вычислительном эксперименте [30].

Несмотря на убедительность первых экспериментов по механическому моделированию динамики промоторных областей ДНК [29, 30], их выводы вызвали сомнения у других исследователей. Van Erp et al. исследовали статистику локальной денатурации в модели ПБД методом прямого интегрирования [264]. Об этом методе уже упоминалось в разделе 4.1. Данный метод позволил изучать статистику пузырьков с очень малыми затратами машинного времени, по сравнению с ланжевенковской динамикой. Поэтому объектом исследования могли быть денатурированные области, имеющие очень большую длину, и, как следствие, ничтожно малый статистический вес. В работе van Erp et al. была исследована статистика пузырьков денатурации длиной от 1 до 50 пар оснований [264].

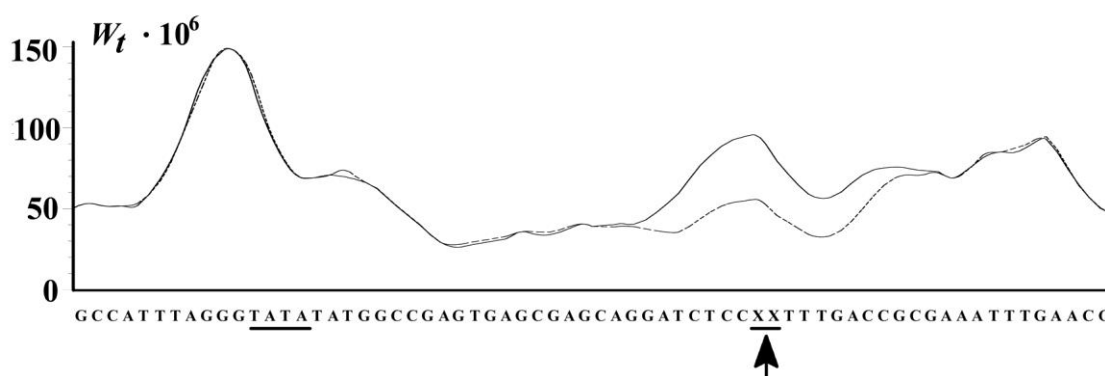


Рис. 4.9. Сравнение расчётов, выполненных van Erp et al. для третьего и четвёртого образцов [265]. W_t – расчётная вероятность нахождения данной пары оснований в составе пузырька длиной 10 или более пар. Сплошная линия соответствует профилю нестабильности третьего образца, пунктирная – аналогичному профилю четвёртого. Сайт связывания белка YY1 подчёркнут, TSS подчёркнуты и отмечены стрелками: XX соответствует AT в третьем образце и GC – в четвёртом.

Результаты, полученные van Erp et al., имели ряд существенных отличий как от экспериментальных данных, так и от результатов ланжевенковской динамики [265, 264]. Прежде всего, хотя мутация и снижала пик нестабильности в TSS, она никак не влияла на статистику пузырьков в области сайта связывания фактора YY1. Строго локальное

влияние замены нуклеотидов в TSS показано на рис. 4.9, где сравниваются расчётные профили третьего и четвёртого образцов, полученные для пузырьков длиной 10 пар оснований.

Помимо этого, на рис. 4.9 видно, что отличие стабильности TSS и сайта связывания YY1 от стабильности остальных участков дуплекса в расчетах выражено намного слабее, чем в эксперименте, см. [29]. Выраженные пики профиля нестабильности наблюдались также в контрольном образце: их величина была не меньше, чем во фрагментах, содержащих промоторные области.

На рис. 4.10 приведены расчётные профили для пузырьков длиной 10 пар оснований во втором образце, полученные в работах [265] и [267]. Если сравнить рис. 4.10 с рис. 4.6, то видно, что полуаналитический подход Rapti et al., как и прямое интегрирование van Erp et al., даёт результаты, далёкие от эксперимента.

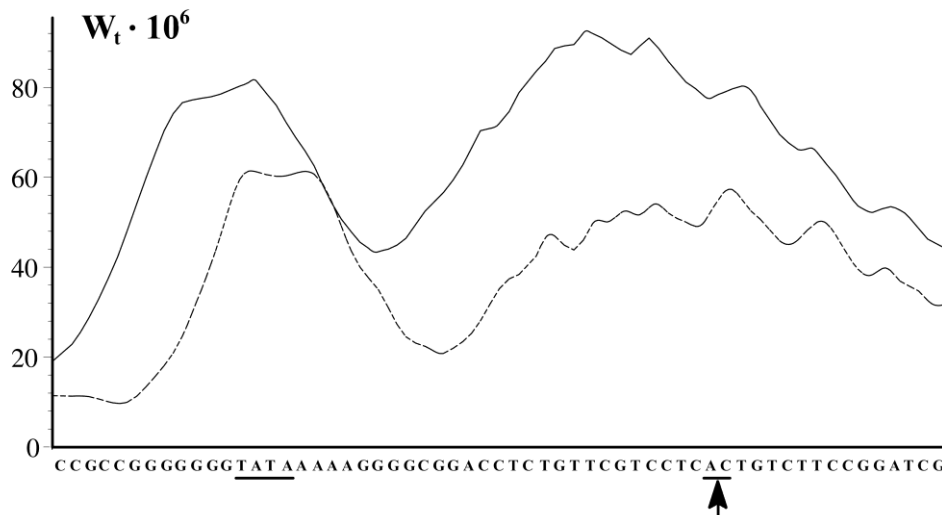


Рис. 4.10. Сравнение профилей нестабильности второго образца, полученных в работах [265] (пунктирная линия) и [267] (сплошная линия). W_t – расчётная вероятность нахождения данной пары оснований в составе пузырька длиной 10 или более пар. Сайт связывания белка TBP подчеркнут. TSS подчеркнут и отмечен стрелкой.

Как и в работе van Erp et al., различие профилей третьего и четвёртого образца касалось только пика нестабильности в TSS, то есть влияние мутации было локальным [267]. Сами пики были выражены слабо по сравнению с экспериментом или расчётами Choi et al. [29].

С другой стороны, вычислительные подходы van Erp et al. и Rapti et al. позволяли получать профили нестабильности с очень малыми затратами машинного времени, по сравнению с ланжевенковской динамикой. Впоследствии Rapti et al. разработали ещё более эффективный метод исследования равновесных термодинамических свойств модели ПБД для гетерогенной ДНК [268]. Метод был основан на приближении эффективной плотности АТ-пар, которые рассматривались как дефекты в однородной цепочке GC-пар. Положение и высота пиков на вычисляемых профилях определялись только размером исследуемых пузырьков и локальной концентрацией АТ-пар.

При помощи этого метода был изучен целый ряд промоторов [268, 269]. Что характерно, расчётные пики профилей нестабильности далеко не всегда совпадали с участками, ответственными за первичное взаимодействие с ферментами. В результате был сделан вывод о необходимости улучшения модели ПБД для более точного описания локальной денатурации гетерогенной ДНК [269]. Этот вывод справедлив, по крайней мере, для случая, когда профили нестабильности получают на основе расчёта равновесных термодинамических свойств модели.

Следует обратить внимание на важный момент моделирования ДНК в низкотемпературном интервале. В этой области теории решают две разные задачи.

Первой из них является разработка эффективного алгоритма для поиска промоторных участков генома на основе первичной структуры ДНК. Трудность её решения заключается в том, что инициация транскрипции связана именно с «коллективными» открываниями пар оснований. Поэтому в качестве основы алгоритмов не всегда подходят, например, модели ближайших соседей. Стабильность ДНК в них зависит от нуклеотидной последовательности исключительно в масштабе единичных пар. В связи с этим профили нестабильности обычно получают путём усреднения по участкам, включающим заданное число пар оснований [270, 271].

Единственным исключением здесь является модель, недавно разработанная Kantorovitz с соавт. и оперирующая вероятностью одновременного открывания ряда пар [272]. Она позволяет напрямую рассчитывать профили вероятности одновременного открывания нескольких соседних пар оснований для ДНК длиной в десятки тысяч пар. Наряду с этим эффективным инструментом анализа генома важную роль в решении задачи поиска промоторов сыграла модель ПБД, а также ряд других подходов. Например, это модели С. Benham [33, 35, 234-236, 243, 244], Е. Yeramian [135, 136] и другие.

Вторая задача заключается в изучении роли динамики открываний ДНК в функционировании генома. Не случайно название работы Choi et al. звучит как «DNA dynamically directs its own transcription initiation». Эта проблема крайне актуальна для развития молекулярной биологии гена. Ни Изинг-подобные подходы, ни изучение равновесных свойств модели ПБД не годятся для её решения, поскольку не учитывают динамики пузырьков.

Только исследование модели ПБД при помощи ланжевендовской динамики позволило выявить резкие отличия денатурационного поведения промоторных участков от поведения остальных областей ДНК. Этот метод позволил Alexandrov et al. с соавт. получить два типа профилей нестабильности ДНК для каждого из образцов, исследованных в работе Choi et al. [212].

Первый тип соответствовал вероятности возникновения пузырька заданной длины: полученные результаты практически совпадали с данными работы Choi et al. [29]. Причина кажущихся расхождений заключалась в том, что в работе [212] координатой возникающего пузырька считалось его начало, тогда как в [29] – середина.

Второй тип профилей отражал время жизни пузырьков, возникающих на разных участках дуплекса. Оказалось, что для крупных пузырьков, возникающих в TSS и сайтах связывания регуляторных белков это время во много раз больше, чем в остальных местах. Кроме того, время жизни пузырьков в районе связывания YY1 сильно возрастало в результате мутации, то есть в четвёртом образце по сравнению с третьим.

Связь между вероятностью появления пузырька, временем его жизни и амплитудой расхождения цепей была подробно изучена в следующей работе Alexandrov et al. [273]. Исследовав динамику восьми эукариотических промоторов, авторы пришли к неожиданным выводам. Во-первых, места появления наиболее долгоживущих пузырьков денатурации далеко не всегда совпадают с максимумами профиля нестабильности. Во-вторых, большая амплитуда пузырька денатурации не всегда подразумевает увеличенное время его жизни [273]. Впоследствии Alexandrov et al. модифицировали модель ПБД, включив в неё гетерогенность стэкинг-потенциала k (см. выражения (2.5) и (2.6)) [274]. Параметры стэкинга для 10 сочетаний соседних оснований были подобраны на основе сравнения расчётных данных с профилями плавления олигомеров регулярной структуры. Исследования новой модели при помощи ланжевендовской динамики подтвердили результаты предыдущих работ [212, 273].

Более того, благодаря учёту гетерогенности стэкинга, динамические отличия сайтов связывания специфических белков проявились намного сильнее [274].

Модифицированная модель ПБД играла большую роль в изучении связи динамики открывания различных участков ДНК с их биологическими функциями [275, 276]. В последние годы первичность локального открывания дуплекса при инициации транскрипции доказана в экспериментах [18, 19]. Это подчёркивает актуальность механического моделирования гетерогенного дуплекса.

Тем не менее, в исследованиях ДНК при низких температурах резко проявляется такой недостаток модели ПБД, как очень малое время жизни пузырьков, не превышающее 4 пс. Для сравнения: наименьшее время открытого состояния, полученное в экспериментах, составляет 0.92 нс [277]. Оно характеризует не пузырёк и даже не открывание одной нуклеотидной пары, а кратковременный выход отдельного основания из уотсон-криковской спирали (подробнее см. главу 5). Взаимодействие ДНК с таким неспецифичным ферментом, как эндонуклеаза S_1 , требует, очевидно, весьма долгоживущих пузырьков. Не исключено, что для точного описания их поведения необходимы модели более высокого уровня.

Кроме того, полученные в модели времена жизни пузырьков зависели от их размера довольно слабо. В экспериментах эти времена могут отличаться на три порядка величины и более, в зависимости от размера пузырька [213]. Изучение кинетики пузырьков денатурации стало возможным относительно недавно, благодаря небольшой модификации известного метода – флуоресцентной корреляционной спектроскопии. Далее мы опишем эту методику и соответствующие исследования более подробно.

4.3. Диапазон времён жизни пузырьков денатурации. Метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии

Флуоресцентная корреляционная спектроскопия (ФКС) широко применяется в химической и биологической физике. Общим принципом этого метода является регистрация флуоресценции из очень малой части объёма раствора, как функции времени [278]. В каждый момент величина сигнала пропорциональна числу флуоресцирующих молекул в объёме-образце, которое колеблется вблизи некоторой средней величины. Из-за того, что объём мал, относительные флуктуации сигнала достигают значительной величины. Основными причинами флуктуаций сигнала являются химические переходы частиц в неизлучающее состояние и обратно, а также диффузия молекул сквозь объём-образец. Построив автокорреляционные функции, можно найти временной масштаб этих процессов. Таким образом, ФКС позволяет получать данные о кинетике идущих в растворе химических реакций, коэффициентах диффузии и равновесных концентрациях молекул [278].

Для получения автокорреляционной функции регистрируют величины флуктуаций флуоресценции $\delta F(t)$ в разные, равноотстоящие моменты времени $t_1, t_2, t_3, \dots, t_i, \dots, t_P$ и флуктуации в «отсроченные» моменты $\delta F(t + \tau)$. Полученные произведения $\delta F(t_i) \cdot \delta F(t_i + \tau)$ делят на P , то есть просто усредняют по времени. Варьируя τ , получают автокорреляционную функцию $G_{fluor}(\tau)$ [278]:

$$G_{fluor}(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}, \quad (4.2)$$

где $F(t)$ – абсолютное значение флуоресценции, а скобки $\langle \dots \rangle$ означают усреднение по времени. Таким образом, величина $\delta F(t)$ является разностью $F(t)$ и $\langle F(t) \rangle$. Иногда формулу (4.2) удобно представлять не через величины флуктуаций, а через абсолютные значения сигнала:

$$G_{\text{флуор}}(\tau) = \frac{\langle F(t) \cdot F(t + \tau) \rangle - \langle F(t) \rangle^2}{\langle F(t) \rangle^2}. \quad (4.3)$$

Первые исследования денатурационного поведения ДНК методом ФКС были проведены G. Bonnet et al. [279]. В их работе была изучена кинетика денатурации специфических шпилечных структур, вида 5'-СССAA-(B)_n-TTGGG-3', где B соответствовало A или T, а n варьировали от 12 до 30. Флуоресцентные молекулы получали путём ковалентного присоединения флуорофора к 5'-концу и тушителя – к 3'-концу. В результате получались структуры, называемые «молекулярными маячками» [279]. В закрытом «маячке» флуорофор и тушитель находятся близко друг к другу и могут взаимодействовать напрямую: в результате флуоресценция невозможна. При разделении его концов флуорофор удаляется от тушителя, и молекула становится флуоресцирующей.

Впоследствии подобную методику применили для изучения кинетики локальных расплетаний АТ-богатого домена в обычных самокомплементарных олигомерах [213]. Для этого флуорофор и тушитель присоединяли к основаниям, находящимся в середине АТ-богатого участка. Авторы исследовали флуоресцентные конструкторы, полученные на основе трёх олигомеров, которые они назвали M₁₈, A₁₈ и (АТ)₉. В олигомере M₁₈ АТ-богатая область состояла из случайно чередующихся адениновых и тимининовых оснований. Поэтому даже в случае денатурации всего АТ-богатого домена его одиночные цепи не могли образовывать вторичных структур, которые стабилизировали бы флуоресцирующую форму. На рис. 4.11 показаны два типа маячков, синтезированных на основе M₁₈, а также упрощённая схема возможных состояний маячка.

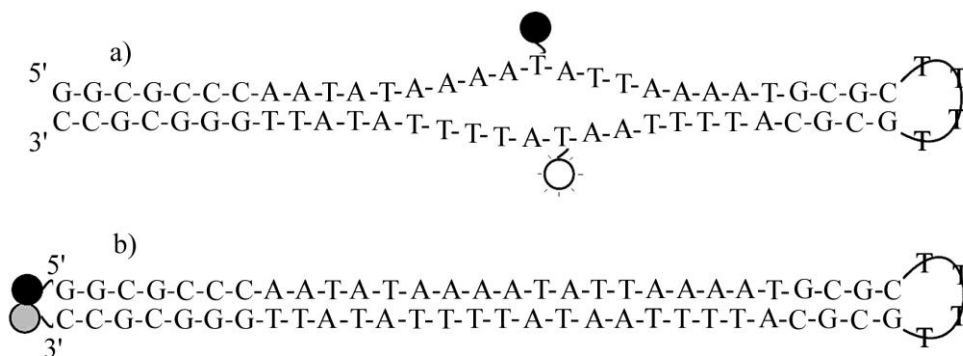


Рис. 4.11. Маячки, полученные из олигонуклеотида M₁₈; закрашенным кружком обозначен тушитель (DABCYL) [213]. а) схема маячка M₁₈ с серединной меткой, находящегося в состоянии с открытой серединой: незакрашенный кружок показывает возбуждённое состояние флуорофора (6-карбоксихлорофана). б) схема маячка M₁₈ с концевой меткой, находящегося в закрытом состоянии: кружок, закрашенный серым цветом, соответствует флуорофору, находящемуся в контакте с тушителем.

Из рисунка видно, что помимо диффузии источником флуктуаций флуоресцентного сигнала являлись открывание и закрывание участка дуплекса, на который были присоединены флуорофор и тушитель.

Маячки с серединной и концевой метками были получены также для олигомеров A₁₈ и (АТ)₉. На схемах их первичной структуры места присоединения флуорофора и тушителя подчеркнуты, а неспаренные участки выделены жирным шрифтом. Маячок A₁₈ имел следующую структуру: 5'—GGCGC ССAAA ААААА АТААА ААААА GCGCT **ТТТ**GC GCTTT **ТТТТ** АТТТТ **ТТТТ** GGGCG СС—3'. Его флуоресцирующая форма способна закрываться с некоторым сдвигом, исключая контакт флуорофора и тушителя. В результате, время жизни этой формы должно быть

значительно выше, чем в M18. Ещё более долгоживущими предполагались флуоресцирующие формы маячка (АТ)₉: 5'—GGCGC CCATA TATAT ATATA TATAT GCGCT TTTGC GCATA TATAT ATATA TATAT GGGCG CC—3'. Помимо сдвига, его открытые состояния способны образовывать крестообразные структуры за счёт самокомплементарности одиночных цепей АТ-богатого домена.

Измерения общей флуоресценции маячков в зависимости от температуры, $I(T)$, позволяют найти константы равновесия $K(T)$ в реакции открывания ДНК. Долю открытых маячков $p_B(T)$ вычисляли по формуле [279]:

$$p_B(T) = \frac{I(T) - I_c}{I_o - I_c}, \quad (4.4)$$

где флуоресценция открытых маячков I_o соответствует максимуму сигнала при 363 К и выше, $I_o = I(363)$, а флуоресценция закрытых I_c получается путём экстраполяции низкотемпературного сигнала на абсолютный нуль $I_c = I(0)$ [279]. Зная $I(T)$, вычисляли константу равновесия как функцию температуры:

$$K = \frac{k_-}{k_+} = \frac{I(T) - I_c}{I_o - I_c} \div \frac{I_o - I(T)}{I_o - I_c} = \frac{p(T)}{1 - p(T)}, \quad (4.5)$$

где k_- – константа скорости открывания в АТ-домене маячка, а k_+ – константа скорости релаксации открытого состояния, то есть его закрывания [213].

Вычисляемая автокорреляционная функция маячка G_{beacon} является произведением диффузионного и химико-кинетического членов:

$$G_{beacon} = \frac{\langle I(t_0) \cdot I(t_0 + \tau) \rangle - \langle I(t_0) \rangle^2}{\langle I(t_0) \rangle^2} = G_{diff} \cdot G_{chem} = \frac{I}{B} \frac{1}{1 + \frac{t}{\tau_{diff}}} \cdot \left(1 + \frac{1 - p_B}{p_B} \exp[-t(k_- + k_+)] \right), \quad (4.6)$$

где скобки $\langle \dots \rangle$ означают усреднение по всем моментам t_0 , B – среднее число маячков в объёме-образце, τ_{diff} – характеристическое время диффузии маячка через этот объём. Величина p_B соответствует $p_B(T)$, то есть $(1 - p_B)/p_B = 1/K$, I – флуоресцентный сигнал, а $k_- + k_+ = \tau_{reaction}^{-1}$ – суммарная скорость (обратное время) реакции. Чтобы найти этот параметр, получали автокорреляционную функцию для специального маячка-контроля, в котором к ДНК присоединён только флуофор [279]:

$$G_{diff} = \frac{I}{B} \frac{1}{1 + \frac{t}{\tau_{diff}}}. \quad (4.7)$$

Решая систему уравнений

$$K = \frac{k_-}{k_+} \quad ; \quad k_+ + k_- = \frac{1}{\tau_{reaction}}, \quad (4.8)$$

легко получить выражения для констант скоростей [279]:

$$k_- = \frac{1}{\tau_{reaction}} \frac{K}{1 + K}, \quad k_+ = \frac{1}{\tau_{reaction}} \frac{1}{1 + K}. \quad (4.9)$$

Если существует единственная флуоресцирующая форма маячка, то величины k_- и k_+ можно определить однозначно. Подобные результаты были получены для маячков с

коротким комплементарным участком, способных находиться либо в открытом состоянии, либо в закрытом [279].

Если флуоресцирующих форм много, то анализ автокорреляционных функций способен дать информацию только о диапазоне скоростей релаксации k_+ . Для маячков, полученных из M_{18} , A_{18} и $(AT)_9$, эти функции не были моноэкспоненциальными. Значение k_+ сильно зависело от длины расплетённой области, то есть от числа открывшихся оснований [213]. Пример нормированной автокорреляционной функции, характеризующей кинетику релаксации маячка M_{18} при 33 °С, представлен на рис. 4.12.

Как видно из рисунка, времена жизни состояний с пузырьком в месте прикрепления флуоресцентной метки находятся в диапазоне 10^{-6} – 10^{-3} с. По меркам ланжевенновской динамики, это огромные времена, на 6–9 порядков превышающие масштаб, характерный для модели ПБД. Они указывают на высокий активационный барьер, препятствующий быстрой релаксации открытых состояний.

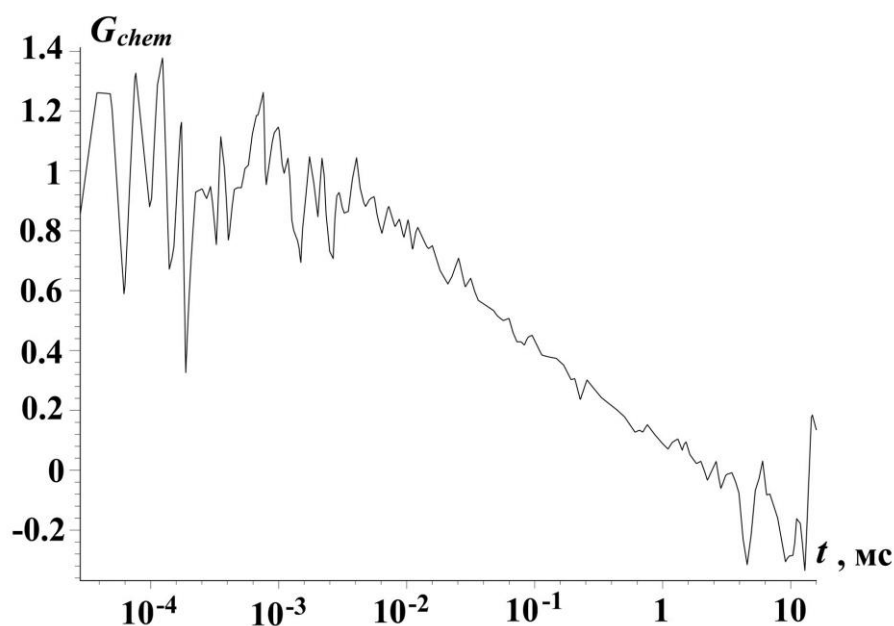


Рис. 4.12. Автокорреляционная функция G_{chem} молекулярного маячка M_{18} с серединной меткой при температуре 33°C [213].

Несмотря на возможность дополнительной стабилизации флуоресцентных форм у A_{18} и $(AT)_9$ (см. выше), диапазоны k_+ во всех маячках практически совпали. Более того, при исследованиях их температурной зависимости в интервале 20–50°C было показано, что величины термодинамических параметров для релаксации разных маячков очень близки. Всё это указывало на одинаковый механизм стабилизации открытых состояний.

По мнению авторов, маячки задерживаются в открытом состоянии за счёт сохранения стэкинг-взаимодействий. Именно эти взаимодействия препятствуют образованию альтернативных вариантов вторичной структуры в A_{18} и $(AT)_9$ [213]. Как мы покажем в разделе 5.3, в общих чертах это объяснение вполне верно, хотя для него необходимы некоторые уточнения.

Таким образом, Altan-Bonnet et al. впервые удалось оценить времена жизни пузырьков денатурации напрямую [213]. Их широкий диапазон и большие значения являются важным и интересным результатом. Однако сама первичная структура маячков, использованных в работе, была достаточно специфической: их AT-богатые домены, включавшие 18 пар оснований, не содержали ни одной GC-пары. В результате, константы равновесия для открывания в местах прикрепления метки оказались очень большими – от 0.005 до 0.02 при 30 °С. Это на 3–4 порядка выше аналогичных констант

для одиночных нуклеотидных пар, получаемых как путём расчётов [129, 280], так и в соответствующих экспериментах, см. раздел 5.2. Отсюда возникают кажущиеся противоречия между результатами ФКС и другими данными по кинетике открывания ДНК. К примеру, независимость кинетики открываний соседних пар является чётко доказанным фактом [281–286]. Это было бы невозможно в случае преобладания коллективных открываний над одиночными.

Главной задачей следующей главы является сравнение пузырьков денатурации и одиночных открываний нуклеотидных пар с точки зрения кинетики и термодинамики. Для этого мы рассмотрим исследования выхода отдельных оснований из уотсон-криковской спирали, выполненные методом протонного обмена. Будут объяснены кажущиеся кинетические противоречия между данными этого метода и ФКС, а также рассмотрен вопрос о сохранении стэкинг-взаимодействий при открывании нескольких соседних нуклеотидных пар.

5. ИССЛЕДОВАНИЯ ОТКРЫВАНИЙ ДНК ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Как показано в главе 2, для упрощённого описания локальной денатурации ДНК достаточно трёх степеней свободы. Это радиальное удаление цепей, локальное изменение суперспирализации и угловое смещение основания вокруг оси сахарофосфатного остова. В образовании пузырька денатурации участвуют все три степени, однако в случае открывания отдельной пары роль первых двух незначительна. Данный случай и схема степеней свободы показаны на рис. 5.1.

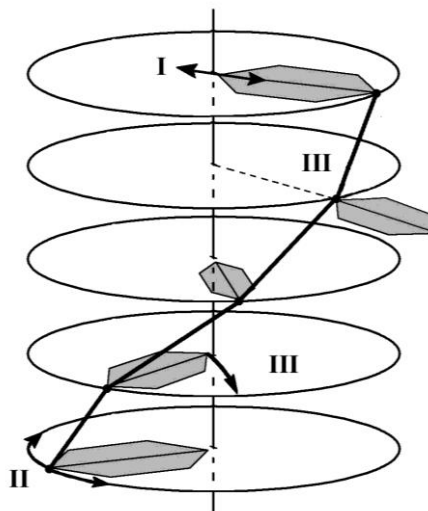


Рис. 5.1. Схема основных степеней свободы нуклеотидных пар в простых моделях ДНК: показана только одна из цепей. I. Радиальное расхождение. II. Изменение суперспирализации. III. Угловой выход основания из стэка – флип-аут, слабо зависящий от других степеней свободы.

Основным путём независимого открывания нуклеотидной пары является угловое смещение её оснований. Поэтому в англоязычной литературе в качестве синонима единичного открывания часто используется термин «флип-аут», который переводится примерно как «переворот наружу». Мы также будем пользоваться этим термином.

5.1. Исследования выхода оснований из уотсон-криковской спирали методами ¹H-ЯМР

Открывание отдельных пар оснований играет ключевую роль во многих специфичных ДНК-белковых взаимодействиях. При этом выходящее из стэка основание попадает в активный центр фермента, либо в другой сайт специфического

связывания [287, 288]. Подобный механизм является общим для первоначального взаимодействия ДНК со многими метилтрансферазами [289–291] и гликозилазами [292–294], а также при репликации [295, 296] и транскрипции [18, 19, 296].

Проблема вклада динамики ДНК в её первичное взаимодействие с ферментами является одной из важнейших в молекулярной биологии. Такие взаимодействия имеют место при температурах намного ниже $T_{пл}$. В этих условиях вероятность флип-аута оснований заметно преобладает над вероятностью образования пузырька, так как второй процесс обычно характеризуется значительно большей энтальпией активации.

В течение всего времени флип-аута основание сохраняет часть взаимодействий с остальными атомами дуплекса [161]. Поэтому, даже выйдя из уотсон-криковской спирали на максимальный угол, оно обычно укладывается в одну из бороздок.

Для изучения кинетики флип-аута при температурах до 35 °С широко применяется метод, основанный на способности иминогрупп гуанина и тимина обмениваться атомами водорода с молекулами раствора. Обмен возможен только из открытых состояний и происходит при участии катализатора – любой молекулы или иона, способного к обратимому захвату H^+ . Замену протонов иминогрупп регистрируют методами 1H -ЯМР. Это позволяет измерять скорости флип-аута отдельных оснований, варьируя концентрацию катализатора. Остановимся более подробно на процессе каталитического обмена протонов.

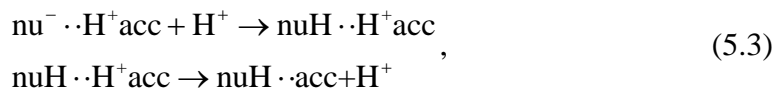
Сначала рассмотрим ситуацию в свободном нуклеозиде. Пусть nuH – нуклеозид, способный к обмену имино-протона, а acc – акцептор протона. В результате столкновения образуется комплекс $nuH \cdot acc$, способный переходить в $nu^- \cdot H^+acc$ и обратно. Дальнейшую динамику обмена удобно представить в терминах показателей ионизации. Показателем ионизации pK для акцептора протона A является отрицательный десятичный логарифм константы равновесия для реакции его диссоциации:

$$K_A = \frac{[A][H^+]}{[AH^+]}. \quad (5.1)$$

Величина pK_{acc} численно равна pH , при котором ионизирована половина молекул акцептора. Соотношение концентраций $nuH \cdot acc$ и $nu^- \cdot H^+acc$ равно отношению K_A акцептора и нуклеозида [297]:

$$\frac{[nuH \cdot acc]}{[nu^- \cdot H^+acc]} = \frac{K_{acc}}{K_{nu}} = \frac{10^{pK_{nu}}}{10^{pK_{acc}}}. \quad (5.2)$$

Обычно pH раствора значительно меньше, чем pK_{nu} и вероятность реакции захвата протона из растворителя



для комплекса $nu^- \cdot H^+acc$ на порядки превышает вероятность обратного перехода в форму $nuH \cdot acc$ через возвращение «своего» протона. Следовательно, лимитирующим шагом процесса является именно депротонирование нуклеозида. Тогда скорость обмена протона k_{ex} можно принять равной скорости его обратимого переноса на акцептор k_{tr} . Эта величина определяется выражением:

$$k_{tr} = k_{coll} \cdot [acc] \cdot \eta \left[\frac{л}{моль \cdot с} \cdot \frac{моль}{л} = с^{-1} \right], \quad (5.4)$$

где k_{coll} – частота «удачных» столкновений, выражаемая через константу скорости второго порядка, η – доля комплексов, способных к обмену протона, а $[acc]$ –

концентрация молекул акцептора. Мы привели размерности величин для ясности. Типичная величина k_{coll} составляет около 10^9 л·моль⁻¹·с⁻¹ для большинства акцепторов и на порядок выше для OH⁻ [297].

Выразив η через величины рК при рН < рК_{ну} (см. (5.2))

$$\eta = \frac{[nu^- \cdot H^+acc]}{[nu^- \cdot H^+acc] + [nuH \cdot acc]} = \left(1 + \frac{[nuH \cdot acc]}{[nu^- \cdot H^+acc]} \right)^{-1} = \left(1 + 10^{pK_{nu} - pK_{acc}} \right)^{-1},$$

получим окончательное выражение для скорости обмена протона в свободном нуклеозиде:

$$k_{tr} = \frac{1}{\tau_i} = \frac{k_{coll} \cdot [acc]}{\left(1 + 10^{pK_{nu} - pK_{acc}} \right)}, \quad (5.5)$$

где τ_i – время обмена. На самом деле, это выражение несколько сложнее, так как обычно рК акцептора выше, чем рН среды [297]. Например, для аммиака рК = 9.3. Пользуясь формулой (5.1), несложно рассчитать концентрацию его незаряженных молекул при рН = 7:

$$[NH_3] = [NH_3]_{TOTAL} \cdot \left(1 + \frac{[NH_4^+]}{[NH_3]} \right)^{-1} = [NH_3]_{TOTAL} / \left(1 + 10^{9.3-7} \right) \cong 0.05 \cdot [NH_3]_{TOTAL}, \quad (5.6)$$

где $[NH_3]_{TOTAL}$ – общая концентрация аммиака. В общем виде выражение для активной концентрации катализатора выглядит так:

$$[acc] = [acc]_{TOTAL} \cdot \left(1 + 10^{pK_{acc} - pH} \right)^{-1}. \quad (5.7)$$

Рассмотрим теперь кинетику обмена протона для нуклеотида в дуплексе. Поскольку эта реакция требует открытого состояния, время обмена τ_{ex} определяется константой равновесия – K_d . Она равна отношению среднего времени открытого состояния к среднему времени закрытого.

Стоит подчеркнуть, что в литературе эти времена называются «временем закрывания» и «временем открывания». Поэтому они обозначаются соответственно как τ_{cl} и τ_{op} . Зависимость времени обмена от этих величин имеет вид:

$$\tau_{ex} = \frac{\tau_i}{\alpha} \cdot \left(\frac{\tau_{cl}}{\tau_{cl} + \tau_{op}} \right)^{-1} = \frac{\tau_i}{\alpha} \cdot \left(1 + \frac{1}{K_d} \right),$$

где $\alpha < 1$ – параметр доступности, учитывающий ограниченный доступ катализатора к протону имино-группы. Считается, что у NH₃ и имидазола этот параметр близок к единице, а для Триса (трис-оксиметиламинометан) и других аминов он составляет примерно 0.3–0.5 [282–284].

Так как τ_{cl} на несколько порядков меньше τ_{op} , выражение для времени обмена протона обычно записывают как

$$\tau_{ex} \approx \frac{\tau_i}{\alpha K_d}. \quad (5.8)$$

Однако выражение (5.8) справедливо лишь при малых концентрациях внешнего акцептора ¹H. Если эта концентрация велика, то значительная часть событий обмена будет происходить при первом же открывании. В пределе бесконечной концентрации катализатора, получится $\tau_i = 0$. Тем не менее, $\tau_{ex} = \tau_{op}$, поскольку обмен не может произойти прежде, чем основание выйдет из дуплекса. Таким образом, выражение для τ_{ex} принимает окончательный вид:

$$\tau_{ex} = \tau_{op} + \tau_i \cdot (\alpha \cdot K_d)^{-1} = \tau_{op} + \frac{1 + 10^{pK_{nu} - pK_{acc}}}{k_{coll} \cdot [acc] \cdot \alpha \cdot K_d}, \quad (5.9)$$

При высоких концентрациях катализатора τ_{ex} приобретает линейную зависимость от $[acc]^{-1}$. Угол наклона этой прямой обратно пропорционален $\alpha \cdot K_d$, а $\tau_{ex}(0) = \tau_{op}$.

Протоны разных иминогрупп дают хорошо различимые пики на ЯМР-спектрах. Это позволяет вычислять $\tau_{ex}([acc]^{-1})$ для отдельных гуаниновых и тиминных оснований. Одним из методов регистрации флип-аута является каталитический обмен протона на дейтрон: в момент замены 1H на 2H происходит релаксация. При этом относительное уширение линии резонанса на полувысоте связано с τ_{ex} соотношением [298]:

$$(\tau_{ex})^{-1} = \pi(\Delta\nu^b - \Delta\nu^{aac}), \quad (5.10)$$

где $\Delta\nu^b$ – ширина линии при некоторой концентрации катализатора, а $\Delta\nu^{aac}$ – ширина при его отсутствии.

Значение τ_{ex} можно вычислить также по времени продольной релаксации T_1 , которое измеряется методом инверсии-восстановления [282–284, 286, 299]. В основе метода лежит избирательное обращение спинов 1H с последующим измерением времени их возврата к равновесию. Время T_1 связано с τ_{ex} простым выражением:

$$T_1^{-1} = \tau_{ex}^{-1} + T_{10}^{-1}$$

где T_1 и T_{10} – соответственно, времена релаксации с катализатором и без него.

Величина T_{10}^{-1} является суммой вкладов протон-протонных дипольных взаимодействий (англ. – «proton-proton dipolar interactions», «dipole-dipole interactions», «dipole-dipole relaxation») и обмена, не зависящего от внешнего катализатора. В ходе последнего протоны могут переноситься на ионы OH^- , а также на атомы азота комплементарных оснований – N_1 аденина или N_3 цитозина. Второй тип переноса получил название внутреннего катализа. Его механизм мы рассмотрим подробно в разделе 5.4.

Каталитический вклад OH^- в слабощелочных растворах ДНК пренебрежимо мал. В этом легко убедиться, задав $pH = 9$ и подставив в выражение (5.9) типичные значения остальных параметров: $k_{coll} = 10^{10}$, $K_d = 10^{-5} - 10^{-6}$, $pK_{acc} = 15.7$, $pK_{nu} = 9.5$. Внутренний катализ также малоэффективен, так как pK атомов N_1 аденина и N_3 цитозина очень малы. Поэтому даже небольшие концентрации внешнего катализатора способны приводить к существенному ускорению обмена 1H .

Высокие концентрации катализатора позволяют измерять τ_{op} и K_d намного точнее. Однако, при больших $[acc]$ увеличивается время корреляции молекул ДНК, поскольку возрастает ионная сила раствора [300]. Это ведёт к дополнительному ускорению релаксации, которое необходимо учитывать во избежание недооценки τ_{op} и переоценки K_d [300, 301]. В качестве примера можно привести τ_{op} четвёртой 4-й GC-пары олигомера $d(GCGCATCGCG)_2$, для которого в ранней работе было получено значение 16 мс при 15 °C [283]. Более поздняя оценка с поправкой на влияние ионной силы составила 21 мс, а без неё – 17 мс [301], что близко к раннему результату.

Влияние больших концентраций катализатора было изучено только в 1996–1997 годах [300, 301]. Тем не менее, в большинстве ранних исследований использовались небольшие $[acc]$, обычно не выше 200 ммоль/л [281–283, 320, 284, 285]. Поэтому на правильности их выводов влияние высоких $[acc]$ практически не отразилось.

Для решения проблемы высокой ионной силы существует два пути. Первый заключается в вычислении уменьшения T_{10} по $(\Delta\nu^b - \Delta\nu^{aac})$ необмениваемых протонов [300], или по зависимости $\Delta\nu^{aac}$ протонов имино-группы от $[H^+acc]$ при низких pH , когда $[acc]$ мала [299] (см. выражение (5.7)). Предлагалось также проводить все исследования в условиях равной ионной силы [301]. Второй путь – измерение T_1

методом переноса намагниченности из воды. Он основан на избирательном обращении спинов протонов у молекул воды и последующем измерении роста поглощения протонов имино-групп [302–305]. Перенос намагниченности возможен только в открытом состоянии, но величина T_{10} при этом не зависит от ионной силы раствора, что позволяет использовать любые [асс]. Поэтому в более поздних измерениях кинетики этот метод применялся как основной [305–307], или в комбинации с другими методами, в качестве контроля [277].

В многочисленных исследованиях флип-аута оснований варьировали длину и первичную структуру олигонуклеотидов, температуру, рН и ионную силу растворов, катализаторы обмена. Измерения скоростей релаксации спинов ^1H имино-групп и их сравнение с динамикой релаксации ядер других атомов позволили сделать ряд ценных выводов о флуктуациях ДНК при умеренных температурах. Далее мы опишем основные черты динамики ДНК при $T \leq 308$ К, которые удалось установить методами ^1H -ЯМР.

5.2. Кинетика и термодинамика одиночных открываний

Ранние исследования динамики нуклеиновых кислот, основанные на протонном обмене, проводились при малых концентрациях акцепторов H^+ . Сначала открывание дуплекса изучали по кинетике обмена водорода на тритий, количество которого определяли с помощью сцинтилляционного счётчика [308, 309]. Позднее, с развитием методик ^1H ЯМР, стали использовать протон-дейтронный или протон-протонный обмен. Хороший обзор этих исследований, проведённых как на ДНК, так и на РНК, представлен в работах Gueron, Kochoyan и Leroy [281–283]. Строго говоря, метод, описанный в главе 5.1, позволяет исследовать кинетику флип-аута только для тиминовых и гуаниновых оснований. Совсем не факт, что комплементарные им основания при этом тоже покидают свой стэк. Однако мы, для простоты, будем считать, что флип-аут в парах происходит согласованно; кроме того, на это указывают некоторые литературные данные [162, 306].

До 1980-х годов считалось, что пары оснований могут открываться только коллективно, а открытые состояния живут десятки, и даже сотни миллисекунд [143, 144]. Этого времени достаточно для обмена даже при разности рК более 3 и [асс] $\leq 10^{-3}$ моль/л, учитывая, что обычно $k_{coll} \leq 10^9$ л·моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$, см. выражения (5.5) и (5.9). Значения K_d , вычисленные при малых концентрациях акцептора, составляли порядка 0,01. Это противоречило данным других методов: например, измерения кинетики связывания РНК с ртутью давали $K_d \approx 0,002$ [310]. Согласно гидродинамическим измерениям для ДНК, $K_d \leq 10^{-4}$ [311], а анализ данных по её взаимодействию с формальдегидом показал, что $K_d \approx 10^{-5}$ ([312], цитата по [282]).

Однако, в 1985 году, было выяснено, что скорость обмена в нуклеиновых кислотах чувствительна к концентрации акцептора протонов [313, 314]. Для РНК Leroy et al. получили $\tau_{op} = 3$ мс и $K_d \approx 10^{-3}$ при 27 °С [313] что согласовалось с данными других методов [310]. Позднее, сравнивая кинетику каталитического обмена в ДНК и свободных нуклеозидах, Gueron et al. нашли, что для АТ-пар $K_d \approx 10^{-5}$ [281]. Таким образом, противоречия данных по обмену протонов с результатами других исследований были сняты.

В той же работе [281] доказано, что в отсутствие внешнего катализатора основным путём обмена ^1H является внутренний катализ. Заметные отличия τ_{op} у соседних оснований, а также разность K_d для АТ- и ГС-пар почти на порядок, свидетельствовали о том, что открывания происходят поодиночке [281]. Их некооперативность и слабая взаимозависимость были позднее продемонстрированы для коротких В-ДНК разной длины и первичной структуры [282–286], а также для Z-ДНК [315]. Таким образом,

было доказано преобладание флип-аутов над пузырьками денатурации при низких температурах.

Кинетика открывания нуклеотидной пары определяется не только её химической природой, но и последовательностью окружающих пар. Здесь можно условно выделить три фактора, определяющих динамику отдельных пар оснований.

Прежде всего, это длина олигомера и близость пары оснований к концу. Скорость каталитического обмена протона в концевых парах настолько велика, что их динамику нельзя исследовать при помощи ^1H -ЯМР. Этот эффект известен как концевое расщепление (англ. – «end-fraying») [316]. Тем не менее, доказано, что даже концевой паре для обмена протона необходимо разорвать водородные связи и нарушить стэк с единственным соседом [317]. Концевые эффекты в ДНК длиной более 12 пар оснований наблюдаются вплоть до третьей пары от конца, а у более коротких дуплексов, видимо, затрагивают даже центральные пары [316].

Второй фактор – влияние «контекста первичной структуры», то есть соседних оснований. Данные по нему несколько противоречивы. Например, хотя некомплементарная GT-пара (англ. – «GT-mismatch») искажает дуплекс и имеет аномальную кинетику ($K_d \approx 0.0007$), её влияние не распространяется дальше оснований, непосредственно связанных с ней в стэке [318]. С другой стороны, τ_{op} центрального тиминового основания участков 5'-AAA[T]AGA-3' и 5'-CAA[T]AGA-3' различаются в 3 раза, хотя их τ_{cl} похожи. Здесь нами приведены значения для 8-й AT-пары олигомера L и 13-й пары олигомера M, из работы [319]. Таким образом, кинетика флип-аута вполне может быть чувствительна к последовательности несмежных оснований, вплоть до трёх с каждой стороны.

Третьим фактором является расположение нуклеотидной пары в составе фрагмента со специфической последовательностью. Например, это может быть стык между участками, первый из которых состоит только из пуриновых оснований, а второй – только из пиримидиновых [282]. У центральных GC-пар олигомера 5'-d(GGAAAGCTTCC)2 при 15 °C $\tau_{op} = 7$ мс, а $K_d = 1.5 \cdot 10^{-6}$. Для сравнения: у тех же пар «контрольной» последовательности 5'-d(CCTTTCGAAAGG)2 аналогичные величины равны 40 мс и $3 \cdot 10^{-7}$ [282]. Другим известным фрагментом с аномальной кинетикой является 5'-GTGT-3', τ_{op} второй AT-пары которого в 8 раз меньше аналогичной величины для фрагмента 5'-GTCT-3' [28]. Более того, устойчивость GC-пар в 5'-GTGT-3' также снижена по сравнению с 5'-GTCT-3', хотя и в меньшей мере.

Среди специфических структур особое место занимают так называемые тракты – последовательности одинаковых оснований. Наиболее хорошо изучены А-тракты. Это последовательности вида 5'-A_n-3', где $n \geq 4$, либо 5'-A_nT_m-3', где $n + m \geq 4$ [320]. В первых исследованиях для τ_{op} оснований, находящихся в центре тракта, были получены величины 80–120 мс при 15 °C [320]. При этом кинетика граничных AT-пар трактов оставалась вполне обычной [320, 285].

Рентгеноструктурный анализ показал, что А-тракты стабилизируются трёхцентровыми водородными связями между цепями и характеризуются большим пропеллерным искажением (англ. – «propeller twist») [321–323]. Подобная структура получила название В'-ДНК [320, 285]. Методами молекулярной динамики подтверждено, что она сохраняется и в растворе, хотя точные значения параметров сильно зависели от выбора протокола [324]. Помимо трёхцентровых Н-связей, А-тракты стабилизированы за счёт повышенной энергии стэкинг-взаимодействий [325, 326].

Заменой тиминового оснований на дезоксиуридиновые в олигомерах, содержащих А-тракты, установлено, что основной вклад в стабилизацию этих структур вносят СН₃-группы тимина [325]. Повышенной стабильностью в В'-ДНК обладает не только дуплекс, но и сами открытые состояния. Их τ_{cl} достигают 0.4–1 мкс, то есть на 1–2

порядка выше, чем для АТ-пар вне трактов [299]. Кроме того, для А-трактов известны случаи согласованного флип-аута соседних нуклеотидных пар [307].

Не менее интересными структурами являются G-тракты, описанные Dornberger et al. [277]. По всей длине этих трактов наблюдается аномально быстрая кинетика одиночных открываний: $\tau_{op} \leq 12$ мс и $\tau_{cl} \leq 6$ нс [277]. Олигомеры, включающие G-тракты, исследованы методами ИК спектроскопии, кругового дихроизма и ЯМР в сочетании с молекулярной динамикой [327]. Показано, что G-тракт характеризуется специфической структурой. Он сохраняет основные черты обычной В-ДНК, однако имеет высокую тенденцию к переходу в А-форму [327].

Таким образом, нуклеотидная последовательность во многом определяет особенности структуры дуплекса. От неё зависит не только прочность связей каждого основания с соседями, но и набор возможных траекторий его выхода из дуплекса. Говоря языком термодинамики, окружение основания, наряду с его размером, определяет энтропию активации флип-аута, ΔS^{\ddagger} . При одиночных открываниях эта величина может играть определяющую роль, см. ниже.

Как мы уже вкратце упоминали, смещение основания перпендикулярно оси дуплекса происходит лишь в начале флип-аута. Дальнейшее его движение происходит по сложной траектории, на которой основание сохраняет водородные связи с дуплексом [161]. По данным Bouvier и Grubmuller, даже в начале флип-аута ни одна из активных колебательных мод ДНК не имеет решающего значения в этом процессе [163].

Чувствительность флип-аута к химической природе, размеру и окружению основания, сложность траекторий выхода, приводят к огромному разбросу значений его термодинамических параметров. Например, энтальпия активации ΔH^{\ddagger} находится в диапазоне от -25 [28] до 146 кДж/моль [307]. Причины этого вполне очевидны. Выход одних оснований требует одновременного разрыва целого ряда связей, в связи с чем ΔH^{\ddagger} высока. Однако в этом случае барьер свободной энергии ΔG^{\ddagger} снижается за счёт большой активационной энтропии ΔS^{\ddagger} , поскольку при разрыве нескольких связей возникает множество «удобных» траекторий флип-аута. Другие основания способны выходить из уотсон-криковской спирали «не силой, но хитростью», не разрывая большого числа связей одновременно. При этом траектория получается более сложной и значение ΔS^{\ddagger} часто бывает ниже нуля, компенсируя активационный барьер. Подобный эффект называется компенсационным. В химии сложных соединений он встречается достаточно часто [328].

Экспериментальные значения активационных параметров флип-аута тиминных оснований, полученные разными исследователями в период с 1987 по 2005 год, суммированы в таблице 5.1. Величины ΔS^{\ddagger} , для наглядности, заменены энтропийным вкладом – произведением $T \cdot \Delta S^{\ddagger}$, где $T = 288$ либо 293 К (различия, на наш взгляд, незначительны). Величины, взятые из таблиц, приведённых в работах [28, 329–331], указаны со значением погрешности. Если это значение отсутствовало у авторов, мы его также не приводим.

Когда в таблицах статьи были указаны только два активационных параметра, оставшийся вычисляли по выражению $\Delta G^{\ddagger} = \Delta H^{\ddagger} - T \cdot \Delta S^{\ddagger}$. Соответствующие значения помечены в таблице знаком «†»: их погрешность мы не указываем. Если погрешность не превышает 200 Дж/моль, она также не указана.

В остальных случаях ΔH^{\ddagger} вычисляли по уравнению [28]:

$$\ln\left(\frac{1}{T \cdot \tau_{op}}\right) = \ln\left(\frac{k}{h}\right) + \frac{\Delta S^{\ddagger}}{R} - \frac{\Delta H^{\ddagger}}{RT}, \quad (5.11)$$

где k – константа Больцмана, а h – постоянная Планка. Подставлялись значения τ_{op} при разных температурах, взятые из представленных в статьях таблиц, либо полученные

путём оцифровки графиков. По этим же данным вычисляли $\Delta G^{\ddagger 0}$ и $T \cdot \Delta S^{\ddagger 0}$. Исключение составляет работа Moe et al. [318], где были готовые табличные значения $\Delta G^{\ddagger 0}$. Вычисленные из её графиков $\Delta H^{\ddagger 0}$ мы представили без указания погрешности, однако для $T \cdot \Delta S^{\ddagger 0}$ она приравнена к погрешности $\Delta G^{\ddagger 0}$. Данные, полученные путём оцифровки, мы поместили знаком «◇» в графе «ссылка».

Таблица 5.1. Активационные термодинамические параметры АТ-пар в различных контекстах первичной структуры. Объяснения см. в тексте

Контекст первичной структуры	$\Delta H^{\ddagger 0}$, кДж/моль	$T \cdot \Delta S^{\ddagger 0}$, кДж/моль ($T = 288-293$ К)	$\Delta G^{\ddagger 0}$, кДж/моль	Ссылка
5' -CCT [T] TCG- (5)	52	-6.4	58.4	[282]◇
(5) -GCT [T] TCC-3'	57	-1.4	58.4	[282]◇
(4) -AAT [T] T*GC- (1)	82	3±8	79±8	[318]◇
(4) -AAT [T] TGC- (1)	83±8	19±7	64 †	[330]
(10) -TAT [T] TGC-3'	118±3	55 †	63	[331]
(6) -TAT [T] TAT- (4)	122±3	58 †	64	[331]
(2) -CTT [T] TAT- (3)	146,8	84,2	62,6	[307]◇
(7) -ATT [T] ATT- (3)	100±5	38 †	62	[331]
(5) -ATT [T] GCG-3'	46±17	-12±14	58 †	[330]
(11) -TAT [T] GC-3'	75±12	17 †	58	[331]
(11) -ATT [T] GC-3'	121±4	62 †	59	[331]
(1) -CTT [T] CGA- (4)	65	7.7	57.3	[282]◇
(4) -AAT [T] CGC- (1)	88	13±12.5	75±12.5	[318]◇
(6) -CTT [T] CC-3'	46	-8,9	54,9	[282]◇
(6) -TGT [T] CTA- (4)	33±4	-26 †	59	[331]
(3) -ATC [T] ATT- (7)	88±4	24 †	64	[331]
5' -CC [T] TTC- (6)	43	-14	57	[282]◇
(4) - AGC [T] TTC- (1)	55	-3.5	58.5	[282]◇
(3) - GAA [T] TCG- (2)	76	-3±4	79±4	[318]◇
(3) -GAA [T] TT*G- (2)	79±4	-1±4	80±4	[318]◇
(3) - AAA [T] TTG- (2)	71±13	7±13	64 †	[330]
(3) - GAA [T] TCG- (2)	47.6	-10.9	58.5	[299]◇
(2) - CGA [T] CGC- (1)	65	7.5	57.5	[281]◇
(3) - AGA [T] CTG- (2)	29±10	-31±10	60 †	[28]
(2) - AGA [T] CAC- (1)	71±7.5	14±7.5	57	[329]
(2) - AAA [T] AAA- (8)	90±2.5	27 †	63	[331]
(6) - AAA [T] AGA- (4)	54±4	-7 †	61	[331]
(3) - ACA [T] GTG- (2)	25±13	-31±13	56 †	[28]
(10) -AGA [T] GCG-3'	54±12	-7 †	61	[331]
(5) -ATG [T] GCG-3'	-25±25	-81±24	56 †	[28]
(5) -CTG [T] TCT- (5)	71±4	11±4 †	60	[331]
(5) -ATC [T] GCG-3'	33±8	-23±11	56 †	[28]

Приведённые в таблице данные расположены в таком порядке, чтобы находящиеся рядом тиминовые основания были максимально похожи по контексту первичной структуры. Это даёт возможность сравнить термодинамические параметры оснований с похожим окружением. Исследованные пары приводятся в квадратных скобках. Цифры, указанные в круглых скобках в начале и конце фрагмента последовательности нуклеотидов, показывают число пар до 5'- и 3'-конца олигомера соответственно. Если основание расположено близко к одному из концов, то обозначен сам 5'- или 3'-конец. Основания, находящиеся в составе А-трактов, подчёркнуты. Звёздочкой «*» обозначены нуклеотиды гуанин-тиминовой пары, исследованной в работе [318].

В таблице 5.2. мы приводим аналогичные величины для флип-аута GC-пар. Способы расчёта и обозначения – те же, что и для таблицы 5.1.

Таблица 5.2. Активационные термодинамические параметры GC-пар в различных контекстах первичной структуры. Объяснения см. в тексте выше

Контекст первичной структуры	ΔH^{\ddagger} , кДж/моль	$T \cdot \Delta S^{\ddagger}$, кДж/моль ($T = 288 - 293$ К)	ΔG^{\ddagger} , кДж/моль	Ссылка
(1) -GCA [G] ATC- (4)	42±13	-22±14	64 †	[28]
5' -GTA [G] ATC- (3)	67±3	6±3	61	[329]
(3) -ATA [G] AAC- (7)	92±8	28 †	64	[331]
(3) -TTC [G] AAA- (2)	65	2,3	62,7	[282]◊
5' -CGC [G] ATC- (3)	46	-14,4	60,4	[283]◊
5' -CGC [G] AAT- (5)	—	—	7±16	[318]◊
5' - GC [G] ATC- (11)	104±8	41 †	63	[331]
5' - GC [G] ATC- (11)	109±3	45 †	64	[331]
(2) -AAA [G] CTT- (3)	30	-28	58	[282]◊
(6) -T*TT [G] CG-3'	—	—	79±25	[318]◊
(6) -TTT [G] CG-3'	92±21	31±19	61 †	[330]
(6) -TGT [G] CG-3'	67±8	6±9	61 †	[28]
(6) -TCT [G] CG-3'	29±16	-31±17	60 †	[28]
(3) -ATA [G] AAC- (7)	92±8	28 †	64	[331]
5' -AGT [G] ATC- (3)	77±6	16±6	61	[329]
(4) -ATC [G] CG-3'	47	-12,3	59,3	[283]◊
(6) -TTC [G] CG-3'	—	—	88±21	[318]◊
(4) -CAT [G] TGC- (1)	62±8	1±7	61 †	[28]

Из 32 AT-пар, активационные параметры которых представлены в таблице 5.1, для шестнадцати $T \cdot \Delta S^{\ddagger} \leq 0$. Ещё у девяти пар высокие положительные значения активационной энтропии легко объяснимы расположением в составе А-трактов, либо близостью к концу дуплекса. В самом деле, влияние концевых эффектов наблюдается вплоть до третьей пары [316]. Поэтому для оснований вблизи концов более выгоден выход путём разрушения большого числа взаимодействий, поскольку из-за концевого расщепления некоторая их часть, с высокой вероятностью, уже нарушена.

Аналогичная ситуация наблюдается и в А-трактах, где структура дуплекса дополнительно стабилизирована трёхцентровыми Н-связями, и усиленным за счёт пропеллерного искажения стэкингом [321, 285, 322, 323]. Эта стабилизация является причиной больших значений ΔH^{\ddagger} для оснований в составе трактов.

Положительные значения $T \cdot \Delta S^{\ddagger}$ оставшихся семи AT-пар составляют в среднем 2 – 14 кДж/моль, что почти соизмеримо со стандартной ошибкой термодинамических измерений, см. таблицы 5.1. и 5.2. Исключение составляет только пара AT₇ олигомера L из работы Coman и Russu, для которой $T \cdot \Delta S^{\ddagger} = 23,8$ кДж/моль [331]. В большинстве же случаев энтропийная составляющая либо увеличивает активационный барьер флип-аута тиминового основания, либо уменьшает его очень незначительно.

Данные по флип-ауту гуаниновых оснований более скудны. Полный набор активационных параметров представлен в таблице 5.2 только для 15 GC-пар. Из них только пять характеризуются $T \cdot \Delta S^{\ddagger} < 0$. Это можно объяснить не только более прочными связями в GC-паре, но и большим размером гуанинового основания по сравнению с тиминовым.

В парах, где $T \cdot \Delta S^{\ddagger} > 0$, закономерности примерно те же, что и для AT-пар. Самые большие ΔH^{\ddagger} и $T \cdot \Delta S^{\ddagger}$ наблюдаются у GC-пар, находящихся вблизи концов дуплекса. Среди остальных наибольшими $T \cdot \Delta S^{\ddagger}$ обладают гуаниновые основания, расположенные между двумя аденинами. Что интересно, в случае пары GC₄ олигомера d(AGTGATCTAC):(GTAGATCACT), исследованной в работе [329], концевые эффекты и расположение между адениновыми основаниями, видимо, «аннигилируют». Это

ведёт к умеренным значениям ΔH° и $T \cdot \Delta S^\circ - 67$ и 6.1 кДж/моль. Значения $T \cdot \Delta S^\circ$ всех прочих GC-пар не превышают 16 кДж/моль.

Обобщая данные таблиц 5.1 и 5.2, можно сказать, что соотношение энтальпийного и энтропийного вкладов в активационный барьер флип-аута определяется совокупностью многих факторов. Из них основными являются размер основания, прочность комплементарных Н-связей, энергия стэкинг-взаимодействий и контекст первичной структуры – вплоть до трёх оснований с каждой из сторон.

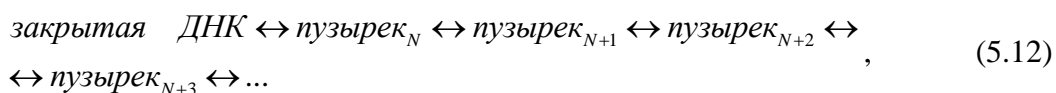
Чем меньше взаимодействий разрушается при флип-ауте основания и чем сложнее траектория его выхода, тем ниже ΔH° и ΔS° этого процесса. Поэтому открывание нескольких соседних оснований должно характеризоваться значительной ΔH° , компенсированной большой $T \cdot \Delta S^\circ$. Ярким примером является высокая ΔH° согласованного флип-аута двух соседних тиминовых оснований в А-тракте, полученная в работе [307]. Её значение составляет почти 147 кДж/моль, см. таблицу 5.1.

Процесс зарождения пузырька денатурации, в котором участвует целый ряд соседних оснований, должен характеризоваться ещё более высокими ΔH° и ΔS° . Это предположение можно подтвердить с помощью анализа результатов ФКС молекулярных маячков. В следующем разделе мы оценим активационные термодинамические параметры образования пузырьков по температурным зависимостям их кинетики, полученным в работе Altan-Bonnet et al. [213].

5.3. Термодинамические различия флип-аутов и пузырьков денатурации. Объяснение расхождений результатов ФКС с данными других методов

Флуоресцентная корреляционная спектроскопия молекулярных маячков [279, 332, 213] является единственной методикой, позволяющей изучать кинетику пузырька денатурации в ДНК. Принцип этого метода вкратце описан в разделе 4.3. В работе Altan-Bonnet et al. исследованы кинетические и термодинамические параметры релаксации пузырьков в маячках с различной первичной структурой [213].

Нас интересует не релаксация пузырька, а его зарождение. Как будет показано далее, этот процесс включает одновременное открывание N соседних пар оснований. Оценки минимального N и доказательства того, что $N > 1$, приведены в разделе 6.1. Наиболее вероятным значением N является 4–6 пар оснований. Зарождение пузырька соответствует первой обратимой реакции в схеме:



где индекс указывает длину открытой области, в нуклеотидных парах.

Пузырька длиной в 4–6 пар оснований вполне достаточно для разделения флуофора и тушителя, см. оценку в разделе 5.3.1. Поэтому пузырек_N с высокой вероятностью является флуоресцирующей формой.

Пузырьки длиной N и более пар оснований обладают относительно большими временами жизни и, очевидно, вносят основной вклад в общую флуоресценцию. В силу этого можно пренебречь аналогичным вкладом короткоживущих открытых состояний, в образовании которых участвует менее N пар. Следовательно, можно допустить, что времена открытого состояния $\tau_{cl,bub}$, полученные в работе Altan-Bonnet et al. [213], характеризуют только пузырьки.

В этом приближении среднее время закрытого состояния $\tau_{op,bub}$ легко вычислить по выражению

$$\tau_{op,bub} = \frac{\bar{\tau}_{cl,bub}}{K_{d,bub}}$$

где $\bar{\tau}_{cl,bub}$ – среднее время открытого состояния, а $K_{d,bub}$ – константа равновесия реакции открывания маячка в месте присоединения флуорофора и тушителя. Соответственно, активационные параметры зарождения пузырька можно вычислить простым сложением активационных характеристик релаксации со стандартными величинами.

Стандартные термодинамические параметры были оценены для температурного интервала пред-плавления (англ. – «pre-melting transition» [326, 333]). Верхняя температурная граница этого интервала для каждого маячка выбрана как T начала роста $d(\ln[I(T)])/dT$, где $I(T)$ – нормированная величина общей флуоресценции. Строго говоря, равенство $K_{d,bub} = I(T)/(1 - I(T))$ не доказано. Однако тесная связь $K_{d,bub}$ с $I(T)$ вполне позволяет считать, что повышение $d(\ln[I(T)])/dT$ совпадает с ростом $d(\ln[K_{d,bub}])/dT$, соответствуя переходу в фазу плавления.

Величина $|K_{d,bub} - I(T)/(1 - I(T))|$ для интервала пред-плавления считалась малой по сравнению с погрешностью измерения $I(T)$. Поэтому она была принята равной нулю. Данное приближение вполне допустимо, так как нашей целью является, в основном, качественная оценка термодинамических характеристик пузырьков.

Нижняя граница интервала оценки стандартных параметров была установлена как T , при которой отношение $I(T)$ к нормированной ошибке её измерения снижается до 8. Это позволило пренебречь погрешностью, связанной с логарифмированием сигнала. Кроме того, при выходе T за нижнюю границу интервала оценки значение $d(\ln[I(T)])/dT$ маячков начинает заметно увеличиваться. Природа этого эффекта будет подробно рассмотрена в разделе 6.5.

Интервалы оценки термодинамических параметров составляли: 38–52 °С для M_{18} , 30–54 °С для A_{18} и 31–44 °С для $(AT)_9$. Температурные зависимости времён $\tau_{cl,bub}$ были рассчитаны из данных по кинетике релаксации. Данные любезно предоставлены О. Кричевским, под руководством которого выполнялись эксперименты по ФКС [213]. Активационные параметры закрывания пузырьков найдены по формуле (5.11). Для расчёта стандартных термодинамических величин по зависимостям $K_{d,bub}$ от T использовалось выражение

$$\ln[K_{d,bub}] = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}, \quad (5.13)$$

Данные по температурной зависимости $I(T)$ маячка M_{18} предоставлены О. Кричевским. Точки $I(T)$ остальных маячков получены нами путём оцифровки кривых на рис. 2 из работы [213]. Ошибка оцифровки в расчётах термодинамических величин не учитывалась. Нормированная ошибка измерения $I(T)$ маячков A_{18} и $(AT)_9$ приравнена к аналогичной погрешности для M_{18} , составляющей 0.005.

Значения активационных параметров открывания пузырьков представлены в таблице 5.3. Как и в случае таблиц 5.1 и 5.2, активационные изменения энтропии ΔS^\ddagger° заменены для наглядности на энтропийные вклады $T \cdot \Delta S^\ddagger^\circ$.

Значения $\tau_{op,bub}$, соответствующие приведённым в таблице 5.3 активационным барьерам, находятся в пределах 0.4–2.3 мс. Данные времена хорошо укладываются в диапазон, получаемый экстраполяцией активационных термодинамических параметров флип-аута на 38 °С и составляющий 0.25–7 мс, см. выражение (5.11) и таблицу 5.1.

Как и следовало ожидать, энтропия активации оказалась во всех случаях положительной и достаточно большой. Однако для A_{18} значения ΔH^\ddagger° и $T \cdot \Delta S^\ddagger^\circ$ существенно снижены по сравнению с другими маячками. Это связано с особыми свойствами середины A_{18} , представляющей собой А-тракт, являющийся участком В'-ДНК, см. раздел 5.2. Возможные механизмы снижения ΔH^\ddagger° и $T \cdot \Delta S^\ddagger^\circ$ в подобных структурах описаны ниже, а также в разделе 5.3.3. Стоит отметить, что в отличие от ΔH^\ddagger° образования пузырька, ΔH^\ddagger° флип-аута в подобных структурах, напротив, сравнительно высока, см. таблицу 5.1. Таким образом, поведение A_{18} является хорошей иллюстрацией принципиальной разницы между этими типами открытых состояний.

Таблица 5.3. Активационные термодинамические параметры зарождения пузырька в молекулярных маячках, кДж/моль. $T = 38 \text{ }^\circ\text{C}$. Места прикрепления флуоресцентной метки подчёркнуты

Маячок	Структура АТ-богатой области, от 5'- к 3'-концу	ΔH^\ddagger	$T \cdot \Delta S^\ddagger$	ΔG^\ddagger
M ₁₈	ААТАТАААААТ [*] АТТАААААТ	120 ± 23	61 ± 25	59.0 ± 1.5
(АТ) ₉	АТАТАТАТАТА [*] АТАТАТАТА	111 ± 25	53 ± 26	58 ± 1
A ₁₈	ААААААААААТ [*] ААААААААА	84 ± 22	27 ± 23.5	57.0 ± 1.5

Главным результатом ФКС молекулярных маячков является большой диапазон $\tau_{cl,bub}$ составляющий 10^{-6} – 10^{-3} с [213]. Однако, поскольку характерное τ_{cl} флип-аута редко превышает 10^{-7} с, сходство τ_{op} и $\tau_{op,bub}$ говорит о различии K_d и $K_{d,bub}$ на 1–4 порядка. $K_{d,bub}$ по результатам ФКС серьёзно расходятся и с данными других методов [311, 312]. Кроме того, при таких больших $K_{d,bub}$ подавляющее большинство протонов имино-групп должны обмениваться из пузырьков. Это противоречит не только данным о взаимонезависимости флип-аутов, но и всей кинетике обмена ^1H , описанной в разделе 5.1.

Самый простой способ разрешить эти противоречия – считать результаты ФКС маячков недостоверными, ошибочными. Например, по мнению Пейярда с соавт., флуоресцентная метка может оказывать сильное влияние на динамику дуплекса [334]. Однако если сопоставить ряд фактов, на первый взгляд не связанных между собой, то достоверность данных ФКС становится очевидной.

Прежде всего, рассмотрим одинаковый порядок времён во всех маячках. Как уже было сказано, A₁₈ мог образовывать структуры со сдвигом, а (АТ)₉ – ещё и крестообразные шпильчатые структуры [213]. Однако в действительности времена релаксации маячков различались умеренно. Причиной этого является не сохранение стэка в открытых участках дуплекса, а его быстрое повторное образование. В исследованиях на одноцепочечной полицитидиловой кислоте показано, что образование и распад стэка происходят в масштабе десятков-сотен наносекунд [335].

Наличие стэка в одноцепочечных нуклеиновых кислотах подтверждено на молекулах самой различной длины: от димеров [74, 336, 337] до полинуклеотидов [39, 338–340]. По данным дифференциальной сканирующей калориметрии, во время реассоциации коротких цепей в дуплекс при низких температурах большая их часть находится в форме одиночной спирали [341, 342]. Это подтверждено также сочетанием микрокалориметрических исследований с рассеянием нейтронов [343]. Энтальпия диссоциации олигомеров при $T_{пл}$ превышает энтальпию их ренатурации почти вдвое, поскольку при плавлении тепловая энергия расходуется не только на разрыв Н-связей, но и на разрушение стэкинга [341].

По разным данным, константа равновесия для распада стэка в одноцепочечной ДНК при температурах менее до 40 °С находится в интервале 0.05–0.5 и сильно зависит от последовательности нуклеотидов, см. напр. [340, 341]. При этом давно известно, что одноцепочечная поли(А) является одной из наиболее стабильных форм в водном растворе [338, 339]. Участок ДНК, состоящий из адениновых нуклеотидов, обладает значительной персистентной длиной, по сравнению с одноцепочечными фрагментами другой первичной структуры [344]. С помощью спектроскопии молекулярных маячков было показано, что высокая ригидность этих участков обусловлена значительной энтальпией стэкинга [332].

Образование стэкинг-взаимодействий в расплетённых участках должно заметно снижать ΔH^\ddagger пузырька. Этот эффект, видимо, особенно выражен в маячке A₁₈, содержащем полиадениловый участок. Более того, A₁₈ обладает наименьшими $\tau_{cl,bub}$. Это хорошо согласуется с данными о возможности реассоциации одиночных цепей ДНК, в которых частично сохранены стэкинг-взаимодействия, см. выше. Из сниженных

ΔH° пузырька и ΔH° его закрывания следует и малая активационная энтальпия его зарождения. Это доказывает возможность радиального расхождения цепей без нарушения стэкинга.

На важную роль стэкинг-взаимодействий могут косвенно указывать и результаты спектроскопии комбинационного светорассеяния. Согласно этим данным, большая часть стэкинг-взаимодействий в полинуклеотиде *poly(A):poly(T)* сохраняется даже после массового разрыва Н-связей при температурах выше 65 °С [333]. В другой ДНК, исследованной в данной работе – *poly(A-T):poly(A-T)* – распад стэка происходил одновременно с нарушением Н-связей. Первичные структуры изученных ДНК совпадают, соответственно, с серединами маячков A_{18} и $(AT)_9$, а их длина составляет тысячи пар оснований. Однако ни одна из этих ДНК не образовывала альтернативных вторичных структур в процессе исследования, несмотря на многократный нагрев до 85 °С и выше [333]. Это позволяет утверждать, что вклад от образования подобных структур в экспериментах по ФКС находится в рамках погрешности метода.

Перейдём теперь к вопросу о расхождении данных ^1H -ЯМР и ФКС. Чтобы понять его природу, необходимо обратиться к материалу предыдущих глав нашего обзора. Для объяснения противоречий результатов ФКС маячков с данными других методов можно выделить четыре взаимодополняющих фактора.

Первый фактор мы условно назовём «секвенциальным» (от англ. *sequence* – последовательность).

5.3.1. Секвенциальный фактор. Роль первичной структуры ДНК

Известно, что стабильность участка ДНК определяется его нуклеотидной последовательностью. Типичные ΔH° открывания АТ- и GC-пар, используемые в моделях ближайших соседей, составляют, соответственно, 35.5 и 39.3 кДж на моль пар оснований [345]. Для малых пузырьков изменения ΔS° при открывании ряда АТ- и GC-пар должны быть одного порядка. Предположим, что при образовании небольшого пузырька все его нуклеотидные пары открываются одновременно. Допустим, что ΔS° мало зависит от последовательности нуклеотидов. Тогда, исходя из общеизвестного выражения для константы равновесия $K = \exp[-\Delta G^\circ \cdot (R \cdot T)^{-1}]$, получаем снижение $K_{d,bub}$ в некотором участке примерно в 4.5 раза с заменой каждой очередной АТ-пары на GC-пару.

В действительности, в силу компенсационного эффекта (см. раздел 5.2), $K_{d,bub}$ должна зависеть от последовательности нуклеотидов несколько меньше. Однако для N , равного 4–6 парам оснований, вполне возможны различия $K_{d,bub}$ на два порядка и более, что подтверждается экспериментами [29, 30]. Кроме того, очень показательна высокая температурная устойчивость концевых участков маячков, динамика которых исследована с помощью концевых меток, см. рис. 4.11,b из работы [213]. Флуоресцентные профили плавления маячков с серединной и концевой метками показаны на рис. 5.2.

Разделению флуофора и тушителя на конце способствуют как односторонние стэкинг-взаимодействия, так и возможность свободного вращения вокруг связей Р–О. Кроме того, расхождению цепей в данном случае способствует концевое расщепление, затрагивающее три крайние пары оснований [316]. Тем не менее, концы маячков значительно стабильнее, чем их середины. Низкая устойчивость концевой пары компенсируется в этом случае прочностью комплементарных связей и стэкинга в соседних с ней GC-парах.

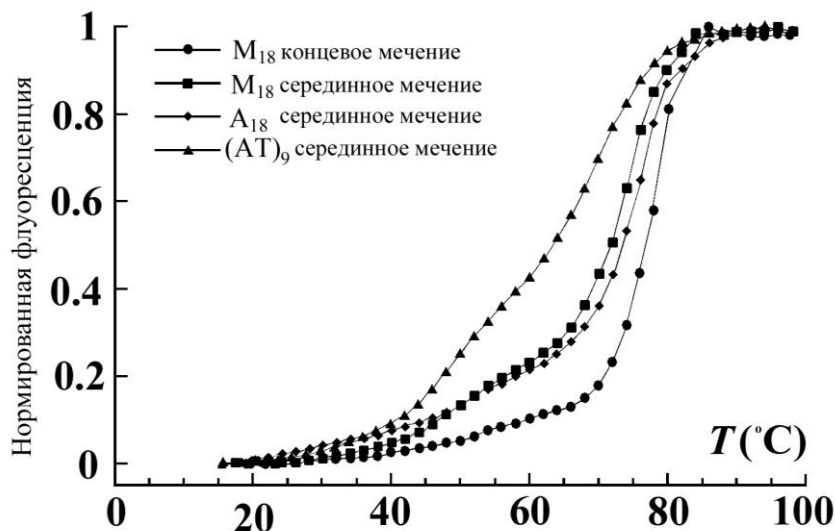


Рис. 5.2. Флуоресцентные профили плавления маячков M_{18} (■), A_{18} (◆) и $(AT)_9$ (▲) с серединной меткой, а также маячка M_{18} с концевой меткой (●), см. рис. 4.11. Каждый профиль отражает долю открытых маячков, вычисляемую по формуле (4.4).

Таким образом, зарождение пузырька включает одновременное открывание некоторого минимального числа пар оснований N , см. уравнение (5.12). К сожалению, точно установить N невозможно. Единственное, что можно утверждать с высокой долей вероятности – то, что N значительно больше единицы.

Одним из доказательств этого факта является феномен критической длины олигомеров, который мы рассмотрим в следующем разделе. Этот раздел посвящён описанию второго фактора, связанного с разностью принципов ^1H -ЯМР и ФКС молекулярных маячков.

5.3.2. Методический фактор и некоторые особенности ^1H -ЯМР

В разделе 4.1 описан феномен критической длины для олигомеров, состоящих из двух концевых GC-богатых областей и расположенной между ними AT-богатой области. Важно отметить, что подобное строение имели почти все олигонуклеотиды, на которых проводились ^1H -ЯМР-исследования флип-аута. Если длина такой ДНК ниже критической, то образование в ней пузырька денатурации невозможно. Вместо этого происходит диссоциация дуплекса. Критическая длина должна быть связана с N достаточно простым соотношением, поскольку для дестабилизации длинного дуплекса необходимо, чтобы даже самый малый пузырёк включал достаточное число оснований. Значение критической длины установлено как экспериментально [261], так и путём расчётов [262], и составляет 20–22 пары оснований. Типичная длина олигомеров, на которых исследовали кинетику флип-аута, была почти в 2 раза меньше, см. таблицы 5.1 и 5.2.

В присутствии катализатора диссоциировавший олигонуклеотид обменивает все протоны за десятки наносекунд. Это на порядки меньше характерного промежутка между импульсами при изучении обмена ^1H методами инверсии-восстановления или переноса намагниченности из воды. Полная диссоциация цепей будет «не видна» и в случае протон-дейтронного обмена, так как уширение резонансных линий при этом получится слишком большим. Похожими свойствами должны обладать и пузырьки.

Уже при концентрациях катализатора около 100 ммоль/л к обмену протона приводит примерно один флип-аут из пяти. Поэтому если время полной диссоциации дуплекса превышает τ_{op} хотя бы на два порядка, главную роль в обмене ^1H будет играть

именно флип-аут. Более того, для высоких [асс] достаточно различия даже на один порядок! Отсюда следует простой вывод: соотношение вкладов пузырьков и флип-аутов в процесс обмена протонов зависит не от $K_{d,bub}/K_d$, а от $\tau_{op,bub}/\tau_{op}$. Эта особенность позволяет исследовать флип-аут при достаточно высоких температурах. Например, даже при 35 °С время диссоциации олигомера $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ превышает 120 мс, а её константа равновесия составляет не более 0,00085 [283].

Денатурационное поведение олигомеров, на которых выполнялись ЯМР-исследования, является, в свою очередь, прекрасной иллюстрацией роли секвенциального фактора. К примеру, основной причиной стабильности олигомера $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ является высокое содержание в нём GC-пар. Для наглядного сравнения можно привести похожий по длине олигонуклеотид $d(\text{CAACTTGATATTAATA}):d(\text{TATTTATATCAAGTTG})$, концевая AT-область которого полностью денатурирует между 7 и 26 °С [346]. Поэтому низкая стабильность AT-доменов в маячках качественно вполне согласуется с данными по денатурации других олигонуклеотидов ДНК.

Однако, роль секвенциального фактора можно оценить количественно, хотя и приближённо. Достаточно лишь сравнить флуоресцентные данные с фотометрическими профилями коротких ДНК, похожих по первичной структуре. Это самокомплементарные олигомеры $L_{36}AS$ и $L_{60}B_{36}$, динамика пузырьков в которых исследована методом закалки [55, 62, 261]. Их AT-богатые домены имеют длины, соответственно, 16 и 36 пар оснований, и очень малую долю GC-пар – 2/16 и 4/36.

Для оценки роли первичной структуры удобно ввести условный параметр T_n – температуру начала плавления. Пусть это будет такая температура, при которой фотометрический сигнал достигает 1% от максимального. Значения T_n олигомеров $L_{36}AS$ и $L_{60}B_{36}$ составляют 40 и 39 °С. Допуская, что зависимость T_n от доли GC-пар [GC] сходна с аналогичной зависимостью для $T_{пл}$, и пользуясь эмпирической формулой Marmur и Doty $T_{пл} = 69,3 + 41 \cdot [GC]$ [56], получаем в среднем $T_n \approx 34,6$ °С для [GC] = 0. Это значение больше T_n маячка M_{18} всего на 4,6 °С, что свидетельствует о важной роли секвенциального фактора.

Однако прямое сравнение «флуоресцентных» T_n маячков с «фотометрическими» T_n шпилек, вероятнее всего, ведёт к некоторой переоценке их разницы. В самом деле, усиление поглощения при длине волны 260–268 нм связано с нарушением стэкинг-взаимодействий, см. раздел 1.1. При низких T степень этого нарушения может быть невелика даже в одноцепочечных участках пузырьков. В результате, T_n по данным общей флуоресценции должна быть несколько ниже аналогичного фотометрического показателя. Это ведёт к недооценке роли секвенциального фактора. Важно заметить, что данный эффект должен быть наиболее выражен для маячка A_{18} , поскольку стэкинг полиадениловых цепей наиболее прочен, см. выше.

Кроме того, влияние первичной структуры может зависеть от длины AT-богатого домена. В недавних исследованиях установлено, что стабильность малого участка ДНК определяется не только его нуклеотидной последовательностью, но и устойчивостью фрагментов, образующих соседние витки спирали. Влияние геометрических эффектов было наглядно показано при помощи ультрафиолетового лазерного фотолиза гуанина [347]. Согласно данным этого метода, большие флуктуации в AT-богатом домене сильнее всего нарушают стабильность участков, расположенных от него в 10–11 парах оснований, то есть через полный виток уотсон-криковской спирали.

Таким образом, в области длиной 18 AT-пар аденин-тиминового оснований, образующей почти 2 витка, должно проявляться взаимное усиление флуктуаций в соседних участках центрального домена. С учётом всего сказанного становится очевидным, что стабильность AT-богатого домена маячка M_{18} по данным Altan-Bonnet et al. вполне обычна для фрагмента ДНК с подобной первичной структурой.

Тем не менее, T_n (АТ)₉ и А₁₈ составляют, соответственно, 26 и 22 °С. Такие низкие значения невозможно объяснить одним лишь секвенциальным фактором, даже с учётом эффектов спирали и устойчивости стэкинга. Кроме того, [GC] = 0 в АТ-богатых областях всех трёх маячков, но при этом диапазон их T_n составляет 8 °С, а диапазон $T_{пл}$ – почти 10 °С, см. рис. 5.2.

Как видно из рисунка 5.2, маячок А₁₈, имеющий наименьшую T_n , тем не менее, обладает наибольшей $T_{пл}$, поскольку его АТ-богатая середина представляет собой А-тракт. Как уже упоминалось в разделе 5.2, данные структуры стабилизированы трёхцентровыми Н-связями между цепями. Возникающее при этом большое пропеллерное искажение дополнительно усиливает стэкинг. Так как при высокой температуре Н-связи и стэкинг-взаимодействия нарушаются одновременно, повышенная $T_{пл}$ А-тракта представляется вполне логичной.

Малую T_n маячка А₁₈ можно объяснить возможностью радиального расхождения цепей с минимальным нарушением стэкинг-взаимодействий. На это указывают термодинамические свойства А₁₈, анализ которых проведён в разделе 5.3. Однако существует ещё один важный фактор, который связан с локализацией нелинейных возбуждений в искажённых участках ДНК. Его можно назвать «бризерным». Вклад данного фактора в снижение T_n максимален именно для А₁₈, хотя в случае (АТ)₉ и М₁₈ он, по-видимому, тоже является существенным.

5.3.3. Бризерный фактор

В работах Peyrard, Choi, Alexandrov и других исследованиях, описанных в разделе 4.2 показано, что нестабильные области ДНК являются преимущественным местом локализации энергии нелинейных возбуждений. В исследованиях модифицированной модели ПБД установлено, что некоторые области гетерогенной ДНК характеризуются при малых температурах значительно большими временами открытого состояния, чем остальные [274–276]. Как правило, в этих участках высок процент АТ-пар и/или низка средняя энергия стэкинг-взаимодействий между основаниями.

Очевидно, самым нестабильным участком любого маячка является место ковалентного присоединения флуоресцентной метки. Во-первых, активационный барьер образования пузырька там должен быть снижен за счёт увеличенной ΔS^\ddagger . Во-вторых, возможно влияние самой метки на динамику ДНК, заключающееся в снижении ΔH^\ddagger . Локализация энергии по этому механизму является наиболее эффективной, по-видимому, в случае маячка (АТ)₉, АТ-богатый домен которого обладает наименьшей суммарной ΔH^\ddagger стэкинга. Его $T_n = 26$ °С, что на 4 °С меньше T_n М₁₈ и на 8.6 °С меньше средней T_n олигомеров L₃₆AS и L₆₀V₃₆, экстраполированной на [GC] = 0, см. выше.

Второй механизм локализации энергии нелинейных возбуждений связан с искажениями структуры ДНК. Характерным примером является как раз искривление оси дуплекса в АТ-богатом участке маячка А₁₈. Это искривление является типичным для А-трактов [285, 320, 348]. Переход энергии бризеров в энергию колебаний молекулярной решётки ДНК внутри её искривлённой области подробно исследован в работе Ting и Peyrard [349]. Они показали, что за счёт нелинейности потенциала Морзе рост амплитуды колебаний вдоль Н-связей приводит к снижению их частоты. В результате увеличивается вероятность улавливания каждого последующего бризера искажённым участком ДНК. Похожий эффект был показан и на модифицированной модели ПБД, в которой искажение вводилось через диполь-дипольные взаимодействия [204]. Именно локализация энергии в середине А-тракта может быть дополнительной причиной снижения энтальпии активации для зарождения пузырька в А₁₈.

Наряду с основными результатами Altan-Vonnet с соавт. существует ещё одна черта кинетики открывания маячков, которая заслуживает внимания. Нижняя граница времени релаксации пузырька, по данным ФКС, находится в интервале 10^{-7} – 10^{-6} с, см.

рис. 4.12. Это время сравнимо с характерным временем распада стэкинга в одноцепочечной полицитидиловой кислоте, составляющим 180–380 нс при 20 °С и 130–220 нс при 30 °С [335]. Похожий масштаб времени указывает на возможность образования малых открытых состояний ДНК, в которых стэкинг-взаимодействия не успевают нарушиться. Если при этом флуорфор удаляется от тушителя, такие открывания будут вносить во флуоресцентный сигнал некоторый вклад, который может оказаться значимым. С другой стороны, из-за высокой погрешности измерения на малых временах эти открывания могут быть не видны на «кинетических» кривых – таких, как представлены на рис. 4.12.

По сравнению с типичными временами релаксации пузырьков, полученными в работе [213], время жизни подобных открытых состояний очень мало. Фактически, они не являются «полноценными» пузырьками денатурации, а представляют собой лишь крупные флуктуации.

Отсюда и название четвёртого фактора, способного зависить регистрируемую вероятность открывания маячков – флуктуационный фактор.

5.3.4. Флуктуационный фактор и оценка его вклада

На самом деле, анализ данного фактора связан не столько с объяснением данных ФКС, сколько с попыткой примирить значения, полученные на модели ПБД, с результатами экспериментов. Для ДНК из одних АТ-пар K_d образования пузырька длиной 2–3 пары оснований в модели составляет 0,002–0,004 при 37 °С [350]. Это значение намного ближе к результатам ФКС маячков, чем к данным прочих экспериментов, согласно которым $K_{d,bub}$ ДНК не превышает 10^{-5} ([312], цитата по [282]).

Предположим, сохранение стэкинг-взаимодействий в малых открытых участках может критически ограничивать доступ молекул раствора к основаниям. Тогда их концентрация по данным большинства экспериментов будет крайне малой. В то же время, моделирование покажет намного более высокие значения этой величины, поскольку в этом случае регистрируется изменение расстояния между цепями ДНК в разных её точках.

В оставшейся части главы 5 мы проведём анализ некоторых литературных данных, с целью оценки:

- 1) характерного числа оснований в составе открытых состояний с сохранённым стэком, возникающих за счёт радиального расхождения цепей ДНК;
- 2) доступности имино-групп таких оснований для молекул раствора.

Если эта доступность действительно сильно ограничена, расхождение результатов исследования модели ПБД с экспериментами будет объяснено. С другой стороны, в этом случае необходимо будет изменить определение открытого состояния, которое мы привели во Введении. В самом деле, единственной характеристикой, позволяющей чётко выделить данное состояние, останется нарушение комплементарных Н-связей.

Оценим возможность сохранения стэкинг-взаимодействий в пузырьках, возникающих в экспериментах по ФКС маячков. Обратимся к рисунку 2.2 (раздел 2.3), иллюстрирующему суть радиально-торсионной модели Varbi et al. [173]. Расстояние между плоскостями соседних оснований h' равно 3,4 Å, а расстояние между точками их прикрепления к сахарофосфатному остову L – в среднем около 4,7 Å. Небольшое радиальное расхождение комплементарных оснований, соответствующее увеличению длины связи r_n , не вызывает заметных конформационных напряжений в дуплексе. Из простого расчёта следует, что умеренное снижение φ_n – с 36° до 23° – приводит при постоянном L к удалению основания от оси ДНК на 2 Å. Это соответствует повышению r_n на 4 Å в отдельно взятой паре. При этом уменьшение φ_n частично компенсирует

снижение площади контакта оснований, способствуя сохранению стэкинг-взаимодействий.

Теперь оценим расстояние, на которое нужно удалить друг от друга цепи ДНК для существенного снижения вероятности контакта флуорофора с тушителем. На рис. 5.3. представлены структурные формулы тиминовых оснований в составе ДНК, к которым ковалентно присоединены эти молекулы. Длины углеводородных мостиков были подобраны таким образом, чтобы флуорофор и тушитель могли образовывать стэк, не препятствуя закрыванию нуклеотидных пар; тушение флуоресценции маячка происходит в результате образования стэкинг-взаимодействий между ними [351].

Исходя из размера этих молекул, можно заключить, что для изоляции флуорофора от тушителя достаточно их удаления примерно на 7 Å. Поэтому при умеренных температурах общая флуоресценция должна быть чувствительна к кинетике пузырьков длиной не менее 4–6 пар оснований.

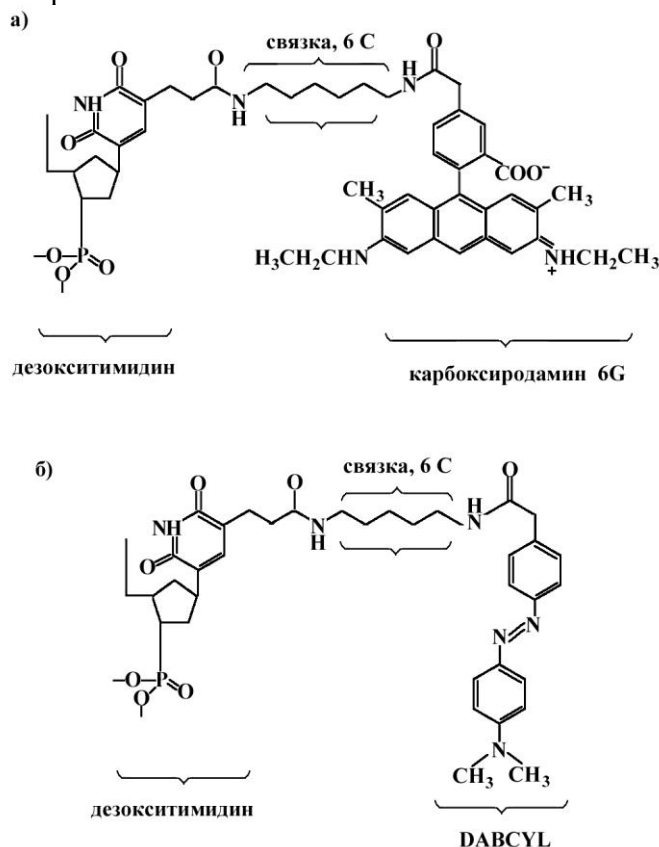


Рис. 5.3. а) Структурная формула флуорофора (карбоксиродамин 6 G), ковалентно присоединённого в молекулярном маячке к тиминовому основанию через связку из 6 углеродных атомов; б) Структурная формула тушителя (DABCYL), присоединённого через аналогичную связку.

Стабилизация открытого состояния с сохранённым стэком теоретически может происходить за счёт проникновения молекул воды между цепями. Вязкость водного «микростэка» между цепями ДНК, по-видимому, намного выше вязкости жидкой воды, положение молекул в которой меняется в пикосекундном масштабе времени [352, 353]. Однако, даже самые короткоживущие открытые состояния, зарегистрированные путём ФКС, релаксируют не менее чем за 100 нс. Значит, даже если молекулы, попадающие между цепями ДНК, задерживаются там на сотни пикосекунд, за время жизни открытого состояния они могут сменять друг друга много раз. Это свидетельствует в пользу доступности молекулярных группировок ДНК, в частности иминогрупп, для реагентов раствора.

Судить об этой доступности можно лишь по косвенным данным. В частности, одна из важнейших работ в этой области была выполнена Nonin et al. [317]. Авторы исследовали динамику обмена ^1H в концевых нуклеотидных парах. Было показано, что концевое положение нуклеотидной пары само по себе не является достаточным условием для обмена ^1H . С другой стороны, значения K_d концевых оснований, полученные в их работе с помощью ЯМР-методов, были на 1–2 порядка выше аналогичных K_d , вычисленных ранее с помощью калориметрии [354]. Это указывает на ключевую роль комплементарных Н-связей в концевых парах: с их разрывом протоны имино-групп становятся доступными для обмена независимо от того, сохраняются стэкинг-взаимодействия, или нет.

Невозможно выяснить точно, насколько нуклеотидные пары, удалённые от концов молекулы, отличаются в этом плане от концевых. Однако, об их свойствах можно судить косвенно, сравнивая кинетику каталитического обмена ^1H с кинетикой обмена при отсутствии внешнего катализатора. В последнем случае основным путём обмена становится внутренний катализ, суть которого кратко описана в разделе 5.1. Более детальный анализ его механизма позволит нам показать характерные черты открытых состояний в середине дуплекса и сравнить их с концевыми. Этому вопросу посвящён следующий раздел.

5.4. Внутренний катализ и доступность протонов иминогрупп

При внутреннем катализе акцептором протона имино-группы выступает атом азота комплементарного основания – N_1 аденина или N_3 цитозина. Перенос ^1H идёт через комплекс с водным мостиком. Комплекс состоит из пары комплементарных оснований и соединяющей их молекулы воды. Ключевыми фазами обмена являются согласованный перенос ^1H и переворот молекулы H_2O , как показано на схеме 6 [297].

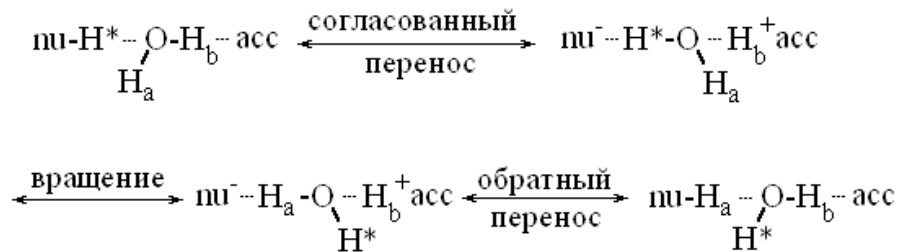


Схема 6. Перенос протона имино-группы на акцептор через молекулу воды.

Как мы покажем далее, комплекс с водным мостиком является полноценным открытым состоянием.

Первые доказательства того, что комплементарное основание может выступать как катализатор, были получены ещё в ранних работах по ^1H ЯМР [281, 284]. К примеру, показано, что в олигомере $d(\text{AATTGCAATT}):d(\text{AATTGCAATTT})$, при отсутствии внешнего катализатора, медленнее всего обменивает протон концевой тимин, не имеющий комплементарной пары [284]. В случае внутреннего катализа выражение (5.9) принимает вид:

$$\tau_{ex} = \tau'_{op} + \frac{1 + 10^{\text{p}K_{\text{nu}} - \text{p}K_{\text{acc}}}}{R_F \cdot K_d'}, \tag{5.14}$$

где R_F – так называемый фактор частоты, заменяющий произведение $k_{coll} \cdot [\text{acc}]$ [286]. Переход нуклеотидной пары в состояние, способное обменивать ^1H за счёт внутреннего катализа, не тождествен флип-ауту. Чтобы подчеркнуть это, мы обозначили константу равновесия для данного перехода K_d' , а время закрытого состояния – τ'_{op} . Остальные обозначения – те же, что в выражении (5.9). Структура комплекса подразумевает $\alpha = 1$.

Как будет показано далее, комплекс $\text{nuH}^* \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{асс}$ является отдельным видом открытого состояния ДНК, отличающимся от флип-аута по своим термодинамическим свойствам.

Большая величина R_F компенсируется ничтожной вероятностью успешного переноса ^1H , поскольку pK N_3 цитозина равна 4.2, а pK N_1 аденина – 3.7. В результате, значения числителя в формуле (5.14) для GC- и AT-пары составляют $1,6 \cdot 10^5$ и 10^6 соответственно. Исключение составляет так называемый кислотный катализ, происходящий в GC-парах при низких pH. Протонирование N_7 гуанина приводит к уменьшению pK его иминогруппы с 9,4 до 7,2 и ведёт к снижению времени обмена более чем в 150 раз, приближая его к τ_{ex} , характерному для высоких концентраций внешнего катализатора [355].

Ещё одной особенностью внутреннего катализа является его чувствительность к концевым эффектам. В исследованиях Nonin et al. показано, что при отсутствии внешнего акцептора концевые основания обменивают ^1H медленнее, чем расположенные в середине дуплекса [317]. Для последних, в силу двусторонних стэкинг-взаимодействий, более выгодны малые угловые смещения, которые и приводят к образованию комплекса $\text{nuH}^* \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{асс}$, показанного на схеме. В концевых парах, очевидно, преобладают более существенные флуктуации, ведущие к флип-аутам. Согласованный перенос ^1H в них затруднён, так как водный мостик получается слишком длинным или вообще отсутствует.

Вычислить точное значение K_d' , исходя из кинетики внутреннего катализа, нельзя, так как она позволяет найти лишь произведение $R_F \cdot K_d'$, а взаимосвязь между K_d' и K_d точно не известна. Однако, K_d' может быть оценена по времени переноса ^1H в комплексе $\text{nuH}^* \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{асс}$. Его лимитирующей стадией является вращение молекулы воды, требующее разрыва одной Н-связи: известно, что оно происходит в течение нескольких пикосекунд [356]. Следовательно, можно допустить, что при температурах 10–40 °C значение R_F находится в диапазоне 10^{11} – 10^{12} с⁻¹. Это позволяет рассчитать характерные K_d' по скорости обмена в отсутствие внешнего катализатора, пренебрегая τ_{op}' , поскольку при этом $\tau_{op}' \ll \tau_{ex}$.

Типичные значения τ_{ex} при $[\text{асс}] = 0$ были впервые получены для ряда оснований в олигонуклеотидах $d(\text{AATTGCAATT})_2$ [284] и $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ [283]. Исследованные основания подчёркнуты в их формулах. По нумерации от концов дуплекса, в первом олигомере они обозначены как AT_3 , AT_4 и GC_5 , а во втором – GC_3 , GC_4 и AT_5 .

В таблице 5.4 представлены K_d' этих пар при температурах 15 и 20 °C, для двух значений R_F (10^{11} и $2 \cdot 10^{12}$ с⁻¹). Они сравниваются с соответствующими K_d . Второе значение R_F соответствует обратной величине наименьшего времени жизни водородной связи в воде (0.5 пс, см. [352, 353]). Величины τ_{ex} при $[\text{асс}] = 0$ олигомера $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ получены путём оцифровок графика на рис. 6 работы [283]. Значения погрешности мы не приводим, так как основной задачей была лишь приближённая оценка. Поскольку значения K_d в этой работе даны только для 15 °C, то для сравнения при 20 °C мы взяли K_d соответствующих нуклеотидных пар из другой статьи [318]. В ней был исследован похожий по структуре олигомер $d(\text{CGCGAATTTCGCG})_2$. Нуклеотидные пары GC_3 , GC_4 и AT_5 , использованные для сравнения, подчёркнуты в его формуле.

Из таблицы 5.4 хорошо видно, что K_d' отличаются от соответствующих K_d в среднем на порядок. Огромное различие для пары AT_3 олигомера $d(\text{AATTGCAATT})_2$ легко объяснимо концевыми эффектами, из-за которых её комплекс $\text{nuH}^* \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{асс}$ получается неустойчивым.

Таблица 5.4. Сравнение K_d и K_d' для различных нуклеотидных пар по данным ряда исследований

Пара оснований	T, °C	$K_d \cdot 10^6$	$K_d' \cdot 10^6$, $R_F = 10^{11}$	$K_d' \cdot 10^6$, $R_F = 2 \cdot 10^{12}$	Ссылка
AT ₃	15	800	33	1,6	[284]
AT ₄	15	100	12	0,62	[284]
GC ₅	15	0,7	<0,4	<0,02	[284]
GC ₃	15	0,39	0,42	0,021	[283]
GC ₃	20	—	0,81	0,04	[283]
GC ₃	20	1,00	—	—	[318]
GC ₄	15	0,22	0,11	0,05	[283]
GC ₄	20	—	0,24	0,012	[283]
GC ₄	20	0,3	—	—	[318]
AT ₅	15	3,2	14	0,7	[283]
AT ₅	20	—	24	1,2	[283]
AT ₅	20	5,8	—	—	[318]

Образование водных мостиков при малых угловых смещениях оснований было подтверждено расчётами Giudice et al. [162]. На рис. 5.4 показан комплекс $\text{puH}^* \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{асс}$, образованный АТ-парой. Чтобы он сформировался, продольная ось основания должна отклониться от линии, параллельно которой лежат комплементарные Н-связи в закрытом дуплексе, на небольшой угол – не более $\pm 45^\circ$ [162].

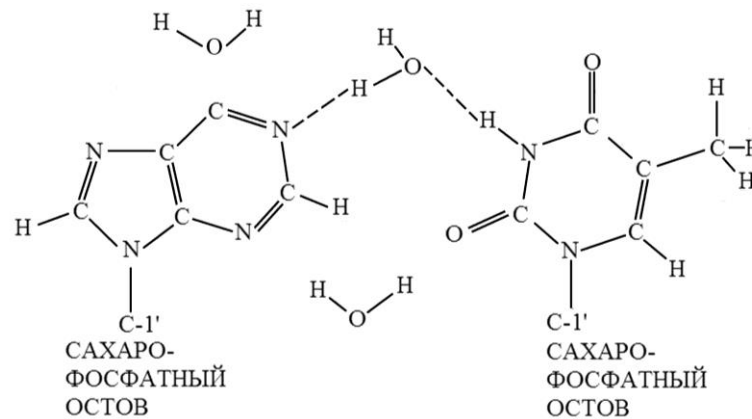


Рис. 5.4. Комплекс $\text{puH}^* \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{асс}$, образованный АТ-парой при её угловом смещении в большую бороздку [162]. Пунктиром показаны Н-связи, соединяющие молекулу H_2O с ^1H иминогруппы и атомом N_1 аденинового основания.

Поскольку умеренное угловое смещение оснований открывает доступ для их химического взаимодействия с водой, вполне закономерно возникает вопрос: может ли в этом случае к иминогруппе проникать молекула катализатора? Если да, то каталитический обмен ^1H из подобных «приоткрытых» состояний способен приводить к некоторому искажению экспериментальных данных. В самом деле, поскольку K_d' соизмеримо с K_d , формула (5.9) должна выглядеть следующим образом:

$$T_{ex} = \frac{1}{k_{ex} + k'_{ex}} = \left[\left(\tau_{op} + \frac{1 + 10^{pK_{nu} - pK_{acc}}}{k_{coll} \cdot [acc] \cdot \alpha \cdot K_d} \right)^{-1} + \left(\tau'_{op} + \frac{1 + 10^{pK_{nu} - pK_{acc}}}{k_{coll} \cdot [acc] \cdot \alpha' \cdot K'_d} \right)^{-1} \right]^{-1}, \quad (5.15)$$

где k_{ex} и k'_{ex} – скорости обмена за счёт флип-аута и малых угловых смещений, а T_{ex} – итоговое время обмена. Величина $T_{ex}(0)$, то есть T_{ex} при $[acc]^{-1} = 0$, равна кажущемуся τ_{op} основания. В отличие от атома N комплементарного основания, доступ молекулы катализатора к «приоткрытой» иминогруппе ограничен, вследствие чего во второе слагаемое введён параметр доступности α' .

При $\tau_{op}' \approx \tau_{op}$ различие между $T_{ex}(0)$ и τ_{op} не превышает 40% даже при условии $\alpha \cdot K_d = \alpha' \cdot K'_d$. Уменьшение соотношения τ_{op}'/τ_{op} приводит к резкому снижению итогового времени обмена, однако уже при $\tau_{op}'/\tau_{op} \leq 0,1$ это время перестаёт меняться. Следовательно, разницы активационных барьеров для флип-аута и «приоткрывания» в 5,7 кДж/моль вполне достаточно для того, чтобы последнее вносило доминирующий вклад в процесс обмена 1H .

Поскольку малое угловое смещение основания является начальной фазой флип-аута, неравенство $\tau_{op}'/\tau_{op} \leq 0,1$, очевидно, выполняется для любой нуклеотидной пары, независимо от её природы и окружения. Во-первых, при малом угловом смещении, в отличие от флип-аута, основание частично сохраняет стэкинг-взаимодействия с соседями по цепи. Поэтому значения ΔH^\ddagger флип-аута и «приоткрывания», очевидно, должны различаться. Во-вторых, как видно из таблиц 5.1 и 5.2, более чем в половине случаев флип-аута $\Delta S^\ddagger < 0$, что является следствием сложной траектории выхода. Траектория движения основания при малом смещении, напротив, должна быть очень коротка. В результате, активационный барьер снижается, так как $\Delta S^\ddagger > 0$.

При $\tau_{op}'/\tau_{op} \leq 0,1$ отклонение $T_{ex}(0)$ от τ_{op} зависит, главным образом, от τ_{cl} – времени жизни открытого состояния при флип-ауте. При $\tau_{cl} \leq 2$ нс и $\alpha \cdot K_d$ превышающем $\alpha' \cdot K'_d$ не менее, чем на порядок, $T_{ex}(0)/\tau_{op} \geq 0,8$, что является вполне допустимой погрешностью. Однако, по данным многих экспериментов, τ_{cl} отдельных оснований могут достигать 100 нс и более [28, 282, 299, 305, 318, 319, 325, 330, 331, 357]. Для сохранения неравенства $T_{ex}(0)/\tau_{op} \geq 0,8$ при таких временах открытого состояния необходимо, чтобы $\alpha \cdot K_d$ отличалось от $\alpha' \cdot K'_d$ на 1.5–2 порядка величины.

Согласно таблице 5.4, среднее отношение K_d'/K_d при $R_F = 10^{12} \text{ с}^{-1}$ равно 0,1. Отсюда можно предположить, что условие $\alpha'/\alpha \leq 0,1$ является достаточным для того, чтобы вклад, вносимый в T_{ex} вторым слагаемым в выражении (5.15), находился в пределах допустимой погрешности. К сожалению, экспериментальных методов, позволяющих измерить α' , пока не существует. Кроме того, мы не знаем ни одной теоретической работы, в которой оценка этой величины была бы проведена *in silico*.

Единственной возможностью оценить α' является аппроксимация некоторых экспериментальных данных уравнением (5.15). В работе Warmlander et al. показано, что при высоких концентрациях аммиака зависимость T_{ex} от $[acc]^{-1}$ отклоняется от линейной формы, которую она должна иметь согласно уравнению (5.9) [299]. Авторы объяснили это явление наличием двух режимов открывания, имеющих различные времена жизни открытых и закрытых состояний. Режим, в котором основания открываются при малой концентрации NH_3 , авторы назвали «медленным», а режим, характерный для больших концентраций – «быстрым». Позже было доказано, что высокие концентрации аммиака способны влиять на структуру ДНК, дополнительно определяя кинетику флип-аута [305].

В то же время, результаты, полученные Warmlander et al., можно описывать и уравнением (5.15). Объектом исследования в работе [299] были олигомеры, включающие А-тракты – элементы структуры, обладающие наибольшим τ_{cl} оснований, вплоть до сотен наносекунд [299, 305, 318, 319, 325, 330, 331]. Значительные τ_{cl} приводят не только к снижению значения $T_{ex}(0)/\tau_{op}$, но и к растущему увеличению наклона функции $T_{ex} = g([\text{acc}]^{-1})$ при $[\text{acc}]^{-1} > 0$.

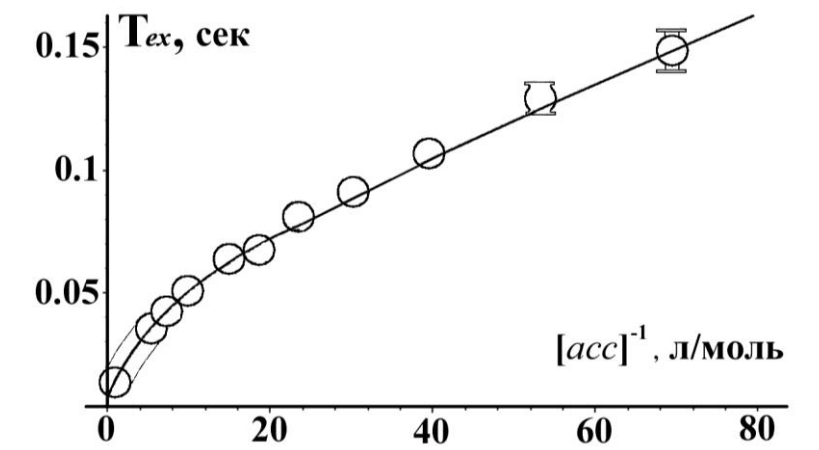


Рис. 5.5. Аппроксимация уравнением (5.15) экспериментальных данных Warmlander et al. для пары АТ₆ олигомера d(CGCGAATTCGCG)₂ [299]. Температура 15 °С, катализатор NH₃. Параметры аппроксимации: $\tau_{op} = 80$ мс, $K_d = 1,87 \cdot 10^{-6}$, $K_d' = 3,16 \cdot 10^{-7}$. Точки экспериментального графика показаны в виде пустых кружков, сливающихся при малых $[\text{acc}]^{-1}$ в «коридор». Это сделано для большей наглядности.

Мы аппроксимировали уравнением (5.15) графики по нуклеотидной паре АТ₆ олигомера d(CGCGAATTCGCG)₂, полученные Warmlander et al. при температурах 10, 15, 20 и 25 °С для двух катализаторов обмена – NH₃ и триметиламина [299]. Была также проведена аппроксимация данных по парам GC₃ и GC₄ того же олигомера [299] (только для NH₃ в качестве катализатора). Один из примеров подобной аппроксимации показан на рис. 5.5.

Ни в одной из проведённых аппроксимаций мы не наблюдали соотношений $\alpha' \cdot K_d' / (\alpha \cdot K_d)$ менее 0,1. Это означает, что α' и α имеют одинаковый порядок величины, поскольку, как видно из таблицы 5.4, типичное соотношение $K_d'/K_d \approx 0,1$. Таким образом, в парах оснований, удалённых от концов дуплекса, разрыв комплементарных Н-связей приводит к существенному возрастанию доступности иминогрупп. В этом плане они ничем не отличаются от концевых пар, см. раздел 5.3.4.

По результатам исследований, приведённым в главе 5, можно сделать два основных вывода.

Первый вывод. Некоторые эксперименты по обмену ¹Н, по всей видимости, характеризуются существенной погрешностью определения τ_{op} . Отношение $T_{ex}(0)/\tau_{op}$, в зависимости от τ_{cl} , находится в диапазоне 0,3–0,8. В то же время, в ¹Н ЯМР экспериментах заметного искривления графиков функции $T_{ex} = g([\text{acc}]^{-1})$ при снижении $[\text{acc}]^{-1}$ обычно не наблюдается. Одной из причин этого может быть специфическая динамика комплексе $\text{nuH}^* \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{acc}$. Вращение молекулы H₂O в его составе может происходить очень быстро, обеспечивая большой частотный фактор R_F. С другой стороны, множество «попыток» переноса ¹Н может осуществляться через одну и ту же молекулу H₂O. Таким образом, константы K_d' вполне могут отличаться от K_d на 1,5 порядка и более, в связи с чем погрешность будет вполне умеренной.

Есть и другая возможная причина того, что искривление графика $T_{ex} = g([\text{acc}]^{-1})$ в экспериментах остаётся незамеченным. При $\tau_{cl} < 100$ нс искривлённый участок

находится в области очень малых значений $[\text{acc}]^{-1}$. В результате, функция $T_{ex} = g([\text{acc}]^{-1})$ выглядит как прямая, хотя уже при $\tau_{cl} > 50$ нс регистрируемое $T_{ex}(0)$ значительно меньше истинного τ_{op} .

С точки зрения термодинамики, искажённые результаты, по всей видимости, касаются лишь энтропийного вклада $T \cdot \Delta S^{\ddagger}$ в активационный барьер ΔG^{\ddagger} . В действительности, значение ΔS^{\ddagger} флип-аута у большинства оснований должно быть намного меньше. Для иллюстрации можно привести температурные зависимости τ_{op} на «быстром» и «медленном» режимах из работы Warmlander et al. [299]. При равной ΔH^{\ddagger} энтропия активации для «медленного» режима была меньше на 7 кДж/моль по сравнению с «быстрым». Именно это различие обеспечивало существенную разницу τ_{op} в эксперименте. Это может указывать на недооценку различий термодинамических свойств пузырьков и флип-аутов в разделе 5.3.

Второй вывод. Мы косвенно подтвердили, что разрыв комплементарных Н-связей между цепями ДНК автоматически открывает молекулам раствора доступ к имино-группам. Поэтому любые открытые состояния ДНК способны обменивать ^1H независимо от того, сохранены в них стэкинг-взаимодействия, или нет. Этот факт очень важен, поскольку он подтверждает правильность определения «открытое состояние», данного во введении. *Открытое состояние – любое изменение конформации ДНК, возникающее в результате полного или частичного разрыва комплементарных Н-связей в одной или нескольких соседних нуклеотидных парах и делающее протоны, участвующие в образовании этих связей, доступными для молекул раствора.*

Таким образом, нам не удалось найти каких-либо особенностей дуплекса, которыми бы объяснялось существенное отличие вероятности открытых состояний, получаемых в модели ПБД [274–276, 350] от эксперимента. Удовлетворительные объяснения найдены только для частного случая расхождения результатов ФКС молекулярных маячков с данными других экспериментов, см. разделы 5.3.1–5.3.3.

Это указывает на необходимость улучшения существующих механических моделей ДНК, в результате которой они смогли бы лучше воспроизводить экспериментальные данные. В то же время, такая доработка не должна приводить к утрате способности этих моделей учитывать перенос и локализацию колебательной энергии в ДНК, важная роль которых продемонстрирована в данном обзоре. В следующей главе и в Заключение мы предложим некоторые пути оптимизации механических подходов, которые должны привести к лучшему соответствию между моделью и экспериментом.

6. ОБОБЩЕНИЕ ДАННЫХ ПО НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ ДИНАМИКЕ ДУПЛЕКСА

Разнообразие теоретических и экспериментальных подходов в изучении ДНК позволило получить множество данных о динамике этой молекулы и факторах, от которых она зависит. Объём этой информации на сегодняшний день так велик, а поведение ДНК представляется настолько сложным, что делать какие-либо обобщения трудно. Поэтому основной целью данной работы являлся обзор ряда теоретических и экспериментальных исследований динамики поведения ДНК.

Сравнение и анализ некоторых экспериментальных результатов, приводимые в работе, преследовали вспомогательные цели. Например, с помощью таблиц в разделе 5.2 показаны закономерности флип-аута оснований в различных контекстах первичной структуры. Анализ, приведённый в разделе 5.3, наглядно продемонстрировал непротиворечивость результатов, полученных принципиально разными методами.

Тем не менее, значительная часть описанного материала относится к достаточно узкой области – исследованиям динамики открытых состояний ДНК в интервале пред-плавления. Объём данных, имеющих прямое отношение к этой области, сравнительно невелик, что делает их обобщение вполне посильной задачей. Этому обобщению

целиком посвящена данная глава обзора. Её основная задача – приведя данные в систему, сделать работу более полезной для исследователей.

6.1. Число пар оснований, одновременно участвующих в зарождении пузырька

При анализе теоретических и экспериментальных данных мы предполагаем, что при зарождении пузырька одновременно открываются несколько пар оснований. Существует ряд фактов, подтверждающих, что число этих пар – обозначим его N – значительно больше единицы. Очевидно, условие $N > 1$ для пузырька частично следует из жёсткости сахарофосфатного остова. Кроме того, в данном обзоре представлен ряд косвенных экспериментальных доказательств этого факта.

В разделе 3.3 описаны свойства силового барьера, препятствующего началу микромеханического расплетания ДНК, см. [178, 258]. Наличие барьера объясняется сохранением стэкинг-взаимодействий в «вилке» – пограничном регионе между одноцепочечной областью и нативной ДНК, см. рис. 3.4 [178]. Удлинение «вилки» приводит к распаду стэкинг-взаимодействий на другом её конце, вследствие чего энтропия системы повышается. Это частично компенсирует затраты свободной энергии на расплетание дуплекса, но лишь в том случае, когда «вилка» уже сформирована. В самом начале расплетания «вилки» ещё нет, и открывание нескольких первых пар оснований требует больших затрат энергии.

Вероятно, роль энтропийной компенсации не является ключевой. Значительный вклад в величину барьера вносит, по-видимому, необходимость одновременного разрыва комплементарных Н-связей в первых N парах оснований. На это указывает сходство расчётного значения длины «вилки» – около 4 нуклеотидных пар [178] – с другими косвенными данными.

Минимальная длина пузырька, достаточная для изоляции флуорофора от тушителя в молекулярных маячках [213], составляет 4–6 пар, см. раздел 5.3.4. Большой разброс времён жизни пузырьков свидетельствует о том, что рост открытой области требует значительно меньших затрат свободной энергии, чем само открывание. Некоторый вклад в эту разность может вносить и энтропийная компенсация за счёт распада стэкинга в пузырьке области. В то же время, при зарождении пузырька стэкинг-взаимодействия могут нарушаться незначительно, см. раздел 5.3.

Условие $N > 1$ хорошо объясняет и относительную стабильность GC-богатых концевых доменов молекулярного маячка M_{18} [213]. Этот вопрос подробно рассмотрен в разделе 5.3.1. Очевидно, диапазон энтальпий зарождения пузырька сильно зависит от N . Данный эффект может также служить объяснением существенных различий $K_{d,bub}$, наблюдаемых в экспериментах Choi et al. [29, 30].

Ещё одним косвенным доказательством того, что $N > 1$, можно считать денатурационное поведение коротких ДНК по данным метода закалки шпилек [54, 55, 261] – см. раздел 4.2, а также раздел 5.3.2. Если короткий олигонуклеотид состоит из АТ-богатой области, ограниченной двумя концевыми GC-богатыми доменами, то его критическая длина превышает 20 пар оснований. Если же он включает всего две области – АТ-богатую и GC-богатую – его критическая длина стремится к нулю.

Данный феномен легко объясним с учётом жёсткости сахарофосфатного остова. Одновременное радиальное открывание ряда соседних пар оснований создаёт положительную суперспирализацию в соседних участках [13]. Если пузырёк образуется в середине короткой ДНК, напряжение суперспирализации может сбрасываться на обоих её концах. Это приводит к дестабилизации и существенно облегчает диссоциацию. При зарождении пузырька вблизи только одного из концов дуплекса происходит только «односторонняя» релаксация. В результате, вместо пузырька образуется концевая открытая область. Зависимость критической длины от первичной структуры ДНК наглядно показывает тесную связь между динамикой пузырьков и

тепловыми флуктуациями торсионного напряжения сахарофосфатного остова. Этот факт дополнительно подтверждает одновременное участие нескольких нуклеотидных пар в зарождении пузырька.

По всей видимости, условие $N > 1$ является характеристикой, учёт которой критичен для описания динамики дуплекса, наблюдаемой в экспериментах. Тем не менее, единственной простой моделью, где она учтена, является Изинг-подобная модель Kantorovitz et al. [272]. На наш взгляд, перспективным направлением является также феноменологическое введение условия $N > 1$ в механические модели. Далее мы отметим другие особенности динамики дуплекса, которые также могут быть основой модернизации моделей этой группы. Конечно, даже после существенных улучшений модели рассматриваемого нами уровня не позволят точно воспроизвести все особенности поведения ДНК. Тем не менее, простые подходы дают возможность видеть свойства гетерогенного дуплекса с разных точек зрения, обеспечивая в своей совокупности картину, во многом соответствующую эксперименту. В этом плане они подобны фотографиям незнакомого предмета с разных ракурсов, позволяющим судить о его форме.

6.2. Сравнение подходов с точки зрения описания пузырьков при умеренных температурах

Прежде всего, выберем главные особенности динамики пузырьков денатурации в гетерогенной ДНК, выявленные в экспериментах. Во-первых, это существенное различие вероятности открытого состояния в разных участках дуплекса. Во-вторых – сильное влияние локальной замены нуклеотидных пар на форму профиля нестабильности гетерогенной ДНК: оно способно распространяться на десятки пар оснований от места замены. Эти свойства открыты при помощи метода ферментативного гидролиза, описанного в разделе 4.2; подробнее см. соответствующие работы [29, 30]. Третьей характерной чертой является участие в образовании пузырька нескольких соседних пар оснований. Доказательства этого были приведены в предыдущем разделе.

Теперь, с учётом данных особенностей и ряда других соображений, обозначим основные критерии оценки теоретических подходов с точки зрения описания пузырьков денатурации.

1. Объектом исследования в модели должен быть релаксированный дуплекс, то есть его суммарная суперспирализация должна быть равной нулю. Эксперименты, в которых были выявлены основные характеристики пузырьков денатурации в гетерогенной ДНК, проводились на релаксированных молекулах. Поэтому несоответствие модели данному критерию лишает смысла оценку по всем остальным.

2. Модель должна учитывать возможность образования пузырька денатурации, состоящего из нескольких нуклеотидных пар и ограниченного закрытыми участками, то есть не являющегося «вилкой» на конце дуплекса. Кроме того, если подход является механическим, то в нём должна быть возможна «стабилизация» пузырька, в результате которой время его жизни в данном участке ДНК существенно превышало бы период колебания нуклеотидной пары в дуплексе.

3. Должен воспроизводиться «дальний эффект» – влияние локальных замен пар оснований на вероятность образования пузырька в областях, удалённых от места замены. При этом число нуклеотидных пар, разделяющее эти участки, может превышать длину пузырька в несколько раз.

4. Соотношение максимального и минимального значения ординаты на профилях нестабильности, получаемых в модели, должно быть не менее 50, см. раздел 4.2. В экспериментах оно зачастую превышало 100 [29, 30].

5. Наконец, важную роль играют конкретные задачи, для решения которых модель изначально разрабатывалась. От этого зависит, какие упрощения при создании модели были допустимыми, а какие – нет. Совокупность принятых упрощений, в свою очередь, определяет точность описания поведения пузырьков.

Изинг-подобная модель С. Benham. Единственным подходом, специально разработанным для изучения локальных расплетаний гетерогенного дуплекса, является модель С. Benham [33–35, 234–236, 243, 244]. Степень её соответствия второму, третьему и четвёртому критериям намного выше, чем у многих моделей этого уровня. Однако данный подход не используется для исследования релаксированной ДНК, то есть не отвечает первому критерию. Причины, по которым мы не рассматриваем поведение дуплекса в присутствии внешнего торсионного напряжения, приведены во Введении и в разделе 3.2.

Механические модели. Для механических моделей главными критериями отбора являются первый и второй. В угловых моделях дуплекс релаксирован, однако открытые состояния ряда смежных нуклеотидных пар сильно отличаются от пузырьков по своей динамике. Подобные состояния достаточно нестабильны. Для большинства радиальных моделей первое условие также выполняется: даже для радиально-торсионных подходов вполне возможно рассмотрение случая с нулевой суперспирализацией. Кроме того, открытые состояния могут стабилизироваться за счёт нелинейности потенциала, описывающего Н-связи. Таким образом, существует достаточно много моделей, которые отвечают первым двум критериям, см. раздел 2.4.

Тем не менее, исследования динамики пузырьков в модели ПБД показали, что необходимым условием соответствия расчётных и экспериментальных данных является «конечность» стэкинг-взаимодействий в гамильтониане ($\rho \neq 0$) [30]. Таким образом, четвёртому критерию лучше всего соответствуют модель ПБД и радиально-торсионный подход Varbi et al. с ангармоническим стэкинг-потенциалом [179]. В данных случаях можно также считать, что несоответствие пятому критерию несущественно.

Модели ближайших соседей. Важной проблемой моделей ближайших соседей является сложность соответствия третьему критерию. В этих подходах отсутствует как возможность изучения переноса и локализации энергии, характерная для механических моделей, так и внешнее торсионное напряжение, обеспечивающее «дальний эффект» в модели Бенхама.

Основной областью применения подходов ближайших соседей было феноменологическое описание дифференциальных профилей плавления гетерогенных ДНК, или их расчёт по последовательности нуклеотидов, см. раздел 1.3. Для этого обычно использовались такие методики как алгоритм Fixman-Friere [358], рекурсивный алгоритм D. Poland [359] и некоторые его модификации – см. [53, 270]. Вычисление сводилось к получению вероятностей открытого состояния каждой отдельной пары оснований с учётом состояния соседних пар. Единственным исключением является работа Gotoh и Tagashira, где проводился расчёт стабильности дублетов [360].

Таким образом, можно считать, что модели ближайших соседей оперируют не пузырьками денатурации, а вероятностью одиночных открываний. Поэтому получаемые в них профили нестабильности плохо отражали реальную статистику пузырьков, особенно при умеренных температурах. Причины несоответствия удобнее всего показать через анализ параметра кооперативности $\bar{\sigma}'$, суть которого описана в разделе 1.3. При расчёте профилей плавления гетерогенных ДНК этому параметру обычно задавали постоянное значение 0,000045 [345], что соответствует $\bar{G}^s \approx 25$ кДж/моль при 300 К, см. формулу (1.12). Из выражения (1.13) видно, что для такого $\bar{\sigma}$ стабильность концевых пар оснований в среднем на два порядка ниже стабильности пар, расположенных в середине дуплекса. Поэтому любая гетерогенная ДНК в

исследованиях моделей ближайших соседей указанными методами могла расплетаться только с концов.

Очевидно, данные результаты не отвечают второму критерию. Поскольку пары оснований в середине дуплекса в этом случае могут открываться только поодиночке, исключено также соответствие четвёртому критерию. Для проверки мы оценили диапазон вероятностей открытого состояния в модели ближайших соседей, исследованной в работе Wartell и Benight [345], используя алгоритм Поланда [359]. Расчёт был проведён для ряда гетерогенных дуплексов, в том числе для ДНК, исследованных в экспериментах по динамике пузырьков [29, 30, 54, 55, 261]. Соотношение максимальной и минимальной ординаты профилей неустойчивости не превышало 9, что примерно соответствует разности термодинамических параметров отдельных пар.

Вероятность образования пузырька длиной N пар оснований в большинстве алгоритмов вычислялась путём усреднения [270, 271, 361]. Однако в 2010 году был разработан подход, позволяющий рассчитывать вероятность синхронного открывания N нуклеотидных пар в модели ближайших соседей [272]. Фактически, было учтено условие $N > 1$, отсутствующее даже в механических подходах. Результаты моделирования отвечали не только второму, но и четвёртому критерию. Например, во фрагменте человеческого генома CFTR, длиной 1200 пар оснований, расчёт для $N = 5$ дал значения $K_{d,bub}$ в диапазоне от 10^{-6} – 10^{-5} до 10^{-3} при 37°C [272]. Различие ординаты профилей неустойчивости на 2–2.5 порядка вполне соответствует экспериментальным данным [29, 30]. Нижняя граница $K_{d,bub}$, полученная в расчётах, хорошо согласуется со средним экспериментальным значением, составляющим $1.5 \cdot 10^{-5}$ при 37°C [266]. Более того, специальный параметр, эффективно связывающий вероятности открытого состояния соседних пар, позволил воспроизвести и дальние эффекты.

Таким образом, соответствие всем критериям оценки возможно не только для механических подходов, но и для моделей ближайших соседей. Эти группы моделей хорошо дополняют друг друга: сопоставление результатов их исследования позволяет видеть особенности динамики ДНК с разных сторон. Гетерогенность $K_{d,bub}$ и дальние эффекты можно воспроизвести как через моделирование переноса и нелинейной локализации энергии в механических подходах, так и через ввод условия $N > 1$ в подходе ближайших соседей. Однако только механические модели позволяют исследовать физические механизмы, лежащие в основе динамики ДНК. Поэтому, на наш взгляд, более перспективной является модернизация подходов именно этого типа.

Один из вариантов модернизации – феноменологический ввод в модель ПБД «локального коэффициента кооперативности», зависящего от N . Этот параметр создаст барьер свободной энергии, который затруднит открывание менее N пар одновременно. Барьер должен препятствовать и быстрому закрыванию пузырька, дополнительно улучшая соответствие модели с экспериментом – см. [213]. Работа над подобной модернизацией модели ПБД планируется на ближайшее будущее. В новой модели средняя $K_{d,bub}$ должна быть значительно меньше, чем в классической модели ПБД [154] или её варианте с гетерогенным стэкингом [274]. Следовательно, результаты моделирования будут намного ближе к эксперименту. Тем не менее, необходимо отметить, что далеко не всякие экспериментальные данные подходят для сравнения с моделью в том случае, когда $T < T_{пл}$. Этому вопросу посвящён следующий раздел.

6.3. Проблема стандартных термодинамических параметров

Стандартные термодинамические параметры открывания нуклеотидных пар определены в калориметрических измерениях достаточно давно [362, 363, 354] (см. также ссылки в [53]). Согласно этим данным, энтальпию диссоциации любого олигонуклеотида, наблюдаемую в эксперименте, легко получить обычным сложением

энтальпий открывания отдельных его нуклеотидных пар [363]. Следовательно, $\ln[K_{d,bub}]$ для N пар оснований должен примерно равняться сумме логарифмов K_d открывания отдельных пар, из которой вычтен логарифм поправочного коэффициента, учитывающего рост энтропии и зависящего от N .

Аналогичный метод применялся при расчёте $K_{d,bub}$ в работе Wartell и Benight [129]. Подобные расчёты дают исчезающе малую вероятность самопроизвольного появления пузырька при умеренных температурах практически для любой нуклеотидной последовательности. Это становится очевидным, если сопоставить условие $N \geq 4$ с типичной K_d флип-аута (для которого $N = 1$), составляющей при $T = 30$ °C около 10^{-5} .

На первый взгляд, выводы калориметрических измерений противоречат данным ФКС [213], ферментативного гидролиза [29, 30] и, отчасти, гипотезе об активном участии ДНК в её специфическом взаимодействии с белками. Однако эти противоречия легко объяснимы с учётом разности температур, при которых проводились различные эксперименты.

Во-первых, разрывы Н-связей и нарушения стэкинг-взаимодействий в ДНК при $T \approx T_{пл}$ происходят согласованно. Если же пузырёк зарождается при $T < T_{пл}$, то при этом полного разрушения стэкинга в его одиночных цепях может и не происходить. Следовательно, как стандартная, так и активационная энтальпия зарождения пузырька могут быть существенно ниже значений, полученных при $T_{пл}$. Данный вопрос обсуждён в разделе 5.3.

Во-вторых, с помощью спектроскопии комбинационного светорассеяния показано, что при возрастании T до $T_{пл}$ наблюдается повышение регистрируемой энтальпии стэкинга в 20 раз [326]. Это является дополнительным свидетельством существенных различий в термодинамических свойствах открытых состояний дуплекса при разных температурах.

В-третьих, как мы уже неоднократно упоминали, $K_{d,bub}$ в определённых участках ДНК может быть повышена за счёт нелинейной локализации энергии радиальных колебаний. Энергия, очевидно, всегда локализуется в самых «слабых» участках, где активационный барьер зарождения пузырька наименьший. По мере роста температуры, энергии колебаний становится достаточно для преодоления активационных барьеров в большем числе участков. Поэтому гетерогенность $K_{d,bub}$, обусловленная локализацией энергии, должна быть наиболее выражена именно при умеренных температурах.

Это предположение имеет интересное следствие. В небольших ДНК, при постепенном повышении температуры, пузырьки должны зарождаться примерно в одном и том же участке из N нуклеотидных пар. Следовательно, в олигомерах, подобных тем, которые изучались методом закалки шпилек [54, 55, 261], фотометрический сигнал при малых T обусловлен, видимо, динамикой единственного пузырька. Если это так, то низкотемпературная часть фотометрического профиля и аналогичный фрагмент профиля общей флуоресценции, получаемый с помощью ФКС маячков [213], отражают кинетику одного и того же процесса.

Наконец, в-четвёртых, при умеренных температурах важную роль может играть не только локализация энергии радиальных колебаний цепей ДНК, но и локализация энергии «угловых» флуктуаций. Как показано в разделе 5.4, в результате угловых смещений оснований образуются метастабильные открытые состояния ДНК, способные, по-видимому, облегчать и зарождение пузырьков и флип-аут оснований. Данный вопрос требует более подробного рассмотрения.

6.4. Локализация энергии угловых колебаний нуклеотидных пар

Помимо радиальных колебаний, направленных вдоль Н-связей, немалое влияние на динамику дуплекса оказывают «угловые» флуктуации оснований. Их направление соответствует третьей степени свободы на рис. 5.1. Смещения этого типа, как и

радиальные, могут осуществлять перенос энергии в ДНК. В данном случае для его изучения используются угловые модели, подробно рассмотренные в разделе 2.1.

Как мы отмечали в разделе 2.2, угловые колебания оснований могут обладать выраженной нелинейностью. Рассмотрим этот вопрос подробнее, опираясь на модельные и экспериментальные данные, приведённые в разделе 5.4. В разделе описан комплекс комплементарной пары оснований с водным мостиком, $\text{nuH}^* \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{асс}$, см. рис. 5.4. Данный комплекс с высокой вероятностью образуется при угловом смещении оснований на 45° и более [162]. Его существование подтверждается кинетическими особенностями внутреннего катализа обмена ^1H , см. раздел 5.4.

Из таблицы 5.4 видно, что кинетика внутреннего катализа в соседних парах взаимно независима, аналогично обмену в присутствии внешнего акцептора протонов. Следовательно, малые угловые смещения оснований, как и их флип-ауты, происходят поодиночке, некооперативно. Этот факт, на первый взгляд, противоречит теоретическим расчётам, поскольку в моделях длина угловых солитонов составляет обычно несколько пар оснований – см., напр., [171, 172]. Однако в данном случае расхождение теории и эксперимента говорит лишь о том, что максимальная амплитуда солитона не превышает 45° .

Пара оснований «вершины» солитона, обладая наибольшим угловым смещением, «рискует» связаться с молекулой воды, образовав комплекс с водным мостиком. Вероятность этого события зависит от прочности Н-связей и стэкинга, вследствие чего уединённая волна может возникать в одном месте, а приводить к образованию комплекса $\text{nuH}^* \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{асс}$ – в другом. Переход в метастабильное состояние, соответствующее этому комплексу, отнимает большую часть энергии солитона. Из данных таблицы 5.4 следует, что ΔH° перехода весьма высока: для GC₃, GC₄ и AT₅ олигомера $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ она составляет, соответственно, 90, 109 и 75 кДж/моль. Данные значения близки к ΔH° флип-аута, находящимся для GC-пар в интервале 45–109 кДж/моль, а для AT-пар (вне А-трактов) – в интервале 60–90 кДж/моль. Предельные значения ΔH° флип-аута оценены нами из материала работ, цитированных в таблицах 5.1 и 5.2.

С одной стороны, большая стандартная энтальпия препятствует возникновению комплекса с водным мостиком. С другой стороны, основания, образовавшие данный комплекс, частично сохраняют стэкинг-взаимодействия со своими соседями. Это способствует передаче энергии очередного солитона той же самой паре оснований, что может приводить к флип-ауту или другим конформационным изменениям. В какой-то степени подобная модель напоминает механизм локализации в искривлённой области ДНК, предложенный Тингом и Пейярдом [349].

Комплекс, в котором водный мостик соединяет иминогруппу с атомом-акцептором (N_1 аденина или N_3 цитозина) – далеко не единственный вид метастабильного состояния, образующегося при связывании пары оснований с молекулой H_2O . В теоретическом исследовании Giudice с соавт. показано, что существует много вариантов похожего соединения, см. рис. 12 в работе [162].

Очевидно, комплексы с водным мостиком являются важными интермедиатами флип-аута. В то же время, как стандартные, так и активационные параметры флип-аута сильно зависят от стерических ограничений. К примеру, ΔH° флип-аута тимина во фрагменте 5'-AAATAAA-3' равна почти 88 кДж/моль, тогда как в похожем фрагменте 5'-AAATAGA-3' аналогичная ΔH° не превышает 55 кДж/моль [331]. Стерические эффекты связаны с конечной частью траектории перехода основания в одну из бороздок ДНК; их природа описана, к примеру, в работе Coman и Russu [331]. В отличие от флип-аута, образование комплекса с водным мостиком не связано со стерическими затруднениями, см. раздел 5.4. Основной фактор, препятствующий возникновению подобных состояний – высокая энтальпия Н-связей и стэкинга.

Поскольку любое открывание дуплекса требует, прежде всего, разрыва комплементарных Н-связей, динамика открытых состояний всех типов должна быть взаимосвязана. Прямых экспериментальных доказательств этой взаимосвязи до сих пор не получено. Тем не менее, существуют факты, косвенно указывающие на тесную связь поведения пузырьков с динамикой остальных открытых состояний. На их основе мы предложили механизмы взаимосвязи открываний ДНК, которые будут рассмотрены далее.

6.5. Гипотеза взаимодействия открытых состояний ДНК и проблема «кода пузырька»

При анализе свойств молекулярных маячков можно заметить интересную особенность профилей их общей флуоресценции, $I(T)$. У всех маячков температурная зависимость $\ln[I(T)/(1 - I(T))]$ в интервале пред-плавления заметно отклоняется от квазилинейной формы. Согласно выражению (5.13), величина $\ln[K_{d,bub}]$, определяющая значение $\ln[I(T)/(1 - I(T))]$, линейно зависит от T^{-1} . Поэтому уменьшение T действительно должно приводить к некоторому росту $d(\ln[I(T)/(1 - I(T))])/dT$. Однако при достаточно высокой абсолютной температуре данный эффект очень незначителен. В то же время, наблюдаемое повышение $d(\ln[I(T)/(1 - I(T))])/dT$ при уменьшении T было весьма резким. Как упоминалось в разделе 5.3, это явление стало одной из причин повышения нижней границы температурного интервала, в котором мы оценивали термодинамические параметры, приведённые в таблице 5.3. Для качественного сравнения результатов флуоресцентной спектроскопии с другими данными была проведена оцифровка профилей плавления олигомеров $L_{48}AS$, $L_{42}B_{18}$ и $L_{60}B_{36}$ [54, 55], см. раздел 4.1. Во всех этих профилях производная сигнала по температуре оказалась постоянной на протяжении всего интервала пред-плавления.

Отличия поведения $I(T)$ маячков от температурной зависимости фотометрического сигнала для $L_{48}AS$, $L_{42}B_{18}$ и $L_{60}B_{36}$ могут быть обусловлены тремя факторами.

Первый фактор – вероятные особенности связи между $K_{d,bub}$ и $I(T)/(1 - I(T))$. С одной стороны, нет никаких доказательств того, что эти величины пропорциональны. Однако с другой стороны, очевидно, что $I(T)/(1 - I(T))$ связана с $K_{d,bub}$ соотношением вида

$$\frac{F(T)}{1 - F(T)} = j(T) \cdot K_{d,bub}$$

где $j(T)$ – некоторая функция температуры, учитывающая особенности флуоресценции молекулярной системы. Маловероятно, что эта функция имеет сложный вид и существенно влияет на величину регистрируемого сигнала. Из общих соображений химической термодинамики следует, что если $j(T)$ не является константой, то она должна быть линейной или экспоненциальной. Из этого следует, что зависимости $\ln[I(T)/(1 - I(T))]$ и $\ln[K_{d,bub}(T)]$ будут похожи хотя бы качественно. На близкое сходство $I(T)$ маячков с их фотометрическими профилями указывают и сами Altan-Bonnet et al. [213]. Поэтому далее мы будем говорить не об изменении сигнала, а об изменении $d(\ln[K_{d,bub}])/dT$ или энтальпии открывания.

Вторым фактором, обуславливающим изменение $d(\ln[K_{d,bub}])/dT$, может быть влияние флуорофора и тушителя на динамику открывания дуплекса. Согласно результатам ФКС, активационная энтальпия обратной реакции – «закрывания» пузырька – в любом маячке является постоянной в интервале от 25 до 60 °C [213]. Следовательно, повышение ΔH° при уменьшении T в интервале пред-плавления можно объяснить только возрастанием ΔH° прямой реакции – открывания. Подобный эффект действительно возможен, если влияние тепловых флуктуаций флуорофора и тушителя на стабильность дуплекса усиливается с ростом T .

Третий фактор – разница температурных интервалов, для которых мы исследовали поведение $\ln[K_{d,bub}]$:

- 1) маячков,
- 2) олигомеров, не содержащих флуоресцентной метки.

Для первых наименьшая температура составляла 23–28 °С; для вторых она превышала 40 °С. В то же время, заметное изменение $d(\ln[K_{d,bub}])/dT$ маячка M_{18} начиналось при снижении T до 35 °С. Для A_{18} и $(AT)_9$ эта температура составляла около 31 °С. Таким образом, при T изменения $d(\ln[K_{d,bub}])/dT$ в олигомерах $L_{48}AS$, $L_{42}B_{18}$ и $L_{60}B_{36}$ сама величина $K_{d,bub}$ может быть ниже предела чувствительности фотометрии.

Современные экспериментальные данные не позволяют точно установить, насколько описанный нами эффект зависит от присутствия флуорофора и тушителя. Однако сделать приближённую оценку влияния второго фактора вполне возможно. Достаточно лишь определить кажущиеся ΔH° открывания маячков при разных температурах и сравнить их с аналогичными величинами олигомеров, не содержащих флуоресцентной метки.

На рис. 6.1. представлена зависимость $\ln[I(T)/(1 - I(T))]$ от обратной температуры для маячка M_{18} . Экспериментальные данные любезно предоставлены О. Кричевским. Мы считали величину $K_{d,bub}$ примерно равной $I(T)/(1 - I(T))$, поэтому ΔH° названы «кажущимися». Оценка ΔH° проведена в интервалах 28–36 и 54–62 °С: на рисунке они обозначены римскими цифрами I и II. Величины $d(\ln[K_{d,bub}])/dT$ в этих интервалах вычислены по методу наименьших квадратов. Соответствующие отрезки на рис. 6.1 наглядно показывают очень малое значение ошибки данного метода в обоих интервалах.

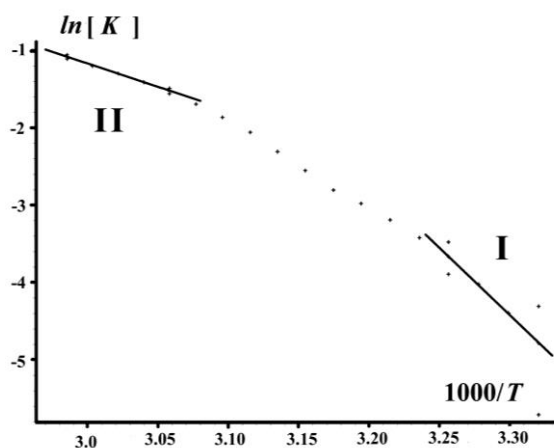


Рис. 6.1. Зависимость $\ln[K_{d,bub}]$ маячка M_{18} от T^{-1} , иллюстрирующая изменение ΔH° в узком интервале температур, а также масштаб ошибки измерений с учётом логарифмирования.

Нормированная величина погрешности измерения $I(T)$ в эксперименте не превышала 0.005. На рисунке она указана в логарифмическом масштабе для температур, являющихся границами интервалов I и II. Это сделано для того, чтобы продемонстрировать, что существенная разность $d(\ln[K_{d,bub}])/dT$ не является «артефактом логарифмирования».

Величины ΔH° в интервалах I и II вычислены по общеизвестному выражению

$$\Delta H^\circ = R \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot \frac{d(\ln[K_{d,bub}])}{dT},$$

где R – универсальная газовая постоянная. Примерные значения ΔH° для интервалов были равны 135 и 50 кДж/моль соответственно. В промежуточном интервале, 36–54 °С,

(именно для него проводился расчёт активационных параметров, см. таблицу 5.3) ΔH° составляла около 90 кДж/моль.

Стандартные энтальпии открывания маячка (АТ)₉ рассчитаны для интервалов 24–29 и 31–44 °С. В первом из них ΔH° была не менее 130 кДж/моль, тогда как для второго она не превышала 90 кДж/моль. Подобная разность энтальпий наблюдалась и для маячка А₁₈: их значения в интервалах 23–30 и 30–54 °С составили, соответственно, около 95 и 55 кДж/моль. Поскольку $I(T)$ маячков (АТ)₉ и А₁₈ получены путём оцифровки, достоверность оценки их термодинамических характеристик ниже, чем для маячка М₁₈. Тем не менее, средняя ошибка аппроксимации по методу наименьших квадратов в «низкотемпературных» интервалах для (АТ)₉ и А₁₈ оказалась так же мала, как и в интервале I маячка М₁₈.

Кажущиеся значения ΔH° открывания олигонуклеотидов L₄₂V₁₈ и L₆₀V₃₆ в интервале пред-плавления не превышали 130 кДж/моль. Аналогичная величина для L₄₈AS оказалась значительно больше – около 200 кДж/моль. По всей видимости, в большинстве фрагментов природной ДНК энтальпии пузырьков находятся в пределах данных значений. На это также косвенно указывает сходство ΔH° пузырьков в L₄₂V₁₈ и L₆₀V₃₆ с энтальпией открывания маячков при пониженных температурах.

Наиболее вероятным механизмом снижения ΔH° открывания маячков при росте T является значительное усиление взаимодействия открытых состояний в месте присоединения флуорофора и тушителя. Эти группировки присоединены не к сахарофосфатному остову, а к тиминовым основаниям соседних комплементарных пар центра маячка, см. рис. 4.11 и 5.3. Тепловые флуктуации флуорофора и тушителя должны снижать активационный барьер флип-аута этих пар, а также увеличивать время жизни открытого состояния за счёт повышения ΔS° .

При малых температурах события флип-аута в указанных АТ-парах являются очень редкими и происходят независимо друг от друга. Однако с повышением T эффективность их взаимодействия, по-видимому, возрастает. Как показано выше, при зарождении пузырька одновременно открываются N соседних нуклеотидных пар. Предварительный разрыв Н-связей и стэкинга (за счёт угловых смещений) в некоторых из этих пар приводит к существенному снижению ΔH° открывания пузырька. Поскольку в этом случае зарождение пузырька происходит в менее упорядоченном участке, данный эффект частично компенсируется снижением ΔS° , что мы и наблюдаем в маячках.

Данный механизм подразумевает, что снижение ΔH° в олигомерах, не содержащих флуорофора и тушителя должно происходить при более высоких температурах, по сравнению с маячками. Однако, как уже сказано выше, энтальпия пузырьков в L₄₈AS, L₄₂V₁₈ и L₆₀V₃₆ была постоянной во всём интервале пред-плавления. Следовательно, в этих олигонуклеотидах динамика флип-аутов влияет на процессы зарождения пузырьков крайне слабо на всём интервале пред-плавления.

К сожалению, современные экспериментальные данные не позволяют судить о процессах взаимодействия открытых состояний разных типов в немодифицированной, нативной ДНК. Кроме того, подобное взаимодействие – по-видимому, далеко не единственный механизм, управляющий температурной зависимостью $K_{d,bub}$. Во всех рассмотренных олигомерах без флуоресцентной метки присутствуют довольно длинные участки, состоящие из одних АТ-пар. Тем не менее, как показано выше, значения их кажущихся ΔH° могут отличаться на десятки кДж/моль!

Экстраполяция на низкие T показывает, что при 20 °С $K_{d,bub}$ олигомера L₄₈AS не превышает $0.5 \cdot 10^{-5}$. Это вполне соответствует ранним оценкам вероятности открытого состояния дуплекса ([312], цитата по [282]), см. раздел 5.2. Однако для L₄₂V₁₈ и L₆₀V₃₆ экстраполяция на 20 °С даёт значения $K_{d,bub}$, соответственно, $0.5 \cdot 10^{-3}$ и 10^{-3} .

Существенные различия термодинамических свойств этих олигомеров и L₄₈AS могут быть обусловлены двумя причинами.

Первая причина связана с серединным расположением АТ-богатых доменов в $L_{42}V_{18}$ и $L_{60}V_{36}$. В разделе 6.1 описано влияние открывания пузырька на напряжение сахарофосфатного остова в соседних участках ДНК. Сброс напряжения положительной суперспирализации на обоих концах олигомеров $L_{42}V_{18}$ и $L_{60}V_{36}$ способствует появлению общей отрицательной суперспирализации дуплекса, которая сохраняется в течение некоторого времени после закрывания пузырька. В это время ДНК дестабилизирована и ΔH° пузырька снижена. Поскольку в молекуле и $L_{48}AS$ сброс напряжения происходит только на одном из концов, она подвержена подобной дестабилизации намного меньше.

Мы полагаем, что время сохранения общей отрицательной суперспирализации, вызванной сбросом торсионного напряжения на концах ДНК, может превышать само время жизни пузырька. Предполагаемый механизм сохранения суперспирализации связан со строением Н-связи. По некоторым данным, Н-связь имеет не один, а два энергетических минимума [364]. Её схема представлена на рис. 6.2.

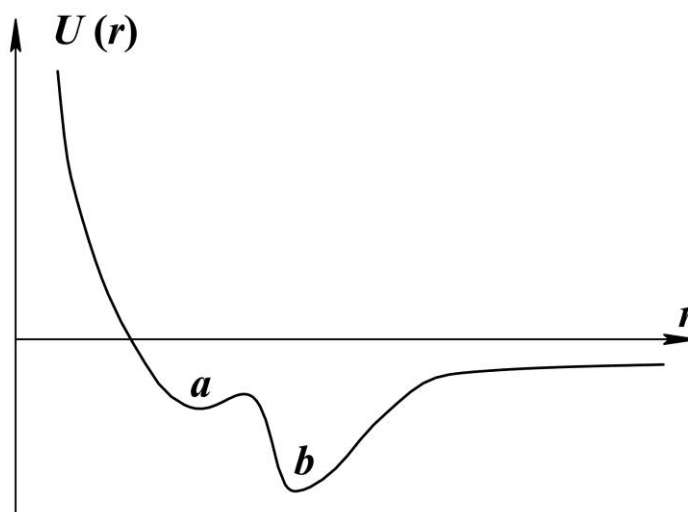


Рис. 6.2. Схема бистабильного потенциала для Н-связи. $U(r)$ – потенциальная энергия взаимодействия атомов, определяется r – расстоянием между атомами.

Первый минимум, обозначенный буквой a , определяется только расстоянием между атомами. Второй, обозначенный буквой b , зависит ещё и от угла между Н-связью и ковалентной связью О–Н. Он является достаточно узко направленным [364]. Есть мнение, что повышение плотности воды при нагревании связано именно с переходом Н-связей между её молекулами в минимум a [там же].

Напряжение отрицательной суперспирализации ведёт к сокращению расстояния между точками прикрепления оснований к сахарофосфатному остову. В силу бистабильности потенциала Н-связи, релаксация может происходить как при её разрыве, так и путём перехода из минимума b в минимум a . Подобный переход в части Н-связей ряда соседних нуклеотидных пар приводит к снижению ΔH° открывания пузырька. Поскольку флуктуации суперспиральности ДНК усиливаются по мере её нагрева, данный механизм, по-видимому, может даже частично обуславливать нелинейное изменение $\ln[K_{d,bub}]$ с ростом T .

Вторая причина отличия кажущейся ΔH° пузырька в $L_{48}AS$ от аналогичной величины олигомеров $L_{42}V_{18}$ и $L_{60}V_{36}$ – возможное присутствие в АТ-богатых доменах последних участка первичной структуры, содержащей «код пузырька». Как показали эксперименты, описанные в разделе 4.2, участки гетерогенной ДНК с самой высокой $K_{d,bub}$ далеко не всегда имеют наименьшую суммарную ΔG° стэкинга и Н-связей.

Видимо, $K_{d,bub}$ может сильно зависеть от особенностей строения локальной области дуплекса, которые, в свою очередь, определяются её нуклеотидной последовательностью. Ярким примером такой зависимости является поведение маячка A_{18} , см. раздел 5.3. Так как расхождение цепей A_{18} при небольших T требует меньших нарушений стэкинга, чем в других маячках, активационный барьер зарождения пузырька в нём относительно невысок. Возможность «поочерёдного» разрушения Н-связей и стэка при открывании пузырька разбивает активационный барьер этой реакции на несколько более низких. Подобное разбиение барьера активации характерно для многих биохимических реакций. В частности, этот механизм играет большую роль в ферментативном катализе [365].

По всей видимости, локальная последовательность нуклеотидов не только определяет форму активационного барьера открывания, но и влияет на процессы взаимодействия угловых флуктуаций оснований с радиальными. Рассмотренный выше вклад динамики флуоресцентной метки в кинетику открывания маячков является наглядным, но «утрированным» примером такой возможности. В немодифицированной ДНК даже при $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ни K_d , ни K_d' не превышают 10^{-4} , поэтому вероятность их взаимодействия при температурах интервала пред-плавления очень низка. С другой стороны не исключено, что в определённых контекстах первичной структуры ДНК угловая динамика отдельного основания может сильно влиять как на K_d и K_d' соседних нуклеотидных пар, так и на $K_{d,bub}$ всего участка, в котором оно находится.

Значительную роль в динамике открываний ДНК могут играть также локальные конформационные изменения, не являющиеся открытыми состояниями. В 1983 году Sobell и Vanerjee описали так называемые « β -премелтоны» – удлинения ДНК, возникающие вследствие разрыва стэкинга между соседними парами оснований [366]. При этом Н-связи полностью сохраняются. Структура β -премелтона показана на рис. 6.3.

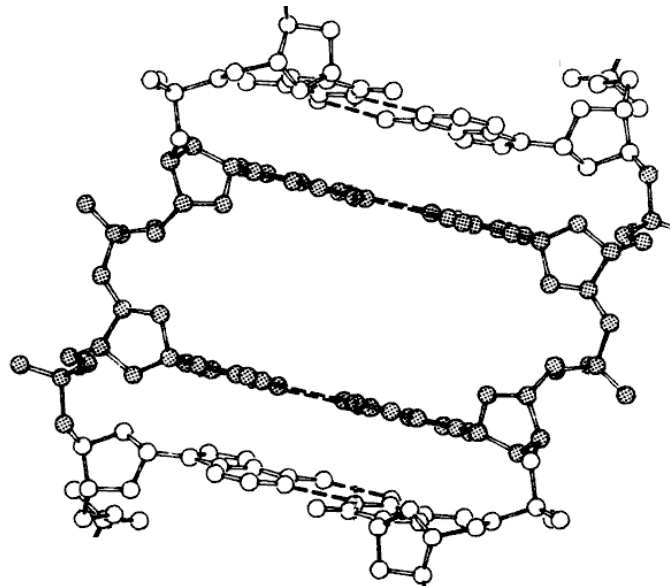


Рис. 6.3. Локальное конформационное изменение ДНК – β -премелтон. Нуклеотидные пары, между которыми нарушено стэкинг-взаимодействие, закрашены серым.

Подобные состояния частично стабилизированы изменением конформации сахарофосфатного остова [214]. Возможно также более глубокое, по сравнению с нативной областью, проникновение H_2O в дуплекс: расстояние между парами оснований в премелтоне является вполне достаточным для интеркаляции таких веществ как актиномицин [214, 366].

Наличие конформационных переходов, не приводящих к открыванию дуплекса, подтверждается и некоторыми расчётными данными. Bouvier и Grubmuller сопоставили результаты своих вычислений с некоторыми особенностями динамики открываний ДНК, описанными в личном сообщении их коллегами, занимавшимися ЯМР-исследованиями ДНК. По мнению Bouvier и Grubmuller в дуплексе могут возникать состояния со следующими свойствами [163]:

- 1) высоким барьером активации – около 67 кДж/моль, то есть на несколько кДж/моль выше средней ΔG^{\ddagger} флип-аута, см. таблицы 5.1 и 5.2,
- 2) достаточно малой ΔG° , составляющей от 8 до 12,5 кДж/моль,
- 3) неспособностью к обмену ^1H с молекулами раствора, свидетельствующей о сохранении Н-связей, см. раздел 5.4.

Таким образом, исследование проблемы «кода пузырька» должно быть тесно связано с изучением взаимодействия открытых состояний между собой, а также с другими конформационными изменениями. Сложность данной проблемы заключается не столько в тесной взаимосвязи конформационных флуктуаций ДНК, сколько в слишком малой статистике соответствующих экспериментальных данных. Можно сказать, что исследования динамики ДНК до сих пор находятся в самом начале своего пути, хотя её структура была расшифрована более 60 лет назад.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе рассмотрены исследования термодинамических и кинетических свойств открытых состояний ДНК, проведённые в мире за последние несколько десятилетий. Основное внимание уделено изучению процессов открывания дуплекса при температурах, намного меньших $T_{пл}$. Путём анализа литературных данных показано, что в этих условиях могут образовываться открытые состояния трёх типов: пузырьки денатурации, флип-ауты и комплексы с водным мостиком. Деление на типы произведено по двум условным критериям. Первый критерий – число нуклеотидных пар, в которых происходит разрыв Н-связей при открывании, обозначенное в работе буквой N . Для комплекса с водным мостиком или флип-аута, как правило, $N = 1$. Зарождение пузырька, напротив, связано с одновременным разрывом Н-связей в четырёх или более нуклеотидных парах. Доказательства этого описаны в разделе 6.1.

Второй критерий тесно связан с первым. Это молекулярно-динамическая траектория открывания. Косвенной количественной характеристикой данного критерия являются активационные термодинамические параметры открывания, см. раздел 5.2. Как показывает таблица 5.3, ΔS^{\ddagger} открывания пузырьков значительно выше нуля. Активационная энтропия флип-аута, средняя по основаниям вне А-трактов, напротив, находится в районе нуля или ниже, см. таблицы 5.1 и 5.2. Флип-ауты в А-трактах и вблизи концов дуплекса по своим активационным параметрам намного ближе к пузырькам. Это объясняется возможностью синхронного флип-аута двух соседних пар оснований [307]. Кроме того, анализ ЯМР-экспериментов, проведённый нами разделе 5.4, показывает, что величины ΔS^{\ddagger} в А-трактах, видимо, переоценены.

Из-за частичного перекрытия диапазонов термодинамических параметров разных открытых состояний, второй критерий является менее строгим, чем первый. Однако именно он, наряду с анализом влияния концевых эффектов на обмен ^1H при внутреннем катализе, помог отделить флип-аут от комплекса с водным мостиком. Вклад «приоткрываний» дуплекса в процесс обмена протонов подробно рассмотрен в разделе 5.4. Характерные черты и термодинамические особенности комплекса с водным мостиком описаны в разделах 5.4 и 6.4. Активационная энтропия его образования значительно выше нуля – в этом плане данный комплекс аналогичен зарождению пузырька. Хотя экспериментальный материал по открытым состояниям этого типа крайне скуден, дальнейшие исследования в этой области очень важны. В

частности, экспериментальные данные по динамике комплексов с водным мостиком способны внести огромный вклад в развитие угловых механических моделей ДНК. К этому вопросу мы вернёмся ниже.

Общей чертой теоретических подходов, рассмотренных в нашем обзоре, является их уровень. Каждая пара оснований описывается в этих моделях небольшим числом переменных – от одной до четырёх. Подходы данного уровня делятся на Изинг-подобные и механические. Каждая из этих групп, в свою очередь, делится на несколько подгрупп. Далее мы обобщим роль каждой из групп моделей в теоретических исследованиях термодинамических свойств открытых состояний дуплекса. Начнём с Изинг-подобных моделей.

Модели ближайших соседей. Основная задача, для решения которой разрабатывались подходы этой группы – изучение связи тонкой структуры профилей плавления гетерогенного дуплекса с его нуклеотидной последовательностью. В настоящее время феноменологическое описание кривых плавления ДНК остаётся областью применения большинства моделей ближайших соседей, см. раздел 1.3. Другой прикладной задачей, решаемой с помощью данных подходов, является расчёт профилей нестабильности длинных гетерогенных ДНК с целью поиска промоторных участков генома. Однако в этом случае расчётные профили далеки от картины, наблюдаемой в реальной ДНК, поскольку образование пузырьков в моделях этой подгруппы невозможно, см. раздел 6.2. Исключение составляет модель Канторович с соавт., оперирующая не стабильностью отдельных пар оснований, а именно вероятностью синхронного открывания ряда соседних пар [272]. Учёт условия $N > 1$ как ключевой характеристики пузырька позволил авторам воспроизвести существенную гетерогенность $K_{d,bub}$ в природной ДНК, содержащей промоторные области.

Несмотря на свою феноменологическую природу, модели ближайших соседей внесли большой вклад в исследование свойств кооперативного перехода в ДНК при её плавлении. Параметры этих моделей были определены из экспериментов, проведённых на коротких гетерогенных дуплексах при температурах, близких к $T_{пл}$, см. раздел 6.3. Длина изучаемых олигомеров не превышала 20 пар оснований, поэтому они могли расплетаться только с концов, не образуя пузырьков в середине. Тем не менее, подобранные параметры позволили точно описать и профили плавления ДНК, длина которых достигала сотен пар оснований [53]. Этот факт важен, поскольку высокая кооперативность в моделях ближайших соседей приводит к огромной разнице стабильности концевых и серединных областей дуплекса, см. раздел 6.2. Данный результат свидетельствует о значительной роли концевых эффектов при высокой температуре, подтверждая резкое увеличение кооперативности разрушения вторичной структуры дуплекса вблизи $T_{пл}$.

В то же время, профили плавления ДНК длиной более 1000 пар оснований описываются данными моделями намного хуже, чем профили более коротких дуплексов – см. рис. 10–18, и 20–22 в обзоре Wartell и Benight [53]. Одной из причин этого может являться сильная зависимость вероятности открывания каждой нуклеотидной пары от состояния соседних с ней пар. Завышенная кооперативность частично компенсирует несоблюдение условия $N > 1$, препятствуя слишком лёгкому открыванию пар, но при этом исключает зарождение пузырьков в середине дуплекса. Ещё одна причина несоответствия эксперименту для длинных ДНК может заключаться в неточной оценке вклада конфигурационной энтропии крупных денатурированных участков. Данный недостаток отсутствует у Изинг-подобных подходов другой подгруппы – моделей ПШ-типа.

Модели ПШ-типа. В отличие от моделей ближайших соседей, подходы этой подгруппы не являются феноменологическими. Они изначально были предназначены для исследования физических механизмов фазового перехода, происходящего при

денатурации ДНК, см. раздел 1.2. Изучение природы фазовых переходов в квазиодномерных системах является одной из важнейших проблем современной теоретической физики. Уникальность подходов ПШ-типа заключается в том, что в них очень удобно исследовать зависимость удельной конфигурационной энтропии крупного пузырька – петли – от его размера, энергии комплементарных связей и прочих факторов. Именно на моделях ПШ-типа показано, что одной из причин скачка теплоёмкости при $T_{пл}$ является резкое снижение удельной энтропии петель при росте их размеров. Кроме того, продемонстрировано, что для гетерогенной ДНК этот эффект является менее выраженным, чем для гомогенной [107], см. раздел 1.2. Исследован также энтропийный вклад денатурированных областей в динамику микромеханической денатурации ДНК, см. раздел 3.2.

Таким образом, Изинг-подобные модели внесли значительный вклад в изучение термодинамики открываний дуплекса при температурах, близких к $T_{пл}$. Однако в интервале пред-плавления свойства открытых состояний могут быть совершенно другими, см. разделы 5.3 и 6.5. Характер активационных барьеров зарождения пузырька и кооперативность процессов его роста/уменьшения могут сильно зависеть не только от первичной структуры ДНК, но и от T . Подобные эффекты крайне трудно изучать в простых моделях, а описать их при помощи Изинг-подобных подходов вообще вряд ли возможно. Значительно более перспективными в этом плане являются радиальные и радиально-торсионные механические модели. Их главным преимуществом является то, что они позволяют исследовать процессы переноса и нелинейной локализации энергии колебаний нуклеотидных пар, оказывающие сильное влияние на динамику открытых состояний. Модели данных подгрупп являются удобными и с точки зрения феноменологической оптимизации, цель которой – более точное описание влияния температуры на кинетику зарождения пузырька и кооперативность его роста/уменьшения. Не менее важной является и разработка угловых подходов, при помощи которых удобно моделировать перенос энергии угловых смещений оснований и его влияние на кинетику комплексов $nH^* \cdots H_2O \cdots ass$, см. раздел 6.4.

Обобщим роль каждой из подгрупп механических подходов в исследованиях ДНК и обозначим возможные перспективы их развития.

Радиальные и радиально-торсионные подходы. Одним из важнейших экспериментальных фактов, изученных в моделях этого типа, является скачкообразный характер «поперечного» микромеханического расплетания ДНК, см. раздел 3.1. Данное явление впервые описано в Изинг-подобных моделях, исследованных методами равновесной статистической физики, см. разделы 3.2 и 3.3. Тем не менее, скачкообразный переход системы между минимумами свободной энергии в этих подходах происходит только в гетерогенной ДНК. Возможность аналогичного поведения гомогенного дуплекса была впервые показана именно в механической модели, см. раздел 3.3. Причиной неравномерного сопротивления гомогенной ДНК при разрыве является нелинейная локализация энергии в случайных её участках, приводящая к их открыванию. В гетерогенной ДНК положение нестабильных участков зависит от первичной структуры, а локализация энергии должна увеличивать глубину энергетических минимумов.

Очевидно, на качественном уровне скачкообразную микромеханическую денатурацию можно воспроизвести во многих механических моделях, описанных в разделах 2.3 и 2.4. В данном случае основным требованием к подходу является описание комплементарных Н-связей через нелинейный потенциал. Уже в первых радиальных моделях показано, что это условие является основным для локализации энергии [151, 152]. Однако, как продемонстрировано на модели ПБД, не менее важна и нелинейность потенциала, описывающего стэкинг-взаимодействия. Прежде всего, данное условие ($\rho \neq 0$) является ключевым для воспроизведения фазового перехода

первого рода, причём как в радиальных, так и в радиально-торсионных моделях, см. разделы 2.2 и 2.3. Более того, ангармоничность стэкинг-потенциала критична для точного описания профилей нестабильности гетерогенной ДНК при умеренных температурах, см. раздел 4.2, а также 6.2.

Как показано в разделе 4.2, к методам исследования механических моделей также существуют определённые требования. Так, переход от ланжевендовской динамики к изучению равновесных свойств модели ПБД приводит к заметной потере согласия с экспериментальными данными. Это хорошо видно из результатов Van Erp et al. и других исследователей [264, 267–269]. Им не удалось воспроизвести ни существенной гетерогенности профиля нестабильности, ни дальнего эффекта мутации, наблюдаемых в экспериментах [29, 30]. Показательны также данные de los Santos et al., использовавших упрощённый ланжевендовский подход [367]. В целях экономии машинного времени авторы сильно увеличили коэффициент трения: полученные результаты оказались также далеки от эксперимента.

Строго говоря, сильная гетерогенность $K_{d,bub}$, наблюдаемая в экспериментах, даже в модели ПБД не описывается в полной мере [29, 30, 212, 273]. Тем же недостатком обладает и модернизированная модель ПБД, в которой стэкинг-потенциал зависит от нуклеотидной последовательности [274]. Поэтому, на наш взгляд, эффективный поиск биологически активных участков ДНК в простых механических моделях требует их дальнейшей оптимизации. Рассмотрим в общих чертах её возможные пути.

Основной модернизацией должен быть ввод добавочного энергетического барьера, препятствующего открыванию менее чем N соседних пар оснований. Вопрос необходимости условия $N > 1$ рассмотрен в разделах 6.1 и 6.2. Как показано в разделе 5.4, расхождение средней $K_{d,bub}$, получаемой в модели ПБД, с результатами экспериментов невозможно объяснить какими-либо особенностями методик. Следовательно, необходимо феноменологически оптимизировать модель, повысив энергетический барьер зарождения пузырька.

Более того, имеет смысл изучить зависимость самой величины N от локального соотношения GC- и AT-пар. Как мы упоминали в разделе 6.2, через условие $N > 1$ в механическую модель можно ввести «локальную кооперативность». В то же время, как показано в разделе 4.1, выраженная зависимость кооперативности плавления отдельных областей ДНК от их состава является экспериментальным фактом. Однако при умеренных температурах кинетика открывания дуплекса зависит от его первичной структуры сильнее, чем вблизи $T_{пл}$. Поэтому при данной модернизации необходимо опираться на большой объём экспериментальных данных.

Ещё одной возможной модернизацией является учёт флип-аутов и комплексов с водным мостиком. Материал раздела 5.2 демонстрирует некооперативность единичных угловых открываний и взаимную независимость их кинетики. Данные раздела 6.5 косвенно свидетельствуют о влиянии этих процессов на динамику пузырьков при повышенной температуре. В радиальные и радиально-торсионные модели флип-аут можно ввести как кратковременное уменьшение глубины ямы потенциала, описывающего комплементарные Н-связи данной пары оснований. «Управлять» флип-аутами удобнее всего через стохастическую функцию. Её параметры можно вывести из термодинамических свойств одиночных открываний, или подобрать путём сравнения с экспериментами. Это позволит учесть не только разные K_d AT- и GC-пар, но и кинетические особенности А- и G-трактов, а также концевые эффекты. Аналогичным образом можно ввести в модель и кинетику комплексов с водным мостиком.

Указанные пути модернизации хорошо подходят как для радиальных, так и для радиально-торсионных моделей. Среди радиальных подходов удобен вариант ПБД с гетерогенным стэкинговым потенциалом [274]. Данная модель хорошо разработана и широко применяется для расчёта профилей нестабильности природных ДНК, см. раздел 4.2. Ещё один пример перспективного подхода – модель Тоды-Леннарда-

Джонса, описанная в разделе 2.4. Среди радиально-торсионных подходов наиболее «многообещающим» является модель Varbi et al. с ангармоническим стэкинговым потенциалом [179], см. раздел 2.3.

Поскольку в радиально-торсионных моделях учтена спиральная геометрия дуплекса, они обладают более широкими возможностями, чем радиальные. Очевидно, данное преимущество сохранится и после модернизации подходов обеих подгрупп. Например, радиальные модели не позволяют исследовать тепловые флуктуации суперспирализации и её «сброс» на концах короткого дуплекса, описанный в разделе 6.1. Другой важной нишей радиально-торсионных подходов может стать изучение влияния пузырька на динамику областей, удалённых от него на виток спирали [347], см. раздел 5.3.2. Наконец, в моделях этой подгруппы можно значительно точнее описывать искажения дуплекса в А-трактах или областях ДНК-белкового взаимодействия. Это позволит лучше изучить локализацию энергии в искажённых областях ДНК, возможность которой была впервые показана в радиальных подходах, см. раздел 5.3.3.

С другой стороны, для радиальных моделей легче определять значения параметров, а их исследование требует меньших затрат машинного времени. Поэтому если ДНК релаксирована, изучать её низкотемпературную динамику в подходах этой подгруппы намного удобнее. Несомненным преимуществом радиальных моделей является и возможность прямого сравнения со многими экспериментальными данными.

Как простота и удобство радиальных моделей, так и большой потенциал развития радиально-торсионных могут играть важную роль в исследовании проблемы «кода пузырька». Однако, не менее полезным инструментом исследования неравновесной динамики дуплекса являются угловые модели, описанные в разделе 2.1. Распределение энергии угловых колебаний между основаниями – один из ключевых факторов, определяющих порядок нарушения стэкинг-взаимодействий и Н-связей при зарождении пузырька, см. раздел 6.5. Поэтому угловые подходы не менее актуальны, чем радиальные или радиально-торсионные.

Угловые подходы. В отличие от моделей, включающих радиальные степени свободы, в угловых подходах расхождение цепей ДНК исключено. Это ограничивает область их применения исследованиями низкотемпературной динамики ДНК. Для моделей данной подгруппы проблема сравнения расчётных данных с экспериментом стоит наиболее остро. На наш взгляд, самый верный путь её решения – разработка и проведение специфических экспериментов. Одним из перспективных вариантов является изучение кинетики обмена ^1H иминогруппы в отсутствие внешнего катализатора в олигонуклеотидах с особой первичной структурой. Это должны быть ДНК, состоящие в основном из GC-пар, но имеющие гетерогенную середину, включающую AT-пары.

Дуплексы подобного строения очень удобны для изучения влияния переноса и локализации энергии угловых смещений оснований на кинетику комплексов с водным мостиком. Возможный механизм такого влияния описан в разделе 6.4. Величины K_d' различных нуклеотидных пар можно определить путём квантовохимических расчётов. Сравнивая данные значения с экспериментом, нетрудно оценить и вклад солитонных возбуждений в кинетику комплексов $\text{puH}^* \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{асс}$. Закономерности, установленные в подобных исследованиях, могут оказаться исключительно полезными для дальнейшего развития угловых моделей и определения их параметров.

Ограничения применимости моделей рассмотренного уровня. Хотя простые теоретические подходы играют большую роль в исследованиях динамики ДНК, некоторые особенности поведения этой молекулы невозможно воспроизвести в моделях данного уровня. В качестве одного из примеров можно привести денатурацию S-ДНК под действием малого усилия, направленного вдоль оси молекулы, разделы 3.1 и 3.3. Стабилизируя локальные изменения конформации, происходящие за счёт

теплового шума, внешняя сила почти не влияет на Н-связи. Однако накопление достаточного числа конформационных нарушений сахарофосфатного остова приводит к кооперативному разрушению системы этих связей. Для описания подобных явлений, очевидно, необходимы модели достаточно высокого уровня.

Другим примером является флип-аут, свойства которого рассмотрены в главе 5. Данный процесс описан феноменологически в моделях ближайших соседей [280], однако простые подходы не позволяют изучать его физические основы. Выходу основания из уотсон-криковской спирали часто препятствуют существенные стерические ограничения. Поэтому траектория флип-аута сильно зависит от контекста первичной структуры, в котором находится данное основание. Она может быть крайне сложной. Основным методом изучения открываний одиночных нуклеотидных пар *in silico* являются молекулярно-динамические вычисления [161–163, 368, 369].

Теоретические исследования проблемы «кода пузырька» также требуют применения подходов высокого уровня наряду с простыми моделями. Суммарная ΔG^{\ddagger} Н-связей и стэкинг-взаимодействий участка ДНК полностью определяет его $K_{d,bub}$ лишь вблизи $T_{пл}$. При умеренных температурах $K_{d,bub}$ дополнительно зависит от целого ряда факторов, описанных в разделе 6.5. Во-первых, это сложная взаимосвязь угловых и радиальных колебаний оснований. Во-вторых, влияние флуктуаций суперспирализации на динамику дуплекса. В-третьих, возможность разбиения активационного барьера зарождения пузырька на несколько более низких в некоторых участках нуклеотидной последовательности. В-четвёртых, вероятный вклад локальных изменений конформации дуплекса, не являющихся открытыми состояниями.

Таким образом, области применения простых подходов и перспективы развития каждого из них ограничиваются, прежде всего, сложностью структуры ДНК. Тем не менее, параллельная разработка моделей нескольких подгрупп, в комплексе с новыми экспериментальными исследованиями динамики дуплекса, обладает огромным потенциалом. Сопоставление поведения принципиально разных моделей в похожих условиях позволит получить намного больше информации о механизмах, управляющих открываниями ДНК. Ярким примером является уже знакомая нам проблема «кода пузырька». Исследование максимально оптимизированных моделей всех описанных выше групп, при условии подобранных параметров, существенно уменьшит необходимость исследования моделей более высокого уровня. В этом случае немалую роль могут сыграть также подходы, специализированные для изучения метастабильных состояний, при которых ДНК остаётся закрытой.

Вообще говоря, любая модель, при помощи которой удаётся описать хотя бы одну характерную черту динамики дуплекса, заслуживает дальнейшей разработки, а результаты её исследований – экспериментальной проверки. Пути оптимизации должны выбираться индивидуально для каждой модели. Изменение подхода не должно приводить к потере его основного преимущества – способности к описанию той или иной черты поведения ДНК. Следовательно, способы модернизации, описанные нами выше, не обязательно подходят для всех моделей, описанных в главе 2. Сравнение расчётных данных с экспериментами также требует известной осторожности. Экспериментальные данные должны быть не только современными, но и максимально близкими к тому аспекту поведения ДНК, который исследуется именно с помощью данной модели. Другими словами, сравнение модели и эксперимента должно быть «как можно более прямым». Случай угловых моделей показывает, что иногда может быть необходима даже разработка и проведение специальных экспериментов.

Подводя итог, можно сказать, что разнообразие простых теоретических и экспериментальных подходов в исследованиях открытых состояний ДНК во многом компенсирует сложность структуры и поведения этой молекулы. По всей видимости, именно простые методики должны сыграть основную роль в дальнейших исследованиях функционального поведения большинства биологических

макромолекул. Совместная работа научных коллективов над комплексным развитием подходов является прекрасной альтернативой гигантским затратам машинного времени на исследование сложных моделей ДНК.

БЛАГОДАРНОСТИ

Один из авторов (А. Ш.) благодарен В.М. Комарову и Н.С. Фиалко за ценные консультации в процессе работы, а также выражает особую благодарность О.М. Кричевскому за предоставленный экспериментальный материал и А.В. Теплухину за конструктивную критику ряда деталей главы 5. Авторы благодарны Российскому Фонду фундаментальных исследований, поддержавшему эту работу (гранты №13-07-00331, №13-07-00256, №12-07-00279 и №12-07-33006).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alhambra C., Luque F.J., Gago F., Orozco M. *Ab Initio* Study of Stacking Interactions in A- and B-DNA. *The Journal of Physical Chemistry B*. 1997. V. 101. P. 3846–3853.
2. Hobza P., Sponer J. Structure, Energetics, and Dynamics of the Nucleic Acid Base Pairs: Nonempirical *Ab Initio* Calculations. *Chemical Reviews*. 1999. V. 99. P. 3247–3276.
3. Sponer J., Leszczynski J., Hobza P. Nature of Nucleic Acid-Base Stacking: Nonempirical *ab Initio* and Empirical Potential Characterization of 10 Stacked Base Dimers. Comparison of Stacked and H-Bonded Base Pairs. *The Journal of Physical Chemistry*. 1996. V. 100. P. 5590–5596.
4. Tewari A.K., Dubey R. Emerging trends in molecular recognition: utility of weak aromatic interactions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2008. V. 16. P. 126–143.
5. Watson D.G., Sutor D.J., Tollin P. The crystal structure of deoxyadenosine monohydrate. *Acta Crystallographica*. 1965. V. 19. P. 111–124.
6. Kraut J., Jensen L.H. Refinement of the crystal structure of adenosine-5'-phosphate. *Acta Crystallographica*. 1963. V. 16. P. 79–88.
7. Gago F. Stacking Interactions and Intercalative DNA Binding. *Methods*. 1998. V. 14. P. 277–292.
8. Sponer J., Leszczynski J., Hobza P. Electronic properties, hydrogen bonding, stacking, and cation binding of DNA and RNA bases. *Biopolymers*. 2001/2002. V. 61. P. 3–31.
9. Cerny J., Hobza P. Non-covalent interactions in biomacromolecules. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2007. V. 9. P. 5291–5303.
10. Нельсон Д., Кокс М. *Основы биохимии Ленинджера: в 3 т.* Т. 1. Пер. с англ. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. 402 с.
11. Benham C.J., Mielke S.P. DNA mechanics. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2005. V. 7. P. 21–53.
12. Веденов А.А., Дыхне А.М., Франк-Каменецкий М.Д. Переход спираль-клубок в ДНК. *Успехи физических наук*. 1971. Т. 105. Вып. 3. С. 479–519.
13. Peyrard M. Nonlinear dynamics and statistical physics of DNA. *Nonlinearity*. 2004. V. 17. P. R1–R40.
14. Cloutier T., Widom J. Spontaneous Sharp Bending of Double-Stranded DNA. *Molecular Cell*. 2004. V. 14. P. 355–362.
15. Yan J., Marko J.F. Localized Single-Stranded Bubble Mechanism for Cyclization of Short Double Helix DNA. *Physical Review Letters*. 2004. V. 93. Article No. 108108.
16. Cloutier T.E., Widom J. DNA twisting flexibility and the formation of sharply looped protein-DNA complexes. *PNAS USA*. 2005. V. 102. P. 3645–3650.
17. Du Q., Smith C., Shiffeldrim N., Vologodskaya M., Vologodskii A. Cyclization of short DNA fragments and bending fluctuations of the double helix. *PNAS USA*. 2005. V. 102. P. 5397–5402.

18. Feklistov A., Darst S.A. Structural basis for promoter-10 element recognition by the bacterial RNA polymerase sigma subunit. *Cell*. 2011. V. 147. P. 1257–1269.
19. Liu X., Bushnell D.A., Kornberg R.D. Lock and key to transcription: sigma-DNA interaction. *Cell*. 2011. V. 147. P. 1218–1219.
20. Eley D.D., Spivey D.I. Semiconductivity of organic substances. Part 9. Nucleic acid in the dry state. *Transactions of the Faraday Society*. 1962. V. 58. P. 411–415.
21. Armitage B. Photocleavage of Nucleic Acids. *Chemical Reviews*. 1998. V. 98. P. 1171–1200.
22. Kino K., Sugiyama H. Possible cause of G-C→C-G transversion mutation by guanine oxidation product, imidazolone. *Chemistry & Biology*. 2001. V. 8. P. 369–378.
23. Wagenknecht H.-A. Electron transfer processes in DNA: mechanisms, biological relevance and applications in DNA analytics. *Natural Product Reports*. 2006. V. 23. P. 973–1006.
24. Kawanishi S., Hiraku Y., Oikawa S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutation Research*. 2001. V. 488. P. 65–76.
25. Genereux J.C., Boal A.K., Barton J.K. DNA-mediated Charge Transport in Redox Sensing and Signaling. *Journal of American Chemical Society*. 2010. V. 132. P. 891–905.
26. Sontz P.A., Mui T.P., Fuss J.O., Tainer J.A., Barton J.K. DNA charge transport as a first step in coordinating the detection of lesions by repair proteins. *PNAS USA*. 2012. V. 109. P. 1856–1861.
27. Sontz P.A., Muren N.B., Barton J.K. DNA Charge Transport for Sensing and Signaling. *Accounts of Chemical Research*. 2012. V. 45. P. 1792–1800.
28. Folta-Stogniew E., Russu I.M. Sequence dependence of base-pair opening in a DNA dodecamer containing the CACA/GTGT sequence motif. *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 11016–11024.
29. Choi C.H., Kalosakas G., Rasmussen K.O., Hiromura M., Bishop A.R., Usheva A. DNA dynamically directs its own transcription initiation. *Nucleic Acids Research*. 2004. V. 32. P. 1584–1590.
30. Kalosakas G., Rasmussen K.O., Bishop A.R., Choi C.H., Usheva A. Sequence-specific thermal fluctuations identify start sites for DNA transcription. *Europhysics Letters*. 2004. V. 68. P. 127–133.
31. Lakhno V.D. DNA Nanobioelectronics. *International Journal of Quantum Chemistry*. 2008. V. 108. P. 1970–1981.
32. Triberis G.P., Dimakogianni M. DNA in the material world: electrical properties and nano-applications. *Recent Patents on Nanotechnology*. 2009. V. 3. P. 135–153.
33. Hatfield G.W., Benham C.J. DNA topology-mediated control of global gene expression in *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics*. 2002. V. 36. P. 175–203.
34. Mielke S.P., Gronbech-Jensen N.G., Krishnan V.V., Fink W.H., Benham C.J. Brownian dynamics simulations of sequence-dependent duplex denaturation in dynamically superhelical DNA. *The Journal of chemical physics*. 2005. V. 123. Article No. 124911.
35. Zhabinskaya D., Benham C.J. Theoretical Analysis of the Stress Induced B-Z Transition in Superhelical DNA. *PLoS Computational Biology*. 2011. V. 7. Article No. e1001051.
36. Watson J.D., Crick F.H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953. V. 171. P. 737–738.
37. Zimm B.H., Kallenbach N.R. Selected Aspects of the Physical Chemistry of Polynucleotides and Nucleic Acids. *Annual Review of Physical Chemistry*. 1962. V. 13. P. 171–194.
38. Marmur J., Rownd R., Schildkraut C.L. Denaturation and Renaturation of Deoxyribonucleic Acids. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 1963. V. 1. P. 231–300.

39. Felsenfeld G., Miles H.T. The Physical and Chemical Properties of Nucleic Acids. *Annual Review of Biochemistry*. 1967 V. 36. P. 407–448.
40. Thomas R. Recherches sur la d'enaturation des acides desoxyribonucleiques. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1954. V. 14. P. 231–240.
41. Rice S.A., Doty P. The Thermal Denaturation of Deoxyribose Nucleic Acid. *Journal of American Chemical Society*. 1957. V. 79. P. 3937–3947.
42. Zamenhof S., Alexander H.E., Leidy G. Studies on the chemistry of the transforming activity. I. Resistance to physical and and chemical agents. *The Journal of Experimental Medicine*. 1953. V. 98. P. 373–397.
43. Bloomfield V.A., Crothers D.M., Tinoco I.Jr. *Physical Chemistry of Nucleic acids*. New York: Harper & Row, 1974. 133 p.
44. Tinoco I. Jr. Hypochromism in Polynucleotides. *Journal of American Chemical Society*. 1960. V. 82. P. 4785–4790. Erratum in: *Journal of American Chemical Society*. 1961. V. 84. P. 5047.
45. Rhodes W. Hypochromism and Other Spectral Properties of Helical Polynucleotides. *Journal of American Chemical Society*. 1961. V. 83. P. 3609–3617.
46. De Voe H. Optical Properties of Molecular Aggregates. I. Classical Model of Electronic Absorption and Refraction. *The Journal of chemical physics*. 1964. V. 41. № 2. P. 393–400.
47. Rhodes W., Chase M. Generalized Susceptibility Theory I. Theories of Hypochromism. *Reviews of Modern Physics*. 1967. V. 39. P. 348–361.
48. Bullough R.K. Complex Refractive Index and a Two-Band Model in the Theory of Hypochromism. *The Journal of chemical physics*. 1968. V. 48. P. 3712–3722.
49. De Voe H. The theory of hypochromism of biopolymers: calculated spectra for DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1969. V. 158. P. 298–307.
50. Brown E., Pysh E.S. Base Composition Dependence of DNA Hypochromism. *The Journal of Chemical Physics*. 1972. V. 56. P. 31–37.
51. Volkov S.N. Some aspects of the DNA hypochromic effect theory. *International Journal of Quantum Chemistry*. 1979. V. 16. Iss. 1. P. 119–132.
52. Russell A.P., Holleman D.S. The thermal denaturation of DNA: average length and composition of denatured areas. *Nucleic Acids Research*. 1974. V. 1. P. 959–978.
53. Wartell R.M., Benight A.S. Thermal denaturation of DNA molecules: A comparison of theory with experiment. *Physics Reports*. 1985. V. 126. P. 67–107.
54. Montrichok A., Gruner G., Zocchi G. Trapping intermediates in the melting transition of DNA oligomers. *Europhysics Letters*. 2003. V. 62. P. 452–458.
55. Zeng Y., Montrichok A., Zocchi G. Length and statistical weight of bubbles in DNA melting. *Physical Review Letters*. 2003. V. 91. Article No. 148101.
56. Marmur J., Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of Molecular Biology*. 1962. V. 5. Iss. 1. P. 109–118.
57. Nishigaki K., Husimi Y., Masuda M., Kaneko K., Tanaka T. Strand dissociation and cooperative melting of double-stranded DNAs detected by denaturant gradient gel electrophoresis. *The Journal of Biochemistry*. 1984. V. 95. P. 627–635.
58. Fodde R., Losekoot M. Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Human mutation*. 1994. V. 3. P. 83–94.
59. Wada A., Yabuki S., Husimi Y. Fine structure in the thermal denaturation of DNA: high temperature-resolution spectrophotometric studies. *CRC critical reviews in biochemistry*. 1980. V. 9. P. 87–144.
60. Lazurkin Yu.S., Frank-Kamenetskii M.D., Trifonov E.N. Melting of DNA: its study and application as a research method. *Biopolymers*. 1970. V. 9. P. 1253–1306.
61. Gotoh O. Prediction of melting profiles and local helix stability for sequenced DNA. *Advances in Biophysics*. 1983. V. 16. P. 1–52.

62. Ivanov V., Zeng Y., Zocchi G. Statistical mechanics of base stacking and pairing in DNA melting. *Physical Review E*. 2004. V. 70. Article No. 051907.
63. Rice S.A., Wada A. On a model of the Helix-coil Transition in Macromolecules. II. *The Journal of Chemical Physics*. 1958. V. 29. P. 233–243.
64. Hill T.L. Generalization of the One-Dimensional Ising Model Applicable to Helix Transitions in Nucleic Acids and Proteins. *The Journal of Chemical Physics*. 1959. V. 30. P. 383–387.
65. Zimm B.H. Theory of "Melting" of the Helical Form in Double Chains of the DNA Type. *The Journal of Chemical Physics*. 1959. V. 33. P. 1349–1356.
66. Newell G.F., Montroll E.W. On the Theory of the Ising Model of Ferromagnetism *Reviews of Modern Physics*. 1953. V. 25. P. 353–389.
67. Magee W.S.Jr., Gibbs J.H., Zimm B.H. Theory of helix–coil transitions involving complementary poly- and oligo-nucleotides. I. The complete binding case. *Biopolymers*. 1963. V. 1. Iss. 2. P. 133–143.
68. Magee W.S., Gibbs J.H., Newell G.F. Statistical Thermodynamic Theory for Helix—Coil Transitions Involving Poly- and Oligonucleotides. II. The Case of Partial Binding. *The Journal of Chemical Physics*. 1965. V. 43. P. 2115–2123.
69. Schildkraut C., Lifson S. Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration. *Biopolymers*. 1965. V. 3. Iss. 2. P. 195–208.
70. Applequist J., Damle V. Theory of the Effects of Concentration and Chain Length on Helix–Coil Equilibria in Two-Stranded Nucleic Acids. *The Journal of Chemical Physics*. 1963. V. 39. P. 2719–2721.
71. Poland D., Scheraga H.R. *Theory of helix-coil transitions in biopolymers: statistical mechanical theory of order-disorder transitions in biological macromolecules*. New York: Acad. Press, 1970. 797 p.
72. Crothers D.M., Kallenbach N.R. On the Helix–Coil Transition in Heterogeneous Polymers. *The Journal of Chemical Physics*. 1966. V. 45. P. 917–927.
73. Lehman G.W., McTague J.P. Melting of DNA. *The Journal of Chemical Physics*. 1968. V. 49. P. 3170–3179.
74. Brahm J., Maurizot J.C., Michelson A.M. Conformational stability of dinucleotides in solution. *Journal of Molecular Biology*. 1967. V. 25. P. 481–495.
75. Davis R.C., Tinoco I. Jr. Temperature-dependent properties of dinucleoside phosphates. *Biopolymers*. 1968. V. 6. P. 223–242.
76. Inman R.B., Baldwin R.L. Helix- Random Coil Transitions in DNA Homopolymer Pairs. *Journal of Molecular Biology*. 1964. V. 8. P. 452–469.
77. Chamberlin M.J. Comparative properties of DNA, RNA, and hybrid homopolymer pairs. *Federation Proceedings*. 1965. V. 24. P. 1446–1457.
78. Applequist J. True Phase Transitions in Macromolecules of the DNA Type. *The Journal of Chemical Physics*. 1966. V. 45. P. 3459–3461.
79. Applequist J. Higher-Order Phase Transitions in Two-Stranded Macromolecules. *The Journal of Chemical Physics*. 1969. V. 50. P. 600–609.
80. Landau L.D., Lifschitz E.M. *Statistical Physics*. Oxford: Pergamon Press, 1980. 387 p.
81. Mermin N., Wagner H. Absence of ferro-magnetism or antiferromagnetism in one- or two-dimensional isotropic Heisenberg models. *Physical Review Letters*. 1966. V. 17. P. 1133–1136.
82. Kac M., Uhlenbeck G.E., Hemmer P.C. On the Van der Waals Theory of the Vapor-Liquid Equilibrium. I. Discussion of a One-Dimensional Model. *Journal of Mathematical Physics*. 1963. V. 4. P. 216–228.
83. Poland D., Scheraga H.A. Phase transitions in one dimension and the helix-coil transition in polyamino acids. *The Journal of Chemical Physics*. 1966. V. 45. P. 1456–1463.

84. Poland D., Scheraga H.A. Occurrence of a phase transition in nucleic acid models. *The Journal of Chemical Physics*. 1966. V. 45. P. 1464–1469.
85. Flory P.J. Theory of Elastic Mechanisms in Fibrous Proteins. *Journal of American Chemical Society*. 1956. V. 78. P. 5222–5235.
86. Fisher M.E. Effect of Excluded Volume on Phase Transitions in Biopolymers. *The Journal of Chemical Physics*. 1966. V. 45. P. 1469–1473.
87. Лифшиц И.М., Гросберг А.Ю., Хохлов А.Р. Структура полимерной глобулы, сформированной насыщающимися связями. *ЖЭТФ*. 1976. Т. 71. Вып. 4. С. 1634–1643.
88. Лифшиц И.М., Гросберг А.Ю., Хохлов А.Р. Объемные взаимодействия в статистической физике полимерной макромолекулы. *Успехи физических наук*. 1979. V. 127. Вып. 3. С. 353–389.
89. Кузнецов Д.В., Хохлов А.Р. Об аномальном переходе клубок-глобула в гетерополимерной макромолекуле. *Высокомолекулярные соединения. Серия Б*. 1981. Т. 23Б. № 1. С. 59–61.
90. Гросберг А.Ю., Хохлов А.Р. Переходы типа клубок-глобула в полимерных системах. В: *Проблемы физики твердого тела: курс лекций*. Под ред. Прохорова А.М. Москва: Мир, 1984. С. 330–353.
91. Гросберг А.Ю., Хохлов А.Р. Фазовые переходы в полимерных и биополимерных системах. *Успехи физических наук*. 1986. Т. 149. Вып. 4. С. 721–726.
92. Grosberg A.Yu., Khokhlov A.R. After-Action of the Ideas of I.M. Lifshitz in Polymer and Biopolymer Physics. *Advances in Polymer Science*. Berlin: Springer-Verlag, 2006. V. 196. P. 189–210.
93. Takahashi M., Yoshikawa K., Vasilevskaya V.V., Khokhlov A.R. Discrete coil-globule transition of single duplex DNAs induced by polyamines. *The Journal of Physical Chemistry B*. 1997. V. 101. P. 9396–9401.
94. Mukherji S., Bhattacharjee S.M. Directed polymers with random interaction: An exactly solvable case. *Physical Review E*. 1993. V. 48. P. 3483–3496.
95. Bhattacharjee S.M., Mukherji S. Directed polymers with random interaction: Marginal relevance and novel criticality. *Physical Review Letters*. 1993. V. 70. P. 49–52.
96. Causo M.S., Coluzzi B., Grassberger P. Simple model for the DNA denaturation transition. *Physical Review E*. 2000. V. 62. P. 3958–3973.
97. Kafri Y., Mukamel D., Peliti L. Why is the DNA Denaturation Transition First Order? *Physical Review Letters*. 2000. V. 85. P. 4988–4991.
98. Duplantier B. Polymer Network of fixed topology: renormalization, exact critical exponent γ in two dimensions, and $d = 4 - \epsilon$. *Physical Review Letters*. 1986. V. 57. P. 941–944.
99. Duplantier B. Statistical Mechanics of Polymer Networks. *Journal of Statistical Physics*. 1989. V. 54. P. 581–680.
100. Schafer L., von Ferber C., Lehr U., Duplantier B. Renormalization of polymer networks and stars. *Nuclear Physics B*. 1992. V. 374. P. 473–495.
101. Garel T., Monthus C., Orland H. A simple model for DNA denaturation. *Europhysics Letters*. 2001. V. 55. P. 132–138.
102. Carlon E., Orlandini E., Stella A.L. Roles of Stiffness and Excluded Volume in DNA Denaturation. *Physical Review Letters*. 2002. V. 88. Article No. 198101.
103. Baiesi M., Carlon E., Stella A.L. Scaling in DNA unzipping models: Denaturated loops and end segments as branches of a block copolymer network. *Physical Review E*. 2002. V. 66. Article No. 021804.
104. Blossey R., Carlon E. Reparametrizing the loop entropy weights: Effect on DNA melting curves. *Physical Review E*. 2003. V. 68. Article No. 061911.

105. Baiesi M., Carlon E., Kafri Y., Mukamel D., Orlandini E., Stella A.L. Interstrand distance distribution of DNA near melting. *Physical Review E*. 2003. V. 67. Article No. 021911.
106. Garel T., Monthus C. Numerical study of the disordered Poland–Scheraga model of DNA denaturation. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*. 2005. V. 2005. Article No. P06004.
107. Coluzzi B. Numerical study of a disordered model for DNA denaturation transition. *Physical Review E*. 2006. V. 73. Article No. 011911.
108. Coluzzi B., Yeramian E. Numerical evidence for relevance of disorder in a Poland–Scheraga DNA denaturation model with self-avoidance: scaling behavior of average quantities. *The European Physical Journal B*. 2007. V. 56. P. 349–365.
109. Bar A., Kafri Y., Mukamel D. Loop Dynamics in DNA Denaturation. *Physical Review Letters*. 2007. V. 98. Article No. 038103.
110. Kunz H., Livi R., Suto A. The structure factor and dynamics of the helix–coil transition. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*. 2007. V. 2007. Article No. P06004.
111. Bandyopadhyay M., Gupta S., Segal D. DNA breathing dynamics: Analytic results for distribution functions of relevant Brownian functionals. *Physical Review E*. 2011. V. 83. Article No. 031905.
112. Inman R.B. A denaturation map of the lambda phage DNA molecule determined by electron microscopy. *Journal of Molecular Biology*. 1966. V. 18. P. 464–476.
113. Hirschman S.Z., Gellert M., Falkow S., Felsenfeld G. Spectral analysis of the intramolecular heterogeneity of lambda DNA. *Journal of Molecular Biology*. 1967. V. 28. P. 469–477.
114. Sanger F., Coulson A.R., Hong G.F., Hill D.F., Petersen G.B. Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *Journal of Molecular Biology*. 1982. V. 162. P. 729–773.
115. Falkow S., Cowie D.B. Intramolecular heterogeneity of the deoxyribonucleic acid of temperate bacteriophages. *Journal of Bacteriology*. 1968. V. 96. P. 777–784.
116. Hanlon S., Johnson R.S., Wolf B., Chan A. Mixed Conformations of Deoxyribonucleic Acid in Chromatin: A Preliminary Report. *PNAS USA*. 1972. V. 69. P. 3263–3267.
117. Tashiro T., Kurokawa M. A Contribution of Nonhistone Proteins to the Conformation of Chromatin. *European Journal of Biochemistry*. 1975. V. 60. P. 569–577.
118. Darzynkiewicz Z., Traganos F., Sharpless T., Melamed M.R. DNA denaturation *in situ*. Effect of divalent cations and alcohols. *The Journal of Cell Biology*. 1976. V. 68. P. 1–10.
119. Defert N., Kitzist A., Kruht J., Brahms S., Brahms J. Effect of non-histone proteins on thermal transition of chromatin and of DNA. *Nucleic Acids Research*. 1977. V. 4. P. 2293–2306.
120. Li H. J., Brand B., Rotter A. Thermal denaturation of calf thymus DNA: existence of a GC-richer fraction. *Nucleic Acids Research*. 1974. V. 1. P. 257–265.
121. Fonty G., Crouse E.J., Stutz E., Bernard G. The Mitochondrial Genome of *Euglena gracilis*. *European Journal of Biochemistry*. 1975. V. 54. P. 367–372.
122. Schmitt J.M, Bonhert H.-J., Gordon K.H.J., Herrmann R., Bernardi G., Crouse E.J. Compositional Heterogeneity of the Chloroplast DNAs from *Euglena gracilis* and *Spinacia oleracea*. *European Journal of Biochemistry*. 1981. V. 117. P. 375–382.
123. Lyon E. Mutation detection using fluorescent hybridization probes and melting curve analysis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2001. V. 1. P. 92–101.
124. Ruskova L., Raclavsky V. The potential of high resolution melting analysis (HRMA) to streamline, facilitate and enrich routine diagnostics in medical microbiology. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. 2011. V. 155. P. 239–252.

125. Li B.S., Wang X.Y., Ma F.L., Jiang B., Song X.X., Xu A.G. Is high resolution melting analysis (HRMA) accurate for detection of human disease-associated mutations? A meta analysis. *PLoS One*. 2011. V. 6. Article No. e28078.
126. Vossen R.H., Aten E., Roos A., den Dunnen J.T. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Human Mutation*. 2009. V. 30. P. 860–866.
127. Ghorashi S.A., Noormohammadi A.H., Markham P.F. Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strains using PCR and high-resolution melting curve analysis. *Microbiology*. 2010. V. 156. P. 1019–1029.
128. Lyamichev V.I., Panyutin I.G., Cherny D.I., Lyubchenko Yu. L. Localization of low-melting regions in phage T7 DNA. *Nucleic Acids Research*. 1983. V. 11. P. 2165–2176.
129. Wartell R.M., Benight A.S. Fluctuational Base-Pair Opening in DNA at Temperatures Below the Helix-Coil Transition Region. *Biopolymers*. 1982. V. 21. P. 2069–2081.
130. Steger G. Thermal denaturation of double-stranded nucleic acids: prediction of temperatures critical for gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*. 1994. V. 22. P. 2760–2768.
131. Blake R.D., Bizzaro J.W., Blake J.D., Day G.R., Delcourt S.G., Knowles J., Marx K.A., Santa-Lucia J.Jr. Statistical mechanical simulation of polymeric DNA melting with MELTSIM. *Bioinformatics*. 1999. V. 15. P. 370–375.
132. Rasmussen J.P., Saint C.P., Monis P.T. Use of DNA melting simulation software for *in silico* diagnostic assay design: targeting regions with complex melting curves and confirmation by real-time PCR using intercalating dyes. *BMC Bioinformatics*. 2007. V. 8. Article No. 107.
133. Yeramian E., Jones L. GeneFizz: A web tool to compare genetic (coding/non-coding) and physical (helix/coil) segmentations of DNA sequences. Gene discovery and evolutionary perspectives. *Nucleic Acids Research*. 2003. V. 31. P. 3843–3849.
134. Leber M., Kaderali L., Schonhuth A., Schrader R. A fractional programming approach to efficient DNA melting temperature calculation. *Bioinformatics*. 2005. V. 21. P. 2375–2382.
135. Yeramian E. Genes and the physics of the DNA double-helix. *Gene*. 2000. V. 255. P. 139–150.
136. Yeramian E. The physics of DNA and the annotation of the *Plasmodium falciparum* genome. *Gene*. 2000. V. 255. P. 151–168.
137. Gaeta G., Reiss C., Peyrard M., Dauxois T. Simple models of non-linear DNA dynamics. In: *La Rivista del Nuovo Cimento*, Ser. 3. 1994. V. 17. № 4. P. 1–48.
138. Yakushevich L.V. *Nonlinear Physics of DNA*. New York: Wiley, 2nd Edition, 2004. 207 p.
139. Mandal C., Kallenbach N.R., Englander S.W. Base-pair opening and closing reactions in the double helix: A stopped-flow hydrogen exchange study in poly(rA):poly(rU). *Journal of Molecular Biology*. 1979. V. 135. P. 391–411.
140. Englander S.W., Kallenbach N.R., Heeger A.J., Krumhansl J.A., Litwin S. Nature of the open state in long polynucleotide double helices: possibility of soliton excitations. *PNAS USA*. 1980. V. 77. P. 7222–7226.
141. Yomosa S. Soliton excitations in deoxyribonucleic acid (DNA) double helices. *Physical Review A*. 1983. V. 27. P. 2120–2125.
142. Yomosa S. Solitary excitations in deoxyribonucleic acid (DNA) double helices. *Physical Review A*. 1984. V. 30. P. 474–480.
143. Teitelbaum H., Englander S.W. Open states in native polynucleotides: I. Hydrogen-exchange study of adenine-containing double helices. *Journal of Molecular Biology*. 1975. V. 92. P. 55–78.

144. Teitelbaum H., Englander S.W. Open states in native polynucleotides: II. Hydrogen-exchange study of cytosine-containing double helices. *Journal of Molecular Biology*. 1975. V. 92. P. 79–92.
145. Nakanishi M., Tsuboi M. Two channels of hydrogen exchange in a double-helical nucleic acid. *Journal of Molecular Biology*. 1978. V. 124. P. 61–71.
146. Takeno S., Homma S. Topological Solitons and Modulated Structure of Bases in DNA Double Helices – A Dynamic Plane Base-Rotator Model. *Progress of Theoretical Physics*. 1983. V. 70. P. 308–311.
147. Homma S., Takeno S. A Coupled Base-Rotator Model for Structure and Dynamics of DNA – Local Fluctuations in Helical Twist Angles and Topological Solitons. *Progress of Theoretical Physics*. 1984. V. 72. P. 679–693.
148. Zhang C.-T. Soliton excitations in deoxyribonucleic acid (DNA) double helices. *Physical Review A*. 1987. V. 35. P. 886–891.
149. Gao Y., Prohofsky E.W. A modified self-consistent phonon theory of hydrogen bond melting. *The Journal of Chemical Physics*. 1984. V. 80. Article No. 2242.
150. Gao Y., Devi-Prasad K.V., Prohofsky E.W. A self-consistent microscopic theory of hydrogen bond melting with application to poly(dG)-poly(dC). *The Journal of Chemical Physics*. 1984. V. 80. Article No. 6291.
151. Prohofsky E.W. Solitons hiding in DNA and their possible significance in RNA transcription. *Physical Review A*. 1988. V. 38. P. 1538–1541.
152. Peyrard M., Bishop A.R. Statistical Mechanics of a Nonlinear Model for DNA Denaturation. *Physical Review Letters*. 1989. V. 62. P. 2755–2758.
153. Dauxois T., Peyrard M., Bishop A.R. Dynamics and thermodynamics of a nonlinear model for DNA denaturation. *Physical Review E*. 1993. V. 47. P. 684–695.
154. Dauxois T., Peyrard M., Bishop A.R. Entropy-driven DNA denaturation. *Physical Review E*. 1993. V. 47. P. R44–R47.
155. Cule D., Hwa T. Denaturation of Heterogeneous DNA. *Physical Review Letters*. 1997. V. 79. P. 2375–2378.
156. Dauxois T., Peyrard M. Entropy-driven transition in a one-dimensional system. *Physical Review E*. 1995. V. 51. P. 4027–4040.
157. Van Zandt L.L. DNA solitons with realistic parameter values. *Physical Review A*. 1989. V. 40. P. 6134–6137.
158. Techera M., Daemen L.L., Prohofsky E.W. Comment on “DNA solitons with realistic parameters”. *Physical Review A*. 1990. V. 42. P. 5033–5035.
159. Van Zandt L.L. Reply to “Comment on ‘DNA solitons with realistic parameters’”. *Physical Review A*. 1990. V. 42. P. 5036–5039.
160. Drigo-Filho E., Ruggiero J.R. Parameters describing the H-bond in DNA. *Physical Review A*. 1991. V. 44. P. 8435–8436.
161. Banavali N.K., MacKerell A.D.Jr. Free energy and structural pathways of base flipping in a DNA GCGC containing sequence. *Journal of Molecular Biology*. 2002. V. 319. P. 141–160.
162. Giudice E., Varnai P., Lavery R. Base pair opening within B-DNA: free energy pathways for GC and AT pairs from umbrella sampling simulations. *Nucleic Acids Research*. 2003. V. 31. P. 1434–1443.
163. Bouvier B., Grubmuller H. A Molecular Dynamics Study of Slow Base Flipping in DNA using Conformational Flooding. *Biophysical Journal*. 2007. V. 93. P. 770–786.
164. Yakushevich L.V. Nonlinear DNA dynamics: a new model. *Physics Letters A*. 1989. V. 136. P. 413–417.
165. Yakushevich L.V. Is DNA a nonlinear dynamical system where solitary conformational waves are possible? *Journal of Biosciences*. 2001. V. 26. P. 305–313.
166. Yakushevich L.V. Modeling the Internal Mobility of the Molecule of DNA. *International Journal of Quantum Chemistry*. 2002. V. 88. P. 570–578.

167. Yakushevich L.V., Savin A.V., Manevitch L.I. Nonlinear dynamics of topological solitons in DNA. *Physical Review E*. 2002. V. 66. Article No. 016614.
168. Gaeta G. Solitons in the Yakushevich model of DNA beyond the contact approximation. *Physical Review E*. 2006. V. 74. Article No. 021921.
169. Cadoni M., De Leo R., Gaeta G. Composite model for DNA torsion dynamics. *Physical Review E*. 2007. V. 75. Article No. 021919.
170. Daniel M., Vasumathi V. Solitonlike base pair opening in a helicoidal DNA: An analogy with a helimagnet and a cholesteric liquid crystal. *Physical Review E*. 2009. V. 79. Article No. 012901.
171. Cadoni M., De Leo R., Demelio S. Soliton propagation in homogeneous and non-homogeneous models for DNA torsion dynamics. *Journal of Nonlinear Mathematical Physics*. 2011. V. 18. P. 287–319.
172. Якушевич Л.В., Рясик А.А. Динамические характеристики кинков и антикинков ДНК. Компьютерные исследования и моделирование. 2012. Т. 4. № 1. С. 209–217.
173. Barbi M., Cocco S., Peyrard M. Helicoidal model for DNA opening. *Physics Letters A*. 1999. V. 253. P. 358–369.
174. Barbi M., Cocco S., Peyrard M., Ruffo S. A Twist Opening Model for DNA. *Journal of Biological Physics*. 1999. V. 24. P. 97–114.
175. Campa A. Bubble propagation in a helicoidal molecular chain. *Physical Review E*. 2001. V. 63. Article No. 021901.
176. Cocco S., Monasson R. Statistical Mechanics of Torque Induced Denaturation of DNA. *Physical Review Letters*. 1999. V. 83. P. 5178–5181.
177. Cocco S., Monasson R. Theoretical study of collective modes in DNA at ambient temperature. *The Journal of Chemical Physics*. 2000. V. 112. P. 10017–10033.
178. Cocco S., Monasson R., Marko J.F. Force and kinetic barriers to initiation of DNA unzipping. *Physical Review E*. 2002. V. 65. Article No. 041907.
179. Barbi M., Lepri S., Peyrard M., Theodorakopoulos N. Thermal denaturation of a helicoidal DNA model. *Physical Review E*. 2003. V. 68. Article No. 061909.
180. Cocco S., Monasson R., Marko J.F. Force and kinetic barriers to unzipping of the DNA double helix. *PNAS USA*. 2001. V. 98. P. 8608–8613.
181. Drukker K., Wu G., Schatz G.C. Model simulations of DNA denaturation dynamics. *Journal of Chemical Physics*. 2001. V. 114. P. 579–590.
182. Calvo G.F., Alvarez-Estrada R.F. Three-dimensional models for homogeneous DNA near denaturation. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2005. V. 17. P. 7755–7781.
183. Hien D.L., Nhan N.T., Thanh Ngo V., Viet N.A. Simple combined model for nonlinear excitations in DNA. *Physical Review E*. 2007. V. 76. Article No. 021921.
184. Goldman C., Olson W.K. DNA denaturation as a problem of translational-symmetry restoration. *Physical Review E*. 1993. V. 48. P. 1461–1468.
185. Pitici F., Svirschevski S. Effective-phonon theory for DNA melting. *Physical Review A*. 1991. V. 44. P. 8348–8355.
186. Zoli M. Path integral method for DNA denaturation. *Physical Review E*. 2009. V. 79. Article No. 041927.
187. Ares S., Sanchez A. Modelling disorder: the cases of wetting and DNA denaturation. *European Physical Journal B*. 2007. V. 56. P. 253–258.
188. Theodorakopoulos N., Dauxois T., Peyrard M. Order of the Phase Transition in Models of DNA Thermal Denaturation. *Physical Review Letters*. 2000. V. 85. P. 6–9.
189. Zhang Y., Zheng W.-M., Liu J.-X., Chen Y.Z. Theory of DNA melting based on the Peyrard-Bishop model. *Physical Review E*. 1997. V. 56. P. 7100–7115.
190. Joyeux M., Buyukdagli S. Dynamical model based on finite stacking enthalpies for homogeneous and inhomogeneous DNA thermal denaturation. *Physical Review E*. 2005. V. 72. Article No. 051902.

191. Buyukdagli S., Sanrey M., Joyeux M. Towards more realistic dynamical models for DNA secondary structure. *Chemical Physics Letters*. 2006. V. 419. P. 434–438.
192. Radosz A., Ostasiewicz K., Magnuszewski P., Damczyk J., Radosinski L., Kusmartsev F.V., Samson J.H., Mitus A.C., Pawlik G. Thermodynamics of entropy-driven phase transformations. *Physical Review E*. 2006. V. 73. Article No. 026127.
193. Weber G. Sharp DNA denaturation due to solvent interaction. *Europhysics Letters*. 2006. V. 73. P. 806–811.
194. Cuenda S., Sanchez A. On the discrete Peyrard-Bishop model of DNA: Stationary solutions and stability. *CHAOS*. 2006. V. 16. Article No. 023123.
195. Zamora-Sillero E., Shapovalov A.V., Esteban F.J. Formation, control, and dynamics of N localized structures in the Peyrard-Bishop model. *Physical Review E*. 2007. V. 76. Article No. 066603.
196. Slade G.G., Drigo Filho E., Ruggiero J.R. Stability of breathers in simple mechanical models for DNA. *Journal of Physics: Conference Series*. 2010. V. 246. Article No. 012039.
197. Tabi C.B., Ekobena Fouda H.P., Mohamadou A., Kofane T.C. Wave propagation of coupled modes in the DNA double helix. *Physica Scripta*. 2011. V. 83. Article No. 035802.
198. Tabi C.B., Mohamadou A., Kofane T.C. Soliton excitation in the DNA double helix. *Physica Scripta*. 2008. V. 77. Article No. 045002.
199. Tabi C.B., Mohamadou A., Kofane T.C. Modulational instability in the anharmonic Peyrard-Bishop model of DNA. *European Physical Journal B*. 2010. V. 74. P. 151–158.
200. Maniadi P., Alexandrov B.S., Bishop A.R., Rasmussen K.O. Feigenbaum cascade of discrete breathers in a model of DNA. *Physical Review E*. 2011. V. 83. Article No. 011904.
201. Zdravkovic S., Sataric M.V. The Impact of Viscosity on the DNA Dynamics. *Physica Scripta*. 2001. V. 64. P. 612–619.
202. Zdravkovic S., Sataric M.V. Solitonic speed in DNA. *Physical Review E*. 2008. V. 77. Article No. 031906.
203. Cuevas J., Archilla J.F.R., Gaididei Yu.B., Romero F.R. Moving breathers in a DNA model with competing short- and long-range dispersive interactions. *Physica D: Nonlinear Phenomena*. 2002. V. 163. P. 106–126.
204. Larsen P.V., Christiansen P.L., Bang O., Archilla J.F.R., Gaididei Yu.B. Energy funneling in a bent chain of Morse oscillators with long-range coupling. *Physical Review E*. 2004. V. 69. Article No. 026603.
205. Alvarez A., Romero F.R., Archilla J.F.R., Cuevas J., Larsen P.V. Breather trapping and breather transmission in a DNA model with an interface. *European Physical Journal B*. 2006. V. 51. P. 119–130.
206. Forinash K., Keeney J. Nonlinearly coupled double chain systems. *Journal of Biological Physics*. 1991. V. 18. P. 19–29.
207. Alvarez A., Romero F.R., Cuevas J., Archilla J.F.R. Moving breather collisions in Klein-Gordon chains of oscillators. *European Physical Journal B*. 2009. V. 70. P. 543–555.
208. Wattis J.A.D., Harris S.A., Grindon C.R., Laughton C.A. Dynamic model of base pair breathing in a DNA chain with a defect. *Physical Review E*. 2001. V. 63. Article No. 061903.
209. Zolotaryuk A.V., Christiansen P.L., Savin A.V. Two-dimensional dynamics of a free molecular chain with a secondary structure. *Physical Review E*. 1996. V. 54. P. 3881–3894.
210. Muto V., Lomdahl P.S., Christiansen P.L. Two-dimensional discrete model for DNA dynamics: Longitudinal wave propagation and denaturation. *Physical Review A*. 1990. V. 42. P. 7452–7458.

211. Muto V. Soliton Oscillations for DNA Dynamics. *Acta Applicandae Mathematicae*. 2011. V. 15. № 1. P. 5–15.
212. Alexandrov B.S., Wille L.T., Rasmussen K.O., Bishop A.R., Blagoev K.B. Bubble statistics and dynamics in double-stranded DNA. *Physical review E*. 2006. V. 74. Article No. 050901(R).
213. Altan-Bonnet G., Libchaber A., Krichevsky O. Bubble Dynamics in Double-Stranded DNA. *Physical Review Letters*. 2003. V. 90. Article No. 138101.
214. Sobell H.M. Actinomycin and DNA transcription. *PNAS USA*. 1985. V. 82. P. 5328–5331.
215. Cluzel P., Lebrun A., Heller C., Lavery R., Viovy J.L., Chatenay D., Caron F. DNA: an extensible molecule. *Science*. 1996. V. 271. P. 792–794.
216. Techera M., Daemen L.L., Prohofsky E.W. Analysis of a nonlinear model for the DNA double helix: Energy transfer in an inhomogeneous chain. *Physical Review A*. 1990. V. 42. P. 1008–1011.
217. Muto V. Local Denaturation in DNA Molecules. *Journal of Biological Physics*. 1993. V. 19. P. 113–122.
218. Forinash K., Bishop A.R., Lomdahl P.S. Nonlinear dynamics in a double-chain model of DNA. *Physical Review B*. 1991. V. 43. P. 10743–10750.
219. Forinash K., Peyrard M., Malomed B. Interaction of discrete breathers with impurity modes. *Physical Review E*. 1994. V. 49. P. 3400–3411.
220. Chela-Fiores J., Migoni R.L. CG Methylation in DNA Transcription. *International Journal of Theoretical Physics*. 1990. V. 29. P. 853–862.
221. Campa A., Giansanti A. Experimental tests of the Peyrard-Bishop model applied to the melting of very short DNA chains. *Physical Review E*. 1998. V. 58. P. 3585–3588.
222. Lavery R., Lebrun A., Allemand J.-F., Bensimon D., Croquette V. Structure and mechanics of single biomolecules: experiment and simulation. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2002. V. 14. P. R383–R414.
223. Bustamante C., Smith S.B., Liphardt J., Smith D. Single-molecule studies of DNA mechanics. *Current Opinion in Structural Biology*. 2000. V. 10. P. 279–285.
224. Smith S.B., Finzi L., Bustamante C. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*. 1992. V. 258. P. 1122–1126.
225. Bustamante C., Marko J.F., Siggia E.D., Smith S. Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science*. 1994. V. 265. P. 1599–600.
226. Smith S.B., Cui Y., Bustamante C. Overstretching B-DNA: The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules. *Science*. 1996. V. 271. P. 795–799.
227. Allemand J.F., Bensimon D., Lavery R., Croquette V. Stretched and overwound DNA forms a Pauling-like structure with exposed bases. *PNAS USA*. 1998. V. 95. P. 14152–14157.
228. Clausen-Schaumann H., Rief M., Tolksdorf C., Gaub H.E. Mechanical Stability of Single DNA Molecules. *Biophysical Journal*. 2000. V. 78. P. 1997–2007.
229. Rief M., Clausen-Schaumann H., Gaub H.E. Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nature Structural Biology*. 1999. V. 6. P. 346–349.
230. Bockelmann U., Essevaz-Roulet B., Heslot F. Molecular Stick-Slip Motion Revealed by Opening DNA with Piconewton Forces. *Physical Review Letters*. 1997. V. 79. P. 4489–4492.
231. Essevaz-Roulet B., Bockelmann U., Heslot F. Mechanical separation of the complementary strands of DNA. *PNAS USA*. 1997. V. 94. P. 11935–11940.
232. Bockelmann U., Thomen Ph., Essevaz-Roulet B., Viasnoff V., Heslot F. Unzipping DNA with Optical Tweezers: High Sequence Sensitivity and Force Flips. *Biophysical Journal*. 2002. V. 82. P. 1537–1553.

233. Bockelmann U., Viasnoff V. Theoretical Study of Sequence-Dependent Nanopore Unzipping of DNA. *Biophysical Journal*. 2008. V. 94. P. 2716–2724.
234. Benham C.J. Theoretical analysis of heteropolymeric transitions in superhelical DNA molecules of specified sequence. *The Journal of Chemical Physics*. 1990. V. 92. P. 6294–6305.
235. Benham C.J. Sites of predicted stress-induced DNA duplex destabilization occur preferentially at regulatory loci. *PNAS USA*. 1993. V. 90. P. 2999–3003.
236. Benham C.J. Duplex destabilization in superhelical DNA is predicted to occur at specific transcriptional regulatory regions. *Journal of Molecular Biology*. 1996. V. 255. P. 425–434.
237. Fye R.M., Benham C.J. Exact method for numerically analyzing a model of local denaturation in superhelically stressed DNA. *Physical Review E*. 1999. V. 59. P. 3408–3426.
238. Rudnick J., Bruinsma R. Effects of torsional strain on thermal denaturation of DNA. *Physical Review E*. 2002. V. 65. Article No. 030902(R).
239. Hwa T., Marinari E., Sneppen K., Tang L.H. Localization of denaturation bubbles in random DNA sequences. *PNAS USA*. 2003. V. 100. P. 4411–4416.
240. Michoel T., Van de Peer Y. Helicoidal transfer matrix model for inhomogeneous DNA melting. *Physical Review E*. 2006. V. 73. Article No. 011908.
241. Nelson P. Transport of torsional stress in DNA. *PNAS USA*. 1999. V. 96. P. 14342–14347.
242. Benham C.J., Singh R.R.P. Comment on “Can One Predict DNA Transcription Start Sites by Studying Bubbles?”. *Physical Review Letters*. 2006. V. 97. P. 059801.
243. Benham C., Kohwi-Shigematsu T., Bode J. Stress-induced Duplex DNA Destabilization in Scaffold/Matrix Attachment Regions. *Journal of Molecular Biology*. 1997. V. 274. P. 181–196.
244. Wang H., Benham C.J. Promoter prediction and annotation of microbial genomes based on DNA sequence and structural responses to superhelical stress. *BMC Bioinformatics*. 2006. V. 7. Article No. 248.
245. Trovato F., Tozzini V. Supercoiling and Local Denaturation of Plasmids with a Minimalist DNA Model. *Journal of Physical Chemistry B*. 2008. V. 112. P. 13197–13200.
246. Kumar S., Li M.S. Biomolecules under mechanical force. *Physics Reports*. 2010. V. 486. P. 1–74.
247. Marenduzzo D., Bhattacharjee S.M., Maritan A., Orlandini E., Seno F. Dynamical Scaling of the DNA Unzipping Transition. *Physical Review Letters*. 2002. V. 88. Article No. 028102.
248. Kapri R., Bhattacharjee S.M., Seno F. Complete Phase Diagram of DNA Unzipping: Eye, Y-Fork, and Triple Point. *Physical Review Letters*. 2004. V. 93. Article No. 248102.
249. Kumar S., Giri D., Bhattacharjee S.M. Force induced triple point for interacting polymers. *Physical Review E*. 2005. V. 71. Article No. 051804.
250. Giri D., Kumar S. Effects of the eye phase in DNA unzipping. *Physical Review E*. 2006. V. 73. Article No. 050903(R).
251. Kumar S., Giri D. Probability distribution analysis of force induced unzipping of DNA. *The Journal of Chemical Physics*. 2006. V. 125. Article No. 044905.
252. Singh A.R., Giri D., Kumar S. Force induced melting of the constrained DNA. *The Journal of Chemical Physics*. 2010. V. 32. Article No. 235105.
253. Lubensky D.K., Nelson D.R. Pulling Pinned Polymers and Unzipping DNA. *Physical Review Letters*. 2000. V. 85. P. 1572–1575.
254. Lubensky D.K., Nelson D.R. Single molecule statistics and the polynucleotide unzipping transition. *Physical Review E*. 2002. V. 65. Article No. 031917.

255. Thompson R.E., Siggia E.D. Physical limits on the mechanical measurement of the secondary structure of biomolecules. *Europhysics Letters*. 1995. V. 31. P. 335–340.
256. Viovy J.L., Heller C., Caron F., Cluzel P., Chatenay D. Sequencing of DNA by mechanical opening of the double helix: a theoretical evaluation. *Comptes rendus de l'Academie des sciences Paris (Life Sciences)*. 1994. V. 317. P. 795–800.
257. Peyrard M. Using DNA to probe nonlinear localized excitations? *Europhysics Letters*. 1998. V. 44. P. 271–277.
258. Krautbauer R., Rief M., Gaub H.E. Unzipping DNA Oligomers. *Nano Letters*. 2003. V. 3. P. 493–496.
259. Singh N., Singh Y. Statistical theory of force-induced unzipping of DNA. *European Physical Journal E*. 2005. V. 17. P. 7–19.
260. Voulgarakis N.K., Redondo A., Bishop A.R., Rasmussen K.O. Probing the Mechanical Unzipping of DNA. *Physical Review Letters*. 2006. V. 96. Article No. 248101.
261. Zeng Y., Montrichok A., Zocchi G. Bubble nucleation and cooperativity in DNA melting. *Journal of Molecular Biology*. 2004. V. 339. P. 67–75.
262. Ares S., Voulgarakis N.K., Rasmussen K.O., Bishop A.R. Bubble Nucleation and Cooperativity in DNA Melting. *Physical Review Letters*. 2005. V. 94. Article No. 035504.
263. Metropolis N., Rosenbluth A.W., Rosenbluth M.N., Teller A.H., Teller E. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *The Journal of Chemical Physics*. 1953. V. 21. P. 1087–1092.
264. van Erp T.S., Cuesta-Lopez S., Peyrard M. Bubbles and denaturation in DNA. *European Physical Journal E*. 2006. V. 20. P. 421–434.
265. van Erp T.S., Cuesta-Lopez S., Hagmann J.-G., Peyrard M. Can One Predict DNA Transcription Start Sites by Studying Bubbles? *Physical Review Letters*. 2005. V. 95. Article No. 218104.
266. Wiegand R.C., Godson G.N., Radding C.N. Specificity of the S₁ Nuclease from *Aspergillus oryzae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1975. V. 250. P. 8848–8855.
267. Rapti Z., Smerzi A., Rasmussen K.O., Bishop A.R., Choi C.H., Usheva A. Lengthscales and cooperativity in DNA bubble formation. *Europhysics Letters*. 2006. V. 74. P. 540–546.
268. Rapti Z., Smerzi A., Rasmussen K.O., Bishop A.R. Healing length and bubble formation in DNA. *Physical Review E*. 2006. V. 73. Article No. 051902.
269. Choi C.H., Rapti Z., Gelev V., Hacker M.R., Alexandrov B., Park E.J., Park J.S., Horikoshi N., Smerzi A., Rasmussen K.O., Bishop A.R., Usheva A. Profiling the Thermodynamic Softness of Adenoviral Promoters. *Biophysical Journal*. 2008. V. 95. P. 597–608.
270. Liu F., Tostesen E., Sundet J.K., Jenssen T.-K., Bock C., Jerstad G.I., Thilly W.G., Hovig E. The Human Genomic Melting Map. *PLoS Computational Biology*. 2007. V. 3. Iss. 5. P. 0874–0886.
271. Abeel T., Saeys Y., Bonnet E., Rouze P., Van de Peer Y. Generic eukaryotic core promoter prediction using structural features of DNA. *Genome Research*. 2008. V. 18. P. 310–323.
272. Kantorovitz M.R., Rapti Z., Gelev V., Usheva A. Computing DNA duplex instability profiles efficiently with a two-state model: trends of promoters and binding sites. *BMC Bioinformatics*. 2010. V. 11. Article No. 604.
273. Alexandrov B.S., Gelev V., Yoo S.W., Bishop A.R., Rasmussen K.O., Usheva A. Toward a Detailed Description of the Thermally Induced Dynamics of the Core Promoter. *PLoS Computational Biology*. 2009. V. 5. P. 1–10.
274. Alexandrov B.S., Gelev V., Monisova Y., Alexandrov L.B., Bishop A.R., Rasmussen K.O., Usheva A. A nonlinear dynamic model of DNA with a sequence-dependent stacking term. *Nucleic Acids Research*. 2009. V. 37. P. 2405–2410.

275. Alexandrov B.S., Gelev V., Yoo S.W., Alexandrov L.B., Fukuyo Y., Bishop A.R., Rasmussen K.O., Usheva A. DNA dynamics play a role as a basal transcription factor in the positioning and regulation of gene transcription initiation. *Nucleic Acids Research*. 2010. V. 38. P. 1790–1795.
276. Alexandrov B.S., Valtchinov V.I., Alexandrov L.B., Gelev V., Dagon Y., Bock J., Kohane I.S., Rasmussen K.O., Bishop A.R., Usheva A. DNA Dynamics Is Likely to Be a Factor in the Genomic Nucleotide Repeats Expansions Related to Diseases. *PLoS One*. 2011. V. 6. P. 1–6.
277. Dornberger U., Leijon M., Fritzsche H. High Base Pair Opening Rates in Tracts of GC Base Pairs. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999. V. 274. P. 6957–6962.
278. Maiti S., Haupts U., Webb W.W. Fluorescence correlation spectroscopy: Diagnostics for sparse molecules. *PNAS USA*. 1997. V. 94. P. 11753–11757.
279. Bonnet G., Krichevsky O., Libchaber A. Kinetics of conformational fluctuations in DNA hairpin-loops. *PNAS USA*. 1998. V. 95. P. 8602–8606.
280. Krueger A., Protozanova E., Frank-Kamenetskii M.D. Sequence-dependent base pair opening in DNA double helix. *Biophysical Journal*. 2006. V. 90. P. 3091–3099.
281. Gueron M., Kochoyan M., Leroy J.L. A single mode of DNA base-pair opening drives imino proton exchange. *Nature*. 1987. V. 328. P. 89–92.
282. Kochoyan M., Leroy J.L., Gueron M. Proton Exchange and Base-pair Lifetimes in a Deoxy-duplex Containing a Purine-Pyrimidine Step and in the Duplex of Inverse Sequence. *Journal of Molecular Biology*. 1987. V. 196. P. 599–609.
283. Leroy J.L., Kochoyan M., Huynh-Dinh T., Gueron M. Characterization of base-pair opening in deoxynucleotide duplexes using catalyzed exchange of the imino proton. *Journal of Molecular Biology*. 1988. V. 200. P. 223–238.
284. Kochoyan M., Lancelot G., Leroy J.L. Study of structure, base-pair opening kinetics and proton exchange mechanism of the d(AATTGCAATT) self-complementary oligodeoxynucleotide in solution. *Nucleic Acids Research*. 1988. V. 16. P. 7685–7702.
285. Moe J.G., Russu I.M. Proton exchange and base-pair opening kinetics in 5'-d(CGCGAATTCGCG)-3' and related dodecamers. *Nucleic Acids Research*. 1990. V. 18. P. 821–827.
286. Leroy J.L., Gao X.L., Gueron M., Patel D.J. Proton exchange and internal motions in two chromomycin dimer-DNA oligomer complexes. *Biochemistry*. 1991. V. 30. P. 5653–5661.
287. David S.S., Williams S.D. Chemistry of glycosylases and endonucleases involved in base-excision repair. *Chemical Reviews*. 1998. V. 98. P. 1221–1262.
288. Stivers J.T. Site-Specific DNA Damage Recognition by Enzyme-Induced Base Flipping. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 2004. V. 77. P. 37–65.
289. Klimasauskas S., Kumar S., Roberts R.J., Cheng X. HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell*. 1994. V. 76. P. 57–69.
290. Reinisch K.M., Chen L., Verdine G.L., Lipscomb W.N. The crystal structure of HaeIII methyltransferase covalently complexed to DNA: an extrahelical cytosine and rearranged base pairing. *Cell*. 1995. V. 82. P. 143–153.
291. Cheng X., Roberts R.J. AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. *Nucleic Acids Research*. 2001. V. 29. P. 3784–3795.
292. Lau A.Y., Wyatt M.D., Glassner B.J., Samson L.D., Ellenberger T. Molecular basis for discriminating between normal and damaged bases by the human alkyladenine glycosylase, AAG. *PNAS USA*. 2000. V. 97. P. 13573–13578.
293. Hollis T., Ichikawa Y., Ellenberger T. DNA bending and a flip-out mechanism for base excision by the helix-hairpin-helix DNA glycosylase, *Escherichia coli* AlkA. *EMBO Journal*. 2000. V. 19. P. 758–766.
294. Fromme J.C., Verdine G.L. DNA Lesion Recognition by the Bacterial Repair Enzyme MutM. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003. V. 278. P. 51543–51548.

295. Lyakhov I.G., Hengen P.N., Rubens D., Schneider T.D. The P1 phage replication protein RepA contacts an otherwise inaccessible thymine N3 proton by DNA distortion or base flipping. *Nucleic Acids Research*. 2001. V. 29. P. 4892–4900.
296. Schneider T.D. Strong minor groove base conservation in sequence logos implies DNA distortion or base flipping during replication and transcription initiation. *Nucleic Acids Research*. 2001. V. 29. P. 4881–4891.
297. Gueron M., Leroy J.L. Studies of base pair kinetics by NMR measurement of proton exchange. *Methods in Enzymology*. 1995. V. 261. P. 383–413.
298. Crothers D.M., Cole P.E., Hilbers C.W., Shulman R.G. The molecular mechanism of thermal unfolding of *Escherichia coli* formylmethionine transfer RNA. *Journal of Molecular Biology*. 1974. V. 87. P. 63–72.
299. Warmlander S., Sen A., Leijon M. Imino proton exchange in DNA catalyzed by ammonia and trimethylamine: evidence for a secondary long-lived open state of the base pair. *Biochemistry*. 2000. V. 39. P. 607–615.
300. Folta-Stogniew E., Russu I.M. Base-catalysis of imino proton exchange in DNA: effects of catalyst upon DNA structure and dynamics. *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 8439–8449.
301. Leijon M., Leroy J.L. Internal motions of nucleic acid structures and the determination of base-pair lifetimes. *Biochimie*. 1997. V. 79. P. 775–779.
302. Forsen S., Hoffman R.A. Study of Moderately Rapid Chemical Exchange Reactions by Means of Nuclear Magnetic Double Resonance. *The Journal of Chemical Physics*. 1963. V. 39. P. 2892–2901.
303. Mihailescu M.R., Russu I.M. A signature of the T → R transition in human hemoglobin. *PNAS USA*. 2001. V. 98. P. 3773–3777.
304. Snoussi K., Leroy J.L. Imino proton exchange and base-pair kinetics in RNA duplexes. *Biochemistry*. 2001. V. 31. P. 8898–8904.
305. Snoussi K., Leroy J.L. Alteration of A.T base-pair opening kinetics by the ammonium cation in DNA A-tracts. *Biochemistry*. 2002. V. 41. P. 12467–12474.
306. Varnai P., Canalia M., Leroy J.L. Opening mechanism of G.T/U pairs in DNA and RNA duplexes: a combined study of imino proton exchange and molecular dynamics simulation. *Journal of American Chemical Society*. 2004. V. 126. P. 14659–14667.
307. Chen C., Russu I.M. Sequence-dependence of the energetics of opening of at basepairs in DNA. *Biophysical Journal*. 2004. V. 87. P. 2545–2551.
308. Englander S.W. A Hydrogen Exchange Method Using Tritium and Sephadex: Its Application to Ribonuclease. *Biochemistry*. 1963. V. 2. P. 798–807.
309. Printz M.P., von Hippel P.H. Hydrogen Exchange Studies of DNA Structure. *PNAS USA*. 1965. V. 53. P. 363–370.
310. Williams M.N., Crothers D.M. Binding kinetics of mercury(II) to polyribonucleotides. *Biochemistry*. 1975. V. 14. P. 1944–1951.
311. Wilcoxon J., Schurr J.M. Temperature dependence of the dynamic light scattering of linear phi29 DNA: Implications for spontaneous opening of the double helix. *Biopolymers*. 1983. V. 22. P. 2273–2321.
312. Frank-Kamenetskii M.D. Fluctuational Motility of DNA. In: *Structure and Motion: Membranes, Nucleic Acids and Proteins*. Eds.: Clemeti E., Corongiu G., Sarma M.H., Sarma R.H. Guilderland: Adenine Press, 1985. P. 417–422.
313. Leroy J.-L., Broseta D., Gueron M. Proton exchange and base-pair kinetics of poly(rA):poly(rU) and poly(rI):poly(rC). *Journal of Molecular Biology*. V. 184. P. 165–178.
314. Leroy J.L., Bolo N., Figueroa N., Plateau P., Gueron M. Internal motions of transfer RNA: a study of exchanging protons by magnetic resonance. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 1985. V. 2. P. 915–939.

315. Kochoyan M., Leroy J.L., Gueron M. Processes of base-pair opening and proton exchange in Z-DNA. *Biochemistry*. 1990. V. 29. P. 4799–4805.
316. Leijon M., Graslund A. Effects of sequence and length on imino proton exchange and base pair opening kinetics in DNA oligonucleotide duplexes. *Nucleic Acids Research*. 1992. V. 20. P. 5339–5343.
317. Nonin S., Leroy J.L., Gueron M. Terminal base pairs of oligodeoxynucleotides: imino proton exchange and fraying. *Biochemistry*. 1995. V. 34. P. 10652–10659.
318. Moe J.G., Russu I.M. Kinetics and energetics of base-pair opening in 5'-d(CGCGAATTCGCG)-3' and a substituted dodecamer containing G.T mismatches. *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 8421–8428.
319. Coman D., Russu I.M. Base pair opening in three DNA-unwinding elements. *Journal of Biological Chemistry*. 2005. V. 280. P. 20216–20221.
320. Leroy J.L., Charretier E., Kochoyan M., Gueron M. Evidence from base-pair kinetics for two types of adenine tract structures in solution: their relation to DNA curvature. *Biochemistry*. 1988. V. 27. P. 8894–8898.
321. Yoon C., Prive G.G., Goodsell D.S., Dickerson R.E. Structure of an alternating-B DNA helix and its relationship to A-tract DNA. *PNAS USA*. 1988. V. 85. P. 6332–6336.
322. Edwards K.J., Brown D.G., Spink N., Skelly J.V., Neidle S. Molecular structure of the B-DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG)₂. An examination of propeller twist and minor-groove water structure at 2.2 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 1992. V. 226. P. 1161–1173.
323. Shatzky-Schwartz M., Arbuckle N.D., Eisenstein M., Rabinovich D., Bareket-Samish A., Haran T.E., Luisi B.F., Shakked Z. X-ray and solution studies of DNA oligomers and implications for the structural basis of A-tract-dependent curvature. *Journal of Molecular Biology*. 1997. V. 267. P. 595–623.
324. Leijon M., Zdunek J., Fritzsche H., Sklenar H., Graslund A. NMR studies and restrained-molecular-dynamics calculations of a long A+T-rich stretch in DNA. Effects of phosphate charge and solvent approximations. *European Journal of Biochemistry*. 1995. V. 234. P. 832–842.
325. Warmlander S., Sponer J.E., Sponer J., Leijon M. The influence of the thymine C5 methyl group on spontaneous base pair breathing in DNA. *Journal of Biological Chemistry*. 2002. V. 277. P. 28491–28497.
326. Movileanu L., Benevides J.M., Thomas G.J.Jr. Determination of base and backbone contributions to the thermodynamics of premelting and melting transitions in B DNA. *Nucleic Acids Research*. 2002. V. 30. P. 3767–3777.
327. Dornberger U., Spackova N., Walter A., Gollmick F.A., Sponer J., Fritzsche H. Solution structure of the dodecamer d-(CATGGGCC-CATG)₂ is B-DNA. Experimental and molecular dynamics study. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. 2001. V. 19. P. 159–174.
328. Денисов Е.Т. *Кинетика гомогенных химических реакций*. Москва: Высшая школа, 1978. 139 с.
329. Leijon M., Sehlstedt U., Nielsen P.E., Graslund A. Unique base-pair breathing dynamics in PNA-DNA hybrids. *Journal of Molecular Biology*. 1997. V. 271. P. 438–455.
330. Moe J.G., Folta-Stogniew E., Russu I.M. Energetics of base pair opening in a DNA dodecamer containing an A₃T₃ tract. *Nucleic Acids Research*. 1995. V. 23. P. 1984–1989.
331. Coman D., Russu I.M. A nuclear magnetic resonance investigation of the energetics of basepair opening pathways in DNA. *Biophysical Journal*. 2005. V. 89. P. 3285–3292.
332. Goddard N.L., Bonnet G., Krichevsky O., Libchaber A. Sequence Dependent Rigidity of Single Stranded DNA. *Physical Review Letters*. 2000. V. 85. P. 2400–2403.
333. Movileanu L., Benevides J.M., Thomas G.I.Jr. Temperature Dependence of the Raman Spectrum of DNA. II. Raman Signatures of Premelting and Melting Transitions of

- Poly(dA)-Poly(dT) and Comparison with Poly(dA-dT)-Poly(dA-dT). *Biopolymers*. 2002. V. 63. P. 181–194.
334. Peyrard M., Cuesta-Lopez S., Angelov D. Experimental and theoretical studies of sequence effects on the fluctuation and melting of short DNA molecules. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2009. V. 21. № 3. Article No. 034103.
335. Freier S.M., Hill K.O., Dewey T.G., Marky L.A., Breslauer K.J., Turner D.H. Solvent effects on the kinetics and thermodynamics of stacking in poly(cytidylic acid). *Biochemistry*. 1981. V. 20. P. 1419–1426.
336. Gueron M., Shulman R.G., Eisinger J. Energy transfer in dinucleotides. *PNAS USA*. 1966. V. 56. P. 814–818.
337. Warshaw M.M., Tinoco I.Jr. Absorption and optical rotatory dispersion of six dinucleoside phosphates. *Journal of Molecular Biology*. 1965. V. 13. P. 54–64.
338. Leng M., Felsenfeld G. A study of polyadenylic acid at neutral pH. *Journal of Molecular Biology*. 1966. V. 15. P. 455–466.
339. Brahm J., Michelson A.M., Van Holde K.E. Adenylate Oligomers in Single- and Double-strand Conformation. *Journal of Molecular Biology*. 1966. V. 15. P. 467–488.
340. Adler A., Grossman L., Fasman G.D. Single-stranded oligomers and polymers of cytidylic and 2'-deoxycytidylic acids: comparative optical rotatory studies. *PNAS USA*. 1967. V. 57. P. 423–430.
341. Vesnaver G., Breslauer K.J. The contribution of DNA single-stranded order to the thermodynamics of duplex formation. *PNAS USA*. 1991. V. 88. P. 3569–3573.
342. Holbrook J.A., Capp M.W., Saecker R.M., Record M.T.Jr. Enthalpy and heat capacity changes for formation of an oligomeric DNA duplex: interpretation in terms of coupled processes of formation and association of single-stranded helices. *Biochemistry*. 1999. V. 38. P. 8409–8422.
343. Zhou J., Gregurick S.K., Krueger S., Schwarz F.P. Conformational Changes in Single-Strand DNA as a Function of Temperature by SANS. *Biophysical Journal*. 2006. V. 90. P. 544–551.
344. Mills J.B., Vacano E., Hagerman P.J. Flexibility of single-stranded DNA: use of gapped duplex helices to determine the persistence lengths of Poly(dT) and Poly(dA). *Journal of Molecular Biology*. 1999. V. 285. P. 245–257.
345. Benight A.S., Wartell R.M., Howell D.K. Theory agrees with experimental thermal denaturation of short DNA restriction fragments. *Nature*. 1981. V. 289. P. 203–205.
346. Tibanyenda N., De Bruin S.H., Haasnoot C.A., van der Marel G.A., van Boom J.H., Hilbers C.W. The effect of single base-pair mismatches on the duplex stability of d(T-A-T-T-A-A-T-A-T-C-A-A-G-T-T-G):d(C-A-A-C-T-T-G-A-T-A-T-T-A-A-T-A). *European Journal of Biochemistry*. 1984. V. 139. P. 19–27.
347. Cuesta-Lopez S., Menoni H., Angelov D., Peyrard M. Guanine radical chemistry reveals the effect of thermal fluctuations in gene promoter regions. *Nucleic Acids Research*. 2011. V. 39. P. 5276–5283.
348. Coll M., Frederick C.A., Wang A.H., Rich A. A bifurcated hydrogen-bonded conformation in the d(A.T) base pairs of the DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG)₂ and its complex with distamycin. *PNAS USA*. 1987. V. 84. P. 8385–8389.
349. Ting J.J.-L., Peyrard M. Effective breather trapping mechanism for DNA transcription. *Physical Review E*. 1996. V. 53. P. 1011–1020.
350. Ares S., Kalosakas G. Distribution of Bubble Lengths in DNA. *Nano Letters*. 2007. V. 7. P. 307–311.
351. Кричевский О.М.: [Личное сообщение, 6.11.2012].
352. Padro J.A., Saiz L., Guardia E. Hydrogen bonding in liquid alcohols: a computer simulation study. *Journal of Molecular Structure*. 1997. V. 416. P. 243–248.
353. Guardia E., Marti J., Padro J.A., Saiz L., Komolkin A.V. Dynamics in hydrogen bonded liquids: water and alcohols. *Journal of Molecular Liquids*. 2002. V. 96–97. P. 3–17.

354. Breslauer K.J., Frank R., Blocker H., Marky L.A. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *PNAS USA*. 1986. V. 83. P. 3746–3750.
355. Nonin S., Leroy J.L., Gueron M. Acid-induced exchange of the imino proton in G.C pairs. *Nucleic Acids Research*. 1996. V. 24. P. 586–595.
356. Nakahara M., Wakai C. Inertial and attractive potential effects on rotation of solitary water molecules in apolar and polar solvents. *The Journal of Chemical Physics*. 1992. V. 97. Article No. 4413.
357. Every A.E., Russu I.M. Probing the Role of Hydrogen Bonds in the Stability of Base Pairs in Double-Helical DNA. *Biopolymers*. 2007. V. 87. P. 165–173.
358. Fixman M., Friere J. Theory of DNA melting curves. *Biopolymers*. 1977. V. 16. P. 2693–2704.
359. Poland D. Recursion Relation Generation of Probability Profiles for Specific-Sequence Macromolecules with Long-Range Correlations. *Biopolymers*. 1974. V. 13. P. 1859–1871.
360. Gotoh O., Tagashira Y. Stabilities of Nearest-Neighbor Doublets in Double-Helical DNA Determined by Fitting Calculated Melting Profiles to Observed Profiles. *Biopolymers*. 1981. V. 20. P. 1033–1042.
361. Gordan R., Hartemink A.J. Using DNA duplex stability information for transcription factor binding site discovery. *Pacific Symposium on Biocomputing*. 2008. V. 13. P. 453–464.
362. Klump H., Ackermann T. Experimental thermodynamics of the helix-random coil transition. IV. Influence of the base composition of DNA on the transition enthalpy. *Biopolymers*. 1971. V. 10. P. 513–522.
363. Marky L.A., Breslauer K.J. Calorimetric determination of base-stacking enthalpies in double-helical DNA molecules. *Biopolymers*. 1982. V. 21. P. 2185–2194.
364. Chaplin M. *Water Clusters: Overview*. URL: <http://www.lsbu.ac.uk/water/abstract.html> (дата обращения: 21.10.2013).
365. Клячко Н.Л. Ферменты - биологические катализаторы: основные принципы действия. *Соросовский образовательный журнал*. 1997. № 3. С. 58–63.
366. Banerjee A., Sobell H.M. Presence of nonlinear excitations in DNA structure and their relationship to DNA premelting and to drug intercalation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 1983. V. 1. P. 253–262.
367. de los Santos F., Al Hammal O., Munoz M.A. Simplified Langevin approach to the Peyrard-Bishop-Dauxois model of DNA. *Physical Review E*. 2008. V. 77. Article No. 032901.
368. Beveridge D.L., Barreiro G., Byun K.S., Case D.A., Cheatham T.E. 3rd, Dixit S.B., Giudice E., Lankas F., Lavery R., Maddocks J.H., Osman R., Seibert E., Sklenar H., Stoll G., Thayer K.M., Varnai P., Young M.A. Molecular Dynamics Simulations of the 136 Unique Tetranucleotide Sequences of DNA Oligonucleotides. I. Research Design and Results on d(CpG) Steps. *Biophysical Journal*. 2004. V. 87. P. 3799–3813.
369. Dixit S.B., Beveridge D.L., Case D.A., Cheatham T.E. 3rd, Giudice E., Lankas F., Lavery R., Maddocks J.H., Osman R., Sklenar H., Thayer K.M., Varnai P. Molecular Dynamics Simulations of the 136 Unique Tetranucleotide Sequences of DNA Oligonucleotides. II: Sequence Context Effects on the Dynamical Structures of the 10 Unique Dinucleotide Steps. *Biophysical Journal*. 2005. V. 89. P. 3721–3740.

Материал поступил в редакцию 22.10.2013, опубликован 11.12.2013.