

## РАВНОВЕСНАЯ АДСОРБЦИЯ ЛИГАНДОВ НА ДНК (НА ПРИМЕРЕ ХИТОЗАНА)

Ю. Д. Нечипуренко<sup>ad\*</sup>, А. М. Вольф<sup>ac</sup>, В. И. Салянов<sup>ad</sup>, Ю. М. Евдокимов<sup>ad</sup>

<sup>a</sup> *Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук  
119991, Москва, Россия*

<sup>b</sup> *Физический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова  
119899, Москва, Россия*

<sup>c</sup> *Университет им. Гумбольта  
10099, Берлин, Германия*

<sup>d</sup> *Компания «Биоаналитические технологии»  
117049, Москва, Россия*

Поступила в редакцию 18 июля 2003 г.

Связывание лигандов с молекулами ДНК в растворе характеризуется функцией распределения, задающей вероятность того, что на одной молекуле ДНК адсорбировано определенное число лигандов. В результате связывания с поликатионами жесткие линейные двухцепочечные молекулы ДНК, отрицательные заряды фосфатных групп которых нейтрализованы зарядами лиганда, претерпевают фазовый переход. На примере связывания хитозана с ДНК проведен анализ экспериментальных данных с учетом предположения о том, что связывание обусловлено процессом равновесной адсорбции. Если число адсорбированных молекул хитозана превышает некоторую критическую величину, то молекула ДНК, покрытая хитозаном, становится способной к взаимодействию с такими же молекулами ДНК. В результате такого взаимодействия (притяжения) формируются частицы жидкокристаллической дисперсии (ЖКД). Показано, что при определенных параметрах модели удастся описать ряд экспериментальных данных, характеризующих образование холестерических ЖКД. Анализ данных позволяет восстановить как размер места, которое занимает одна аминокислотная единица хитозана на ДНК, так и энергию взаимодействия такой единицы с ДНК.

PACS: 05.70.Jk, 68.43.De, 82.35.Rs, 87.14.Gg

### 1. ВВЕДЕНИЕ

Равновесное связывание молекул лигандов с линейными полимерами в растворах рассматривается как ленгмюровская адсорбция: линейный полимер представляет собой одномерную матрицу — решетку реакционных центров, лиганд адсорбируется на реакционных центрах матрицы. Основы такого рассмотрения заложены в работах Хилла [1, 2], Маги, Гиббса и Брэгга [3]. Эта проблема привлекает внимание широкого круга исследователей; вышло несколько десятков работ, где развиты модели адсорбции и получены соотношения, описывающие связывание

биологически активных лигандов с матрицами ДНК (см., например, [4–13]).

Обычно лиганд при связывании «покрывает» несколько пар оснований ДНК, делая их недоступными для связывания других молекул лиганда. Поведение адсорбированных лигандов с физической точки зрения соответствует поведению решеточно-го газа с исключенным объемом.

Наиболее полно и детально описывает связывание лигандов с ДНК функция распределения, которая задает вероятность обнаружить в растворе молекулу ДНК с определенным числом адсорбированных лигандов. Такая функция введена в работах Рейтера и Эпштейна [14, 15] для описания связывания протяженных лигандов с ДНК. В работе Йова-

\*E-mail: nech@smt.p.ru

новича и Нечипуренко [16] эта функция была применена для анализа расположения лигандов на молекулах ДНК. В работах Полаанда [17, 18] подробно рассмотрено применение такой функции к описанию связывания разных лигандов с макромолекулами.

В данной работе мы применили эту функцию для описания процессов, при которых некооперативная «критическая нейтрализация» фосфатов ДНК лигандами, несущими положительно заряженные группы, приводит к конденсации ДНК. Конденсированная форма двухцепочечной ДНК привлекает внимание исследователей в качестве модели, описывающей некоторые особенности состояния этих молекул в таких биологических объектах, как вирусы, хромосомы простейших и т. д. [19].

Известны два способа конденсации двухцепочечных молекул нуклеиновых кислот (НК).

1) «Энтропийная конденсация», т. е. процесс, в котором движущей силой является изменение энтропии системы. Такая конденсация реализуется при исключении молекул НК (или сегментов одной и той же молекулы НК высокой молекулярной массы) из водно-полимерных или из водно-солевых растворов [20, 21]. Следует отметить, что в случае исключения из водно-полимерных растворов молекулы полимера не входят в состав образующейся фазы НК. Процесс фазового исключения НК с достаточной точностью описывается в рамках теории Флори (см., например, [20]).

2) «Энтальпийная конденсация», т. е. процесс, в котором движущей силой является притяжение между соседними молекулами НК (сегментами одной и той же молекулы). Силы притяжения имеют преимущественно электростатическую природу, включая лондоновское дисперсионное взаимодействие и взаимодействие типа диполь-наведенный диполь. Эти силы довольно слабы на больших расстояниях, но быстро нарастают при сближении молекул НК, причем энергия взаимодействия меняется приблизительно как  $1/R^5$  [21]. Очевидно, что когда плотность поверхностного заряда молекул НК понижается в достаточной степени (за счет нейтрализации отрицательно заряженных фосфатных групп НК группами поликатиона), дисперсионные силы уравнивают, а затем и превышают электростатическое отталкивание соседних молекул НК, что приводит к конденсации НК.

Заметим, что в случае высокомолекулярных НК конденсация — это внутримолекулярный процесс (компактизация, глобулизация), в случае низкомолекулярных НК — межмолекулярный процесс.

В случае «энтальпийной конденсации» возмож-

ны два сценария процесса: а) нейтрализация отрицательных зарядов фосфатных групп НК при помощи поликатионов и притяжение соседних молекул комплексов (НК-поликатион); б) образование поликатионных «сшивков» между соседними молекулами НК, определяющих эффективность сближения соседних молекул НК. Такую конденсацию наблюдали авторы работ, использовавшие в качестве поликатионов спермин, спермидин и т. д. (см., например, [13, 22] и ссылки в этих работах).

Независимо от сценария в случае энтальпийной конденсации добавленный поликатион входит в состав образующейся фазы. Экспериментальные данные показывают, что конденсация НК «запускается» всегда при достижении некоторой «критической» концентрации поликатиона в растворе и характеризуется *S*-образной кривой зависимости степени конденсации НК от концентрации использованного поликатиона [23–27].

Недавно было показано [28], что при использовании такого поликатиона, как хитозан, образуется жидкокристаллическая фаза НК, причем характером пространственной упаковки соседних молекул НК можно управлять посредством изменения расстояния между аминогруппами в составе молекул хитозана при его постоянной молекулярной массе (т. е. при постоянной длине молекулы).

Интерес к биодegradуемому полимеру — хитозану, называемому «полимером XXI века», стимулирует исследование особенностей свойств жидких кристаллов, формируемых при взаимодействии хитозана с ДНК [28].

В настоящей работе предпринята попытка теоретически описать связывание молекул ДНК (имеющих размер несколько сотен пар нуклеотидов) с хитозаном, т. е. протяженным лигандом, занимающим при связывании несколько пар нуклеотидов ДНК, и сопоставить полученные теоретические результаты с экспериментальными данными, характеризующими фазовый переход ДНК, вызванный нейтрализацией отрицательных зарядов фосфатных групп аминогруппами хитозана. При таком описании мы исходили из следующих предположений: а) хитозан связывается с ДНК некооперативно: в растворе находятся в равновесном состоянии молекулы ДНК, на которых нет хитозана, и молекулы, на которых адсорбируются одна, две, ... и так далее молекулы хитозана — до максимального заполнения ДНК хитозаном (в предположении, что молекулы хитозана не перекрываются при связывании и не «сшиваются» с концами ДНК); б) существенным моментом при связывании хитозана с ДНК является взаимо-

действие его заряженных групп с фосфатами ДНК, благодаря чему происходит нейтрализация фосфатов по мере покрытия ДНК хитозаном; в) при достижении «критической» степени покрытия хитозаном молекула ДНК переходит в «измененное» состояние, которое необходимо для образования холестерической жидкокристаллической фазы; г) аномальная оптическая активность жидкокристаллической формы комплекса ДНК–хитозан прямо пропорциональна концентрации молекул ДНК, перешедших в измененное состояние (то же самое касается «кажущейся» оптической плотности, характеризующей рассеяние света на частицах ЖКД-комплекса ДНК–хитозан).

Кроме того, мы не рассматриваем и не учитываем никаких взаимодействий между молекулами ДНК, покрытыми хитозаном (в том числе возможных «сшивок», обусловленных связыванием одной молекулы хитозана с двумя разными молекулами ДНК), мы лишь оцениваем число молекул ДНК, которые могут вступить в такие взаимодействия.

## 2. МОДЕЛЬ АДСОРБЦИИ ЛИГАНДОВ НА МОЛЕКУЛАХ ДНК

Пусть в растворе при постоянной температуре и постоянном давлении находятся молекулы ДНК с адсорбированными лигандами и свободные молекулы лиганда. Молекула ДНК представляет собой матрицу — линейный полимер из  $N$  реакционных центров (в качестве таких центров выступают пары оснований вместе с атомами сахаро-фосфатного остова). При связывании лиганд занимает подряд  $L$  центров, которые становятся недоступными для связывания с другими молекулами лиганда. Следует заметить, что конкретные стерические детали и особенности взаимодействия лиганда с ДНК не рассматриваются. Мы будем называть эти  $L$  центров местом связывания. Если пронумеровать центры матрицы от одного конца к другому, то первое из связывающих мест представляет собой последовательность из первых  $L$  центров матрицы.

Обозначим через  $K$  константу химического равновесия в реакции связывания лиганда на одном связывающем месте матрицы (мы рассматриваем ситуацию, когда связывание лиганда на любом месте матрицы происходит с одной и той же константой, т. е. случай так называемого «гомополимерного» связывания).

В растворе сосуществуют молекулы ДНК с разным числом адсорбированных лигандов. Рассмотрим

молекулу ДНК, состоящую из  $N$  центров: такая молекула способна адсорбировать в насыщении  $q_{max} = N/L$  молекул лиганда. Равновесные свойства системы полностью определяются, если рассчитана свободная энергия  $\Delta f(q, N)$  системы (матрица ДНК с адсорбированными лигандами), которая может быть представлена в следующем виде (см. [29]):

$$-\Delta f(q, N)/RT = \ln[(N - qL + q)!/q!(N - qL)!] + q \ln Km. \quad (1)$$

Здесь  $m$  — концентрация свободного лиганда в растворе,  $RT$  — произведение универсальной газовой постоянной на температуру.

Первый член в правой части формулы (1) соответствует статистической энтропии, связанной с числом перестановок лигандов и отдельных свободных центров. Если на молекуле ДНК связано  $q$  лигандов, то остается  $N - qL$  свободных центров. Статистическая энтропия равна логарифму степени вырожденности макросостояния матрицы с адсорбированными лигандами, или логарифму числа перестановок в последовательности элементов двух типов: лигандов и свободных центров —

$$\Delta S(q, N) = \ln \frac{(N - qL + q)!}{q!(N - qL)!} = \ln C_{N - qL + q}^q. \quad (2)$$

Напомним, что мы рассматриваем одну матрицу с адсорбированными лигандами. Свойства такой подсистемы связаны с неопределенностью, обусловленной статистической энтропией. Действительно, если известно, что на матрице адсорбированы  $q$  лигандов, то существует неопределенность в ответе на вопрос: «какие именно реакционные центры заняты лигандами, а какие свободны?» Мерой такой неопределенности служит статистическая энтропия матрицы с адсорбированными лигандами.

Обозначим через  $M(q)$  концентрацию матриц с  $q$  адсорбированными лигандами ( $M(0)$  соответствует концентрации матриц, на которых нет лигандов). Тогда в соответствии с распределением Больцмана можно написать

$$\ln[M(q)/M(0)] = -\Delta f(q, N)/RT, \quad (3)$$

где величина  $\Delta f(q, N)$  определяется уравнением (1).

Зная концентрацию свободного лиганда в растворе,  $m$ , можно рассчитать концентрацию матриц, на которых связано  $q$  молекул лиганда. Действительно, если концентрация матриц, на которых не адсорбировано ни одного лиганда, равна  $M(0)$ , то из формул (3) можем найти концентрацию матриц, на которых адсорбировано  $q$  лигандов:

$$M(q) = M(0) \exp(-\Delta f(q, N)/RT). \quad (4)$$

Рассмотрим систему, состоящую из одной матрицы. Матрица может находиться в  $(q_{max} + 1)$  состояниях: она может быть пуста, может содержать одну, две, ...,  $q_{max}$  молекул лиганда. Вероятность того, что матрица будет находиться в определенном состоянии, экспоненциально зависит от свободной энергии, соответствующей этому состоянию. Эта вероятность определяет число матриц в растворе, на которых связано  $q$  лигандов. Обозначим через  $C_M$  полную концентрация матриц в растворе, тогда

$$\begin{aligned} \sum_{q=0}^{q_{max}} M(q) &= \\ &= \sum_{q=0}^{q_{max}} M(0) \exp(-\Delta f(q, N)/RT) = C_M. \end{aligned} \quad (5)$$

Представим следующую ситуацию: среди всех матриц в растворе мы наугад выбираем одну. Какова вероятность того, что на этой матрице будет адсорбировано  $q$  лигандов? Если разделить концентрацию матриц с  $q$  лигандами на общую концентрацию матриц в растворе,  $C_M$ , то мы получим искомую величину:

$$\Phi(q) = M(q)/C_M. \quad (6)$$

Для каждой концентрации  $m$  свободного лиганда в растворе существует свое распределение матриц по состояниям  $\Phi(q)$ . Это распределение детально характеризует нашу систему. Запишем функцию распределения в виде

$$\Phi(q) = \frac{C_{N-qL+q}^q (Km)^q}{\sum_{q=0}^{q_{max}} C_{N-qL+q}^q (Km)^q}. \quad (7)$$

Очевидно, что

$$\sum_{q=0}^{q_{max}} \Phi(q) = 1.$$

Функция распределения не зависит от концентрации матриц в растворе, но зависит от длины лиганда и длины матрицы. Что же касается зависимости от концентрации  $m$  свободных молекул лиганда в растворе, то область значений концентрации, при которых происходят значимые изменения в функции распределения, определяется величиной константы равновесия  $K$ . Действительно,  $\Phi(q)$  зависит только от произведения  $Km$ . Среднее число адсорбированных на матрице лигандов  $\langle q \rangle$  тоже определяется полностью величиной  $Km$ .

Из формулы (7) можно получить

$$\langle q \rangle = \sum_{q=0}^{q_{max}} q \Phi(q) = \frac{\sum_{q=1}^{q_{max}} q C_{N-qL+q}^q (Km)^q}{\sum_{q=0}^{q_{max}} C_{N-qL+q}^q (Km)^q}. \quad (8)$$

В экспериментах по связыванию поликатионов с ДНК принято рассматривать «покрытие» матрицы лигандами. Если на одной матрице связано  $q$  лигандов, каждый из которых покрывает  $L$  центров матрицы, то величина покрытия матрицы лигандами  $\alpha = qL/N$ .

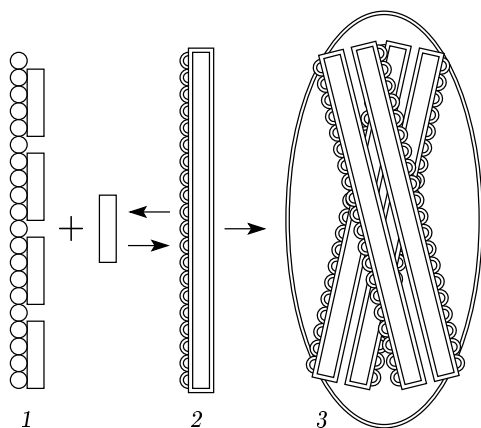
### 3. СВЯЗЫВАНИЕ ПОЛИКАТИОНОВ С ДНК, РАВНОВЕСИЕ МЕЖДУ ДВУМЯ СОСТОЯНИЯМИ

Предположим, что при связывании на одной жесткой двухцепочечной молекуле ДНК, молекулярная масса которой не превышает  $10^6$  Да, некоторого «критического» числа лигандов  $q_{crit}$  молекула ДНК становится способна к взаимодействию с другими такими же молекулами ДНК, и это обеспечивает, в конечном счете, их переход в конденсированное состояние. В частности, при достаточной компенсации отрицательных зарядов фосфатных групп молекулы ДНК, покрытые хитозаном, взаимодействуют между собой таким образом, что становится возможным формирование жидкокристаллической дисперсии (ЖКД) [28].

Условимся называть далее состояние матрицы ДНК, на которой связано  $q \geq q_{crit}$  лигандов (т.е. заряды которой компенсированы в достаточной степени), «измененным» состоянием или состоянием 2 (обозначая «обычное» состояние матрицы ДНК при  $q < q_{crit}$  как состояние 1, см. рис. 1).

Если в качестве поликатиона рассматривать хитозан, то можно предположить, что по мере возрастания концентрации хитозана в растворе все большее число молекул ДНК переходит в состояние 2, что делает возможным образование ЖКД. В данном случае нас не будет интересовать сам процесс образования дисперсии, мы лишь оценим при помощи функции распределения долю молекул ДНК, способных участвовать в образовании ЖКД.

Состояние 2 характеризуется тем, что матрица ДНК, покрытая хитозаном, начинает вести себя как молекула, обладающая новыми свойствами: она проявляет способность к переходу в ЖКД. Если в выбранных экспериментальных условиях подавляющее число молекул ДНК, которые перешли в такое состояние, входят в состав частиц ЖКД, то мож-



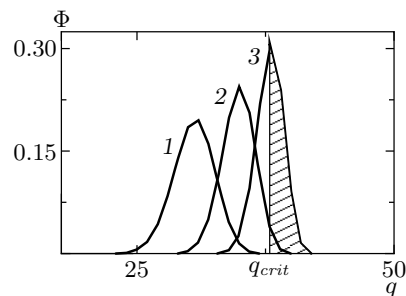
**Рис. 1.** Состояния ДНК с разной степенью «покрытия» лигандом и конденсация комплексов ДНК–лиганд при достижении «критической» степени покрытия. ДНК может существовать в трех состояниях: обычном — при степени покрытия лигандом, меньшей критического значения (1), измененном — при покрытии больше критического значения (2) и в составе холестерика (3), образованного соседними молекулами комплекса ДНК–лиганд

но принять, что доля молекул ДНК в составе ЖКД является параметром, позволяющим оценить соотношение между молекулами ДНК, находящимися в состояниях 1 и 2. Тогда состояние 2 будет соответствовать жидкокристаллическому состоянию, которое легко обнаруживается по величине аномального оптического сигнала в спектре КД и по рассеянию света частицами ЖКД [28].

Чтобы рассчитать концентрацию молекул ДНК, находящихся в состоянии 2 теоретически, надо воспользоваться соотношениями, позволяющими восстановить вероятность обнаружить в растворе молекулу ДНК, на которой адсорбировано лигандов больше, чем  $q_{crit}$ . Обозначим через  $R$  вероятность обнаружить в растворе молекулу ДНК с числом лигандов больше критического значения:

$$R = \sum_{q=q_{crit}}^{q_{max}} \Phi(q) = \frac{\sum_{q=q_{crit}}^{q_{max}} C_{N-qL+q}^q (Km)^q}{\sum_{q=0}^{q_{max}} C_{N-qL+q}^q (Km)^q}. \quad (9)$$

Пусть  $C_{DNA}$  обозначает полную концентрацию молекул ДНК (в парах оснований):  $C_{DNA} = NC_M$ . Обозначим через  $C_{lig}$  полную концентрацию лиганда в растворе. Тогда



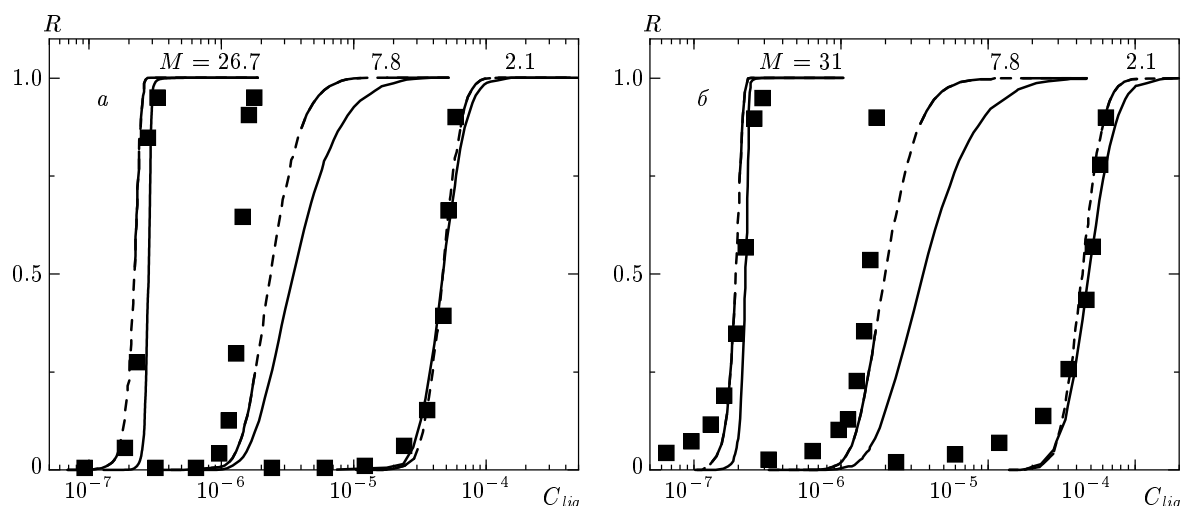
**Рис. 2.** Функция распределения, характеризующая связывание лиганда с молекулами ДНК для разных значений концентрации свободного лиганда в растворе. ДНК имеет размер  $N = 800$  пар оснований, лиганд покрывает при связывании  $L = 17$  пар оснований. Кривые 1, 2 и 3 рассчитаны по формуле (7) для значений  $Km$ , равных соответственно 0.001, 0.163 и 0.872. Заштрихованная область соответствует доле молекул ДНК, на которых связано 38 или более лигандов (такие молекулы ДНК переходят в состояние 2 в соответствии с моделью на рис. 1)

$$C_{lig} = m + \sum_{q=q_{crit}}^{q_{max}} q\Phi(q)C_M = m + \frac{\sum_{q=q_{crit}}^{q_{max}} qC_{N-qL+q}^q (Km)^q}{N \sum_{q=0}^{q_{max}} C_{N-qL+q}^q (Km)^q} C_{DNA}. \quad (10)$$

Уравнения (9), (10) позволяют рассчитать долю молекул ДНК, которые перешли в состояние 2, в зависимости от концентрации лиганда в растворе (см. [29]).

Действительно, зная величины  $K$  и  $L$ , можно решить уравнения (9), (10) при помощи численных методов и для известных значений длины матрицы  $N$  и концентрации ДНК в растворе  $C_{DNA}$  построить зависимость  $R(C_{lig})$ . Заметим, что проще всего это можно сделать, задав набор значений концентрации свободного лиганда в растворе,  $m$ , который простирается примерно от  $m = 0.01/K$  до  $m = 1/K$  (можно показать, что в этой области происходит заметное связывание). В результате получим кривую  $R(C_{lig})$ , которая описывает переход ДНК из состояния, когда в среднем на одной молекуле полимера адсорбировано менее  $q_{crit}$  лигандов, в состояние, когда среднее число лигандов  $\langle q \rangle$  больше  $q_{crit}$ .

На рис. 2 показан пример того, как изменяется функция распределения  $\Phi(q)$  по мере увеличения концентрации  $m$  свободного лиганда: все большее число молекул ДНК несет на себе число лиган-



**Рис. 3.** Экспериментальные и теоретические кривые, описывающие связывание молекул хитозана различной молекулярной массы с ДНК:  $R$  — величина сигнала, нормированная на максимальное значение сигнала для измерений аномальной полосы в спектре КД (слева) и измерений поглощения (справа),  $C_{lig}$  — концентрация молекул хитозана в растворе,  $M$  — молекулярная масса хитозана. Сплошными линиями показаны результаты теоретических расчетов соответствующих кривых для случая, когда молекула ДНК переходит в измененное состояние при степени покрытия ДНК хитозаном, равной  $\alpha = 0.8$ , штриховыми линиями показаны кривые, рассчитанные для  $\alpha = 0.7$

дов  $q > q_{crit}$ , и, соответственно, возрастает величина  $R(C_{lig})$ .

Однако на практике перед исследователями чаще стоит другая задача, а именно, из экспериментальной зависимости  $R(C_{lig})$  нужно оценить размер связывающего места  $L$ , которое занимает лиганд при связывании на ДНК, и величину константы взаимодействия лиганда со связывающим местом  $K$ . Ниже мы покажем, как можно решать эту задачу для случая связывания хитозана с молекулами ДНК в том случае, когда в результате такого связывания образуется ЖКД ДНК.

#### 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

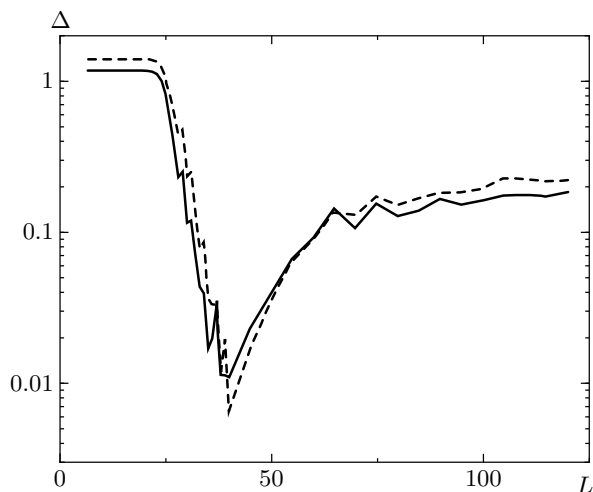
##### Сопоставление теоретических кривых связывания хитозана с ДНК с данными по образованию жидкокристаллической дисперсии

В работе [28] были получены данные о связывании хитозана с ДНК и последующем образовании ЖКД ДНК при помощи методов кругового дихроизма (КД) и «кажущейся» оптической плотности. Наборы из характерных кривых, описывающих такое связывание, показаны на рис. 3. Каждая кривая имеет  $S$ -образный вид. Описание методики эксперимента содержится в [28]. Размер молекул ДНК со-

ставлял примерно 800 пар нуклеотидов. Использованный препарат хитозана был дезацетилирован на 85 % (т. е. имел 85 % аминогрупп). Молекулы хитозана в разных опытах имели вес от 2 кДа до 32 кДа, т. е. в их составе было примерно от 10 до 160 аминокислотных остатков (молекулярный вес одного остатка — 200 Да).

Мы провели расчеты теоретических кривых связывания хитозана для каждого из экспериментов, используя данные независимых измерений кругового дихроизма и «кажущейся» оптической плотности. На основании литературных данных было сделано предположение, согласно которому одна молекула ДНК при значении покрытия ее лигандом  $\alpha = 0.8$  переходит в измененное состояние (также проводились расчеты для значения  $\alpha = 0.7$ , так как существуют отдельные свидетельства в пользу того, что  $\alpha$  может быть меньше 0.8 [30]). Для определенных  $L$  находилось значение константы связывания  $K$ , которое соответствовало наилучшему совпадению теоретической кривой с экспериментальными данными. Зная величину  $\alpha$ , при заданных  $L$  и  $N$  можно найти значение  $q_{crit} = \alpha N/L$  и при помощи формул (9), (10) рассчитать теоретическую кривую.

Критерием выбора значений константы связывания  $K$  служила сумма квадратичных отклонений теоретических значений доли молекул ДНК, перешедших в ЖК-состояние, от эксперименталь-



**Рис. 4.** Зависимость суммы квадратов отклонений экспериментальной кривой от теоретической  $\Delta(L)$  для молекулы хитозана массой 13.6 кДа. Каждая точка рассчитана для определенного значения  $L$ , причем величина  $K$  выбрана так, что достигается наилучшее совпадение теоретической кривой с экспериментальными данными. Расчеты для данных по поглощению показаны сплошной линией, для данных КД — штриховой

ных значений. Для каждой экспериментальной кривой мы оценили, что такая доля для точек кривой, соответствующих максимуму сигнала, примерно равна единице (при дальнейшем увеличении концентрации молекул хитозана в растворе начались необратимые процессы, связанные с осаждением частиц ЖКД).

Проиллюстрируем наш подход на примере анализа двух кривых, полученных при помощи измерения КД и «кажущейся» оптической плотности и соответствующих связыванию молекул хитозана весом 13.6 Да. Одна такая молекула содержит примерно 68 аминокислотных остатков. Один остаток имеет длину около 5 Å. Учитывая тот факт, что две ближайших соседних пары ДНК разделяют 3.4 Å, можно представить, что максимально возможный размер связывающего места, которое занимает молекула из 68 остатков на ДНК в случае, когда она располагается параллельно длинной оси ДНК, составляет  $L = 68 \times 5 / 3.4 = 100$  пар нуклеотидов (реакционных центров матрицы).

Заметим, что эта величина завышена: молекула хитозана может «обвивать» молекулу ДНК по спирали, изогометричной ходу фосфатного остова; в этом случае длина связывающего места должна быть примерно в два раза меньше ( $L \sim 50$  пар ну-

клеотидов). При данном чисто стерическом подходе мы рассматриваем хитозан как физическое тело и не учитываем того факта, что лишь каждая вторая группа молекулы несет заряд, т. е. не учитываем деталей и природы взаимодействия хитозана с ДНК: нас интересует только размер места, который покрывает молекула хитозана на ДНК (т. е. в рамках нашего модельного подхода число реакционных центров матрицы, которые становятся недоступными для связывания другой молекулы лиганда).

На рис. 4 показаны значения среднеквадратичных отклонений, которые рассчитаны для значений  $L$  от 10 до 120 пар нуклеотидов (т. е. в том интервале, куда заведомо должен попадать искомый размер связывающего места одной молекулы хитозана). Видно, что наилучшее совпадение теории с экспериментом получается при значении  $L = 40$  пар оснований. Для каждого значения  $L$  мы находили то значение  $K$ , которое минимизировало сумму среднеквадратичных отклонений, и именно эту сумму показывали на рисунке. Минимизация производилась при помощи пакета программ МАТЛАБ.

В табл. 1 представлены результаты расчетов для всех экспериментальных кривых. В верхней части просуммированы значения величин  $K$  и  $L$ , которые мы определили на основании экспериментальных данных, полученных при помощи метода КД, в нижней части — при помощи поглощения,  $L_{min}$  и  $L_{max}$  соответствуют минимальному и максимальному размерам связывающего места,  $K_{min}$  и  $K_{max}$  соответствуют минимальному и максимальному значениям константы, которые мы определяли с помощью метода наименьших квадратов.

На рис. 5 продемонстрированы результаты анализа экспериментальных данных, полученных при помощи методов КД и оптического поглощения. Видно, что эти данные близки и дают примерно один и тот же результат: длина связывающего места, которое занимает молекула хитозана на ДНК, прямо пропорциональна молекулярной массе хитозана. Это факт свидетельствует в пользу того, что связывание с ДНК длинных молекул хитозана происходит тем же способом, что и связывание коротких молекул хитозана.

Таким образом, соотношение между длиной связывающего места и массой молекулы хитозана можно записать в виде

$$L = cM. \quad (11)$$

Здесь  $c$  — коэффициент пропорциональности. Анализ данных по КД позволяет оценить величину

**Таблица 1.** Оценки значений размеров связывающих мест  $L$ , которые покрывают при связывании на ДНК молекулы хитозана, имеющие различную молекулярную массу, и оценки констант взаимодействия таких молекул хитозана со связывающими местами на ДНК. В верхней половине таблицы показаны результаты анализа экспериментальных данных, полученных при помощи метода КД, в нижней — результаты анализа данных, полученных при помощи измерений поглощения

Масса, кДа	$L$	$L_{min}$	$L_{max}$	$\alpha = 0.7$		$\alpha = 0.8$	
				$K_{min}, M^{-1}$	$K_{max}, M^{-1}$	$K_{min}, M^{-1}$	$K_{max}, M^{-1}$
2	7	3	20	$2 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$
2.1	10	3	25	$2 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$
4.1	12	7	24	$3 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^6$
7.8	17	11	33	$4 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^{10}$
13.6	40	32	60	$2 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^{10}$
19	55	39	95	$6 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^9$	$4 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^{10}$
26.7	70	60	110	$2 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^7$	$8 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^9$
31	90	70	150	$2 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^6$	$9 \cdot 10^{10}$

Масса, кДа	$L$	$L_{min}$	$L_{max}$	$\alpha = 0.7$		$\alpha = 0.8$	
				$K_{min}, M^{-1}$	$K_{max}, M^{-1}$	$K_{min}, M^{-1}$	$K_{max}, M^{-1}$
2	5	3	16	$2 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$
2.1	9	6	20	$2 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^5$
4.1	9	8	12	$2 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^6$
7.8	17	13	20	$1 \cdot 10^6$	$9 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^6$	$9 \cdot 10^9$
13.6	40	32	65	$2 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^{10}$	$9 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^{10}$
19	50	40	75	$1 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^{10}$
26.7	80	60	120	$1 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^{10}$
31	75	60	110	$1 \cdot 10^6$	$9 \cdot 10^{10}$	$6 \cdot 10^6$	$9 \cdot 10^{10}$

$c = (2.64 \pm 0.25) \text{ кДа}^{-1}$ , анализ данных по поглощению позволяет оценить эту величину более точно:  $c = (2.79 \pm 0.15) \text{ кДа}^{-1}$ . Если принять эту вторую оценку, то можно посчитать, что 5 аминокислотных остатков, которые весят примерно 1 кДа, занимают около 2.8 пар оснований ДНК. Длина сахаро-фосфатного остова ДНК, соответствующего одной паре оснований, равна примерно  $7.2 \text{ \AA}$ . Итак, 5 аминокислотных остатков покрывают на ДНК участок в  $20 \text{ \AA}$ . Сами собой эти 5 остатков имеют несколько большую длину —  $25 \text{ \AA}$  (возможно, такое отличие обусловлено тем, что аминокислотная цепь хитозана может примерно на  $1/5$  часть «сवेशивать-

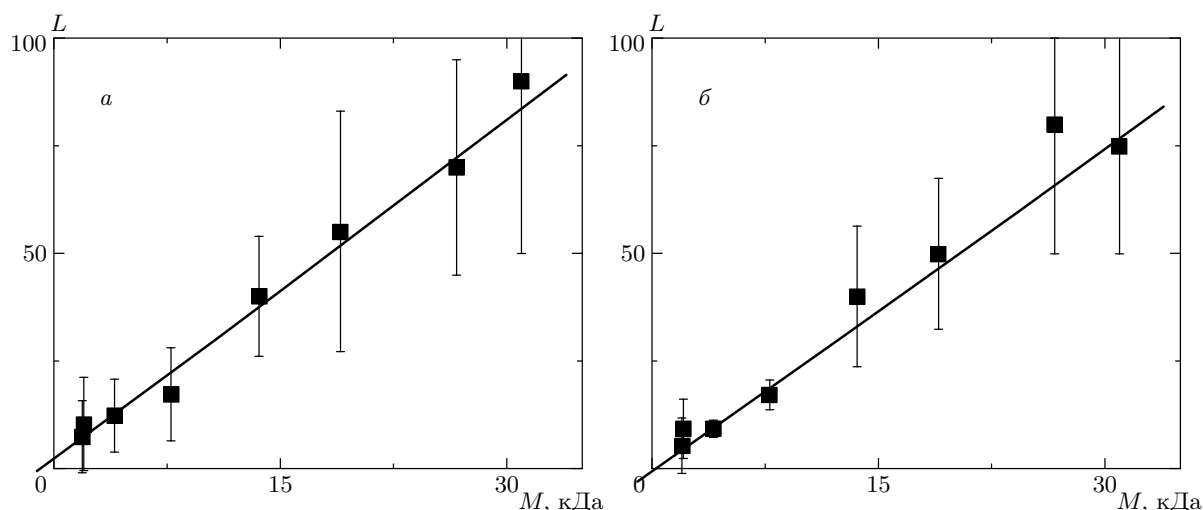
ся» с молекулы ДНК, т.е. образовывать петли или другие структуры).

Если предположить, что способ связывания хитозана с ДНК не зависит от длины молекулы хитозана, то энергия такого связывания должна аддитивно меняться в зависимости от длины связывающего места, которое занимает хитозан, и константа связывания должна экспоненциально зависеть от длины. Мы можем предположить, что должно выполняться соотношение

$$K = b \exp(aL). \quad (12)$$

В табл. 2 представлены оценки величин  $a$  и  $b$ , полученные в результате нашего анализа для двух





**Рис. 5.** Значения размеров связывающих мест, дающие наилучшее соответствие теории и эксперимента для связывания с ДНК молекул хитозана разной молекулярной массы:  $M$  — молекулярная масса хитозана,  $L$  — размер связывающего места (в парах оснований),  $a$  — результаты, полученные на основании анализа данных КД,  $b$  — результаты, полученные на основании анализа измерения «кажущейся» оптической плотности

**Таблица 2.** Значения энергетических параметров связывания хитозана с ДНК, получаемые в результате анализа экспериментальных данных

		$a$	$b, 10^4 M^{-1}$
$\alpha = 0.7$	КД	$0.13 \pm 0.08$	$1.9 \pm 1.2$
	Поглощение	$0.09 \pm 0.05$	$2.8 \pm 1.9$
$\alpha = 0.8$	КД	$0.14 \pm 0.08$	$8.7 \pm 5.6$
	Поглощение	$0.10 \pm 0.07$	$11.8 \pm 4$

значений критического покрытия ДНК хитозаном  $\alpha = 0.7$  и  $\alpha = 0.8$ .

Заметим, что в целом значения констант, получаемые при таком анализе, не контрастируют с данными, характеризующими связывание поликатионов с ДНК (см. табл. 3) и полученными в работах разных авторов. Изменение свободной энергии связывания в расчете на одну пару оснований в соответствии с данными табл. 2 оказывается небольшим, так что при увеличении размера связывающего места хитозана на 10 пар оснований константа связывания возрастает в 2.8 раз.

Следует добавить, что для описания образования ЖКД ДНК в результате связывания молекул хитозана с ДНК были предприняты попытки использовать ряд других моделей, в частности, модель Поршке [13], в которой компактизация нуклеи-

новых кислот происходит посредством образования комплексов, в которых одна молекула лиганда связывает между собой две молекулы ДНК. Однако на этом пути мы не смогли построить удовлетворительного описания имеющихся экспериментальных данных, что неудивительно, так как в нашем случае образуется ЖК-фаза, в которой молекулы ДНК сохраняют подвижность, т. е. они не связаны хитозановыми «сшивками».

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе предложена модель, в рамках которой при достижении определенного критического покрытия ДНК хитозаном в растворе начинается переход молекул ДНК в состояние, обеспечивающее эффективное взаимодействие между молекулами комплексов (хитозан–ДНК) и образование ЖКД.

В данной работе использована модель некооперативного связывания лигандов с ДНК и проиллюстрировано, каким образом можно оценить концентрации фрагментов ДНК, которые могут быть «подготовлены», в частности, к фазовым переходам, на примере анализа связывания хитозана с ДНК. Заметим, что описание фазовых переходов в одиночных молекулах ДНК, обусловленных кооперативными взаимодействиями между адсорбированными лигандами, содержится в работах

Таблица 3. Константы связывания различных поликатионов с двухцепочечными молекулами ДНК

Соединение	Условия	$K, M^{-1}$	Ссылка
Поли(L-лизин)	Мол. вес 36.600	$8.3 \cdot 10^9$	[31]
тиолированный поли(L-лизин)	—	$1.3 \cdot 10^{10}$	[31]
Гистоноподобные, спермо- специфический белок из <i>Spisula solidissima</i>	(300 аминокислотных остатков, протаминоподобный белок)	$(1-9) \cdot 10^8$	[32]
Спермидин	17 мМ	$1.4 \cdot 10^6$	[23]
Спермин	1 мМ	$1.87 \cdot 10^5$	[33]
Пентализин	0.1 М	$4.7 \cdot 10^3$ (связывание с poly(A).poly(T))	[34]
Цетилтриметилам монийбромид (СТАВ)		$1.2 \cdot 10^3$	[35]

Ландо, Тэйфа и соавторов [36, 37].

Авторы признательны Г. В. Гурскому за внимание к работе, С. В. Семенову за критические замечания.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 03-04-48212).

## ЛИТЕРАТУРА

1. T. L. Hill, *J. Polymer Sci.* **23**, 549 (1957).
2. T. Hill, *Statistical Mechanics*, McGraw-Hill, New York (1956).
3. W. S. Magee, J. H. Gibbs, and B. H. Zimm, *Biopolymers* **1**, 133 (1963).
4. D. Crothers, *Biopolymers* **6**, 575 (1968).
5. А. С. Заседателев, Г. В. Гурский, М. В. Волькенштейн, *Мол. биология* **5**, 245 (1971).
6. Г. В. Гурский, А. С. Заседателев, М. В. Волькенштейн, *Мол. биология* **6**, 479 (1972).
7. J. A. Schellman, *Biopolymers* **14**, 999 (1975).
8. I. R. Epstein, *Biophys. Chem.* **8**, 327 (1978).
9. Ю. Д. Нечипуренко, *Биофизика* **27**, 391 (1982).
10. Г. В. Гурский, А. С. Заседателев, в кн.: *Итоги науки и техники*, серия «Молекулярная биология», ВИНТИ, Москва (1982), с. 190.
11. Ю. Д. Нечипуренко, Г. В. Гурский, *ДАН СССР* **281**, 213 (1985).
12. Yu. D. Nechipurenko and G. V. Gursky, *Biophys. Chem.* **24**, 195 (1986).
13. D. Porschke, *J. Mol. Biol.* **222**, 423 (1991).
14. J. Reiter and I. R. Epstein, *J. Phys. Chem.* **91**, 4813 (1987).
15. J. Reiter and I. R. Epstein, *Biophys. Chem.* **33**, 1 (1989).
16. Б. Йованович, Ю. Д. Нечипуренко, *Мол. биология* **24**, 478 (1990).
17. D. Poland, *J. Chem. Phys.* **113**, 4774 (2000).
18. D. Poland, *Biopolymers* **58**, 477 (2001).
19. F. Livolant and A. Leforestier, *Progr. Polymer Sci.* **21**, 1115 (1996).
20. R. L. Rill, T. E. Strzelecka, M. W. Davidson, and D. H. van Winkle, *Physica A* **176**, 87 (1991).

21. V. A. Bloomfield, R. W. Wilson, and D. C. Rau, *Biophys. Chem.* **11**, 339 (1980).
22. D. Y. Lando and V. B. Teif, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **20**, 215 (2002).
23. D. Porschke, *Biochemistry* **23**, 4821 (1984).
24. A. Osland and K. Kleppe, *Nucl. Acids Res.* **4**, 685 (1977).
25. E. Raspaud, M. Olivera de la Cruz, J.-L. Sikorav, and F. Livolant, *Biophys. J.* **74**, 381 (1998).
26. С. Г. Скуридин, А. Т. Дембо, В. С. Ефимов, Ю. М. Евдокимов, *ДАН* **365**, 400 (1999).
27. M. Saminathan, T. Antony, A. Shirahata, L. H. Sigal, T. Thomas, and T. J. Thomas, *Biochemistry* **38**, 3821 (1999).
28. Ю. М. Евдокимов, В. И. Салянов, С. В. Семенов, А. В. Ильина, В. П. Варламов, *Мол. биология* **36**, 532 (2002).
29. Ю. Д. Нечипуренко, Г. В. Гурский, *Биофизика* **48**, 773 (2003).
30. Ю. Д. Нечипуренко, А. М. Вольф, Ю. М. Евдокимов, *Биофизика* **48**, 802 (2003).
31. T. Wink, J. de Beer, W. E. Hennink, A. Bult, and W. P. von Bennekom, *Anal. Chem.* **71**, 801 (1999).
32. L. J. Libertini, J. Ausio, and K. E. van Holde, *Biopolymers* **27**, 1459 (1988).
33. R. Marquet, C. Houssier, and E. Fredericq, *Biochim. Biophys. Acta* **825**, 365 (1985).
34. M. T. Record, T. M. Lohman, and P. de Haseth, *J. Mol. Biol.* **107**, 145 (1976).
35. S. M. Mel'nikov, V. G. Sergeev, and K. Yoshikawa, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 9951 (1995).
36. D. Lando and V. Teif, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **17**, 903 (2000).
37. V. B. Teif, S. G. Haroutiunian, V. I. Vorob'ev et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.* **19**, 1093 (2002).