

**ПРИМЕНЕНИЕ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ТЕРМОДИНАМИКИ ДЛЯ АНАЛИЗА СВЯЗЫВАНИЯ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ**

Нечипуренко Ю.Д.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

*ул. Вавилова, 32, г. Москва, 119991, РФ**e-mail: nech99@mail.ru*

Аннотация. Связывание биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами необходимо рассматривать на основании представлений физической адсорбции. Применение модели Изинга позволяет построить аналитическое решение математических уравнений адсорбции в самом общем виде, для широкого класса моделей. Разработанные нами подходы изложены в монографии, посвященной анализу связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами.

Ключевые слова: связывание лигандов с ДНК, кооперативные взаимодействия, модели адсорбции, модель Изинга.

**STATISTICAL THERMODYNAMICS TREATMENT FOR ANALYSIS OF BINDING
BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS TO NUCLEIC ACIDS**

Nechipurenko Yu.D.

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,

*Moscow, 119991, Russia**e-mail: nech99@mail.ru*

Abstract. The binding of biologically active compounds with nucleic acids should be described using the models of physical adsorption. The application of the Ising model allows to formulate an analytical solution of the mathematical equations of adsorption in the most general terms for a wide class of models. The developed approaches are outlined in the monograph addressing the analysis of biologically active compounds binding to the nucleic acids.

Key words: DNA-ligand binding, cooperative interactions, binding curve, Ising model

Развитие экспериментальных методов анализа связывания лигандов с нуклеиновыми кислотами позволяет получить всё более полную количественную информацию об исследуемой системе. Такими «детальными», которыми нельзя пренебречь при количественном описании системы могут быть, к примеру, кооперативные взаимодействия между адсорбированными лигандами. Конечно, не во всякой системе и не всегда присутствуют кооперативные взаимодействия, однако исследователю-экспериментатору необходимо быть готовым, к тому, что его система окажется сложной.

В случае сложной системы может оказаться необходимо применить весь арсенал современных методов анализа связывания биологически активных соединений с молекулами-матрицами. Первыми примерами анализа связывания протяженных лигандов с полимерами с точки зрения термодинамики являются работы Брэдли и Лифсона [1] и Латта и Собера [2] и Крозерса [3], где примерно 50 лет назад впервые получены соотношения, позволяющие описывать такое связывание.

Следующий этап развития теории адсорбции в этой области связан с учётом кооперативных взаимодействий между адсорбированными лигандами. Корректное описание систем, в которых наблюдаются кооперативные взаимодействия, было проведено в работах, выполненных в Институте Молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН [4, 5]. Гурский, Заседателев и Волькенштейн построили модели связывания и решили ряд теоретических задач, которые позволяют описывать связывание биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами при помощи систем алгебраических уравнений и рекуррентных соотношений. Подытожила описание кооперативного связывания лигандов на ДНК работа Мак Ги и фон Хиппеля, в которой полученные Заседателевым и соавторами уравнения для простейшего случая контактных кооперативных взаимодействий получили интерпретацию, позволяющую наглядно их истолковать для молекулярных биологов и биохимиков, не знакомых со статистической физикой [6].

Дальнейшее развитие теории адсорбции в применении к связыванию лигандов с нуклеиновыми кислотами позволило Гурскому и Заседателеву учесть ситуации, когда лиганды могут связываться на полимере в различных ориентациях (или образовывать различные типы комплекса при связывании с полимером) [7, 8].

В русле этого подхода нам удалось для широкого класса адсорбционных задач применить одномерную модель Изинга [9]. Эта модель была предложена ещё в 1920 году Вильгельмом Ленцем для описания ферромагнетизма [10], а его ученик Эрнст Изинг смог найти решение уравнений, которые возникают в этой задаче (поэтому в ряде источников соответствующая модель называется моделью Ленца-Изинга). Оказалось, что эта модель имеет широчайшее применение в статистической механике при описании кооперативных феноменов – в частности, нам удалось свести к ней модель, описывающую кооперативное связывание лигандов в разных ориентациях на полимере, что позволило получить систему уравнений и построить её решение в самом общем виде, когда учитываются дальние взаимодействия между ближайшими соседними адсорбированными на полимере лигандами [11-15].

В живой клетке с молекулами ДНК и РНК связывается большое число различных соединений, и при связывании на матрицах нуклеиновых кислот может задействоваться одновременно несколько систем реакционных центров. В монографии [16] мы рассмотрели как конкуренцию лигандов за одни и те же связывающие места, так и координацию при связывании лигандов на одной или двух системах реакционных

центров. Эта монография подытожила развитие теории адсорбции в применении к описанию связывания лигандов с нуклеиновыми кислотами за последние 50 лет, в неё вошли как оригинальные работы автора, так и ряд обзоров [17-19].

Следует заметить, что Заседателей и Гурский получили уравнение, описывающее кооперативное связывание протяженного лиганда на полимере, однако они не учли дисперсию адсорбции (так как воспользовались приближением «бесконечного полимера»). В случае, когда лиганд при связывании закрывает L звеньев полимера, делая их недоступными для связывания других молекул лиганда, заполнение полимера лигандом r и концентрация свободного лиганда в растворе m связаны следующим соотношением:

$$\frac{r}{Km} = \left(\frac{1-rL}{1-rL+r} \right)^L (1-rL+r). \quad (1)$$

Здесь K – равновесная константа связывания лиганда с одним связывающим местом на полимере. Уравнение (1), описывающее некооперативное связывание протяженного лиганда, является центральным в теории адсорбции. Заметим, что данная модель – связывание протяженного лиганда рассматривалась и до работ Заседателя с соавторами, уравнения, описывающие такое связывание, были получены ранее в работах [1-3], однако эти уравнения имели другую, параметрическую форму записи.

Введём в рассмотрение вероятность встретить среди свободных звеньев полимера и адсорбированных лигандов свободное звено (не закрытое лигандом):

$$P = (1-rL) / (1-rL+r). \quad (2)$$

Тогда уравнение (1) можно записать в виде:

$$(Km)^{-1} = P^L / (1-P). \quad (3)$$

Параметр P изменяется от 0 до 1, и если задавать значение этого параметра, можно из (2), (3) легко найти значения m и r и построить изотерму адсорбции.

Вероятностная интерпретация уравнения (1) заключается в следующем: если рассмотреть полимер с адсорбированными лигандами, то правая часть уравнения соответствует относительному числу свободных связывающих мест для лиганда на этом полимере (одно место составляют L расположенных подряд не закрытых лигандом звеньев полимера). Величина r дает относительное число адсорбированных лигандов. В таком случае (1) можно рассматривать как условие химического равновесия для лиганда длины L .

В реальной ситуации полимер имеет не бесконечную длину, и благодаря этому в системе наблюдается дисперсия: разные полимеры в растворе имеют разное число адсорбированных лигандов. Обозначим число лигандов, адсорбированных на полимере, посредством q , а длину полимера N . Мы можем построить схему испытаний Бернулли и оценить сходимость величины q/N к значению r - вероятности обнаружить, что определённое звено полимера занято лигандом [16].

Эффективность применения теории адсорбции для описания биологических систем в целом обусловлена, с одной стороны, участием специалистов в области статистической физики в решении задач, связанных с биополимерами, а с другой, привлечением внимания со стороны молекулярных биологов и биофизиков к теории адсорбции. Однако, несмотря на достижения в этой области, до последнего времени в отечественной и мировой литературе не существовало крупных обзорных работ, в которых с единой точкой зрения рассматривались бы сотни и тысячи примеров применения теории адсорбции к описанию взаимодействия лигандов с НК. Не существовало ни современных руководств, ни монографий, в которых бы излагались подходы к описанию взаимодействия лигандов с НК. Недавно появилась монография Гарри Стормо, в одной из глав которой рассматриваются термодинамические аспекты связывания белков с ДНК [20], однако в ней нет систематического изложения совокупности методов анализа такого связывания.

За последние годы вышел ряд работ, в которых содержится описание систем, где связывание лигандов с матрицами НК происходит по новым схемам (см., например, [18, 21, 22]). Развита новая модель адсорбции, получены уравнения связывания. В монографии [16] такие модели впервые изложены системно: с единой точки зрения, в рамках общего подхода. Здесь впервые в наиболее полном виде изложена совокупность методов и подходов статистической термодинамики, позволяющих описывать и анализировать системы, в которых изучается связывание лигандов с нуклеиновыми кислотами *in vitro*. На ряде примеров мы показали, как такие подходы работают, какие параметры связывания они позволяют оценить.

Развитые нами методы анализа данных дают в руки исследователя разнообразный теоретический «инструментарий», позволяющий анализировать как реальные биологические системы, так и модельные системы, в которых изучается связывание лигандов с нуклеиновыми кислотами. Примером такого инструментария является модель Изинга, которая хорошо известна в самых разных приложениях статистической физики. Любопытно, что развитие теории связывания лигандов с двумерными платформами биочипов закономерно привело нас к применению двумерной модели Изинга [23-26].

Теория адсорбции на протяжении ста лет своего применения к биологическим системам накопила уже достаточно опыта, чтобы выступить в этой области в роли научной дисциплины. Эта дисциплина выработала свой язык, который позволил сформулировать такую фундаментальную проблему биологии, как регуляция генетической экспрессии, в рамках представлений статистической физики. С другой стороны, применение теории адсорбции к анализу экспериментальных данных позволяет связать наблюдаемые величины с модельными свойствами молекулярно-биологических систем: определять энергии взаимодействия лигандов с нуклеиновыми кислотами, энергии взаимодействия между адсорбированными лигандами и т.п. Описание

реальных систем при помощи теории адсорбции даёт возможность как предсказывать их поведение при изменении внешних условий, так и уточнять черты моделей связывания лигандов с ДНК. Без применения теории адсорбции невозможно сейчас представить эффективное решение и таких прикладных задач, как испытание лекарственных соединений и создание биосенсоров.

Заметим, что в последние годы вышли монографии Евстигнеева с соавторами, посвященные детальному количественному анализу связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами [27, 28]. Обширный класс фундаментальных и прикладных задач молекулярной биофизики можно решать при помощи теории адсорбции. Статистическая термодинамика связывания лигандов с ДНК и РНК находится на переднем крае науки, в области развития новых технологий постгеномной эры. Модели адсорбции оказываются необходимыми и востребованными в объяснении экспериментов по гибридизации геномных ДНК и РНК на биочипах, в анализе экспериментов по фут-принтингу, в описании шума экспрессии генов и работы малых РНК (см, например, [29-32]), в конструировании новых лекарственных соединений, в создании биосенсоров – во многих областях науки. В связи с развитием новых методов и технологий в молекулярной биологии появилась надежда решить здесь и фундаментальные задачи: разобраться в том, что же происходит в клетке «вокруг ДНК» – иными словами, как работают факторы транскрипции, малые РНК и лекарственные соединения, которые регулируют процессы экспрессии генов.

Список литературы / References:

1. Bradley D.F., Lifson S. Statistical mechanical analysis of binding of acridines to DNA. *Molecular Associations in Biology*, Ed. B. Pullman, 1968, pp. 261-270.
2. Latt S.A., Sober L.H. Protein-nucleic acid interactions. Oligopeptide- polyribonucleotide binding studies. *Biochemistry*, 1967, vol. 6, pp. 3293-3306.
3. Crothers D. Calculation of binding isotherms for heterogeneous polymers. *Biopolymers*, 1968, vol. 6, pp. 575-584.
4. Заседателев А.С., Гурский Г.В., Волькенштейн М.В. Теория одномерной адсорбции. I. Адсорбция малых молекул на гомополимере. *Мол. биология*, 1971, т. 5, с. 245-490. [Zasedatelev A.S., Gurskii G.V., Vol'kenshtein M.V. Theory of one-dimensional adsorption. I. Adsorption of small molecules on a homopolymer. *Molecular biology*, 1971, vol. 5, pp. 194-198. (In Russ.)]
5. Гурский Г.В., Заседателев А.С., Волькенштейн М.В. Теория одномерной адсорбции. II. Адсорбция малых молекул на гетерополимере. *Мол. биология*, 1972, т. 6, с. 479-489. [Gurskii G.V., Zasedatelev A.S., Vol'kenshtein M.V. Theory of single-dimensional adsorption. II. Adsorption of small molecules on a heteropolymer. *Molecular biology*, 1972, vol. 6, pp. 385-393. (In Russ.)]
6. McGhee J.D. and von Hippel P.H. Theoretical Aspects of DNA-Protein Interactions: Co-operative and Non-co-operative Binding of Large Ligands to a One-dimensional Homogeneous Lattice. *J. Mol. Biol.*, 1974, vol. 86, pp. 469-489.
7. Гурский Г.В., Заседателев А.С. Точные соотношения, описывающие связывание регуляторных белков и других решёточных лигандов на двухспиральных полинуклеотидах. *Биофизика*, 1978, т. 23, с. 932-946. [Gurskii G.V., Zasedatelev A.S. Exact relations for calculating the binding of the regulatory proteins and other lattice ligands in double-stranded polynucleotides. *Biophysics*, 1978, vol. 23, pp. 946-960. (In Russ.)]
8. Gursky G.V., Zasedatelev A.S. Thermodynamic and stereochemical aspects of binding interactions between sequence-specific ligands and DNA. *Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol.*, 1984, vol. 5, pp. 53-139.
9. E. Ising. Beitrag zur Theorie des Ferromagnetismus. *Z. Physik*, 1925, vol. 31, pp. 253-258.
10. Lenz W. Beiträge zum Verständnis der magnetischen Eigenschaften in festen Körper. *Z. Phys.*, 1920, vol. 12, pp. 613-615.
11. Нечипуренко Ю.Д., Заседателев А.С., Гурский Г.В. Теория одномерной адсорбции на гомополимере. Учет различных ориентаций молекул лиганда. *Биофизика*, 1979, т. 24, с. 351-361. [Nechipurenko Yu.D., Zasedatelev A.S., Gurskii G.V. Theory of one-dimensional adsorption on a homopolymer. Allowance for different orientations of the molecules of the ligand. *Biophysics*, 1979, vol. 24, pp. 366-376. (In Russ.)]
12. Нечипуренко Ю.Д., Заседателев А.С., Гурский Г.В. Кооперативные взаимодействия при связывании протяженных лигандов с ДНК. I. Неконтактные кооперативные взаимодействия. *Мол. биология*, 1984, т. 18, с. 798-812. [Nechipurenko Yu.D., Zasedatelev A.S., Gurskii G.V. Cooperative effects in the binding of extended ligands on DNA. 1. Long-range interactions between adsorbed ligands. *Molecular biology*, 1984, vol. 18, pp. 655-669. (In Russ.)]
13. Нечипуренко Ю.Д. Кооперативные взаимодействия при связывании протяженных лигандов с ДНК. II. Контактные кооперативные взаимодействия между адсорбированными лигандами. *Мол. биология*, 1984, т. 18, с. 1066-1079. [Nechipurenko I.D. Cooperative effects during binding of extended ligands with DNA. 2 Contact interactions between adsorbed ligands. *Molecular biology*. 1984, vol. 18, pp. 871-883. (In Russ.)]
14. Nechipurenko Yu.D., Gursky G.V. Cooperative effects on binding of proteins to DNA. *Bioph. Chem.* 1986, vol. 24, pp. 195-209.
15. Lando D.Y., Nechipurenko Y.D. Distribution of unselectively bound ligands along DNA. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2008, vol. 26, pp. 187-196.
16. Нечипуренко Ю.Д. Анализ связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами. Москва-Ижевск, ИКИ, 2015, 188 с. [Nechipurenko Yu.D. *Analysis of binding of biologically active compounds to nucleic acids*. Moscow-Izhevsk, ICI, 2015, 188 p. (In Russ.)]

17. Нечипуренко Ю.Д., Гурский Г.В. Термодинамические модели связывания лигандов с ДНК. *Биофизика*, 2003, т. 48, с. 773-796. [Nechipurenko Y.D., Gursky G.V. Thermodynamic models of ligand binding to nucleic acids. *Biophysics*, 2003, vol. 48, pp. 717-740. (In Russ.)]
18. Yevdokimov Y.M., Skuridin S.G., Nechipurenko Y.D., Zakharov M.A., Salyanov V.I., Kurnosov A.A., Kuznetsov V.D., Nikiforov V.N. Nanoconstructions based on double-stranded nucleic acids. *International journal of biological macromolecules*, 2005, vol. 36, pp. 103-115.
19. Нечипуренко Ю.Д. Анализ связывания лигандов с нуклеиновыми кислотами. *Биофизика*, 2014, т. 59, с. 12-36. [Nechipurenko Yu.D. Analysis of binding of ligands to nucleic acids. *Biophysics (Russian Federation)*, 2014, vol. 56, pp. 6-27. (In Russ.)]
20. Stormo G. *Introduction to protein-DNA interactions: Structure, thermodynamics, and bioinformatics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2013.
21. Bujalowski W. Thermodynamic and kinetic methods of analyses of protein-nucleic acid interactions. From simpler to more complex systems. *Chemical reviews*, 2006, vol. 106, pp. 556-606.
22. Teif V.B., Kepper N., Yserentant K., Wedemann G. & Rippe K. Affinity, stoichiometry and cooperativity of heterochromatin protein 1 (HP1) binding to nucleosomal arrays. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2015, vol. 27, p. 064110.
23. Головкин М.В., Матвеева О.В., Нечипуренко Ю.Д. Свойства изотерм гибридизации при связывании лигандов на биочипах. *Биофизика*, 2009, т. 54, с. 820-823. [Golovkin M.V., Matveeva O.V., Nechipurenko Y.D. Properties of hybridization isotherms upon binding of ligands on microchips. *Biophysics*, 2009, vol. 54, pp. 581-583. (In Russ.)]
24. Ходыков М.В., Анашкина А.А., Головкин М.В., Матвеева О.В., Нечипуренко Ю.Д. Анализ связывания лигандов с ДНК в растворе и на микрочипах. *Биофизика*, 2011, т. 56, с.1053-1061. [Khodykov M.V., Anashkina A.A., Golovkin M.V., Matveeva O.V., Nechipurenko Yu.D. Analysis of DNA-ligand binding in solution and on biochips. *Biophysics*, 2011, vol. 56, pp. 1033-1040. (In Russ.)]
25. Стирманов Я.В., Ходыков М.В., Матвеева О.В., Нечипуренко Ю.Д. Анализ связывания олигонуклеотидов на микрочипах: энергетические изотермы гибридизации. *Биофизика*, 2013, т. 58, с. 981-986. [Stirmanov Y.V., Khodykov M.V., Matveeva O.V., Nechipurenko Y.D. Analysis of hybridization in DNA microarrays: Hybridization energy isotherms. *Biophysics*, 2013, vol. 58, pp. 771-774. (In Russ.)]
26. Стирманов Я.В., Ходыков М.В., Матвеева О.В., Нечипуренко Ю.Д. Кооперативные эффекты при связывании лигандов с ДНК в растворе и на микрочипах. В сборнике: *Актуальные вопросы биологической физики и химии БФФХ-2015. Материалы X международной научно-технической конференции, г. Севастополь*, 2015, с. 151-156. [Stirmanov Y.V., Khodykov M.V., Matveeva O.V., Nechipurenko Y. D. Cooperative effects on DNA-ligand binding in solutions and microarrays. *Proceedings of X International Science-Technical Conference «Aktualnie voprosy biologicheskoy fiziki i himii. BFFH-2015»*, Sevastopol, 2015, pp. 151-156. (In Russ.)]
27. Костюков В.В., Евстигнеев М.П. *Энергетика комплексообразования биологически активных соединений и нуклеиновых кислот в водном растворе*. Севастополь, 2012. [Kostyukov V.V., Evstigneev M.P. *Energetics of Complexation of Biologically Active Compounds and Nucleic Acids in Aqueous Solution*. SevNTU, Sevastopol, 2012. (In Russ.)]
28. Evstigneev M.P., Shestopalova A.V. Structure, Thermodynamics and Energetics of Drug-DNA Interactions: Computer Modeling and Experiment. *Application of Computational Techniques in Pharmacy and Medicine*. Springer Netherlands, 2014, pp. 21-57.
29. Рябоконт В.Ф., Нечипуренко Ю.Д., Гурский Г.В. Количественные методы анализа диаграмм фут-принтинга для комплекса лиганда с ДНК с известной последовательностью. *ДАН*, 2004, т. 398, с. 832-837. [Ryabokon' V.F., Nechipurenko Yu.D., Gurskij G.V. Quantitative methods for analysis of footprinting diagrams for complexes between a ligand and DNA oligomer with the predetermined sequence. *Doklady Akademii Nauk*, 2004, vol. 398, pp. 832-837. (In Russ.)]
30. Nechipurenko Yu. D., Jovanovic B., Riabokon V.F., Gursky G.V. Quantitative methods of analysis of footprinting diagrams for the complexes formed by a ligand with a DNA fragment of known sequence. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2005, vol. 15, pp. 660-672.
31. Головкин М.В., Нечипуренко Ю.Д., Гурский Г.В. Статистические флуктуации в уровне заполнения репрессором оператора определяют величину экспрессии репортерного гена. *Биофизика*, 2009, т. 54, с. 581-588. [Golovkin M.V., Nechipurenko Y.D., Gursky G.V. Statistical Fluctuations of the Level of Operator Filling by Repressor Determine the Level of Noise of Reporter Gene expression. *Biophysics*, 1979, vol. 54, pp. 409-414. (In Russ.)]
32. Matveeva Olga, Nechipurenko Yury, Rossi Leo, Moore Barry, Saetrom Pal, Ogurtsov Aleksey Y., Atkins John F. and Shabalina Svetlana A. Comparison of approaches for rational siRNA design leading to a new efficient and transparent method. *NAR*, 2007, vol. 35, Iss. 8, <http://nar.oxfordjournals.org/content/35/8/e63.full>