

Т. И. СМОЛЬЯНИНОВА, Б. И. СУХОРУКОВ

КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМ КОНФОРМАЦИОННЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ДНК, ВЫЗВАННЫХ КИСЛОТОЙ

(Представлено академиком Г. М. Франком 5 XI 1970)

С целью выяснения природы внутримолекулярных взаимодействий, определяющих различные конформации нуклеиновых кислот, и в связи с проблемами редуликации ДНК и синтеза РНК на ДНК-матрице представляется необходимым проведение исследований по кинетике конформационных превращений ДНК и получение данных о механизме этих превращений *in vitro*. В настоящее время в этом направлении появились экспериментальные работы. Большинство из них посвящено исследованию кинетики тепловой денатурации ДНК различными методами температурного скачка (¹⁻⁴). Методом остановленной струи исследовалась кинетика щелочной (⁵⁻⁷) и кислотной (⁸) денатурации. Имеющиеся данные по кинетике конформационных превращений ДНК в ряде работ противоречивы и явно недостаточны для выяснения механизма превращений, который определяется природой сил, стабилизирующих исходную конформацию, и характером изменений внутримолекулярных взаимодействий, обусловленных действием факторов, вызывающих конформационный переход.

Целью данной работы является выяснение основных особенностей кинетики, определение кинетических параметров и изучение механизма конформационных превращений ДНК, вызванных кислотой.

В работе использовался препарат ДНК, выделенной из тимуса телянка (*). Содержание белка в препарате не превышало 1%. Температура плавления и ширина температурного перехода ДНК в 0,15 M NaCl, pH 5,9 составляли соответственно 83 и 14°. Гиперхромный эффект 32%. Молекулярный вес ~ 10⁶.

Кинетика конформационных превращений исследовалась методом остановленной струи со спектрофотометрической системой регистрации. Изготовленная нами струевая система (¹⁰) позволяет исследовать процессы с временем полупревращения порядка 10⁻³ сек. Использование этого метода (при давлении газа в пневмопушке 20 атм.) не вызывало деструкции молекул ДНК. Концентрация ДНК в кювете наблюдения составляла 20—25 мкг/мл. Кинетические измерения проводились на длине волны 265 мμ. Надежные кинетические измерения можно было проводить в том случае, если оптические плотности исходного и конечного состояний различались более, чем на 3,5%. Эти состояния определялись из кривых спектрофотометрического титрования (кривые с.т.) ДНК, полученных нами при нескольких температурах в интервале 20—40°.

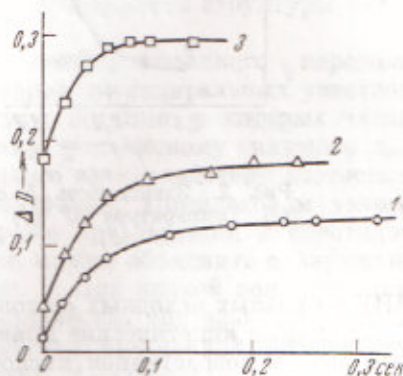


Рис. 1. Кинетические кривые структурных переходов ДНК, вызванных кислотой. Температура 20°. 1 — pH 1,8, 2 — pH 2,0, 3 — pH 2,2

В исследованном интервале температур ($T = 15-40^\circ$) данные по кинетике конформационных переходов ДНК из исходного двухспирального состояния рН 5,9 в конечные были получены по возрастанию поглощения, хотя часть результатов, относящихся к переходам ДНК в состояния, соответствующие рН до резкого возрастания оптической плотности на кривой с.т., была измерена по уменьшению поглощения ДНК. Для 20° была получена также серия кинетических кривых, относящихся к переходам

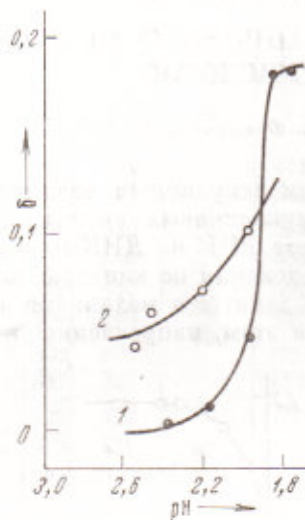


Рис. 2. Зависимость δ от рН. Температура 20° (1) и 30° (2)

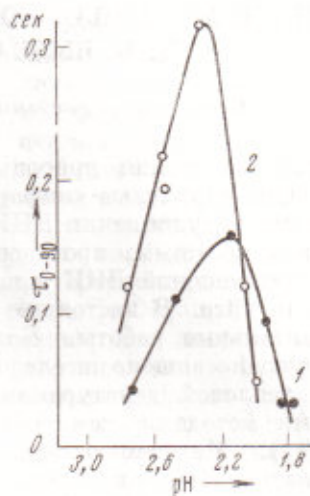


Рис. 3. Зависимость $\tau_{0-90\%}$ от рН. Температура 20° (1) и 30° (2)

ДНК из разных исходных состояний в одно и то же конечное.

Типичные кинетические кривые структурных переходов ДНК, вызванных резким возрастанием кислотности среды, приведены на рис. 1, где ΔD — разность оптических плотностей ДНК в момент времени t и исходного двухспирального состояния (рН 5,9). Результаты, представленные на рис. 1, относятся к 20° . Как видно из этих данных, при смещении рН до значений, соответствующих резкому возрастанию оптической плотности, структурный переход зарегистрировать полностью не удастся. Определенная часть нуклеотидов ДНК изменяет свое состояние за время, меньшее постоянной времени прибора ($3 \cdot 10^{-3}$ сек). Если обозначить изменение оптической плотности, происходящее за это время, через δ , тогда $\kappa = \Delta D - \delta$ будет представлять собой регистрируемую нами во времени долю изменения гипохромизма. Зависимость δ от температуры и концентрации вводимых в раствор ДНК водородных ионов представлена на рис. 2. Из этих данных следует, что доля нуклеотидов ДНК, изменяющих свое состояние за $t < 3 \cdot 10^{-3}$ сек, с уменьшением рН возрастает и температурный коэффициент сложным образом зависит от рН.

Другая характерная особенность структурного перехода ДНК обнаруживается при анализе регистрируемой части кинетических кривых, из которых следует, что кривая зависимости $\tau_{0-90\%}$ ($\tau_{0-90\%}$ — время, за которое изменение оптической плотности составляет 90% величины κ) от концентрации добавленных в раствор ДНК водородных ионов проходит через максимум (рис. 3). В среднем ошибка в определении $\tau_{0-90\%}$ при разных рН составляет 8%. Из сопоставления кривых с.т. и зависимости $\tau_{0-90\%}$ от рН для 20° видно, что самое низкое значение $\tau_{0-90\%}$ на левой ветви колоколообразной кривой рис. 3 соответствует рН 2,65 (на кривой с.т. рН 2,95) и приходится на область понижения оптической плотности относительно

исходного состояния. При смещении рН ниже 2,65 наблюдается возрастание величины $\tau_{0-90}\%$, которая достигает наибольшего значения при рН 2,2, совпадающего с положением максимума оптической плотности на кривой с.т. (рН 2,5). При рН ниже 2,2 τ_{0-90} уменьшается (правая ветвь). Максимальное значение τ_{0-90} составляет 160 мсек. для 20° и 320 мсек. для 30° и наблюдается соответственно при рН 2,2 и 2,4.

Приведенные выше экспериментальные данные позволяют высказать предположение о механизме конформационного перехода ДНК, вызванного кислотой.

При взаимодействии ДНК с кислотой в определенных местах молекулы происходит протонизация азотистых оснований, которая приводит к нарушению комплементарности в этих участках и инициирует образование «петель». Процесс образования таких петель протекает за время, меньшее постоянной времени прибора, и представляет собой нерегистрируемую стадию конформационного перехода. Относительно механизма этой стадии можно высказать гипотетические соображения. По-видимому, присоединение протона по двухспиральным участкам ДНК происходит по азоту N₇-гуанина с последующим переходом протона от азота N₁-гуанина к N₁-цитозину, которые связаны между собой в исходной структуре ДНК водородной связью. В результате этого образуется неустойчивая пара из зwitter-ионной структуры гуанина и протонизированной структуры цитозина, приводящая к образованию «петли».

Относительно регистрируемой стадии конформационного перехода предполагается, что она связана с расплетением двухспиральных участков полинуклеотидной цепи, находящихся между петлями, в которых число нуклеотидов n меньше или равно некоторому критическому значению $n_{кр}$. В этих участках нарушение комплементарного взаимодействия азотистых оснований компенсируется повышением энтропии. Инициатором такого расплетания могут быть поворотные-изомерные превращения нуклеотидов в петлях. Исходя из такого предположения, можно объяснить обнаруженную нами зависимость $\tau_{0-90}\%$ от рН на рис. 3. При низкой концентрации водородных ионов возникает небольшое количество «петель» и, следовательно, имеются как не способные к расплетанию при данной температуре спиральные участки с $n \gg n_{кр}$, так и участки, способные к расплетанию с $n < n_{кр}$. Последние при расплетании вносят основной вклад в изменение ΔD и τ_{0-90} . По мере возрастания кислотности уменьшается количество спиральных участков, не способных к расплетанию ($n > n_{кр}$), а в ΔD и $\tau_{0-90}\%$ больший вклад вносят расплетающиеся спиральные участки с $n = n_{кр}$. При этом $\tau_{0-90}\%$ растет, достигая максимального значения. При дальнейшем уменьшении рН практически исчезают участки, не способные к расплетанию, уменьшается число участков с $n_{кр}$ и возрастает количество участков с $n < n_{кр}$, что и определяет уменьшение $\tau_{0-90}\%$.

Из предложенного объяснения зависимости $\tau_{0-90}\%$ от рН следует, что измеряемые временные параметры относятся только к стадии расплетания спиральных участков ДНК, на которой происходит увеличение среднего размера петель и уменьшение их числа — стадия «сливания» петель.

Предлагаемый многоцентровый механизм расплетания находит подтверждение в наших предварительных исследованиях кинетики структурного перехода в зависимости от молекулярного веса и исходного состояния ДНК. Полученные нами данные по кинетике структурных переходов из некоторых исходных состояний ДНК, находящихся в одной области фазовой диаграммы, построенной с использованием гидродинамических и оптических методов, позволяют выявить различия в их состояниях. Например, при $T = 20^\circ$ удалось обнаружить различия в состояниях ДНК при рН среды 5,5 и 4,5 по временам структурных переходов, вызванных смещением рН раствора ДНК 5,5 → 2,3 и 4,5 → 2,3.

Этот метод оказался чувствителен и к сравнительно слабым примесям белка в ДНК. Например, $\tau_{0-90}\%$ структурного перехода, вызванного сме-

щением рН от 5,9 до 2,0, для ДНК с содержанием белка 1,5 и 0,1% составляет соответственно 240 мсек. и 190 мсек. Для этих препаратов наблюдались различия и в значениях δ .

Таким образом, кинетический метод позволяет исследовать локальные изменения в структуре полимера, вызванные различными причинами, и выявить тонкую структуру фазовой поверхности перехода «спираль — клубок».

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

Поступило
28 X 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ K. E. Reinert, *Physikalische Chemie biogener Makromolekule*, II Jenaer Symposium, 1963, S. 27. ² S. Takashima, E. A. Arnolds, *Biochim. et biophys. acta*, 94, 546 (1965). ³ Ю. М. Евдокимов, Я. М. Варшавский, *ДАН*, 170, № 5 (1966). ⁴ H. R. Massie, B. H. Zimm, *Biopolymers*, 7, 475 (1969). ⁵ D. M. Crothers, *J. Mol. Biol.*, 9, 712 (1964). ⁶ P. E. Davison, *Biopolymers*, 5, 715 (1967). ⁷ M. Ageno et al., *Biophysical J.*, 9, 11 (1969). ⁸ L. G. Bunville et al., *Biopolymers*, 3, 213 (1965). ⁹ Г. И. Георгиев, В. А. Стручков, *Биофизика*, 5, 745 (1960). ¹⁰ А. С. Шаломеев и др., *Изв. АН СССР, сер. хим.*, 1970, 1035.