

УДК 578.0888

БИОФИЗИКА

Е. М. МИЛЬ, С. К. ЗАВРИЕВ, Г. Л. ГРИГОРЯН, К. Е. КРУГЛЯКОВА

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ПЕРЕХОДОВ СПИН-МЕЧЕНОЙ ДНК

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 20 IV 1972)

В последние годы метод спиновых меток (и зондов) широко используется для изучения конформационных переходов в белках и ферментах (1-3). Что касается нуклеиновых кислот, то в литературе имеется пока ограниченное число работ (2-4), хотя перспективность использования этого метода для анализа структурных переходов в таких сложных макромолекулах бесспорна.

В настоящей работе показана возможность использования спин-меченого этиленимина (смЭИ) (4(β-N-этиленимино-пропионил)-оксип-2.2.6,6,

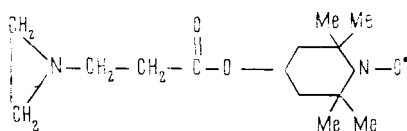
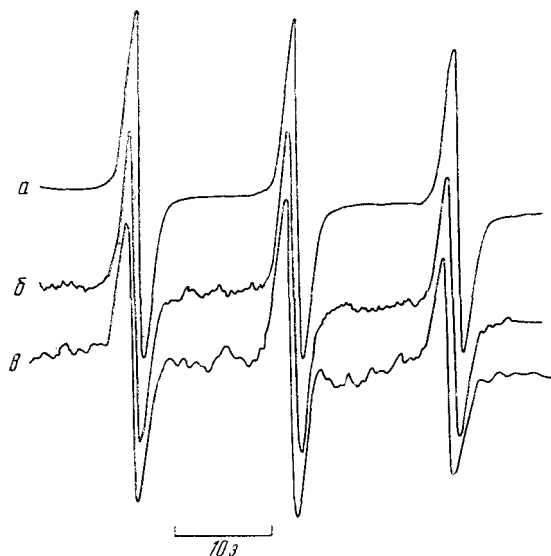


Рис. 1. Структурная формула спин-меченого этиленимина и его спектры э.п.р. *a* — в ацетатном буфере pH 5,5; *b* — после присоединения к ДНК, выделенным из тимуса телят и селезенки крыс; *в* — после присоединения к ДНК, выделенной из опухоли селезенки крыс, зараженных эритромиелозом



тетраметилпиперидин-1-оксил) (5) для изучения конформационных переходов в ДНК, выделенной из различных органов и тканей. Были использованы препараты ДНК № 1 (из тимуса телят), ДНК № 2 (из опухоли селезенки крыс, зараженных эритромиелозом); ДНК № 3 (из селезенки здоровых крыс). Препараты ДНК выделяли по методу Зьюби и Доти с последующей депротенинизацией по Кэю (6). Приводим основные характеристики исходных препаратов соответственно для ДНК № 1, № 2, № 3:

Содержание белка, %	3	3	1
E_{P260} мμ	6200	7030	6200
Концентрация, μг/мл	900	900	970

Реакцию присоединения смЭИ к ДНК проводили в 0,15 *M* ацетатном буфере pH 5,6 при 22° в течение 40 час.; остаток непрореагировавшей метки удаляли истощающим диализом; количество метки, связанной с ДНК, определяли сравнением спектров меченой ДНК, выдержанной в 0,2 *N* NaOH, с эталонным спектром. Электронномикроскопические фотографии, показатель нативности, а также у.-ф. спектры поглощения спин-меченой ДНК соответствовали нативной ДНК. На ДНК после диализа оставалось 1–2% связанной метки. Спектры всех трех препаратов спин-меченой ДНК в ацетатном буфере при 22° представляют собой слегка уширенный триплет со временем корреляции $\tau_c = 4,5 \cdot 10^{-10}$ сек. (рис. 1). Обра-

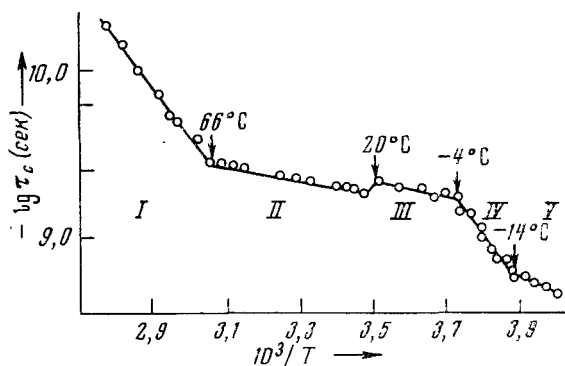


Рис. 2. Зависимость $-\lg \tau_c$ от $1/T^\circ K$ для спин-меченой ДНК тимуса телят в интервале температур от -20 до 100°

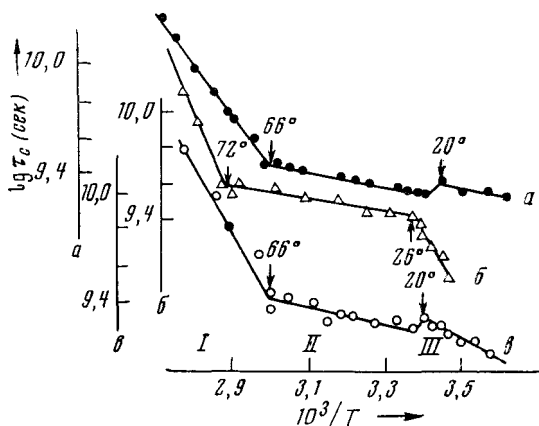


Рис. 3. Зависимость $-\lg \tau_c$ от $1/T^\circ K$ для спин-меченых ДНК: а — тимуса телят, б — опухоли селезенки крыс, зараженных эритромиелозом, в — селезенки крыс

ботка спектров проводилась согласно (7). Оценка расстояния между метками, сделанная по (8), свидетельствует об отсутствии взаимодействия между парамагнитными центрами. Для ДНК № 1 была снята зависимость времени корреляции метки (τ_c) от температуры в интервале температур от 20 до 90° . Поведение метки при измерении температуры может быть описано уравнением Аррениуса $\tau_c = \tau_0 \exp(E_{\text{эфф}}/RT)$, где τ_c — время корреляции, τ_0 — предэкспоненциальный множитель, $E_{\text{эфф}}$ — эффективная энергия активации. На рис. 2 приведена зависимость $-\lg \tau_c$ от $1/T^\circ K$, которая позволяет выделить пять линейных участков. Энергии активации, вычисленные по линейным участкам I, II, III, IV, V, приведены в табл. 1; этим участкам соответствуют 4 особые точки при -14° , -4° , $+20^\circ$, $+66^\circ$. Ошибка в измерении $E_{\text{эфф}} \pm 0,5$ ккал/моль·г.

Существенную роль в некоторых из этих переходов может играть вода, структурно связанная с

макромолекулой ДНК. В настоящем случае наличие фазовых переходов при -14 и -4° , по-видимому, можно связать именно с изменением физических свойств воды. В пользу этого свидетельствуют работы Привалова (9), в которых эти переходы определены методом колориметрирования. Точка -4° приписывается образованию айсбергов раствора, а -14° — плавлению структурированной воды в гидрооболочке ДНК. Близкие по значению точки переходов обнаружены ранее методом спинового зонда в работах (4).

Изменения, наблюдаемые в интервале положительных температур, могут быть сопоставлены с границей функциональной активности ДНК. Из-

вестно, что с 20° ДНК начинает проявлять свою биологическую активность, а при температурах выше 60° начинается процесс «плавления» ДНК, приводящий к денатурации всей молекулы.

Было проведено сравнительное изучение структурных изменений молекулы ДНК различного происхождения в положительном температурном интервале от 10–90° (рис. 3). На кривой зависимости $-\lg \tau_c$ от $1/T$ °К можно выделить три линейных участка с точками переходов, образующих низкотемпературную форму (участок III), область «биологически активной» молекулы (участок II), высокотемпературную форму молекулы ДНК

Таблица 1

ДНК	$E_{эфф}$ (ккал/моль·г)				
	I	II	III	IV	V
№ 1	11,5	1,7	3,7	11,5	3,3
№ 2	19,8	2,1	13,8	—	—
№ 3	12,6	2,0	4,8	—	—

(участок I). Точки пересечения прямых I–II и II–III для ДНК №№ 1 и 3 равны соответственно 20 и 66°, а для ДНК № 2 26 и 72°.

Следует отметить наличие хорошо воспроизводимого перехода при 20°, для которого характерно скачкообразное замедление вращательной подвижности спин-метки.

Значение $E_{эфф}$, приведенное в табл. 1, показывает, что в области II, названной нами областью «биологически активной» молекулы, реализуется минимальная эффективная энергия активации (1–2 ккал/моль), одинаковая для всех трех ДНК. Подобные энергии активации свидетельствуют о жесткой стабильной структуре, мало меняющей свою конформацию под действием температурного скачка. Именно в этом интервале, вероятно, могут происходить динамические процессы разрыва и восстановления водородных связей.

Возрастание энергии активации при переходе в более высокую или низкую температурную область свидетельствует о конформационных изменениях в структуре ДНК. Эти переходы, по-видимому, могут быть связаны со скачкообразным изменением числа витков спирали, приходящегося на единицу длины молекулы ДНК; не исключено, что изменение молекулы, происходящее при 20°, приводит к структурному соответствию ДНК и белка, необходимому для биологического функционирования нуклеопротеида. Переход при 66° можно связать с так называемыми предденатурационными изменениями структуры ДНК, которые отмечались в ряде работ (¹⁰, ¹¹).

Как видно из рис. 3 и табл. 1, наблюдается существенное отличие поведения ДНК из опухолевой ткани (ДНК № 2) от ДНК из нормальных тканей (ДНК № 1, ДНК № 3). ДНК № 2 отличается как более высокими значениями энергий активаций на участках I и III, так и более высокими температурами фазовых переходов (26 и 72°). Этот факт представляет самостоятельный интерес и будет дополнительно изучен и обсужден в дальнейшем.

Таким образом, использование метода спиновой метки позволило обнаружить 4 точки фазового перехода для ДНК, выделенной из нормальной ткани, и выявить некоторые различия в поведении молекул ДНК из нормальных и опухолевой ткани при изменении температуры.

Авторы выражают искреннюю благодарность акад. Н. М. Эмануэлю за внимание и интерес к работе.

- ¹ O. H. Griffith, A. S. Waggoner, *Account Chem. Res.*, **2**, № 1 (1969).
- ² I. C. P. Smith, T. Iamone, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **58**, № 3, 884 (1967).
- ³ B. Hoffman, P. Schofield, A. Rich, *ibid.*, **62**, № 4, 1195 (1969).
- ⁴ Б. И. Сухоруков, А. А. Козлова, *Биофизика*, **15**, в. 3, 539 (1970); Б. И. Сухоруков, Л. А. Козлова и др., *ДАН*, **177**, № 2, 454 (1967).
- ⁵ А. Б. Шаниро, В. И. Сускина и др., *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **1969**, 2828; Е. М. Миль, Г. Л. Григорян и др., *Тез. симп. Свободнорадикальные состояния и их роль при лучевом поражении и злокачественном росте*, М., 1971.
- ⁶ G. Zubay, P. Doty, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 6207 (1956); E. R. M. Kay, N. S. Simmons, A. A. Dounce, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1724 (1952).
- ⁷ А. Л. Бучаченко, А. М. Вассерман, *ЖСХ*, **8**, 24 (1967).
- ⁸ А. И. Кокорин, К. И. Замараев, Г. Л. Григорян и др., *Биофизика*, **17**, № 1, 34 (1972).
- ⁹ П. Л. Привалов, К. А. Кафиани и др., В сборн. *Нуклеиновые кислоты*, Тр. II конф. по нуклеиновым кислотам, М., 1966.
- ¹⁰ D. Luzzati, A. Nicolaeff, F. Mason, *J. Mol. Biol.*, **3**, 185 (1961).