

М. А. НОВОСЕЛЕР, В. М. АСЛАНЯН

## ИССЛЕДОВАНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ И ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СТАТИСТИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ ДНК-ПОЛИ-L-ЛИЗИН

### 1. Распределение поли-L-лизина и стабильность свободных участков ДНК

Исследовались комплексы ПЛ-ДНК различного происхождения (тимуса теленка фага  $T_2$ , *E. coli*), составленные методом непосредственного смешивания. Показано, что поли-L-лизин (ПЛ) распределяется на всех молекулах ДНК далеко отстоящими друг от друга кластерами, независимо от происхождения ДНК; рост стабильности свободных участков комплексов ДНК-ПЛ определяется эффектом Шефлера и блочностью структуры исследуемых ДНК.

Проблема взаимодействия ДНК с основными белками-гистонами и протаминами, входящими в состав хромосом эукариотических клеток, является одной из основных в молекулярной биологии. Естественные комплексы обладают исключительной сложностью организации. Поэтому прямые исследования характера взаимодействий, реализующихся в нуклеопротендах, и их структуры малоинформационны в силу ограниченности возможностей физических методов. Однако достаточно полезные сведения относительно физических принципов организации и особенностей поведения этих систем можно получить на основании исследований комплексов ДНК с синтетическими полипептидами (поли-L-лизином, поли-L-аргинином и их статистическими сополимерами), более или менее полно моделирующими молекулы гистонов.

В настоящей статье обобщается экспериментальный материал, полученный при изучении взаимодействия ПЛ, удовлетворительно моделирующего фракцию  $F_1$  гистона, с ДНК различного происхождения. Сравнительный анализ данных позволяет получить информацию о некоторых особенностях физической организации комплексов и ее зависимости от гетерогенности ДНК.

*Материал и методика.* Комплексы составлялись непосредственным смешиванием растворов ДНК (5  $\gamma$ /мл) с растворами ПЛ (10  $\gamma$ /мл) при ионной силе  $10^{-2}$  М NaCl +  $10^{-3}$  М цитрата Na. Использовались ДНК трех типов—тимуса теленка ( $M=15 \cdot 10^6$ ), *E. coli* ( $M=11 \cdot 10^6$ ) и фага  $T_2$  ( $M=1,2 \cdot 10^8$ ), любезно предоставленные Г. П. Георгиевым и Р. Б. Хесниным, а также поли-L-лизин-НВг фирмы «Pilot» ( $M=52 \cdot 10^3$ ). Кривые плавления снимались спектрофотометрически с использованием специально сконструированного устройства.

*Результаты и обсуждение.* Зависимость оптической плотности комплексов от температуры описывается двухступенчатой кривой плавления.

ния (рис. 1). Первая ступень обусловлена вы плавлением свободных участков ДНК, вторая—комплексных участков. Каждую из ступеней мы характеризуем четырьмя параметрами: температурой плавления ( $T_m$ ), началом плавления ( $T_0$ ), интервалом плавления ( $\Delta T$ ) и величиной гиперхромизма ( $H$ ). На рис. 2 приведены зависимости каждого из параметров первой ступени плавления от содержания ПЛ в комплексе, характеризуемого отношением  $NH_2/P$ .

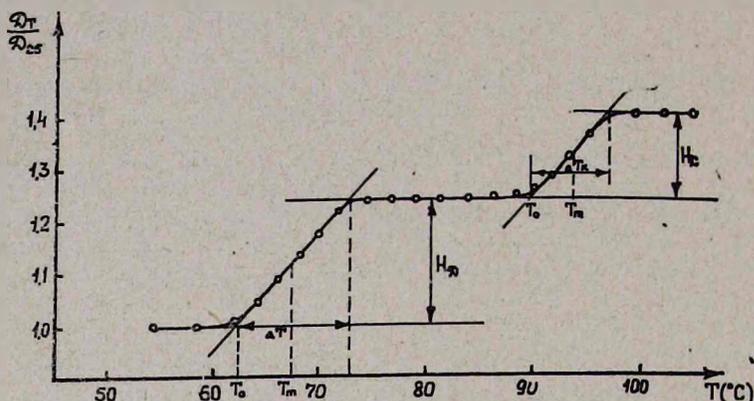


Рис. 1. Характерная кривая плавления комплекса ПЛ—ДНК.

С увеличением ПЛ в комплексе доля свободной ДНК уменьшается, а соответственно гиперхромизм должен падать (рис. 2, а). Экстраполяция линейной зависимости  $H_D$  от  $NH_2/P$  до значений  $H_D=1$  позволяет определить количество пар азотистых оснований ДНК, экранируемых одной молекулой ПЛ, т. е. определить стехиометрию комплекса. Для ДНК тимуса тельца  $NH_2/P=1,1:1$ ; а для ДНК *E. coli* и фага  $T_2$ —1:1. (Прямые через экспериментальные точки проводились по методу наименьших квадратов). Следовательно, в нашем случае одна молекула ПЛ экранирует 130 пар оснований.

Температура плавления первой ступени ( $T_m^D$ ) ДНК тимуса тельца возрастает по мере увеличения содержания ПЛ в комплексе. В литературе было предложено два объяснения.

У всех рассматриваемых нами комплексов двухступенчатость выражена достаточно четко ( $T_m^k - T_m^D = 27^\circ$  для ДНК тимуса тельца и ДНК фага  $T_2$  и  $12^\circ$ —для ДНК *E. coli*). Двухступенчатый характер кривой плавления свидетельствует о том, что ПЛ обладает очень высоким коэффициентом связывания с нативной ДНК. Тогда свободные части ДНК, скрепленные на концах молекулами ПЛ, можно рассматривать как замкнутые «шпильки». Вместе с тем, Шефлером было показано [6], что замкнутые «шпильки» стабильнее открытых полимерных цепей. Более того, температура плавления замкнутой «шпильки» растет по мере уменьшения ее длины. Метод оценки сдвига  $T_m$  при изменении длины «шпильки» разработан в работе Субирана [7]. Расчеты, проведенные в рамках этого метода, свидетельствуют о том, что сво-

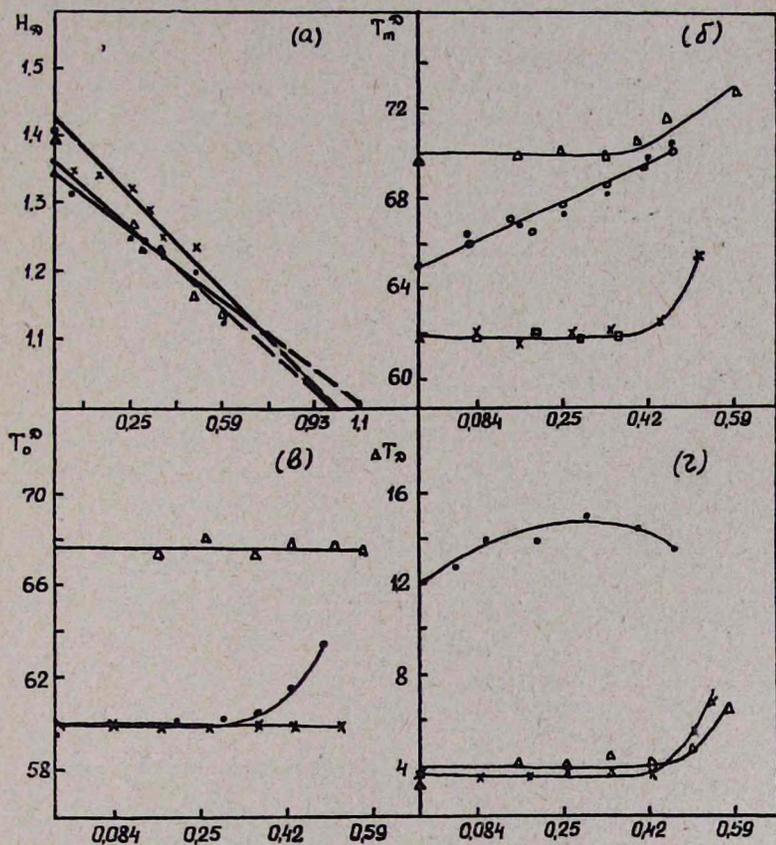


Рис 2. Зависимость параметров плавления свободных участков ДНК от отношения  $NH_2/P$ . ●, ○ — ДНК тимуса теленка; x, □ — ДНК фага  $T_2$ ; Δ — ДНК *E. coli* на рис. 26 и □ — относятся к ДНК, дробленным пропусканием через шприц до молекулярных весов  $3 \cdot 10^6$ .

бодные участки в среднем должны содержать 170 пар оснований при  $NH_2/P=0,33$ , поскольку  $T_m^D$  возрастает на  $2,5^\circ$ . Предполагая, что ПЛ равномерно распределяется вдоль ДНК, полученное значение средней длины свободных участков можно считать разумным. Однако следует проявить определенную осторожность, поскольку при нашем способе приготовления растворов могут возникать флюктуации концентраций, что, несомненно, будет препятствовать равномерному распределению ПЛ.

Эффект возрастания  $T_m^D$  можно также объяснить преимущественным связыванием ПЛ с участками ДНК, обогащенными АТ-парами. Тогда свободные участки обогащаются ГЦ-парами, что должно сопровождаться их стабилизацией. Отметим, что такое объяснение эффекта возможно для комплексов, приготовленных диализом [4, 5]. Метод же непосредственного смешивания растворов, используемый нами, приводит к случайному распределению молекул ПЛ по молекулам ДНК

[3, 8]. При этом маловероятен процесс перераспределения ПЛ из-за большого коэффициента связывания ПЛ с ДНК.

Таким образом, оба возможных объяснения возрастания  $T_m^D$  по мере увеличения отношения  $NH_2/P$  упираются в вопрос о распределении ПЛ на молекулах ДНК. Поэтому для выяснения характера распределения ПЛ на ДНК нами был проведен контрольный эксперимент.

Растворы комплекса с отношением  $NH_2/P=0,17$  центрифугировались при 105000 г в течение 2 час. Кривые плавления супернатанта и перерастворенного в буфере осадка приведены на рис. 3 и свидетель-

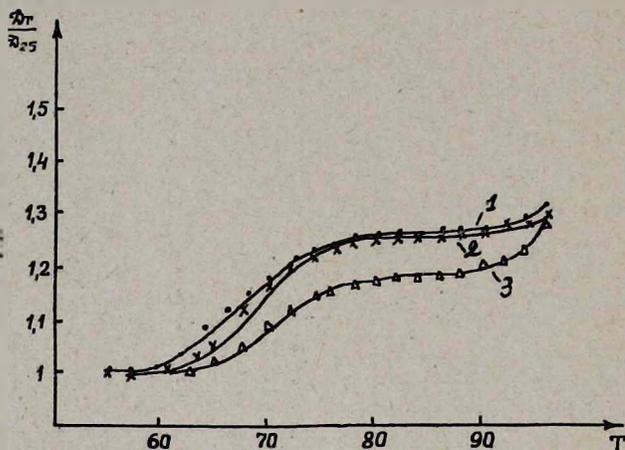


Рис. 3. Кривые плавления исходного комплекса (1) с отношением  $NH_2/P=0,17$ , супернатанта (2) и перерастворенного в буфере осадка (3). В супернатанте находится 55% ДНК, в осадке—45.

ствуют о распределении ПЛ практически по всем молекулам ДНК, т. е. если даже ПЛ и перераспределяется на АТ-блоки, то это перераспределение происходит некооперативно. Однако, как мы увидим ниже, у нас нет достаточных оснований для полного отказа от второй концепции в случае ДНК тимуса телят. Как известно, геном выших организмов представляет собой сочетание достаточно длинных участков (блоков), отличающихся друг от друга средним нуклеотидным составом [1]. Геном же ДНК фага  $T_2$  представляет собой один блок, в котором последовательность оснований носит статистический характер. Это обстоятельство позволяет оценить роль эффекта Шефлера в стабилизации свободных участков ДНК (рис. 2, б). Из рис. видно, что для этой системы эффект Шефлера начинает проявляться лишь при отношениях  $NH_2/P > 0,42$ . Это означает, что молекулы ПЛ распределяются на молекулах ДНК довольно неравномерно, кластерами, удаленными друг от друга на большие расстояния. Совокупность полученных результатов позволяет считать, что при низких отношениях  $NH_2/P$  возрастание  $T_m^D$  у ДНК тимуса телят обусловлено преимущественным взаимодействием с АТ-блоками, эффект же Шефлера проявляется при более высоких отношениях  $NH_2/P$ .

Заключение о существовании преимущественного связывания ПЛ с АТ-блоками ДНК тимуса теленка обосновывается нами как результат количественного соотношения АТ- и ГЦ-блоков в геноме ДНК тимуса теленка. Действительно, хотя ГЦ-состав блоков в ДНК тимуса теленка изменяется от 32 до 62%, средний ГЦ-состав ДНК тимуса теленка равен 42%. Наши рассуждения подтверждаются результатами исследований комплексов ПЛ с ДНК *E. coli*, ГЦ-состав которой изменяется от 39 до 51%. Одновременно известно, что АТ-блоки составляют только 3,3% всей ДНК [2], а средний ГЦ-состав равен 51%. Как и следовало ожидать, стабилизация свободных участков ДНК *E. coli* проявляется лишь при отношениях  $NH_2/P > 0,42$  (рис. 2, б).

Наконец, для того чтобы исключить возможные артефакты, обусловленные различными молекулярными весами исследуемых ДНК, мы повторили всю серию экспериментов с ДНК, многократно пропущенными через шприц. Этот процесс сопровождается дроблением ДНК. В результате были получены гомогенные ДНК с молекулярным весом  $3 \cdot 10^6$ . Нами было установлено, что эффект стабилизации не зависит в исследуемом интервале изменений  $NH_2/P$  от молекулярных весов ДНК, а также от полидисперсности образцов (кружки на кривых 2, б относятся к ДНК с молекулярным весом  $3 \cdot 10^6$ ).

Обратимся теперь к поведению параметров, упомянутых выше. Значение параметра  $T_0^D$  (рис. 2, в) не меняется с ростом содержания ПЛ для ДНК фага  $T_2$  и *E. coli* даже при отношениях  $NH_2/P > 0,5$ . У ДНК тимуса теленка наблюдается возрастание  $T_0^D$  при отношениях  $NH_2/P > 0,33$ . Это означает, что на молекулах ДНК остаются свободными довольно большие участки в полном согласии с кластерным характером посадки ПЛ на ДНК, которые выплавляются при прежних температурах. Поскольку же в случае ДНК тимуса теленка ПЛ, как было показано выше, распределяется предпочтительно по АТ-блокам, то возрастание  $T_0^D$  должно проявляться раньше (увеличение  $T_0^D$  обусловлено, очевидно, уменьшением относительной доли АТ-блоков, обладающих меньшей стабильностью, чем ГЦ-блоки).

На рис. 2, г приведена зависимость интервала плавления свободных участков ДНК от отношения  $NH_2/P$ . Как видно из рисунка, для гомогенной ДНК фага  $T_2$  и ДНК *E. coli*, блочная структура которой весьма слабо выражена, интервал плавления не меняется вплоть до соотношений  $NH_2/P$ , при которых расстояния между кластерами молекул ПЛ становятся достаточными для проявления эффекта Шефлера. Увеличение  $\Delta T^D$  при отношениях  $NH_2/P > 0,42$  можно объяснить проявлением гетерогенности по длинам свободных участков ДНК, что вполне оправдано из-за статистического характера посадки ПЛ на ДНК и существенной зависимости стабильности «шпиклек» от их длины.

Для ДНК тимуса теленка наблюдается слабое возрастание  $\Delta T^D$  (на  $1,5^\circ$ ) при низких отношениях  $NH_2/P$ , что можно объяснить слабо выраженной гетерогенностью свободных участков по длинам. При высоких отношениях  $NH_2/P$   $\Delta T^D$  заметно уменьшается. Здесь следу-

ет отметить, что интервалы плавления исходных образцов ДНК существенно отличаются друг от друга. Если у ДНК фага  $T_2$  и ДНК *E. coli* они малы (соответственно  $4^\circ$  и  $5^\circ$ ), то интервал плавления ДНК тимуса телят равен  $12^\circ$ . Столь высокое значение  $\Delta T$  для ДНК тимуса телят обусловлено главным образом ее блочной структурой. Уменьшение  $\Delta T$  этой ДНК наблюдается при отношениях  $NH_2/P$ , при которых начинает проявляться эффект Шефлера, обусловленный главным образом длиной «шпильки» и практически не зависящий от ее нуклеотидного состава. Поэтому можно думать, что благодаря проявлению эффекта Шефлера практически нивелируется гетерогенность, обусловленная составом. Соответственно при значительных отношениях  $NH_2/P$  величины  $\Delta T$  для ДНК фага  $T_2$  и ДНК *E. coli*, с одной стороны, и ДНК тимуса телят, с другой, должны сближаться, что и наблюдается в эксперименте.

Итак, из анализа поведения параметров, характеризующих плавление свободных участков ДНК, следует, что ПЛ распределяется кластерами на молекулах ДНК любого происхождения; рост стабильности свободных участков ДНК тимуса телят обусловлен как эффектом Шефлера, так и их обогащением ГЦ-парами оснований; преимущественное взаимодействие ПЛ с АТ-парами ДНК тимуса телят — результат большего количества АТ-блоков в ДНК генома тимуса телят; стабилизация свободных участков ДНК *E. coli* и ДНК фага  $T_2$  обуславливается исключительно эффектом Шефлера.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 24.XII 1975 г.

Մ. Ա. ՆՈՎՈՍԵԼԵՐ, Վ. Մ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ

ԴՆԹ—ՊՈԼԻ—L—ԷԻՆԻՋԻ ՍՏԱՏԻՍՏԻԿ ԿՈՄՊԼԵՔՍԵՆՆԵՐԻ ԿԱԶՄԱՎՈՐՄԱՆ ԵՎ ՅԻՋԻԿԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ

1. Պոլի—L—լիզինի բաշխումը և ԴՆԹ-ի ազատ հատվածների կայունությունը

Ա մ փ ո փ ո ս մ

Հետազոտվել են տարբեր ծագման ԴՆԹ-ի (հորթի տիմուս, *E. coli*  $T_2$  ֆագի) և պոլիլիզինի (ՊԼ) կոմպլեքսները, առաջացած անմիջական խառնուրդի մեթոդով:

Ցույց է տրված, որ 1. ՊԼ-ը բաշխվում է ԴՆԹ-ի բոլոր մոլեկուլների վրա, որոնք գտնվում են լուծույթում, իսկ ամեն մի ԴՆԹ-ի մոլեկուլի հրկայնքով ՊԼ-ը բաշխվում է իրարից հեռու գտնվող «բլաստերներով» անկախ ԴՆԹ-ի ծագումից, 2. ՊԼ—ԴՆԹ կոմպլեքսների ազատ հատվածների կայունության աճը պայմանավորված է  $NH_2/P > 0,42$  հարաբերությունների դեպքում հիմնականում Շեֆլերի էֆեկտով, իսկ  $NH_2/P < 0,42$  հարաբերությունների դեպքում՝ հետազոտվող ԴՆԹ-ի «հատվածային» կառուցվածքով:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Шугалий А. В., Франк-Каменецкий М. Д., Лазуркин Ю. С. Мол. биол., 4, 2, 257, 1970.
2. Jamagishi H. J. Mol. Biol. 49, 603, 1970.
3. Li H. J., Chang C., Welskopf M., Brand B., Rotter A. Biopolymers 13, 4, 649, 1974.
4. Ohba J. BBA, 123, 76, 1966.
5. Olins D. E., Olins A. L., von Hippel P. H. J. Mol. Biol., 24, 157, 1967.
6. Scheffler Y. E., Elson E. L., Baldwin R. L. J. Mol. Biol., 48, 145, 1970.
7. Subirana J. A. J. Mol. Biol., 74, 363, 1973.
8. Tsuboi M., Matsou K., Ts'o P. J. Mol. Biol., 15, 256, 1966.