

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТАМИНА НА МАКРОМОЛЕКУЛАХ ДНК
 РАЗНОГО ГЦ-СОДЕРЖАНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ
 СВОБОДНЫХ УЧАСТКОВ ДНК

М. А. НОВОСЕЛЕР

Исследована термическая денатурация комплексов протамина с ДНК тимуса теленка, ДНК *E. coli* и ДНК фага T_2 , полученных методом непосредственного смешивания. Показано, что молекулы протамина распределяются на макромолекулах ДНК кластерами. Размер кластеров и расстояние между ними зависят от стерической доступности большого желоба двойной спирали ДНК.

Ключевые слова: протамин, макромолекулы, стабильность ДНК.

Нуклеопротамины являются самыми простыми комплексами ДНК-основной белок, найденными в клетках эукариотов. Согласно данным термической денатурации и кругового дихроизма, наиболее близки к природным нуклеопротаминам искусственные комплексы ДНК-протамин, полученные методом непосредственного смешивания компонентов при низких ионных силах [7]. Поэтому особый интерес представляет изучение распределения молекул протамина на макромолекулах ДНК при образовании комплексов вышеназванным методом. Этому и посвящена настоящая работа.

Материал и методика. Нами исследовались термическая денатурация комплексов протамина с ДНК тимуса теленка (фирмы «Sigma»), ДНК *E. coli* и ДНК фага T_2 (образцы любезно предоставлены Р. Б. Хесиним). Эти ДНК ($c=7 \times 10^{-10}$ моль/литр) смешивались с протаминсульфатом (фирма «Sprofa», $c=1.4 \times 10^{-6}$ моль/литр) в водных растворах, содержащих 10^{-2} М NaCl + 10^{-3} М цитрата Na. Профили плавления регистрировались с помощью спектрофотометра СФ-4, снабженного термостатирующим устройством, в кювете с длиной оптического пути 40 мм.

Результаты и обсуждение. Комплексы протамина с ДНК тимуса теленка и ДНК *E. coli* обнаруживают ярко выраженное двухфазовое плавление: $T_m^* - T_m > 20^\circ$, где T_m и T_m^* — температуры плавления свободных и связанных с белком участков ДНК. В случае комплекса протамин-ДНК фага T_2 двухфазовость выражена слабо: $T_m^* - T_m = 2-5^\circ$, (рис. 1).

Фиксируемые для различных отношений протамин/ДНК (NH_2/P) значения температур плавления (T_m) и гиперхромностей (H_D), обусловленные плавлением свободной ДНК, достаточно хорошо описываются линейным приближением метода наименьших квадратов (рис. 2 а, б).

Стехиометрия в изученных комплексах оказалась равной: для ком-

плексов протамина—ДНК тимуса телянка—1,06:1; протамин—ДНК *E. coli*—1,1:1; протамин—ДНК фага T_2 —1:1. Следовательно, одна молекула протамина нейтрализует на макромолекулах ДНК тимуса телянка и ДНК *E. coli* по 11 пар, а на ДНК фага T_2 —12 пар оснований.

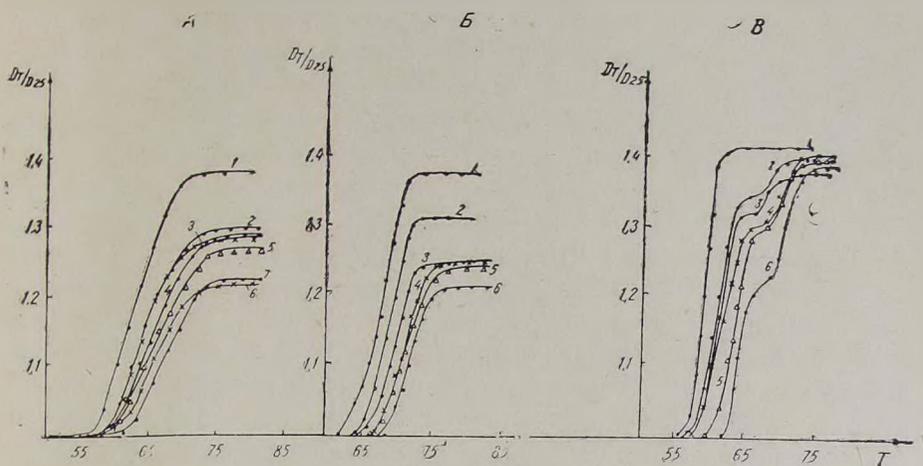


Рис. 1. Кривые термической денатурации комплексов протамина—ДНК разного ГЦ—содержания, регистрируемые при 259 нм для ряда отношений катионов пептида к фосфатам ДНК (NH_2/P), А—протамин—ДНК тимуса телянка. Отношения NH_2/P : 1—0; 2—0,07; 3—0,17; 4—0,24; 5—0,32; 6—0,4; 7—0,45. Б—Протамин—ДНК *E. coli*. Отношения NH_2/P : 1—0; 2—0,1; 3—0,2; 4—0,34; 5—0,43; 6—0,54. В — протамин—ДНК фага T_2 . Отношения NH_2/P : 1—0; 2—0,15; 3—0,21; 4—0,28; 5—0,4; 6—0,56. Растворителем служит 10^{-2} М NaCl + 10^{-3} М цитрат Na.

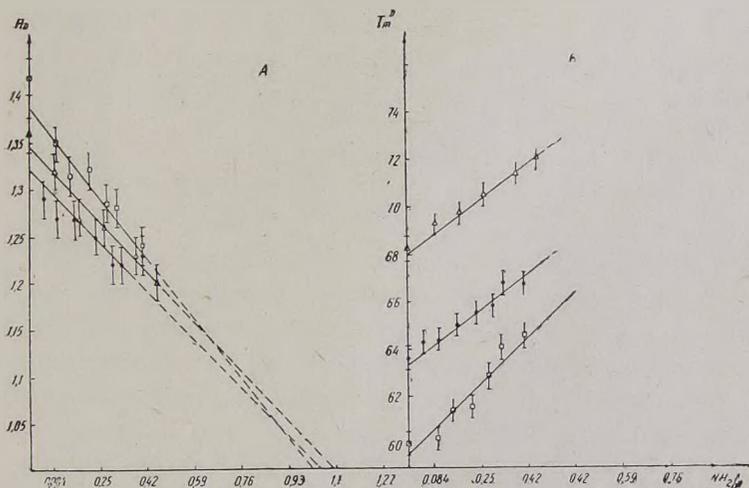


Рис. 2. Зависимость относительного гиперхромизма (А) и температуры плавления (Б) свободных участков ДНК от содержания протамина в комплексе. ● — ДНК тимуса телянка, △ — ДНК *E. coli*, □ — ДНК фага T_2 .

Известно [8], что если комплекс образован методом непосредственного смешивания, то протамин распределяется по всем молекулам ДНК, находящимся в растворе. Протяженности свободных и закрытых протамином участков ДНК определялись нами по нормированным методом наименьших квадратов значениям T_m и N_D с помощью выкладок, следующих из теоретических работ Ахрема, Ландо, Андрианова [1]. Результаты приведены в таблице. Видим, что молекулы протаминна располагаются вдоль макромолекул ДНК кластерами, которые содержат по 4—5 молекул лиганда. Если решетками служат макромолекулы ДНК тимуса телянка и ДНК *E. coli*, и 3 молекулы лиганда при комплексовании с ДНК фага T_2 . Интересно, что значения n , l , а также изменение расстояний между кластерами по мере насыщения решетки свидетельствуют о более равномерном распределении лиганда на ДНК фага T_2 по сравнению с ДНК тимуса телянка и ДНК *E. coli*. Различия в распределении лиганда на решетке следуют уже из вида самих кривых плавления, на что указывалось выше (рис. 1). Все вместе свидетельствует о том, что различное распределение лиганда на решетках обусловлено не их ГЦ-содержанием, а тем, что ДНК фага T_2 гликозилирована. По-видимому, расположение глюкозы в большой канавке ДНК фага T_2 [4] ослабляет связывание протаминна с ней, способствуя более равномерному распределению молекул лиганда на решетке.

Наши результаты свидетельствуют в пользу аналогичного расположения протаминов и гистонов относительно бороздок ДНК в ДНП. С помощью метилирования двойной спирали ДНК по малой и большой бороздкам было показано, что гистоны оставляют малую бороздку ДНК открытой и взаимодействуют с сахарофосфатным остовом ДНК преимущественно со стороны ее большой бороздки [2].

Кооперативное связывание лигандов с ДНК, по Олинсу [5] и Драперу [3], вызывается тем, что первые молекулы лигандов могут изменить каким-то образом конформацию или плотность заряда ДНК. При этом второй и последующим молекулам требуется потратить меньше свободной энергии, чем первой молекуле, для распространения искажения конформации решетки. Можно думать, что при взаимодействии протаминна с ДНК тимуса телянка и ДНК *E. coli* решетка деформируется сильнее, чем при взаимодействии с ДНК фага T_2 . Поэтому кластеры на ДНК фага T_2 содержат 3 молекулы протаминна, а на ДНК тимуса телянка и ДНК *E. coli*—по 4—5.

Исследование стабильности свободных от протаминна участков ДНК показало, что по мере добавления протаминна температура плавления свободных участков (T_m^D) растет (рис. 1Б). Можно думать, что из-за достаточно большого коэффициента связывания протаминна с ДНК свободные участки ее можно рассматривать как замкнутые «шпильки», стабильность которых согласно Шефлеру [6] больше, чем у открытых полимерных цепей, и растет по мере уменьшения длины «шпильки». Действительно, возрастание T_m при увеличении насыщенности решетки для исследованных ДНК описывается следующими уравнениями:

ДНК тимуса теленка				ДНК E. coli				ДНК фага T ₂			
NH ₂ /P	l ₁	l ₂	n	NH ₂ /P	l ₁	l ₂	n	NH ₂ /P	l ₁	l ₂	n
0	—	—	—	0	—	—	—	0	—	—	—
0,059	670	43	4	0,1	450	44	4	0,11	233	29	3
0,118	335	46	4	0,197	197	44	4	0,15	170	30	3
0,17	233	41	4	0,28	143	50	4	0,21	123	33	3
0,236	168	45	4	0,38	105	59	5	0,29	89	36	3
0,296	134	50	4	0,48	83	68	6	0,33	79	38	3
0,34	116	57	5					0,41	63	45	4
0,41	97	59	5								

l₁—средняя длина свободных участков ДНК.

l₂—средняя длина закрытых белком участков ДНК.

n—среднее число молекул лиганда в кластерах.

$$\text{ДНК тимуса теленка } \bar{J}_{j(1)} = 63,6 + 7,93 x_{i(1)}$$

$$\text{ДНК E. coli } \bar{J}_{j(1)} = 68,3 + 7,94 x_{i(1)}$$

$$\text{ДНК фага T}_2 \bar{J}_{j(1)} = 59,45 + 12,26 x_{i(1)}$$

Видим, что $lg \alpha$ прямой, описывающей возрастание T_m свободных участков ДНК фага T₂ больше, чем $lg \alpha$ соответствующих прямых для ДНК тимуса теленка и ДНК E. coli. Это обусловлено, как мы показали выше, более равномерным распределением молекул протамин по макромолекулам ДНК фага T₂ и, следовательно, меньшей длиной свободных участков ДНК.

Автор выражает признательность Д. Ю. Ландо за весьма полезное обсуждение результатов работы.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 3.XII 1979 г.

ՊՐՈՏԱՄԻՆԻ ԲԱՇԽՈՒՄԸ ՏԱՐԲԵՐ ԳՅ- ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՒԹՅԱՆ
ԴՆԹ-Ի ՄՈՒԵԿՈՒԼՆԵՐԻ ՎՐԱ ԵՎ ԴՆԹ-Ի ԱԶԱՏ ՀԱՏՎԱԾՆԵՐԻ
ԿԱՅՈՒՆՈՒԹՅՈՒՆԸ

Մ. Ա. ՆՈՎՈՍԵԼԵՐ

Ուսումնասիրվել է անմիջական խառնման մեթոդով ստացված պրոտամինի ԴՆԹ (հորթի տիմուսի, E. coli, T₂ ֆագի) կոմպլեքսների շերմային դենատուրացիան: Հալման կորերից Ախրեմի և ուրիշների առաջարկած մեթոդով որոշվել են ԴՆԹ-ի ազատ և պրոտամինով ծածկված հատվածների երկարությունները: Հեղինակը գտնում է, որ քլաստերների չափը և նրանց միջև եղած հեռավորությունը կախված են ԴՆԹ-ի կրկնակի պարուրի մեծ ակոսի տարածական մատչելիությունից:

ԴՆԹ-ի ազատ հատվածների կայունությունը աճում է պրոտամինի մոլեկուլներով ԴՆԹ-ի հագեցմանը զուգընթաց և կախված է միայն ԴՆԹ-ի երկայնքով իրականների բաշխման եղանակից, այլ ոչ թե նրանց ԳՅ- պարունակությունից:

M. A. NOVOSELER

Thermal denaturation of direct mixed complexes of protamine with calf thymus DNA, *E. coli* DNA and phage T₂ DNA has been studied. Lengths of free and protamine-covered regions of DNA were defined from melting curves using method proposed by Achrem and others. It has been shown that molecules of protamine are distributed on the DNA macromolecules by clusters. The size of clusters and distance between them is supposed to depend on steric accessibility of double stranded DNA large groove. Stability of free regions of DNA increases linearly as DNA saturation by protamine molecules increases and depends on ligands distribution mode along DNA lattice and not on their GC-content.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ахрем А. А., Ландо Д. Ю., Андрианов В. Т. ДАН БССР, 21, 5, 463, 1977; Мол. биол., 11, 3, 555, 1977.
2. Мирзибеков А. Д. Тез. симпоз. докл. 4 го биохим. съезда, 74, JL, 1979.
3. Draper D. E., P. H. von Hippel. J. Mol. Biol., 122, 339, 1978.
4. Olins D. E. J. Mol. Biol., 43, 439, 1969.
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. Sh. S. Li, Shih T. Y. Biochemistry, 15, 2027, 1976.
8. Yu Sh. S., Li H. J. Biopolymers, 12, 2777, 1973.