

МОДЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОСОБЕННОСТЕЙ СТРУКТУРЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В РАСТВОРАХ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ

А. Г. ГАБРИЕЛЯН, Н. А. ГУКАСЯН, А. Г. АРАКЕЛЯН

Изучены особенности гидратации различных групп нуклеиновых кислот в условиях компактизации молекул ДНК в присутствии ПЭГ. Наибольшее влияние ПЭГ оказывает на фосфатные группы: происходит сильная дегидратация фосфатов нуклеозидов и значительно изменяются термодинамические параметры переноса этих соединений из растворов, не содержащих ПЭГ, в ПЭГ-содержащие растворы.

Ընկերակցված է՝ նուկլեինաթթուների տարբեր խմբերի հիդրատացիայի առանձնահատկությունները ՊԷԳ-ի ներկայությամբ: ՊԷԳ-ի առկայությանը կապակցված է փոփոխվում: ՊԷԳ-ը առավելագույն ազդեցություն է բաղժում նուկլեոտիդների խմբերի վրա՝ ազդի է ունենում նուկլեոթիդների ֆոսֆատների ուժեղ դեհիդրատում: ԴժՊ-ը պարունակող լուծույթներից ՊԷԳ-պարունակող լուծույթներ այդ միացությունների տեղափոխմանը թերմոդինամիկական պարամետրերի զգալի փոփոխություն:

Peculiarities of hydration of nucleic acids various groups have been studied under conditions of DNA molecules compactization in the presence of PEG. PEG influences greatly on phosphate groups: strong dehydration of phosphate nucleosides and significant changes in thermodynamic parameters of transfer of these combinations from solutions, not containing PEG into PEG-containing solutions take place.

Ключевые слова: компоненты нуклеиновых кислот, растворимость, полиэтиленгликоль

В последние годы экспериментально и теоретически исследуется переход двухцепочечной ДНК на уровне третичной структуры в компактную горообразную форму [3-6, 9, 15, 18, 19]. Интерес к этой структуре объясняется тем, что для ДНК многих биологических объектов характерна аналогичная специфическая третичная структура. Процесс конденсации—деконденсации хромосом эукариот также является обратимым переходом в компактную форму. Переход может быть вызван полиаминами (спермидин, гистон H1, полилизин). Исследование процесса компактизации *in vivo* затруднено из-за наличия усложняющих факторов в клетке. Поэтому переход этот изучают в основном *in vitro*, пользуясь тем, что он происходит и в растворах нейтральных полимеров, гидрофобно-гидрофильных, подобно полиаминам, например, в водно-солевых растворах полиэтиленгликоля (ПЭГ) [3, 5, 19].

Двухспиральные молекулы ДНК упорядоченно укладываются в форму торов постоянного размера ($\sim 1000 \text{ \AA}$ в диаметре) при определенных «критических» значениях pH, концентраций соли и ПЭГ, а также молекулярных масс ПЭГ. Показано, что этот внутримолекулярный переход обратим. Экспериментально подробно изучены интервалы условий компактизации и свойства компактных молекул ДНК [7, 11, 17, 21]. В теоретических работах последних лет показано, что в растворе ПЭГ при определенных условиях минимуму свободной энергии единичной молекулы ДНК соответствует именно компактная форма. При компактизации полимеров, жесткость которых сопоставима с жесткостью ДНК,

должны получаться частицы торообразной формы [3, 4, 9]. Фриш и Фесциан показали [15] отрицательное взаимодействие ДНК с ПЭГ, приходящее как к компактизации молекул ДНК, так и к конкурентному процессу агрегации их с приобретением свойств, характерных для холестерических жидких кристаллов [8, 10].

Нами предпринята попытка выяснения деталей механизма действия ПЭГ на структуру ДНК и системе ПЭГ—соль—вода. Представлялось интересным изучить влияние ПЭГ на гидратацию компонентов нуклеиновых кислот и выяснить, имеются ли в условиях, соответствующих компактизации ДНК, сколько-нибудь значительные изменения во взаимодействии молекул оснований, нуклеозидов и нуклеотидов с водой. С этой целью мы провели модельные эксперименты по измерению растворимости оснований, нуклеозидов и их фосфатов. Как известно, такое изучение растворимости соответствующих модельных соединений (пептидов, азотистых оснований и т. д.) дает большую информацию о механизмах воздействия растворителя или его составляющих на биополимеры [16, 22, 23]. Измерение температурной зависимости растворимости позволяет вычислить термодинамические параметры переноса этих модельных соединений из одного растворителя в другой (свободную энергию, а также энтальпийную и энтропийную составляющие процесса переноса) [1, 20, 22].

Материал и методика. Изучалась растворимость следующих азотистых оснований, нуклеозидов и их фосфорных эфиров: аденина, тимина, цитидина, гуанина, урацила, дезоксиаденина, тимидина, цитидина, гуанозина, аденозин-фосфата, цитидинфосфата, уридинфосфата, гуанозинфосфата и аденозин-трифосфата (все фосфаты взяты в виде натриевых солей). Коэффициенты экстинкции и характеристические длины волн этих соединений брались из литературы [12].

Избыточное количество исследуемого вещества помещалось в 0,02 М фосфатный буфер (рН 7,18), содержащий NaCl определенной концентрации 0,01; 0,1; 0,3; 1,0 М; ПЭГ (фирмы «Мерк») следующих молекулярных масс и концентраций: 300, 400, 600, 1000, 4000, 6000, 40000, 25, 50, 75, 100, 125, 145 мг/мл. Эта смесь, помещенная в плотно закрытый сосуд, в течение трех суток размешивалась при постоянной температуре (25, 35, 45, 55°) и затем оставлялась стоять при данной температуре на сутки для разделения фаз. Проверялось постоянство твердой фазы.

Измерение содержания вещества в надосадочной жидкости производилось спектрофотометрически (СФ-4а) после разбавления раствора до концентраций вещества, отвечающих оптимальной оптической плотности (10^{-1} М). Известно, что основания, нуклеозиды и нуклеотиды в растворах способны к самоассоциации, стеккинг-взаимодействиям, однако константы ассоциации, вычисленные Робинсоном, Грантом [22], оказались настолько малы для подобных экспериментов, что можно пользоваться законом Бера. Полученная нами зависимость амплитуды сигнала ПМР (атомы C_2 и C_4 аденозина) также свидетельствует об отсутствии заметной самоассоциации при использованных концентрациях $\sim 0,1$ М. Заметьного отклонения от прямолинейной зависимости величины химического сдвига от объемной доли добавляемого растворителя не наблюдалось. ПМР-исследования проводились на спектрометре марки «Тесла Б-167».

Результаты и обсуждение. Подробнее других соединений был изучен аденозин по причинам, изложенным ранее [2]. Показано, что растворимость аденозина мало зависит от концентрации ПЭГ (25—145 мг/мл) при постоянной молекулярной массе последнего и неизменной ионной силе раствора и лишь несколько возрастает при концентрации ПЭГ 100 мг/мл. Далее были зафиксированы ионная сила (0,3) и концентрация ПЭГ (100 мг/мл), а молекулярная масса ПЭГ варьировалась. В этом слу-

час изменения растворимости аденозина при переходе через критическую молекулярную массу ПЭГ были незначительны. Изменение концентрации NaCl (0,01; 0,1; 0,3; 1,0 М) при постоянных значениях молекулярной массы и концентрации ПЭГ также не оказывало существенного влияния на относительную растворимость аденозина [2, 14, 17, 22].

При изучении других соединений мы ограничились лишь оптимальными условиями, соответствующими компактизации ДНК: ионной силой раствора—0,3; концентрацией ПЭГ—100 мг/мл, молекулярной массой ПЭГ—40000.

В табл. сведены данные о растворимости (в молях на литр) нуклеозидов и азотистых оснований при наличии (С) и отсутствии (С₀) ПЭГ. Растворимость всех соединений увеличивалась с повышением температуры от 25 до 55°. Известно, что действие этих соединений на воду, с одной стороны, разрушающее, с другой —упорядочивающее. Преобладание разрушающего действия связано с несоответствием формы и размеров молекул этих веществ и воды, а также с различием во взаимодействии молекул нуклеозида и воды. С увеличением температуры структура воды разрушается, и гидратация растворенного основания или нуклеозида увеличивается как в растворах с ПЭГ, так и без него.

Для большинства азотистых оснований и нуклеозидов значения относительной растворимости С/С₀ близки к единице. В присутствии ПЭГ

Таблица. Растворимость компонентов нуклеиновых кислот в растворах с ПЭГ и без него и термодинамические параметры переноса в ПЭГ-содержащие растворы

Соединение	Т°К	С ₀ , М л	С, М л	ΔF _{tr} , кал/М	ΔH _{tr} , кал/М	ΔS _{tr} , кал/Мград
1	2	3	4	5	6	7
Адезин	298	0.0073	0.0133	-354.0	114.3	1.57
	308	0.0107	0.0196	-369.2		1.57
	318	0.0161	0.0320	-421.2		1.68
	328	0.0224	0.0403	-382.4		1.51
Тимин	298	0.0327	0.0331	-11.7	0	0.04
	308	0.0388	0.0445	-81.2		0.26
	318	0.0560	0.0389	-32.5		0.13
	328	0.0687	0.0775	-69.0		0.21
Цитозин	298	0.0668	0.0680	-10.6	0	0.03
	308	0.1047	0.1054	-4.2		0.01
	318	0.1461	0.1504	-18.6		0.06
	328	0.1482	0.2223	-90.9		0.28
Урацил	298	0.0290	0.0280	16.2	0	-0.054
	308	0.0380	0.0420	-57.7		0.187
	318	0.0530	0.0560	-35.7		0.122
	328	0.0750	0.0770	-16.63		0.049
Гуанин	298	0.0010	0.0001	1230.6	11404	44.21
	308	0.0070	0.0031	129.79		44.72
	318	0.0140	0.0120	17.36		44.69
	328	0.0140	0.0110	197.097		43.44

1	2	3	4	5	6	7
Аденозин	298	0.0910	0.0290	-247.1	150.9	0.32
	308	0.0288	0.0413	-219.7		0.22
	318	0.0523	0.0737	-211.7		0.19
	328	0.0562	0.0862	-278.0		0.39
Дезоксиаденозин	298	0.0226	0.0309	-184.3	0	0.62
	308	0.0476	0.0619	-159.8		0.52
	318	0.1628	0.1276	-166.4		0.52
	328	0.0980	0.2176	-189.5		0.58
Тимидин	298	0.2080	0.2080	-23.7	0	0.08
	308	0.2928	0.3288	-70.9		0.23
	318	0.4614	0.4701	-11.9		0.04
	328	0.6187	0.7004	-80.7		0.25
Цитидин	298	0.8061	0.7930	9.59	-1629.1	-6.17
	308	0.8202	1.0030	126.66		-6.35
	318	0.8077	1.0618	-167.6		-5.22
	328	1.0839	1.4092	-150.356		-5.09
Гуанозин	298	0.0020	0.0030	-336.14	-3118	-9.34
	308	0.0030	0.0050	-274.04		-9.23
	318	0.0100	0.0110	-89.1		-9.52
	328	0.0210	0.0235	-87.90		-9.30
Аденозинфосфат	298	0.0834	0.0334	513.6	609.6	3.77
	308	0.2473	0.0976	567.9		3.82
	318	0.2760	0.1086	588.3		3.77
	328	0.3210	0.1188	646.7		3.83
Уридинфосфат	298	0.9340	0.8790	35.97	-685.9	-2.42
	308	1.2310	1.0400	103.24		-2.56
	318	1.3010	1.1330	88.41		-2.435
	328	1.5060	0.8990	404.97		-3.63
Цитидинфосфат	298	0.0460	0.0360	157.2	-2057.8	-7.433
	308	0.0064	0.0470	189.5		-7.296
	318	0.0950	0.0610	279.3		-7.035
	328	0.1420	0.0820	354.9		-7.356
Гуанозиндифосфат	298	0.0520	0.0310	301.84	-2658.4	-13.26
	308	0.0770	0.0460	333.94		-12.96
	318	0.0950	0.0440	485.39		-13.03
	328	0.2240	0.0730	728.64		-13.37
Аденозинтрифосфат	298	0.5352	0.7630	53.8	-4572.8	-15.53
	308	1.0620	0.6840	268.9		-15.72
	318	1.4060	0.7550	396.6		-15.63
	328	1.9910	0.6900	730.0		-16.10

наблюдается лишь некоторое увеличение растворимости при данной температуре, что соответствует результатам изучения растворимости других циклических органических соединений (нафталина и бифенила) в водных растворах различных полимеров, в том числе ПЭГ [13].

При сравнении растворимости дезоксиаденозина, аденозина и аденина, а также тимидина и тимина, цитидина и цитозина (таблица) не обнаружено значительного влияния ПЭГ на гидратацию как оснований, так и остатков рибозы и дезоксирибозы.

Аномальное поведение гуанина и гуанозина (см. табл.) может быть вызвано дополнительными эффектами, связанными со способностью гуаниновых соединений к сильной самоассоциации в растворах, в связи с чем закон Бера оказывается неприменимым, и возникает необходимость введения поправки на самоассоциацию. Как видно из таблицы, относительная растворимость при повышении температуры приближается к единице, что закономерно, так как с увеличением температуры эффект самоассоциации сходит на нет.

Результаты изучения температурной зависимости позволяют оценить термодинамические функции переноса соединений из растворов без ПЭГ в растворы, содержащие ПЭГ, согласно формулам:

$$\left\{ \begin{aligned} \Delta F_{tr} &= RT \ln \frac{C}{C_0}, \\ \lg \frac{C}{C_0} &= \frac{\Delta H_{tr}}{2,303 RT} + \frac{\Delta S_{tr}}{2,303 R}, \\ \Delta S_{tr} &= \frac{\Delta H_{tr} - \Delta F_{tr}}{T}, \text{ где} \end{aligned} \right.$$

$\frac{C}{C_0}$ — относительная растворимость: отношение растворимости вещества (в М/л) в растворе, содержащем ПЭГ (C), к растворимости в растворе, не содержащем ПЭГ (C_0), при той же температуре, ΔF_{tr} — свободная энергия переноса 1 моля вещества из раствора вода—соль в раствор вода—соль—ПЭГ, ΔS_{tr} — энтропия переноса, ΔH_{tr} — энтальпия переноса, определяемая по наклону кривой Вант-Гоффа зависимости $\lg \frac{C}{C_0}$ от $\frac{1}{T}$ [20]. Иногда графики Вант-Гоффа оказываются искривленными,

что свидетельствует о зависимости величины ΔH_{tr} от температуры и существенности вклада теплоемкости в определяемые термодинамические величины. В таких случаях можно говорить лишь о тенденциях параметров ΔH_{tr} и ΔS_{tr} , а для более точного определения требуются микрокалориметрические измерения. Такие кривые приведены на рис. 1. Для азотистых оснований и нуклеозидов, как и можно было предвидеть из исходных данных по растворимости, значительных термодинамических эффектов не наблюдается (за исключением соединений с гуанином, о чем сказано выше).

Свободные энергии переноса, энтальпийные и энтропийные изменения во всех случаях невелики. Энтропия перехода характеризуется небольшими отрицательными или положительными значениями, что свидетельствует об отсутствии эффекта ПЭГ на гидрофобные и стеклинга-взаимодействия оснований, ибо в противном случае имели бы место зна-

чительные энтропийные эффекты. Поэтому нельзя согласиться с интерпретацией некоторых авторов [13], согласно которой увеличение срока циклических соединений к растворителю объясняется возрастанием гидрофобности растворителя в присутствии ПЭГ.

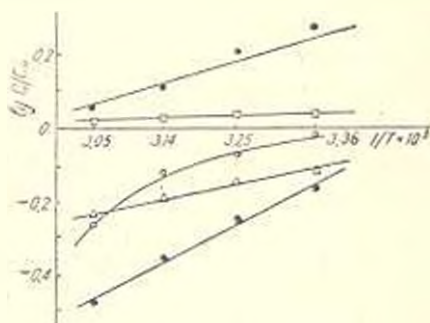


Рис. 1. Кривые Вант-Гоффа для (●) гуанозина, (□) урацила, (○) уридинмонофосфата, (Δ) цитидинмонофосфата, (⊗) гуанидиндифосфата.

Отсутствие влияния ПЭГ на гидрофобные взаимодействия азотистых оснований неудивительно, так как укладка в компактную структуру, по-видимому, происходит без нарушения спаривания и стеклинга оснований и не сопровождается разворачиванием внутренних групп ДНК (оснований) в растворитель. Поэтому и не должно быть простой корреляции между процессом компактизации и изменением растворимости азотистых оснований, как это имеет место при денатурации двуспиральной ДНК, когда основания полностью контактируют с растворителем.

Отсутствие влияния ПЭГ на гидратацию аденозина подтверждается также ПМР-исследованиями растворов аденозина. ПЭГ не влияет на пики протонов C_8 и C_2 аденозина. Сигналы от CH_2 и CH протонов ПЭГ также не меняются в присутствии аденозина.

По-видимому, наиболее существенным является влияние ПЭГ из фосфатные группы [1], значение которых обусловлено не только экранировкой их противоположами. При используемых ионных силах, необходимых для компактизации, фосфаты ДНК оказываются экранированными. Как явствует из таблицы, ПЭГ вызывает ощутимое уменьшение растворимости всех нуклеотидов. Увеличение количества фосфатных групп в соединениях приводит к усилению эффекта дегидратации.

Как видно из рис. 2, величины свободной энергии переноса фосфатов нуклеозидов в растворы, содержащие ПЭГ, положительны, что указывает на энергетическую невыгодность процесса переноса фосфатов в ПЭГ-содержащие растворы.

На рис. 3 даны графики энтропий переноса с отрицательными значениями ΔS_{tr} , говорящими о структурировании воды и дегидратации растворенных соединений.

Таким образом, ПЭГ оказывает сильное дегидратирующее действие на фосфатные группы, что согласуется со способностью макромолекул ДНК к сворачиванию в компактную глобулу и к межмолекулярной агрегации в водно-солевых растворах в присутствии ПЭГ. ПЭГ-содержащие растворы являются θ-растворителями для ДНК. Явления компак-

таши и межмолекулярной агрегации являются конкурентными, движущей силой которых является стремление двойной спирали к минималь-

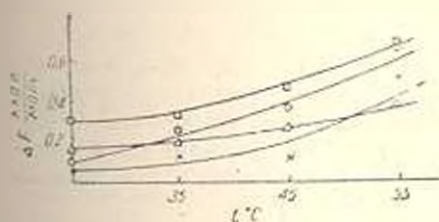


Рис. 2.

Рис. 2. Величины свободной энергии переноса фосфорных эфиров нуклеозидов из водно-солевых в ПЭГ-содержащие растворы как функция температуры: (X) уридинмонофосфат, (Δ) пиримидинмонофосфат, (□) гуанидиндифосфат, (o) аденозинтрифосфат.



Рис. 3.

Рис. 3. Температурная зависимость величины энтропий переноса фосфатов нуклеозидов в ПЭГ-содержащие растворы: (X) уридинмонофосфата, (▲) пиримидинмонофосфата, (□) гуанидиндифосфата, (o) аденозинтрифосфата

но возможному числу контактов с растворителем (водой). По-видимому, в клетке реализуются оба эти пути.

ЛИТЕРАТУРА

1. Габриелян А. Г. В сб.: Международный симпозиум по биофизике нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов, 198, Таллин, 1981.
2. Габриелян А. Г. Биофизика, 22, 5, 1977.
3. Гросберг А. Ю., Ерихмилович И. Я., Шахнович Е. И. Биофизика, 26, 415, 1981.
4. Гросберг А. Ю. Докл. АН СССР, 253, 1370, 1980.
5. Евдокимов Ю. М., Акименко Н. М., Глухова Н. Е., Варшавский Я. М. Мол. биол., 8, 396, 1974.
6. Евдокимов Ю. М., Салаянов А. М. Мол. биол., 11, 303, 1977.
7. Евдокимов Ю. М., Скуридин С. Г., Варшавский Я. М. Докл. АН СССР, 246, 2, 1979.
8. Жем П. де. Физика жидких кристаллов. М., 1977.
9. Лифшиц Н. М., Гросберг А. Ю., Хохлова А. Р. Успехи физ. наук, 127, 353, 1983.
10. Минц Р. И., Кононенко Е. В. Жидкие кристаллы в биологических системах. Итоги науки и техники, Биофизика, ВИНИТИ, 13, 1982.
11. Пятиморская Т. Н., Евдокимов Ю. М., Варшавский Я. М. Мол. биол., 12, 404, 1978.
12. Beaven G. H., Holiday E. R., Johnson E. A. The Nucleic Acids, I. Academic press, Inc. New-York, 1963, ed. by Chargaff E., I. N. Davidson.
13. Okamoto T., Ise N. J. Phys. Chem., 73, 5, 1969.
14. Farster S., Johnson J. K. J. Polymer Sci., 50, 379, 1961.
15. Frish L. H. L., Feshtyan S. J. Polymer Sci., Polymer Letters Edition, 17, 309, 1979.
16. Harkovits T. H., Harrington J. B. Biochemistry, 11, 486, 1972.
17. Jordan C. F., Lerman L. S., Venable J. H. Nature New Biology, 226, 67-70, 1972.
18. Lerman L. S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 8, 1886, 1977.
19. Lerman L. S., Wilkerson L. S., Venable J. H., Robinson B. H. J. Mol. Biol., 108, 271-293, 1977.
20. Long F. A., McDevitt W. F. Chem. Rev., 51, 119, 1952.
21. Post C. B., Zimm B. H. Biopolymers, 18, 1487, 1979.
22. Robinson D. K., Grant M. E. J. Biol. Chem., 4030, 1966.
23. Stookx J., Aert A., van Clewarrty. Bull. Soc. Chem., Belges, 75, 673, 1966.