

БИОФИЗИКА

В. М. Асланян, А. Г. Габриелян, М. А. Новоселер и Э. Г. Товмасян

Влияние ионной силы раствора на ренатурацию ДНК

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 1/V1965 г.)

В настоящее время можно считать установленным, что процесс транскрипции, т. е. матричного синтеза информационной РНК на молекуле ДНК, идет через предварительную частичную денатурацию биспирального комплекса ДНК. При этом каждая макромолекула ДНК может служить матрицей для синтеза большого числа РНК. Отсюда следует, что после каждого акта синтеза ДНК полностью восстанавливает свою нативную структуру. В этой связи возникает ряд вопросов, связанных с ренатурацией макромолекул ДНК.

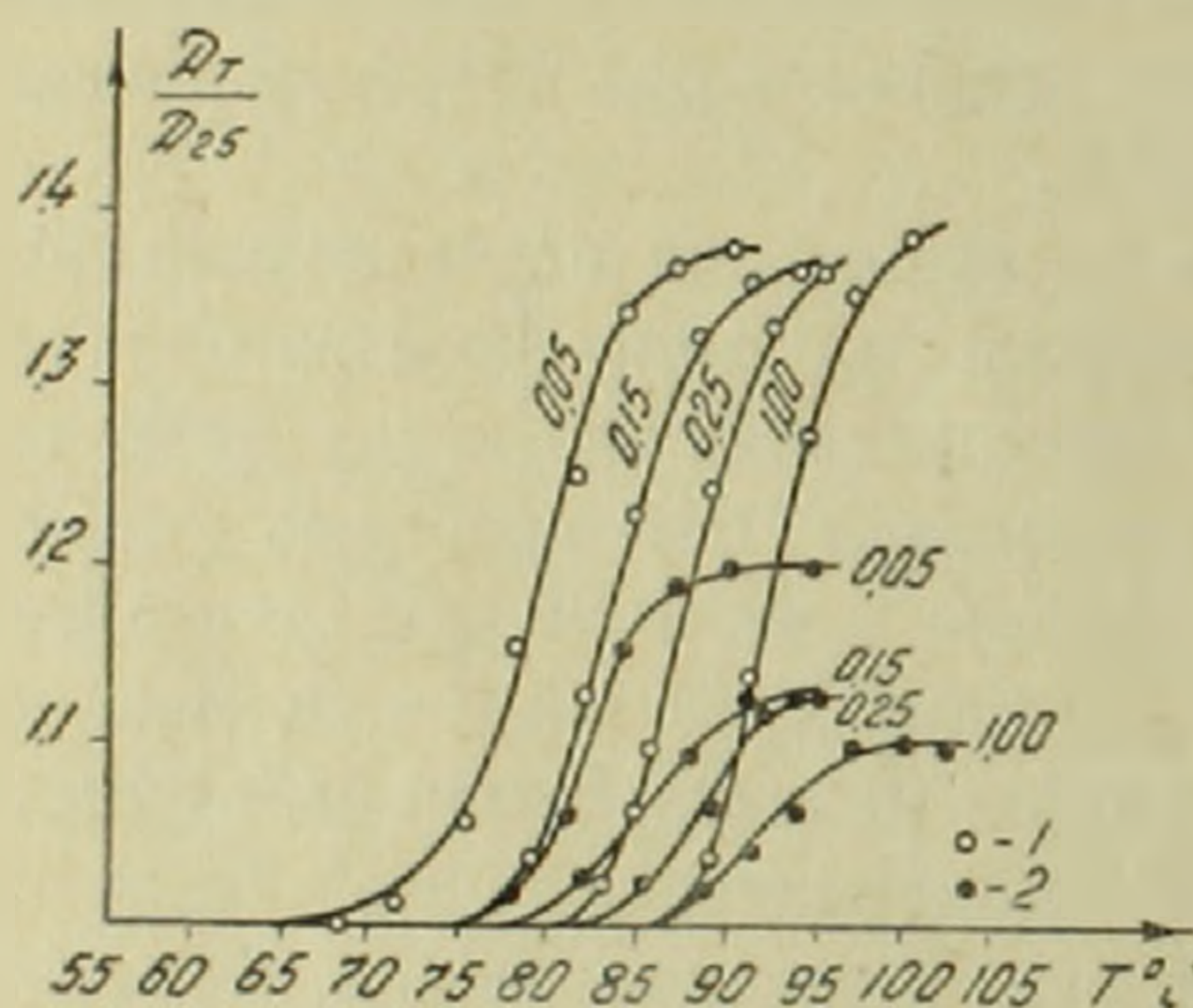
Изучению процесса ренатурации посвящен ряд исследований. Известно, что процесс образования биспиральных комплексов из простых модельных полинуклеотидных цепей, имитирующих структуру ДНК, является обратимым (¹). В случае макромолекул ДНК проблема существенным образом осложняется. Ренатурация в этом случае затруднена из-за гетерогенности ДНК. Исследуемая нами ДНК тимуса телят состоит из нескольких десятков тысяч сортов молекул. Тогда вероятность столкновения двух денатурированных комплементарных нитей будет порядка 10^{-10} . Поэтому ренатурация по сути дела невозможна. Согласно современным представлениям (^{2, 3}), процесс перехода спираль—клубок в растворах ДНК осуществляется в два этапа. На первой стадии происходит частичное расхождение тяжелой биспиральной структуры ДНК и образуются так называемые петли, фиксированные резистентными участками, которые плавятся при более высоких температурах. На второй стадии денатурации происходит полное разделение цепей. Очевидно, что ренатурация частично деспирализованных ДНК вполне возможна и определяется только размерами петель и режимом охлаждения. Затруднение, связанное с нахождением дополнительных друг к другу нитей, снимается. На второй же стадии по вышеуказанной причине денатурация необратима.

Систематическое исследование необратимой тепловой денатурации проводилось Гейдушеком (⁴). Как известно, денатурация хорошо прослеживается по гипохромному сдвигу. Критерием восстановления струк-

туры биополимеров служит остаточный гипохромизм. Остаточный гипохромизм, сопровождающий охлаждение полностью денатурированной гетерогенной ДНК, является в основном результатом мономолекулярной ренатурации, т. е. образования случайных дефектных спиральных участков в пределах одной цепи. Такие спиральные участки характерны для высокомолекулярных РНК.

В последние несколько лет появилась серия работ по изучению переходов спираль—клубок в растворах ДНК в присутствии ионов металлов. Исследование явления тепловой денатурации в солевых растворах интересно по ряду причин. Известно, что в клетке содержится большое число металлических ионов и все биологические процессы, по-видимому, протекают при их участии. Изучение процессов плавления и восстановления биспиральной структуры ДНК в присутствии ионов позволяет составить определенное представление о роли этих ионов в биологических процессах, в частности репликации и транскрипции.

Нами проводилось последовательное исследование обратимости тепловой денатурации растворов ДНК тимуса телят в присутствии ионов Na^+ . Восстановление структуры прослеживалось по сопоставлению кривых гипохромного сдвига и остаточного гипохромизма. При этом кривые гипохромизма были получены двумя способами ⁽⁵⁾. Одновременно проводилось измерение температурной зависимости вязкости.



Фиг. 1. Кривые, характеризующие обратимость денатурации ДНК при разных молярных концентрациях ионов Na^+ . 1 — кривые зависимости относительной оптической плотности растворов ДНК от температуры (кривые гипохромного сдвига); 2 — кривые остаточного гипохромизма.

Подробное изложение методики эксперимента приведено в работе ⁽⁵⁾.

Явление ренатурации исследовалось нами в солевых растворах ДНК при ионных силах ниже 0,4 М NaCl ⁽⁹⁾. На фиг. 1 приведены кривые, характеризующие обратимость денатурации при разных концентрациях ионов Na^+ . Бросается в глаза, что в некоторой температурной области, где уже проявляется гипохромный эффект, кривая остаточного гипохромизма не претерпевает изменения. Последнее означает, что в этой температурной области денатурация полностью обратима, поглощение нативной ДНК и охлажденной полностью совпадают. Это обстоятельство может найти свое объяснение в рамках теории Птицы-

на ⁽³⁾, посвященной выяснению роли взаимодействий дальнего порядка в денатурации ДНК. В работе устанавливается связь между изменением свободной энергии ΔF при переходе спираль—клубок с температурой T и числом сегментов в цепи N :

$$\Delta F = F_{\text{кл}} - F_{\text{сп}} = \Delta F_0 + AT \left(1 - \frac{B}{\sqrt{N}} \right), \quad (1)$$

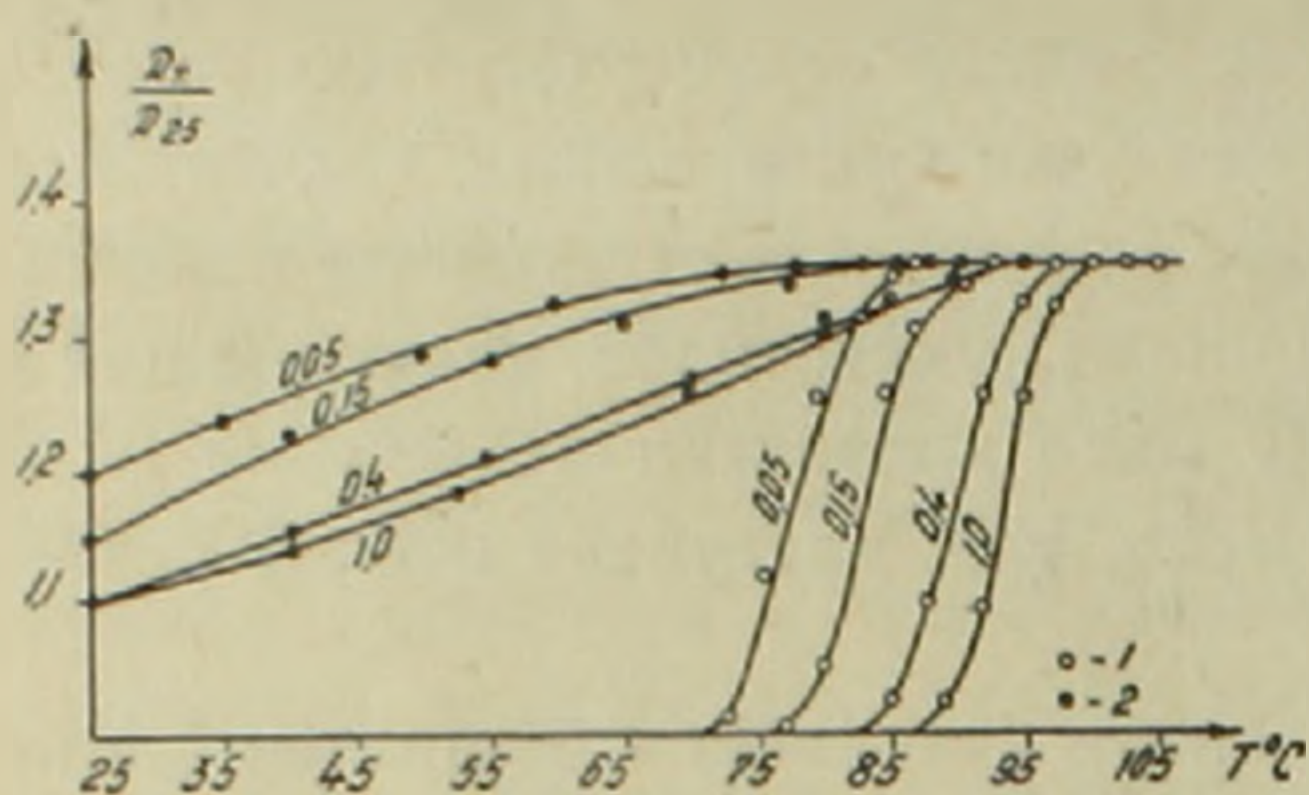
где ΔF_0 — изменение свободной энергии при плавлении без учета сил дальнего действия, A и B — некоторые параметры. Из уравнения (1) следует, что при повышении температуры от значений, при которых $\Delta F > 0$ для любых N , мы вначале должны попасть в область, в которой ΔF положительно для больших N , но отрицательно для малых N . Очевидно, что в этой области полное разрушение биспиральной структуры ДНК термодинамически невыгодно. В то же время частичная денатурация, при которой образуются локальные петлеобразные структуры, оказывается выгодной. Размеры петель определяются теми критическими значениями N , при которых изменение свободной энергии ΔF становится положительным. С повышением температуры число нуклеотидов, участвующих в петлеобразных структурах, возрастает, пока критические значения N не совпадают с полным числом нуклеотидов, т. е. наступает полное разделение нитей ДНК.

С этой точки зрения можно объяснить результаты, приведенные на фиг. 1, из которых следует, что охлаждение солевых растворов ДНК от температур $T \leq T_m$ приводит к почти полному восстановлению оптической плотности нативной ДНК. Очевидно, что в области перехода молекулы ДНК находятся на стадии частичной денатурации. Петлеобразная структура должна ренатурировать значительно легче, чем полностью денатурированная ДНК.

Наблюдаемое на фиг. 1 уменьшение интервала полной обратимости ренатурации с увеличением ионной силы объясняется, по-видимому, тем, что с увеличением ионной силы понижается ΔF . В самом деле, ионы Na^+ экранируют заряды фосфатных групп ДНК и тем самым понижают электростатическое отталкивание нитей. Очевидно, что с повышением ионной силы величина ΔF должна уменьшаться за счет уменьшения $F_{\text{кл}}$, обусловленного экранированием зарядов фосфатных групп. При этом $F_{\text{сп}}$ остается практически неизменной. А это обстоятельство должно облегчить образование петель с большим числом нуклеотидов N и тем самым уменьшить интервал обратимой денатурации. Существование петель определяется, по-видимому, наличием сшивок между нитями ДНК. Такими сшивками в принципе могут быть участки молекулы ДНК, обогащенные Г-Ц парами. Это означает, что в макромолекуле ДНК существуют участки с различной резистентностью. Возникновение необратимости процесса денатурации при нагревании до температур выше T может определяться разрушением участков с повышенной стабильностью. Следовательно, кривая остаточного гипохромизма должна характеризовать плавление более стабильных участков спирали. В пользу этого свидетельствуют два факта. Во-первых, полная денатурация должна характеризоваться разрушением всех водородных связей. Тогда максимальные значения кривых гипохромного сдвига и остаточного гипохромизма должны достигаться при одной температуре. В этом нетрудно убедиться из фиг. 1. Во-вторых, средние точки кривых $\frac{D_T}{D_{25}}$ и $\frac{D_{25}^T}{D_{25}}$

должны быть смещены друг относительно друга. В самом деле, разрушение резистентных участков, т. е. сшивок, должно проходить при более высоких температурах, что также видно на фиг. 1.

Медленное охлаждение растворов ДНК, нагретых до максимальных значений гипохромного эффекта, также сопровождается значительным снижением оптической плотности (фиг. 2). Нагревание растворов ДНК

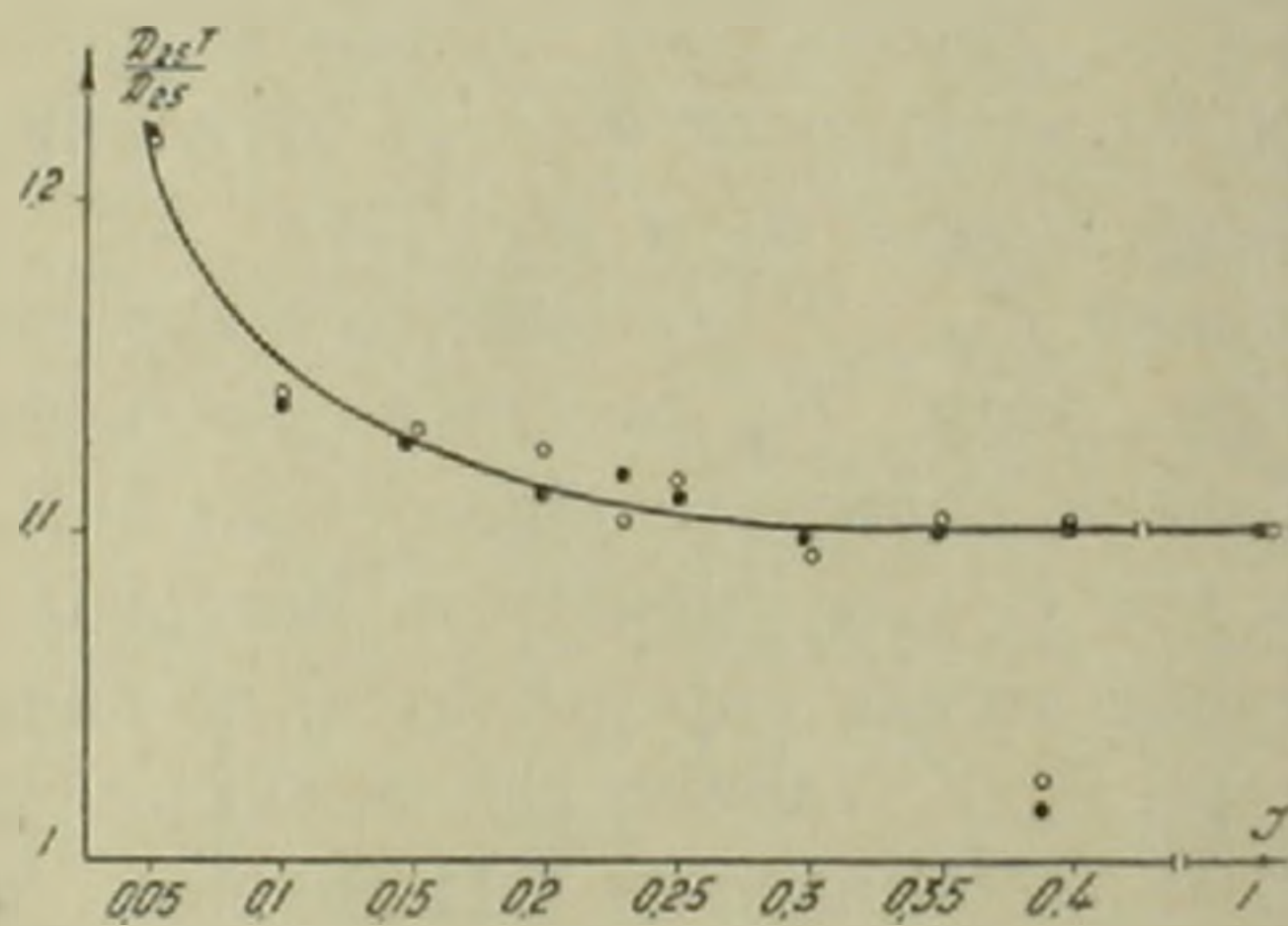


Фиг. 2. Зависимости относительной оптической плотности растворов ДНК разных ионных сил от температуры при нагреве до температур денатурации (1) и медленное охлаждение от этих температур (2).

до максимального сдвига производилось непрерывным способом. При этом наблюдается существенная зависимость остаточного гипохромизма от ионной силы. Чем выше концентрация ионов Na^+ , тем меньше величина оптической плотности охлажденной ДНК. Это вполне естественно, так как при малых ионных силах, когда степень диссоциации нитей макромолекулы ДНК выше, электростатическое отталкивание будет препятствовать образованию как внутри-, так и межмолекулярных водородных связей. Такой же эффект прослеживается по кривым остаточного гипохромизма на фиг. 1, где его максимальное значение понижается с увеличением ионной силы. Можно думать что при большом разбавлении ДНК после охлаждения осуществляются конформации, аналогичные конформации РНК. Для сравнения результатов, полученных нашими двумя методами, на фиг. 3 приведены зависимости относительного остаточного гипохромизма от ионной силы для обоих режимов охлаждения. Видно, что величина остаточного гипохромизма в обоих случаях с увеличением концентрации связываемых ионов стремится к одному и тому же предельному значению, которое заведомо больше оптической плотности, характерной для нативной ДНК. Предельное значение остаточного гипохромизма вероятнее всего характеризует ренатурацию, происходящую по мономолекулярному механизму.

Интересно, что минимальное значение остаточного гипохромизма достигается уже при ионной силе 0,3 М NaCl. Для контроля брался раствор с 1,0 М NaCl. Значение остаточного гипохромизма оставалось неизмен-

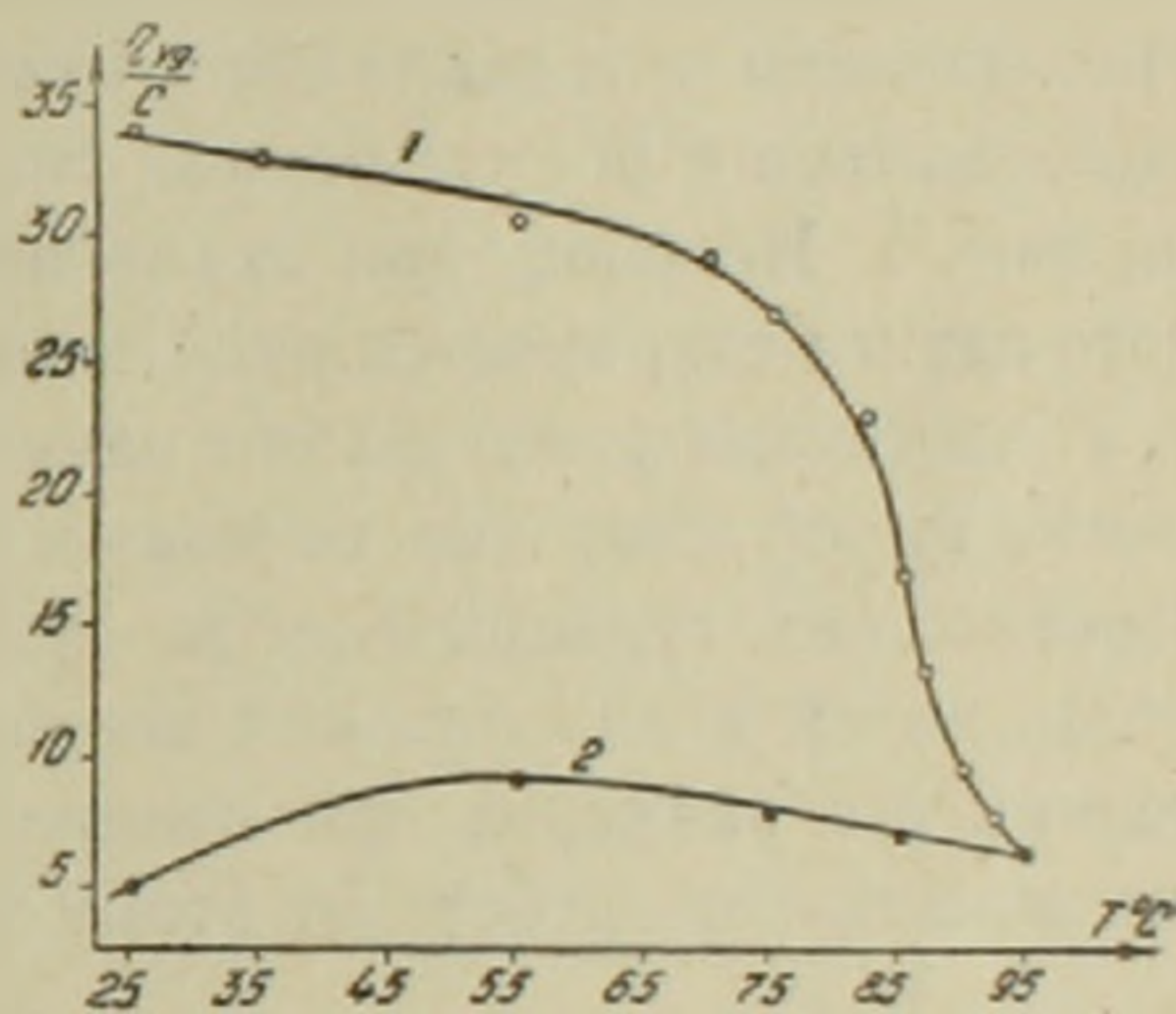
Фиг. 3. Зависимость предельного относительного остаточного гипохромизма от ионной силы для обоих режимов охлаждения; 1 — значение относительной оптической плотности после медленного охлаждения от температуры полной денатурации до 25°C; 2 — максимальное значение остаточного гипохромизма, полученное при нагреве с возвратами к 25°C.



Фиг. 3. Зависимость предельного относительного остаточного гипохромизма от ионной силы для обоих режимов охлаждения; 1 — значение относительной оптической плотности после медленного охлаждения от температуры полной денатурации до 25°C; 2 — максимальное значение остаточного гипохромизма, полученное при нагреве с возвратами к 25°C.

ным. Все вышесказанное позволяет считать, что электростатическое отталкивание, вносящее существенный вклад во взаимодействие дальнего порядка, перестает эффективно влиять на вторичную структуру разделившихся нитей. Тогда предельное значение остаточного гипохромизма соответствует отдельным незаряженным нитям ДНК. Следовательно, уже при ионных силах $0,3M$ NaCl молекулы образуют максимально возможное число внутримолекулярных водородных связей, т. е. приобретают структуру с максимально возможной степенью спирализации. Об этом же должна свидетельствовать и величина гипохромного эффекта обсуждаемых структур, мерой которой является разность между максимальными значениями гипохромного сдвига и остаточного гипохромизма. И действительно, эта разность приобретает свое предельное постоянное значение в той же области ионных сил.

Охлаждение растворов ДНК от температур, при которых достигается минимальное значение вязкости (фиг. 4), оставляет неизменной ее значение. Видимо, охлаждение сопровождается ренатурацией по мономолекулярному механизму с образованием коротких спиральных «шпилек» ⁽³⁾. Гибкость разделившихся цепей, которой определяются гидродинамические свойства макромолекул, сохраняется за счет хаотически свернутых участков, чередующихся со спиральными отрезками. Таким образом, и температурный ход вязкости также приводит к заключению, что ренатурация в основном проходит по мономолекулярному механизму. В пользу мономолекулярной ренатурации свидетельствует и независимость остаточного гипохромизма от режима охлаждения (фиг. 3). В самом деле, если восстановление структуры шло бы по бимолекулярному механизму, следовало бы ожидать четко выраженную зависимость ренатурации от режима охлаждения, так как число соударений в единицу времени резко падает с понижением температуры. Следовательно, комплементарное сшивание нитей ДНК должно существенно зависеть от скорости охлаждения, что было показано, для бактериальных нуклеиновых кислот ^(6, 7). В то же время ренатурация по мономолекулярному механизму протекает весьма быстро и не зависит поэтому от режима охлаждения ⁽⁷⁾. Таким образом, результаты наших экспериментов свидетельствуют в пользу мономолекулярного механизма ренатурации. Однако эти эксперименты не позволяют полностью исключить возможность агрегаций молекул, хотя и исследовались достаточно разбавленные растворы ДНК.



Фиг. 4. Проведение приведенной вязкости при охлаждении растворов ДНК (концентрация 80 г/мл) от температур полной денатурации — кривая 2. Кривая 1 характеризует температурную зависимость вязкости при нагреве.

Весьма интересна прослеженная нами зависимость между температурами, соответствующими средним точкам кривых гипохромного сдвига и остаточного гипохромизма. С повышением ионной силы обе температуры плавления возрастают. При этом, по мере увеличения концентрации ионов Na^+ , значения их сближаются. С ростом ионной силы понижается энергия электростатического отталкивания как А—Т, так и Г—Ц пар. Одним из возможных объяснений сближения температур плавления может быть следующее. Очевидно, что разрыв сшивок в значительной степени должен ускоряться тепловым движением денатурировавших нитей петель, стабилизированных этими сшивками. С ростом ионной силы возрастает температура плавления ДНК, т. е. интенсифицируется тепловое движение частично денатурировавших нитей. Следовательно, должна возрасти и вероятность флюктуаций теплового движения, ведущих к разрыву сшивок. Если к тому же отжиг проводится в течение конечного времени, то при очень высоких температурах плавления T_m можно предполагать, что значения T_m и T'_m должны совпасть. Кроме того, при высоких температурах понижается стабильность Г—Ц пар, что также облегчает разрывы сшивок под воздействием теплового движения нитей. Сближение T_m и T'_m должно сопровождаться уменьшением интервала обратимой денатурации δT , т. е. δT должно уменьшаться с ростом ионной силы, что видно из кривых, приведенных на фиг. 1. Наконец, при охлаждении максимальное значение гипохромного сдвига сохраняется вплоть до температуры плавления T_m (фиг. 2), т. е. частичная ренатурация начинается при температурах ниже T_m , что опять же обусловлено тепловым движением деспирализованных цепей. Процесс ренатурации идет по пути столкновения комплементарных участков нитей и образования центра спирализации с постепенным увеличением его размеров при понижении температуры. Тепловое движение активно противодействует этому процессу.

ВЦ Академии наук Армянской ССР и ЕрГУ

Վ. Մ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ, Ա. Կ. ԳԱՐՐԻԵԼՅԱՆ, Մ. Ա. ՆՈՎՈՍԵԼՆԵՐ Ե Է. Դ. ԽՈՎՍԱՅԱՆ

Լուծույթի իոնական ուժի ազդեցությունը ԴՆԹ-ի ռենատուրացիայի վրա

Տվյալ աշխատանքը նվիրված է ԴՆԹ-ի ռենատուրացիայի պրոցեսի ուսումնասիրությանը ազային լուծույթներում: NaCl աղի կոնցենտրացիան փոփոխվել է լայն սահմաններում: Համաձայն Ջիմի և Պարիցինի տեսական պատկերացումներին՝ հաստատված է, որ դենատուրացիայի պրոցեսը անցնում է երկու փուլ: Առաջին փուլում ռենատուրացիան հիմնականում ընթանում է ռիմոլեկուլյար մեխանիզմով, երկրորդում՝ մոնոմոլեկուլյար: Ցույց է տրված, որ NaCl 0,3 M լուծույթի իոնական ուժի դեպքում մնացորդային հիպոխրոմիզմի մեծությունը հասնում է իր սահմանային արժեքին, որը համապատասխանում է ԴՆԹ-ի լրիվ շիջքավորված թելերի կլանմանը: Այդ նշանակում է, որ էլեկտրոստատիկ վանումը, որը մեծ ներդրում է տալիս հեռազդեցությունների մեջ, այդ իոնական ուժերի դեպքում դադարում է էֆեկտիվ կերպով ազդել մոլեկուլների ստրուկտուրայի վրա: Մանրակրկիտ կերպով քննարկվում է ԴՆԹ-ի մասնակի դենատուրացված թելերի ցերմային շարժման դերը նուկլեինյան թթուների ստրուկտուրայի հալման և վերականգնման պրոցեսներում:

ЛИТЕРАТУРА — ГИЩЦЪЛЪРЪ ВЪРЪ

- ¹ Дж. Фреско, Б. Альбертс, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 46, 31 (1960).
² Б. Зимм, *J. Chem. Phys.*, 33, 1349 (1960). ³ О. Б. Птицын, „Биофизика“ 7, 257, 1962. ⁴ Е. П. Гейдушек, *J. Mol. Biol.*, 4, 467 (1962). ⁵ В. М. Асладян, А. Г. Габриелян, М. А. Новоселер, Э. Г. Товмасын, ДАН АрмССР, в печати, 1966. ⁶ П. Доти, Дж. Мармур, Дж. Эйгнер, К. Шильдкраут, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 46, 461 (1960).
⁷ А. Дж. Ковидл, Д. О. Жордан, *J. Mol. Biol.*, 7, 700 (1963).