

Физика

УДК 577.3:547.963.3

В. М. АСЛАНЯН, Е. Б. ДАЛЯН, С. Г. АРУТЮНЯН,  
В. А. ТУМЯН

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДНК В  
ЩЕЛОЧНОЙ СРЕДЕ

Предложен конкретный механизм депротонирования азотистых оснований ДНК в щелочной среде ( $pH > 7,0$ ). Показано, что при  $pH > 10,3$  может происходить депротонирование азотистых оснований в ГЦ-богатых спиральных участках. Выяснено, что особенности зависимостей температуры и интервала перехода спираль—клубок ДНК от  $pH$  обусловлены исключительно избирательностью депротонирования азотистых оснований.

Исследованию плавления ДНК в условиях измененной кислотности среды посвящено много работ, однако щелочная область изучена недостаточно [1—3]. Это, скорее всего, связано с тем, что они проводились достаточно давно и из-за отсутствия совершенной экспериментальной техники и неточных значений констант ионизации азотистых оснований в области щелочных  $pH$  выводы были сделаны не совсем корректные. Например, предполагалось, что константы ионизации азотистых оснований одинаковы для всех типов оснований [1], что заведомо неверно [4]. Более того, значения констант ионизации азотистых оснований сильно зависят от температуры [1, 2] и ионной силы [5, 6].

Целью настоящей работы является выяснение механизма депротонирования и структурных особенностей ДНК при щелочных  $pH$ .

**Материалы и методы исследований.** В работе использованы нативные ДНК из тимуса телянка ( $X_{GC} = 42\%$ ) фирмы «Sigma», *M. luteus* ( $X_{GC} = 72\%$ ) и *Cl. Perfringens* ( $X_G = 28\%$ ) фирмы «Serva».

Концентрированные растворы ДНК готовились в бидистиллированной воде с ионной силой  $10^{-3} M Na^+$ . Для исследования ДНК в области щелочных  $pH$  применялся 0,1 *n* боратный буфер. Измерения  $pH$  проводились на  $pH$ -метре « $pH$ -673» с использованием электродов разных марок для различных температурных режимов.

УФ-спектры поглощения и кривые плавления получены на спектрофотометре «Unicam SP-8000» (Англия) с термостатируемой ячейкой при непрерывном режиме нагрева растворов со скоростью 0,25 град/мин. Использованы кварцевые кюветы с плотно закрывающимися крышками (длина оптического пути 10 мм). Точность измерения температуры  $\pm 0,025^\circ C$ , а оптической плотности  $\pm 2 \cdot 10^{-3}$  отн. ед.

Спектры КД снимались на дихрографе «Roussel Jouan» (Франция).

**Результаты и их обсуждение.** На рис. 1 приведены зависимости температуры (а) и интервала (б) плавления ДНК тимуса телянка от  $pH$  в

щелочной среде. Как видим, зависимость  $\Delta T$  (рН) проходит через минимум при рН  $\sim 10,3$  при монотонном уменьшении температуры плавления с ростом рН. Уменьшение  $T_m$  и  $\Delta T$  в области рН  $< 10,3$ , скорее всего, обусловлено ионизацией сначала гуанина (рК = 9,4), а затем тимина (рК = 10,0) в расплавленном состоянии (значения рК приведены

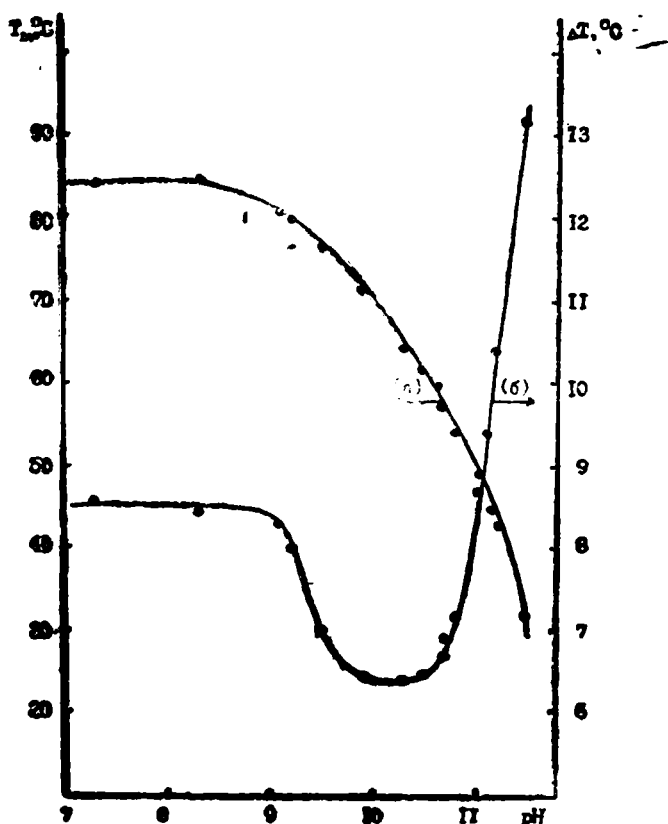


Рис. 1. Зависимость температуры (а) и интервала (б) плавления ДНК тимуса теленка от рН среды. Здесь и на остальных рисунках значения рН приведены при 25°C.

при 25°C и ионной силе  $\mu = 0,1$ ). Однако последующее увеличение  $\Delta T$  при рН  $> 10,3$  с одновременным понижением температуры плавления ДНК невозможно объяснить только этими эффектами. В работе [7] показано, что при рН  $> 10$  происходит изменение гидродинамических характеристик нативной ДНК, свидетельствующее об изменении линейной плотности отрицательных зарядов на ДНК. Это должно приводить к тому, что ионизированные группы будут взаимодействовать друг с другом, а последнее должно приводить к появлению зависимости констант депротонирования от степени ионизации ДНК. А это, в свою очередь, должно отразиться на характере плавления ДНК. Следует отметить, что немаловажную роль в поведении ДНК при щелочных рН может играть также температурная зависимость констант ионизации. Нам представляется, что подобную зависимость  $T_m$  (рН) и  $\Delta T$  (рН) можно объяснить, если предположить, что при рН  $> 10$  может происходить избирательное депротонирование ДНК в спиральной форме. В пользу такого заключения говорят также и результаты наших КД-исследований, приведенных на рис. 2. Действительно, если при щелочных рН происходит депротонирование оснований ДНК в спиральной форме, то это

должно приводить к изменению конформации ДНК, что наглядно продемонстрировано на рис. 2. При  $pH > 10,2$ , где предполагается депротонирование пар оснований ДНК в спиральной форме, происходит увеличение относительного изменения полосы  $\Delta \epsilon_{276}$  КД при  $25^\circ C$ . Увеличение этой полосы КД ДНК обычно связывается с переходом ДНК в несколько раскрученную форму в пределах В-семейства форм [8]. Подобное поведение спектров КД ДНК до начала плавления макромолекулы свидетельствует об ослаблении водородных связей нативной ДНК при депротонировании азотистых оснований. Более эффективное раскручивание ГЦ-богатой ДНК есть результат того, что депротонирование оснований в спиральной форме происходит именно в ГЦ-богатых участках. В пользу того, что ГЦ-богатые области ДНК более чувствительны к изменению pH среды, свидетельствует и то обстоятельство, что максимум спектра поглощения денатурированной ГЦ-богатой ДНК (*M. Luteus*) сдвигается в сторону длинных волн на 6—8 нм по сравнению с нативной, причем сдвиг растет с ростом pH. Для АТ-богатой ДНК (*Cl. Perfringens* гачкой сдвиг не наблюдается. Следует отметить, что в области  $pH > 10,2$  исчезает также эффект «предплавления» ДНК и происходит резкое падение энтальпии перехода спираль-клубок, свидетельствующее о том, что в ДНК происходит переход порядок-порядок [8, 9]. А это тоже говорит в пользу вышеизложенного заключения.

К сожалению, в литературе нет никаких прямых данных, свидетельствующих о депротонировании азотистых оснований ДНК в спиральном состоянии. В работах [4, 10, 11] весьма детально проанализированы возможные места ионизации всех гипов азотистых оснований в составе мононуклеозидов и мононуклеотидов в щелочной среде. Здесь, помимо известных данных об ионизации N(1) гуанина и N(3) тимина при  $pH \sim 10$ , приведены также данные о вторичной ионизации гуанина посредством отрыва подвижного протона в N(7)—N(9)-положениях. Однако, во-первых, подобная ионизация происходит при значительно более высоких значениях pH (12,3—12,6) и, во-вторых, в ДНК вместо протона в N(9)-положении находится радикал (фуранозное кольцо). Другим возможным местом депротонирования является  $NH_2$ -группа во втором положении гуанина. Однако эта группа считается малоактивной и о ее депротонировании при щелочных pH нет никаких данных. Депротонирование в спиральной форме N(1)-положения гуанина энергетически крайне невыгодно, поскольку при этом должен происходить разрыв водородной связи. Таким образом, из представленных данных можно заключить, что к депротонированию способны не только денатурированные, но и спиральные формы ДНК, но из-за нехватки прямых литературных данных невозможно однозначно утверждать о конкретных местах депротонирования азотистых оснований в спиральном со-

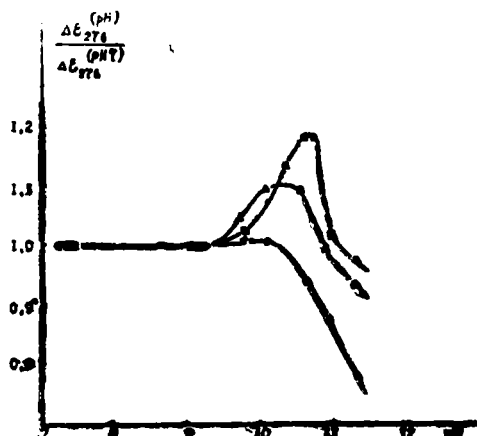


Рис. 2. Относительное изменение полосы  $\Delta \epsilon_{276}$  спектров КД ДНК с различным ГЦ-содержанием при  $25^\circ C$  с увеличением pH среды.  
 ▲ — ДНК тимуса теленка, □ — ДНК *M. Luteus*, ● — ДНК *Cl. Perfringens*.

стоянии. Для выяснения этого вопроса нужны дополнительные исследования.

Подробнее остановимся на вопросе избирательного депротонирования азотистых оснований ДНК в щелочной среде, используя предложенный нами метод исследования избирательного влияния низкомолекулярных лигандов с нуклеотидными парами ДНК [12, 13]. Такая необходимость диктуется теми соображениями, что на поведение ДНК в щелочной среде может влиять ряд неспецифических факторов, например, зависимость рН (Т) и др.

На рис. 3 представлены зависимости  $T_m$  от ГЦ-содержания ДНК при различных значениях рН. С помощью серии полученных кривых можно вычислить разности  $T_{ГЦ} - T_{АТ}$  для различных рН. Зная эти разности можно определить обусловленное только специфичностью изменение  $\Delta T$  для исследуемой ДНК (в данном случае в качестве ДНК с высокой степенью гетерогенности берется ДНК из тимуса теленка [12]). Результаты суммированы в таблице. Видно, что изменения разности  $T_{ГЦ} - T_{АТ}$  и  $\Delta T$  практически одинаковы. Слабая зависимость рН (Т) не может играть определяющую роль в характере изменения

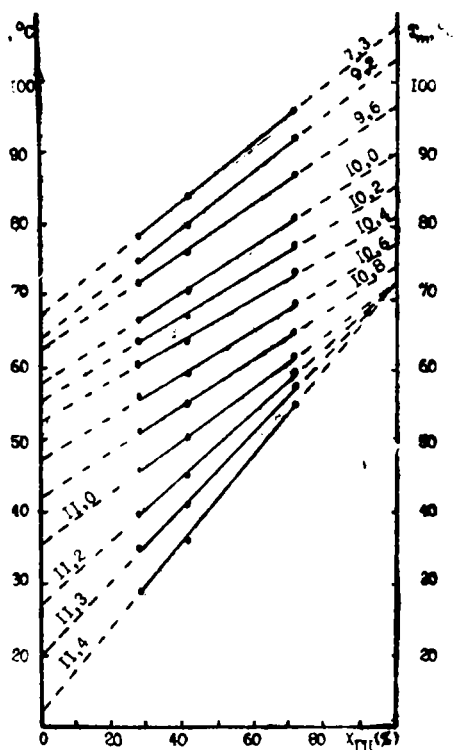


Рис. 3. Зависимость температуры плавления ( $T_m$ ) от ГЦ-содержания ДНК при различных рН. Цифры у прямых—значения рН среды.

$\Delta T$  от рН, поскольку, как показывают наши результаты, в области исследуемых температур рН изменяется на 0,2--0,5 единиц. Это означает, что изменение интервала плавления ДНК тимуса теленка целиком обусловлено специфичностью влияния щелочных рН на переход спираль-клубок.

Зависимость от рН среды значений интервала плавления ( $\Delta T$ ) ДНК тимуса теленка и параметра  $T_{ГЦ} - T_{АТ}$ , полученных с помощью температур плавления контрольных ДНК.

рН	$T_{ГЦ} - T_{АТ}$ (°C)	$\Delta T$ (°C)	$\frac{(T_{ГЦ} - T_{АТ})_0}{T_{ГЦ} - T_{АТ}}$	$\frac{\Delta T_0}{\Delta T}$
7,3	40,9	8,5	1,00	1,00
8,3	41,0	8,5	1,03	1,00
9,2	41,0	8,1	1,03	1,06
9,6	47,4	6,8	1,16	1,24
10,0	50,7	6,4	1,24	1,32
10,4	56,4	6,4	1,38	1,32
10,8	50,6	7,2	1,24	1,19
11,0	43,3	8,7	1,06	1,01
11,2	36,8	10,4	0,90	0,85
11,3	31,9	11,4	0,78	0,74
11,4	26,6	12,4	0,65	0,70
11,5	24,5	13,2	0,60	0,63

$(T_{ГЦ} - T_{АТ})_0 = 40,9$ , а  $\Delta T_0 = 8,5$  приведены для рН 7,3. Значения  $\Delta T$  рассчитывались по разности 83% и 17% гипохрома. Все значения рН приведены при 25°C.

Кафедра молекулярной физики и биофизики

Поступила 12.02.1987

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Сухеруков Б. И., Мошковский Ю. Ш., Биштейн Т. М., Лысов В. Н. Оптические свойства и молекулярное строение нуклеиновых кислот и их компонентов.—Биофизика, 1963, т. 8, с. 294—300.
2. Zimmer Ch., Luck G., Venner H., Fric J. Studies on the conformation of protonated DNA.—Biopolymers, 1968, v. 6, № 4, p. 563—574.
3. Woodbury C. P., Record H. T. A range GC-independent denaturation solvents for DNA.—Biopolymers, 1975, v. 14, p. 2417—2420.
4. Кочетков Н. К., Будовский Э. И. и др. Органическая химия нуклеиновых кислот. М.: Химия, 1970, с. 177—195.
5. Dore E., Frontali C., Gratton E. The role of ions in the acid melting of DNA.—Biopolymers, 1972, v. 11, p. 2033—2041.
6. Bunville L. G., Geidushek E. P., Raw itscher M. A. Sturtevant J. M. Kinetics and equilibria in the acid denaturation of DNA from various sources. — Biopolymers, 1965, v. 3, № 2, p. 213—240.
7. Касьяненко Н. А., Бартошевич С. Ф., Фрисман Э. В. Исследование влияния рН среды на конформацию молекулы ДНК.—Мол. биол., 1985, т. 19, № 5, с. 213—240.
8. Асламян В. М., Арутюнян С. Г., Бабаян Ю. С. Конформация и термостабильность ДНК в водных растворах  $\beta$ -аланина и  $\gamma$ -АМК.—Биофизика, 1984, т. 29, № 4, с. 564—568.
9. Арутюнян С. Г. Конформация и термостабильность ДНК в водных растворах  $\beta$ -аланина и  $\gamma$ -АМК.—Фанд. дисс. физ.-мат. наук. Тбилиси: 1984, с. 143.
10. Зигель Г. Ионы металлов в биологических системах. М.: Мир, 1982.
11. Бородавкин А. В., Будовский Э. И. и др. Электронная структура, ГФ-спектры поглощения и реакционная способность компонентов нуклеиновых кислот.—Итоги науки и техники, Серия мол. биол., 1977, т. 14, с. 3—230.
12. Ахрем А. А., Асламян В. М., Арутюнян С. Г., Ландо Д. Ю. К вопросу об избирательности связывания  $\beta$ -аланина и  $\gamma$ -АМК с нуклеотидными парами ДНК.—Докл. АН БССР, 1984, т. 29, № 3, с. 272—275.
13. Асламян В. М., Арутюнян С. Г., Ландо Д. Ю., Далаи Е. Б. Избирательность взаимодействия низкомолекулярных лигандов с нуклеотидными парами ДНК.—Тез.

## Ա մ փ ո փ ու մ

Առաջարկված է հիմնային միջավայրում ( $\text{pH} > 7,0$ ) ԳնԹ-ի ազոտական հիմքերի ապապրոտոնացման կոնկրետ մեխանիզմ: Ցույց է տրված, որ  $\text{pH} > 10,3$  դեպքում հնարավոր է ԳնԹ-ի ԳՑ-հարուստ պարուրային տեղամասերի ապապրոտոնացում: Պարզված է, որ ԳնԹ-ի պարույր-կծիկ անցման շերտաստիճանի և ինտերվալի  $\text{pH}$ -ից կախվածության առանձնահատկությունները պայմանավորված են բացառապես ազոտական հիմքերի ընտրողական ապապրոտոնացումով:

## Summary

A specific mechanism of deprotonization of DNA nitrogen bases in alkaline media ( $\text{pH} > 7.0$ ) has been suggested. It has been shown that at  $\text{pH} > 10.3$  deprotonization of nitrogen bases in GC-rich helical regions can take place. It has been estimated that the character of DNA helix-coil transition temperature and interval dependences on  $\text{pH}$  is due to deprotonization selectivity of nitrogen bases only.