



Структура и функция биополимеров

УДК 577.3

ТЕРМОДИНАМИКА В — Z-ПЕРЕХОДА ПОЛИ[д(Г — Ц)] В ВОДНО-ЭТАНОЛЬНОМ РАСТВОРЕ. «СКРЕПОЧНАЯ» КАЛОРИМЕТРИЯ *

А. Т. Карапетян, Э. Е. Минят, И. О. Вардеванян, В. И. Иванов

Введение. Недавно была установлена способность обратимого перехода поли[д(Г—Ц)] из В- в Z-форму при изменении температуры в водно-этанольном растворе низкой ионной силы [1]. Это открывает широкие возможности для изучения связывания различных лигандов (белков или низкомолекулярных соединений) с В- и Z-формами. Как известно, традиционный способ получить Z-форму состоит в добавлении очень большой концентрации соли (2,5 М) [2], что препятствует исследованию комплексов из-за конкуренции лиганда с противоионами. Перспективность нового подхода была нами продемонстрирована на примере бромистого этидия (БЭ), сдвигающего $Z \rightleftharpoons В$ -равновесие в сторону В-формы [1]. Энтальпия В—Z-перехода, оцененная с помощью этой «скрепки», оказалась на порядок меньше энтальпии перехода спираль—клубок: $\Delta H_{ВZ} = -0,7$ ккал/моль, $\Delta H_{\text{спираль—клубок}} = 9$ ккал/моль. (Знак минус означает, что в данных условиях температура стабилизирует В-форму.)

В настоящей работе мы задались целью проверить этот вывод с помощью другого лиганда — полиамина, стабилизирующего в отличие от БЭ Z-конформацию [3]. Кроме того, исследования проводили в широком интервале ионной силы раствора и на разных образцах поли[д(Г—Ц)] для выяснения, как подобные факторы могли бы влиять на термодинамические параметры В—Z-перехода.

Материалы и методы. Использовали поли[д(Г—Ц)] фирмы «Pharmacia, Mol. Biol.» (США). Концентрацию полинуклеотида определяли по величине молярного поглощения В-формы $A^{255} = 8400$. Растворы готовили на дважды дистиллированной воде. Концентрация полинуклеотида была около $5 \cdot 10^{-5}$ М (Р). Все растворы содержали 55 % этанола (по объему), концентрации NaCl и полиамина указаны в подписях к рисункам и таблице. Полиамин N-(аминоэтил)-1,3-пропандиамин (АЭПДА) фирмы «Aldrich» (США) очищали перекристаллизацией. Z — В-переход регистрировали методом кругового дихроизма (КД) на дихрографе Mark III, «Jobin Ivon» (Франция) в 0,5 см термостатируемой кювете. Так как время установления равновесия при каждой температуре составляло десятки минут и более, то степень перехода регистрировали при дискретных значениях температуры. При каждой из этих температур образец выдерживали до завершения перехода [1]. Для снятия температурных кривых В — Z-перехода использовали два термостата: пока один термостат с нужным значением температуры был соединен с кюветным отделением, другой, отсоединенный, устанавливали на следующее значение температуры; после завершения кинетики записывали равно-

* Представлена членом редколлегии М. Д. Франк-Каменским.

всный спектр КД, а затем использовали второй термостат и т. д. попеременно. При помощи калиброванной термопары, погруженной непосредственно в кювету, было проверено, что в интервале температур 15—50 °С в кювете и термостате температуры различались не более чем на 0,5 °С.

Трудности при изучении В—Z-перехода. Первая трудность, обязательно присущая изучению В \rightleftharpoons Z-равновесия в поли[д(Г—Ц)],— это медленная кинетика, ибо времена установления равновесия достигают часов. В связи с этим изрядное число публикаций представляют результаты изучения неравновесных систем и тем самым непригодны для термодинамического анализа. В своей работе [1] мы специально исследовали кинетические аспекты В—Z-переходов, и все спектры КД, приведенные в настоящей статье, записаны после выхода кинетической кривой на асимптоту.

Вторая трудность еще более значительна. Из-за агрегации образца в 55 %-ном растворе этанола мы вынуждены были работать при ионных силах не выше $5 \cdot 10^{-3}$ М NaCl. В этих условиях заметное влияние на В \rightleftharpoons Z-равновесие начинают оказывать неконтролируемые примеси ионов металлов, эффекты от которых не удается устранить полностью даже с помощью ЭДТА [4]. Более того, по мере нахождения образца в стеклянной посуде наблюдается систематическое изменение точки Z—В-перехода, вероятно, из-за хелатирования полинуклеотидами ионов Ca²⁺ из стенок пробирки. Но, несмотря на отмеченное влияние примесей на положение точки перехода, сдвиги перехода в присутствии добавленных лигандов и влияние лигандов на ширину перехода оказались в пределах ошибки не зависящими от параметров исходной кривой перехода. Этот результат важен не столько потому, что позволяет избавиться от трудоемкой и не всегда успешной процедуры стандартизации образцов, сколько из-за того, что доказывает малую зависимость, например, такого параметра, как энтальпия перехода от типичных примесей.

Наконец, еще одна трудность связана с выбором лиганда-«скрепки» при определении термодинамических параметров В—Z-перехода. В нашей предыдущей работе в качестве «скрепки» был использован БЭ. Было известно, что это соединение стабилизирует В-форму [5], и нашей главной целью было продемонстрировать селективность изучения взаимодействия лигандов с полинуклеотидом в условиях малой ионной силы водно-спиртовых растворов. Однако, как оказалось, различие в константах связывания БЭ с В- и Z-конформациями не слишком велико. При этом и сдвиг профиля перехода и, особенно, уширение перехода—недостаточно велики. Отсюда меньшая точность определения энтальпии В—Z-перехода.

В данной работе мы выбрали другую «скрепку»: полнамин АЭПДА. По аналогии с результатами экспериментов со спермином [3] можно думать, что он, во-первых, стабилизирует Z-форму, и, во-вторых, связывается с ней намного сильнее, чем с В-формой.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 показано, что температура влияет на В \rightleftharpoons Z-равновесие. Очевидно, что в обоих случаях с ростом температуры стабилизируется В-форма. При этом тождественные формы спектров КД наряду с существованием изодихронной точки доказывают, что в равновесии участвуют только две структуры—В и Z. Однако в присутствии полнамина Z—В-переход затруднен, что видно из профилей переходов (рис. 2).

Очевидно также, что полнамин не только сдвигает переход к более высокой температуре, но и значительно расширяет интервал перехода. Таким образом, полнамин является «скрепкой» Z-состояния. Как известно, сдвиг (δT_0) и уширение ($\delta \Delta T$) профиля перехода в присутствии «скрепки» позволяют определить энтальпию (ΔH) кооперативного перехода [6, 7]. В общем случае имеют место соотношения [7]:

$$\delta T_0 = \Lambda \cdot \frac{RT_0^2}{\Delta H_{BZ}} c; \quad (1)$$

$$\delta \Delta T = \Lambda^2 \frac{RT_0^2}{\Delta H_{BZ}} c. \quad (2)$$

Здесь $c = 2D/P$ — величина, обратная числу пар оснований ($P/2$), при-

ходящихся на одну молекулу лиганда (D);

$$\Lambda = 2 \frac{p-1}{p+1} \frac{PK_Z + PK_B}{4 + PK_Z + PK_B}, \quad (3)$$

где K_Z и K_B — константы связывания «скрепки» с Z- и В-формами, P — концентрация нуклеотидов, а $p = K_B/K_Z$.

Справедливость уравнений (1) и (2) ограничена лишь одним условием — $c \ll 1$. Особенно простые формулы получаются, когда связыва-

Рис. 1. Семейство равновесных спектров КД раствора поли[д(Г—Ц)] при разных температурах в отсутствие (а) и присутствии (б) полиамина (1 молекула на 50 п. о.). Условия: 55 %-ный раствор (по объему) этанола, $5 \cdot 10^{-4}$ М NaCl, $5 \cdot 10^{-5}$ М ЭДТА

Fig. 1. A family of equilibrium circular dichroism (CD) spectra of poly[d(G—C)] at different temperatures in the absence (a) and presence (b) of polyamine (1 molecule per 50 base pairs). Conditions: ethanol, 55% v/v; NaCl, $5 \cdot 10^{-4}$ M; EDTA, $5 \cdot 10^{-5}$ M

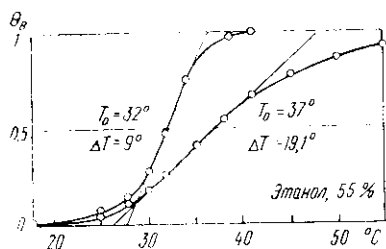
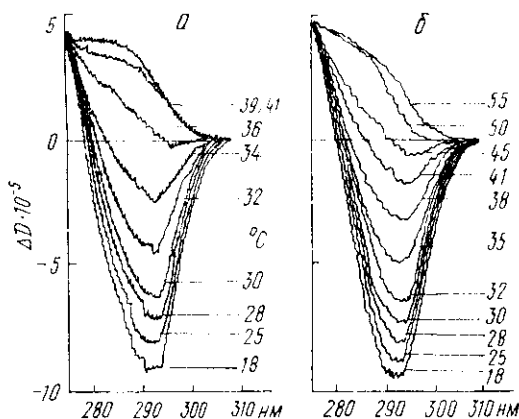


Рис. 2. Профили Z—В-перехода свободного поли[д(Г—Ц)] и его комплекса с полиамином (1 молекула на 50 п. о.). θ_B — доля В-формы по данным КД рис. 1

Fig. 2. Profiles of the Z-B transition of free poly[d(G-C)] and its complex with polyamine (1 molecule per 50 base pairs). θ_B is for the B form fraction from the CD data of Fig. 1

ние «скрепки» с одной из форм много сильнее, чем с другой. Практически, если $p = K_B/K_Z < 0,1$, $PK_B \gg 1$, $PK_Z \gg 1$, то, как видно из (3), $\Lambda = 2$, и мы имеем:

$$\delta T_0 = 2 \frac{RT_0^2}{\Delta H_{BZ}} c; \quad (4)$$

$$\delta \Delta T = 4 \frac{RT_0^2}{\Delta H_{BZ}} c. \quad (5)$$

Из (4) и (5) следует, что в этом случае уширение вдвое превосходит сдвиг, и ΔH_{BZ} может быть независимо определена по изменению каждого параметра кривой. И наоборот, экспериментально полученный факт удвоенного по отношению к сдвигу уширения доказывал бы справедливость неравенства $K_Z/K_B > 10$. Как установлено в работе [1], для БЭ подобное неравенство ($K_B/K_Z > 10$) не выполняется, так как там $\delta \Delta T / \delta T_0 = 3,2/4 = 0,8$. Поэтому для определения ΔH_{BZ} нужно было использовать соотношения, включающие одновременно и δT_0 , и $\delta \Delta T$, справедливые при дополнительном предположении, что в растворе нет свободного лиганда.

В отличие от БЭ для полиамина $\delta \Delta T / \delta T_0 = 2$ (рис. 2), что делает этот лиганд более подходящей «скрепкой» для точного определения энтальпии В—Z-перехода.

Мы изучили действие полиамина на В—Z-переход в интервале ионных сил от 0,5 до 2 мМ NaCl. В таблице представлена сводка экспери-

ментов. Можно видеть, что в пределах указанной точности ионная сила не влияет на сдвиги и уширение кривых перехода под действием полиамиона. Тем самым и энтальпия перехода должна быть приблизительно постоянной.

На рис. 3 приведены зависимости сдвигов и уширения В—Z-перехода, построенные по усредненным данным из таблицы. Видно, что отношение наклона кривой уширения к кривой сдвига с хорошей точно-

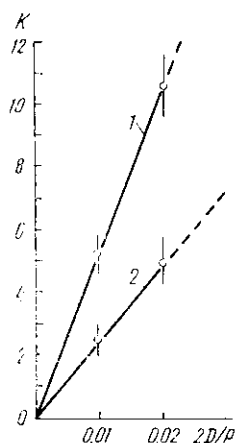


Рис. 3. Зависимости уширения кривой $\delta\Delta T$ (1) и сдвига δT_0 (2) В—Z-перехода от концентрации «скрепки» на основе данных таблицы. Условия, как на рис. 1, кроме того, что концентрацию NaCl варьировали в интервале $5 \cdot 10^{-4} \div 2 \times 10^{-3}$ М

Fig. 3. Dependence of the widening $\delta\Delta T$ (1) and shift δT_0 (2) of the В—Z transition on the «tie» concentration on the basis of the data from Table. Conditions: ethanol, 55% (v/v); EDTA, 5×10^{-5} М; NaCl was varied within the range of $5 \cdot 10^{-4} \div 2 \cdot 10^{-3}$ М

Изменение параметров температурного Z—B-перехода в присутствии полиамиона
The change of the parameters of the Z to B transition, induced by temperature, in the presence of the polyamine

NaCl, М	Полиамион (молекула на пары оснований)			
	0,01		0,02	
	δT_0	$\delta\Delta T$	δT_0	$\delta\Delta T$
$5 \cdot 10^{-4}$	3,0	4,6	5,6	11,6
	2,7	5,2	—	—
	2,0	4,6	5,0	10,1
	2,6	4,8	5,3	10,8
10^{-3}	2,1	5,0	—	—
	2,6	4,4	—	—
	2,0	6,0	—	—
	2,2	5,1	—	—
$1,4 \cdot 10^{-3}$	2,7	6,6	—	—
	—	—	—	—
$2 \cdot 10^{-3}$	3,0	5,6	—	—
	3,0	5,0	4,6	9,8
	3,0	5,3	—	—

Примечание. Усредненные по всем опытам изменения параметров Z—B-перехода: $2D/P=0,01$; $\delta T_0=2,5 \pm 0,5$; $\delta\Delta T=5,2 \pm 0,7$ (стандартная ошибка); $2D/P=0,02$; $\delta T_0=4,9 \pm 0,7$; $\delta\Delta T=10,5 \pm 1,1$ (наибольшая ошибка). Величины с чертой сверху—средние значения при каждой из ионных сил.

стью соответствует 2 : 1. Поэтому для определения энтальпии перехода годятся простые формулы (4) или (5):

$$\Delta H_{BZ} = -2 \frac{c}{\delta T_0} RT_0^2 = -(1,4 \pm 0,2) \text{ ккал/моль}$$

или

$$\Delta H_{BZ} = -4 \frac{c}{\delta\Delta T} RT_0^2 = -(1,38 \pm 0,2) \text{ ккал/моль}$$

Этот результат согласуется с выводом нашей прежней работы [1] о том, что энтальпия температурного Z—B-перехода для поли[д(Г—Ц)] в 55%-ном растворе этанола отрицательна и невелика. Кроме того, она с точностью 10% не зависит от ионной силы.

Вместе с тем полученное здесь значение вдвое больше, чем в нашей работе, где «скрепкой» служил БЭ [1]. Выше мы уже обсуждали причины того, что БЭ в качестве «скрепки» менее пригоден, чем полиамион. Поэтому значение, полученное в настоящей статье, мы считаем более правильным. Недавно нам удалось подтвердить это, используя совсем другой метод определения ΔH_{BZ} на основе полиэлектролитной теории.

THERMODYNAMICS OF THE B-Z TRANSITION OF POLY[d(G-C)]
IN WATER/ETHANOL SOLUTION. THE «TIE» CALORIMETRY

A. T. Karapetyan *, E. E. Minyat, P. O. Vardevanyan *, V. I. Ivanov

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow
* Pedagogical Institute, Armenian SSR, Kirovakan

Summary

Poly[d(G-C)] in 55 % ethanol solution shifts from the Z form to the B form with the temperature rise from 20 to 50 °C. Enthalpy of the B-Z transition, ΔH_{BZ} , has been determined with a «tie», a polyamine, which stabilized the Z conformation: $\Delta H_{BZ} = -1.4$ kcal/mol. This value was shown to be practically independent from the ionic strength in the range of $5 \cdot 10^{-4}$ — $2 \cdot 10^{-3}$ M NaCl.

1. Karapetyan A. T., Minyat E. E., Ivanov V. I. Increase in temperature induces the Z to B transition of poly d(G-C) in water-ethanol solution // FEBS Lett.—1984.—173, N 1.—P. 243—246.
2. Pohl F. M., Jovin T. M. Salt-induced co-operative conformational change of a synthetic DNA: equilibrium and kinetic studies with poly(dG-dC) // J. Mol. Biol.—1972.—67, N 3.—P. 375—396.
3. Ivanov V. I., Minyat E. E. The transitions between left- and right-handed forms of poly(dG—dC) // Nucl. Acids Res.—1981.—9, N 18.—P. 4783—4798.
4. Woisard A., Guschlbauer W., Fazakerley G. V. The low ionic strength form of the sodium salt of poly(dm⁵C-dG) is a B DNA // Ibid.—1986.—14, N 1.—P. 3515—3519.
5. Ethidium bromide as a cooperative effector of a DNA structure / F. M. Pohl, T. M. Jovin, W. Baer, Ch. Holbrook // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1972.—69, N 13.—P. 3805—3809.
6. Lazurkin Yu. S., Frank-Kamenetskii M. D., Trifonov E. N. Melting of DNA: its study and application as a research method // Biopolymers.—1970.—9, N 10.—P. 1253—1306.
7. Франк-Каменецкий М. Д., Карапетян А. Т. Теория плавления ДНК в присутствии низкомолекулярных веществ // Молекуляр. биология.—1972.—6, № 7.—С. 624—635.

Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва
Кировакан. пед. ин-т

Получено 09.03.87

УДК 547.963.32

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ
И БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ОБРАТНОЙ ГИРАЗЫ
ИЗ ЭКСТРЕМАЛЬНО ТЕРМОФИЛЬНЫХ АРХЕБАКТЕРИЙ *

А. И. Слесарев, С. А. Козьявкин

Введение. Существование живых организмов при высоких температурах (вплоть до 110 °C [1]) ставит проблему стабилизации вторичных и третичных структур биологических макромолекул. Обнаружение специального фермента, создающего положительную сверхспирализацию в ДНК,— обратной гиразы — в двух различных экстремально термофильных архебактериях (*Sulfolobus acidocaldarius* с оптимумом роста при 75 °C [2, 3] и *Desulfurococcus amylolyticus* с оптимумом роста при 92 °C [4]), а также обнаружение положительной сверхспирализации в ДНК, выделенной из *S. acidocaldarius* [5], дают основания предположить, что создание положительной сверхспирализации является общим принципом стабилизации двойной спирали ДНК в экстремальных термофилах. Поскольку основная роль при этом принадлежит обратной гиразе, то в настоящее время вызывает интерес изучение специфики и механизма действия фермента, а также его места в ряду других топоизомераз.

Данная работа посвящена исследованию субстратной специфичности обратной гиразы из *D. amylolyticus*.

* Представлена членом редколлегии М. Д. Франк-Каменецким.