

Экспериментальное изучение явления гистерезиса в процессе гидратации—дегидратации NaДНК

М. Е. Толсторуков, К. М. Вирник¹

Харьковский государственный университет
310077, Харьков, пл. Свободы, 4

¹ Институт радиофизики и электроники НАН Украины
310085, Харьков, ул. Академика Проскуры, 12

Представлены результаты экспериментальных исследований гистерезисных явлений в системе NaДНК—вода, проведенных методом гравиметрии. Интервалы относительной влажности, в которых наблюдается гистерезис, соотносятся с таковыми существования устойчивых конформаций ДНК. Гистерезисные явления отражают взаимосвязь процессов сорбции воды и конформационных переходов молекулы биополимера.

Введение. Исследования, в которых вода постепенно добавляется к сухому биополимеру, необходимы для изучения возможных структурных и динамических изменений в молекуле биополимера за счет взаимодействия с растворителем. В настоящее время существует множество данных по гидратации нуклеиновых кислот [1, 2]. На основании этих данных можно сделать вывод о том, что в процессе гидратации нуклеиновых кислот в них происходят конформационные изменения. Так, при дегидратации имеет место изменение наклона азотистых оснований относительно оси спирали и потеря стэкинга, что указывает на переход молекул ДНК из упорядоченной формы в неупорядоченную [3]. Регидратация ведет к восстановлению исходного конформационного состояния. Это хорошо согласуется с результатами исследований, проведенных другими методами [2, 4, 5].

Более детальное изучение показывает, что натриевые соли природных ДНК при биологических значениях содержания ионов находятся в одном из трех возможных состояниях: неупорядоченной, А- и В-формах [1]. Под неупорядоченным состоянием понимается особая форма ДНК в обезвоженных образцах [2, 6, 7]. Между этими формами происходят обратимые конформационные переходы при изменении содержания воды в образце. Эти пере-

ходы тесно связаны с перестройкой гидратной оболочки ДНК, образованной молекулами воды, сорбированными в процессе гидратации. Молекулы сорбированной воды образуют между собой водородные связи, стабилизирующие ту или иную конформацию ДНК [1]. При этом каждой конформации ДНК присуща специфическая структура гидратной оболочки.

Согласно экспериментальным данным, переход из неупорядоченной формы в А-форму происходит при 75—76 % относительной влажности (ОВ) и переход из А- в В-форму — при 92—94 % ОВ [1, 2, 6]. Конформационные переходы ДНК сопровождаются гистерезисом [3—5, 8], т. е. обратные переходы из В- в А-форму и из А-формы в неупорядоченное состояние осуществляются при более низких значениях ОВ. Кривые зависимости содержания воды образцами ДНК также имеют гистерезис при циклическом изменении ОВ [9]. Такой гистерезис мог бы быть проявлением макроскопических эффектов. Однако его величина не зависит от размера образца в широком диапазоне толщины пленок (0,05—0,2 мкм) [3] и его пористости [10]. Это позволяет считать, что гистерезис не является макроскопическим эффектом, а отражает молекулярное взаимодействие воды и биополимера.

Немного публикаций посвящено исследованию этого интересного явления. Кроме цитированных выше экспериментальных сообщений, необходимо

отметить существование теоретических работ, предлагающих подход к оценке термодинамических параметров сорбции воды биополимерами при наличии гистерезиса, а также возможные термодинамические интерпретации этого явления (для обзора см. [11]). В работе [12] представлена математическая модель, основывающаяся на кинетических уравнениях процессов сорбции и конформационных переходов.

Недостаток внимания к проблеме изучения гистерезисных явлений делает актуальными исследования в данной области. В настоящей работе представлены результаты экспериментального изучения гистерезисных явлений в системе NaДНК—вода, проведенных методом гравиметрии, заключающимся в измерении количества воды, сорбированной образцом, как функции ОВ окружающей атмосферы.

Материалы и методы. В данной работе в качестве образцов использовали волокна натриевой соли ДНК тимуса телят фирмы «Serva» (ФРГ). Ультрафиолетовые спектры показывали полную нативность образцов ДНК (гипохромный эффект $\approx 38\%$).

Образцы ДНК подвергали лиофильной сушке до тех пор, пока масса образцов не становилась постоянной при комнатной температуре. Масса каждого сухого образца составляла примерно 50 мг.

Процедура измерений практически совпадала с таковой, описанной в работе [9]. Кювету с образцом помещали в изолированный контейнер, где поддерживался постоянный уровень ОВ с помощью насыщенного раствора соответствующей соли. Температура в ходе экспериментов была постоянной (21°C). Значения ОВ для насыщенных растворов солей взяты из работ [9, 13].

Для получения образца с данным содержанием воды волокна NaДНК выдерживали в атмосфере с постоянной ОВ в течение трех дней. Как показали эксперименты, этого времени оказывается достаточно для достижения как массового, так и конформационного стационарного состояния [6]. В отношении стационарного состояния массы необходимо заметить, что для его достижения требуется меньшее время (один день или немного более) [3, 6]. Этот факт также подтверждается нашими данными по ежедневному взвешиванию образцов до тех пор, пока их масса не оставалась неизменной в течение двух недель. После экспозиции образец взвешивался с точностью до 0,05 мг. Максимальное количество воды, сорбированной на кювете, не превышало 0,05 мг или 0,1 % массы воды, сорбированной образцом при 100 % ОВ.

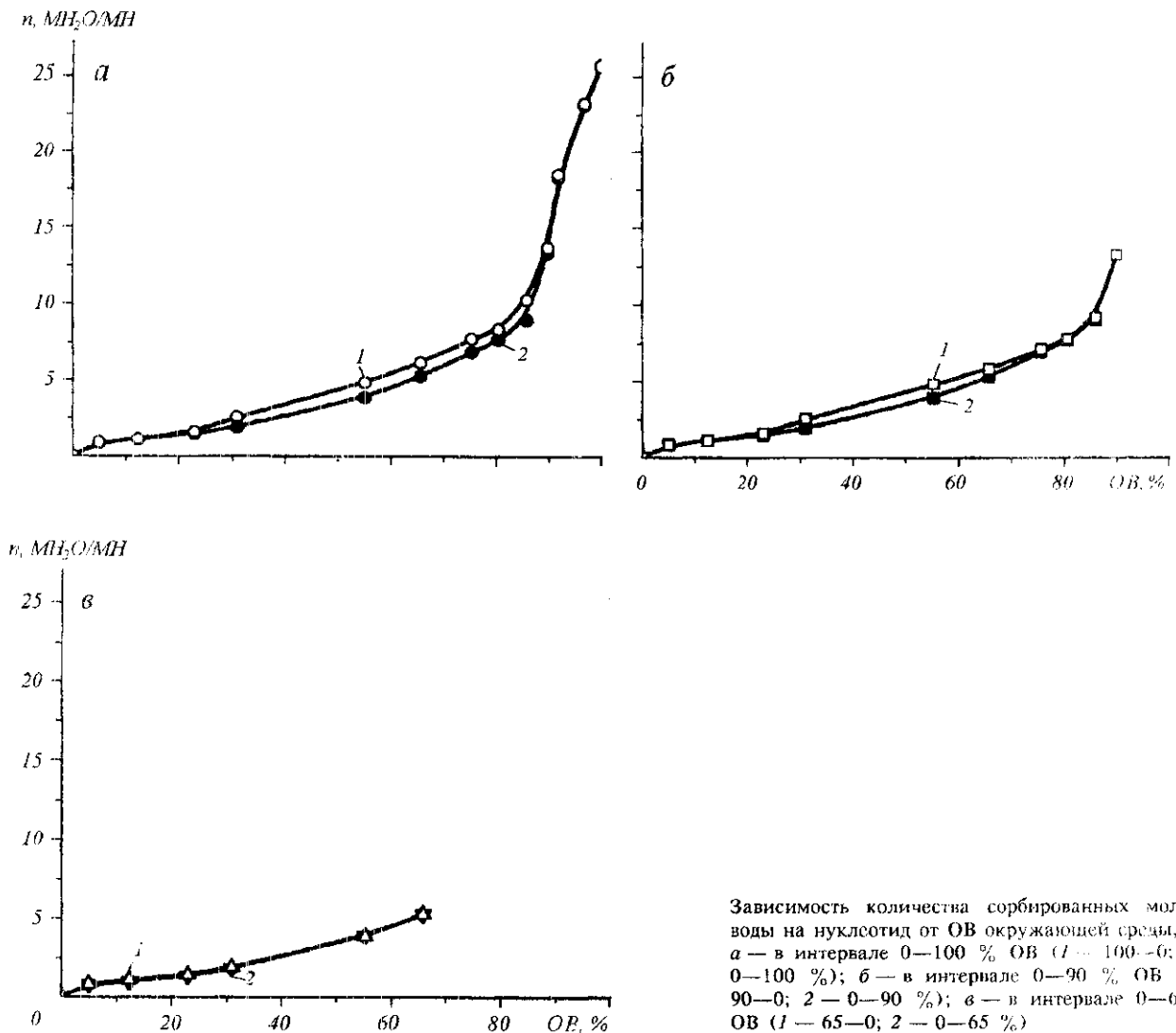
Приближение к равновесию происходило как

со стороны более низких значений ОВ (гидратация), так и со стороны более высоких (дегидратация). Таким образом, получены соответственно изотермы гидратации и дегидратации, т. е. зависимости содержания воды в образце (количество молей воды на моль нуклеотидов, $\text{Mn}_2\text{O}/\text{Mn}$), n , от ОВ. На образцах нативной ДНК проведены три серии экспериментов. Для каждой серии выбрана определенная область изменения ОВ: 1) $0 \rightarrow 100 \rightarrow 0\%$ ОВ; 2) $0 \rightarrow 90 \rightarrow 0\%$ ОВ; 3) $0 \rightarrow 65 \rightarrow 0\%$ ОВ. Каждую область ОВ выбирали таким образом, чтобы можно было с уверенностью сказать, что при наибольшем значении ОВ в этой области ДНК находится в определенной форме. Поскольку переход ДНК из неупорядоченного состояния в А-форму происходит при 75—76 % ОВ, а переход из А- в В-форму при 92—94 % ОВ [1, 2, 6], то при 65, 90, 100 % ОВ NaДНК находится в неупорядоченной, А- или В-формах соответственно.

Процедуру измерения содержания воды в образцах NaДНК при каждом значении ОВ во всех проведенных сериях экспериментов производили пять раз. Среднеквадратическое отклонение, S , и относительный показатель разброса результатов измерений (коэффициент вариации), V , определенные в соответствии со стандартной процедурой, в зависимости от значений ОВ составляли: $S = 0,1$, $V = 5-7\%$ в области низких значений ОВ (0—40 % ОВ); $S = 0,2$, $V = 3-5\%$ в области умеренной ОВ (40—80 % ОВ); $S = 0,3$, $V = 2-3\%$ при высоких значениях ОВ (80—100 % ОВ). Изотермы сорбции, полученные для всех трех серий экспериментов, совпадают в соответствующих диапазонах ОВ в пределах ошибки эксперимента.

Результаты и обсуждение. Изотермы для случаев сорбции и десорбции молекул воды по всему интервалу значений ОВ (0—100 %) для нативных образцов ДНК представлены на рисунке, а. Изотерма десорбции лежит выше изотермы сорбции в интервале примерно от 20 до 90 % ОВ. Такой сорбционный гистерезис сохраняется на протяжении недель, не уменьшаясь заметным образом. Величина гистерезиса в максимуме (в области 55 % ОВ) достигает $1,2 \pm 0,2$ молекулы воды. Необходимо отметить, что верхняя граница петли гистерезиса является областью конформационного перехода из А- в В-форму.

Значения содержания воды в волокнах ДНК, полученные в настоящей работе, несколько меньше по абсолютному значению, чем таковые, приведенные в известных работах [6, 9], которые были получены для ориентированных пленок ДНК. Мы считаем, что наблюдаемые различия связаны с тем,



что ориентированные пленки ДНК сорбируют больше молекул воды, чем волокна, как это было показано в работе [10]. Кроме того, эти различия в значениях содержания воды могут быть связаны также с различиями в содержании противоионов в образцах ДНК, использованных в нашем исследовании и в цитированных работах.

На рисунке, б, представлены результаты второй серии экспериментов: изотермы сорбции и десорбции для интервала 0—90 % ОВ. В этом случае гистерезис наблюдается в более узком интервале ОВ (20—75 %), чем для первой серии экспериментов, однако максимальные значения гистерезиса хорошо совпадают для этих двух серий.

В данной серии гистерезис также сохраняется в течение недель. Кривые сорбции для обеих серий экспериментов совпадают в пределах экспериментальной ошибки. Кривая десорбции второй серии выходит на значения, полученные в первой серии, в области 55 % ОВ и в дальнейшем обе десорбционные кривые совпадают в пределах ошибки эксперимента вплоть до 0 % ОВ.

Наши данные о максимальном значении n в интервале гистерезиса второй серии согласуются с результатами, полученными в работе [9], в которой изотермы сорбции и десорбции снимали для пленок NaДНК тимуса теленка в интервале 0—93,2 % ОВ методом гравиметрии. Значения 90—

94 % ОВ являются интервалом А → В-конформационного перехода. Совпадение результатов второй серии и несовпадение результатов первой, на наш взгляд, — это следствие того, что в первой серии при ОВ выше 94 % происходил переход образца ДНК в В-форму, в отличие от второй серии и результатов работы [9], где такого конформационного перехода не происходило. Необходимо заметить, что для второй серии экспериментов наблюдается интервал ОВ (90—75 %), в котором изотермы сорбции и десорбции совпадают (рисунк, б). При 75 % ОВ начинается конформационный переход молекулы ДНК из неупорядоченной формы в А-конформацию. Интервал ОВ, в котором отмечен гистерезис, а также значения ОВ, соответствующие его максимальной величине, хорошо согласуются и с результатами, представленными в работах [3, 8]. Данные по дихроичному отношению для образцов ориентированных пленок NaДНК тимуса теленка в зависимости от ОВ [3] показывают, что при дегидратации и последующей регидратации пленок ДНК наблюдается ярко выраженный конформационный гистерезис, наиболее сильно проявляющийся между 45 и 55 % ОВ. Верхняя граница петли гистерезиса находится в области 70 % ОВ. В этих экспериментах образцы ДНК увлажняли до 94 % ОВ. Эта область ОВ, как уже упоминалось выше, является пограничной между А- и В-формой. Следовательно, ДНК в данном случае, как и в работе [9], вероятнее всего, находилась в А-форме и значение ОВ, соответствующей верхней границе гистерезиса, согласуется с таковым, полученным нами во второй серии экспериментов. Расчеты, основанные на данных оптических измерений [8], показывают наличие конформационного гистерезиса в ходе цикла дегидратация—регидратация. Его верхняя граница лежит примерно в области 75 % ОВ, максимальные значения величины гистерезиса находятся в области 50—55 % ОВ, а спиральная структура ДНК практически полностью исчезает при 20—25 % ОВ, что приводит к исчезновению гистерезиса.

Гистерезисные эффекты в цикле гидратация — дегидратация молекулы ДНК также наблюдались в работах по инфракрасному и ультрафиолетовому линейному дихроизму [4, 5]. В работе [4] отмечен гистерезис в зависимостях дихроичного отношения от ОВ в диапазоне 20—80 % ОВ, а интервал гистерезиса, исследованного в работе [5], лежит в области 20—75 % ОВ. Эти результаты также довольно хорошо согласуются с нашими.

Полученные данные позволяют связать наблюдаемые гистерезисные явления в системе ДНК—вода в цикле гидратация—дегидратация с конформационными переходами в молекуле нуклеиновой

кислоты. Обратные конформационные переходы происходят при более низких значениях ОВ, чем прямые, вследствие стабилизирующего действия гидратной оболочки, сформированной ранее в процессе гидратации (конформационный гистерезис). В то же время специфичность гидратных оболочек различных конформаций нуклеиновых кислот приводит к разным значениям содержания воды в макромолекуле между значениями ОВ, соответствующими прямым и обратным конформационным переходам (сорбционный гистерезис). Таким образом, мы рассматриваем гистерезис как молекулярный, немакроскопический феномен.

Для проверки этого предположения была осуществлена третья серия экспериментов, т. е. получены изотермы сорбции и десорбции в интервале 0—65 % ОВ. В данном интервале ОВ молекула ДНК не испытывает конформационных переходов, поэтому гистерезисные явления не должны наблюдаться. Результаты третьей серии экспериментов представлены на рисунке, в. Видно, что изотермы сорбции и десорбции совпадают в пределах экспериментальной ошибки во всем рассматриваемом интервале ОВ, т. е. процесс сорбция—десорбция является полностью обратимым. Эти данные подтверждают наше предположение о природе гистерезисных явлений в системе ДНК—вода.

Таким образом, гистерезисные явления должны рассматриваться как микроскопический феномен, отражающий молекулярные взаимодействия в системе нуклеиновая кислота—вода, а именно: взаимосвязь процессов сорбции воды и конформационных переходов молекулы биополимера. Другими словами, сорбированные молекулы воды в известной степени определяют конформацию и являются неотъемлемой структурной частью нативной формы нуклеиновой кислоты.

Данное исследование не дает ответа на вопрос о термодинамической природе явления гистерезиса. Можно предположить, что гистерезис является следствием существования метастабильных состояний в системе нуклеиновая кислота—вода [12]. Однако вследствие значительного среднего времени жизни этих состояний (величина гистерезиса не уменьшается в течение недель, что намного больше времени протекания биологически важных процессов) гистерезис, вероятно, может играть определенную роль в процессах регуляции жизнедеятельности клетки.

Авторы выражают благодарность В. Я. Малееву (Институт радиофизики и электроники НАН Украины) за помощь в постановке задачи и обсуждении полученных результатов. Авторы также выражают свою признательность А. И. Гасану (Институт

радиофизики и электроники НАН Украины) за
помощь, оказанную в ходе проведения данной ра-
боты.

М. Е. Толсторуков, К. М. Вирник

Експериментальне вивчення явища гістерезису в процесі
гдратації—дегідратації NaДНК

Резюме

Представлено результати експериментальних досліджень гіс-
терезисних явищ у системі NaДНК—вода, які були виконані
гравіметричним методом. Інтервали, у яких спостерігається
гістерезис, співвідносяться з інтервалами існування стійких
конформацій ДНК. Гістерезисні явища відображають взаємо-
зв'язок процесів сорбції води та конформаційних переходів
молекули біополімеру.

М. Ye. Tolstorukov, K. M. Virnik

Experimental study of hysteresis phenomenon in the NaDNA
hydration-dehydration process

Summary

Results of the experimental study of hysteresis phenomena in the
NaDNA-water system carried out with using gravimetric technique
are presented. Intervals of relative humidity where hysteresis is
observed correlate with ones of stable DNA conformation existence.
Hysteresis phenomena reflect relationship between water sorption
and conformational transitions of biopolymer molecule.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Saenger W. Structure and dynamics of water surrounding
biomolecules // Ann. Rev. Biophys. Chem.—1987.—16.—
Р. 93—114.
2. Малеев Б. Я., Семенов М. А., Гасан А. И. и др. Физичес-
кие свойства системы ДНК—вода // Биофизика.—1993.—
38.—С. 768—790.

3. Wetzel R., Zirwer D., Becker M. Optical anisotropy of oriented
deoxyribonucleic acid films of different water content //
Biopolymers.—1969.—8.—Р. 391—401.
4. Falk M., Hartman K. A., Lord R. C. Hydration of de-
oxyribonucleic acid. III. A spectroscopic study of the effect of
hydration on the structure of deoxyribonucleic acid // J. Amer.
Chem. Soc.—1963.—85.—Р. 391—394.
5. Fritzsche H., Lang H., Sprinz H. et al. On the interaction of
caffeine with nucleic acids. IV. Studies of the caffeine-DNA
interaction by infrared and ultraviolet linear dichroism. proton
and deuterium nuclear magnetic resonance // Biophys. Chem.—
1980.—11.—Р. 121—131.
6. Lindsay S. M., Lee S. A., Powell J. M. et al. The origin of the
A to B transition in DNA fibres and films // Biopolymers.—
1989.—27.—Р. 1015—1043.
7. Zehfus U. H., Johnson W. C. Conformation of P-form DNA //
Ibid.—1984.—23.—Р. 1269—1281.
8. Wetzel R. Conformational changes of DNA in oriented films at
varying relative humidities // Stud. biophys.— 1973.—35.—
Р. 107—114.
9. Falk M., Hartman K. A., Lord R. C. Hydration of deoxy-
ribonucleic acid. I. A gravimetric study // J. Amer. Chem
Soc.—1962.—84.—Р. 3843—3846.
10. Волков В. В., Гасан А. И., Малеев В. Я. Влияние гли-
церина на гистерезисные явления в ДНК // Препринт
№ 386.—Харьков: Изд. ИРЭ АН УССР, 1989.—16 с.
11. Bryan W. P. Thermodynamics models for water-protein sorp-
tion hysteresis // Biopolymers.—1987.—26. Р. 1705—1716.
12. Толсторуков М. Е., Гасан А. И., Гаташ С. В. и др.
Молекулярные механизмы сорбционного гистерезиса в си-
стеме ДНК—вода // Биофизика.—1997.—42.—С. 844—
854.
13. Воронец Д., Козич Д. Влажный воздух: термодинамические
свойства и применение.—М.: Энергоатомиздат, 1984.—
135 с.

Поступила в редакцию 17.12.97