



Структура и функция биополимеров

УДК 577.3

© Г. М. Мревлишвили, Г. Н. Лапиашвили, Т. Дж. Мдзинарашвили,
М. З. Горгошидзе, М. Г. Харатишвили, Н. Э. Якобашвили, 1990

ЭНЕРГЕТИКА ПЕРЕХОДОВ В — Z- И Z-КЛУБОК В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ПОЛИ(dG-dC)*

С использованием методов дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), кругового дихроизма (КД) и УФ-спектрофотометрии исследовали переходы В—Z- и Z-спираль — клубок в поли(dG-dC). При 76 °С наблюдался обратимый переход, идентифицированный как В—Z-переход. При 97 °С был зафиксирован гораздо более интенсивный по теплпоглощению переход Z-спираль — клубок. Рассчитаны термодинамические параметры этих переходов.

Введение. Прошло почти два десятилетия со времени, когда впервые было высказано предположение о возможности перехода молекулы ДНК из правозакрученной В-формы в необычную — левоспиральную форму двойной спирали [1]. За это время мы стали свидетелями больших успехов в изучении переходов ДНК в пределах двухтяжевого состояния (вплоть до непосредственного обнаружения рентгенографически самих левоспиральных структур [2], составляющих семейство Z-форм, и даже сегментов нативной ДНК со структурой Z-типа в составе рекомбинантных [3], бактериальных [4] и эукариотических [5] хромосом, построения диаграмм состояния растворов природных и синтетических ДНК, определяющих области существования А-, В- и Z-форм ДНК [6, 7] и т. д.).

Однако установление значений термодинамических параметров (температуры, энтальпии, энтропии, свободной энергии) этого перехода все еще актуальная задача.

Сводка опубликованных данных приведена в таблице.

Мы поставили целью определить с помощью наиболее надежного и прямого метода, такого как сканирующая микрокалориметрия, термодинамические параметры В—Z-перехода в чередующемся полинуклеотиде поли(dG-dC), для которого при малой концентрации поддерживающего электролита в присутствии ионов Mg^{2+} имеет место температурозависимый В—Z-переход [8].

Материалы и методы. Использовали препараты фирмы «Boehringer Mannheim» (ФРГ), лиофилизованные в виде натриевой соли, без дополнительной очистки. Растворы готовили на дистиллированной воде, используя реактивы фирмы «Serva» (ФРГ) градации «А». Концентрацию полинуклеотида определяли по величине молярного поглощения его В-формы $A^{255} = 16\,800$ [9]. Концентрация полинуклеотида в калориметрических экспериментах была 0,9 мг/мл, при спектрофотометрических — 0,02—0,05 мг/мл. За переходом В — Z и плавлением полинуклеотида следили с помощью спектрофотометра SP 1 800 фирмы «Ray Unicam» (Англия), оснащенного температуро-сканирующей приставкой, при фиксированных длинах волн 260 и 295 нм и спектрополяриметра J 500A фирмы «Jasco» (Япония), оснащенного термостатируемой кюветой.

* Представлена членом редколлегии В. И. Ивановым.

Препараты полинуклеотида растворяли в 1 мМ какодилате натрия и 0,02 мМ Na₂-ЭДТА. Затем проводили исчерпывающий диализ против 0,5 мМ раствора какодилата натрия, 2 мМ Na₂-ЭДТА и диализ против 100 объемов 0,5 мМ раствора какодилата натрия (рН 6,5) и 1 мМ MgCl₂. Таким образом, эксперименты вели в условиях 0,05 мМ водного раствора какодилата натрия (рН 6,5), 1 мМ MgCl₂, 0,02 мМ Na₂-ЭДТА.

Калориметрические исследования осуществляли на дифференциальном сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4 (СКБ АН СССР). Подробно с методом микрокалориметрии и конструкцией прибора можно ознакомиться в статье [10]. Здесь кратко отметим, что сканирующий микрокалориметр непосредственно измеряет изменение теплоемкости при постоянном давлении (C_p) малого объема (до 0,43 мл) препарата относительно стандарта-растворителя, а площадь под пиком зависимости изменения теплоемкости от температуры (C_p=f(T)) соответствует теплоте наблюдаемого процесса превращения (ΔH_{cal}). Возможен также расчет так называемой вант-гоффовской энтальпии (ΔH_{v-h}), являющейся для кооперативных переходов ничем иным, как изменением энтальпии кооперативной единицы перехода [9, 11]:

$$\Delta H_{v-h} = ART_m^2 C_{\text{изб-макс}} / \Delta h_{\text{cal}},$$

где коэффициент A=4 для простой модели двух состояний [9]; R — газовая постоянная; T_m — абсолютная температура, при которой значение избыточной теплоемкости максимально (C_{изб-макс}); Δh_{cal} и ΔH_{cal} — калориметрическая энтальпия в кал/г и ккал/моль соответственно.

Результаты и обсуждение. Для нашего исследования мы выбрали близкую к физиологической концентрацию ионов Mg²⁺, при которой В—Z-переход должен наблюдаться при температуре 76 °С [8]. В таких условиях температура второго (для поли(dG-dC)) перехода Z-спираль — клубок достаточно удалена от температуры В—Z-перехода и одновременно находится в пределах возможности прибора ДАСМ-4,

Термодинамические параметры переходов В—Z- и Z-спираль—клубок, полученные разными методами

The B-Z and Z-helix-coil transitions thermodynamic parameters obtained by different methods

Полимер	Условия среды	Метод	Переход	Температура перехода, °С	Энтальпия перехода ΔH, ккал/моль п.о.	Энтальпия Вант-Гофа (ΔH _{v-h}), ккал/моль	Длина кооперативной единицы, п.о.
Поли(dG-dC) [16]	10 мМ Na ⁺ , 16 мМ Ca ²⁺	СФ, кривые Скэтчарда	В—Z	18	ΔG=0,12	—	—
Поли(dG-m ⁵ C) [9]	6 мМ Na(P), 0,15 мМ NaCl, 1 мМ MgCl ₂	ДСК	В—Z	38,2	0,56	60	110
			Z-клубок	120,8	8,5	417	(49)
Поли(dG-dC) [18]	0,1—0,4 мМ Na ⁺ , 10 % этанол	СФ и КД, статистико-механическое моделирование	В—Z	47	—	200	—
				34,5	—	140	—
Поли(dG-dC) [7]	0,5 мМ Na ⁺ , 55 % этанол, 0,05 мМ ЭДТА	Скрепочная калориметрия	Z—В	32	—1,4	—	—
Поли(dG-dC)	4 мМ Na ⁺ 2 мМ Mg ²⁺	ДСК	Z-клубок	118,3 130	11,2 12,7	735 —	65,6 —
Поли(dG-m ⁵ dG) [15]	0,5 мМ Na ⁺ , 1 мМ MgCl ₂ , 0,02 мМ ЭДТА, рН 6,5	ДСК	В—Z	75,5	0,2±0,02	200±20	10 ³
Z-клубок			97,7	10,1±1,1	1150±115	114	

что позволило нам определить термодинамические параметры и этого перехода.

На рис. 1 приведены кривые теплопоглощения и температурная зависимость теплоемкости для препарата поли(dG-dC) в растворе. Удалось явно идентифицировать эндотермический процесс при 76 °С, характеризующийся малым теплопоглощением. После охлаждения препарата (при повторном прогреве) этот процесс повторяется в неизменном виде, а при 97 °С наблюдается второй — гораздо более интенсивный по теплопоглощению переход. В соответствии с литературными данными [7, 9, 16, 17] и нашими предположениями эти два процесса должны быть отнесены к переходам В—Z- и Z-спираль — клубок соответственно, что и было подтверждено с помощью измерений спектров УФ-поглощения и КД того же препарата (правда, более разбавленного, что допускается, так как по утверждению ряда авторов, в том числе [9], характеристики В—Z-перехода не зависят от концентрации полинуклеотида в широком интервале, почти 1 000-кратного, ее изменения).

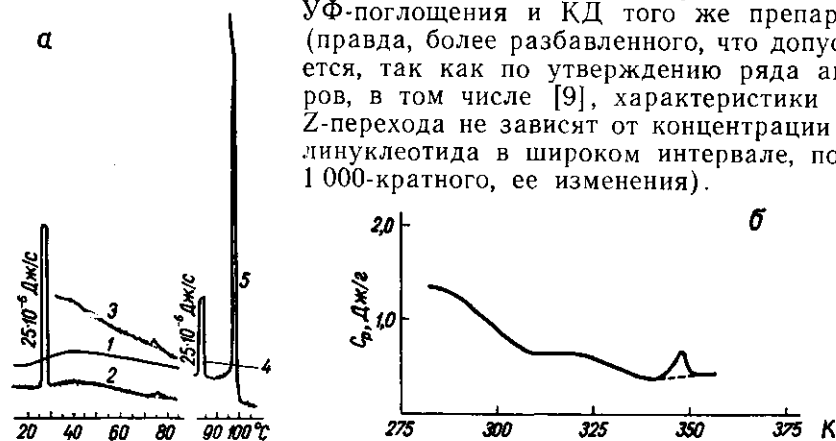


Рис. 1. Микрокалориметрические записи процессов теплопоглощения растворов поли(dG-dC) в области переходов В—Z- и Z-спираль — клубок (0,5 мМ какодилат натрия (рН 6,5), 1 мМ $MgCl_2$, 0,02 мМ Na_2 -ЭДТА; концентрация полимера 0,9 мг/мл; скорость сканирования 0,25 град/мин): 1, 4 — базисные линии; 2 — запись процесса В—Z-перехода (при чувствительности $25 \cdot 10^{-6}$ Дж/с); 3 — повторная запись В—Z-перехода после охлаждения препарата до 25 °С (при чувствительности $50 \cdot 10^{-6}$ Дж/с); 5 — переход Z-спираль — клубок (а) и зависимость удельной теплоемкости поли(dG-dC) от температуры в широком интервале температур, включая интервал В—Z-перехода (б)

Fig. 1. Heat absorption microcalorimetric curves of poly(dG-dC) solutions in the B-Z and Z-helix-coil transitions region (0.5 mM sodium cacodylate+1 mM $MgCl_2$ +0.02 mM Na_2 EDTA, pH 6.5; polymer concentration 0.9 mg/ml; scanning rate 0.25 °/min): 1, 4 — baselines, 2 — B-to-Z transition curve (sensitivity $25 \cdot 10^{-6}$ J/s); 3 — repeated curve of B-to-Z transition after cooling of the preparation to 25 °C (sensitivity $50 \cdot 10^{-6}$ J/s); 5 — Z-helix-to-coil transition (a) and heat capacity curves as a function of temperature in the wide temperature range. B-Z transition is observed (b)

На рис. 2 приведены эти спектры при различных температурах и кривые температурных зависимостей их интенсивностей при фиксированных, характеристических, длинах волн. Как видно из зависимостей, при 76 °С имеет место кооперативный обратимый переход, который можно идентифицировать как В—Z-переход. В пользу такого вывода свидетельствуют формы спектров КД после охлаждения препарата. Рост интенсивности отрицательной полосы спектра КД, происходящий при температурах выше 80 °С, если и связан с агрегацией полинуклеотида, что вполне вероятно, то это имеет место за пределами температурного интервала В—Z-перехода и, следовательно, не вносит вклада в величину энтальпии самого превращения (необходимо учесть и полную обратимость калориметрических кривых для В—Z-перехода).

Обработка калориметрических кривых и сопоставление оптических данных с зависимостью $C_p-f(T)$ для раствора поли(dG-dC) в области переходов В—Z- и Z-спираль — клубок позволили нам рассчитать термодинамические параметры этих переходов. Они приведены в таблице. Как видно, полученное нами значение для энтальпии В—Z-перехода очень мало: $\Delta H_{cal} = 0,2 \pm 0,02$ ккал/моль пар оснований (п. о.). Сравни-

вая ее с данными, приведенными в таблице, можно сделать следующее заключение. Величины изменения энтальпии В—Z-перехода, рассчитанные и измеренные непосредственно различными авторами при различных условиях, отличаются в значительной степени, однако имеют

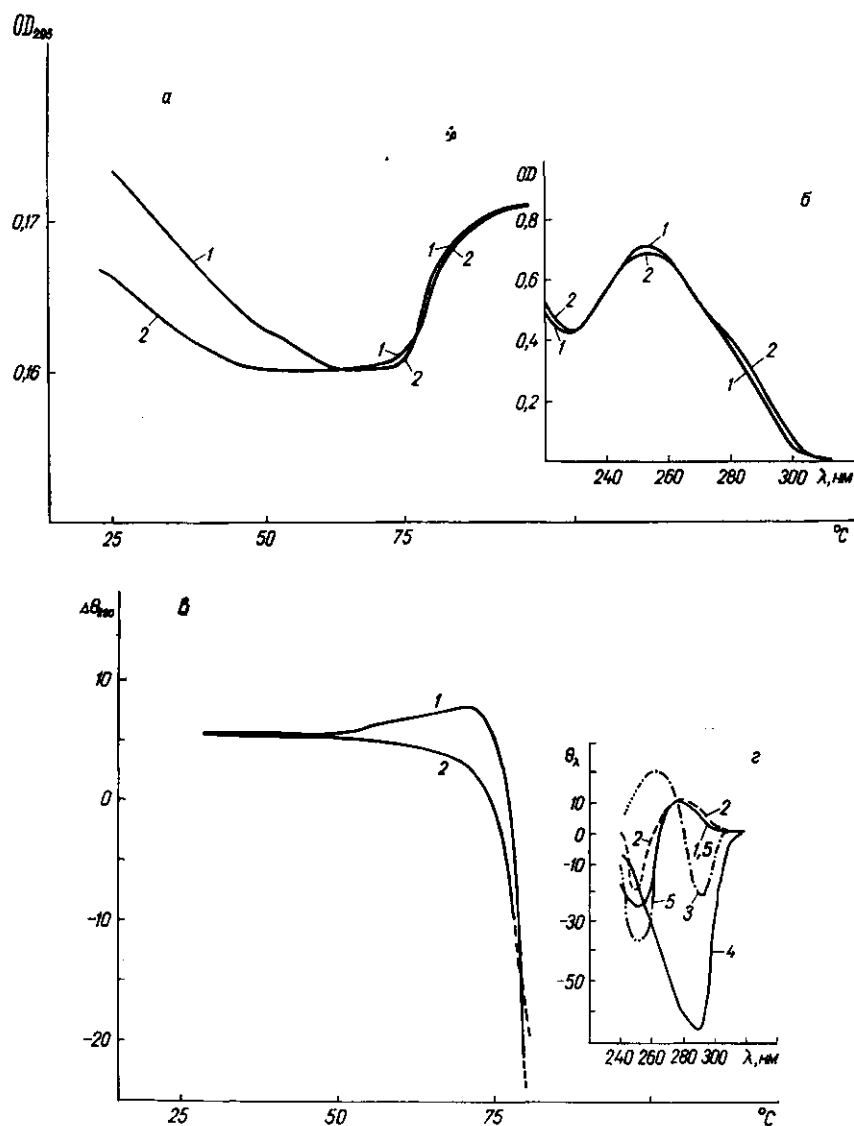


Рис. 2. Температурная зависимость оптической плотности раствора поли (dG-dC) при 295 нм (1 — первый прогрев, 2 — повторный прогрев) (а); спектр поглощения того же препарата (1 — до прогрева, 2 — после прогрева до 80 °С) (б); температурная зависимость интенсивности спектра КД того же препарата при 290 нм (1 — первый прогрев, 2 — повторный прогрев) (в); спектры КД того же препарата при разных температурах (1 — 28; 2 — 70,5; 3 — 80; 4 — 85; 5 — 25 °С после охлаждения)

Fig. 2. Temperature dependence of poly(dG-dC) optical density ($\lambda=295$ nm) (1 — the first heating, 2 — another heating) (a); absorption spectra of poly(dG-dC) before (1) and after (2) heating to 80 °C (b); temperature dependence of poly(dG-dC) 290 nm CD band (1 — first heating, 2 — another heating) (c); poly(dG-dC) CD spectra, registered at different temperatures (1 — 28 °C, 2 — 70.5 °C, 3 — 80 °C, 4 — 85 °C, 5 — 25 °C after cooling)

общую тенденцию малости. Это свидетельствует о шатком энергетическом равновесии между право- и левозакрученными конформациями ДНК, которое смещается в ту или иную сторону в зависимости от условий окружающей среды, влияющих на структуру как самой молекулы полинуклеотида, так и растворителя — воды, играющей особую роль

в стабилизации В- и Z-форм ДНК [12—14]. Что касается ΔH_{cal} , измеренной нами для перехода Z-спираль — клубок, то эта величина хорошо согласуется с имеющейся температурной зависимостью энтальпии для переходов спираль — клубок, полученных в разных ионных условиях [15].

ENERGETICS OF THE B-TO-Z and Z-HELIX-TO-COIL
TRANSITIONS IN WATER SOLUTIONS OF POLY(DG-DC)

G. M. Mrevlishvili, G. N. Lapiashvili, T. J. Mdzinarashvili,
M. Z. Gorgoshidze, M. G. Kharatishvili, N. E. Yakobashvili

Department of Macromolecular Physics, State University, Tbilisi Institute of Physics,
Academy of Sciences of the Georgian SSR, Tbilisi

Summary

Differential scanning calorimetry, CD- and UV-spectroscopy were used to study thermodynamics of the B-Z and Z-helix-coil transitions of poly(dG-dC). The experiments were performed under conditions of 0.5 mM water solutions of sodium cacodylate (pH 6.5) + +1 mM $MgCl_2$ + 0.02 mM EDTA. The reversible transition of the polymer observed calorimetrically at 76 °C was identified as B-Z transition. The left-handed helix-coil transition was observed at 97 °C. The enthalpy of B-Z transition is small. $\Delta H_{cal} = 0.2 \pm \pm 0.02$ kcal/mole bp, indicating a fine energy balance between the DNA left- and right-handed conformations in water solutions. The enthalpy of Z-helix-coil transition is $\Delta H_{cal} = 10.1 \pm 1.1$ kcal/mole bp.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution / A. H.-J. Wang, G. J. Quigly, F. J. Kolpak et al. // Nature.— 1979.— 282, N 5813.— P. 680—686.
3. Klysik J., Stirdivant S. M., Wells R. D. Left-handed DNA // J. Biol. Chem.— 1982.— 254, N 17.— P. 10152—10158.
4. Nordheim A., Rich A. Negatively supercoiled simian virus 40 DNA contains Z DNA segments within transcriptional enhancer sequences // Nature.— 1983.— 303, N 5914.— P. 674—679.
5. Left-handed Z DNA in bands of acid-fixed polyten chromosomes / D. Arndt-Jovin, M. Robert-Nicoud, D. A. Zarling et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1983.— 80, N 14.— P. 4344—4348.
6. Ivanov V. I., Krylov D. Yu., Minyat E. E. Three-state diagram for DNA // J. Biomol. Struct. and Dup.— 1988.— 3, N 1.— P. 43—54.
7. Фазовая поверхность В—Z-равновесия раствора поли(dG—dC) // Э. Е. Минят, А. Т. Карапетян, П. О. Вардеванян, В. И. Иванов // Биополимеры и клетка.— 1988.— 4, № 4.— С. 177—183.
8. Temperature-dependent conformational transitions in poly(dG-dC) and poly(dG-dC) // M. J. Behe, G. Felsenfeld, S. C. Szu, E. Charney // Biopolymers.— 1985.— 24, N 2.— P. 289—300.
9. Chaiers T. B., Sturtevant J. M. Thermodynamics of the B to Z transitions in poly(dG-m⁵dC) // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1986.— 83, N 15.— P. 5479—5483.
10. Привалов П. Л. Физические проблемы структуры белка // Вестн. АН СССР.— 1986.— № 2.— С. 72—79.
11. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия.— М.: Мир, 1985.— Т. 3.— 220 с.
12. Rich A., Nordheim A., Wang H.-J. The chemistry and biology of left-handed Z-DNA // Ann. Rev. Biochem.— 1984.— 53.— P. 791—846.
13. Solvation of the left-handed hexamer d(5Br C-G-5BrC-G) in crystals grown at two temperatures / D. Chevrier, A. C. Dock, B. Hartmann et al. // J. Mol. Biol.— 1986.— 188, N 4.— P. 707—719.
14. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.— М.: Мир, 1987.— 413 с.
15. Klump H. H. Thermodynamics of left-handed helix formation // FEBS Lett.— 1986.— 196, N 1.— P. 175—179.
16. Ruggiero J., Manzini G., Quardrioglio F. Ionic and non-ionic contribution of the free-energy change in the B-Z transition of alternating polynucleotides in aqueous solution // Biopolymers.— 1987.— 26, N 11.— P. 1975—1979.
17. Hall K. B., Maestre M. F. Temperature dependent reversible transition of poly(dG-dC)-poly(dG-dC) in ethanolic and methanolic solutions // Ibid.— 1984.— 23, N 11.— P. 2127—2139.

Тбилис. гос. ун-т
Ин-т физики АН ГССР, Тбилиси

Получено 18.12.89