

ВЫЗВАННАЯ АДСОРБЦИЕЙ ЛИГАНДОВ ИНВЕРСИЯ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ АТ- И GC-ПАР ОСНОВАНИЙ ДНК

Д. Ю. Ландо, А. С. Фридман, А. Г. Шпаковский, А. А. Ахрем

Явление инверсии относительной стабильности АТ- и GC-пар оснований ДНК может быть обусловлено как непосредственным избирательным связыванием молекул веществ, присутствующих в растворе ДНК, с АТ- или GC-парами, так и изменением свойств среды в целом при наличии в ней достаточно высоких концентраций различных агентов, непосредственно с ДНК не взаимодействующих.

Теоретическое рассмотрение второго случая проведено в работах [1, 2], где задавались термостабильности АТ- и GC-пар (T_{AT} , T_{GC}) и при концентрации инверсии предполагалось, что $T_{AT} = T_{GC}$.

Инверсия, обусловленная непосредственным связыванием (адсорбцией) лигандов, рассматривалась только для комплекса непротяженных невазаимодействующих при адсорбции лигандов на ДНК, характеризующейся ярко выраженной блочной первичной структурой [3].

В настоящем сообщении инверсия относительной стабильности рассматривается для комплексов блочной ДНК с лигандами, характеризующимися дальним порядком взаимодействия [4], и ДНК со случайной последовательностью пар оснований с лигандами, характеризующимися контактным взаимодействием при адсорбции [5]. Проводится также сравнение непосредственного избирательного связывания и опосредованного влияния на переход спираль—клубок ДНК растворенных веществ.

Комплексы характеризуются следующими параметрами: $\Delta H_{AT} = 8500$ (кал/моль·пар оснований) — энтальпия плавления АТ-пар ДНК без лигандов, $T_{AT} = 70^\circ\text{C}$, $T_{GC} = 110^\circ\text{C}$. В случае контактного взаимодействия между лигандами, адсорбированными на ДНК, первичная структура предполагается случайной при среднем GC-составе (x) и задается при помощи генератора случайных чисел.

При дальнем порядке взаимодействия между адсорбированными лигандами расчеты проводятся для ДНК с блочным строением согласно [4]. Свободная энергия связывания лиганда с ДНК на участке типа i ($i=1$ соответствует расплавленному участку, $i=2$ — спиральному), задается формулой

$$\Psi_i = \Psi_{0i} - \omega_i c_i,$$

где $c_i = k_i/N_i$ (k_i — число лигандов, адсорбированных на участках типа i , N_i — число пар оснований, входящих в эти участки). При кооперативном связывании $\omega_i > 0$, при антикооперативном — $\omega_i < 0$.

Контактное взаимодействие между лигандами, адсорбированными на соседних звеньях одного типа (спиральных или расплавленных), характеризуется константой a_i ($i=1,2$), а различных типов — $a_{ii'}$ ($i \neq i'$), т. е. константа $a_{ii'}$ характеризует взаимодействие соседних лигандов, адсорбированных на участках различных типов.

Используются также следующие обозначения: T_m — температура плавления, ΔT — ширина температурного интервала перехода спираль—клубок; K_i — константа связывания с GC-парами участков типа i . В случае дальнего действия предполагается связывание с гуанином и цитозином, а при контактном взаимодействии между лигандами — только с гуанином; c_0 — молярная концентрация свободных лигандов.

Прежде чем приступить к основной задаче нашего исследования, отметим два обстоятельства.

1. Расчеты, проведенные для случая отсутствия взаимодействия при адсорбции, показали, что не всякие сближающие термостабильности АТ- и GC-пар лиганды могут вызвать явление инверсии. Инверсия

может иметь место только при определенных соотношениях между значениями констант связывания лигандов с азотистыми основаниями, входящими в состав спиральных и расплавленных участков. Так, для лигандов, взаимодействующих с гуанином и цитозином, отношение K_1/K_2 должно превышать 2. Если $K_1/K_2 < 2$, то зависимость $\Delta T(c_0)$ не имеет минимума, что свидетельствует об отсутствии инверсии.

2. Как показали расчеты, проведенные в работе [6], минимум на кривой зависимости $\Delta T(c_0)$ не всегда является доказательством наличия инверсии. Минимум может быть обусловлен тем, что при опреде-

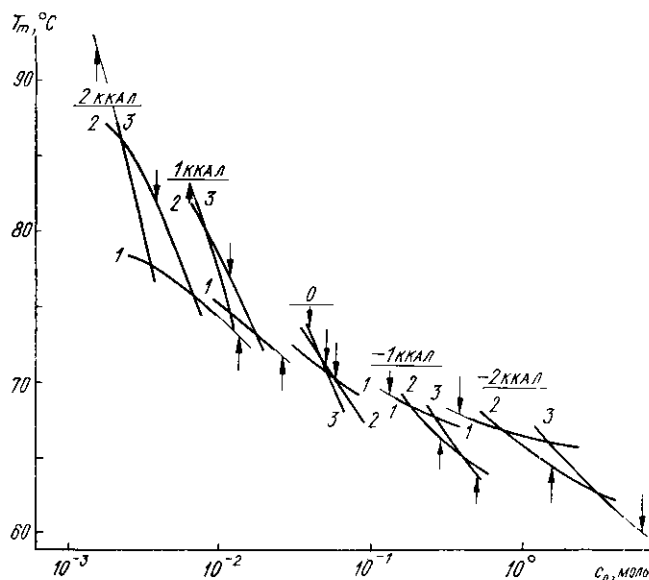


Рис. 1. Зависимость температуры плавления от концентрации лигандов для ДНК с GC-содержанием, равным 25 (1), 50 (2), 75 % (3) при кооперативном ($\omega_1 = \omega_2 = 1$ или 2 ккал), некооперативном ($\omega = 0$) и антикооперативном ($\omega_1 = \omega_2 = -1$ или -2 ккал) взаимодействии дальнего порядка лигандов с ДНК. Стрелками отмечены концентрации инверсии отдельных блоков

Fig. 1. Dependence of the melting temperature on ligand concentration for DNA with the GC-content being equal to 25 % (1), 50 % (2), 75 % (3) for cooperative ($\omega_1 = \omega_2 = 1$ or 2 kcal), noncooperative ($\omega = 0$) and anticooperative ($\omega_1 = \omega_2 = -1$ or -2 kcal) long-range interaction of ligands with DNA. Arrows indicate concentrations of certain blocks inversion

ленном соотношении констант связывания для низких концентраций лигандов наблюдается уменьшение разности термостабильности АТ- и GC-пар оснований ДНК, а при средних или высоких — рост этого параметра начинается прежде чем достигается равенство термостабильностей. Данное явление не может иметь места, если лиганды связываются только с одним типом пар оснований.

Рассмотрим модель комплекса ДНК с лигандами, для которой оба упомянутых эффекта не имеют места и не затрудняют исследования явления инверсии. Предполагается, что лиганды взаимодействуют только с GC-парами, причем $K_1/K_2 > 5$.

Результаты расчетов. Из рис. 1 видно, что ни для одного типа лигандов кривые зависимости $T_m(c_0)$ ДНК с различным GC-содержанием не пересекаются в одной точке. Кроме этого, концентрации инверсии для ДНК или блоков ДНК, определенные из условия $\delta T_m(x)/\delta x = 0$, сильно отличаются от положения точки пересечения медиан треугольников, изображенных на рис. 1 (при этой концентрации значение ΔT минимально). Эти отличия минимальны в случае некооперативного связывания и составляют 20 % для ДНК с GC = 25 % и GC = 75 %. Примерно в этих пределах находится GC-содержание блоков ДНК тимуса теленка.

При кооперативном и антикооперативном характере связывания лигандов с ДНК концентрации инверсии для блоков с различным содержанием и положением на шкале концентраций пересечения кривых зависимостей $T_m(c_0)$ (рис. 1) различаются еще сильнее.

Все это приводит к дополнительному уширению температурного интервала перехода спираль—клубок при концентрации инверсии. Такое уширение существенно при кооперативном и антикооперативном взаимодействиях лигандов с ДНК и сравнительно невелико при некооперативном связывании ($\sim 0,1^\circ\text{C}$).

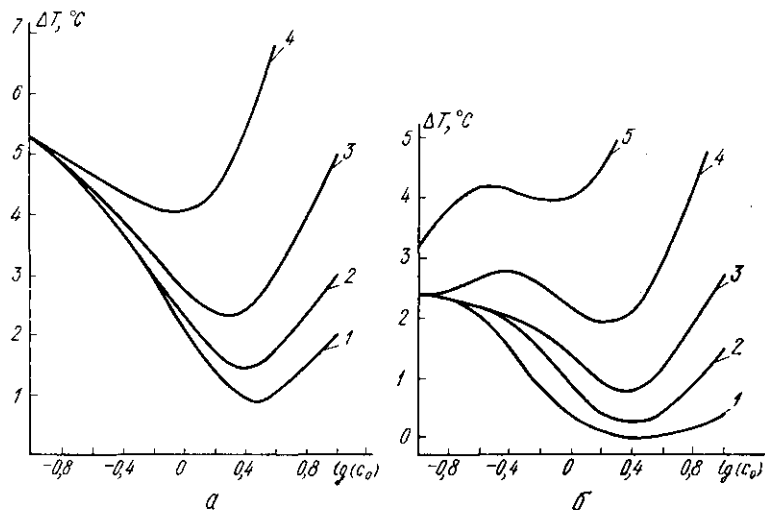


Рис. 2. Зависимость ширины температурного интервала перехода от концентрации лигандов (c_0), взаимодействующих сильнее с границами между спиральными и расплавленными участками по сравнению с внутренними областями: $a - \sigma = 5 \cdot 10^{-5}$, $a_{12} = a_{21} = 1$ (1), 10 (2), 30 (3), 100 (4); $b - \sigma = 10^{-8}$, $a_{12} = a_{21} = 1$ (1), $3 \cdot 10^2$ (2), 10^3 (3), $3 \cdot 10^3$ (4), 10^4 (5)

Fig. 2. Dependence of the melting range width on concentration of ligands (c_0) interacting with the boundaries between the helical and coil regions stronger than with the inner regions: $a - \sigma = 5 \cdot 10^{-5}$, $a_{12} = a_{21} = 1$ (1), 10 (2), 30 (3), 100 (4); $b - \sigma = 10^{-8}$, $a_{12} = a_{21} = 1$ (1), $3 \cdot 10^2$ (2), 10^3 (3), $3 \cdot 10^3$ (4), 10^4 (5)

Контактное взаимодействие между лигандами с избирательным характером связывания и их протяженность также обуславливают несовпадение температур плавления ДНК с различным GC-содержанием при концентрации инверсии, что вызывает увеличение ΔT . Оба типа взаимодействия лигандов с ДНК, если они достаточно сильные, чтобы вызвать заметное увеличение ΔT , обуславливают нелинейность зависимости $T_m(x)$ в присутствии лигандов.

Рассмотрим еще одну возможную причину увеличения ΔT в точке инверсии. В работе [7] было показано, что лиганды с неизбирательным характером связывания, сильнее взаимодействующие с границами между спиральными и расплавленными участками по сравнению с внутренними областями, вызывают увеличение ΔT . Отметим, что избирательная адсорбция может быть обусловлена как более высокими константами связывания с крайними звеньями участков, так и более высокими константами контактного взаимодействия между лигандами, адсорбированными на этих звеньях. Проверим, не сохраняется ли эффект уширения в случае избирательного связывания лигандов.

В качестве примера на рис. 2 представлена зависимость $\Delta T(c_0)$ для лигандов, сильнее взаимодействующих между собой на границах между спиральными и расплавленными участками по сравнению с внутренними областями ($a_1 = a_2 = 1$, $a_{12} = a_{21} > 1$). Действительно, такие лиганды вызывают увеличение ΔT в точке инверсии (рис. 2), однако величина эффекта резко падает с ростом кооперативности процесса плавления. Если для $\sigma = 5 \cdot 10^{-5}$ значительное увеличение ΔT имеет ме-

сто при $a_{12}=a_{21}>10$, то при $\sigma=10^{-8}$ эффект становится заметным при $a_{12}=a_{21}>300$. Задавая $\sigma=10^{-8}$ вместо реального значения $5 \cdot 10^{-5}$, удается приближенно учесть двунитчатость ДНК [8, 9]. Установлено также, что изменение взаимодействия лигандов с границами не влияет на зависимости $T_m(c_0)$ и $T_m(x)$.

Полученные данные показывают, что для получения при расчетах экспериментально наблюдаемого значения ΔT ($\sim 1^\circ\text{C}$) эффективная константа связывания с крайними звеньями спиральных и расплавленных участков должна быть в $20 \div 30$ раз выше константы связывания со звеньями внутренних областей. Такая высокая избирательность маловероятна. Однако, если более высокими константами связывания характеризуются не только самые крайние звенья участков, а несколько крайних звеньев, то эта величина становится на порядок ниже.

Обсуждение результатов. К настоящему времени обнаружен ряд веществ, присутствие которых в растворе ДНК вызывает инверсию термостабильности АТ- и ГС-пар нуклеотидов. Это противопохолевые антибиотики [10], возможно, соли некоторых металлов, например меди [11], и алкиламмониевые соли [1, 12—15]. В двух первых случаях инверсия обусловлена непосредственным избирательным связыванием с определенными типами пар оснований. Однако исследовать явление инверсии, вызванное адсорбцией этих лигандов, не позволяет их перераспределение в процессе плавления (подробнее см. [3]).

Инверсия в присутствии алкиламмониевых солей не искажается перераспределением лигандов, что позволяет определить значение ширины температурного интервала перехода спираль — клубок, которое можно сопоставить с теорией. Но каковы же именно причины инверсии: непосредственное связывание или опосредованное влияние, до сих пор не установлено. С одной стороны, для алкиламмониевых солей характерно непосредственное избирательное связывание с АТ-парами [16]. С другой стороны, нужно учесть, что для возникновения инверсии необходима высокая концентрация солей в растворе ДНК. Их присутствие ведет к изменению структуры воды, что также может вызвать инверсию термостабильности [15, 17].

В работе [2] при исследовании явления инверсии предполагалось, что существует опосредованное независимое от конкретной первичной структуры влияние растворенных веществ на пары оснований. Это позволило использовать теорию плавления свободных гетерополимеров без лигандов, предполагая, что $T_{\text{АТ}}$ и $T_{\text{ГС}}$ известны при заданной концентрации агента, сближающего термостабильности АТ- и ГС-пар, а для точки инверсии допустить равенство $T_{\text{АТ}}$ и $T_{\text{ГС}}$. В рамках этой теории зависимость $T_m(x)$ всегда линейна, и равенство $T_{\text{АТ}}$ и $T_{\text{ГС}}$ означает, что температура плавления ДНК не зависит от ее ГС-содержания ($T_{\text{АТ}}=T_{\text{ГС}}=T_m(x)$, $0 < x < 1$).

В результате расчетов [2] при $T_{\text{АТ}}=T_{\text{ГС}}$ получено значение $\Delta T = 0,1 \div 0,2^\circ\text{C}$. Однако эксперимент дает значительно большую, равную $0,6 \div 1,2^\circ\text{C}$, величину ΔT [1, 12—15].

Результаты расчетов, проведенных для случая непосредственного связывания лигандов с ДНК, показывают, что основное использованное в работе [2] условие ($T_{\text{АТ}}=T_{\text{ГС}}=T_m(x)$) в точке инверсии не выполняется. Т. е. не существует концентрации лигандов, при которой температуры плавления ДНК с различным ГС-содержанием совпадают (рис. 1). Не сохраняется в присутствии лигандов с избирательным характером связывания и линейность зависимости $T_m(x)$. Величина несовпадения и степень нелинейности малы в случае непротяженных не взаимодействующих при адсорбции лигандов. Они вызывают лишь незначительное (менее $0,1^\circ\text{C}$) увеличение ΔT при концентрации инверсии. В этом случае теория не объясняет экспериментально наблюдаемого значения $\Delta T = 0,6 \div 1,2^\circ\text{C}$.

Вместе с тем при появлении даже слабого взаимодействия между лигандами, адсорбированными на ДНК, нелинейность зависимости

$T_m(x)$ и несовпадение в точке инверсии температур плавления ДНК с различным GC-содержанием резко увеличиваются (рис. 1). Это приводит к существенному увеличению ΔT и позволяет, казалось бы, объяснить увеличение значения ΔT по сравнению с предсказанным теорией, разработанной для случая опосредованного влияния растворенных веществ (для свободной ДНК без лигандов).

Однако результаты расчетов показывают также, что при взаимодействии между лигандами достаточно сильным, чтобы вызвать увеличение ΔT до значений, наблюдаемых в эксперименте, зависимость $T_m(x)$ становится нелинейной. Вместе с тем эксперимент демонстрирует линейность зависимости $T_m(x)$ для различных концентраций алкиламмониевых солей [12]. Поэтому увеличение ΔT по сравнению с теорией [2] нельзя объяснить взаимодействием ионов алкиламмониевых солей при адсорбции на ДНК и их протяженностью, которая обуславливает такие же эффекты нелинейности функции $T_m(x)$ и несовпадения зависимости $T_m(c_0)$ для ДНК с различным GC-содержанием в точке инверсии.

Единственной обнаруженной нами особенностью в механизме адсорбции лигандов на ДНК, которая может вызвать увеличение ΔT до наблюдаемого в эксперименте значения при сохранении линейной зависимости $T_m(x)$ в присутствии лигандов, является более сильное связывание непротяженных не взаимодействующих между собой при адсорбции лигандов с границами между спиральными и расплавленными участками по сравнению с внутренними областями.

Авторы выражают признательность М. Д. Франк-Каменецкому за обсуждение результатов работы.

INVERSION OF THE RELATIVE STABILITY OF AT- AND GC-PAIRS IN DNA INDUCED BY ADSORPTION OF LIGANDS

D. Yu. Lando, A. S. Fridman, A. G. Shpakovskii, A. A. Akhrem

Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

Summary

The inversion of relative stability of AT- and GC-pairs of bases in the complexes of a block sequence DNA with long-range interacting ligands and DNA with random sequence of pairs of bases with contactly interacting ligands has been theoretically studied. Both types of ligand interaction with DNA are shown to give rise to a nonlinearity of the GC-content dependence of the melting temperature ($T_m(x)$), which induces a considerable increase in the melting range width (ΔT) at the inversion point. It is found that only short noninteracting ligands which are bound stronger to the boundaries between the helix and coil regions cause both the growth of ΔT at the inversion point and a linearity of the $T_m(x)$ dependence.

1. Исследование плавления ДНК в области инверсии относительной стабильности AT- и GC-пар / А. Д. Воскобойник, Д. Р. Монаселидзе, Г. Н. Мгеладзе и др. // Молекуляр. биология.— 1975.— 9, № 5.— С. 783—790.
2. Белинцев Б. Н., Вологодский А. В., Франк-Каменецкий М. Д. Влияние последовательности оснований на стабильность двойной спирали ДНК // Там же.— 1976.— 10, № 4.— С. 764—769.
3. Ахрем А. А., Ландо Д. Ю. Влияние лигандов с избирательным характером взаимодействия на переход спираль— клубок ДНК. III. Расчет кривых плавления комплексов ДНК с лигандами // Там же.— 1981.— 15, № 5.— С. 1083—1091.
4. Ландо Д. Ю., Шпаковский А. Г., Ахрем А. А. Влияние на переход спираль— клубок ДНК взаимодействия дальнего порядка между адсорбированными лигандами, характеризующимися избирательностью связывания // Вестн. АН БССР.— Сер. хим. наук.— 1984.— № 5.— С. 21—23.
5. Ахрем А. А., Фридман А. С., Ландо Д. Ю. Теория перехода спираль— клубок комплексов гетерогенной ДНК с гетерогенными лигандами // Биополимеры и клетка.— 1985.— 1, № 4.— С. 171—179.
6. Ландо Д. Ю., Кульба А. М., Ахрем А. А. Влияние лигандов с избирательным характером взаимодействия на переход спираль— клубок ДНК. IV. Тепловая дена-

- турация ДНК в кислой среде // Молекуляр. биология.— 1981.— 15, № 5.— С. 1093—1101.
7. Фридман А. С., Ландо Д. Ю. Кооперативное контактное взаимодействие между лигандами, адсорбированными на ДНК, вызывает уменьшение ширины температурного интервала плавления // Тез. докл. V Всесоюз. конф. по спектроскопии биополимеров.— Харьков, 1984.— С. 251.
 8. Tachibana H., Wada A. Ligand induced melting reaction of specific-sequence DNA molecules // Biopolymers.— 1982.— 21, N 9.— P. 1873—1886.
 9. Fine structure of DNA melting curves / Yu. L. Lyubchenko, M. D. Frank-Kamenetskii, A. V. Vologodskii et al. // Ibid.— 1976.— 15, N 6.— P. 1019—1036.
 10. Kaukas E., Raim T. Thermal denaturation of distamycin A—DNA complexes as followed hyperchromic spectra // Biophys. Chem.— 1980.— 11, N 2.— P. 233—237.
 11. Об особенностях перехода спираль—клубок ДНК в области инверсии относительной стабильности GC- и AT-пар, обусловленной ионами Cu^{2+} и Mn^{2+} / Ю. П. Благой, В. А. Сорокин, В. А. Валсев, Г. О. Гладченко // Докл. АН СССР.— 1978.— 240, № 2.— С. 459—462.
 12. Melchior W. B., von Hippel P. H. Alteration of the relative stability of dA·dT and dG·dC base pairs in DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1973.— 70, N 2.— P. 298—302.
 13. Record M. T., Woodbury C. P., Ross B. I. Characterization of rod-like DNA fragments // Biopolymers.— 1975.— 14, N 2.— P. 393—408.
 14. Woodbury C. P., Record M. T. A range of GC-independent denaturation solvents for DNA // Ibid.— N 11.— P. 2417—2420.
 15. Монаселдзе Д. Р., Мгеладзе Г. Н. Тепловые свойства ДНК и полидезоксирибонуклеотидов в широкой области концентраций ионов солей и полимера // Биофизика.— 1977.— 22, № 5.— С. 950—958.
 16. Shapiro J. T., Stannard B. S., Felsenfeld G. The binding of small cations to deoxyribonucleic acid. Nucleotide specificity // Biochemistry.— 1969.— 8, N 8.— P. 3233—3241.
 17. Габриелян А. Г. Конформационные переходы ДНК в концентрированных растворах нейтральных солей // Биофизика.— 1979.— 24, № 4.— С. 620—632.

Ин-т биоорг. химии АН БССР, Минск

Получено 04.06.86.

УДК 543.544.42.08:577.214.625

ИЗМЕРЕНИЕ КОНСТАНТ ДНК-БЕЛКОВОГО СВЯЗЫВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ КОМПЛЕКСА ХРОМАТОГРАФ «МИЛИХРОМ» — ЭВМ

Ю. А. Каламбет, Е. И. Бурова, А. А. Жучков, В. Л. Кнорре, А. А. Александров

Введение. В литературе описано большое число способов определения констант ДНК-белкового связывания с помощью гель-хроматографии [1—4]. Во всех вариантах постановки хроматографического эксперимента исходными данными для подсчета констант являются зависимости концентраций ДНК и белка от времени. Для облегчения расчетов желательно иметь обе зависимости. Однако при детектировании хроматограммы на одной длине волны обе зависимости получить невозможно.

Использование многоволнового детектора хроматографа «Милихром» [5] делает задачу одновременного определения концентраций разрешимой. В работах [3, 4] регистрировали хроматограммы с помощью самописца, и для определения соотношения количеств ДНК и белка применяли спектральное отношение на двух длинах волн. При таком способе регистрации невозможно адекватно оценить ошибку определения количеств веществ и затруднено использование большого числа длин волн.

Регистрация хроматограммы с использованием ЭВМ и последующий анализ полученных данных позволяют решить задачу определения количеств ДНК и белка в смеси с максимальной точностью и с учетом измерений, сделанных на любых выбранных длинах волн.

В данной работе представлены результаты проведенных нами с помощью комплекса хроматограф «Милихром» — ЭВМ «Искра-226» экспериментов по изучению взаимодействия РНК-полимеразы *Esche-*