

4. Действие ДНК-метилазы *Ecodam* на одностранные последовательности и синтетические олигонуклеотиды / В. В. Зиновьев, Ю. А. Горбунов, С. Г. Попов и др. // Молекуляр. биология.— 1985.— 19, № 4.— С. 947—954.
5. Does the DNA methylase *Ecodam* pair nucleotide sequences to form site-specific duplexes / Ya. I. Buryanov, V. V. Zinoviev, M. T. Vienozhinskis et al. // FEBS Lett.— 1984.— 168, N 1.— P. 166—168.
6. Hirose T., Crea R., Itakura K. Rapid synthesis of triphosphorylated nucleotide blocks // Tetrahedron Lett.— 1978.— N 28.— P. 2449—2452.
7. Reese C. B., Yau L. O-aryl S-methyl phosphorochloridothioates: terminal phosphorylating agents in the phosphotriester approach to oligonucleotide synthesis // J. Chem. Soc. Chem. Commun.— 1978.— N 23.— P. 1050—1052.
8. Brooks J. E., Blumenthal R. M., Gingeras T. R. The isolation and characterization of the *Escherichia coli* DNA adenine methylase (*dam*) gene // Nucl. Acids Res.— 1983.— 11, N 3.— P. 837—851.
9. Herman G. E., Modrich P. *Escherichia coli dam* methylase. Physical and catalytic properties of the homogeneous enzyme // J. Biol. Chem.— 1982.— 257, N 5.— P. 2605—2612.
10. Изучение индуцируемых субстратом изменений в состоянии метилазы *Ecodam* методом малоуглового рентгеновского рассеяния / Ф. В. Тузиков, В. В. Зиновьев, Л. Н. Яшина и др. // Молекуляр. биология.— 1986.— 20, № 4.— С. 1002—1007.
11. Димеризация *Ecodam* метилазы, индуцированная олигонуклеотидным субстратом / Н. И. Речкунова, В. В. Зиновьев, Э. Г. Малыгин и др. // Биополимеры и клетка.— 1987.— 3, № 3.— С. 152—154.

ВНИИ молекуляр. биологии,
пос. Кольцово Новосибир. обл.
Ин-т биохимии и физиологии
микроорганизмов АН СССР, Пушкино

Получено 14.07.87

УДК 577.3:547.963.3

МИКРОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРАТАЦИИ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ ПОЛИ (dA) · ПОЛИ (dT) И ПОЛИ (dG) · ПОЛИ (dC) *

Г. М. Мрвшлишвили, В. М. Сохадзе,
Г. Ш. Джапаридзе, Д. А. Татишвили, Н. Э. Якобашвили

Введение. Известно, что двойная спираль ДНК в растворах и волокнах может находиться в различных упорядоченных состояниях (А-, В-, Z-формы) в зависимости от нуклеотидной последовательности, типа и концентрации ионов и активности воды [1—6]. Основываясь на данных рентгеноструктурного анализа монокристаллов фрагментов ДНК [7—9], авторы работы [10] пришли к выводу, что основным фактором, приводящим к возникновению двух дискретных структурных форм ДНК (А и В) является особенность стэкинг-взаимодействий соседних пар оснований. В работе [11] подчеркивается, что СС/ГГ-контакты облегчают В—А-переход ДНК в растворах. С другой стороны, утверждается, что молекулы воды могут играть определяющую роль как в стабилизации В-ДНК (имеется в виду обнаруженное рентгеноструктурным анализом упорядоченное расположение молекул воды — квазитетраэдрический водный «хребет» в узком желобке В-ДНК [8, 9] и пентагональная сетка из молекул воды в А-ДНК [12]), так и при переходах в пределах двухтяжесвого состояния. Недавно высказано предположение [13], что стабилизация ДНК в А- и В-формах обусловлена особенностями гидратации фосфатных групп: при В—А-переходе, индуцированном уменьшением влажности, оставшихся молекул воды оказывается вполне достаточно для стабилизации А-формы ДНК, так как одна молекула воды может связываться сразу с двумя фосфатами одной цепи. Следовательно, в условиях пониженной влажности стабильность В-формы не может быть достигнута из-за большого расстояния (0,66 нм)

* Представлена членом редколлегии В. И. Ивановым.

между фосфатами (молекул воды оказывается недостаточно для их экранирования). Таким образом, «экономичность» [13] в расходовании воды при гидратации фосфатных групп может явиться основным фактором стабилизации той или иной конформации [14], что делает крайне актуальным детальное количественное исследование параметров гидратации двухтяжевых полимеров ДНК в растворах, гелях и кристаллах.

В настоящей работе методом низкотемпературной сканирующей микрокалориметрии [15, 16] изучена гидратация полинуклеотидов поли(dA)·поли(dT) и поли(dG)·поли(dC) в растворах и гелях при различных влажностях. При выборе объектов исследования руководствовались следующими соображениями: 1) ранее нами установлено

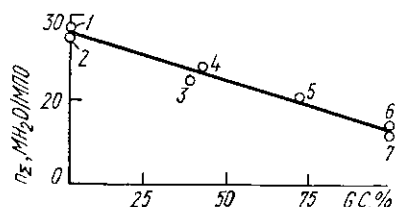


Рис. 1. Зависимость гидратации двухспиральных ДНК в В-форме от GC-содержания [17, 18]: 1 — поли[d(A-T)]; 2 — поли(dA)·поли(dT); 3 — фаг T2; 4 — тимус телянка; 5 — *M. lysodeikticus*; 6 — поли[d(G-C)]; 7 — поли(dG)·поли(dC). Данные для кривых 2 и 7 получены в настоящей работе

Fig. 1. Double-stranded B-form DNA hydration (n_2) versus the GC-content [17, 18]: 1 — poly(d(A-T)), 2 — poly(dA)·poly(dT), 3 — T2-phage, 4 — calf thymus, 5 — *M. lysodeikticus*, 6 — poly(d(G-C)), 7 — poly(dG)·poly(dC). Data for 2 and 7 curves have been obtained in the present study.

[17, 18], что гидратация двойной спирали ДНК зависит от GC-содержания, линейно уменьшаясь с ростом GC-пар (рис. 1) согласно эмпирической зависимости $n_2 = \{28,0 - 0,12 \cdot (\% \text{ GC})\} \text{ M H}_2\text{O}/\text{МПО}$ (n_2 — общее количество молекул воды в гидратной «оболочке» двойной спирали, включая гидратацию фосфатных групп и молекулы воды, заполняющие желобки); 2) известно, что последовательность поли(dA)·поли(dT) остается в В-форме при всех значениях относительной влажности (ОВ), в то время как поли(dG)·поли(dC) принадлежит к «А-предпочитающей» последовательности и сохраняет А-конформацию даже при высоких значениях ОВ [1—5]. Следовательно, изучение гидратации (dA)·(dT)- и (dG)·(dC)-полимеров одним и тем же физическим методом при различных значениях ОВ представляет исключительный интерес, так как может выявить некоторые особенности в механизмах конформационных переходов ДНК в пределах двухтяжевого состояния с уточнением роли молекул воды.

Материалы и методы. В работе использовали препараты натриевых солей полинуклеотидов поли(dA)·поли(dT) и поли(dG)·поли(dC) («Boehringer», ФРГ). В качестве растворителя использовали деионизированную воду (рН 6,7). Калориметрические измерения проводили на низкотемпературном дифференциальном микрокалориметре отдела физики биополимеров Ин-та физики АН ГССР [15].

Результаты и обсуждение. На рис. 2 приведены калориметрические кривые, соответствующие процессу фазового перехода лед — вода в растворах и гелях полинуклеотидов. Видно, что увеличение концентрации полимеров приводит к уменьшению теплоты перехода, к сдвигу температуры перехода в сторону низких температур и к уширению интервала плавления. Подобные изменения в термодинамических параметрах перехода лед — вода в растворах биополимеров подробно проанализированы [15—16, 19]. Основной причиной вырождения фазового перехода первого рода для воды в нечеткий по температуре переход типа «порядок — беспорядок» является сильное взаимодействие некоторых атомных групп полимеров с растворителем и влияние конформации полимера на топологию сетки водородных связей в объемных слоях воды, приводящие к дефектам в структуре льда [20]. Важно,

что при некоторых критических концентрациях воды (вполне однозначно определяемых для каждого полимера [15—20]) фазовый переход вообще исчезает [2], что свидетельствует о нахождении всей воды при данных концентрациях в гидратированном, связанном («невывораживаемом») состоянии.

Зависимость теплоты плавления «объемной» воды от относительной концентрации воды в системе полимер—вода (рис. 3) выявляет существенную разницу в механизмах гидратации поли(dA)·поли(dT)

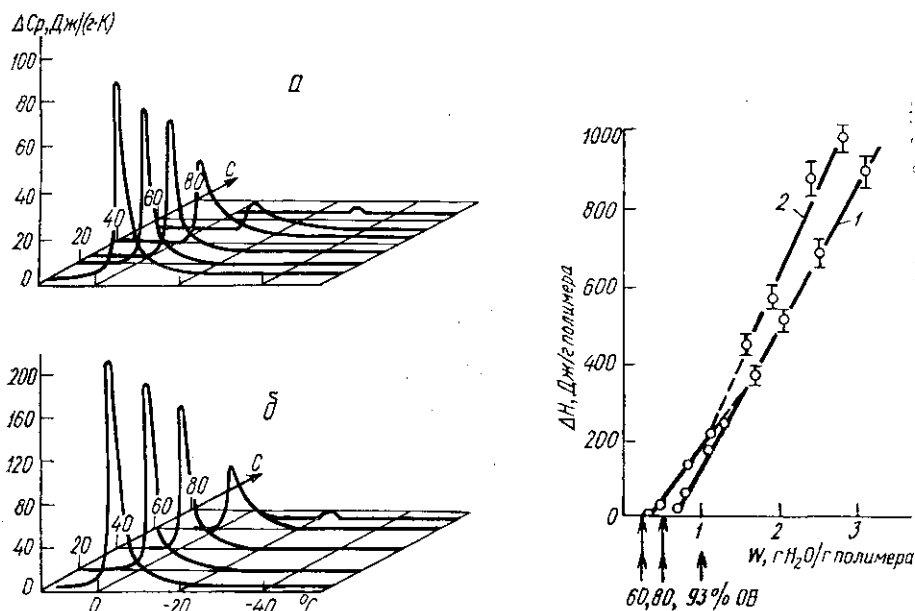


Рис. 2. Кривые теплопоглощения в водных растворах и гелях поли(dA)·поли(dT) (а) и поли(dG)·поли(dC) (б) в интервале фазового перехода лед—вода при различных концентрациях полимеров; величина C указана в весовых процентах

Fig. 2. Heat absorption curves of ice-water phase transition observed in the poly(dA)·poly(dT) (a) and poly(dG)·poly(dC) (b) water solutions and gels with various polymer concentrations (C — in weight percents)

Рис. 3. Энтальпия плавления воды в водных растворах и гелях поли(dA)·поли(dT) (1) и поли(dG)·поли(dC) (2) как функция концентрации воды в образцах. Отмечены также значения ОВ, соответствующие данным величинам W ; $n_{\Sigma,GC}^A$, $n_{\Sigma,GC}^B$, $n_{Z,AT}^B = 12, 16, 27$ M H₂O/МПО соответственно

Fig. 3. Water fusion enthalpy (ΔH) in the water solutions and gels of poly(dA)·poly(dT) (1) and poly(dG)·poly(dC) (2) as a function of water content (W). RH values (in %) corresponding to the given W values are also presented; $n_{\Sigma,GC}^A$, $n_{\Sigma,GC}^B$, $n_{Z,AT}^B = 12, 16, 27$ M H₂O/MBP

и поли(dG)·поли(dC). Видно, что при уменьшении активности воды зависимость $\Delta H = f(W)$ в растворах и гелях поли(dA)·поли(dT) сохраняет линейный характер во всем интервале концентраций, пересекая ось абсцисс при значениях $W = 0,69 \pm 0,01$ г H₂O/г полимера. Именно это значение W и соответствует гидратации двойной спирали поли(dA)·поли(dT), равной $n_{\Sigma,AT} = 27,0 \pm 1$ M H₂O/МПО. Отметим, что тангенс угла наклона зависимости $\Delta H = f(W)$ представляет удельную теплоту плавления «объемной» воды.

Для растворов и гелей поли(dG)·поли(dC) обнаружено изменение наклона кривой $\Delta H = f(W)$. Причем при высоких значениях W ($W > 1,5$, т. е. при высоких ОВ) параметр гидратации, определяемый по тепловому эффекту плавления льда, составляет $n_{\Sigma,GC} = 16,0 \pm 1$ M H₂O/МПО, что хорошо согласуется с эмпирической зависимостью для В-формы ДНК (рис. 1). При концентрациях $W < 1,0$, $n'_{\Sigma,GC} = 12,0 \pm 1$ M H₂O/МПО. Именно при таком соотношении H₂O/полимер (0,33 г H₂O/г полимера), соответствующем значениям ОВ ~ 60—65 %, проис-

ходит пересечение кривой ΔH с осью абсцисс. Особо отметим, что характер зависимости $\Delta H=f(W)$, отвечающий гидратации (dG)·(dC)-полимера с $n' = 12$ М Н₂О/МПО, сохраняется до относительно высоких значений ОВ (~95 %).

Таким образом, согласно калориметрическим данным: 1) гидратация поли(dA)·поли(dT) составляет $n_{\Sigma,AT} = 27,0 \pm 1$ М Н₂О/МПО при всех значениях ОВ, и термодинамические параметры плавления воды не проявляют никаких особенностей, которые могли бы свидетельствовать о конформационном переходе в пределах двухтяжевого состояния и соответственно изменении гидратации; 2) гидратация поли(dG)·поли(dC) при высоких значениях ОВ (соответствующих существованию В-формы ДНК в волокнах поли(dG)·поли(dC) [2, 3]) составляет $n_{\Sigma,GC} = 16,0 \pm 1$ М Н₂О/МПО; 3) термодинамические параметры фазового перехода растворителя в растворах и гелях поли(dG)·поли(dC) резко меняются при уменьшении общего содержания воды (в интервале ОВ 90—60 %); 4) гидратация поли(dG)·поли(dC) при низких значениях ОВ (соответствующих существованию А-формы в волокнах поли(dG)·поли(dC) [2, 3]) составляет $n_{\Sigma,GC} = 12,0 \pm 1$ М Н₂О/МПО, что указывает на существенную дегидратацию (на 4 ± 1 М Н₂О/МПО) двухтяжевого полимера (dG)·(dC).

Следует отметить, что калориметрические эксперименты проводятся в относительно концентрированных растворах и гелях ДНК, что, естественно, не позволяет без оговорок переносить полученные результаты на случай разбавленных растворов, т. е. невзаимодействующих молекул. Вместе с тем имеющиеся данные [13] свидетельствуют о том, что причиной В—А-перехода может быть дегидратация отдельных атомных групп двойной спирали, а стабилизация двухтяжевых структур усиливается за счет межмолекулярных взаимодействий в конденсированном состоянии.

В настоящее время мы не располагаем собственными экспериментальными данными о структурах возникающих форм в растворах и гелях поли(dG)·поли(dC) при изменении содержания в них воды. Данные, свидетельствующие о наличии В- и А-форм в волокнах поли(dG)·поли(dC), как было отмечено, получены ранее рентгенографически [2, 3]. В работах по исследованию конформации поли(dG)·поли(dC) методами Раман-спектроскопии [21] и протонной спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера [22] высказываются предположения о том, что в растворах поли(dG)·поли(dC) существует равновесие В \rightleftharpoons А. К такому же выводу приходят авторы работы [23]. Это равновесие в определенных условиях (например при дегидратации) может быть сдвинуто в сторону А-формы [21]. Наблюдаемый нами переход, сопровождающийся существенным уменьшением количества связанных молекул воды, может отражать именно эту ситуацию. Для выяснения данного вопроса нами предпринимаются эксперименты с привлечением рентгеноструктурного анализа.

Авторы выражают глубокую признательность В. И. Иванову за дискуссию и ценные замечания, а также М. Д. Франк-Каменецкому за полезные советы.

MICROCALORIMETRIC STUDIES IN HYDRATION OF poly(dA) poly(dT) AND poly(dG)·poly(dC) POLYNUCLEOTIDES

*G. M. Mrevlishvili, V. M. Sokhadze, G. Sh. Japaridze,
D. A. Tatishvili, N. E. Yachobashvili*

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

Summary

The calorimetric data show: 1) poly(dA)poly(dT) hydration is $n_{at} = 27.0 \pm 1$ МН₂О/МБР at all values of relative humidity (RH); 2) poly(dG)poly(dC) hydration at high values of RH is $n_{GC} = 16.0 \pm 1$ МН₂О/МБР; 3) thermodynamic parameters of ice-water phase

transition in poly(dG)poly(dC) solutions and gels are abruptly changed with a decrease of the total water content (in the RH range of 90-60 %; 4) poly(dG)poly(dC) hydration at low RH is $n_{GC} = 12.0 \pm 1 \text{MH}_2\text{O}/\text{MBP}$; 5) the observed hydration change of poly(dG)poly(dC) (by $4 \pm 1 \text{MH}_2\text{O}/\text{MBP}$) points to the conformational transition of this polymer within the limits of double-stranded state during the dehydration.

1. *The B to A transition of DNA in solution* / V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, E. E. Mynyat et al. // J. Mol. Biol.—1974.—87, N 4.—P. 817—833.
2. *Arnot S., Selsing E.* The structure of poly-deoxyguanylic and poly-deoxycytidylic acids // Ibid.—88, N 3.—P. 551—552.
3. *Polymorphism of DNA double helices* / A. G. W. Leslie, S. Arnott, R. Chandrasekaran, R. L. Ratliff // Ibid.—1980.—143, N 1.—P. 49—72.
4. *The anatomy of A-, B- and Z-DNA* / R. E. Dickerson, H. R. Drew, B. N. Conner et al. // Science.—1982.—21, N 4545.—P. 475—485.
5. *McCall M., Brown T., Kennard O.* The crystal structure of d(G-G-G-G-C-C-C-C). A model for poly(dG)·poly(dC) // J. Mol. Biol.—1985.—183, N 3.—P. 385—396.
6. *Rich A., Nordheim A., Wang A. H.* The chemistry and biology of left-handed Z-DNA // Annu. Rev. Biochem.—1984.—53.—P. 791—846.
7. *Dickerson R. E., Drew H. R.* Structure of a B-DNA dodecamer. 2. Influence of base sequence on helix structure // J. Mol. Biol.—1981.—149, N 4.—P. 761—786.
8. *Drew H. R., Dickerson R. E.* Structure of a B-DNA dodecamer. 4. Geometry of hydration // Ibid.—151, N 3.—P. 535—556.
9. *Ordered water structure around a B-DNA dodecamer* / M. L. Kopka, A. V. Fratini, H. R. Drew, R. E. Dickerson // Ibid.—1983.—163, N 1.—P. 129—146.
10. *Calladine C. R., Drew H. R.* A base-centered explanation of the B-to-A transition in DNA // Ibid.—1984.—178, N 3.—P. 773—782.
11. *CC/GG contacts facilitate the B to A transition of DNA in solution* / L. E. Minchenkova, A. K. Schyolkina, B. K. Chernov, V. I. Ivanov // J. Biomol. Struct. and Dyn.—1986.—4, N 3.—P. 463—476.
12. *Ordered water structure in an A-DNA octamer at 1.7 Å resolution* / O. Kennard, W. B. T. Cruse, J. Nachman et al. // Ibid.—3, N 4.—P. 623—647.
13. *Saenger W., Hunter W. N., Kennard O.* DNA conformation is determined by economics in the hydration of phosphate groups // Nature.—1986.—324, N 6095.—P. 385—388.
14. *Frank-Kamenetskii M. D.* A simple solution to the stability of the double helix // Ibid.—P. 305.
15. *Мревлишвили Г. М.* Низкотемпературная калориметрия биологических макромолекул // Успехи физ. наук.—1979.—128, № 2.—С. 274—312.
16. *Andronikashvili E. L.* Low-temperature calorimetry of biological macromolecule solutions // J. Polym. Sci.—1981.—69.—P. 11—15.
17. *Мревлишвили Г. М.* Гидратация ДНК зависит от GC-содержания // Докл. АН СССР.—1981.—260, № 3.—С. 761—764.
18. *Hydration of DNA and possible role of water in the transition between right- and left-handed double helix* / G. M. Mrevlishvili, G. Sh. Japaridze, V. M. Sokhadze, D. A. Tishvili // Water and ions in biol. systems.—New York; London: Plenum press, 1985.—P. 8.
19. *Mrevlishvili G. M.* Heat capacity of biological macromolecules // Thermodynamic data for biochem. and biotechnol.—Berlin etc: Springer, 1986.—P. 25.
20. *Mrevlishvili G. M., Syrnikov Yu. P.* Thermodynamic quantities of water-phase transition in biopolymer solutions of high concentration // Stud. biophys.—1974.—43, N 3.—P. 155—170.
21. *Nishimura Y., Torigoe Ch., Tsuboi M.* An A-form poly(dG)·poly(dC) in H₂O solution // Biopolymers.—1985.—24, N 9.—P. 1841—1844.
22. *Sarma M. H., Gupta G., Sarma R. H.* 500-MHz ¹H NMR study of poly(dG)·poly(dC) in solution using one-dimensional nuclear Overhauser effect // Biochemistry.—1986.—25, N 12.—P. 3659—3665.
23. *Исследование конформационных особенностей полидезоксирибонуклеотидов с неслучайной последовательностью оснований методом медленного обмена ¹H—³H* / Е. А. Лесник, И. Н. Агранович, Р. Н. Маслова, Я. М. Варшавский // Молекуляр. биология.—1987.—21, № 2.—С. 422—427.

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

Получено 14.07.87