

Barbara Lubas, Tadeusz Wilczok

Katedra i Zakład Chemii Ogólnej,  
Śląskiej Akademii Medycznej, Katowice

ZMIANY UWODNIENIA DNA W PROCESIE FAZOWEGO  
PRZEJŚCIA TERMICZNEGO SPIRALA - KŁĘBEK

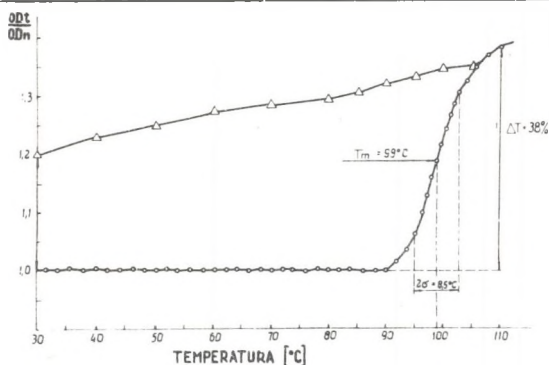
Streszczenie. Przy zastosowaniu graficznej metody rozwiązania równań wyliczono z pomiarów czasów magnetycznej relaksacji protonów uwodnienie nierotacyjne DNA w zakresie temperatur od 20°C do temperatury fazowego przejścia termicznego  $T_m$ . Obliczenia oparto o zależności doświadczalne czasów relaksacji  $T_1$  i  $T_2$  w funkcji temperatury dla wodnych roztworów DNA i odpowiednich rozpuszczalników. Zaobserwowano dehydratację DNA w procesie przejścia spirala kłębek, wyróżniono jej stadia i znaleziono jej zależność od siły jonowej roztworu i stężenia DNA. Dehydratacja DNA przy przejściu spirala-kłębek stanowi bezpośredni dowód doświadczalny roli, jaką może odgrywać woda związana z DNA przy stabilizacji drugorzędowej struktury makromolekuły.

Makromolekuła DNA stanowi w stanie natywnym uporzędkowaną przestrzennie bispiralę, w której dwa łańcuchy polinukleotydowe związane są ze sobą przy pomocy wiązań wodorowych między komplementarnymi zasadami azotowymi, zwanych wiązaniami WATSONA i CRICKA [1]. Struktura DNA typu bispirali jest również określana jako struktura drugorzędowa

Odstępstwa od stanu natywnego - bispirali DNA z nienaruszonymi wiązaniami wodorowymi WATSONA-CRICKA nazywamy zmianami denaturacyjnymi. Denaturacja makromolekuł DNA będzie całkowita, jeżeli wszystkie wiązania wodorowe WATSONA-CRICKA ulegną rozerwaniu, co doprowadzi do pełnego rozejścia się łańcuchów polinukleotydowych, które następnie mogą związać się w kłębki. Wskutek tego pełną denaturację DNA określa się również jako przejście fazowe spirala-kłębek.

Denaturacja DNA może być wywołana [2] przez czynniki chemiczne, jak np. zmiana pH środowiska w kierunku kwasowym lub zasadowym, lub przez obniżenie siły jonowej roztworu poniżej  $10^{-3}$  i czynniki fizyczne, np. wzrost temperatury lub promieniowanie jonizujące i ultrafioletowe.

Najdogodniej jest śledzić zmiany denaturacyjne DNA przy temperaturowym przejściu fazowym spirala-kłębek przez pomiar gęstości optycznej (OD) roztworu DNA przy długości fali 260 nm. Wykresy zależności od temperatury stosunku  $OD_t/OD_n$  gdzie  $t$  oznacza dowolną temperaturę pomiaru a  $n$  temperaturę początkową, w której DNA jest jeszcze w całości natywny, nazywamy krzywymi topnienia drugorzędowej struktury DNA. Typową krzywą dla DNA z grasicy cielęcej przedstawiono na Rys. 1.



Rys. 1. Krzywa topnienia dla DNA XIII/66 rozpuszczonego w 1,0 M roztworze NaCl, z uwzględnieniem charakterystycznych parametrów (kółka - wyniki przygrzewaniu roztworu, trójkąty - wyniki przy chłodzeniu roztworu)

Trzy główne parametry, charakteryzujące krzywą topnienia, wprowadzili Marmur i Doty [3]. Parametry te to średnia temperatura topnienia  $T_m$ , efekt hiperchromatyczny  $\Delta T$  i współczynnik heterogenności  $2\sigma$ . Jako dwa niezależne kryteria osłabienia stabilności molekuł DNA lub zmian o charakterze denaturacyjnym przyjmuje się obniżenie temperatury topnienia  $T_m$  czy też wzrost efektu hiperchromatycznego w temperaturach poniżej wznoszącej się części krzywej topnienia.

Liczne dane doświadczalne świadczą [4,5], że do osłabienia stabilności DNA prowadzą czynniki, które wywierają wpływ na strukturę uwodnienia molekuł. Destabilizacja DNA następuje w roztworach niewodnych przy dodaniu do roztworu DNA dużych ilości elektrolitów lub zasad azotowych, nukleozydów i związków pochodnych, mocznika i innych związków, które ze względu na właściwość intensywnej hydratacji własnej mogą prowadzić do dehydratacji molekuł DNA.

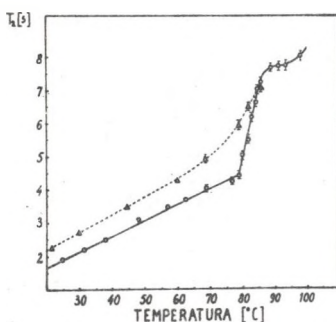
Pośrednie dowody wpływu powłoki wodnej na stabilność DNA stanowią również: brak wzrostu wartości gęstości optycznej obserwowanej przy kwasowej i zasadowej denaturacji DNA mimo wyraźnego obniżenia temperatury  $T_m$ , wpływ typu buforu na stabilność DNA oraz zależność kwasowej denaturacji DNA od temperatury. Zjawiska te nie sposób zinterpretować przy założeniu, że w stabilizacji drugorzędowej struktury DNA biorą udział jedynie siły wynikające z wiązań wodorowych WATSONA-CRICKA. Przy założeniu udziału w tej stabilizacji mostków wodnych tworzących warstwę hydratacyjną DNA i uwalnianych w trakcie denaturacji, interpretacja powyższych faktów podana przez LEWINA [6], daje się udowodnić. Uwzględniając istnienie mostków wodnych można także zinterpretować zaobserwowane w procesie denaturacji zmiany lepkości i promienia bezwładności oraz przesunięcia chemiczne w widmach magnetycznych rezonansu jądrowego roztworów DNA.

Bezpośredniego dowodu wpływu dipoli wodnych związanych przez makromolekułę DNA na jej strukturalną stabilność dotąd jednak nie przedstawiono. Dowodem takim mogłoby być jedynie zaobserwowanie dehydratacji DNA w proce-

sie fazowego przejścia spirala-kłębek, a duże rozbieżności w wartościach uwodnienia DNA oznaczanego różnymi metodami nie sprzyjały podejmowaniu tego typu badań.

Zastosowanie metody wyznaczania uwodnienia nierotacyjnego DNA z pomiaru czasów relaksacji  $T_1$  i  $T_2$  [5,7,8] wydało się pod tym względem bardzo obiecujące ze względu na różnice w uwodnieniu nierotacyjnym zaobserwowane dla zdenaturowanego i natywnego stanu DNA.

W tym celu zmierzono zależność czasów relaksacji  $T_1$  i  $T_2$  próbek DNA od temperatury na aparaturze echa spinowego [9]. Jako rozpuszczalników DNA używano 0,02, 0,15 i 1,0 M roztworu NaCl. Dla tych roztworów wykonano również analogiczne pomiary temperaturowe. Wykazano, że istnieje charakterystyczna zależność czasów relaksacji roztworów DNA od temperatury [10]. Typową krzywą doświadczalną przedstawiono na Rys. 2.



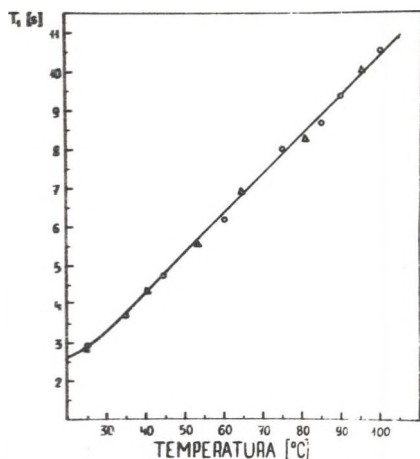
Rys. 2. Zależność poprzecznego czasu relaksacji  $T_2$  od temperatury dla DNA XIII/66 w 0,15 M roztworze NaCl, przy stężeniu wyjściowym  $C_{20} = 5.38 \text{ mg/cm}^3$  (kółka - wyniki przy ogrzewaniu roztworu, trójkąty - wyniki przy chłodzeniu roztworu)

Dla DNA w stanie natywnym wzrost czasu relaksacji  $T_2$  jest początkowo wolniejszy a w okolicy początku wznoszącej się części krzywej topnienia DNA przechodzi we wzrost bardzo szybki, który kończy się praktycznie w okolicy temperatury  $T_m$  wyznaczonej dla DNA przez pomiary spektrofotometryczne. W stanie zdenaturowanym w miarę spadku temperatury następuje monotoniczny spadek czasu relaksacji, przy czym wartości czasu relaksacji są zawsze wyższe dla DNA w stanie zdenaturowanym niż dla DNA w stanie natywnym.

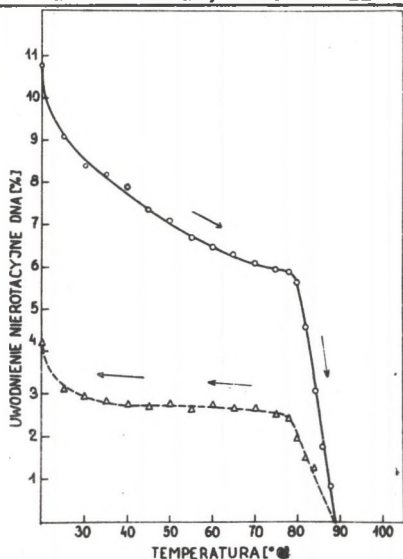
Typową zależność czasów relaksacji od temperatury dla roztworów NaCl w których rozpuszczano DNA przedstawiono na Rys. 3.

Jak widać, w tym przypadku nie obserwuje się różnic między wynikami uzyskanymi przy ogrzewaniu i chłodzeniu roztworu.

W całym badanym zakresie temperatur wartości czasów relaksacji  $T_1$  i  $T_2$  dla roztworów DNA były skrócone w stosunku do  $T_1$  i  $T_2$  dla odpowiednich rozpuszczalników. Pozwoliło to na wyznaczenie przy zastosowaniu opisane



Rys. 3. Zależność podłużnego czasu relaksacji  $T_1$  od temperatury w 1,0 M roztworze NaCl



Rys. 4. Zależność uwodnienia nierotacyjnego od temperatury dla DNA o stężeniu wyjściowym  $2,9 \text{ mg/cm}^3$ , w 0,15 M roztworze NaCl (kółka i linia ciągła - DNA natywny, trójkąty i linia przerywana - DNA sdenaturowany)

poprzednio metody [8] wartości uwodnienia nierotacyjnego i czasu korelacji molekuł DNA.

Obliczenia przeprowadzono w zakresie temperatur poniżej wznoszącej się części krzywej topnienia co  $5^\circ\text{C}$ , a w temperaturach wyższych co  $2^\circ\text{C}$ .

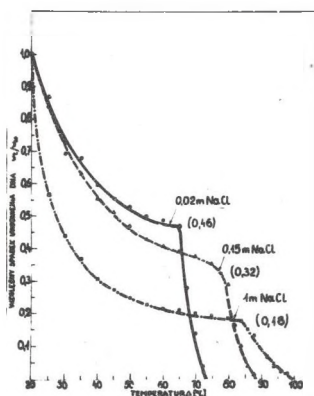
Zależność uwodnienia nierotacyjnego DNA rozpuszczonego w 0,15 M roztworze NaCl przedstawiono w funkcji temperatury na Rys. 4.

Wykazano, że w miarę wzrostu temperatury następuje dehydratacja natywnych molekuł DNA, przy czym możemy wyróżnić dwa różne stadia dehydratacji. W zakresie pomiędzy temperaturą wyjściową a temperaturą początku krzywej topnienia dla danego stężenia NaCl dehydratacja jest powolna. W zakresie między temperaturą początku krzywej topnienia i temperaturą fazowego przejścia termicznego  $T_m$  dehydratacja ma charakter gwałtowny. W temperaturze bliskiej wartości  $T_m$  molekula jest praktycznie zupełnie odwodniona. Wydaje się, że w zakresie powolnej dehydratacji srywane są mostki wodne położone w szerokich bruzdach DNA [4,6], a w zakresie dehydratacji gwałtownej również mostki wodne w wąskich bruzdach DNA.

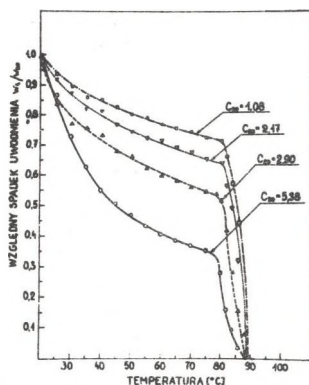
W czasie ochładzania roztworów sdenaturowanych zwinięte w kłębki pojedyncze łańcuchy DNA ulegają powtórnej rehydratacji, jednak odbudowana liczba mostków wodnych jest wyraźnie niższa niż dla DNA w stanie natywnym.

Zaobserwowana dehydratacja stanowi pierwszy bezpośredni dowód udziału mostków wodnych w molekułach DNA w stabilizacji struktury tej molekuly. De-

hydratacja ta zależy wyraźnie od siły jonowej roztworu oraz od stężenia DNA w próbce. Termiczne zmiany uwodnienia DNA w zależności od tych parametrów przedstawiono na Rys. 5 i 6.



Rys. 5. Względny spadek uwodnienia DNA w funkcji temperatury w zależności od stężenia molowego NaCl w rozpuszczalniku (stężenie wyjściowe DNA  $C_{20} = 5.38 \text{ mg/cm}^3$ ).



Rys. 6. Względny spadek uwodnienia DNA w funkcji temperatury w zależności od stężenia DNA, w 0,15 m roztworze NaCl (stężenie DNA  $C_{20}$  podano w  $\text{mg/cm}^3$ ).

Na Rys. 5 porównano względne spadki uwodnienia  $w_t/w_{20}$ , gdzie  $w_t$  oznacza uwodnienie w danej temperaturze a  $w_{20}$  w temperaturze wyjściowej 20°C dla DNA w roztworze NaCl o różnej sile jonowej. Jak widać, większa siła jonowa roztworu sprzyja dehydratacji w niższych zakresach temperatur, co można prawdopodobnie tłumaczyć konkurencją jonów  $\text{Na}^+$  w wiązaniu dipoli wodnych oderwanych od DNA.

Zależność względnego spadku uwodnienia DNA w funkcji temperatury i stężenia DNA przedstawiono na Rys. 6. Wykres wykazuje, że większe stężenie próbki sprzyja dehydratacji w niższych temperaturach, tym razem ze względu na konkurencję samych molekuł DNA w restauracji zerwanych mostków wodnych.

Przedstawione wyniki dają podstawę do termodynamicznej analizy udziału molekuł wody w procesie termicznego przejścia fazowego spirala-kłębek dla molekuł DNA.

#### LITERATURA

- [1] Watson, J., Crick F.C.H., *Nature*, **171**, 737 (1953)
- [2] Marmur J., Rownd R., Schildkraut C.L., *Progress in Nucleic Acid Research*, Vol. 1, str. 231, Davidson & Cohn, 1963
- [3] Marmur, J., Doty P., *Nature*, **183**, 1427 (1959)
- [4] Lewin, S., *Lab. Pract.*, **13**, 400, 824, 1191 (1964)
- [5] Lubas, B., Praca doktorska, Śląska Ak. Med., Katowice 1968
- [6] Lewin, S., *J. Theoret. Biol.*, **17**, 181 (1967)
- [7] Lubas, B., Wilczok T., *Biochim. Biophys. Acta*, **120**, 427 (1966)
- [8] Lubas, B., Wilczok T. *Zesz. Nauk. Pol. Śląskiej Mat. Fiz.*, **17** 141 (1972)
- [9] Daszkiewicz., O.K., Praca doktorska, U.J. Kraków, 1965
- [10] Lubas B., Wilczok T., Daszkiewicz O.K., *Biopolymers*, **5**, 967 (1967)

#### CHANGES IN HYDRATION OF DNA DURING THERMAL HELIX-COIL TRANSITION

##### S u m m a r y

The nonrotational hydration of DNA at temperatures ranging from 20°C up to the melting point  $T_m$  was calculated from measurements of proton magnetic relaxation times. The graphical method for solving of the constructed equations was used. Calculations were based on the functional dependence of relaxation times  $T_1$  and  $T_2$  on temperature in aqueous DNA solutions and relative solvents. Dehydration of DNA during thermal helix-coil transition was observed. Four characteristic parts of the curve and their dependence on solution ionic strength and concentration of DNA were found. Dehydration of DNA during thermal helix-coil transition was interpreted as indirect experimental proof of the role water dipoles in stabilization of the DNA secondary structure.

ИЗМЕНЕНИЕ ГИДРАТАЦИИ ДНК ВО ВРЕМЯ ТЕРМИЧЕСКОГО ПЕРЕХОДА  
СПИРАЛЯ-КЛУБОК

## Резюме

При помощи графического метода решения уравнений вычислено из времени магнитной релаксации протонов, неротационную гидратацию ДНК в области температур от 20°C до температуры перехода спираль-клубок  $T_m$ . Расчёты получено из зависимости времени релаксации  $T_1$  и  $T_2$  от температуры для водных растворов ДНК и растворителей. Доказано, что дегидратация ДНК изменяется в процессе перехода спираль-клубок. Вычислено зависимость дегидратации от йонной силы раствора и концентрации ДНК. Дегидратация ДНК во время перехода спираль-клубок является непосредственным экспериментальным доказательством значения воды связанной с ДНК, которая отгрызает существенную роль в стабилизации вторичной структуры макромолекул ДНК.