

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ

СОЕДИНЕНИЯ

Том IV

№ 5

1962

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ НИЗКОПОЛИМЕРНЫХ РИБОНОУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В РАСТВОРЕ

Л. Л. Киселев, Е. П. Ребиндер, Л. Ю. Фролова

Низкополимерные растворимые рибонуклеиновые кислоты (S-RНК) (мол. вес 25 000) являются природными линейными сополимерами, состоящими главным образом из четырех мономеров-нуклеотидов (адениловой, гуаниловой, цитидиловой и уридиновой кислот) [1].

Необходимость изучения макромолекулярной структуры S-RНК была обоснована нами в предыдущей работе [2]. Ранее было показано [2—4], что S-RНК из разных источников обладают при температуре 25° и ионной силе 0,1 вторичной структурой, характеризующейся определенной степенью упорядоченности (спирализации). Эта упорядоченность может быть уничтожена нагреванием, причем при охлаждении спирализации снова восстанавливается [2,3].

С другой стороны, молекулы S-RНК как полигоны должны обнаруживать зависимость формы молекул от условий, имеющихся в растворе (рН, ионная сила, температура и т. д.).

Цель этой работы состояла в том, чтобы показать, какими факторами определяется форма молекул S-RНК в растворе. Далее мы стремились выяснить степень упорядоченности, присущей разным конформациям S-RНК в растворе, и характер конформационных переходов.

Экспериментальная часть

В опытах использовали S-RНК, выделенную из пекарских дрожжей [2]. Небольшое изменение методики состояло в исключении стадии адсорбции препарата на активированном угле. В некоторых случаях вместо диализа против цитратного буфера раствор диализовали против 5·10⁻³ M раствора версена, pH 7,0 (это существенным образом не влияло на свойства препарата). Вместо однократной применяли двукратную фенольную депротеинизацию (первый раз — 1,5 часа равным объемом фенола, второй раз — 0,5 часа половинным объемом фенола). Препарат хранили в концентрированном растворе при 0° с хлороформом. Концентрацию S-RНК определяли по поглощению при 260 мк на спектрофотометре СФ-4. В вискозиметрических и поляриметрических измерениях концентрация S-RНК составляла 5 мг/мл, кроме опытов по изучению свойств S-RНК в зависимости от концентрации.

При спектрофотометрических измерениях пользовались ≈0,002%-ными растворами. Для создания требуемых ионных сил использовали растворы NaCl соответствующей молярности, с буферным раствором цитрата, pH 7,0. При изучении зависимости структуры S-RНК от pH пользовались 0,1 M растворами цитратного буфера с соответствующими pH. В опытах с использованием воды в качестве растворителя употребляли тридистиллят (последняя перегонка из кварца). Содержание ионов (по данным электропроводности) соответствовало 10⁻⁶ ионной силы.

Препараты S-RНК перед измерениями центрифугировали 20 мин. при 15 000 g на холоду. Вязкость измеряли в вискозиметре Уббелоде со временем истечения для воды 3—3,5 мин., термостатированно с помощью ультратермостата Вобсера. Ошибка измерений составляла ± 10%. Большая ошибка объясняется малой вязкостью препаратов в связи с небольшим молекулярным весом.

Оптическую плотность и оптическое вращение измеряли методом, описанным ранее [2]. В поляриметре в качестве источника света использовали лампу СВД-120а с фильтром, пропускающим ртутные линии (577 и 579 мк). Точность поляриметрических измерений составляла ± 2,5%. Спектры снимали на японском регистрирующем спектрофотометре Hitachi в диапазоне 220—300 мк¹.

¹ Приносим нашу благодарность Н. Бажулиной за снятие спектров.

Результаты

Влияние электролитов на форму молекул S-PHK. Известно, что эффективный гидродинамический объем, измеренный при разных условиях, позволяет охарактеризовать степень гибкости полионов [см. 5].

Был изучен характер зависимости приведенной вязкости (удельная вязкость/концентрация) от концентрации молекул S-PHK в растворе при разных ионных силах. Полученные данные приведены на рис. 1. Величины приведенной вязкости зависят от ионной силы — в воде они максимальны и резко уменьшаются при увеличении количества ионов в растворе.

Кроме того, приведенная вязкость, измеренная в воде, различна для разных концентраций S-PHK в растворе. С уменьшением концентрации S-PHK в воде приведенная вязкость увеличивается, достигая при $c = 0,2\%$ максимума, и затем резко падает. (Для разных препаратов абсолютное значение максимума и та концентрация S-PHK, при которой этот максимум достигается, слегка варьируют.)

При добавлении ионов в раствор S-PHK наблюдаются изменения характера кривой при сохранении зависимости от концентрации. Эти изменения состоят в том, что исчезает максимум и кривая переходит в прямую, наклоненную под углом к оси абсцисс. Это характерно для ионных сил 10^{-3} — 10^{-2} .

Рис. 1. Изменения величины приведенной вязкости в зависимости от концентрации раствора S-PHK и ионной силы растворителя:

1 — растворитель H_2O , 2 — $\mu = 0,02$; 3 — $\mu = 0,1, 1, 10$

изменения состоят в том, что исчезает максимум и кривая переходит в прямую, наклоненную под углом к оси абсцисс. Это характерно для ионных сил 10^{-3} — 10^{-2} .

При дальнейшем увеличении содержания ионов в растворе наклон прямой к оси абсцисс исчезает (кривая идет параллельно). Исчезает зависимость не только абсолютных значений приведенной вязкости от концентрации, но и от ионной силы — кривые для S-PHK при $\mu = 0,1$ и $\mu = 1,0$ сливаются в одну прямую, параллельную оси абсцисс.

Следовательно, в зависимости от ионной силы меняются и характер изменения приведенной вязкости от концентрации, и абсолютные значения приведенной вязкости. Эти зависимости наиболее резко выражены в воде и сглаживаются при введении ионов в раствор. При ионной силе 0,1—1,0 приведенная вязкость не зависит ни от концентрации, ни от ионной силы.

Полученные при этом значения характеристической вязкости приведены в табл. 1.

Оказывается, что значения характеристической вязкости обнаруживают ярко выраженную зависимость от ионных сил до $\mu = 0,1$; при дальнейшем введении ионов в раствор характеристическая вязкость остается постоянной. Так как при бесконечном разбавлении ($c \rightarrow 0$) можно не учитывать межмолекулярных взаимодействий, то изменения характеристической вязкости в данном случае, по-видимому, связаны только с изменениями формы самих молекул.

Уменьшение характеристической вязкости при увеличении ионной силы показывает, что происходит переход от растянутой формы молекулы

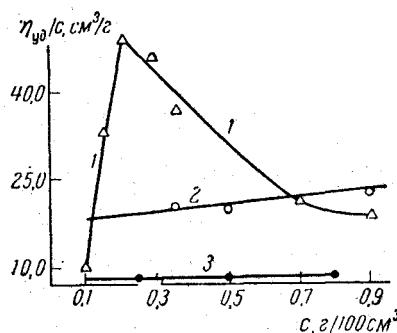


Таблица 1
Зависимость величины характеристической вязкости от ионной силы

№ п.п.	μ	$\lim_{c \rightarrow 0} \eta_{ud}/c$, см ³ /г
1	0,005	21,0
2	0,01	17,5
3	0,1	7,5
4	1,0	7,5

к глобулярной. При этом образуется клубок и расстояния между отдельными звенями молекулы уменьшаются, что приводит к возникновению внутримолекулярных связей. Известно, что в нуклеиновых кислотах это главным образом водородные связи. Появление этих связей можно регистрировать по уменьшению поглощения препаратов S-RНК в УФ при 260 м μ [6, 7, 9] (гипохромный эффект).

Была изучена гипохромия препаратов S-RНK в растворах с разной ионной силой. Результаты представлены в табл. 2 и на рис. 2.

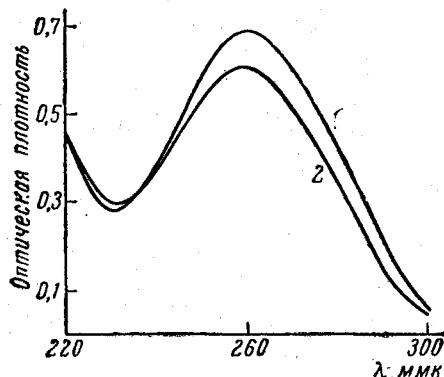


Рис. 2

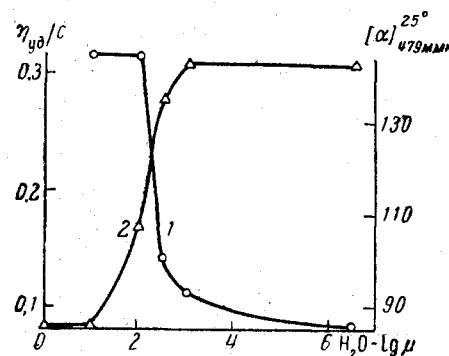


Рис. 3

Рис. 2. Влияние ионной силы на оптическое поглощение раствора S-RНK:
1 — растворитель H_2O ; 2 — растворитель $0.1\text{ M NaCl} + 0.015\text{ M}$ цитратный буфер, pH 7,0
Рис. 3. Удельное оптическое вращение (1) и приведенная вязкость (2) препарата S-RНK в зависимости от содержания электролитов в растворе

Таблица 2
Спектральные характеристики препарата S-RНK

№ п.п.	Растворитель	$\lambda_{\min.}$, м μ	$\lambda_{\max.}$, м μ	Оптич. плотн. макс.	Оптич. плотн. H_2O Оптич. плотн. $NaCl$ $\lambda = 259\text{ ммк}$
			Оптич. плотн. мин.		
1	H_2O	230,5	259	2,42	
2	0.1 M раствор $NaCl$ + + 0.015 M раствор цитрата, pH 7,0	231	259	2,09	113,5

Видно, что добавление ионов вызывает уменьшение поглощения, т. е. появление водородных связей. Это увеличение поглощения составляет $\approx 15\%$ от исходного значения. Следовательно, увеличение содержания электролита в растворе приводит не только к уплотнению (скручиванию) молекулы, но и к появлению водородных связей, носящих внутримолекулярный характер, так как для данной концентрации (0,002%) межмолекулярным взаимодействием следует пренебречь.

Возникает вопрос о том, каков характер этой сжатой (скрученной) формы молекулы, имеющей водородные связи: организованы ли они в определенную упорядоченную систему или образуют хаотические, беспорядочные спшивки?

Для решения вопроса о характере внутримолекулярной организации молекулы S-RНK в состоянии клубка мы воспользовались измерением оптического вращения растворов S-RНK.

Было известно, что молекулы S-RНK в солевых растворах обладают значительной оптической активностью [2—4, 8], говорящей об упорядоченном характере их вторичной структуры.

На рис. 3 показано, как при увеличении ионной силы раствора, одно-

временно с резким сокращением эффективного гидродинамического объема, возрастает степень спирализации молекул S-РНК. Основные изменения в значениях вязкости и оптического вращения совершаются между 10^{-2} и 10^{-3} μ . Интересно, что максимальная для данных условий спирализация не вызывает полной жесткости молекулы (например, при $\mu = 10^{-2}$ оптическое вращение уже достигло максимума в 145° , тогда как приведенная вязкость вдвое больше того значения, которое характерно для максимально сжатой формы молекулы). Следует отметить также, что оптическое вращение в растянутой форме молекулы (при малых ионных силах и в воде) превышает значения, характерные для мононуклеотидов ($[\alpha] = 10^\circ$), что свидетельствует об «остаточной» спирализации, не зависящей от ионной силы.

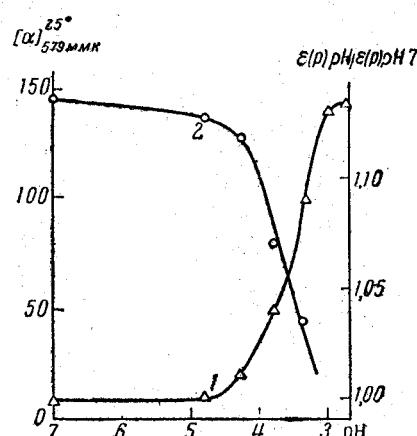


Рис. 4. Влияние pH на оптическую плотность (1) и удельное оптическое вращение (2) раствора S-РНК

Вторичная структура и pH раствора. В состав нуклеиновых кислот входят пуриновые и пиримидиновые основания, содержащие аминные и карбонильные группы. Средство этих групп к протонам различно. При подкислении первым ионизируется цитозин, а последним — гуанин; pH для цитозина $\sim 4,5$, для гуанина $\sim 2,7$ [6, 7, 9]. Теоретически именно в этих пределах pH должна осуществляться ионизация всей молекулы, начиная от pH $\sim 4,5$ и вплоть до pH ~ 3 .

Введение протонов резко уменьшает средство NH и CO-групп, что приводит к разрыву водородных связей между ними. Поэтому, пользуясь введением протонов как средством разрушения внутримолекулярных водородных связей, можно проследить корреляцию между степенью упорядоченности молекул и содержанием водородных связей. Мерой разрушения водородных связей служила величина гиперхромного эффекта при подкислении раствора, а мерой степени упорядоченности структуры — величина оптического вращения.

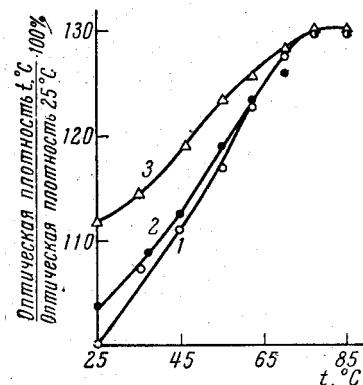
Характер зависимости изменения оптической плотности от pH представлен на рис. 4. Экспериментально найденная зависимость точно соответствует теоретически предсказанной: изменение оптической плотности начинается при pH $\sim 4,5$ и заканчивается при pH $\sim 3,0$. Плавный характер кривой прямо указывает на то, что разрушение водородных связей при подкислении раствора совершается постепенно, по мере ионизации отдельных нуклеотидов.

Используя оптическое вращение как меру спирализации молекул S-РНК, удалось показать (рис. 4), что сдвиг pH приводит к постепенному уменьшению оптического вращения вплоть до величин, характерных для оптической активности составляющих S-РНК нуклеотидов (при pH $\sim 2,7$, $[\alpha]_{478} \approx 10^\circ$). Снова, как и в случае зависимости оптического вращения и приведенной вязкости от ионной силы раствора (рис. 3), обращает на себя внимание то обстоятельство, что гиперхромный эффект и деспирализация молекул S-РНК развиваются в одинаковых пределах (в данном случае в пределах pH 3,0—4,5) и характер зависимости совершенно одинаков.

Ранее было показано, что нагревание раствора S-РНК приводит к разрушению водородных связей. В связи с этим интересно было выяснить взаимоотношения двух факторов — температуры и pH — в их влиянии на водородные связи в молекулах S-РНК. На рис. 5 представлены полученные данные.

Оказалось, что сдвиг рН в кислую сторону до рН 5 не вызывает интенсификации исходного (при 25°) поглощения (рис. 4). При дальнейшем подкислении наблюдается сдвиг кривых влево — в область меньших температур (рис. 5), причем уже при комнатной температуре часть водородных связей оказывается разорванной, а оставшаяся часть — ослабленной. Следовательно, введение протонов ослабляет устойчивость водородных связей к нагреванию.

Рис. 5. Влияние рН на зависимость оптической плотности препаратов S-RНК от температуры:
1 — 0,1 M раствор цитратного буфера, рН 5,5; 2 — 0,1 M раствор цитратного буфера, рН 4,5; 3 — 0,1 M раствор цитратного буфера, рН 3,8



Исследовался также вопрос об обратимости сдвигов в оптической плотности препарата под влиянием рН. Оказалось, что, так же как и в случае нагревания [2,10], возросшее поглощение в УФ возвращается к исходному, если препарат нейтрализуют до рН 7,0.

Обсуждение

В начале обсуждения целесообразно выяснить характер тех изменений, которые возникают в значениях приведенной и характеристической вязкости в зависимости от концентрации препарата и низкомолекулярных ионов.

Эффект уменьшения приведенной вязкости в воде (рис. 1) при увеличении концентрации от 0,2 до 0,7% связан, по-видимому, с усилением взаимодействия молекул полиэлектролитов между собой, что приводит в силу электролитного характера молекул S-RНК, к взаимному подавлению диссоциации полярных групп высокополимера. Уменьшение диссоциации полярных групп в полиэлектролитах ведет к сворачиванию молекул в клубок с уменьшением эффективного гидродинамического объема.

Резкое падение приведенной вязкости при уменьшении концентрации от 0,2% также, вероятно, следует связывать с ролью межмолекулярных взаимодействий: при уменьшении концентрации эти взаимовлияния резко ослабляются и молекулы S-RНК принимают форму, обладающую минимумом свободной энергии. Такой формой для полиэлектролита является статистический клубок.

Введение ионов низкомолекулярного электролита ведет к экранированию фосфатных групп в цепях S-RНК, подавляя электростатическое отталкивание. Сближение цепей позволяет образовать водородные связи.

Изменение характеристической вязкости в зависимости от ионной силы с очевидностью показывает, что именно изменения формы молекул, а не какие-либо другие факторы, обусловливают влияние ионов на эффективный гидродинамический объем.

Оценивая зависимость вязкости и степени упорядоченности молекул S-RНК от ионной силы и учитывая данные о влиянии рН и температуры [2, 3, 10] на вторичную структуру S-RНК, можно сделать, по-видимому, следующие заключения. Молекулы S-RНК могут находиться в растворе в двух четко различающихся конформациях. Сжатая (скрученная) конформация существует при температуре 25°, ионных силах 0,1 и характеризуется близкими расстояниями между отдельными участками полинуклеотидной цепи (минимальными значениями характеристической вязкости). Сжатая конформация обладает определенной степенью упорядоченности

вторичной структуры (спирализацией). При деионизации раствора происходит переход к другой — развернутой конформации, существующей при ионных силах $\mu \leq 10^{-3}$ или $pH \approx 3$.

Эта конформация характеризуется отсутствием (полным или почти полным) внутримолекулярных водородных связей. Молекулы вместе с тем занимают значительно больший эффективный гидродинамический объем. Эта конформация не содержит упорядоченных областей внутри молекулы. Здесь, однако, необходимо сделать одно замечание. Переход к неупорядоченной конформации при подкислении раствора — полный, так как спирализация полностью исчезает (рис. 4). При деионизации раствора этот переход неполный, так как наблюдается некоторая «остаточная» спирализация (рис. 3). Эта «остаточная» спирализация может, вероятно, поддерживаться либо прочными водородными связями, устойчивыми в воде, либо связями другого типа (например, известно, что ионы металлов могут стабилизировать структуру высокополимерных РНК [11]). Возможно, что эта «остаточная» спирализация поддерживается и водородными, и «металлическими» связями.

Следует обратить внимание, что гиперхромный эффект в деионизированной воде составляет только 15% (табл. 2), тогда как при нагревании раствора S-РНК поглощение увеличивается на 30% [2,10]. Это указывает на то, что «остаточная» спирализация может поддерживаться водородными связями.

Полученные результаты позволяют предполагать, что молекулярная структура S-РНК в растворе определяется в основном двумя факторами — внутримолекулярными силами притяжения, сжатия (водородные связи) и электростатическими силами отталкивания, растяжения вдоль полинуклеотидных цепей.

Важно отметить, что структурный переход от одной конформации к другой совершается в относительно узких интервалах. Он носит характер резкого изменения формы молекулы — скачка. Этот скачок при переходе от одной конформации молекулы к другой с резким изменением в степени упорядоченности внутренней структуры молекулы есть по существу превращение типа «порядок — беспорядок». Поэтому переход от сжатой (упорядоченной) конформации молекул S-РНК к развернутой (неупорядоченной) может быть охарактеризован как «молекулярное плавление».

По-видимому, представленные данные позволяют сделать вывод о том, что макромолекулярная структура S-РНК в растворе и макромолекулярная структура высокополимерных (вирусных и рибосомальных) РНК [12—15] очень близки, несмотря на резкое различие в молекулярных весах. Если и существуют некоторые различия (они должны быть специально исследованы), то они носят частный характер.

Общность макромолекулярной структуры рибонуклеиновых кислот в растворе состоит в том, что они ведут себя как гибкие однотяжевые полиэлектролиты, обладающие способностью к обратимым конформационным переходам типа «порядок — беспорядок».

Приносим глубокую благодарность В. А. Энгельгардту за руководство работой.

Выводы

1. Молекулы низкополимерных рибонуклеиновых кислот могут существовать в растворе в двух четко различающихся конформациях. Глобулярная (сжатая) конформация характеризуется минимальным эффективным гидродинамическим объемом, высоким содержанием внутримолекулярных водородных связей. Она существует в растворе при температуре 25°, ионной силе 0,1 и нейтральных значениях pH.

Эта сжатая конформация есть наиболее упорядоченная, характеризующаяся высокой спирализацией молекул S-РНК.

2. Развернутая (рыхлая, раскрученная) конформация молекул S-РНК характеризуется большим гидродинамическим объемом, занимаемым молекулой в растворе, и отсутствием упорядоченных (спирализованных) участков. Она существует при $\mu \leqslant 10^{-3}$, pH ~ 3 и повышенных температурах.

3. Переход от сжатой конформации молекул к развернутой носит характер перехода типа «порядок — беспорядок».

4. Макромолекулярная структура S-РНК резко отличается от ДНК и обнаруживает большое сходство с макромолекулярной структурой высокополимерных РНК в растворе.

Институт радиационной
и физико-химической биологии АН СССР

Поступила в редакцию
8 VIII 1961

ЛИТЕРАТУРА

1. M. B. Hoagland, Nucleic Acids, Ac. Press, N. Y., 1960, V. 3.
2. Л. Л. Киселев, Л. Ю. Фролова, Е. П. Ребиндер, Высокомолек. соед., 4, 749, 1962.
3. A. Tissieres, J. Mol. Biol., 1, 365, 1959.
4. R. A. Cox, U. L. Littauer, J. Mol. Biol., 2, 166, 1960.
5. В. А. Каргин, Г. Л. Слонимский, Краткие очерки по физико-химии полимеров, Изд. МГУ, 1960.
6. G. H. Beaven, E. R. Holiday, E. A. Johnson, The Nucleic Acids, N. Y., V. 1, 1955.
7. P. Ehrich, P. Doty, J. Amer. Chem. Soc., 80, 4251, 1958.
8. S. Osawa, Biochim. et biophys. acta, 43, 110, 1960.
9. E. L. Duggan, V. L. Stevens, B. W. Grunbaum, J. Amer. Chem. Soc., 79, 4859, 1957.
10. G. L. Brown, G. Zubay, J. Mol. Biol., 2, 287, 1960.
11. W. E. C. Wacker, K. Fuma, R. Druyan, Federat. Proc., 19, 1, part 1, 316, 1960.
12. P. Doty, H. Boedtke, J. R. Fresco, R. Haselcorn, M. Litt, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 45, 482, 1959.
13. А. С. Спирин, Л. П. Гаврилова, С. Е. Бреслер, М. И. Мовсесянцкий, Биохимия, 24, 938, 1959.
14. А. С. Спирин, J. Mol. Biol., 2, 436, 1960.
15. А. С. Спирин, Биохимия, 26, 511, 1961.

PHYSICOCHEMICAL STUDY OF LOW POLYMER RIBONUCLEIC ACIDS IN SOLUTION

L. L. Kiselev, E. P. Rehbinder, L. Yu. Frolova

Summary

The change in shape of yeast S-RNA molecules has been investigated with respect to the electrolyte content, pH and temperature of the solution. For this purpose measurements were made of the reduced and intrinsic viscosities and of the specific optical rotation and the optical density of S-RNA solutions. It has been shown that molecules of low polymer ribonucleic acids may exist in solution in two clearly different conformations: a globular (compact) conformation and an unfolded (loose, uncoiled) conformation. The former is characterized by a minimal effective hydrodynamic volume and high content of hydrogen bonds. It exists in neutral solution of ionic strength 0.1 at 25°. This compact conformation is the more ordered one, possessing a considerable amount of helical structures. The loose conformation is characterized by a large hydrodynamic volume and by the absence of ordered (helical) regions. It exists at $\mu \leqslant 10^{-3}$, pH ~ 3 and elevated temperatures. The transition from the compact to the loose conformation bears the character of an «random-coil» transition. The macromolecular structure of S-RNA sharply differs from that of DNA and displays great similarity to the macromolecular structure of high polymer RNA in solution.