



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.32.04 + 577.23

ДЕНАТУРАЦИЯ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ ПРИ АДсорБЦИИ  
НА ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЕ

Будкер В. Г., Наумова Л. П.

Новосибирский институт органической химии СО Академии наук СССР

Ранее мы показали, что различные поли- и олигонуклеотиды адсорбируются на искусственных мембранах из фосфатидилхолина и суммарного митохондриального липида [1]. Адсорбция происходит в присутствии двухвалентных катионов  $Mg^{2+}$  или  $Ca^{2+}$  и подавляется одновалентными  $Na^+$  или  $K^+$ . Адсорбированный полинуклеотид оказывается на границе раздела полярной и неполярной фаз, что, несомненно, может сказаться на его вторичной структуре. Имеются данные, что в водном метанольном растворе различные фосфолипиды понижают температуру плавления ДНК [2-4].

В данной работе исследовано влияние адсорбции двухспиральных полинуклеотидов на липидной мембране на их вторичную структуру. Был получен комплекс полиуридилиловой кислоты с  $[^3H]$ пентааденилатом  $(A)_5$ . Соотношение  $poly(U) - (A)_5$  примерно 2 : 1. Температура плавления этого комплекса  $\sim 36^\circ$  [5]. Все эксперименты с ним проводили при  $4^\circ$ . Добавление к комплексу 4-кратного избытка нерадиоактивного  $(A)_5$  приводит к уменьшению радиоактивности, связанной с  $poly(U)$ , с 39110 (100%) до 25100 имп/мин (64% от исходной величины).

При добавлении к комплексу  $poly(U) - [^3H] (A)_5$  липосом из яичного фосфатидилхолина в присутствии  $Mg^{2+}$  происходит адсорбция нуклеотидного материала на мембранах. Последующее добавление к смеси  $NaCl$  до 0,5 М приводит к десорбции полинуклеотида. При этой процедуре в комплексе с  $poly(U)$  остается подавляющая часть радиоактивного полинуклеотида — 36850 имп/мин (95%). Если же адсорбцию комплекса на мембране проводить в присутствии 4-кратного избытка немеченого  $(A)_5$ , то после десорбции радиоактивность, связанная с  $poly(U)$ , уменьшается до 9130 имп/мин (23% от исходной величины), т. е. происходит полное изотопное разведение по олигонуклеотиду, находящемуся в комплексе с полинуклеотидом. Таким образом, при адсорбции комплекса  $poly(U) - [^3H] (A)_5$  на мембране в присутствии немеченого  $(A)_5$  резко облегчается обмен радиоактивного олигонуклеотида на нерадиоактивный. Этот результат можно объяснить, предположив, что при адсорбции на мембране происходит существенное снижение температуры плавления комплекса.

Аналогичные выводы можно сделать и из результатов опытов по гидролизу ДНК нуклеазой  $S_1$  из *Aspergillus oryzae*. Как известно, этот фермент не гидролизует двухспиральную ДНК [6]. Добавление в реак-

ционную смесь липосом из фосфатидилхолина приводит к резкому увеличению скорости гидролиза ДНК; при соотношении ДНК — липид 1 : 50 (моль/моль) скорость ферментативной реакции возрастает примерно в 25 раз и достигает 30 нмоль/мин. (Следует отметить, что в условиях реакции ДНК адсорбирована на мембранах.) Полученная скорость сопоставима со скоростью гидролиза ДНК, денатурированной нагреванием, нуклеазой  $S_1$  в присутствии липида.

Полученные результаты позволяют предположить, что при адсорбции полинуклеотидов на липидной мембране происходят структурные перестройки, подобные денатурации.

Адсорбция полинуклеотидов на липидной мембране происходит при соотношении двух- и одновалентных катионов, близком к физиологическому (см., например, [7]). Можно допустить, что в клетке полинуклеотиды или их фрагменты, не связанные с белками, могут прочно связываться с липидной частью мембраны. При этом, как следует из приведенных экспериментов, может происходить частичная денатурация полинуклеотидов. Представляется весьма вероятным, что такая денатурация может играть существенную роль в таких процессах, где частичное расплетение полинуклеотидов необходимо, например в репликации, транскрипции и рекомбинации. По-видимому, денатурация полинуклеотида при адсорбции на мембране необходима и при трансмембранном переносе полинуклеотидов, так как при расхождении цепей полинуклеотида может происходить его интеграция в мембрану.

### Экспериментальная часть

В работе использовали poly(U) (Reanal, Венгрия),  $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$  с уд. акт. 250 Ки/моль — продукт ЛМО «Изотоп» (СССР). Пентааденилат любезно предоставлен Г. Г. Каршовой (НИОХ).  $[^3\text{H}](\text{A})_5$  с уд. акт. 2 Ки/моль получали окислением олигонуклеотида  $\text{NaIO}_4$  и последующим восстановлением  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  [8]. Фосфатидилхолин из куриных яиц получали и очищали, как описано в работе [9], липосомы — как в [10]. Комплекс poly(U) —  $(\text{A})_5$  получали в 0,01 М трис-НСI (рН 7,5), содержащем 0,01 М  $\text{MgCl}_2$ . К 1 мкмоль poly(U) добавляли 1,5 мкмоль  $[^3\text{H}](\text{A})_5$ . В опытах с липосомами реакционная смесь содержала 5 мг липида. В опытах с нерadioактивным  $(\text{A})_5$  его количество составляло 6 мкмоль. Затем во всех случаях к смеси (0,2 мл) добавляли NaCl до концентрации 0,5 М и комплекс poly(U) —  $(\text{A})_5$  отделяли от несвязавшегося олигонуклеотида гель-фильтрацией на сефадексе G-25. Радиоактивность комплекса определяли в диоксановом сцинтилляторе на счетчике Mark II (Nuclear Chicago, США).

ДНК из спермы пеляди любезно предоставлена Соколенко А. А. (Институт цитологии и генетики СО АН СССР), нуклеаза  $S_1$  (КФ 3.1.4.21) предоставлена Пустошиловой Н. М. (СКТБ БАВ, Новосибирск). Гидролиз ДНК нуклеазой  $S_1$  проводили в 0,01 М ацетатном буфере (рН 4,6), содержащем 1 мМ  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , 0,01 М  $\text{MgCl}_2$  и разные количества липида. Концентрация ДНК в реакционной смеси составляла 1,3 мМ, концентрация липида менялась от 0 до 70 мМ, концентрация нуклеазы  $S_1$  — 280 ед. акт./мл. Реакционную смесь инкубировали 10 мин при 37°, после чего добавляли равный объем 1 М  $\text{HClO}_4$ , осадок отделяли центрифугированием и в аликвоте супернатанта определяли поглощение на 260 нм после разбавления 2 мл метилового спирта.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Budker V. G., Kazatchkov Yu. A., Naumova L. P. (1978) FEBS Lett., in press.
2. Manzoli F. A., Muchmore H. J., Bonora B., Sabioni A., Stefoni S. (1972) Biochim. et biophys. acta, 277, 251—255.

3. Manzoli F. A., Muchmore H. J., Bonora B., Capitani S., Bortoli S. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **340**, 1—10.
4. Capitani S., Maraldi N. M., Santi P., Martoni E., Manzoli-Guidotti H. (1977) *Boll. Soc. ital. biol. sper.*, **52**, 966—972.
5. Гриднева Н. И. (1974) Докт. дис. «Алкилирующие производные компонентов нуклеиновых кислот. Комплементарно адресованная модификация нуклеиновых кислот», с. 121, Новосибирск.
6. Sutton W. D. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **240**, 522—531.
7. Damadian R. (1971) *Biophys. J.*, **11**, 739—760.
8. Randerath K., Randerath E. (1969) *Anal. Biochem.*, **28**, 110—113.
9. Wells M. A., Hanahau D. J. (1969) *Biochemistry*, **8**, 414—424.
10. Kamp H., Wirtz K. (1974) in: *Methods in Enzymol.*, vol. XXXII, p. 140—146, Acad. Press, N. Y.— London.

Поступило в редакцию  
18.VII.1978

## DENATURATION OF POLYNUCLEOTIDES UPON THEIR ADSORPTION ON LIPID MEMBRANE

BUDKER V. G., NAUMOVA L. P.

*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch  
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

A study was made of the changes in secondary structure of double helix polynucleotides upon their adsorption on a lipid membrane. In the presence of phosphatidyl choline liposomes, [ $^3\text{H}$ ](A)<sub>5</sub> in its complex with poly(U) (2 : 1) acquires the capability of exchanging with nonradioactive oligonucleotide, and double helix DNA becomes susceptible to nuclease S<sub>1</sub> catalyzed hydrolysis. This allows to suggest the implication of denaturation-like structural transformations in polynucleotides which accompany their adsorption onto a lipid membrane.

---