

УДК 577.32

ИК СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ИОНОВ Cu^{2+} НА КОНФОРМАЦИОННОЕ СОСТОЯНИЕ ДНК

Ю.В. Коваль, Ю.П. Благой¹, В.В. Товстяк

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, 61077, г. Харьков, пл. Свободы, 4

¹Физико-технический институт низких температур им. Б.П. Веркина НАН Украины, 61103, г. Харьков, пр. Ленина, 47

Поступила в редакцию 11 сентября 2002 г.

Методом ИК спектроскопии изучено взаимодействие ионов Cu^{2+} (при $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]=0,2-0,8$) с молекулой ДНК в водных растворах ($[\text{P}]=6 \cdot 10^{-2} \text{M}$) в диапазоне температур $26-93^\circ \text{C}$. Показано, что ионы Cu^{2+} , связываясь с фосфатными группами молекулы ДНК, вызывают значительное увеличение интенсивности спектра поглощения в области колебаний сахара-фосфатной цепи, что свидетельствует о переходе ДНК в компактное состояние (в пределах В-формы). Однако, при соотношении $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] > 0,6$ происходит частичная денатурация ДНК. Проведено исследование действия ионов Cu^{2+} на устойчивость вторичной структуры ДНК к изменению температуры. Установлено, что температура перехода спираль-глобул ДНК повышается с увеличением концентрации ионов Cu^{2+} , причем эта зависимость имеет существенно нелинейный характер, что, по-видимому, определяется наложением эффектов, обусловленных связыванием Cu^{2+} с фосфатными группами и азотистыми основаниями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, ИК спектроскопия, ионы Cu^{2+} , компактизация ДНК, плавление ДНК.

Совместно с водой, ионы металлов стабилизируют структуру нуклеиновых кислот, определяя равновесие между различными формами вторичной структуры, влияют на переходы спираль-глобул [1]. Нуклеиновые кислоты, являющиеся в водном растворе полиионами, характеризуются высокими абсолютными значениями макромолекулярного электростатического потенциала с большой гетерогенностью поля вблизи поверхности молекулы, что обеспечивает условия для образования локальных центров связывания ионов [2]. Средство ионов к центрам связывания определяется значением потенциала и стерической доступностью этих центров, а также зарядом и размером ионов (с учетом гидратной оболочки), склонностью к образованию ковалентной связи.

По характеру взаимодействия с полиэлектролитом катионы в растворе можно разделить на две основные группы. К первой относятся ионы, принадлежащие к диффузному окружению нуклеиновой кислоты. Они образуют ионную атмосферу, которая может простираться на сотни ангстрем вокруг макромолекулярной цепи. Эти ионы сохраняют гидратные оболочки и вступают в электростатическое взаимодействие с полиионом, характеризующееся малыми временами релаксации ($10^{-7}-10^{-11}$ с).

Ко второй группе относятся ионы, образующие сравнительно устойчивые связи с макромолекулой (специфическое связывание). При специфическом связывании ионы находятся на характерном для химических связей расстоянии от акцепторных групп нуклеиновой кислоты (для двухвалентных металлов и фосфатных групп это расстояние порядка 3 \AA). Время жизни таких металлокомплексов составляет 10^{-7} и выше. Специфическое связывание, как правило, сильно влияет на стабильность структуры ДНК и может приводить к конформационным перестройкам.

Проблема взаимодействия ионов двухвалентных металлов с ДНК и ее компонентами была исследована различными экспериментальными и теоретическими методами. Было показано [3-5], что ионы Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} вызывают увеличение закрученности В-спирали ДНК. Предполагаемый механизм закручивающего действия ионов, вызывающего сужение узкого желобка макромолекулы, заключается в экранировании отрицательно заряженных фосфатных групп и уменьшении их кулоновского расталкивания. Связывание ионов Cu^{2+} с ДНК приводит к более значительным изменениям конформационного состояния ДНК чем при ее связывании с вышеуказанными ионами, что объясняется более сильной тенденцией Cu^{2+} к связыванию с азотистыми основаниями [2].

В работах [6-8] было показано, что под действием ионов Cu^{2+} , молекула ДНК может переходить в компактное состояние, вследствие возможного образования межнитевых координационных связей через ион металла.

В данной работе была поставлена цель исследовать концентрационные зависимости эффектов взаимодействия ионов Cu^{2+} с ДНК в водном растворе, и выяснить, как отражаются эти эффекты на устойчивости вторичной структуры ДНК к повышению температуры.

Для решения поставленных задач использовался метод ИК спектроскопии. Этот метод чувствителен к изменениям во вторичной структуре ДНК, и позволяет изучать связывание различных лигандов с молекулой ДНК в растворах, с концентрацией ДНК, близкой к ее локальной концентрации *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовалась ДНК тимуса теленка с молекулярной массой $1,9 \cdot 10^7$ Да, с содержанием белка менее 0,3% и гипохромным эффектом 37% на $\lambda=260$ нм. Подробно методы определения и очистки препаратов ДНК описаны в [9]. Концентрацию ДНК в растворе определяли спектрофотометрически [10] по значению молекулярной экстинкции при $\lambda=260$ нм, при этом концентрация фосфатов составила $6 \cdot 10^{-2}$ М - такая концентрация была подобрана, как оптимальная для получения наиболее удовлетворительных по интенсивности ИК спектров.

В процессе приготовления раствора ДНК, его подвергали центрифугированию для вытеснения остатков воздуха из волокон ДНК, после чего, объем раствора доводили буфером до заданного значения.

Растворы комплексов ДНК с ионами Cu^{2+} готовили непосредственно перед измерениями, путем прибавления раствора CuCl_2 в буфере к раствору ДНК (рН=7,0).

Для записи спектров растворов ДНК и ее комплексов с медью применяли флюоритовые разборные кюветы, выполненные по модели Фишмана [11]. Флюорит (CaF_2) не поглощает в исследуемой области спектра, практически не растворим в воде (0,00016 г/л), достаточно прочен и имеет показатель преломления, близкий значению показателя преломления воды. Толщина слоя раствора определялась величиной зазора измерительной кюветы и составила 62 мкм. Использование кювет с большей толщиной зазора делает трудно доступной для измерений область деформационных колебаний воды. Толщины зазоров кювет определяли по интерференции на пустой кювете, точность определения толщины не хуже 1%. Конструкция измерительной кюветы обеспечивала хорошую воспроизводимость по толщине слоя образца. Кювета сравнения меняла свою толщину в зависимости от силы прижатия, что позволяло компенсировать поглощение воды во всех измерениях. Компенсацию по воде производили в области $3650..3700 \text{ см}^{-1}$.

Измерения ИК спектров были выполнены на двулучевом спектрофотометре UR-20 (призма NaCl , щелевая программа 4).

Для достижения необходимой температуры образцов, кюветы помещали в термостатируемые камеры. Температуру в кювете измеряли медь-константановой термопарой, с точностью $0,1^\circ\text{C}$. Подробно метод измерения ИК спектров нуклеиновых кислот при разных температурах описан в работе [12].

Оптическую плотность D определяли методом базовой линии [13], за которую принимали значение D при построении общего спектра поглощения в области 1400 см^{-1} , где отсутствовали полосы поглощения. Измерения ИК спектров были выполнены на двулучевом спектрофотометре UR-20 (призма NaCl , щелевая программа 4). Все измерения дублировались и имели хорошую воспроизводимость.

Концентрации ионов Cu^{2+} были выбраны такие, чтобы можно было проследить возможные конформационные изменения в ДНК, вплоть до ее денатурации ($[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]=0,2 \div 0,8$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены ИК спектры ДНК и комплексов ДНК с ионами Cu^{2+} в области колебаний сахаро-фосфатной цепи ($1000-1400 \text{ см}^{-1}$). Из рис. 2, на котором изображены зависимости интенсивностей некоторых полос поглощения, видно, что с увеличением концентрации ионов Cu^{2+} , в интервале значений $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]$ от 0,3 до 0,6 происходит существенный рост интенсивности полос поглощения симметричных и асимметричных колебаний фосфатных групп (1088 см^{-1} и 1223 см^{-1}), а также полосы 1053 см^{-1} , связанной с валентными колебаниями дезоксирибозы и являющейся маркерной полосой для В-формы ДНК [14]. Увеличение интенсивностей полос поглощения сахаро-фосфатной цепи, по-видимому, связано с процессом компактизации ДНК [6,15]. О конденсации ДНК, в результате связывания с ионами двухвалентных металлов, говорится в работах [16,17].

Следует отметить, что увеличение интенсивности полос поглощения происходит именно в результате конформационных изменений в молекуле ДНК, так как при взаимодействии ДНК с ионами Na^+ , K^+ и Ca^{2+} заметного изменения интенсивности полос поглощения фосфатных групп не происходит [2]. В отличие от ионов Na^+ , K^+ и Ca^{2+} , ионы Cu^{2+} образуют межнитевые координационные связи между фосфатами [6,7], и, таким образом, переводят молекулу ДНК в компактную форму, что сопровождается сильной поляризацией связей и значительное увеличение поглощения в соответствующем участке ИК спектра [18].

Однако, если в диапазоне значений $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]$ от 0,2 до 0,6 переход ДНК в компактное состояние происходит в пределах В-формы, то при $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] > 0,6$ полоса 1053 см^{-1} смещается к 1065 см^{-1} , превращается в плечо и практически исчезает, полосы 1088 см^{-1} и 1223 см^{-1} смещаются к $1090-1093 \text{ см}^{-1}$ и 1226 см^{-1} , соответственно, а интенсивность ИК спектра резко падает. Таким образом, можно

предположить, что, при связывании ионов Cu^{2+} с молекулой ДНК, имеют место два эффекта: компактизация ДНК и некоторое разупорядочение ее вторичной структуры. Для того, чтобы выяснить, как влияют ионы Cu^{2+} на стабильность вторичной структуры ДНК, нами были получены ИК спектры комплексов ДНК с ионами Cu^{2+} в водном растворе, при различных значениях $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]$, в интервале температур $26 \div 93^\circ \text{C}$.

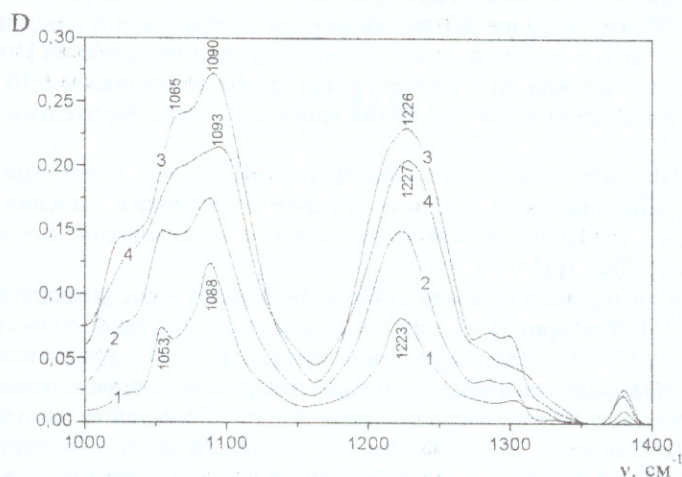


Рис. 1. ИК спектры водных растворов ДНК (1) и ее комплексов с Cu^{2+} (2-4) при различном соотношении $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]$: 0,4 (2), 0,6 (3), 0,8 (4); концентрация ДНК – 0,06 М фосфора; температура 26°C

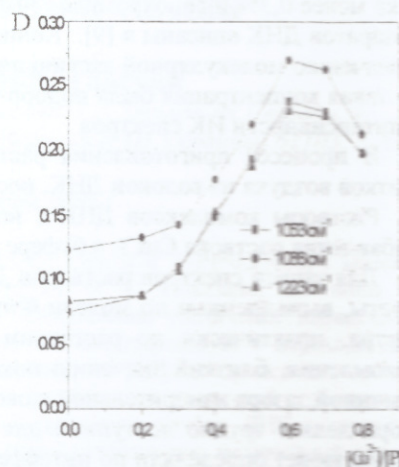


Рис. 2. Зависимости интенсивности полос поглощения от содержания ионов Cu^{2+} в растворе (указано начальное положение полос в спектре)

С ростом температуры, межмолекулярные связи, удерживающие две комплементарные цепи, рвутся, что отражается на ИК спектре ДНК: существенное падение интенсивности всех полос поглощения сахара-фосфатного остова со сдвигом максимумов поглощения, сами пики уширяются, спектр принимает размытый вид. По перечисленным признакам можно определить температурный интервал перехода спираль-клубок и среднюю температуру плавления ДНК, что и было нами сделано для значений $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] = 0,2 \div 0,7$ (на рис. 3, в качестве примера, изображены температурные зависимости интенсивности полосы 1053 cm^{-1} при различном $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]$).

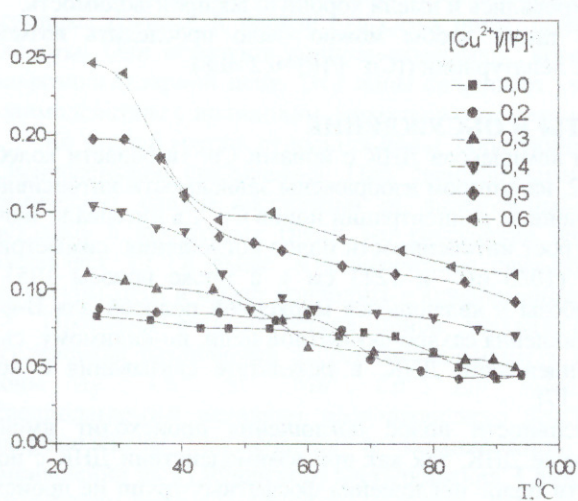


Рис. 3. Интенсивность полосы валентных колебаний дезоксирибозы (начальное положение в спектре 1053 cm^{-1}) при разном $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]$

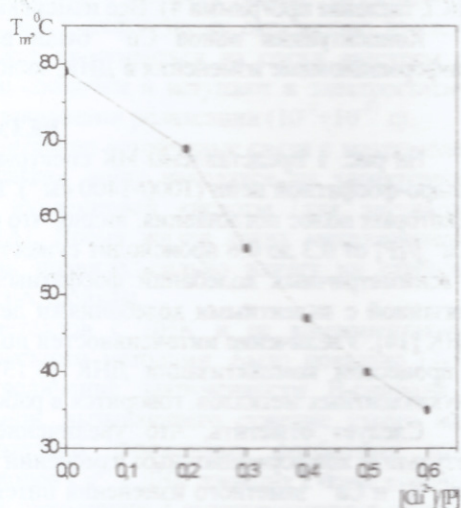


Рис. 4. Температура плавления ДНК (T_m) при различном содержании Cu^{2+} в растворе

Из графика, изображенном на рис. 4, видно, что температура плавления ДНК (T_m), при увеличении содержания ионов Cu^{2+} , смещается в область низких значений, вплоть до комнатной температуры, при $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] > 0,7$ (на графике не показано). Изменение T_m , при этом, имеет замство нелинейный характер: при $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] < 0,2$ уменьшение T_m не такое резкое, как при больших значениях, что свидетельствует в

пользу того, что ионы Cu^{2+} в первую очередь связываются преимущественно с фосфатными группами, расположенными на поверхности молекулы ДНК, а после некоторого критического значения концентрации ионов Cu^{2+} , начинают преобладать эффекты, обусловленные связыванием Cu^{2+} с азотистыми основаниями. В пользу этого предположения, можно привести работу [19], в которой говорится о возможности образования межнитевых комплексов Cu^{2+} между гуанозином и цитозином с поворотом гуанозина вокруг гликозидной связи, что приводит к дестабилизации вторичной структуры ДНК и понижению температуры плавления комплекса.

ВЫВОДЫ

В водных растворах ДНК ионы Cu^{2+} , в исследованных концентрациях, взаимодействуют с молекулой ДНК, и вызывают ее компактизацию. При соотношении $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] > 0.6$ ионы Cu^{2+} приводят к частичной денатурации ДНК уже при комнатных значениях температуры. Температура плавления комплексов ДНК с Cu^{2+} понижается с увеличением содержания ионов Cu^{2+} в растворе. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что ионы Cu^{2+} , взаимодействуя с молекулой ДНК, вызывают ее компактизацию, и, в тоже время, дестабилизируют ее вторичную структуру, что выражается в падении температуры плавления ДНК. Причем, зависимость $T_{\text{пл}}$ ДНК от содержания ионов Cu^{2+} в растворе не монотонна: существенное падение $T_{\text{пл}}$ происходит при соотношении $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] > 0.2$, что обусловлено наложением эффектов, связанных с взаимодействием ионов Cu^{2+} с фосфатными группами и азотистыми основаниями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987.-584с.
2. Благой Ю.П., Галкин В.Л., Гладченко Г.О., Корнилова С.В., Сорокин В.А., Шкорбатов А.Г. Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах. Киев: Наук. думка, 1991. 272с.
3. Schultz J., Ruppecht A., Song Z., Pisky J., Nordenskiöld L., Lahajnar G. // *Bioph. J.* 1994. V.66. P.810-819
4. Корнилова С.В., Сорокин В.А., Благой Ю.П., Валеев В.А., Арутюнян С.Г. Изучение взаимодействия ДНК с ионами двухвалентных металлов // *Мол. биология.* 1991. Т.25. Вып.3. С.648-657
5. Blagoi Yu.P., Kornilova S.V., Shkorbatov A.G., Egupov S.A. // *Stud. Biophysica.* 1985. V.108. №1. P.17-24
6. Hackl E., Kornilova S., Kapinos L et. al. // *J. Mol. Struct.* 1997. V.408/409. P.229-232
7. Hackl E., Kornilova S., Blagoi Yu. // *Metal Ions in biology and medicine.* 1998. V.5. P.74-79
8. Е.В. Хакл, С.В. Корнилова, Ю.П. Благой // *Біофізичний вісник.* 1998. №1. Ст.62-70
9. Ахрем А.А., Егорова Е.П., Егоров А.С. и др. // *Биополимеры и клетка.* 1989. Вып.5. №5. С.44-48
10. Müller W., Crothers D.M. // *Eur. J. Biochem.* 1975. V.54. P.267-277
11. Fishman E. // *Appl. Opt.* 1962. №1. 493
12. Малеев В.Я., Семенов М.А. // *Биофизика.* 1971. Т.16. Вып.3. С.389-397
13. Бабушкин А.А., Бажулин П.А., Королев Ф.В. и др. Методы спектрального анализа. М.: МГУ, 1962. - 273с
14. Taillandier E., Liquier J. // *Methods in enzymol.* 1990. V.211. P.307-335
15. Kornilova S., Hackl E., Kapinos L., et. al. // *Acta Biochim. Polon.* 1998. V.45. №1. P.107-117
16. Ma C., Bloomfield V. // *Biophys. J.* 1994. V.67. P.1678-1681
17. Benbasat J.A. // *Biochemistry.* 1984. V.23. P.3609-3619
18. Zundel G. Proton polarizability of hydrogen bonds. Series of lectures. Zalzburg. 1997. 250p.
19. Sissoeff J., Grisvaldt J., Cuile E. // *Progr. Biophys. and Mol. Biol.* 1976. V.31. №2. P.165-199