

УДК 577.323.425

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ Mg^{2+} НА КОНФОРМАЦИОННОЕ РАВНОВЕСИЕ ТРОЙНОЙ СПИРАЛИ ПОЛИ I · ПОЛИ A · ПОЛИ I В РАСТВОРЕ

В.А. Сорокин, В.А. Валеєв, Е.А. Андрусь, Г.О. Гладченко, Ю.П. Благой

Физико-технический институт низких температур им. Б.П. Веркина

НАН Украины, просп. Ленина, 47, Харьков, 61103

Поступила в редакцию 20 жовтня 2003

Методом дифференциальной УФ-спектроскопии изучена температурная зависимость конформационного равновесия в водных растворах полиI·полиA·полиI (A2I), содержащих ионы Na^+ (0,1M) и Mg^{2+} ($10^{-5} \pm 0,005$ M). Во всей области концентраций ионов Mg^{2+} вызванное нагреванием разрушение тройной спирали A2I представляет собой переход $A2I \rightarrow A+I+I$ (переход $3 \rightarrow 1$). Повышение температуры этого перехода при увеличении содержания ионов Mg^{2+} удовлетворительно описывается теорией "лигандов". Это обстоятельство позволило оценить константу связывания ионов Mg^{2+} с A2I ($K=1250$ M⁻¹ при нулевой степени связывания). Получено аналитическое выражение, устанавливающее связь между значениями констант связывания магния с трех (K_3) - и одноцепочечными (K_1) полинуклеотидами и величинами линейной плотности заряда на них. Малое различие между значениями K_3 для A2I и A2U и K_1 для поли A, поли I и поли U обусловлено подобием структуры соответствующих полинуклеотидов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полинуклеотиды, термостабильность, ионы металлов

Среди трехцепочечных структур, использование которых возможно для лечения вирусных и онкологических заболеваний на геномном уровне [1,2], особый интерес представляют трехцепочечные спирали, содержащие гипоксантин. Это основание связывается с различными дуплексами азотистых оснований при физиологических условиях, поэтому его участие в образовании триплексов должно устранять зависимость их стабильности от кислотности раствора. Это обстоятельство, как и конформационная возможность замены AU-пар на AI-пары, могут быть использованы при решении задач геномной инженерии [3,4]. Ранее [5] нами было изучено конформационное равновесие трехцепочечной полиI·полиA·полиI (A2I) в широком диапазоне концентраций ионов Na^+ . Представляло интерес получить диаграмму термостабильность полиI·полиA·полиI (A2I) – концентрация ионов Mg^{2+} . Эти ионы биологически функциональны: являются компонентами внутри- и висклеточной жидкости, необходимыми для нормального функционирования клеток и их генетического аппарата [6].

Таблица 1

Структурные характеристики полинуклеотидов [6].

	тип спирали	h, Å	b, Å	α , град
A2I	A	36,2	1,1	32,7
A2U	A'	36,5	1,0	30
полиA	A	25,4	2,82	40
полиU	клубок	-	4,3 [7]	-
полиI	клубок	-	3,6±0,2 [5]	-

h – шаг спирали; b – расстояние между проекциями отрицательных зарядов на ось спирали; α – угол спирального вращения.

Структура A2I во многом подобна структуре другого трехспирального полинуклеотида полиU·полиA·полиU (A2U) (табл.1). Однако, в отличие от уотсон-криковской антипараллельной спирали, образованной парами A-U₁ (рис. 1), у которых расстояние между гликозидными связями составляет 10,4 Å [6], это расстояние в парах A-H₁ (рис. 1), также формирующими антипараллельную спираль, существенно больше (~13 Å [4]). Поскольку для A2U уже получены данные о её конформационном равновесии в присутствии ионов Ni^{2+} и Mg^{2+} [8,9], представляло интерес выяснить, как различие и сходство в структуре A2U и A2I влияют на их термостабильность и термодинамику кулоновского взаимодействия с ионами Mg^{2+} .

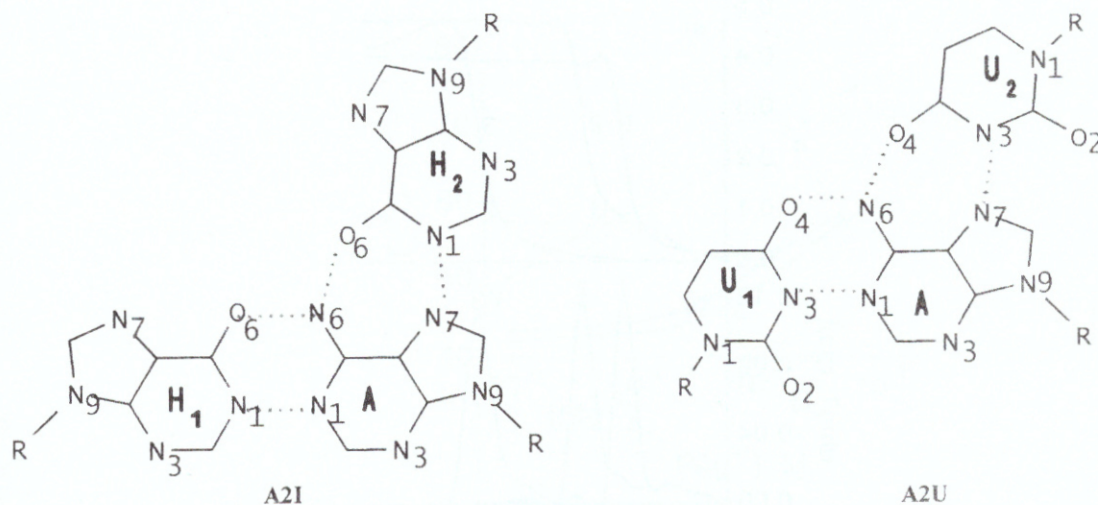


Рис. 1. Структуры триплетов трехцепочечных A2I и A2U по данным рентгеноструктурного анализа [4,7].
 H - гидоксантин, U - урацил, A - аденин.
 Пары A-U₂ и A-H₂ являются хугстиновскими, A-U₁ и A-H₁ - уотсон-криковскими

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Калиевые соли поли A и поли I (Sigma Chemical Company) растворяли в 0,001M какодилатного буфера (pH7), в который добавляли необходимое количество NaCl. Общая концентрация ионов Na^+ в растворе составляла 0,1M. Отношение концентрации поли A к концентрации поли I составляло 1:2. Процесс образования мультицепочечных спиралей из одноцепочечных может быть достаточно длительным [10,11], поэтому раствор поли A и поли I, имевший суммарную концентрацию фосфора полинуклеотидов (P) $(0,8 \div 1) \cdot 10^{-2}$ M и ионов Na^+ ($[Na^+]$) 0,1M, выдерживали в течение 120 часов при 4°C.

Перед измерениями раствор разбавляли при комнатной температуре до концентрации $P = (2 \div 3) \cdot 10^{-5}$ M. Величину P определяли по молярному коэффициенту экстинкции $\epsilon = 6700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ при $\lambda = 249 \text{ nm}$ [5,11,12]. Добавляемую концентрацию ионов Mg^{2+} вводимых в раствор в виде дважды перекристаллизованных солей NaCl и $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ квалификации "особо чистые" (Реахим), определяли по весу. Содержание ионов Mg^{2+} дополнительно контролировали комплексометрическим методом. Ошибка определения P не превышала 3% [11,12], ионов Mg^{2+} - 0,5%.

Зависимость изменения оптической плотности растворов от температуры ($\Delta A(T)$) при различном содержании ионов Mg^{2+} измеряли на спектрофотометре Specord UV VIS (Carl Zeiss, Jena), соединенном с персональным компьютером, который осуществлял запись кривых плавления A2I в форме $h(T) = \Delta A(T) / A_{T_0}$, где A_{T_0} - оптическая плотность раствора в максимуме поглощения A2I (39900 cm^{-1}) при $T_0 = (20 \pm 2)^\circ \text{C}$. Компьютер осуществлял также запись производных $dh(T)/dT$. Во всех случаях эталонную кювету термостатировали в пределах $\pm 0,5^\circ \text{C}$, рабочую - нагревали со скоростью 0,25 град/мин. При температурах, во всяком случае соответствующих полному распаду A2I на одноцепочечные неупорядоченные клубки ($92 \div 96^\circ \text{C}$), регистрировали спектр $\Delta A_h(\nu)$. Зависимость $\Delta A_h(\nu)$ нормировали на концентрацию фосфора: $\Delta \epsilon_h(\nu) = \Delta A_h(\nu) / P$.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нагрев A2I при 0,1M Na^+ приводит только к одному кооперативному конформационному переходу (рис. 2), который, по-видимому, является переходом $3 \rightarrow 1$ ($A2I \rightarrow A+I+I$) [5]. Форма кривых плавления A2I в присутствии ионов Mg^{2+} подобна наблюдаемой в их отсутствие (рис.2). Это позволяет предположить, что плавление A2I в растворах, содержащих магний, также является переходом $3 \rightarrow 1$. Отсутствие переходов $3 \rightarrow 2$ и $2 \rightarrow 1$ подтверждается также отсутствием при нагревании изменения поглощения

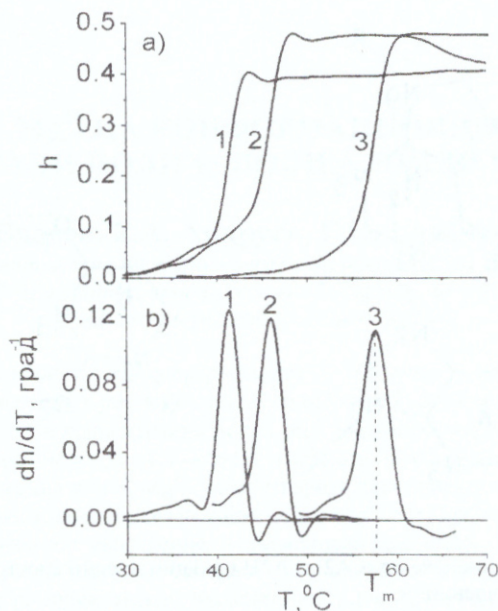


Рис. 2. Типичные кривые плавления А2I (а) и их производные (б) в присутствии ионов Mg^{2+} ($0,1 M Na^+$).
1 - $[Mg^{2+}] = 0$; 2 - $3 \cdot 10^{-4} M Mg^{2+}$; 3 - $0,005 M Mg^{2+}$.

растворов А2I при $\nu = \nu_1 = (35,8 \pm 0,2) \cdot 10^3 \text{ см}^{-1}$, где ν_1 - волновое число, соответствующее изобестической точке на спектрах $\Delta \epsilon_{h'}(\nu)$ (рис. 3). Во всем изученном интервале концентраций ионов Mg^{2+} производная $dh(T)/dT$, характеризующая кооперативность процесса, та же, что и в присутствии ионов Na^+ [5] и составляет величину $(0,12 \pm 0,02) \text{ град}^{-1}$. Соответственно полный интервал этого конформационного перехода составляет $(3 \pm 4,5)^\circ C$. Эти параметры перехода близки к наблюдаемым для перехода $3 \rightarrow 1$ А2U [8, 9, 13]. Хотя в температурной области, предшествующей переходу $3 \rightarrow 1$, наблюдается небольшой

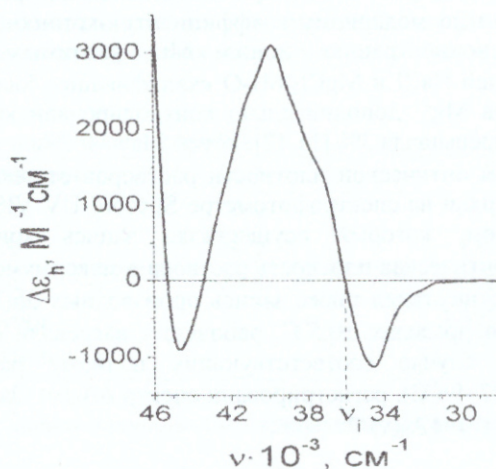


Рис. 3. Изменение спектра поглощения раствора А2I при нагреве от $25^\circ C$ до $92^\circ C$ ($0,1 M Na^+$, $0,005 M Mg^{2+}$).
Форма спектров $\Delta \epsilon_{h'}$ не зависит от концентрации ионов Mg^{2+} .

гиперхромизм поглощения, характеризуемый производной $dh(T)/dT \leq 0,01 \text{ град}^{-1}$ (рис. 2), он обусловлен, по-видимому, подплавлением трехпечечных спиралей с концов [14, 15] или плавлением спиральных участков одноцепочечной полиА, некоторое количество которой могло сохраняться в процессе образования А2I из одноцепочечных полинуклеотидов.

Подобно ионам Na^+ [5] ионы Mg^{2+} повышают термостабильность А2I (рис. 4). Поскольку ионы Mg^{2+} не изменяют спектры поглощения А2I, полиI и полиА, то возрастание T_m обусловлено взаимодействием магния с фосфатными группами А2I и одноцепочечных полинуклеотидов, образующихся в результате ее плавления.

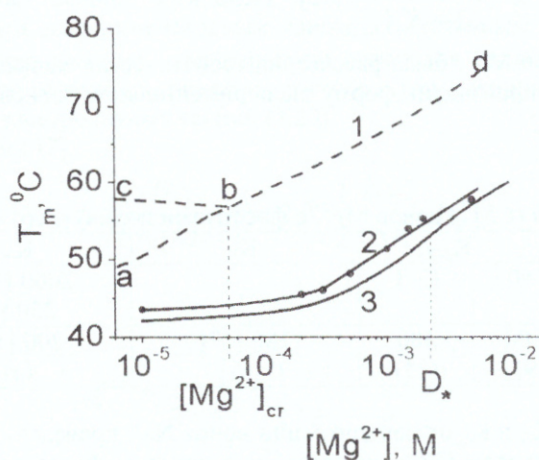


Рис. 4. Зависимость температур конформационных переходов A2U (1) [9] и A2I (2) от концентрации ионов Mg^{2+} в растворе. 3 - теоретическая зависимость $(T_m)_{31}$ A2I, рассчитанная по формулам (1) и (2) теории лигандов [15] при постоянном значении $K_{A2I}=750 M^{-1}$. D_* - концентрация, соответствующая точке перегиба на этой зависимости. ab - $A2U \rightarrow AU+U$ ($3 \rightarrow 2$); cb - $AU+U \rightarrow \Lambda+U+U$ ($2 \rightarrow 1$); bd - $A2U \rightarrow \Lambda+U+U$ ($3 \rightarrow 1$); 2 - $A2I \rightarrow \Lambda+I+I$ ($3 \rightarrow 1$).

Согласно полученным данным (рис. 4), диаграммы конформационного равновесия A2I не имеют «критических» точек не только в присутствии ионов Na^+ [5], но и ионов Mg^{2+} . Возможная причина различия этих диаграмм A2U и A2I состоит в следующем. Хугстиновские пары в A2U менее стабильны, чем уотсон-криковские. Поэтому при нагревании от A2U прежде всего отделяется нить поли U_2 (рис. 1), параллельная (или антипараллельная [16]) полиA. Образовавшаяся при этом антипараллельная двойная спираль, сформированная уотсон-криковскими парами AU₁, является стабильной при $[Mt] < [Mt]_{cr}$ (рис. 4). По-видимому, у A2I стабильности хугстиновских (AH_2) и уотсон-криковских (AH_1) пар примерно одинаковы из-за большого расстояния между гликозидными связями в паре AH_1 . Поэтому при нагревании от A2I одной из нитей полиI приводит к одновременному отделению другой (переход $3 \rightarrow 1$). Малая стабильность обеих пар триплета A2I проявляется также в том, что $(T_m)_{31}$ A2I на $(13 \div 19)^\circ C$ ниже $(T_m)_{31}$ A2U в растворах, содержащих ионы Na^+ [5] и Mg^{2+} (рис. 4). Еще больше у A2U и A2I отличаются энтальпии перехода $3 \rightarrow 1$: во втором случае ΔH_{31} на 30% меньше, чем в первом (табл. 2).

Таблица 2

Энтальпия и начальная температура переходов $3 \rightarrow 1$ в A2I и A2U ($0.1M Na^+$; $[Mg^{2+}] = 0$).

	$(T_m)_{31}$, К	$3 \cdot \Delta H$, ккал/моль триплет
A2I	315	9.8 ± 0.5 [11]
A2U	333 [5]	12.7 [13]

Ранее нами было показано, что теория лигандов [15] удовлетворительно описывает вызванное ионами Mg^{2+} изменение температур различных конформационных переходов в мультицепочечных полинуклеотидах (см., например, [8,9]).

Можно считать, что стехиометрия комплексов ионов Mg^{2+} с тройными и одноцепочечными полинуклеотидами $n=0.5$ [8,9]. Поэтому зависимость изменения температуры перехода $3 \rightarrow 1$ от концентрации свободных ионов Mg^{2+} (A_f) имеет вид [9].

$$\delta T_m = T_m - T_{m_0} = \frac{RT_{m_0} T_m}{3\Delta H} \ln \frac{1 + K_{A2I} A_f}{(1 + K_A A_f)^{1/3} (1 + K_I A_f)^{2/3}} \quad (1)$$

Здесь T_{m_0} и ΔH соответственно температура перехода и его энтальпия, приходящаяся на нуклеотид, в отсутствие лигандов. K - константы связывания ионов Mg^{2+} с соответствующими полинуклеотидами.

Уравнение материального баланса при $T = T_m$:

$$D \equiv [Mg^{2+}] = A_f + P \left(\frac{1}{2} C_{A2I} n_{A2I} + \frac{1}{6} C_A n_A + \frac{1}{3} C_I n_I \right) \quad (2)$$

где степень связывания $C = \frac{KA_f}{1+KA_f}$ [15]. Используя данные табл.2 и 3 и полагая в первом приближении, что $K_{A2I} = 750 \text{ M}^{-1}$, была рассчитана теоретическая зависимость T_m A2I от концентрации ионов Mg^{2+} . Её форма воспроизводит форму экспериментальной зависимости (рис.4). Количественное различие составляет $\sim 2.5^{10}C$.

Таблица 3

Константы связывания (в M^{-1}) ионов Mg^{2+} с фосфатами полинуклеотидов при 0.1 M Na^+ .

K_{A2I}		K_{A2I}^*		K_I	K_A	K_U
C=0	C=1	C=0	C=1			
					2000 [17]; 250 [9]	65 [17]; 330 [9]
1250 (*)	600 (*)	1000 [9]	480 (**)	280 [17] (a)	200 [18] (a)	250 [18] (a)

Анализ зависимости K_A и K_U от концентрации ионов Na^+ , проведенный в [9], показал, что значения K_A и K_U , найденные Кракауэром [18], являются, по-видимому, более корректными, чем определенные Диблером [17]. (*) - получено в настоящей работе; (a) – значения K , использованные при расчете зависимости K_{A2I} (C_{A2I}) (рис. 5); (**) - определено в предположении, что для A2U, как и для A2I, $\gamma = -0.32$.

По формулам (1) и (2) мы рассчитали зависимость K_{A2I} от C_{A2I} (рис.5), учет которой дает полное совпадение экспериментальной и теоретической зависимостей T_m A2I от $[Mg^{2+}]$. Согласно рис.5, связывание ионов Mg^{2+} с фосфатами A2I антикооперативно ($\gamma = d \log K / dC = -0.32$), что обусловлено электростатическим отталкиванием между ионами, связанными с полимером и ионами, адсорбируемыми им из раствора [19].

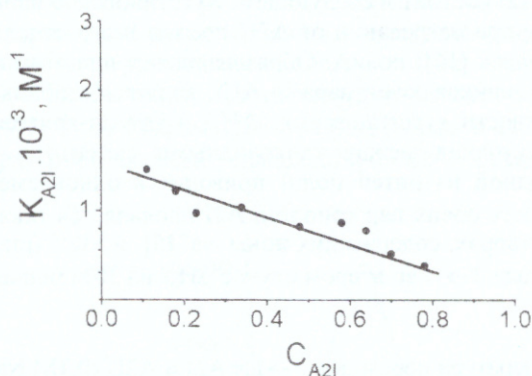


Рис. 5. Зависимость константы связывания A2I с ионами Mg^{2+} от степени связывания, рассчитанная по формулам (1) и (2) при условии равенства теоретических и экспериментальных значений δT_m во всей изученной области концентраций ионов Mg^{2+} .

Согласно [20,21], константы связывания ионов Mg^{2+} с дианионами нуклеотидов UMP, AMP и IMP (K_{NMP}) составляют величину $(40 \pm 6) \text{ M}^{-1}$. Т.о. константы связывания ионов Mg^{2+} с одноцепочечными полинуклеотидами, будучи в (5 ± 6) раз меньше констант связывания с трехцепочечными спиральями (табл.3), примерно во столько же раз больше K_{NMP} . По-видимому, причиной последнего является суперпозиция силовых полей в полинуклеотидах, приводящая к росту (по сравнению с отдельными нуклеотидами) молекулярного электростатического потенциала на атомах кислорода фосфатных групп [22].

Как видно из рис.4, для A2I и A2U производные $\varphi_e = \frac{dT_m}{d \ln[Mg^{2+}]}$ в области перехода $3 \rightarrow 1$ отличаются не более, чем на 20%. На такую же величину для этих полинуклеотидов отличаются также производные $\mu_e = \frac{dT_m}{d \log[Na^+]}$ ($\mu_{A2I} = (21.9 \pm 1)^{10}C$ [5], $\mu_{A2U} = 26^{10}C$ [7]). С другой стороны, различия между значениями констант связывания ионов Mg^{2+} с A2I и A2U и между величинами констант связывания с одноцепочечными полинуклеотидами (табл.3) также невелики и находятся в пределах

ошибки их определения (~30%). Можно попытаться выяснить физическую природу близости этих параметров для A2I и A2U.

Согласно многочисленным экспериментальным данным, полученным для переходов 2→1, 3→2, а также 3→1 в различных полинуклеотидах, температуры переходов являются линейными функциями логарифма концентрации одновалентных ионов в растворе (см., например [5,7]). Эти результаты согласуются с выводами полиэлектролитных теорий [7,23].

Согласно теории Маннинга [7],

$$\mu_r = \frac{dT_m}{d \log[Me^+]} = 2,3 \cdot \frac{1}{2} \frac{RT_m^2}{\Delta H} \Delta \xi^{-1} \quad (3)$$

Для перехода 3→1

$$\Delta \xi^{-1} = \frac{2}{3} \cdot \frac{1}{\xi_I} + \frac{1}{3} \cdot \frac{1}{\xi_A} - \frac{1}{\xi_{A2I}} \quad (4)$$

где ξ_I , ξ_A и ξ_{A2I} — линейные плотности отрицательного заряда на поверхности соответственно одноцепочечных поли I, поли A и трехцепочечной A2I. $1/\xi = b/l_B$, где b — расстояние между проекциями заряда на ось полимерной нити, а $l_B = 7\text{Å}$ — длина Бьеррума в воде при комнатной температуре [23].

Из формул (3) и (4) следует, что

$$\tau_r = \frac{(\mu_r)_{A2I}}{(\mu_r)_{A2U}} = \left[\frac{(T_{m_0})_{A2I}}{(T_{m_0})_{A2U}} \right]^2 \cdot \left[\frac{\Delta H_{A2U}}{\Delta H_{A2I}} \right] \cdot \left[\frac{\Delta \xi^{-1}_{A2I}}{\Delta \xi^{-1}_{A2U}} \right] = a \cdot r \cdot d \quad (5)$$

Согласно данным табл.2 и 4, произведение $a \cdot r \cdot d = 0,89 \cdot 1,3 \cdot 0,83 = 0,96$. Т.е. для перехода 3→1 значения производных от T_m по логарифму концентрации ионов Na^+ для A2U и A2I действительно должны быть одинаковы. Экспериментальное значение $\tau_e = (\mu_e)_{A2I}/(\mu_e)_{A2U} = 0,84 \pm 0,04$ несколько меньше. Однако, это отличие, возможно, связано с экспериментальными ошибками в определении μ_r .

Зависимость T_m A2I от $\log[Mg^{2+}]$, описываемая формулой (1), является нелинейной. Однако, она должна быть близка к линейной в окрестности точки перегиба, соответствующей концентрации D_* , в которой вторая производная от δT_m по $\log D$ обращается в нуль.

Представим формулу (1) в более простом виде. Поскольку K_A мало отличается от K_I (табл.3), можно заменить K_A и K_I на $K_1 = \sqrt{K_A \cdot K_I}$. (Для A2U $K_1 = \sqrt{K_A \cdot K_U}$.) В области изменения T_m полная концентрация ионов Mg^{2+} на порядок больше P , поэтому можно считать, что $A_1 \approx D$. Таким образом, формула (1) принимает вид:

$$\delta T_m = B \ln \frac{1 + K_3 D}{1 + K_1 D} \quad (6)$$

где $B = RT_{m_0}^2 / 3\Delta H$, а $K_3 \equiv K_{A2I}$.

Обозначив $\ln D = x$, получим выражения для первой и второй производных от T_m по x

$$\varphi_r = \frac{dT_m}{dx} = B \frac{d}{dx} \left[\ln \frac{1 + K_3 D}{1 + K_1 D} \right] = BD \left[\frac{K_3 - K_1}{(1 + K_3 D)(1 + K_1 D)} \right] \quad (7)$$

$$\frac{d^2 T}{dx^2} = \frac{K_3 e^x}{(1 + K_3 e^x)^2} - \frac{K_1 e^x}{(1 + K_1 e^x)^2} = D \left[\frac{(\sqrt{K_3})^2}{(1 + K_3 D)^2} - \frac{(\sqrt{K_1})^2}{(1 + K_1 D)^2} \right] \quad (8)$$

Приравняв вторую производную к нулю, получаем

$$D_* = \frac{1}{\sqrt{K_1 \cdot K_3}} \quad (9)$$

При $D = D_*$ выражение для φ_r принимает простой вид.

$$\varphi_i = \varphi_* = \frac{dT_m}{dx} \Big|_{D_*} = B \left(-\frac{1}{1+K_3 D_*} + \frac{1}{K_1 D_*} \right) = BE, \quad (10)$$

где $E = (\sqrt{K_3} - \sqrt{K_1}) / (\sqrt{K_3} + \sqrt{K_1})$.

Из формулы (10) следует, что для ионов Mg^{2+} отношение производных $F_i = (\varphi_{A2I} / \varphi_{A2U})$ имеет ту же форму, что и отношение $\tau = (\mu_{A2I} / \mu_{A2U})$ для ионов Na^+ (формула (5))

$$F_i = a \cdot r \cdot f = a \cdot r \cdot \frac{E_{A2I}}{E_{A2U}} \quad (11)$$

Можно отметить, что приравняв φ_e к φ_* , получаем, что отношение $f/d=1$ в пределах ошибки определения этих величин ($f=0.86$; $d=0.82 \pm 0.06$). Это означает, что различие в связывании ионов Mg^{2+} с A2I и A2U определяется, как и в случае ионов Na^+ , различием линейных плотностей зарядов на этих полинуклеотидах. Этот неочевидный результат представляется вполне естественным в силу того, что взаимодействие ионов щелочных и щелочно-земельных металлов с фосфатами полинуклеотидов является чисто кулоновским.

Из формул (3) и (10) следует, что

$$\frac{\mu_i}{2,3\varphi_*} = \frac{3 \Delta \xi_i^{-1}}{2 E} \quad (12)$$

Согласно (12), отношение $\mu_i / 2,3\varphi_*$ для A2U и A2I равно соответственно 3.1 и 2.2. Эти значения совпадают с полученными в опыте величинами $\mu_e / 2,3\varphi_e$ (3.2 для A2U и 2.2 для A2I). Как видно из табл.4, различие между линейными плотностями заряда на одноцепочечных полинуклеотидах разного

Таблица 4

Параметры, характеризующие распределение зарядов на полинуклеотидах и его изменение при переходе $3 \rightarrow 1$ ($\Delta \xi_i^{-1}$).

ξ_i^{-1} [5]	ξ_{A}^{-1}	ξ_{U}^{-1}	ξ_{A2I}^{-1}	ξ_{A2U}^{-1}	$\Delta \xi_{A2I}^{-1}$ [5]	$\Delta \xi_{A2U}^{-1}$ [5]
0.53±0.03	0.40 [8]	0.61 [9]	0.16 [8]	0.144 [8]	0.326±0.02	0.395

ξ_i - линейная плотность заряда;

сорта, как и различие между значениями ξ_{A2I} и ξ_{A2U} , достаточно мало. Поэтому можно положить для простоты, что $\xi_A \approx \xi_U \approx \xi_{A2I} \approx \xi_{A2U}$, а $\xi_{A2I} \approx \xi_{A2U} \approx \xi_3$. В этом случае формула (12) принимает вид

$$\left(\frac{\sqrt{K_3} - \sqrt{K_1}}{\sqrt{K_3} + \sqrt{K_1}} \right) \cdot S = \xi_1^{-1} - \xi_3^{-1} \quad (13)$$

где S- постоянная для данного полинуклеотида.

Из (13) следует, что

$$\frac{K_3}{K_1} = \left[\frac{2S}{S - (\xi_1^{-1} - \xi_3^{-1})} - 1 \right]^2 \quad (14)$$

Формула (14) делает очевидной связь между константами ассоциации ионов Mg^{2+} с фосфатами полинуклеотидов и линейной плотностью зарядов на них. Из этой формулы следует, что различие между линейными плотностями зарядов на одно- и трехцепочечном полинуклеотидах определяет величину отношения их констант связывания с ионами Mg^{2+} .

Формулы (10) - (14) строго выполняются только при $D=D_*$. Однако, как видно из рис. 4, теоретическая зависимость $T_m(\log[Mg^{2+}])$, близка к линейной в довольно широком интервале концентраций магния. Существенно, что в этом интервале, производные $dT_m/d\log[Mg^{2+}]$ для экспериментальной и теоретической зависимостей практически одинаковы.

В целом можно отметить, что сравнительно небольшие отличия между значениями K_{A2I} и K_{A2U} с одной стороны, а также между значениями K_A , K_I и K_U с другой (табл. 3), обусловлены близостью основных параметров, характеризующих структуру и конформацию этих полинуклеотидов (табл. 1).

ВЫВОДЫ

1. Впервые получена зависимость термостабильности A2I от концентрации ионов Mg^{2+} ($10^{-5} \pm 0,005$ М). Показано, что при нагревании A2I в присутствии этих ионов имеет место только конформационный переход $A2I \rightarrow A+I+I$ (переход 3 \rightarrow 1).
2. Используя теорию "лигандов", впервые определена зависимость константы связывания ионов Mg^{2+} с A2I от степени связывания.
3. Получено аналитическое выражение, согласно которому отношение констант связывания ионов Mg^{2+} с мультицепочечными и одноцепочечными полинуклеотидами определяется различием между значениями линейных плотностей зарядов на их поверхности.
4. Близость основных параметров, характеризующих структуру A2I и A2U с одной стороны, и конформацию одноцепочечных полиА, полиI и полиU с другой, является причиной малого отличия значений констант связывания ионов Mg^{2+} с этими полинуклеотидами.
5. Возможная причина того, что термостабильность A2I на $(13 \div 19)^\circ\text{C}$ ниже термостабильности A2U состоит в существенно большем, чем у A2U межгликозидном расстоянии в парах оснований, образующих уотсон-криковскую двойную спираль.

Благодарности

Авторы благодарят профессора В.И. Бабенко за обсуждение работы и полезные замечания, М.В. Дегтяр - за предоставленную программу расчета констант связывания.

Исследование, описанное в этой публикации, стало возможным частично благодаря гранту № UB2-2442-KH-02 Фонда Гражданских Исследований и Развития США для Независимых Государств бывшего Советского Союза (CRDF).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Catasti, X. Chen, S.V. Mariappan, E.M. Bradbury, G. Gupta// *Genetica*. 1999. V. 106. P.15-36.
2. C. Giovannangeli, M. Rougee, T. Garestier, N.T. Thuong, C. Helene// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V.89. P.8631-8635.
3. M. Mils, J. Völker, H.H. Klump// *Biochemistry*. 1996. V. 35(41). P. 13338-13344.
4. S. Amott, P.J. Bond// *Science*. 1973. V.181. P.56-57.
5. В.А.Сорокин, В.А.Валеев, Г.О.Гладченко, Е.А.Андрусь, Ю.П.Благой// *Вестн.ХДУ № 568. Биологический Вестник*. 2002. Вып.2(11). С.30-35.
6. В. Зенгер. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. 1987. Мир. Москва. 584 с.
7. Ч. Кантор, П. Шиммель. Биофизическая химия. 1985. Т.3. Москва. Мир. 534 с.
8. V.A. Sorokin, V.A. Valeev, G.O. Gladchenko, M.V. Degtyar, Blagoi Yu.P.// *Macromol.Biosci*. 2001. V.1. P.191-203
9. V.A. Sorokin, V.A. Valeev, G.O. Gladchenko, M.V. Degtyar, E.A. Andrus, Blagoi Yu.P., V.A. Karachevtsev // *Macromol.Biosci*. 2002. V.2. P.155-162
10. F.B. Hovard, H.T. Miles// *Biochemistry*. 1982. V. 21. P. 6736-6745.
11. K. Fuchijoka, Y. Baba, A. Kagamoto// *Macromol. Chem.*, 1982, vol. 183, p. 389-398.
12. K. Fuchijoka, Y. Baba, A. Kagamoto, R. Fujishiro// *Repts. Progr. Polym. Phys. Jap.*, 1980, vol. 23, p. 811-814.
13. H. Krakauer, J.M. Sturtevant// *Biopolymers*, 1968, vol.6, p. 491-512.
14. D. Pörschke// *Biopolymers*, 1971, vol.10, p.1980-2013.
15. Yu.S. Lazurkin, M.D. Frank-Kamenetskii, E.N. Trifonov// *Biopolymers*, 1971, vol.9, p.1253-1306.
16. V.Andrushchenko, Yu.P.Bлагой, J.H. van de Sande, H. Wieser// *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2002, vol. 19, p.889-906
17. H. Diebler, F. Secco, M. Venturini// *Biophys. Chem.*, 1987, vol. 26, p. 193-205.
18. H. Krakauer// *Biochemistry*, 1974, vol., p. 2579 - 2589.
19. R. M. Clement, J. Stumm, M. Daune// *Biopolymers*, 1973, vol.12, p. 405-421.
20. S.S. Massoud, H. Sigel// *Inorg. Chem.*, 1988, vol. 27, p. 1447-1453.
21. H. Sigel, S.S. Massoud, N.A. Corfu// *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, vol. 116, p. 2958-2971.
22. B. Pullman, D. Parahia, D. Cauchy// *Nucl. Acids Res.*, 1979, vol. 12, p. 3821-3829.
23. М.Д. Франк-Каменицкий, В.В. Аннелевич, А.В. Лукашвили// *Усп. физ. наук*, 1987, т.151, с.595-618.