

УДК 577.323.425

## ВЛИЯНИЕ ИОНОВ $Ni^{2+}$ НА КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕХОДЫ В СИСТЕМЕ POLY(dA)-POLY(dT)

В.Н. Зозуля, Ю.П. Благой, Д.Н. Ложко, А.Б. Нестеров, О.А. Рязанова

*Физико-технический институт низких температур им. Б.П. Веркина НАН Украины,  
61103, пр. Ленина 47, Харьков, e-mail: zozulya@ilt.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 18 ноября 2003 г.

Исследовано влияние ионов  $Ni^{2+}$  на конформационные переходы в дуплексных и триплексных комплексах, образованных poly(dA) с poly(dT). Измерения проведены в буферных растворах (pH 6.9, 0.1 M NaCl), при концентрации полинуклеотидов 0.1 – 0.3 мМ и  $Ni^{2+}$  до 3 мМ, используя метод термической денатурации с регистрацией кривых плавления по изменению поглощения при длине волны 260 нм. Агрегационные процессы в системах прослеживались по интенсивности рассеяния света в видимой области при 540 нм. По полученным данным построена диаграмма конформационных переходов в системе poly(dA)-poly(dT)- $Ni^{2+}$ . Ионы никеля повышают температуру переходов спираль-клубок для poly(dA)-poly(dT) и триплекс-дуплекс для poly(dA)2poly(dT) пропорционально  $\log[Ni^{2+}]$ , причем величина коэффициента пропорциональности для перехода 3→2 существенно больше, чем для перехода 2→1. В данной системе при  $[Ni^{2+}] \geq 3$  мМ возникала агрегация и нарушалась обратимость процесса перехода спираль-клубок, что связано с молекулярной конденсацией poly(dA).

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** термическая денатурация, УФ-спектроскопия, poly(dA)-poly(dT), ионы  $Ni^{2+}$ .

Известно, что малые количества никеля необходимы организму человека для воспроизводства красных кровяных телец. Однако превышение определенного уровня содержания никеля в организме делает его токсичным. В условиях роста загрязненности окружающей среды отравление соединениями никеля может происходить ингаляционным и оральным путем, а также через кожу. При этом, они постепенно накапливаются в организме человека. Международное агентство по исследованию рака (International Agency for Research on Cancer) отнесло соединения никеля к классу канцерогенов [1]. Различные соединения никеля проявляют разную токсичность и канцерогенность в зависимости от их физических и химических свойств. Исследования, проведенные Международным комитетом по канцерогенному воздействию никеля на человека (International Committee on Nickel Carcinogenesis in Man), показали, что длительное воздействие соединений никеля вызывают у людей рак легких и носовой полости [1,2], астму, уменьшение веса тела, повреждения сердца и печени [3,4], аллергические реакции, раздражение кожи, и повышение кровяного давления. Наибольшей канцерогенной активностью обладают нерастворимые соединения, а именно оксиды и сульфид никеля. Причина этого кроется в их биодоступности, а также способности ионов никеля проникать в клетку и вызывать повреждения хроматина [3]. Частицы нерастворимых соединений никеля попадают в клетку в процессе фагоцитоза, а последующее внутриклеточное растворение приводит к очень высокому уровню содержания  $Ni^{2+}$  в клетке. Металлический никель не проявляет канцерогенной активности, а данные, относительно водорастворимых соединений (сульфат и хлорид никеля) неоднозначны и противоречивы [1]. Предполагается, что они усиливают действие других канцерогенов.

Для выяснения механизмов влияния соединений никеля на организм человека был проведен ряд экспериментальных исследований на клеточном и молекулярном уровнях [4,5]. Оказалось, что ионы никеля индуцируют хромосомные абберрации [6], вызывают гиперметилирование ДНК, приводящее к перерождению нормальной клетки в раковую, усиливают конденсацию ДНК и хроматина [7], негативно влияют на точность репликации ДНК и репарационные процессы, вызывают нарушения экспрессии генов [5,8] и клеточной сигнализации, способствуют возникновению гипоксии клетки.

Однако молекулярный механизм канцерогенной активности  $Ni^{2+}$  окончательно не выяснен. Известно, что подобно магнию, никель связывается с кислородом сахарофосфатного остова. Хотя механизм гиперметилирования ДНК пока неизвестен, возможная модель предполагает способность никеля замещать магний и более эффективно вызывать конденсацию ДНК и хроматина, что приводит к перерождению здоровых клеток в раковые [7]. Было обнаружено [9], что хлорид никеля нарушает точность синтеза ДНК. Влияние ионов  $Ni^{2+}$  на конформационные переходы в нуклеиновых кислотах изучено in-vitro, в основном на ДНК, например, в работах [10-13]. Поэтому представляется целесообразным провести такие исследования на более простых системах с синтетическими полинуклеотидами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Натриевые соли poly(dA)·poly(dT) и poly(dT) были куплены в Sigma Chemical Co. и использовались без дополнительной очистки. В качестве растворителя во всех экспериментах использовался 10 мМ Na-какодилатный буфер, pH 6,9, с содержанием 0,1 М NaCl, приготовленный на деионизованной дистиллированной воде. Необходимую концентрацию ионов Ni<sup>2+</sup> создавали добавлением NiCl<sub>2</sub>·перекристаллизованного из соли марки ХЧ. Концентрацию полинуклеотидов определяли спектрофотометрически, используя коэффициенты молярной экстинкции при 260 нм: 6000 для poly(dA)·poly(dT) и 8460 для poly(dT), при 25 °С. Полагалось, что соотношение составляющих полинуклеотидов в фирменном образце poly(dA)·poly(dT) обеспечивало двухспиральную структуру полимера, а триплекс poly(dA)·2poly(dT) готовили эквимольным смешиванием poly(dA)·poly(dT) с poly(dT).

Эксперименты были проведены методом термической денатурации с регистрацией кривых плавления по изменениям УФ поглощения при 260 нм. Абсорбционные измерения выполняли на спектрофотометре SPECORD UV/VIS (VEB Carl Zeiss, Jena), соединенном с персональным компьютером для сбора информации. Измерения проводили в кварцевой кювете 1,0 × 0,2 см, используя короткий, либо длинный оптический путь луча. Кювета помещалась в медный держатель термостатируемой ячейки, нагрев и охлаждение которой осуществлялся с помощью управляемого компьютером элемента Пельтье. Скорость нагрева составляла 0,8 °С/мин. Показания спектрофотометра регистрировались с интервалом в полградуса. Агрегационные процессы в системах прослеживались по рассеянию света в видимой области, при 540 нм. Интенсивность рассеяния измерялась под прямым углом к возбуждающему лучу методом счета фотонов на лабораторном спектрофлуориметре, описанном ранее [14]. Возбуждение осуществлялось выделенным с помощью двойного монохроматора стабилизированным излучением галогенной лампы. Счет фотонов производился путем накопления импульсов за 10 с для каждой экспериментальной точки. Кюветное отделение было оснащено зрительной трубой для визуального наблюдения процесса агрегации.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На Рис. 1 приведена серия абсорбционных кривых плавления двухспиральной poly(dA)·poly(dT), концентрация которой (в парах оснований) составляла 50 мкМ. Кривые были получены в растворах, содержащих 0,1 М NaCl, при концентрациях ионов Ni<sup>2+</sup> в диапазоне от 0 до 3 мМ. Из рисунка видно, что в ходе плавления наблюдается только один резкий переход спираль-клубок (переход 2→1), средняя температура которого (Т<sub>м</sub>) возрастает при повышении концентрации ионов никеля. При охлаждении зависимость поглощения от температуры повторяла кривые плавления для образцов с концентрацией Ni<sup>2+</sup> до 2 мМ (включительно), т.е. осуществлялся обратный конформационный переход клубок-спираль. Однако, при большем содержании Ni<sup>2+</sup> в системе poly(dA) + poly(dT), после плавления возникала агрегация, которая увеличивала оптическую плотность раствора. На Рис. 1 это показано для образца с содержанием 3 мМ Ni<sup>2+</sup>. До температуры ~90 °С рост агрегатов происходил медленно, а с дальнейшим нагревом этот процесс резко ускорялся, приводя к образованию крупных частиц, хорошо видимых через зрительную трубу. При охлаждении агрегаты медленно распадались, и через несколько часов, двухспиральная структура полимера восстанавливалась, о чем свидетельствовало возвращение к первоначальным абсорбционным характеристикам. Однако при концентрации [Ni<sup>2+</sup>] > 5 мМ в данной системе после перехода спираль-клубок возникала необратимая агрегация, сопровождающаяся выпадением полимеров в осадок.

Влияние ионов никеля на триплексную систему poly(dA)·2poly(dT) было изучено при таких же ионных условиях, как и для poly(dA)·poly(dT), но при концентрации полимера в два раза большей. Абсорбционные кривые плавления (Рис. 2) показали наличие двух переходов. Низкотемпературный переход характеризует отделение Хугстиновской нити poly(dT) от триплекса poly(dA)·2poly(dT) (переход 3→2), в то время как высокотемпературный переход отражает плавление самой poly(dA)·poly(dT) (переход 2→1). Как видно из рисунка, ионы Ni<sup>2+</sup> повышают температуру обоих переходов, но для перехода 3→2 этот эффект существенно сильнее, чем для перехода 2→1. По величине гиперхромизма в поглощении, наблюдаемого для низкотемпературного перехода, можно судить о полноте формирования триплексной структуры. При данной ионной силе раствора, 0,11 М Na<sup>+</sup>, полное присоединение poly(dT) к poly(dA)·poly(dT) осуществляется при [Ni<sup>2+</sup>] ≥ 0,3 мМ, а при меньшей концентрации Ni<sup>2+</sup> триплексная структура реализуется неполностью.

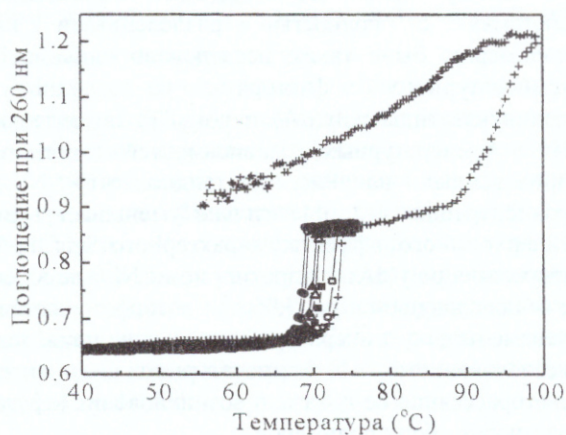


Рис. 1. Кривые плавления  $poly(dA) \cdot poly(dT)$  в 10 мМ какодильном буфере (pH6,9), содержащем 0,1 М NaCl при различных концентрациях ионов  $Ni^{2+}$ : 0 (●), 0,1 (○), 0,3 (▲), 0,6 (△), 1 (■), 2 (□) и 3 (+) мМ. Концентрация полимера составляла 50 мкМ пар оснований, а длина оптического пути 1 см.

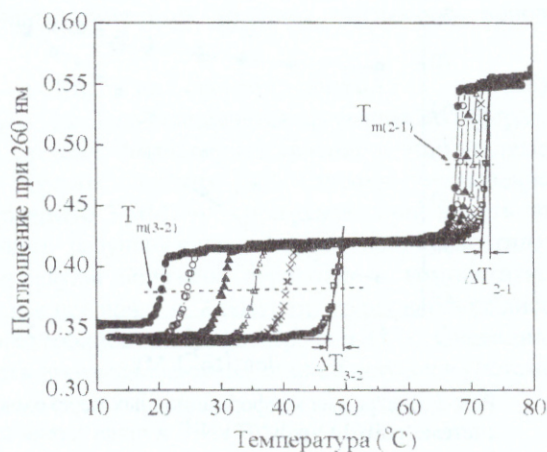


Рис. 2. Кривые плавления  $poly(dA) \cdot 2poly(dT)$  в присутствии ионов  $Ni^{2+}$  в концентрации 0 (●), 0,1 (○), 0,3 (▲), 0,6 (△), 1 (×) и 2 (□) мМ. Концентрация полимера составляла 100 мкМ триплексов оснований, а оптический путь 0,2 см. Ионные условия такие же, как в случае с  $poly(dA) \cdot poly(dT)$ .

В данной триплексной системе после окончания стадии плавления так же, как и для дуплексов, наблюдалась агрегация, которая возникала при достижении концентрации ионов никеля 2 мМ. Кинетика процесса агрегации в изученных системах проиллюстрирована на рис. 3 зависимостями интенсивности рассеяния света ( $I_{рас}$ ) от температуры. Из сравнения этих зависимостей с абсорбционными кривыми плавления (Рис. 1 и 2) видно, что резкое возрастание рассеяния света в растворах с дуплексом  $poly(dA) \cdot poly(dT)$  и триплексом  $poly(dA) \cdot 2poly(dT)$ , свидетельствующее о возникновении агрегатов, происходит при температурах выше температурного интервала конформационного перехода спираль-клубок. Кривые рассеяния отражают двухфазный характер процесса агрегации. Визуально (с помощью зрительной трубы) было установлено, что сначала возникало рассеяние по типу опалесценции, которое определяло нижнюю ветвь кривых рассеяния до "ступеньки", а с дальнейшим повышением температуры наблюдалось образование крупномасштабной агрегации, которая приводила к резкому возрастанию интенсивности рассеяния света. С понижением температуры до комнатной агрегаты медленно распались, и через несколько часов, аномальное светорассеяние исчезало.

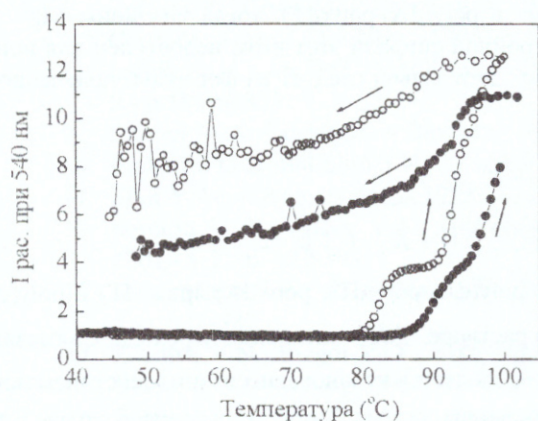


Рис. 3. Температурные зависимости интенсивности рассеяния света,  $I_{рас}$ , характеризующие возникновение под действием ионов  $Ni^{2+}$  агрегации в растворах полинуклеотидов:  $poly(dA) \cdot poly(dT)$  - (○) и  $poly(dA) \cdot 2poly(dT)$  - (●). Ионные условия – как указано в подписи к Рис. 1.

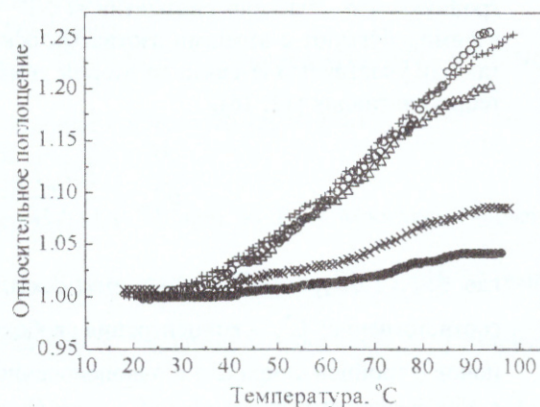


Рис. 4. Зависимость от температуры гиперхромизма в УФ-поглощении при 260 нм растворов  $poly(dA)$  с ионами  $Ni^{2+}$  в концентрации: 0 (○), 1 (+), 2 (△), 2,5 (×) и 3 мМ (●). Концентрация полимера составляла 100 мкМ оснований, ионные условия – как указано в подписи к Рис. 1.

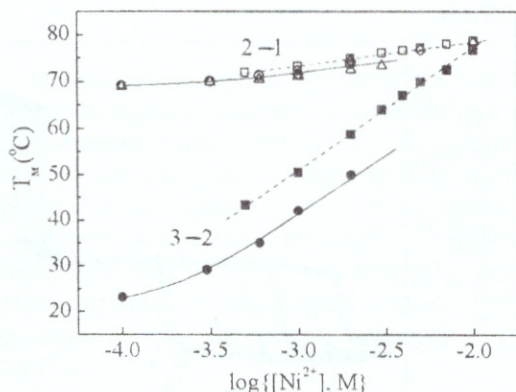


Рис. 5 Диаграмма конформационных переходов в системе poly(dA)-poly(dT)-Ni<sup>2+</sup> в присутствии 0.1 М NaCl. Значения T<sub>m</sub> для перехода 2→1 определены по положению средней точки перехода, полученные из профилей плавления poly(dA)-poly(dT) (Рис. 1) (Δ) и poly(dA)-2poly(dT) (Рис. 2) (●). (○) – данные для перехода 3→2 из Рис. 2. Символами (■, □) изображена фазовая диаграмма для системы poly(dA)-poly(dT)-Mg<sup>2+</sup> [15].

этой диаграмме приведены также полученные нами ранее данные для системы poly(dA) – poly(dT) – Mg<sup>2+</sup> [15].

Анализ полученных результатов позволяет сделать ряд существенных заключений относительно влияния ионов Ni<sup>2+</sup> на конформационные переходы в системе poly(dA) – poly(dT). Прежде всего следует отметить большое сходство влияния Ni<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> на параметры перехода 2→1 в области низких и умеренных концентраций ионов (до ~3 мМ). Зависимости T<sub>m</sub> от концентрации этих ионов отличаются незначительно (Рис. 5). Сравнение кривых плавления, приведенных на рис. 1 и 2, с данными для аналогичных полинуклеотидных систем с ионами Mg<sup>2+</sup>, полученными в работе [15], показывает, что форма кривых плавления в обоих случаях подобна и ширина интервала перехода в пределах точности измерений одинакова, составляя величину ΔT<sub>2-1</sub> = (1.1 ± 0.1) °С. Однако, для перехода 3→2 линия значений T<sub>m</sub> на фазовой диаграмме (Рис. 5) располагается на ~10 °С ниже, чем для системы poly(dA)-2poly(dT)-Mg<sup>2+</sup>. При этом крутизна перехода остается высокой - ширина интервала перехода ΔT<sub>3-2</sub> ≈ 2.5 °С (Рис. 2).

Таким образом, в сравнении с Mg<sup>2+</sup> ионы Ni<sup>2+</sup> более сильно стабилизируют двойную спираль, чем тройную, что вызвано связыванием Ni<sup>2+</sup> с N<sub>7</sub> аденина в poly(dA)-poly(dT), тогда как ионы Mg<sup>2+</sup> не взаимодействуют с атомами азотистых оснований. В тройной спирали этот атом недоступен для ионов, так как участвует в Н-связи со второй тиминовой нитью. Этот вывод следует из формулы, полученной в теории лигандов [12, 16]:

$$\delta T_m = \frac{RT_m T_{mo}}{\Delta H} \ln \frac{1 + K_{A2T} \cdot C_f}{(1 + K_{AT} \cdot C_f)^{\frac{1}{2}} (1 + K_T \cdot C_f)^{\frac{1}{2}}}, \quad (1)$$

где K<sub>A2T</sub>, K<sub>AT</sub> и K<sub>T</sub> – константы связывания Ni<sup>2+</sup> с poly(dA)-poly(dT), poly(dA)-2poly(dT) и poly(dT), соответственно; C<sub>f</sub> – концентрация свободных ионов в растворе, ΔH – энтальпия перехода. Связывание ионов с тройной спиралью и одноцепочечной poly(dT) определяется кулоновским взаимодействием ионов с фосфатами. В связи с этим, K<sub>A2T</sub> и K<sub>T</sub> должны быть равны для Mg<sup>2+</sup> и Ni<sup>2+</sup>, тогда как в случае с Ni<sup>2+</sup> K<sub>AT</sub> возрастает за счет дополнительного взаимодействия ионов этого переходного металла с атомом N<sub>7</sub> аденина. Очевидно, что при возрастании K<sub>AT</sub> величина δT<sub>m</sub> уменьшается, что и наблюдается при переходе от триплексной системы полинуклеотидов, содержащей Mg<sup>2+</sup>, к системе с Ni<sup>2+</sup>. Теоретическая

Ввиду того, что агрегация наблюдалась в системах с полностью разделенными нитями полимеров, было также исследовано влияние Ni<sup>2+</sup> и температурного фактора на одонитевые полинуклеотиды poly(dA) и poly(dT) по отдельности. Из температурных зависимостей поглощения, приведенных на Рис. 4, видно, что Ni<sup>2+</sup> при концентрации ≥ 2 мМ сильно уменьшает величину гиперхромного эффекта, характерного для процесса плавления poly(dA). Напротив, ионы Ni<sup>2+</sup> не влияли на УФ-поглощение poly(dT), которое оставалось неизменным с температурой (данные не приведены). В исследованном температурном интервале светорассеяние не показало возникновения агрегатов в растворах обоих полимеров.

Влияние ионов Ni<sup>2+</sup> на конформационные переходы в системе poly(dA) – poly(dT) проиллюстрировано на Рис. 5 фазовой диаграммой, построенной в виде зависимостей температуры переходов (T<sub>m</sub>) от логарифма концентрации ионов Ni<sup>2+</sup>. Значения T<sub>m</sub> определялись для средних точек переходов 2→1 и 3→2 из абсорбционных кривых плавления, как показано на Рис. 2. Для сравнения на

оценка изменений  $\delta T_m$  может быть сделана после определения всех констант связывания ионов независимым методом.

Наиболее существенные отличия действия  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  на систему poly(dA) - poly(dT) обнаруживаются при высокой концентрации ионов. При  $[\text{Ni}^{2+}] \geq 3$  мМ начинается агрегация полимеров, что полностью нарушает конформационное равновесие в системе. Аналогичное явление в этой системе ионы  $\text{Mg}^{2+}$  вызывают при значениях концентрации, на порядок больших [15]. Сильное уменьшение гиперхромизма УФ-поглощения раствора poly(dA), содержащего 3 мМ  $\text{Ni}^{2+}$ , при нагревании вплоть до 100 °С (Рис. 4) означает, что при этом не происходит разупорядочения этого полинуклеотида. Предположительно, уже при комнатной температуре молекулы полимера переходят в компактную, устойчивую форму, которая стабилизируется включенными в неё ионами. Такие структуры наблюдались нами ранее при связывании  $\text{Ca}^{2+}$  с poly(dA) методом электронной микрофотографии [17]. Очевидно, именно из-за конденсации poly(dA) нарушается обратимость процесса перехода спираль-клубок в системе poly(dA) - poly(dT).

### ВЫВОДЫ

Из полученной диаграммы конформационных переходов в системе poly(dA) - poly(dT), содержащей ионы переходного металла никеля следует, что  $\text{Ni}^{2+}$  стабилизирует структуру образуемых двух- и трехспиральных комплексов полинуклеотидов, повышая  $T_m$  переходов пропорционально  $\log[\text{Ni}^{2+}]$ . С увеличением концентрации  $\text{Ni}^{2+}$  значение  $T_m$  для перехода 3→2 возрастает быстрее, чем для перехода 2→1, однако слияние этих переходов в один непрерывный переход 3→1, как это наблюдалось для ионов щелочноземельного металла магния [15], не достигается из-за возникновения агрегации полинуклеотидов. В данной системе при  $[\text{Ni}^{2+}] \geq 3$  мМ из-за молекулярной конденсации poly(dA) нарушается обратимость процесса перехода спираль-клубок.

Работа выполнена при финансовой поддержке по программе CRDF, грант UB2-2442-KH-02.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grimsrud T.K., Berge S.R., Haldorsen T., and Andersen A. // Am. J. Epidemiol.- 2002. - v.156.- p.1123-1132.
2. Oller AR. // Environ Health Perspect. -2002.- v.110. Suppl 5.- p.841-844.
3. Costa M. // In: Toxicology of Metals. Boca Raton, FL:CRC Press. 1996.- p. 245-251.
4. Kasprzak K.S., Jaruga P., Zastawny T., North S.L., Riggs C.W., Olinski R. and Dizdaroglu M. // Carcinogenesis. -1997.- v.18.- p.271-277.
5. Salnikow K., Cosentino S., Klein C., Costa M. // Mol. Cell. Biol. -1994.- v.14.- p.851-858.
6. Conway K., Costa M. // Cancer Res. -1989.- v.49.- p.6032-6038.
7. Costa M. // Am J Clin Nutr. -1995.- v.61(Suppl).- p.666S-669S.
8. Salnikow K., An WG., Melillo G., Blagosklonny MV., Costa M. // Carcinogenesis.-1999.- v.20. No. 9.- p.1819-1823.
9. Sirover M.A., Loeb L.A. // Biochem. Biophys. Res. Commun.-1976.- v.70.- p. 812-817.
10. Eichhorn G.L.,and Shin Y.Ae. // JACS. -1968.- v. 90.- p.7323-7328.
11. Shin Y.Ae. // Biopolymers.- 1973.- v12.- p.2459-2475.
12. Sorokin V.A., Valeev V.A., Gladchenko G.O., Degtyar M.V., Blagoi Yu.P. // Macromol. Biosci.- 2001.- v.1.- p. 191-203.
13. Касьяненко Н.А., Дьяконова Н.Е., Фрисман Э.В. // Молекулярная Биология. 1989.- том 23. вып. 4.- с.975-982.
14. Zozulya V.N., Blagoi Yu.P., Lober G., Voloshin I., Winter S., Makitruk V., Shalamay A. // Biophys. Chem.-1997.- v.65.- p.55-63.
15. Zozulya V.N., Nesterov A.B., Ryazanova O.A., Blagoi Yu.P. // Int. J. Biol. Macromol.- 2003.- v.33.- p.183-191.
16. Lazurkin Y.S., Frank-Kamenetskii M.D., Trifonov E.N. // Biopolymers.- 1970.- v.9.- p.1253-1306.
17. Sorokin V.A., Blagoi Yu.P., Valeev V.A., Lisnyak Yu. // J. Inorg. Biochem.- 1983.-v.19 N.2.- p. 143-152.