

УДК 577.323.425

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАДМИЯ НА ФАЗОВОЕ РАВНОВЕСИЕ В ДВУНИТЕВОЙ POLY(rA)-POLY(rU)

Г.О. Гладченко, Ю.П. Благой, В.А. Сорокин, В.А. Валеев, Е.А. Андрусъ,
В.А. Карачевцев

Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины, пр. Ленина, 47, Харьков 61103
Поступила в редакцию 1 марта 2007 года

Методом дифференциальной УФ-спектроскопии изучены индуцированные нагреванием и ионами Cd^{2+} конформационные переходы в двунитевой poly(rA)-poly(rU) (AU) и ее компонентах (однонитевых poly(rA) и poly(rU)) в буферных растворах (рН 6,5), содержащих $0,03\text{MNa}^+$. Обнаружено, что с ростом концентрации ионов кадмия однонитевые полинуклеотиды претерпевают ряд конформационных переходов, характер которых обуславливается доминирующим типом металлокомплекса. Фазовая диаграмма poly(rA)-poly(rU), измеренная в растворах с ионами кадмия при $0,03\text{MNa}^+$, сравнивается с диаграммами $\text{AU}+\text{Cd}^{2+}$ в $0,1\text{MNa}^+$ и $\text{AU}+\text{Mg}^{2+}$ в $0,01\text{MNa}^+$. Показано, что при низких концентрациях ионов металлов переход спираль-клубок ($2 \rightarrow 1$) AU имеет однофазный кооперативный характер. При достижении критической концентрации двухвалентных ионов $[\text{M}_{\text{cr}}]$ переход $2 \rightarrow 1$ замещается диспропорциональным переходом $2\text{AU} \rightarrow \text{A}_2\text{U} + \text{poly(rA)}$ ($2 \rightarrow 3$) и последующим разрушением тройной спирали ($3 \rightarrow 1$). Значение $[\text{M}_{\text{cr}}]$ зависит от содержания ионов натрия в растворе: чем выше концентрация $[\text{Na}^+]$, тем бóльшая концентрация двухвалентных ионов соответствует тройной точке. Ряд концентраций $[\text{Na}^+] = 0,01, 0,03$ и $0,1\text{M}$ задает положения $[\text{M}_{\text{cr}}]$ как $4 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$ и 10^{-4}M , что в двойном логарифмическом масштабе представляет собой линейную зависимость $[\text{M}_{\text{cr}}] = f([\text{Na}^+])$. Связывание кадмия с основаниями poly(rA) вызывает сужение области существования тройных спиралей (в сравнении с таковой для ионов Mg^{2+}). Взаимодействие ионов Cd^{2+} с O(4) урацила приводит к дальнейшей дестабилизации тройной спирали.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нуклеиновые кислоты, ионы металлов, кадмий, конформационные переходы.

Кадмий и его соединения, непрерывно генерируемые индустриальной и сельскохозяйственной деятельностью человека [1], недавно были классифицированы Международным агентством по исследованиям рака как канцерогены 1 категории [2, 3]. Предполагается, что индуцируемый кадмием канцерогенез может включать как не прямое (индукция окислительного повреждения ДНК [3]; ингибирование процессов репарации ДНК [4]), так и прямое взаимодействие с ДНК (изменение в экспрессии определенных онкогенов и генов-супрессоров опухолей [3, 5, 6]). В частности, в работах [5, 6] идентифицирован, клонирован и охарактеризован участок TEF-1 delta (Translation Elongation Factor-1 delta) как новый кадмий-зависимый протоонкоген. Блокирование трансляции TEF-1 delta антисмысловой мРНК приводит к существенному обращению онкогенного потенциала кадмий-трансформированных

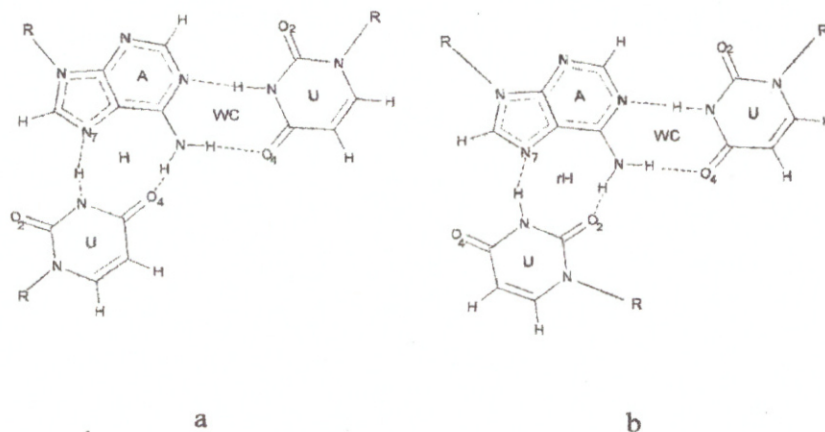


Рис. 1. Структура poly(rA)-2poly(rU): (а) Хугстиновское спаривание оснований для третьей нити poly(rU); (б) обратная Хугстиновская пара, образованная третьей нитью.

Влияние ионов кадмия на фазовое равновесие в двунитевой poly(rA)-poly(rU)

клеток, что следовало из уменьшения числа опухолевых очагов. Свойство сайт-специфического узнавания нуклеиновых кислот специально сконструированными олигонуклеотидами с последующим образованием триплексов может быть использовано для лечения не только онкологических, но и вирусных заболеваний на геномном уровне [7,8].

В качестве модельной системы мы использовали двунитевую poly(rA)-poly(rU), способную образовывать тройную спираль в ходе индуцированного нагреванием перехода $2\text{poly(rA)} \cdot \text{poly(rU)} \rightarrow \text{poly(rA)} \cdot 2\text{poly(rU)} + \text{poly(rA)}$ в растворах с высоким содержанием ионов металлов [9]. Ранее было установлено, что тройной комплекс $\text{poly(rA)} \cdot 2\text{poly(rU)}$ (A2U) состоит из антипараллельной двойной спирали $\text{poly(rA)} \cdot \text{poly(rU)}$ с уотсон-криковскими парами и цепи poly(rU) , образующей хугстиновскую пару с N7 и N6H poly(rA) (Рис.1а). В ряде работ были изучены термодинамические свойства этих полинуклеотидных комплексов в зависимости от содержания ионов щелочных металлов Na^+ и K^+ в растворе и построены фазовые диаграммы [11, 12]. Было также исследовано влияние ионов Mg^{2+} на стабильность $\text{poly(rA)} \cdot 2\text{poly(rU)}$, однако оно носило фрагментарный характер [12,13]. В настоящее время эта модельная система вновь привлекла большое внимание [14-19]. Методом колебательного кругового дихроизма (VCD) изучены диспропорциональные переходы $(2\text{poly(rA)} \cdot \text{poly(rU)} \rightarrow \text{poly(rA)} \cdot 2\text{poly(rU)} + \text{poly(rA)})$ (переход 2→3) в отсутствие двухвалентных ионов [14] и в присутствии ионов Ni^{2+} [15] и выявлены новые аспекты молекулярной структуры этих комплексов. В частности, в [15] на основании полученных в работе VCD –спектров предполагается, что наиболее вероятной моделью для тройной спирали A2U есть структура с обратным Хугстиновским типом водородно-связанной пары для третьей нити (poly(rU)) (Рис.1б). Спектроскопическими методами подробно исследовано влияние ионов Mg^{2+} и Ni^{2+} на конформационное равновесие в растворах двух- и трехцепочечных полинуклеотидов, образованных poly(rA) и poly(rU) , и построены диаграммы состояния одно - и мультицепочечных структур [16-19]. Цель настоящего исследования – изучить конформационные переходы в двунитевой $\text{poly(rA)} \cdot \text{poly(rU)}$ и ее компонентах (однунитевых poly(rA) и poly(rU)) в растворах, содержащих ионы Cd^{2+} , и выявить влияние ионов натрия на фазовое равновесие между мульти- и одноцепочечными структурами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Натриевую соль $\text{poly(rA)} \cdot \text{poly(rU)}$ (AU) (Sigma), калиевые соли poly(rA) и poly(rU) , динатриевую соль AMP (Serva), а также дважды перекристаллизованную соль $\text{CdCl}_2 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (Реахим) растворяли в какодилатном буфере (pH6.5), содержащем $0,001\text{MNa}^+$. Для повышения ионной силы до $0,03\text{MNa}^+$ в раствор добавляли перекристаллизованный NaCl. Добавляемую концентрацию ионов Cd^{2+} ($[\text{Cd}^{2+}]$) определяли по весу и контролировали комплексонометрическим методом. Концентрацию фосфора полинуклеотидов (P) определяли по значениям коэффициента молярной экстинкции в максимумах УФ - поглощения [16,18]. Во всех случаях она составляла $(4 \pm 1) \cdot 10^{-5}$ М Р. Ошибка определения величины Р и $[\text{Cd}^{2+}]$ не превышала 0,5%.

Индукцированные ионами Cd^{2+} дифференциальные УФ (ДУФ) - спектры ($\Delta A_s(\nu)$) регистрировали при $T=T_0$ на спектрофотометре Specord M40 (Carl Zeiss Jena) с использованием 4-куветной схемы измерений [17-20]. ДУФ-спектры нормировали на концентрацию полинуклеотидов: $\Delta \epsilon_s(\nu) = \Delta A_s(\nu) / P$. Зависимость изменения оптической плотности полинуклеотидов от температуры (кривые конформационного перехода) измеряли с помощью спектрофотометра Specord UV VIS (Carl Zeiss, Jena), сопряженного с IBM PC. Кривые пересчитывали к виду $h(T) = \Delta A(T) / A_0$, где A_0 - оптическая плотность раствора при $T=T_0$ ($h(T)$ - гиперхромный коэффициент). Скорость нагрева составляла $0,25^\circ/\text{мин}$.

Переходы $\text{AU} \rightarrow \text{A} + \text{U}$ (2→1), $\text{A2U} \rightarrow \text{A} + \text{U} + \text{U}$ (3→1) регистрировали при $\nu_m = 38500 \text{ см}^{-1}$ (ν_m - волновое число, соответствующее максимуму поглощения AU); переход $\text{poly(rA)} \cdot \text{poly(rU)} \rightarrow \text{poly(rA)} \cdot 2\text{poly(rU)}$ (2→3) - при $(\nu_i)_{\text{AU}} = 35700 \text{ см}^{-1}$ ($(\nu_i)_{\text{AU}}$ - изобестическая точка (i.p.) дифференциального гиперхромного спектра AU ($\Delta A_h(\nu)$)) [11-13,16-18]. $\Delta A_h(\nu)$ измеряли при температурах, соответствующих переходу спиралей в полностью разупорядоченное (клубкообразное) состояние ($92-96^\circ\text{C}$). Температуры начала (T_s) и конца (T_f) перехода были найдены как соответствующие точкам пересечения касательной к кривой плавления при $T=T_m$ с прямыми линиями $h(T)=0$ и $h(T)=h_{\text{max}}$, соответственно. T_m - температура, при которой 50% звеньев полинуклеотида переходит в новую конформацию. Для переходов 2→1 и 3→1 T_m также определяли как температуру, при которой производная $\partial h(T) / \partial T$ имеет максимальное значение. Различия в определении T_m не превышали $0,5^\circ$.

Полинуклеотиды и тридистиллят, в котором их растворяли, содержали примеси ионов металлов ($[\text{M}t_0]$). Ранее нами [19] было определено содержание примесей в растворах AU ($[\text{M}t_0]$), которое составило $\sim 10^{-5}$ М. Полную концентрацию ионов Cd^{2+} в растворе ($[\text{Cd}^{2+}]$) определяли как $[\text{Cd}^{2+}] = [\text{M}t_0^{2+}] + [\text{Cd}^{2+}]$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Poly (rA)

На Рис.2 показаны индуцированные ионами Cd^{2+} ДУФ-спектры poly(rA). При низких степенях заполнения мест связывания на полинуклеотиде ($[\text{Cd}^{2+}] \leq 9 \cdot 10^{-5} \text{M}$) наблюдается гипохромизм спектра поглощения (спектр «1» на Рис.2, Таблица), что обусловлено появлением дополнительного стэкинга оснований [20]. Подобный эффект наблюдается в случае ионов Mg^{2+} , взаимодействующих только с фосфатными группами нуклеиновых кислот (спектр на вставке), и ионов Ni^{2+} в области малых степеней связывания с полимером и низких концентрациях Na^+ [17]. Это позволяет заключить, что в данной области концентраций ионы кадмия взаимодействуют с фосфатами poly(rA). Этот тип связывания увеличивает термостабильность poly(rA): кривая плавления 2 сдвигается в область высоких температур примерно на 5° относительно кривой 1 при увеличении концентрации от $1.3 \cdot 10^{-5}$ до $2,5 \cdot 10^{-5}$ M Cd^{2+} (Рис.3).

В интервале концентраций $9 \cdot 10^{-5} \text{M} \leq [\text{Cd}^{2+}] \leq 3 \cdot 10^{-4} \text{M}$ преобладающим становится связывание катионов с основаниями. ДУФ-спектр комплекса poly(rA)+ Cd^{2+} (спектр «2») приобретает вид, качественно подобный наблюдаемому для АМР (спектр «а»): положительный максимум при $\nu \sim 37000 \text{cm}^{-1}$, отрицательный минимум при $\nu \sim 40000 \text{cm}^{-1}$ и особенность в виде плеча в коротковолновой части спектра. Эти особенности обусловлены координацией ионов с N7 Ade, как показано ранее для Ni^{2+} [17] и Cu^{2+} [20]. Согласно данным рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии [21, 22], в кольце аденина N7-положение является основным местом связывания иона металла. Ультрафиолетовая абсорбционная спектроскопия, следящая за возмущениями в адениновом кольце, в основном чувствительна к его внутрисферной координации с ионами металлов. Можно предположить, что

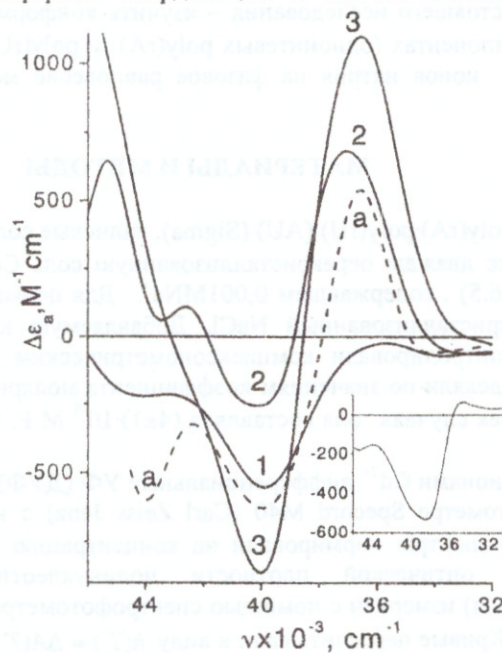


Рис.2. Дифференциальные УФ-спектры poly(rA), индуцированные ионами Cd^{2+} (0.03MNa^+ , pH7, 17°C). 1- $9 \cdot 10^{-5} \text{M}$, 2- $2.4 \cdot 10^{-4} \text{M}$, 3- $4.4 \cdot 10^{-3} \text{M}$ Cd^{2+} . а- ДУФС АМР+ 0.01M Cd^{2+} (0.01MNa^+ , pH6).
На вставке показан ДУФ-спектр poly(rA) в присутствии $3 \cdot 10^{-3} \text{M}$ Mg^{2+} (0.01MNa^+).

наблюдаемые ДУФ-спектры poly(rA) обусловлены образованием комплекса, представляющего собой макрохелат, в котором Cd^{2+} участвует во внутрисферной координации с N7 и внешнесферной координации (через молекулу воды) с атомом кислорода фосфатной группы O(P) [22,23]. В АМР количество макрохелатов такого типа достигает 42% [23]. Связывание Cd^{2+} с poly(rA) сопровождается увеличением интенсивности положительного максимума при $\nu \sim 37000 \text{cm}^{-1}$; при этом изобестическая точка сдвигается в коротковолновую сторону, а интенсивность отрицательного минимума ($\nu \sim 40000 \text{cm}^{-1}$) уменьшается (Таблица). Эти особенности свидетельствуют о разрушении упорядоченной вторичной

Влияние ионов кадмия на фазовое равновесие в двунитевой poly(rA)-poly(rU)

Таблица. Зависимость интенсивности экстремумов ($M^{-1}cm^{-1}$) и положения изобестических точек (i.p., cm^{-1}) дифференциальных УФ-спектров полинуклеотидов от концентрации ионов Cd^{2+} в растворе.

| $[Cd^{2+}] \cdot 10^5$ | poly(rA) | | | polyU $\Delta\epsilon_{\lambda}^{40000}$ |
|------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------------|
| | $-\Delta\epsilon_{\lambda}^{40000}$ | $\Delta\epsilon_{\lambda}^{37000}$ | $\nu_{i.p.} \cdot 10^{-3}$ | |
| 4.4 | 356 | -57 | | 65 |
| 9 | 551 | -80 | | |
| 10 | 483 | 223 | | |
| 15 | 397 | 497 | 38.5 | 22 |
| 24 | 255 | 685 | 38.9 | -52 |
| 44 | 389 | 893 | 38.9 | |
| 90 | 397 | 945 | 38.9 | |
| 130 | 511 | 1038 | 38.9 | -295 |
| 240 | 673 | 990 | 38.7 | |
| 440 | 867 | 1041 | 38.5 | -779 |
| 1320 | 1544 | 563 | 37.8 | -978 |

структуры poly(rA) [17]. Разупорядочение спиральных частей poly(rA) ранее наблюдалось при связывании большинства ионов переходных металлов [20] и, в частности, для Ni^{2+} - в том же концентрационном интервале [17]. Повышение концентрации Cd^{2+} от $2.4 \cdot 10^{-4}$ до $1.3 \cdot 10^{-3} M$ не изменяет структуру металлокомплекса: положение длинноволновой изобестической точки ДУФ-спектров сохраняется (Таблица). Поскольку комплекс включает Cd^{2+} , координирующий N7 и одну или две фосфатные группы соседних либо не-соседних нуклеотидов [20], его образование должно провоцировать агрегационный процесс. Действительно, как видно из Таблицы, при $[Cd^{2+}] > 1.3 \cdot 10^{-3} M$ наблюдается гипохромизм спектра поглощения при $\nu \sim 40000 \text{ cm}^{-1}$ и смещение изобестической точки в длинноволновую сторону, что, по-видимому, обусловлено внутримолекулярной конденсацией poly(rA) [24].

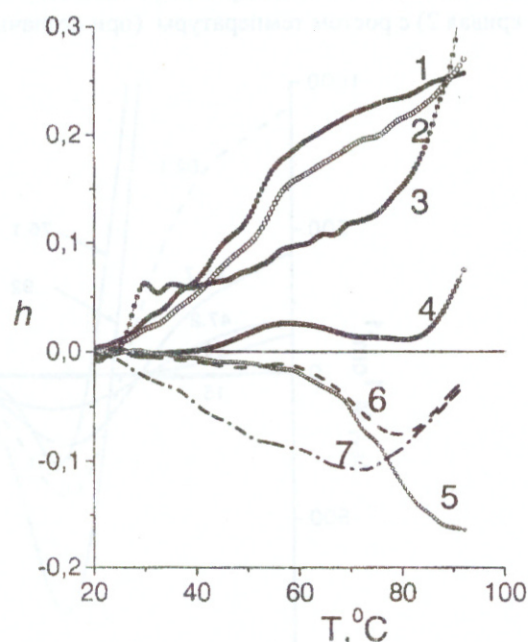


Рис. 3. Кривые плавления poly(rA) и poly(rU) при различных концентрациях Cd^{2+} . Poly(rA) : 1- $1.3 \cdot 10^{-5} M$, 2- $2.5 \cdot 10^{-5} M$, 3- $2.3 \cdot 10^{-4} M$, 4- $2.3 \cdot 10^{-3} M$, 5- $4.5 \cdot 10^{-3} M$. Poly(rU) : 6- $4.5 \cdot 10^{-4} M$, 7- $4.5 \cdot 10^{-3} M$.

При $[Cd^{2+}] = 2.3 \cdot 10^{-4} M$ существенно изменяется форма кривой конформационного перехода (Рис.3, кривая 3). Плавление структуры, образовавшейся в этих условиях, является

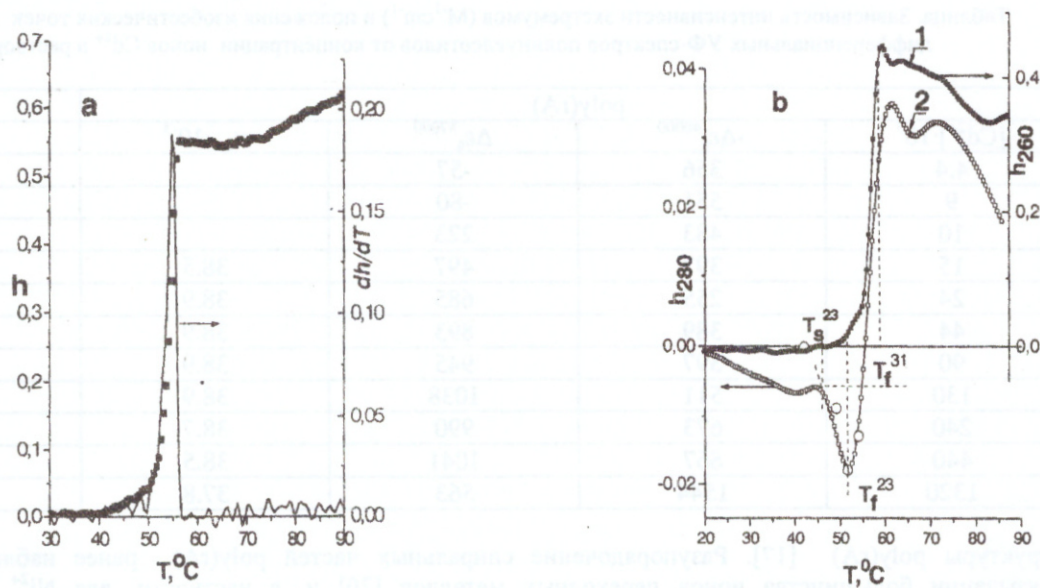


Рис. 4. Кривые плавления poly(rA)-poly(rU), измеренные при $\lambda = 260$ нм ($\nu = 38500$ см $^{-1}$) (а, б) и $\lambda = 280$ нм ($\nu = 35700$ см $^{-1}$) (б) при различных концентрациях Cd $^{2+}$.

а - [Cd $^{2+}$]= $5.4 \cdot 10^{-5}$ М, ■ - кривая перехода 2→1. Сплошной линией обозначена (dh/dT) дифференциальная кривая плавления. б - [Cd $^{2+}$]= $2.3 \cdot 10^{-4}$ М: 1- $\lambda = 260$ нм ($\nu = 38500$ см $^{-1}$), правая ордината; 2- $\lambda = 280$ нм ($\nu = 35700$ см $^{-1}$), левая ордината. ○ - измерения выполнены ступенчатым нагревом с выдержкой в каждой точке 20 мин.

постоянными в указанном интервале концентраций Cd $^{2+}$.

Дальнейшее повышение содержания ионов кадмия индуцирует образование тройных спиралей A2U из частично расплавленных AU. Это следует из уменьшения экстинкции полимерного раствора при $\nu \sim 35700$ см $^{-1}$ (Рис.4б, кривая 2) с ростом температуры (при незначительном относительном изменении

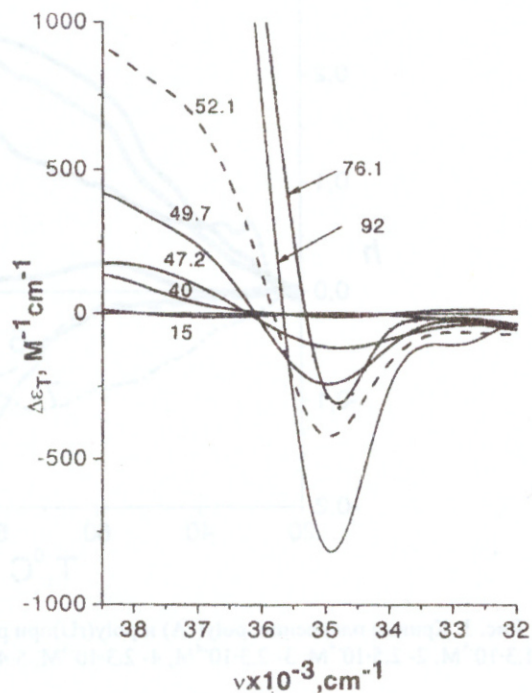


Рис. 5. Индуцированные нагреванием ДУФ-спектры poly(rA)-poly(rU), измеренные при [Cd $^{2+}$]= $2.3 \cdot 10^{-4}$ М. Цифры возле кривых - значения температуры в $^{\circ}$ С.

Влияние ионов кадмия на фазовое равновесие в двунитевой poly(rA)-poly(rU)

высококооперативным процессом (интервал плавления не превышает 5°C). Вероятно, что в разбавленных полимерных растворах образуются шпильки, сформированные отдельной нитью в результате сшивок не-соседних P(O)- Cd^{2+} -N7 (или N1) аденина [25]. Шпильки могут служить зародышами нового фазового состояния poly(rA)- компактные частицы. Такая возможность была предсказана теоретически Постом и Зиммом [26] для объяснения диффузной природы наблюдаемого в экспериментах перехода ДНК в конденсированное состояние. Предполагалось, что ДНК могут образовывать два (подчиняющихся Больцмановскому распределению) вида доменов - компактно упакованные и протяженные клубкообразные части молекулы. В последствии это было показано экспериментально с помощью флуоресцентной микроскопии, позволяющей наблюдать за отдельной молекулой ДНК [27]. Следует отметить, что концентрация $2.3 \cdot 10^{-4}\text{M}$ Cd^{2+} , при которой возникают описанные процессы, соответствует близкой к 1 степени заполнения мест связывания на основаниях poly(rA) (Таблица). Ранее, на основании экспериментальных наблюдений Блумфилд [28] показал, что для индуцирования конденсации ДНК необходима нейтрализация заряда на полимере до 90%.

Компактные частицы poly(rA), образованные в растворе, содержащем $2.3 \cdot 10^{-3}\text{M}$ Cd^{2+} , характеризуются высокой термостабильностью и не разрушаются вплоть до 80°C . При более высоких концентрациях кадмия нагревание раствора сопровождается преципитацией комплекса.

PolyU

При комнатной температуре в буферном растворе (pH 6.5), содержащем $3 \cdot 10^{-2}\text{MNa}^{+}$, poly(rU) сохраняет состояние неупорядоченного клубка [20]. Очень слабая способность урацила к стэкингу не позволяет молекулам poly(rU) объединяться в мультицепочечные спирали при комнатной температуре даже в условиях высокой степени экранирования отрицательных зарядов на фосфатных группах ионами двухвалентных металлов. Однако, ионы Cd^{2+} при концентрациях, превышающих $2.4 \cdot 10^{-4}\text{M}$ (Таблица), индуцируют гипохромизм поглощения poly(rU), свидетельствующий об образовании упорядоченной структуры. Ранее [29] подобный эффект был обнаружен в присутствии ионов Mg^{2+} и Ni^{2+} в близком по значениям интервале концентраций (0.001-0.08)M.

Термическое разрушение структуры, образованной при комнатной температуре, сопровождается гипохромизмом поглощения вплоть до температур $(70+80)^{\circ}\text{C}$ (Рис.3, кривые 6,7). Подобное явление было зарегистрировано для poly(rA) в присутствии ионов Ni^{2+} методом VCD [15]. При температуре $\sim 86^{\circ}\text{C}$ после разрушения стэкинга оснований наблюдалось формирование нового, отличного от канонического, типа упорядоченной структуры poly(rA). Можно предположить, что при комнатной температуре кадмий индуцирует образование некоторой спиральной, со значительной долей стэкинга, обладающей жесткостью структуры. Термическое нарушение стэкинга уменьшает жесткость и позволяет компактизоваться полинуклеотиду в результате образования перекрестных сшивок между не-соседними фосфатными группами. При температурах больше $\sim 80^{\circ}\text{C}$ компактные частицы разрушаются, индуцируя гиперхромизм поглощения. Однако, как было показано в [30], даже при этих температурах цепь poly(rU) сохраняет некоторую долю стэкинга благодаря макрохелату, образованному Cd^{2+} с O(4) и кислородом фосфатной группы.

Poly(rA) · poly(rU)

Данные Рис.4 показывают, что в зависимости от концентрации катионов в растворе индуцированные нагреванием конформационные переходы в AU могут быть двух типов: одностадийное разрушение двойной спирали на отдельные нити poly(rA) и poly(rU) ($2 \rightarrow 1$); двухфазные (диспропорциональные) переходы, включающие трансформацию дуплекса в триплекс ($2 \rightarrow 3$) и однонитевую poly(rA) и последующее разрушение образовавшейся триплексной структуры A2U ($3 \rightarrow 1$). В интервале концентраций $6 \cdot 10^{-6} \div 6 \cdot 10^{-5}\text{M}$ Cd^{2+} кривые плавления, измеренные при $\nu = 38500\text{ см}^{-1}$ (Рис.4а) демонстрируют кооперативный процесс плавления AU вплоть до полного расхождения нитей. Дифференциальный профиль плавления (dh/dT vs T) также имеет характер узкого однофазного перехода. За ним следует некооперативная часть кривой, соответствующая конформационным превращениям в одноцепочечных poly(rA) и poly(rU) (см. Рис.3, кривые 1, 2). В этом интервале концентраций поглощение AU, измеренное при $\nu = 35700\text{ см}^{-1}$, не изменяется вплоть до 96°C , что свидетельствует об отсутствии перехода ($2 \rightarrow 3$) в этих условиях [31]. Значение $\nu = 35700\text{ см}^{-1}$ соответствует положению длинноволновой изобестической точки гиперхромного спектра $\text{AU} + \text{Cd}^{2+}$, измеренного при 92°C (Рис.5). Гиперхромный коэффициент и кооперативность плавления ($(dh/dT)_{\text{max}}$) дуплекса практически остаются

эстинкции в максимуме спектра поглощения полимера (кривая 1)). Образование тройных спиралей идет параллельно с термически индуцированным процессом расплетания двойной спирали AU: $T_{s2 \rightarrow 3}$ совпадает с температурой начала кривой плавления AU, измеренной при $\nu=38500 \text{ см}^{-1}$. Это позволяет заключить, что тройные спирали образуются в пределах одной нити, а не в результате межнитевых сшивок. Отсутствие рассеяния света в видимой части спектра поглощения полимерного раствора при температурах, соответствующих области существования мультиспиралей ($T \leq T_f^{23}$) (Рис. 4б, 5), также свидетельствует в пользу этого предположения. Образовавшиеся тройные спирали разрушаются с увеличением температуры, что сопровождается ростом оптического поглощения при $\nu=35700 \text{ см}^{-1}$ (Рис. 4б, кривая 2). В отличие от ионов Mg^{2+} , связывание которых с фосфатами однонитевых poly(rA) и poly(rU) практически не изменяет спектр поглощения этих полинуклеотидов, и кривая диспропорционального перехода имеет симметричный вид [12, 18], взаимодействие ионов Cd^{2+} с гетероатомами оснований poly(rA) дает вклад в поглощение полимерного раствора, что приводит к искажению правой ветви кривой диспропорционального перехода (Рис. 4б) и неопределенности значения $T_{m3 \rightarrow 1}$. Эта температура может быть найдена из кривой плавления, измеренной при $\nu=38500 \text{ см}^{-1}$ (либо ее первой производной). Следует отметить, что в области концентраций кадмия, индуцирующих диспропорциональные переходы в AU ($[\text{Cd}^{2+}] > 10^{-4} \text{ М}$), измеренные в максимуме спектра поглощения кривые плавления характеризуются более низкими значениями h и $(dh/dT)_{\text{max}}$. Это может быть связано с процессом компактизации однонитевых полинуклеотидов poly(rA) и poly(rU) (рис.2, кривые 3-7), образующихся при денатурации мультиспиралей, и сопутствующем ему гипохромизмом поглощения.

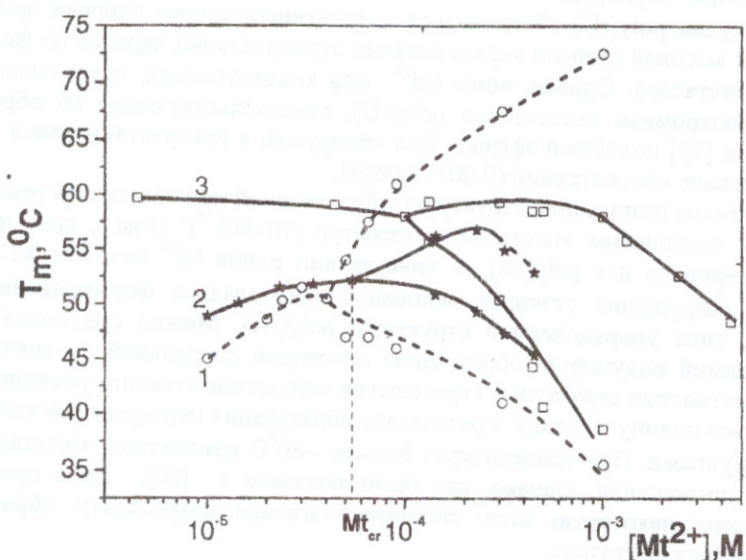


Рис. 6. Зависимости температур конформационных переходов poly(rA) · poly(rU) от концентрации ионов металлов $[\text{Mt}^{2+}]$. 1- Mg^{2+} , 0.01 М Na^+ [18]; 2- Cd^{2+} , 0.03 М Na^+ ; 3- Cd^{2+} , 0.1 М Na^+ [30].

Используя концентрационные зависимости T_m для различных конформационных переходов, мы построили диаграмму фазового состояния AU+ Cd^{2+} для 0.03 М Na^+ и сравнили ее с диаграммами для AU+ Cd^{2+} в 0.1 М Na^+ [30] и для AU+ Mg^{2+} в 0.01 М Na^+ [18] (Рис.6). Согласно этим данным, диаграммы имеют три ветви фазового равновесия, которые пересекаются в тройной точке (Mt_{cr}). Положение точки в концентрационной шкале двухвалентных ионов ($[\text{Mt}^{2+}]$) зависит от содержания ионов натрия в растворе: чем выше концентрация $[\text{Na}^+]$, тем большая концентрация $[\text{Mt}^{2+}]$ соответствует тройной точке. Ряд концентраций $[\text{Na}^+] = 0.01, 0.03$ и 0.1 М задает положения $[\text{Mt}_{\text{cr}}]$ как $4 \cdot 10^{-5}, 6 \cdot 10^{-5}$ и 10^{-4} М, что в двойном логарифмическом масштабе представляет собой линейную зависимость $[\text{Mt}_{\text{cr}}] = f([\text{Na}^+])$. Ветвь до $[\text{Mt}_{\text{cr}}]$ соответствует обычному переходу спираль-клубок ($2 \rightarrow 1$) в AU. Этот переход протекает в узком температурном интервале $(1 \pm 5)^\circ$ (Рис.4а, [18, 30]). Как и в случае с ионами Mg^{2+} , при сравнительно невысокой концентрации натрия (0.03 М) возрастание концентрации ионов Cd^{2+} сопровождается стабилизацией (на $\sim 5^\circ\text{C}$) двойной спирали AU (Рис.6), что обусловлено связыванием ионов с фосфатными группами двух- и однонитевых полимеров (Рис. 2, 3 и Таблица). Почти никакого влияния Cd^{2+} на термостабильность двунитевой AU не наблюдается при высокой концентрации одновалентных ионов (0.1 М Na^+) вследствие их экранирующего действия на фосфатные заряды. При

Влияние ионов кадмия на фазовое равновесие в двунитевой poly(rA)-poly(rU)

критической концентрации кадмия ($\sim 6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) начинают образовываться тройные спирали polyA \cdot 2polyU, область существования которых расширяется с ростом $[\text{Cd}^{2+}]$. При $[\text{Cd}^{2+}] \sim 2.3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ и 0.03 M Na^+ температурный интервал, определенный как разность между $T_m^{2,3}$ (нижняя ветвь) и $T_m^{3,1}$ (верхняя ветвь), составляет $\sim 8^\circ \text{C}$. Как следует из резкого уменьшения температуры перехода $3 \rightarrow 1$, при $[\text{Cd}^{2+}] \geq 2.3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ возникает сильная дестабилизация тройной спирали. Аналогичное поведение $T_m^{3,1}$ vs $([\text{Cd}^{2+}])$ наблюдается на фазовой диаграмме AU в условиях высокой концентрации одновалентных ионов (0.1 M Na^+), однако точка перегиба этой зависимости находится при $10^{-3} \text{ M Cd}^{2+}$. Эти величины соответствуют концентрациям ионов кадмия, при которых появляются ДУФ-спектры poly(rU). Как было показано ранее [30], спектральные изменения возникают из-за образования кадмием хелатного комплекса, включающего кислород фосфатной группы и O(4) урацила. Если следовать предложенной в работе [15] структуре тройной спирали с обратной Хугстиновской связью, где положение O(4) урацила доступно для взаимодействия (рис. 1b), то очевидно, что именно образование этого комплекса отвечает за дестабилизацию A2U. При сравнении фазовых диаграмм AU+ Cd^{2+} для 0.03 и 0.1 M Na^+ также можно видеть, что кроме возрастания концентрации $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{cr}}$, соответствующей тройной точке, в последнем случае имеет место расширение области существования тройных спиралей за счет резкого снижения $T_m^{2,3}$, так что при $10^{-3} \text{ M Cd}^{2+}$ ширина области достигает 20°C . В то же время, при 0.03 M Na^+ разница между $T_m^{2,3}$ и $T_m^{3,1}$ возрастает, в основном, из-за повышения $T_m^{3,1}$. При $[\text{Cd}^{2+}] \sim 2.3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ температурные интервалы стабильности триплексов в растворах, содержащих 0.03 и 0.1 M Na^+ , почти одинаковы.

Из рис.6 также видно, что, несмотря на подобие диаграмм AU с ионами Mg^{2+} и Cd^{2+} , имеется и отличие, обусловленное разными типами связывания катионов с AU. Как и магний, кадмий взаимодействует с фосфатными группами при низких концентрациях одно- и двухвалентных ионов. При достижении концентрации $[\text{Cd}^{2+}] \sim 8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (0.03 M Na^+) начинает образовываться комплекс кадмия с основаниями poly(rA) (Рис.2, таблица). Это вызывает сужение области существования тройных спиралей (в сравнении с таковой для ионов Mg^{2+}). Взаимодействие ионов Cd^{2+} с O(4) урацила приводит к дальнейшей дестабилизации тройной спирали.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом ДУФ-спектроскопии изучены индуцированные повышением температуры и ионами Cd^{2+} конформационные переходы в poly(rA)·poly(rU) и ее компонентах в буферном растворе (pH 6.5), содержащем 0.03 M Na^+ . Показано, что вид конформационного перехода (упорядочение \rightarrow разупорядочение \rightarrow формирование шпилек \rightarrow компактизация, агрегация) в однонитевых полинуклеотидах определяется доминирующим типом комплекса Cd-полимер, который в свою очередь зависит от концентрационного интервала ионов кадмия. Тип металлокомплекса в значительной мере определяет характер перехода в двунитевой poly(rA)·poly(rU).

Измерена диаграмма конформационного равновесия одно-, двух- и трехнитевых структур, образованных при нагревании двунитевой polyA·polyU в растворах с ионами Cd^{2+} при 0.03 M Na^+ . При ее сравнении с диаграммами для AU+ Cd^{2+} в 0.1 M Na^+ и для AU+ Mg^{2+} в 0.01 M Na^+ обнаружено, что положение тройной точки $[M]_{\text{cr}}$ в концентрационной шкале двухвалентных ионов зависит от содержания ионов натрия в растворе: чем выше концентрация $[\text{Na}^+]$, тем большая концентрация $[M]^{2+}$ соответствует тройной точке. В двойном логарифмическом масштабе зависимость $[M]_{\text{cr}} = f([\text{Na}^+])$ является линейной.

Показано, что при низких концентрациях Cd^{2+} переход спираль-клубок ($2 \rightarrow 1$) AU имеет однофазный кооперативный характер. При превышении критической концентрации $[M]_{\text{cr}}$ ионы кадмия индуцируют переход двунитевой poly(rA)·poly(rU) в трехспиральную конформацию. Связывание кадмия с основаниями poly(rA) вызывает сужение области существования тройных спиралей (в сравнении с таковой для ионов Mg^{2+}). Взаимодействие ионов Cd^{2+} с O(4) урацила приводит к дальнейшей дестабилизации тройной спирали.

ЛИТЕРАТУРА.

1. B. L'Azou, I. Dubus, C. Ohayon-Courtes, J. Labouyrie, L. Perez, C. Pouvreau, L. Juvet, J. Cambar // *Toxicology*, 2002, vol.179, p.233-245.
2. Z. Hossain, F. Huq // *J. Inorg. Biochem.*, 2002, vol. 90, p.97-105.
3. A. Hartwig // *Pure Appl. Chem.*, 2000, vol.72, p.1007-1014.
4. R. Kowara, A.A. Karaczyn, M.J. Jr. Fivash, K.S. Kasprzak // *Chem. Res. Toxicol.*, 2002, vol. 15, p.319-325.
5. P. Joseph, Y.X. Lei, W.Z. Whong, T.M. Ong // *J. Biol. Chem.*, 2002, vol.277, p.6131-6136.
6. Y.X. Lei, J.K. Chen, Z.L. Wu // *Teratog. Carcinog. Mutagen*, 2002, vol.22, p.377-383.
7. C. Giovannangeli, M. Rougee, T. Garestier, N.T. Thuong, C. Helene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, V.89, p.8631-8635.
8. D. Praseuth, A.L. Guieysse, C. Helene // *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, vol.1489, p.181-206.

9. G.Felsenfeld, D.R.Davies, A. Rich//*J.Amer.Chem.Soc.*, 1957, vol.79, p.2023-2024.
10. В.Зенгер. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот, 1987, Мир, Москва, 584 с.
11. H. Krakauer, J.M. Sturtevant// *Biopolymers*, 1968, vol.6, p. 491-512.
12. H. Krakauer// *Biochemistry*, 1974, vol.13, p. 2579-2589.
13. Ch.L. Stevens, G. Felsenfeld//*Biopolymers*, 1964, vol.2, p.293-314.
14. L.Yang and T.A. Keiderling//*Biopolymers*, 1993, vol.33, p.315-327.
15. V.Andrushchenko, Yu. Blagoi, J.H. van de Sande, H.Wieser//*J. Biomol.Struct. Dynam.*, 2002, vol.19, p.889-906.
16. U. Schlstedt, P. Aich, J. Bergman, H. Vallberg, B. Norden, A. Gräslund// *J. Mol. Biol.*, 1998, vol.278, p.31-56.
17. V.A. Sorokin, V.A. Valeev, G.O. Gladchenko, M.V. Degtiar, Yu.P. Blagoi//*Macromol. Biosci.*, 2001, vol.1, p.191-203.
18. Sorokin V.A., Valeev V.A., Gladchenko G.O., Degtiar M.V., Karachevtsev V.A, Blagoi Yu.P. *Int.J.of Biol.Macromol.* 2003; **31**, 223-233.
19. Sorokin V.A., Valeev V.A., Gladchenko G.O., Degtiar M.V., Rubina A.Yu., Andrus E.A., Blagoi Yu.P., Karachevtsev V.A. *Biophysical Bulletin*, 2001; N528, 2(9), 45-50.
20. Ю.П. Благой, В.Л. Галкин, Г.О. Гладченко, С.В. Корнилова, В.А. Сорокин, А.Г. Шкорбагов. Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах, 1991, Киев, Наукова думка, 270 с.
21. K. Aoki, In: *Nucleosides, Nucleotides and Metal Ions*, Elsevier: Amsterdam, Oxford, New York 1988, p.457-490.
22. Gellert, R.W.; Bau, R.; Martin, R.B.; Mariam, Ya.H. In *Metal ions in biological system*; Sigel, H., Ed.; Marsel Dekker: New York 1979; vol.8, p.(chapt.1-2)
23. Sigel, H.; Massoud, S.S.; Corfu, N.A. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, **116**, 2958- 2971
24. Kato Y., Kuninaka A., Yoshino H. *Agr.Biol.Chem.*, 1975, **39**,(10), 1957-1962
25. Y.A.Shin, *Biopolymers*, 1973, **12**, 2459-2475
26. Post C.B., Zimm B.H. *Biopolymers*, 1982, **21**, 2133-2137
27. Yamasaki Yu., Teramoto Y., Yoshikawa K., *Biophysical J.*, 2001, **80**, 2823-2832
28. Bloomfield V.A. *Biopolymers*, 1997, **44**, 269-282
29. Diebler H., Secco F., Venturini M. *Biophys.Chem.*, 1987, **26**, 193-205
30. Blagoi Yu., Gladchenko G., Nafie L.A., Freedman T.B., Sorokin V., Valeev V., He Y.// *Biopolymers*, 2005, v.78, 275-286
31. Pörschke, D.// *Biopolymers*. 1971; **10**: 1989-2013