

УДК 577.323.425

## ВЛИЯНИЕ ИОНОВ $Mg^{2+}$ НА СТАБИЛЬНОСТЬ ДВУХНИТЕВОГО ПОЛИНУКЛЕОТИДА, ОБРАЗОВАННОГО ПОЛИРИБОИНОЗИНОВОЙ И ПОЛИРИБОЦИТИДИЛОВОЙ ЦЕПЯМИ.

**В.А.Сорокин, В.А.Валеев, Е.Л.Усенко, В.А.Карачевцев**

*Физико-технический институт низких температур им.Б.И.Веркина*

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

Поступила в редакцию 5 июля 2005 года

Методом дифференциальной УФ-спектроскопии изучено влияние ионов  $Mg^{2+}$  на термостабильность двухцепочечного полинуклеотида PolyI•PolyC (IC) в условиях, близких к физиологическим (0,1M Na<sup>+</sup>, pH7). Начальное повышение концентрации ионов  $Mg^{2+}$  приводит к повышению температуры плавления ( $T_m$ ) и уменьшению величины гиперхромизма поглощения, обусловленного переходом спираль-клубок, индуцированным нагреванием ( $h_{max}$ ). Предполагается, что последний эффект является следствием взаимодействия ионов  $Mg^{2+}$  с  $\pi$ -электронами колец гипоксантина или цитозина (катион- $\pi$ -взаимодействие). При достижении критического значения  $[Mg^{2+}]_{cr} \sim 10^{-4}M$  происходит кооперативное уменьшение  $T_m$  и возрастание  $h_{max}$  до значений, близких к наблюдаемым в отсутствие магния. Предполагается, что при  $[Mg^{2+}] = [Mg^{2+}]_{cr}$  происходит переход IC в новое структурное состояние. При  $[Mg^{2+}] > [Mg^{2+}]_{cr}$   $T_m$  полинуклеотида снова увеличивается, а  $h_{max}$  слабо уменьшается.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** полинуклеотид PolyI•PolyC, термостабильность, ионы  $Mg^{2+}$ .

Задачи, связанные с выяснением молекулярных механизмов биологического действия ионов  $Mg^{2+}$ , проблемами экологии [1,2], а в последнее время с использованием металлокомплексов олиго- и полинуклеотидов при создании наноэлектронных схем [3], делают необходимым изучение зависимости конформационного состояния полинуклеотидов разного состава от концентрации ионов  $Mg^{2+}$  и температуры, а также зависимость от этих параметров стабильности металлокомплексов.

В настоящее время эти вопросы изучены довольно подробно для металлокомплексов природных ДНК и двухцепочечных гомополинуклеотидов, содержащих пары канонических азотистых оснований (AU и GC) [4-6]. Представляет интерес получить подобную информацию для полинуклеотидов, в состав которых входят минорные основания. В частности, гипоксантин (H). Это основание, его нуклеозид-инозин (Ino) и нуклеотид-инозинмонофосфат (IMP) также обладают биологической функциональностью. Так, Ino является действующим веществом некоторых кардиологических препаратов (например, рибоксина). В процессах репликации или транскрипции возможна замена GC-пар на IC-пары без существенных изменений структурных параметров спирали. Случайная замена может приводить к точечным мутациям, целенаправленная-позволяет использовать олиго- и полинуклеотиды, содержащие IMP, при решении задач геной инженерии [7]. Можно отметить также, что этот нуклеотид входит в антикодон некоторых t-РНК (например, валина) [8]. Наконец, двухспиральный полинуклеотид PolyI•PolyC (IC) используется при лечении некоторых вирусных заболеваний в качестве сильнодействующего агента, индуцирующего образование интерферона [8].

Рансе [6] нами была получена диаграмма конформационного равновесия для комплексов ионов  $Mg^{2+}$  с PolyA•PolyU (AU). Цель настоящей работы состояла в получении аналогичной информации для комплексов ионов  $Mg^{2+}$  с IC, структура которой в значительной мере изоморфна структуре канонической двойной спирали AU [8].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Калиевые соли полирибоинозиновой (Poly I) и полирибоцитидиловой (PolyC) кислот (Sigma Chemical Company). Дважды перекристаллизованная соль  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (Реахим). Двухцепочечную IC готовили растворением PolyI и PolyC в соотношении 1:1 в 0,001M какодилатном буфере pH7, содержащем 0,099M NaCl. Поскольку скорость самоассоциации пропорциональна квадрату их концентрации, то для того, чтобы реакция образования IC прошла наиболее полно, раствор, в котором суммарная концентрация фосфора полинуклеотидов (P) составляла 0,008±0,01M, выдерживали в течение

120 часов при 4°C. Перед измерениями раствор IC разбавляли при комнатной температуре ( $T_0=22\pm 1^\circ\text{C}$ ) до концентрации  $P=(3-5)\cdot 10^{-5}$  М. Такая малая концентрация полимера сводила к минимуму агрегацию между макромолекулами в присутствии больших концентраций ионов  $\text{Mg}^{2+}$ . Так, заметного рассеяния света на агрегатах не обнаруживали вплоть до  $0,007\text{M Mg}^{2+}$  ни при комнатной, ни при максимальной ( $92^\circ\text{C}$ ) температурах. Концентрацию фосфора IC определяли по коэффициенту молярной экстинкции  $\epsilon=4800\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  при  $\nu=38500\text{ cm}^{-1}$  [9]. Концентрацию ионов  $\text{Mg}^{2+}$ , вводимых в раствор непосредственно перед измерениями, определяли по весу и дополнительно контролировали комплексонометрическим методом. Ошибка определения величины концентрации ионов  $\text{Mg}^{2+}$  не превышала 0,5%, концентрации фосфора полинуклеотидов -1,5% [9,10].

Зависимость изменения оптической плотности растворов полинуклеотидов ( $\Delta A$ ) от температуры (кривые плавления), а также зависимость  $\Delta A$  от волнового числа ( $\nu$ ) при различном содержании ионов  $\text{Mg}^{2+}$  измеряли на спектрофотометре Specord UV VIS (Carl Zeiss Jena, Germany). Последний был соединён с персональным компьютером, который осуществлял запись кривых плавления полинуклеотидов в форме температурных зависимостей гиперхромного коэффициента  $h(T)=[\Delta A(T)/A_{T_0}]_{\nu_m}$  ( $A_{T_0}$ -оптическая плотность раствора при  $T=T_0$ ), а также расчёт производных  $dh(T)/dT$ . Кривые плавления IC регистрировали при волновом числе  $\nu_m=40300\text{ cm}^{-1}$ , соответствующем максимальному изменению поглощения полинуклеотида при нагревании (рис.1). Их регистрацию проводили по дифференциальной схеме: в обоих каналах спектрофотометра находились идентичные растворы полинуклеотидов или их комплексов с ионами  $\text{Mg}^{2+}$ . Эталонную кювету термостатировали в пределах  $\pm 0,5^\circ\text{C}$ , рабочую нагревали со скоростью 0,25 град/мин до  $92^\circ\text{C}$ . При этой температуре измеряли спектр  $\Delta A_h(\nu)$ , соответствующий изменению спектра поглощения IC, вызванному переходом упорядоченной спирали в полностью разупорядоченное клубкообразное состояние. Эти изменения соответствуют максимальным значениям гиперхромного коэффициента  $h(\nu)_{\max}$ . Изменение спектров поглощения IC, индуцированное ионами  $\text{Mg}^{2+}$ , измеряли при  $T=T_0$ , используя четырёхкюветную схему.

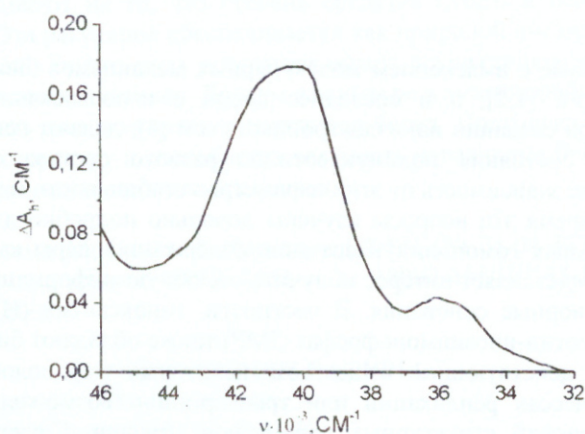


Рис.1. Изменение спектра поглощения PolyI•PolyC, индуцированное нагреванием от  $20^\circ\text{C}$  до  $92^\circ\text{C}$ . Форма спектра  $\Delta A_h(\nu)$  не зависит от концентрации ионов  $\text{Mg}^{2+}$ .

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во всём измеренном диапазоне волновых чисел ( $46000\div 32000\text{ cm}^{-1}$ ) при  $T=T_0$  ионы  $\text{Mg}^{2+}$  практически не изменяют спектр поглощения IC (изменения находятся в пределах 0,003 о.е.), что свидетельствует об отсутствии образования ионами внутрисферных координационных связей с гетероатомами колец гипоксантина и цитозина IC. При ионизации гидроксильной группы рибозы СМР спектра УФ-спектра также должен измениться [11]. Таким образом ионы  $\text{Mg}^{2+}$  не взаимодействуют с атомом кислорода рибозного кольца полицитидиловой нити IC, что является естественным для раствора, имевшего рН7, поскольку рК ионизации рибозы СМР~13 [11].

Форма кривых плавления полинуклеотидов является чувствительным индикатором их конформации при комнатной температуре. Так, из рис.2а видно, что одноцепочечная PolyI, растворённая в 0,001М какодилата натрия, после добавления в раствор 0,099М  $\text{Na}^+$  и уменьшения её концентрации до  $P=5\cdot 10^{-5}$  М во всяком случае в течение 90 мин. остаётся в конформации одноцепочечного клубка. Однако после

## Влияние ионов $Mg^{2+}$ на стабильность двухнитевого полинуклеотида, ...

выдержки в растворе, содержащем  $0,1M Na^+$ , в течение месяца, PolyI ( $P \sim 0,01M$ ) переходит в состояние четырёхцепочечной спирали (рис.2а). При  $0,1M Na^+$  ( $P \sim 10^{-4}M$ ) её температура плавления  $T_m$  ( $T_m = T$ , при которой производная  $dh(T)/dT$  имеет максимальное значение), равна  $27^\circ C$ , что удовлетворительно согласуется со значением  $T_m = 29^\circ C$ , полученным Говардом и Милсом [4]. Плавление четырёхцепочечной спирали характеризуется высокой кооперативностью ( $dh/dT = 0,16 \text{ град}^{-1}$ ) и сравнительно большим значением гиперхромного коэффициента ( $h_{max} = 0,5$ ). Плавление PolyC (рис.2а) осуществляется в интервале температур, растянутом на десятки градусов ( $dh/dT = 0,002 \text{ град}^{-1}$ ) и сопровождается существенно меньшим возрастанием поглощения ( $h_{max} = 0,13$ -рис.2а). Малые значения  $dh/dT$  и  $h$  обусловлены тем, что в водном растворе при нейтральных pH и  $0,1M Na^+$  PolyC находится в конформации частично расплавленной одноцепочечной спирали [12].

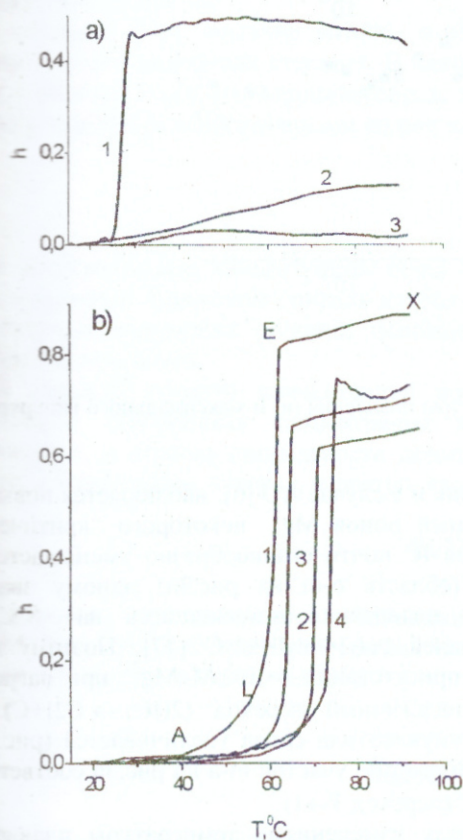


Рис.2. Кривые плавления полинуклеотидов в растворе, содержащем  $0,1M Na^+$  и ионы  $Mg^{2+}$ .

а) 1-четырёхцепочечная PolyI (выдержка одноцепочечной PolyI в течение месяца), 2- одноцепочечная PolyC, 3- одноцепочечная PolyI (выдержка в течение 90 мин.).

Кривые плавления PolyI регистрировали при  $v_m = 40300 \text{ см}^{-1}$ , PolyC-  $v_m = 37300 \text{ см}^{-1}$ . ( $[Mg^{2+}] = 0$ )  
 б) PolyI•PolyC: 1- $[Mg^{2+}] = 0$ , 2- $1,1 \cdot 10^{-4}M Mg^{2+}$ ,  
 Предположительно PolyI•PolyI•PolyC:  
 3- $1,25 \cdot 10^{-4}M Mg^{2+}$ , 4- $0,007M Mg^{2+}$ .

естественно приписать плавлению спиральных участков PolyC, образовавшейся в результате разделения нитей.

В связи с вышесказанным, следовало ожидать, что зависимости  $T_m$  от концентрации ионов  $Mg^{2+}$  для AU [6] и IC будут близки. Однако эта зависимость для IC имеет необычный вид (рис.3а).

Образование двойной (или четырёхцепочечной) спирали PolyC возможно лишь в кислых растворах [4,12,13]. Таким образом при длительной выдержке эквимолярной смеси PolyI и PolyC в принципе могут формироваться как двойные спирали IC, так и четырёхцепочечные спирали 4•I [4,14]. Тем не менее образование последних, по-видимому, не происходит: в области  $(25 \div 40)^\circ C$  отсутствует какой-либо гиперхромизм поглощения, а температура плавления образовавшегося полинуклеотида ( $T_{mo}$ ) равна  $61^\circ C$  (рис.2б). Однако при приготовлении новых смесей PolyI и PolyC имел место довольно большой разброс значений  $T_{mo}$ , достигавший  $\pm 1,5^\circ C$ . В пределах этого разброса среднее значение  $T_{mo} = 61,5^\circ C$  совпадает со значением  $T_{mo} = 60^\circ C$ , полученным в работе [15] для PolyI•PolyC. Дополнительным подтверждением того, что при смешении PolyI и PolyC образуется IC является совпадение полученного нами при  $0,01M Na^+$  значения  $T_{mo} = 38,3^\circ C$  с величиной  $T_{mo} = 38^\circ C$ , найденной для IC в работе [10]. Удовлетворительно согласуются и значения  $h_{max}$  при  $v = 38500 \text{ см}^{-1}$ :  $0,29$  в настоящей работе,  $0,26$  в [10]. Большая величина  $h_{max}$  (рис.2б), при  $v = v_m$  свидетельствуют о высокой степени спиральности полинуклеотида, образовавшегося при смешении PolyI и PolyC.

Пары AU в PolyA•PolyU и IC в PolyI•PolyC образованы двумя водородными связями и, кроме того, как уже отмечалось, эти двойные спирали изоструктурны [8]. Это, по-видимому, определяет малое отличие термостабильности IC (рис.2) и AU (для AU при  $0,1 M Na^+$  и  $0,01M Na^+$ , соответственно,  $T_{mo} = (56 \div 58)^\circ C$  [15,16] и  $T_{mo} = (37,5 \div 39)^\circ C$  [6,16]). Форма кривых плавления AU и IC также подобна. В частности, кривые плавления IC также как и AU [6], распадаются на три основных участка: участок A-L, по-видимому, обусловлен расплетанием IC с концов [6] или плавлением спиральных участков одноцепочечной PolyC, не образовавших комплементарные пары с PolyI; участок L-E, характеризуемый производной  $dh/dT \sim (0,2 \div 0,3) \text{ град}^{-1}$ , соответствующий переходу IC  $\rightarrow$  I+C (переход 2  $\rightarrow$  1), и участок E-X, который

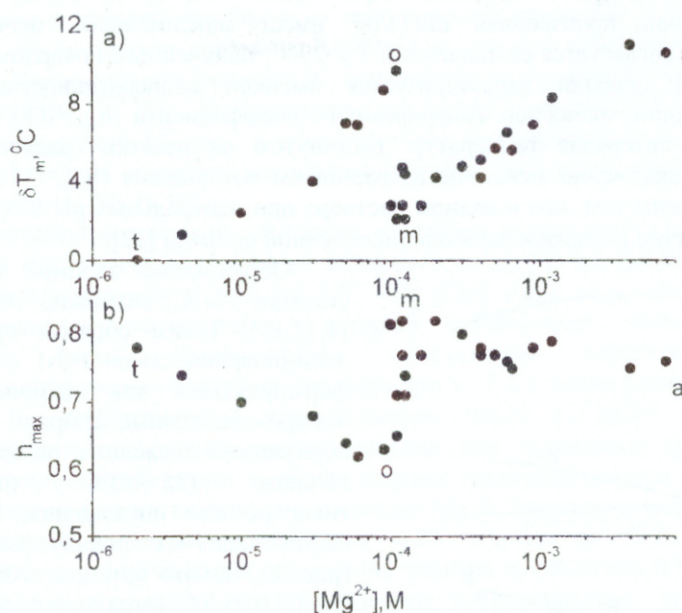


Рис. 3. Концентрационные зависимости изменения температуры плавления (а) и максимального гиперхромного коэффициента при  $v_m = 40300 \text{ см}^{-1}$  (б).

В области малого содержания магния (участок t-o), как и в случае AU [6], наблюдается повышение термостабильности IC, но, при достижении концентрацией ионов  $\text{Mg}^{2+}$  некоторого "критического" значения ( $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{cr}} = (1.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) температура плавления IC почти скачкообразно уменьшается. Так что в пределах неопределённости величины  $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{cr}}$  (область o-m на рис.3а) одному значению концентрации магния соответствует две температуры плавления, отличающиеся на  $\sim 8^\circ\text{C}$ . При нейтральных pH возможно образование тройных спиралей PolyI•PolyI•PolyC [17]. Поэтому можно предположить, что, как и в случае AU, для которой в присутствии  $\sim 5 \cdot 10^{-5} \text{ M Mg}^{2+}$  при нагревании начинается переход  $2 \rightarrow 3$  [6], для IC имеет место аналогичный переход ( $2(\text{IC}) \rightarrow \text{C2I} + \text{C}$ ). При  $[\text{Mg}^{2+}] > [\text{Mg}^{2+}]_{\text{cr}}$  термостабильность образовавшегося полинуклеотида снова увеличивается (рис.3а) и достигает предельного значения при  $\sim 0.003 \text{ M Mg}^{2+}$ . По-видимому, участок m-a на рис.3а соответствует изменению температуры перехода PolyI•PolyI•PolyC  $\rightarrow \text{I} + \text{I} + \text{C}$  (переход  $3 \rightarrow 1$ ).

Как видно из рис.3б, наблюдается корреляция между изменениями температуры плавления и величины  $h_{\text{max}}$ . Так, на участке t-o значение  $h_{\text{max}}$  уменьшается, но в узкой области содержания ионов, соответствующей  $[\text{Mg}^{2+}] \sim [\text{Mg}^{2+}]_{\text{cr}}$ , вновь возрастает, достигая значения, близкого к величине  $h_{\text{max}}$  при  $[\text{Mg}^{2+}] = 0$  ( $(h_{\text{max}})_0 = 0.82 \pm 0.03$ ). При дальнейшем повышении концентрации ионов наблюдается некоторое уменьшение  $h_{\text{max}}$ , которое, однако, находится в пределах максимального экспериментального разброса значений этого параметра (рис.3б).

Известно, что кулоновское взаимодействие ионов щелочных и щелочноземельных металлов с отрицательными зарядами на атомах кислорода (фосфатных групп одно- и двухцепочечных полинуклеотидов) приводит к повышению их термостабильности [4-6, 16]. При наличии в макромолекулах расплавленных звеньев это взаимодействие вызывает их переход в спиральную конформацию, следствием чего должно быть возрастание величины  $h_{\text{max}}$ . Поскольку величина  $h_{\text{max}}$  пропорциональна начальной степени спиральности полинуклеотида, то данные рис.3б, позволяют сделать вывод о том, что ионы  $\text{Mg}^{2+}$  индуцируют её уменьшение в области t-o. Причина этой аномалии может состоять в следующем. Согласно анализу структуры комплексов гидратированных ионов магния с фрагментами ДНК и РНК, наряду с образованием комплексов с одиночными парами электронов ионы  $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$  взаимодействуют с  $\pi$ -электронной системой колец азотистых оснований полинуклеотидов [18]. Например, в случае комплексов магния с дуплексами декамера и додекамера Дикерсона, состоящих в основном из последовательностей GC-пар, а также с плечом антикодона дрожжевой фенилаланиновой t-РНК имеет место катион- $\pi$ -взаимодействие  $\text{Mg}(\text{OH}_2)_6^{2+}$  с цитозином. Существенно, что это взаимодействие приводит к структурным изменениям, сопровождающимся нарушением стекинга [18]. В связи с этим можно предположить, что наблюдаемое в нашем случае уменьшение  $h_{\text{max}}$  обусловлено

## Влияние ионов $Mg^{2+}$ на стабильность двухнитевого полинуклеотида, ...

именно этим эффектом. Данные  $^1H$ -ЯМР-спектроскопии, полученные, правда, для комплексов ионов  $Mn^{2+}$  с IC, не противоречат этому предположению, поскольку свидетельствуют о том, что наиболее вероятным местом расположения марганца является большая бороздка двойной спирали IC [9]. При этом расстояние  $d$  между ионом  $Mn^{2+}$  и иминопротоном гипоксантина, образующего водородную связь с N3 цитозина, составляет 4,7Å [9]. То есть удовлетворяет необходимому условию возникновения катион- $\pi$ -взаимодействий ( $d < 5,2\text{\AA}$ ), способного ослабить или нарушить эту связь [18].

Известно, что образование внутрисферной координационной связи с гетероатомами азотистых оснований приводит к сдвигу и изменению интенсивности их полос поглощения, следствием чего является появление ДУФС определённой формы [4], отличной от обусловленной разупорядочением полинуклеотида (рис.1). Однако катион- $\pi$ -взаимодействие магния с ДНК и РНК является внешнесферным, чем, по-видимому, обусловлено отсутствие изменения спектров поглощения IC в присутствии ионов  $Mg^{2+}$ .

Согласно [18], наличие катион- $\pi$ -взаимодействий дестабилизирует дуплекс. Однако, фактом является лишь нарушение стекинга. В какой мере это влияет на термостабильность неясно, поскольку так изменения  $T_m$  и его величина определяются различием в константах связывания ионов с двух- и одноцепочечными конформациями полинуклеотидов [6].

### ВЫВОДЫ

1. В области малых концентраций ионы  $Mg^{2+}$  уменьшают величину возрастания поглощения IC, обусловленного переходом спираль-клубок при нагревании. Предполагается, что этот эффект является результатом нарушения стекинга оснований, вызванного взаимодействием ионов с  $\pi$ -электронами ароматических колец.
2. В широкой области концентраций ионы  $Mg^{2+}$  повышают температуру плавления IC. Однако существует критическая концентрация ионов, при которой термостабильность полинуклеотида понижается, а степень спиральности повышается. Возможной причиной этого является переход IC в новую конформацию, которая, вероятно, является тройной спиралью.

### БЛАГОДАРНОСТИ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] J.Durlach, M.Bara, A.Guiet-Bara in: Metal ions in Biological Systems (H.Sigel and A.Sigel, Eds.) V.26, P.243-247, Marcel Dekker Inc. New-York-Basel 1990.
- [2] A.Hartwig, M.Asmus, I.Ehleben, et al. // Environ Health Perspect. 2002, V.110 Suppl 5, P. 797-799.
- [3] A.Rakitin, P.Aich, C. Papadopoulos, et al. // Phys.Rev.Letters. 2001, V.86, №16, P.3670-3673.
- [4] Ю.П.Благой, В.Л.Галкин, Г.О.Гладченко, С.В.Корнилова, В.А.Сорокин, В.А.Шкорбатов. // Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах (В.Я.Малеев ред.), Наукова думка, 1991, Киев, 270 с.
- [5] V.A.Sorokin, V.A.Valeev, G.O.Gladchenko, et al. // Macromol.biosci.2001, V.1, P.191-203.
- [6] V.A.Sorokin, V.A.Valeev, G.O.Gladchenko, et al. // Int.J.Biol.Macromol.2003, V.31, P.223-233.
- [7] S.Arnott, P.J.Bond // Science. 1973, V.181, P.68-69.
- [8] В.Зенгер. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. 1987. Мир. Москва. 584 с.
- [9] Ding-Kiwo Chang, D.R.Keams // Biopolymers, 1986, V.25, P.1283-1297.
- [10] R.L.Ratliff, Jung-Jen Liu, M.R.Vaughan, D.M.Gray // Biopolymers, 1986, V.25, P.1735-1750.
- [11] А.В.Бородавкин, Э.И.Будовский, Ю.В.Морозов, Ф.А.Савин, Н.А.Симукова. Молекулярная биология. Электронная структура, УФ-спектры поглощения и реакционная способность нуклеиновых кислот (М.В.Волькенштейн ред.), 1977. т.14, ВИНТИ. Итоги науки и техники, Москва.
- [12] V.A.Sorokin, Yu.P.Bлагой, V.A.Valeev, O.A.Antonova // J.Inorg.Biochemistry 1985, V.24, P.91-111.
- [13] L.Chen, L.Cai, X.Zhang, A.Rich // Biochemistry, 1994, V.33, P.13540-13546.
- [14] G.L.Eichhorn, E.Tarien // Biopolymers, 1967, V.5, P.273-281.
- [15] H.H.Klump // Can.J.Chem., 1988, V.66, P.804-811.
- [16] H.Krakauer, J.M.Sturtevant // Biopolymers, 1968, V.6, P.491-512.
- [17] M.Mills, J.Völker, H.H.Klump // Biochemistry, 1996, V.35 (41), P.13338-13344.
- [18] L.McFail-Isom, X.Shui, L.D.Williams // Biochemistry, 1998, V.37, №49, P.17105-17111.