

УДК 577.32

СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИОНОВ Cu^{2+} С ДНК

Ю.В. Коваль, В.В. Товстяк

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, 61077, г. Харьков, пл. Свободы, 4
e-mail: yurij.v.koval@univer.kharkov.ua

Поступила в редакцию 20 мая 2005 г.

Получены ИК-спектры поглощения растворов тимусной ДНК в H_2O и D_2O с различным содержанием ионов меди: $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]=0,05\div 0,8$ ($[\text{Na}^+]=0,15 \text{ M}$). Существенное увеличение интенсивности полос в области поглощения сахаро-фосфатного остова, наблюдаемое при отношении $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]=0,4\div 0,6$, указывает на взаимодействие ионов меди с фосфатными группами ДНК. Довольно узкий интервал концентраций меди, в котором наблюдается увеличение поглощения, свидетельствует в пользу конформационного перехода, индуцируемого в ряде работ компактизацией ДНК. Дальнейшее увеличение содержания ионов меди в растворе ведет к денатурации молекулы ДНК, что сопровождается спадом интенсивности полос поглощения сахаро-фосфатного остова и гиперхромизмом в области колебаний азотистых оснований. Полученные методом УФ-спектроскопии кривые плавления ДНК позволяют сделать вывод, что при $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]=0,05\div 0,1$ в растворе с ионной силой 0,15 М ионы меди не оказывают существенного влияния на такие параметры перехода спираль-клубок как температура перехода, интервал перехода и величина гиперхромного эффекта. Однако уже при $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]=0,2$ температура плавления ДНК понижается, а интервал плавления уширяется.

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

Ионы металлов, способные к специфическому связыванию с молекулой ДНК, существенно влияют на стабильность её вторичной структуры и могут вызывать конформационные перестройки. К числу таких ионов относятся ионы меди Cu^{2+} . Связывание ионов Cu^{2+} с ДНК приводит к значительным изменениям конформационного состояния ДНК, что объясняется более сильной тенденцией Cu^{2+} к связыванию с азотистыми основаниями, чем у ионов многих других металлов [1-3].

В работах [4-8] было показано, что под действием ионов Cu^{2+} , молекула ДНК может переходить в компактное состояние, вследствие возможного образования межнитевых координационных связей через ион металла.

Ионы меди, связываясь с фосфатными группами двойной спирали ДНК, вследствие экранирования отрицательного заряда на этих группах, уменьшают электростатическое расталкивание комплементарных цепей и, таким образом, должны оказывать стабилизирующее действие на вторичную структуру молекулы ДНК. Однако способность этих ионов образовывать координационные связи с азотистыми основаниями приводит к противоположному эффекту. Соотношение вкладов эффектов, обусловленных этими двумя видами взаимодействия ионов Cu^{2+} с молекулой ДНК и определяет конечный результат.

Проблема взаимодействия ионов двухвалентных металлов с ДНК и ее компонентами была исследована различными экспериментальными и теоретическими методами в работах многих авторов. В ряде работ [9-11] установлено, что ионы меди, взаимодействуя с фосфатами, способны стабилизировать структуру ДНК при $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] < 0,3$, что выражается в росте температуры перехода спираль-клубок.

Ранее [12] нами были исследованы комплексы ДНК с ионами Cu^{2+} в водных растворах с отношением $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]=0,2\div 0,8$. Судя по полученным в прошлой работе ИК-спектрам в области поглощения сахаро-фосфатного остова и кривым плавления, ионы Cu^{2+} взаимодействуют с фосфатными группами ДНК, при этом для $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]=0,4\div 0,6$ имеет место конформационный переход (без разрушения двойной спирали), который, возможно, представляет собой явление компактизации ДНК. Эти результаты не противоречат работам [4-8]. Также было установлено, что взаимодействие ионов меди во всем исследованном интервале значений $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]$ приводит к понижению температуры перехода спираль-клубок, что указывает на взаимодействие меди с азотистыми основаниями, причем при $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] > 0,7$ происходит денатурация молекулы ДНК.

В настоящей работе исследовалось влияние ионов меди в растворе ДНК при отношении $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]=0,05\div 0,8$ и концентрации ионов Na^+ в образцах 0,15 М, на конформационное состояние молекулы ДНК и на некоторые параметры перехода спираль-клубок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовалась ДНК (натриевая соль) тимуса теленка производства "Sigma" с молекулярной массой $\sim 10^7$ Да, содержанием белка не более 3% и гиперхромным эффектом 39% на $\lambda=260$ нм.

Для приготовления растворов ДНК в тяжелой воде использовали D_2O с содержанием основного вещества 99,84%. Все используемые реактивы были квалификации "хч" и "осч".

С целью вытеснения из довольно вязких исходных растворов ДНК пузырьков воздуха, вносимых вместе с волокнами ДНК, растворы подвергали центрифугированию. Для полного растворения ДНК растворы выдерживали при температуре $4^\circ C$ в течение 4 суток.

Концентрация фосфатов в образцах, предназначенных для спектроскопических исследований в ИК-области, составила $6,5 \cdot 10^{-2}$ М. Такая концентрация была выбрана, как достаточная для получения удовлетворительных по интенсивности спектров. Для УФ-спектроскопии готовили образцы с концентрацией ДНК $6,1 \cdot 10^{-5}$ М по фосфору. Концентрацию ДНК в растворах определяли спектрофотометрически [13].

Комплексы ДНК с ионами Cu^{2+} готовили непосредственно перед измерениями, добавляя раствор $CuCl_2$ соответствующей концентрации к исходному раствору ДНК.

Для записи ИК-спектров ДНК и ее комплексов с медью использовали флюоритовые кюветы модели Фишмана [14]. Компенсацию светопоглощения растворителя производили в области $3700 \dots 3750$ cm^{-1} и $2720 \dots 2770$ cm^{-1} (для H_2O и D_2O , соответственно), путем регулировки толщины рабочего слоя кюветы сравнения, заполненной растворителем. Оптическую плотность D определяли методом базовой линии [15], за которую принимали значение D при построении общего спектра поглощения в районе, где отсутствуют полосы поглощения. Спектры поглощения регистрировали на двухлучевом спектрофотометре "Specord 75IR".

Кривые плавления комплексов ДНК с ионами меди были получены путем регистрации оптической плотности образцов на длине волны 260 нм при повышении температуры в кюветах со скоростью $0,2^\circ C/мин$. Температуру внутри кварцевых кювет с длиной оптического пути 1 см контролировали медь-константановой термопарой с фторопластовым покрытием.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных в работе спектров показал, что ионы меди вызывают существенные изменения в ИК-спектрах ДНК как в области колебаний сахара-фосфатного остова, так и азотистых оснований.

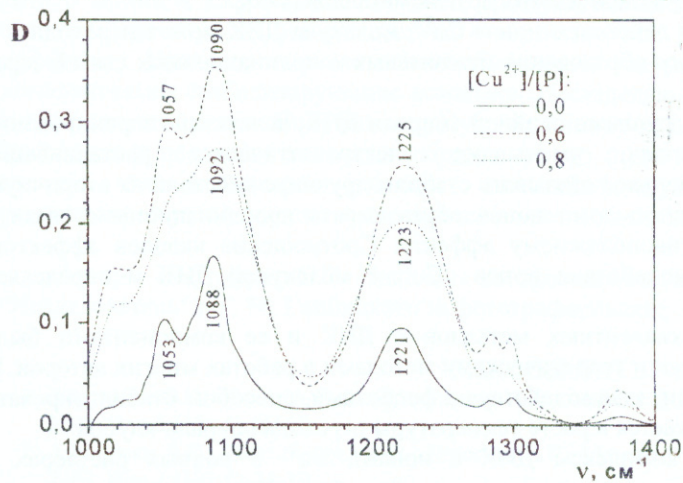


Рис. 1. ИК-спектры растворов ДНК в H_2O ($[Na^+]=0,15$ М) с различным содержанием ионов Cu^{2+} .

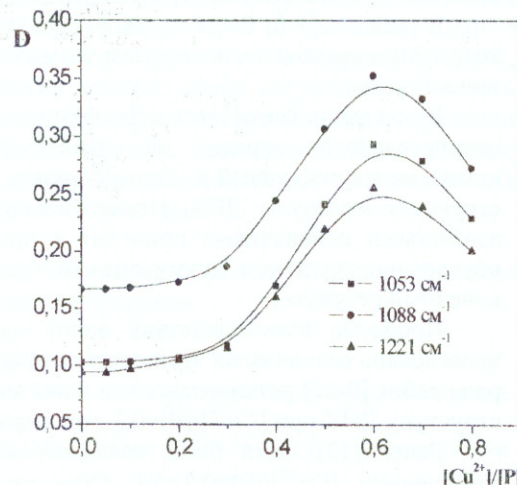


Рис. 2. Зависимость оптической плотности D (на разных частотах) в области поглощения сахара-фосфатного остова ДНК от концентрации ионов Cu^{2+} в растворе.

Рассмотрим изменения в области поглощения сахара-фосфатного остова. На рис.1 представлены ИК-спектры растворов ДНК с различным содержанием ионов меди. Видно, что интенсивность полос поглощения спектра ДНК зависит от содержания ионов меди в растворе, начиная с отношения $[Cu^{2+}]/[P]=0,3$ и более (рис. 2).

Положение полос в спектре не меняется существенно до уровня концентрации меди в растворе, при которой $[Cu^{2+}]/[P]<0,7$. Зависимость величины поглощения от содержания ионов меди в растворе приобретает наиболее крутой характер в интервале отношений $[Cu^{2+}]/[P]=0,4 \div 0,6$. На этом участке

Спектроскопическое исследование взаимодействия ионов Cu^{2+} с ДНК

зависимости интенсивности полос поглощения, обусловленных симметричными (1088 см^{-1}) и антисимметричными (1221 см^{-1}) колебаниями фосфатных групп, вырастают на 87% и 122%, соответственно, и на 149% для полосы внутривалентных валентных колебаний дезоксирибозы (1053 см^{-1}).

Наблюдаемое увеличение поглощения в области колебаний сахаро-фосфатного остова может быть вызвано поляризацией связей фосфатных групп при взаимодействии с ними противоположно заряженных катионов Cu^{2+} , однако немонотонный (скачкообразный) характер зависимости интенсивности полос поглощения от концентрации ионов меди скорее указывает на конформационный переход, сопровождающийся сильной поляризацией фосфатных групп. Поскольку положение полос в спектре существенно не изменяется и сохраняется характерная для В-формы ДНК полоса 1053 см^{-1} [16], а также нет заметных изменений в области поглощения азотистых оснований для спектров растворов ДНК в D_2O , можно заключить, что конформационный переход ДНК происходит с сохранением двойной спирали и возможно представляет собой явление компактизации молекулы ДНК.

Однако при более высоких концентрациях ионов меди ($[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] > 0,6$) происходит денатурация молекулы ДНК, сопровождающаяся уменьшением общей интенсивности спектра и изменением его формы: полоса 1053 см^{-1} превращается в плечо, а полосы колебаний фосфатов претерпевают высокочастотный сдвиг на $2-4 \text{ см}^{-1}$ (рис. 1). На денатурацию ДНК при $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] > 0,6$ указывают также характерные для денатурированной ДНК [17] изменения спектра в области колебаний азотистых оснований ДНК (рис. 3).

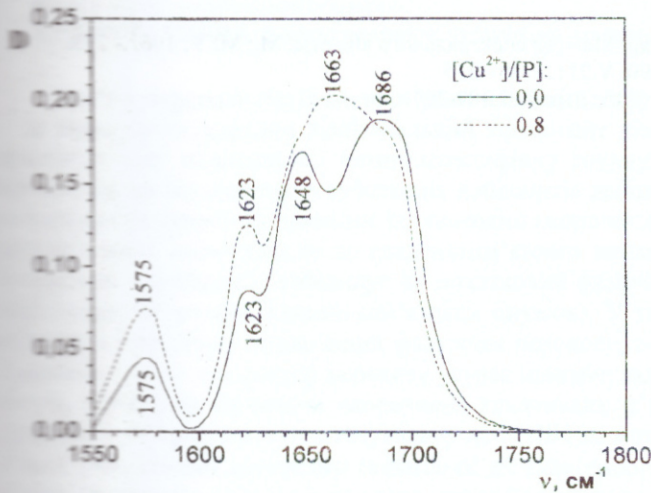


Рис. 3. ИК-спектры растворов ДНК в D_2O ($[\text{Na}^+] = 0,15 \text{ M}$) с различным содержанием ионов Cu^{2+} .

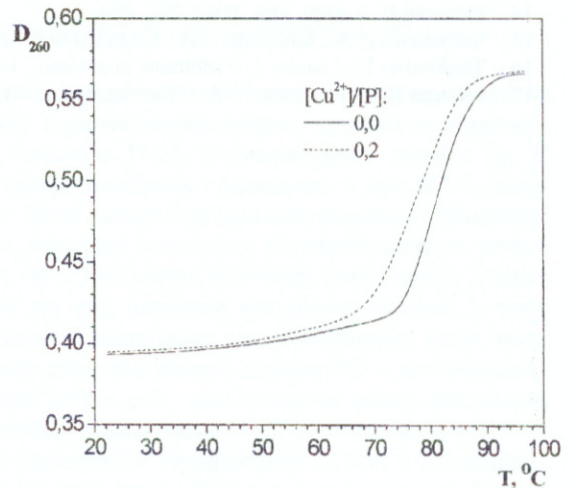


Рис. 4. Кривые плавления ДНК и её комплекса с Cu^{2+} .

Известно, что ионы меди способны понижать температуру перехода спираль-клубок, а при низких ионных силах ионы Cu^{2+} в малых концентрациях ($[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] = 0,1 \div 0,3$) могут даже повысить температуру плавления ДНК [1,9-12]. Интересно, какое влияние окажут ионы меди на температуру плавления ДНК в растворе с более высоким значением ионной силы. Для ответа на этот вопрос, используя метод УФ-спектроскопии, нами были получены кривые плавления ДНК в интервале значений $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] = 0,05 \div 0,2$ при концентрации ионов Na^+ в растворе $0,15 \text{ M}$. Как видно из рис. 4, температура плавления $T_{\text{пл}}$ плавящейся ДНК в отсутствие ионов меди составила $81,5 \text{ }^\circ\text{C}$, интервал плавления $\Delta T_{\text{пл}}$ - $13,9 \text{ }^\circ\text{C}$. Не наблюдается существенных отличий параметров перехода спираль-клубок, по сравнению с контрольной ДНК, для образцов ДНК с ионами Cu^{2+} при $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] = 0,05$ и $0,1$. Но уже при $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] = 0,2$ $T_{\text{пл}}$ понижается до $77 \text{ }^\circ\text{C}$, а интервал плавления уширяется. Кривые плавления для растворов ДНК с более высоким содержанием ионов меди были получены в предыдущей работе [12], в которой было установлено, что присутствие в растворе ионов Cu^{2+} при $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] = 0,2 \div 0,8$ ведет к снижению $T_{\text{пл}}$ вплоть до денатурации ДНК при комнатной температуре.

ВЫВОДЫ

Ионы Cu^{2+} связываются с фосфатными группами ДНК, и при $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] = 0,4 \div 0,6$ вызывают конформационный переход, который может представлять собой явление компактизации ДНК. На основании полученных в последних двух работах результатов, можно заключить, что при значениях ионной силы раствора, близким к физиологическим, ионы меди в достаточно высоких концентрациях

($[Cu^{2+}]/[P]=0,2\div 0,8$) вызывают существенное понижение стабильности вторичной структуры ДНК, а в случае малых концентраций (при $[Cu^{2+}]/[P]<0,2$) не оказывают заметного влияния (ни стабилизирующего, ни дестабилизирующего) на ее вторичную структуру.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Благой Ю.П., Галкин В.Л., Гладченко Г.О., Корнилова С.В. и др. Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах. Киев: Наук. думка, 1991. 272с.
2. Корнилова С.В., Капинос Л.Е., Томкова А. и др. // Биофизика. 1994. Т.39. Вып.3. С.423-436
3. Sissoeff J., Grisvaldt J., Cuile E. // Progr. Biophys. and Mol. Biol. 1976. V.31. №2. P.165-199
4. Корнилова С.В., Сорокин В.А., Благой Ю.П., Валеев В.А., Арутюнян С.Г. // Мол. биология. 1991. Т.25. Вып.3. С.648-657
5. Hackl E., Kornilova S., Kapinos L et. al. // J. Mol. Struct. 1997. V.408/409. P.229-232
6. Hackl E., Kornilova S., Blagoi Yu. // Metal ions in biology and medicine. 1998. V.5. P.74-79
7. Е.В. Хакл, С.В. Корнилова, Ю.П. Благой // Біофізичний вісник. 1998. №1. С.62-70
8. Kornilova S., Hackl E., Kapinos L., et. al. // Acta Biochim. Polon. 1998. V.45. №1. P.107-117
9. Getashvili G.R., Gerasimov V.V., Zaalishvili M.M. // Stud. Biophys. 1976. V.60. P.83-88.
10. Корнилова С.В., Ясем П., Григорьев Д.Н. и др. // Биофизика. 1998. Т.43. Вып.1. С.46-52.
11. Благой Ю.П., Сорокин В.А., Валеев В.А. и др. // Молекулярная биология. 1978. Т.12. Вып.4. С.795-805
12. Коваль Ю.В., Благой Ю.П., Товстяк В.В. // Біофізичний вісник. 2003. Вип.1(12). №1. С.40-43
13. Muller W., Crothers D.M., // Eur. J. Biochem. 1975. V.54. P.267-277
14. Fishman E. // Appl. Opt. 1962. №1. 493
15. Бабушкин А.А., Бажулин П.А., Королев Ф.В. и др. Методы спектрального анализа. М.: МГУ, 1962.- 273с.
16. Taillandier E., Liquier J. // Methods in enzymol. 1990. V.211. P.307-335
17. Малеев В.Я., Семенов М.А. // Биофизика. 1971. Т.16. Вып.3. С.389-397