

МОЛЕКУЛЯРНА БЮФІЗИКА

УДК 577.323.425

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ Na^+ И Cd^{2+} НА СТАБИЛЬНОСТЬ ТРОЙНОЙ СПИРАЛИ ПОЛИ I · ПОЛИ А · ПОЛИ I

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

*Физико-технический институт низких температур им. Б.Н. Веркина НАН Украины;**пр. Ленина, 47, Харьков, 61103, Украина*

Поступила в редакцию 5 сентября 2002 г.

Изучено влияние ионов Na^+ ($0,1\div 2\text{M}$) и ионов Cd^{2+} ($10^{-6}\div 10^{-3}\text{M}$) на стабильность и структуру трехцепочечной А2I. Показано, что плавление А2I представляет собой переход $3\rightarrow 1$ ($\text{A2I}\rightarrow\text{A}+\text{I}+\text{I}$). В соответствии с полиэлектролитными теориями, температура этого перехода является линейной функцией логарифма содержания ионов Na^+ в растворе. Рассчитаны линейная плотность заряда на поверхности одноцепочечной поли I ($\xi=1,9$) и фактор кооперативности перехода $3\rightarrow 1$ А2I ($\sigma\sim 0,001$). В присутствии ионов Cd^{2+} плавление А2I сохраняет все особенности перехода $3\rightarrow 1$, но при концентрации кадмия, превышающей $2\cdot 10^{-5}\text{M}$, термостабильность А2I начинает уменьшаться. Причина этого - взаимодействие кадмия с N7 глицозидина, приводящее к изменению структуры А2I, которая, однако, при комнатной температуре вплоть до $5\cdot 10^{-5}\text{M}$ Cd^{2+} остается трехцепочечной спиралью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: многоцепочечные полинуклеотиды, термостабильность, ионы металлов

В последнее время резко возрос интерес к трехцепочечным структурам олиго- и полинуклеотидов, связанный с обнаружением их участия в различных биологических процессах [1], а также возможностью использования при лечении вирусных и онкологических заболеваний [2]. Для понимания роли триплексов в функционировании клетки требуется знание условий их стабильности в зависимости от нуклеотидного состава, температуры и концентрации одно- и многовалентных ионов. В настоящее время эти вопросы наиболее подробно изучены для трехцепочечной А2U [3,4]. Представляет интерес получить диаграмму термостабильность - концентрация ионов Na^+ для А2I, являющейся пуриновым аналогом А2U [5]. В отличие от последней, из-за очень большого расстояния между гликозидными связями (~ 13 Å), пары АI, образующие антипараллельную спираль, могут быть, согласно гипотезе Крика, источником точечных мутаций [5].

Цель настоящей работы состояла также в изучении влияния ионов Cd^{2+} на конформационное равновесие в водных растворах А2I. Кадмий, являясь одним из наиболее токсичных металлов, обладает также мутагенной (и канцерогенной) активностью. В настоящее время его содержание в дождевой воде вблизи предприятий цветной металлургии на 2 порядка превосходит естественную концентрацию в гидросфере. При этом скорость поступления кадмия в окружающую среду непрерывно увеличивается [6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Калиевые соли поли А и поли I (Sigma Chemical Company), а также динатриевые соли АМР и ИРР (Serva) растворяли в $0,001\text{M}$ какодилатного буфера (рН7), в который добавляли необходимое количество NaCl . Отношение концентрации поли А к концентрации поли I составляло 1:2. Процесс образования мультицепочечных спиралей из одноцепочечных может быть достаточно долгим [7,8]. Поскольку скорость ассоциации полинуклеотидов пропорциональна квадрату их концентрации, то, для того чтобы реакция образования А2I была наиболее полной, раствор поли А и поли I, имевший суммарную концентрацию фосфора полинуклеотидов (Р) $(0,8\div 1)\cdot 10^{-2}\text{M}$ и ионов Na^+ ($[\text{Na}^+]$) $0,1\text{M}$, выдерживали в течение 120 часов при 4°C .

Перед измерениями раствор разбавляли при комнатной температуре до концентрации $P=(2\div 3)\cdot 10^{-5}\text{M}$ и $(6\div 7)\cdot 10^{-5}\text{M}$ соответственно при измерении кривых плавления и дифференциальных УФ-спектров (ДУФС). Величину Р определяли по молярному коэффициенту экстинкции $\epsilon=6700\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ при $\lambda=249\text{nm}$, рассчитанному по данным [7,9]. Добавляемую концентрацию ионов МI, вводимых в раствор в виде дважды перекристаллизованных солей NaCl и $\text{CdCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ квалификации осч (Редиса), определяли по весу. Содержание ионов Cd^{2+} дополнительно контролировали комплексометрическим методом. Ошибка определения Р не превышала 3% [7,9], ионов Ml^{2+} - 0,5%.

Зависимость изменения оптической плотности растворов А2I от температуры ($\Delta A(T)$) и волнового числа ($\Delta A(\nu)$ - ДУФС) при различном содержании ионов МI измеряли на спектрофотометре

Specord UV VIS (Carl Zeiss, Jena), соединенным с персональным компьютером, который осуществлял запись ДУФС, а также дифференциальных кривых плавления (ДКП) в форме $\partial h(T)/\partial T$, где $h(T) = \Delta A(T)/A_{T_0}$ - гиперхромный коэффициент, A_{T_0} - оптическая плотность раствора в максимуме поглощения A2I (39900 см^{-1}) при $T_0 = (20 \pm 2)^\circ\text{C}$. Во всех случаях эталонную кювету термостатировали в пределах $\pm 0,5^\circ\text{C}$, рабочую - нагревали со скоростью $0,25$ град/мин. При температурах, соответствующих полному распаду A2I на одноцепочечные клубки поли А и поли I ($92+96^\circ\text{C}$), регистрировали спектр $\Delta A_h(\nu)$. Дифференциальные УФ-спектры A2I, AMP и IMP, индуцированные ионами Cd^{2+} , измеряли при $T = T_0$, используя четырехкюветную схему. Эти спектры практически не зависели от времени в течение (20+30) мин выдержки, что свидетельствует о наличии термодинамического равновесия в растворах. ДКП и ДУФС A2I и отдельных нуклеотидов в присутствии ионов Cd^{2+} были получены в растворах, содержащих $0,1 \text{ M Na}^+$. Зависимость $\Delta A(\nu)$ нормировали на концентрацию фосфора: $\Delta \epsilon_a(\nu) = \Delta A_a(\nu)/P$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ионов Na^+ на дифференциальные кривые плавления A2I

Нагрев A2I при $[\text{Na}^+] \geq 0,1 \text{ M}$ приводит только к одному кооперативному конформационному переходу (рис. 1), который, по-видимому, как и в случае A2U [4], является переходом $3 \rightarrow 1$ ($\text{A2I} \rightarrow \text{A} + \text{I} + \text{I}$). Отсутствие каких-либо других переходов (в частности, $3 \rightarrow 2$ и $2 \rightarrow 1$) подтверждается также отсутствием изменения поглощения растворов A2I при $\nu = \nu_i = (35,7 \pm 0,2) \cdot 10^3 \text{ см}^{-1}$, где ν_i - волновое число, соответствующее изобестической точке на спектрах $\Delta A_h(\nu)$. Во всем изученном интервале концентраций ионов Na^+ производная $\partial h(T)/\partial T$, характеризующая кооперативность процесса, составляет величину $(0,12 \pm 0,02) \text{ град}^{-1}$. Соответственно полный интервал этого конформационного перехода (ΔT) составляет $(3+4,5)^\circ\text{C}$. Эти параметры перехода близки к наблюдаемым для перехода $3 \rightarrow 1$ A2U [3,4]. Интерпретация конформационных переходов A2I как переходов $3 \rightarrow 1$ согласуется также с данными работ [7,9], согласно которым в опытах по смешению поли А и поли I при комнатной температуре в интервале содержания ионов Na^+ от $0,001 \text{ M}$ до $0,3 \text{ M}$ образование двухцепочечной AI или четырехцепочечной 4I обнаружено не было как при отношении концентраций поли А к поли I, равном 1:2, так и 1:1. В обоих случаях происходило образование только трехцепочечной A2I. Значение максимального гиперхромного коэффициента в максимуме поглощения A2I, индуцированного нагреванием до $(92+96)^\circ\text{C}$, составляет $0,53 \pm 0,1$ (с учетом теплового расширения объема рабочей кюветы), что практически совпадает с величиной гипохромизма поли I, наблюдаемого при смешении поли А и поли I при комнатной температуре [7,9].

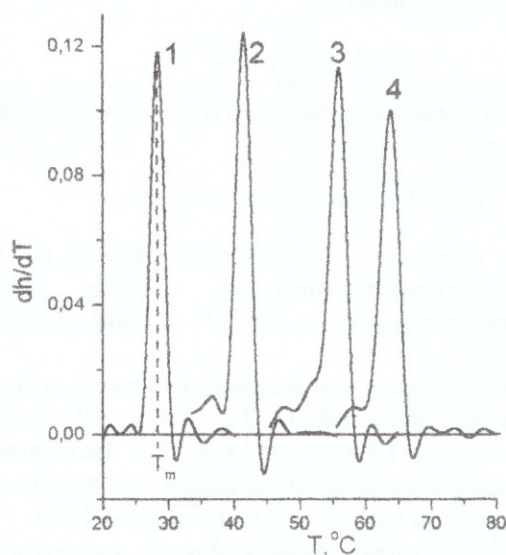


Рис. 1. Дифференциальные кривые плавления A2I.
1 - $0,1 \text{ M Na}^+ + 5 \cdot 10^{-4} \text{ M Cd}^{2+}$; 2 - $0,1 \text{ M Na}^+$; 3 - $0,4 \text{ M Na}^+$; 4 - 1 M Na^+ .

Данные настоящей работы и работы [7] позволяют предположить, что "критическая" концентрация ионов Na^+ , ниже которой нагревание A2I должно приводить к последовательным переходам $\text{A2I} \rightarrow \text{AI} + \text{I}$ и $\text{AI} \rightarrow \text{A} + \text{I}$, должна быть меньше $0,01 \text{ M Na}^+$, то есть во всяком случае на порядок ниже, чем в A2U ($0,1-0,2 \text{ M Na}^+$) [3,4]. Определить экспериментально значение $[\text{Na}^+]_{\text{кр}}$ в случае A2I затруднительно из-за

сильного замедления процесса образования A2I из отдельных нитей при низкой концентрации ионов Na^+ . Так, выдержка растворов одноцепочечных поли A и поли I, содержащих $0,001\text{M Na}^+$, в течение 10 суток не привела к образованию многоцепочечных спиралей, что согласуется с данными [7,8].

В температурной области, предшествующей переходу $3 \rightarrow 1$, наблюдается небольшой гиперхромизм поглощения ($\partial h/\partial T \leq 0,01 \text{ град}^{-1}$ - рис. 1), обусловленный, по-видимому, подплавлением предсечечных спиралей с концов [10,11].

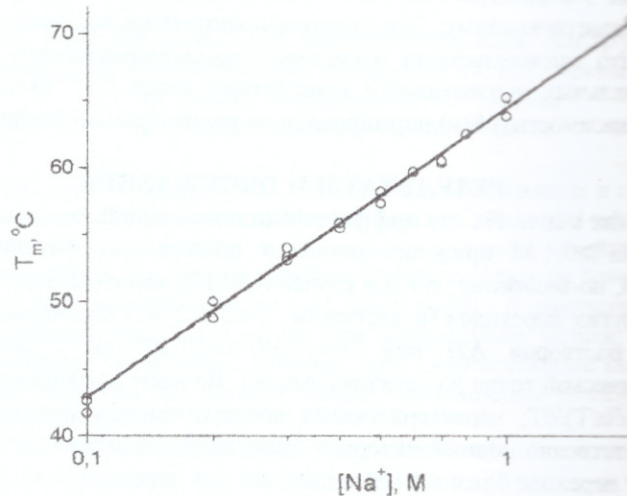


Рис. 2. Зависимость температуры перехода $3 \rightarrow 1$ A2I от концентрации ионов Na^+ .

Как видно из рис. 2, T_m (T_m - температура, соответствующая максимуму на ДЭП - рис. 1) является линейной функцией логарифма концентрации ионов Na^+ . Этот результат согласуется как с экспериментальными данными, полученными для переходов $3 \rightarrow 1$, $3 \rightarrow 2$ и $2 \rightarrow 1$ в случае гомополинуклеотидов, содержащих аденин и урацил [12], так и с полиэлектролитными теориями [12,13]. Для перехода $3 \rightarrow 1$ значение $\gamma_{31} = \partial T_m / \partial (\log [\text{Na}^+]) = (21,9 \pm 1)^\circ\text{C}$, что на -18% ($\gamma_{31} = 26^\circ\text{C}$) меньше полученного для A2U [12].

Согласно теории конденсации Маннинга [12],

$$\gamma = 1,15 \frac{RT_m^2}{\Delta H} \Delta(\xi^{-1}) \quad (1)$$

Здесь T_m и ΔH соответственно температура перехода и его энтальпия, приходящаяся на нуклеотид.

Для перехода $3 \rightarrow 1$ [12]

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

где ξ_I , ξ_A и ξ_{A2I} - линейные плотности отрицательного заряда на поверхности соответственно одноцепочечных поли I, поли A и трехцепочечной A2I. $1/\xi = b/l_B$ [13], где b - расстояние между проекциями заряда на ось полимерной нити, а $l_B = 7 \text{ \AA}$ - длина Бьеррума в воде при комнатной температуре.

Формулы (1) и (2) позволяют оценить неизвестные значения ξ_I и b_I для одноцепочечной поли I, используя следующие параметры этих уравнений: $T_m = T_{m0} = 315 \text{ K}$, $\Delta H_{31} = 3,25 \text{ ккал/моль}$ [7], $1/\xi_A = 0,4$ [3], $1/\xi_{A2I} = 0,16$ [14]. Расчетные значения $\xi_I = 1,9 \pm 0,1$, $b_I = (3,6 \pm 0,2) \text{ \AA}$. Величины этих параметров близки к найденным ранее для одноцепочечной поли U, находящейся, как и поли I, при $0,1\text{M Na}^+$ и $T > 25^\circ\text{C}$ в состоянии полностью разупорядоченного клубка: ($\xi_U = 1,64$, $b_U = 4,3 \text{ \AA}$ [12]).

Полученные данные позволяют также оценить фактор кооперативности перехода $3 \rightarrow 1$ A2I, используя выражение для интервала перехода ΔT в гомополинуклеотидах [11]

$$\Delta T = 12,4 \sigma^{2/3} RT_m^2 / \Delta H \quad (3)$$

Здесь $\sigma = \exp(-F_s/RT)$ - фактор кооперативности перехода (F_s - свободная энергия граничной новой конформации, появляющейся при нагревании). $\Delta H = 9,8 \text{ ккал/моль}$ триплет [7].

Согласно (3), $\sigma = (1 \pm 2) \cdot 10^{-3}$. Порядок величины для перехода $2 \rightarrow 1$ составляет $10^{-4} \sim 10^{-5}$ [15]. Таким образом, в соответствии с результатами настоящей работы и данными работы [4], порядок величины фактора кооперативности для перехода $3 \rightarrow 1$ в A2I и A2U составляет $10^{-3} \sim 10^{-4}$.

Влияние ионов Cd^{2+} на термостабильность и УФ-поглощение A21

ДУФС A21, индуцированные кадмием, имеют максимум и два минимума, расположенные соответственно при $\nu = (38 \pm 38,3) \cdot 10^3 \text{ см}^{-1}$, $\nu \sim 44800 \text{ см}^{-1}$ и $\nu \sim 35000 \text{ см}^{-1}$ при всех изученных концентрациях ионов Cd^{2+} (рис. 3). Наиболее вероятным атомом, координирующим кадмий в отдельных АМР и ИМР, является N7 [16], взаимодействие с которым приводит к появлению ДУФС определенной формы (рис. 4). Существенно, что ДУФС комплексов ионов Cd^{2+} с ИМР имеет характерный длинноволновый минимум, отсутствующий на ДУФС его комплексов с АМР. Дополнительным подтверждением того, что ДУФС ИМР, индуцированный ионами Cd^{2+} , обусловлен взаимодействием кадмия с N7, является то, что его форма хорошо согласуется с формой ДУФС ИМР, обусловленного протонированием этого атома гипоксантина (рис. 4). Таким образом, форма ДУФС A21, индуцированных ионами Cd^{2+} (рис. 3), свидетельствует о том, что N7 гипоксантина также является атомом, координирующим кадмий в тройной спирали. Этот результат коррелирует с данными РСА (рис. 5), согласно которым взаимодействие иона с атомами N7 полиадениловой цепи, образующими водородные связи с атомами одной из полиинозиновых цепей, затруднено.

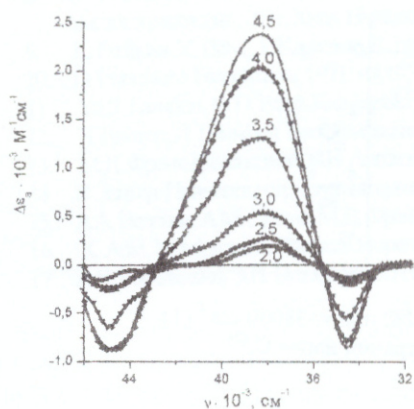


Рис. 3. Дифференциальные УФ-спектры A21, индуцированные ионами Cd^{2+} (0,1 М Na^+ , 20°C). Цифры возле кривых - $[\text{Cd}^{2+}] \cdot 10^4 \text{ М}^{-1}$

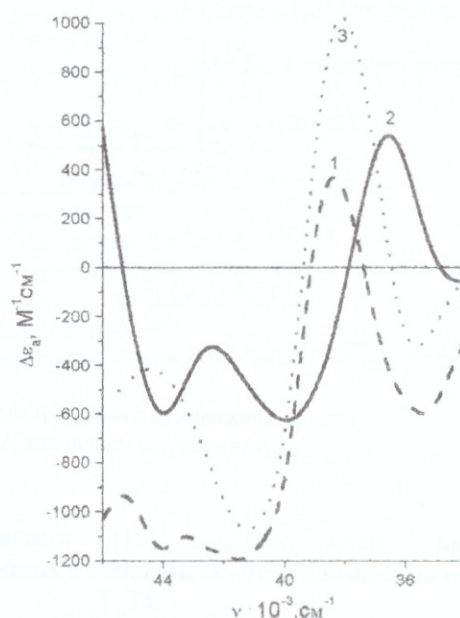


Рис. 4. Дифференциальные УФ-спектры ИМР(1) и АМР(2), индуцированные 0,01М Cd^{2+} . 3 – ДУФС ИМР, обусловленный протонированием N7 гипоксантина (рассчитан по данным [17]). Его интенсивность уменьшена в 2 раза.

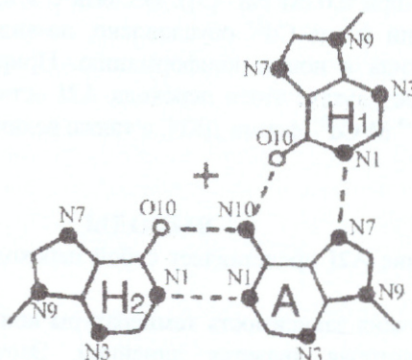


Рис. 5. Структура A21, определенная по данным рентгеноструктурного анализа [5]. + - ось спирали. А - аденин, Н₁ и Н₂- гипоксантин.

Из рис. 3 и 6 видно, что изменение спектра поглощения A21 в присутствии ионов Cd^{2+} начинается при концентрации, превышающей 10^{-4} М , и заканчивается при $[\text{Cd}^{2+}] \sim 5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$.

Форма ДКП A2I в присутствии ионов Cd^{2+} практически не зависит от их концентрации и аналогична наблюдаемой в отсутствие кадмия (рис. 1). При этом в диапазоне $10^{-5}\text{M} \leq [\text{Cd}^{2+}] \leq 2 \cdot 10^{-4}\text{M}$ термостабильность A2I практически не меняется (ее повышение находится в пределах 1°C) (рис. 6). При большем содержании кадмия термостабильность тройной спирали резко уменьшается. В пределах экспериментального разброса значений T_m ее зависимость от $\log [\text{Cd}^{2+}]$ является линейной ($\partial T_m / \partial \log [\text{Cd}^{2+}] = 35^\circ\text{C}$). Однако, в отличие от электростатической природы влияния ионов Na^+ на стабильность полианиона, изменение термостабильности A2I в присутствии кадмия обусловлено связыванием его ионов с N7 гипоксантина: понижение T_m и изменение спектра поглощения A2I происходит в одном и том же концентрационном диапазоне (рис. 6).

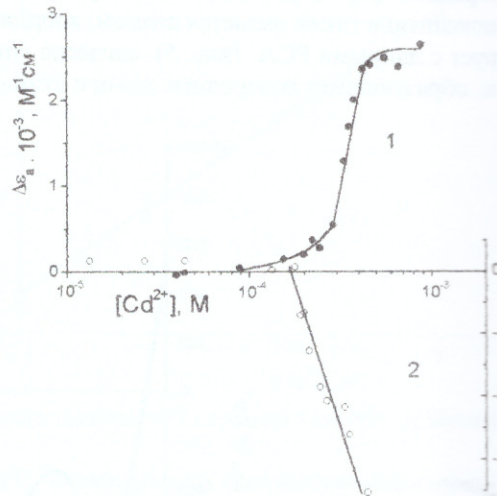


Рис. 6. Зависимость изменений интенсивности ДУФС при $\nu = 38000 \text{ cm}^{-1}$ (1) и температуры плавления A2I (2) от концентрации ионов Cd^{2+}

Согласно теории лигандов [11], изменение температуры конформационного перехода полинуклеотида, вызванное его связыванием с лигандами, может быть представлено выражением [4]

$$\delta T_m = \frac{RT_m T_{m0}}{\Delta H} \ln \frac{1 + K_{A2I} A_f}{(1 + K_A A_f)^{1/3} (1 + K_I A_f)^{2/3}}, \quad (4)$$

где K и A_f - соответственно константы связывания и концентрация свободных ионов, T_m - начальная температура перехода. Поскольку в области низкого содержания ионов Cd^{2+} $\delta T_m \approx 0$, то можно предположить, что их константы связывания с A2I и одноцепочечными поли A и поли I, образующимися при переходе 3→1, примерно одинаковы (можно отметить, что такая ситуация характерна, например, для связывания ионов Ni^{2+} с A2U, поли A и поли U при $0,03\text{M Na}^+$ [3]). В связи с этим понижение термостабильности A2I в области больших концентраций ионов Cd^{2+} обусловлено, по-видимому, индуцированным кадмием при $T=T_0$ переходом полинуклеотида в новую конформацию. Природа этого перехода остается неясной. Существенно, однако, что в результате этого перехода A2I остается в конформации тройной спирали. Действительно, даже при $5 \cdot 10^{-4}\text{M Cd}^{2+}$ форма ДКП, а также величины $\partial \epsilon / \partial T$ соответствуют нормальному переходу 3→1.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что плавление A2I представляет собой переход 3→1 при любой концентрации ионов Na^+ .
2. Впервые для A2I получена зависимость температуры конформационного перехода от логарифма концентрации ионов Na^+ , которая является линейной. Этот результат согласуется с выводами полиэлектролитной теории.
3. Впервые оценена величина линейной плотности заряда, а также расстояния между отрицательными зарядами на поверхности одноцепочечной поли I.

4. При достаточно высоких концентрациях ионов кадмия происходит понижение термостабильности A2I, обусловленное тем, что при его связывании с N7 гипоксантина происходит переход A2I в новую конформацию, которая остается тройной спиралью.

Исследования, приведенные в этой публикации, стали возможны благодаря Гранту UB2-2442-KH-02 Civilian Research & Development Foundation (CRDF).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Catasti, X. Chen, S.V. Mamiapan, E.M. Bradbury, G. Gupta // *Genetica*, 1999, vol. 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. V.A. Sorokin, V.A. Valeev, G.O. Gladchenko, M.V. Degtyar, Yu.P. Blagoi // *Macromol. Biosci.*, 2001, vol.1, p.191-203.
4. V.A. Sorokin, V.A. Valeev, G.O. Gladchenko, M.V. Degtyar, E.A. Andrus, Yu.P. Blagoi, V.A. Karachevtsev // *Macromol. Biosci.*, 2002, vol. 2, p. 155-162.
5. S. Amott, P.J. Bond // *Science*, 1973, vol.181, p.56-57.
6. Дяс. Мур, С. Рамамурти. Тяжелые металлы в природных водах: контроль и оценка влияния, 1987, Москва, Мир, 288 с.
7. K. Fudjioka, Y. Baba, A. Kagimoto // *Macromol. chem.* 1982, vol. 183, p. 389-398.
8. Ю.П. Благой, В.Л. Галкин, Г.О. Гладченко, С.В. Корнилова, В.А. Сорокин, А.Г. Шкорбатов. Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах, 1991, Киев, Наукова думка, 270 с.
9. K. Fudjioka, Y. Baba, A. Kagimoto, R. Fujishiro // *Repts. Progr. Polym. Phys. Jap.*, 1980, vol. 23, p. 811-814.
10. D. Pörschke // *Biopolymers*, 1971, vol.10, p.1980-2013.
11. Yu.S. Lazurkin, M.D. Frank-Kamenetskii, E.N. Trifonov // *Biopolymers*, 1970, vol.9, p.1253-1306.
12. Ч. Кантор, П. Шиммел. Биофизическая химия, 1985, т. 3, Москва, Мир, 534 с.
13. М.Д. Франк-Каменецкий, В.В. Анпилов, А.В. Лукашин // *Усп. физ. наук*, 1987, т.151, с.595-618.
14. В. Зенгер. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот, 1987, Мир, Москва, 584 с.
15. А.А. Веденов, А.М. Дыбне, М.Д. Франк-Каменецкий // *Усп. физ. наук*, 1971, т.105, с.479-519.
16. K. Aoki. Metalproteins: Chemical Properties and Biological Effects. 1988, p. 457-490.
17. А.В. Бородавкин, Э.И. Будковский, Ю.В. Морозов и др. // *Итоги науки и техники. Сер. Мол. Биол.* 1977, Москва, ВИНТИ, 227 с.