

УДК 577.3

## ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРАТАЦИИ И СТРУКТУРНЫХ ПЕРЕХОДОВ ТРАНСПОРТНЫХ РНК

Т.В. Больбух, М.А. Семенов, В.А. Кашпур, В.Я. Малеев

Институт радиофизики и электроники НАН Украины, ул. Ак. Проскуры, 12, г. Харьков, 310085

e-mail: maleev@ire.kharkov.ua.

поступила в редакцию 15 января 1999 г.

Методами ИК-спектроскопии, КВЧ-дieleктрометрии и пьезограмметрии проведено исследование гидратации суммарной тРНК во влажных пленках и растворах. Найдено, что степень гидратации тРНК составляет  $\sim 14 (\pm 1)$  молей воды на средний моль нуклеотида. Данное количество воды необходимо для образования не только вторичной структуры стеблей тРНК, но и формирования ее третичной структуры.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** нуклеиновые кислоты, гидратация, структура тРНК, ИК-спектроскопия, пьезограмметрия, КВЧ-дieleктрометрия.

Изучение транспортных РНК (тРНК) с помощью дифракции рентгеновских лучей позволило установить, что эти важные молекулы, обладая однонитчатой первичной структурой (75-90 нуклеотидов) при определенных условиях в кристаллическом состоянии формируют вторичную (в виде клеверного листа) и третичную структуры. Считается, что стабилизация этих структур достигается за счет образования водородных связей в правильных и неправильных парах азотистых оснований, а также благодаря стекинг-взаимодействию. В большинстве случаев правильные уотсон-криковские пары формируют вторичную структуру - спиральные стебли тРНК, а третичная структура удерживается в основном неправильными парами. Известно также, что в формировании третичной структуры тРНК активное участие принимают ионы двухвалентных металлов ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , и др.) [1]. Из многочисленных рентгеноструктурных данных для монокристаллов дуплексов РНК [2] известно, что устойчивость их спиральной структуры определяется как уотсон-криковскими парами и стекинг-взаимодействием, так и сформировавшимися водными мостиками, которые в спиральной конформации скрепляют азотистые основания и противоположные полинуклеотидные цепи. Поэтому можно думать, что воде принадлежит определенная роль в образовании вторичной и, по-видимому, третичной структуры тРНК. Насколько нам известно, влияние воды на структуру тРНК не изучалось.

Целью настоящей работы было исследование влияния гидратации на структуру и структурные переходы суммарных тРНК в пленках и растворах с помощью разработанного нами комплексного подхода, основанного на использовании ИК-спектроскопии, dieлектрометрии и пьезограмметрии. Применение ИК-спектроскопии оказалось полезным при исследовании вторичной структуры фенилаланиновой тРНК [3]. Поэтому можно было надеяться получить информацию о влиянии гидратации не только на спиральные участки тРНК, но и на формирование третичной структуры. Предварительные результаты были сообщены в [4].

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Методика ИК-спектроскопических, dieлектрометрических и пьезограмметрических исследований была аналогична той, которая применялась для изучения особенностей формирования двойных спиралей и гидратных оболочек полинуклеотидов типа РНК [5-9].

В качестве образцов использовали суммарную тРНК фирмы «Sevva» (Германия). Количество ионов определяли с помощью пламенного фотометра ФПЛ-1 и измерений dieлектрических параметров (мост Р568, частота 10 кГц). Согласно этим измерениям, в исследуемом образце по отношению к сухому весу тРНК содержалось 5,7% и 0,6% ионов  $Na^+$  и  $K^+$  соответственно.

Пленки готовили медленным испарением воды при  $4^{\circ}C$  из 1% раствора тРНК, помещенного на подложку из флюорита. Подложку располагали строго горизонтально на специальном столике. ИК-спектры записывали с помощью двухлучевого спектрофотометра UR-20, призма NaCl, разрешение  $6\text{см}^{-1}$  при  $1700\text{см}^{-1}$ . ИК-спектры образцов тРНК с различным содержанием воды в области  $3900-1800\text{см}^{-1}$  получали с помощью ранее разработанной герметичной и термостатированной кюветы с окошками из флюорита [10]. Дейтерирование и увлажнение пленок производили в интервале 0-96% относительной влажности (ОВ) так же, как и в работе [10]. Оптическую плотность находили методом базовой линии при частотах  $\nu=1800\text{см}^{-1}$  и  $1350\text{см}^{-1}$ .



Степень гидратации тРНК в растворе (концентрация 1,3%) находили с помощью дифференциального диэлектromетра миллиметрового диапазона длин волн. Непосредственно измеряемыми величинами являлись коэффициент поглощения и фазовая постоянная, исходя из которых, как и в работе [11], рассчитывали комплексную проницаемость и количество молекул воды, связанных с молекулой РНК.

Изотермы гидратации тРНК, то есть зависимость числа сорбированных молекул воды на нуклеотид ( $n$ ) от ОВ, получали методом кварцевого резонатора [12].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1а, б представлены спектры пленок тРНК при различных значениях ОВ в дейтерированном и недейтерированном состояниях. Из этих данных видно, что с ростом ОВ наблюдаются значительные изменения в участках спектра, отвечающих поглощению азотистых оснований ( $1800-1300 \text{ см}^{-1}$ ) и сахарофосфатной цепи ( $1300-900 \text{ см}^{-1}$ ). Эти изменения связаны с изменениями структуры тРНК и их гидратного окружения в процессе увлажнения образца.

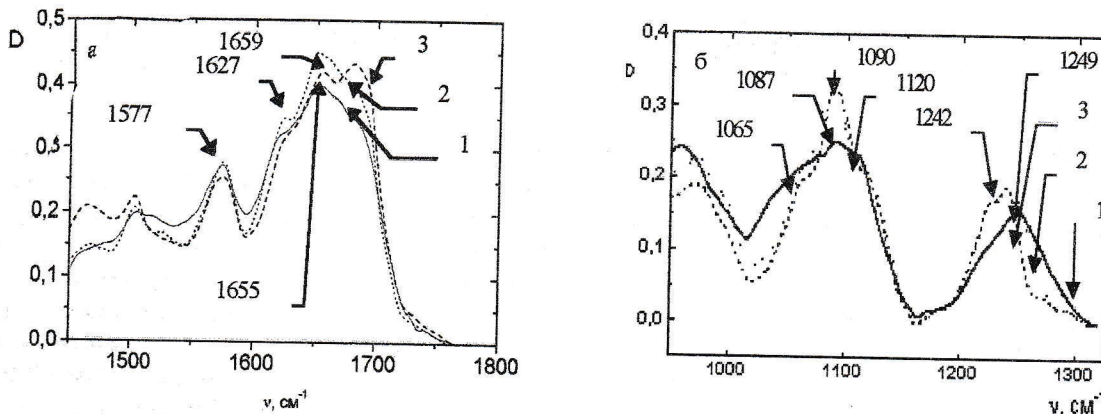


Рис. 1. ИК-спектры дейтерированной (а) и недейтерированной (б) тРНК в пленке при различных значениях ОВ: 1-0%, 2-56%, 3-92%(а); 1-0%, 2-44%, 3-86% (б)

На рис.2 приведена изотерма гидратации тРНК при  $20^\circ\text{C}$ . Сорбционная способность тРНК незначительно отличается от ДНК [13].

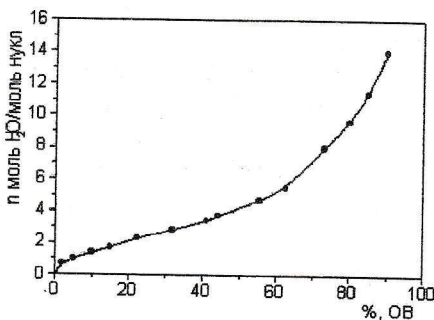


Рис. 2 Изотерма гидратации тРНК при  $20^\circ\text{C}$

Для достаточно надежно интерпретированных полос поглощения азотистых оснований и сахарофосфатной цепи выполнен подробный анализ спектров. С этой целью построены зависимости значений частот  $\nu$  и интенсивностей  $R$  (в относительных единицах) от величины  $n$  (числа молекул воды на нуклеотид).

**Область поглощения азотистых оснований.** На рис.3 для дейтерированной тРНК представлены типичные зависимости  $\nu$  и  $R$  от  $n$  для полос поглощения внутрикольцевых колебаний  $\text{C}=\text{N}$  гуанина  $\nu=1574 \text{ см}^{-1}$  (а), аденина  $\nu=1624 \text{ см}^{-1}$  (б), карбонильного колебания  $\text{C}=\text{O}$  урацила и, возможно,  $\text{C}=\text{O}$  цитозина  $\nu=1655 \text{ см}^{-1}$  (в) и  $\text{C}=\text{O}$  гуанина  $\nu=1681 \text{ см}^{-1}$  (г), а на рис.3д приведены подобные зависимости для полосы поглощения  $1698 \text{ см}^{-1}$  (колебание  $\text{C}=\text{O}$ ) недейтерированного образца тРНК.

## Исследование гидратации и структурных переходов транспортных РНК

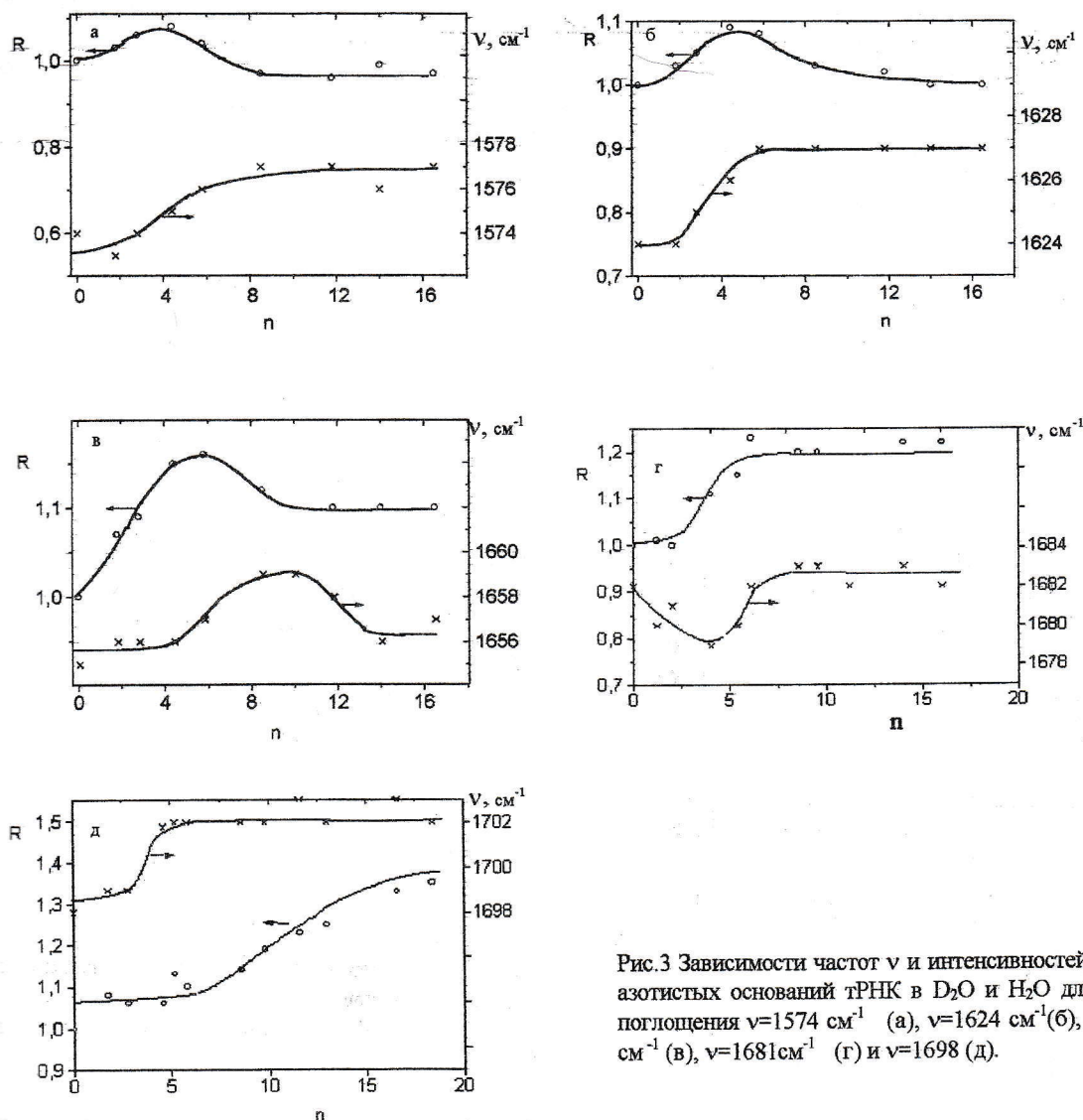


Рис.3 Зависимости частот  $\nu$  и интенсивностей  $R$  от  $n$  азотистых оснований тРНК в  $D_2O$  и  $H_2O$  для полос поглощения  $\nu=1574 \text{ см}^{-1}$  (а),  $\nu=1624 \text{ см}^{-1}$ (б),  $\nu=1655 \text{ см}^{-1}$  (в),  $\nu=1681 \text{ см}^{-1}$  (г) и  $\nu=1698$  (д).

На этих зависимостях в трех интервалах изменения  $n$  наблюдаются особенности. В первом интервале изменения  $0 < n \leq 4$  интенсивность  $R$  возрастает на 10-20%. При этом заметного частотного сдвига большинства указанных полос не происходит. Такое увеличение интенсивности с ростом  $n$ , как показал квантовомеханический расчет для модельного соединения [14], связано с изменением электронной плотности на атомах, с которыми молекулы воды образуют Н-связи. Поскольку рассмотренные колебания относятся к связям с участием атомов азотистых оснований (N3, N7, O2, O4), то связывание молекул происходит именно по этим центрам. О связывании молекул воды с C6O6 группами свидетельствует понижение частоты  $\nu=1682 \text{ см}^{-1}$  на 2-3  $\text{см}^{-1}$  (рис.3г) и рост интенсивности на 20%.

Во втором интервале  $4 < n \leq 9$  происходит резкий высокочастотный сдвиг на 3-4  $\text{см}^{-1}$  полос, соответствующих внутрикольцевым колебаниям C=N (рис.3а,б) и внекольцевым колебаниям C=O на 3  $\text{см}^{-1}$  (рис.3в,г), который сопровождается уменьшением интенсивности на 10-12% (гипохромизм). Эти эффекты в 2-3 раза меньше по сравнению с аналогичными эффектами для ДНК в двухспиральной конформации [15], что вполне объяснимо, поскольку в двухспиральной структуре тРНК находится приблизительно только  $\approx 50\%$  азотистых оснований. Как показал расчет резонансных частот [16], обнаруженные высокочастотные сдвиги полос и наблюдаемый ИК-гипохромизм свидетельствуют о переходе стеблей тРНК в спиральную А-конформацию. Этот вывод соответствует работам [5-8]. При  $n > 3$  полоса поглощения  $1698 \text{ см}^{-1}$  недеирированной тРНК претерпевает «голубой» сдвиг до  $\nu=1702 \text{ см}^{-1}$  (рис.3д), что также говорит о переходе тРНК в спиральную конформацию.

В третьем интервале  $9 < n \leq 14$  полоса поглощения  $1655 \text{ см}^{-1}$  (колебания C4O4 и C2O2) претерпевает низкочастотный сдвиг на 3-4  $\text{см}^{-1}$ . Ранее при исследовании комплексов полинуклеотидов



poly(rA)-poly(rU) [5], poly(dA)-poly(dT) [17], poly(rG)-poly(rC) [8] такой эффект для полос поглощения, соответствующих карбонильным колебаниям, не был обнаружен. Из данных РСА известно также, что третичная структура тРНК стабилизируется правильными и неправильными Н-связями с участием этих карбонильных групп [1]. Поэтому мы полагаем, что обнаруженный низкочастотный сдвиг полосы  $1655\text{см}^{-1}$  связан с формированием третичной структуры тРНК в этом интервале абсорбции воды.

Область поглощения сахарофосфатной цепи. На рис. 4 показаны типичные зависимости  $\nu$  и R от n для полос поглощения симметричного ( $\nu_s$ ) и антисимметричного ( $\nu_{as}$ ) колебаний фосфатов  $\text{PO}_2^-$  и вырожденного колебания атомов рибозы [18,19]:

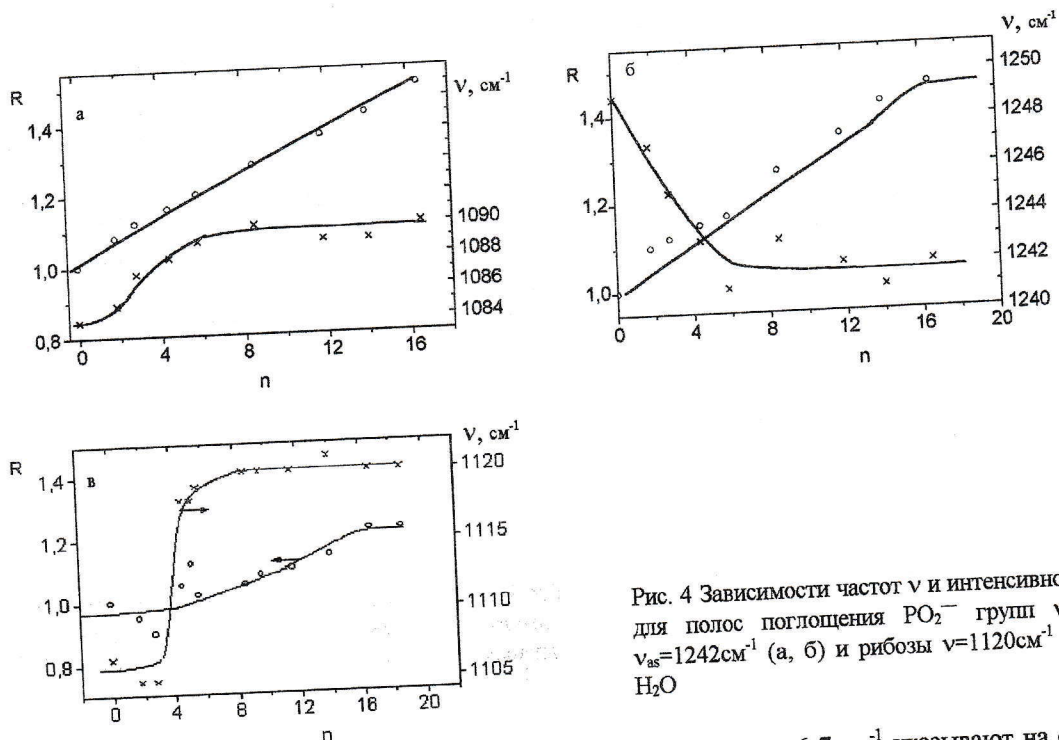
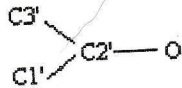


Рис. 4 Зависимости частот  $\nu$  и интенсивностей R от n для полос поглощения  $\text{PO}_2^-$  группы  $\nu_s=1090\text{см}^{-1}$ ,  $\nu_{as}=1242\text{см}^{-1}$  (а, б) и рибозы  $\nu=1120\text{см}^{-1}$  (в) тРНК в  $\text{H}_2\text{O}$

Низкочастотное смещение  $\nu_{as}$  и высокочастотный сдвиг  $\nu_s$  на  $6-7\text{см}^{-1}$  указывают на связывание молекул воды фосфатными группами. Поскольку это смещение приблизительно в 3 раза меньше, чем смещение аналогичного колебания  $\nu_{as}$  ДНК [15], то следует полагать, что связывание воды с группами  $\text{PO}_2^-$  в тРНК менее прочное, чем с теми же группами ДНК. Рост интенсивности этих полос во всех трех интервалах сорбции указывает на то, что степень гидратации тРНК соответствует  $n=14$  молекулам воды на один нуклеотид. Частота полосы поглощения рибозы  $1105\text{см}^{-1}$  в первом интервале сорбции практически не изменяется, однако во втором интервале до  $n=8$  она претерпевает высокочастотный сдвиг до  $1120\text{см}^{-1}$  (рис.4в), что связано, по-видимому, с конформационными изменениями рибозы. Рост интенсивности данной полосы вплоть до  $n=14$ , как и в случае с фосфатными полосами, свидетельствует о связывании молекул воды с  $\text{C}2'\text{OH}$  группами рибозы. Поскольку интенсивность этих полос возрастает и в третьем интервале сорбции, то надо полагать, что на образование третичной структуры требуется 4-5 молекул воды.

Измерения диэлектрических параметров раствора тРНК также позволили определить степень гидратации тРНК, которая оказалась близкой ( $\sim 13$  молекул воды на один нуклеотид) к соответствующей величине во влажных пленках.

Таким образом, можно считать, что степень гидратации ( $\text{H}^{\text{тРНК}}$ ) в пересчете на один нуклеотид суммарной тРНК составляет  $14 \pm 1$  молекул воды.

Ранее нами было установлено, что степени гидратации полинуклеотидов соответственно равны:  $h^V=7(\pm 1)$ ,  $h^A=11(\pm 1)$ ,  $h^T=12(\pm 1)$ ,  $h^C=9(\pm 1)$ ,  $h^{A-Y}=14(\pm 1)$ ,  $h^{\Gamma-C}=8(\pm 1)$ . Так как в среднем в двухспиральной структуре в стеблях тРНК находится  $\sim 55\%$  всех нуклеотидов, то степень гидратации тРНК можно представить в виде

$$H_{\text{тРНК}} = 0,55 \frac{h^{A-Y} + h^{G-C}}{2} + 0,45 \frac{h^Y + h^A + h^G + h^C}{4} + h^{\text{трет}},$$

где  $h^{\text{трет}}$  - степень гидратации нуклеотида при формировании третичной структуры тРНК. Подставляя известные величины в формулу, можно найти, что на образование третичной структуры необходимо около 4 молекул воды на нуклеотид. Из зависимости величины  $v$  от  $n$  (рис. 3в) также видно, что это количество молекул воды необходимо для формирования третичной структуры тРНК. Наличие спирализованных стеблей тРНК обеспечивается достаточным количеством гидратированных ионов  $\text{Na}^+$  в исследуемых образцах.

### ВЫВОДЫ

Проведенные исследования гидратации тРНК и полинуклеотидов свидетельствуют о том, что вода играет важную роль не только в формировании вторичной структуры, но и в свертывании транспортной РНК в третичную структуру.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. -М.; Мир, 1987, 584с.
2. Egly M., Portmann S., Usman N. // Biochemistry 1996, V. 35. p. 8489-8494.
3. Starikov E.B. Semenov M.A. // Studia biophysica 1987, V. 120, №2. p. 187-196.
4. Семенов М.О., Капшур В.А., Большух Т.В. П з їзд Українського Біофізичного товариства. Харків 1998, с. 15
5. Семенов М.А., Большух Т.В., Малеев В.Я. // Биофизика. 1985. Т.30. с. 571-577
6. Semenov M.A., Bolbukh T.V., Starikov E.B. // Studia biophysica 1985, V. 106. №3 p. 181-192.
7. Семенов М.А., Стариков Е.Б. Большух Т.В., Малеев В.Я. // Биофизика. 1988. Т.34. с. 389-395
8. Семенов М.А., Малеев В.Я., Березняк Е.Г. Гасан А.И., Большух Т.В. // Молекулярная биология 1991. Т.25. с.1626-1634.
9. Семенов М.А. дисс. докт. физ.-мат. наук. М. МГУ, 1990
10. Семенов М.А., Сухоруков Б.И., Малеев В.Я., Шабардина Л.И. // Биофизика. 1979. Т.24. вып. 2. с. 210-217
11. Капшур В.А., Малеев В.Я., Щеголева Т.Ю. // Молекулярная биология 1976. Т10. №3. с.568-575.
12. Большух Т.В., Семенов М.А. // Биофизика. 1985. Т.30. с.409-413
13. Семенов М.А., Большух Т.В. // Биофизика. 1984. Т.29. вып. 3. с. 377-382
14. Стариков Е.Б., Семенов М.А. // Журнал физ. химии. 1988. Т.42. №8. с. 2120-2126
15. Семенов М.А., Малеев В.Я. // Биофизика. 1986. Т.31. с. 764-767
16. Semenov M.A., Bolbukh T.V. // Studia biophysica 1984. V. 102. p. 215-220.
17. Семенов М.А., Матвеев Д.А., Большух Т.В., Малеев В.Я. // Биофизика. 1994. Т.39. с. 628-636
18. Tsuboi M. // Appl. Spectrosc. Rev. 1971. V.5, №3. p. 45-90
19. Chem Y.Z. Pronofsky E.W. // Biopolymers. 1993 V.35. №5. p. 797-812