

УДК 577.323.425

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ ИОНОВ Mt^{2+} С ПОЛИНУКЛЕОТИДАМИ, НАХОДЯЩИМИСЯ В РАЗЛИЧНЫХ КОНФОРМАЦИЯХ, МЕТОДОМ “ФАЗОВЫХ ДИАГРАММ”

В. А. Сорокин^a, В. И. Бабенко^a, Е. Л. Усенко^a, Н. Н. Жигалова^b

^aФизико – технический институт низких температур им. Б. И. Веркина НАН Украины,
пр. Ленина, 47, 61103, Харьков, Украина

^bХарьковский национальный университет им. В.Н.Каразина
площадь Свободы, 4, 61077, Харьков, Украина

sorokin@ilt.kharkov.ua

Поступила в редакцию 19 февраля 2009 г.

Принята 3 марта 2009 г.

Рассчитаны термодинамические параметры связывания (константы ассоциации – K , стехиометрия комплексов – n) трёх (полиU·полиA·полиU \equiv A2U)-, двух (полиA·полиU \equiv AU)- и одонитевых (полиA, полиU) полинуклеотидов с ионами Ni^{2+} , а также энтальпии переходов (ΔH): A2U \rightarrow AU+полиU (переход 3 \rightarrow 2) и AU \rightarrow полиA+полиU (переход 2 \rightarrow 1) с использованием теории “скрепок” и фазовой диаграммы комплексов A2U с этими ионами. За исключением взаимодействия с AU, влияние ионов Ni^{2+} на температуры соответствующих переходов в значительной мере определяется их взаимодействием с отрицательными зарядами на поверхности трёх- и одноцепочечных полинуклеотидов. Сравнение расчётных данных с экспериментальными показало, что метод определения K , n и ΔH , основанный на теоретическом анализе фазовых диаграмм металлокомплексов полинуклеотидов, является конкурентоспособным прямому экспериментальному определению этих параметров.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ионы металлов, фазовые диаграммы, конформационные переходы, полинуклеотиды, термодинамические параметры связывания.

Загрязнение окружающей среды солями металлов (Mt) представляет серьёзную экологическую проблему [1]. Особенно для стран (к ним, в частности, принадлежит Украина), имеющих развитую металлургическую промышленность. Известно, что ионы Mt изменяют конформационное равновесие в растворах ДНК и РНК [2], что, в принципе, может влиять на биологическую функцию этих полинуклеотидов [3-6]. Основными параметрами, определяющими концентрационный диапазон устойчивости комплексов ионов Mt с нуклеиновыми кислотами, находящимися в различной конформации, являются константы связывания (K) и стехиометрия комплексов (n) – параметр, определяющий степень насыщения ионами мест связывания на полинуклеотидной матрице. В связи с этим представляет интерес разработка методов их определения.

Ранее [7] нами была получена фазовая диаграмма комплексов ионов никеля с состоящими из аденина и урацила полирибонуклеотидами, находящимися в конформации двухнитевой (полиA·полиU \equiv AU) и трёхнитевой (полиU·полиA·полиU \equiv A2U) спиралей. Эти данные были использованы нами для определения неизвестных констант связывания ионов Ni^{2+} с AU и A2U решением обратной задачи в рамках феноменологической теории “скрепок”, в которой установлена зависимость между изменением температуры конформационного перехода полинуклеотида в присутствии низкомолекулярных веществ различной природы и термодинамическими параметрами комплексообразования (K , n), а также энтальпией соответствующего конформационного перехода (ΔH) [7]. Надёжность расчётов контролировалась тем, что они проводились при совместном анализе фазовых

диаграмм комплексов ионов Ni^{2+} с AU и A2U [7]. Однако, при этом был сделан ряд априорных предположений, справедливость которых может быть поставлена под сомнение. Так, предполагалось, что стехиометрия комплексов ионов Ni^{2+} с полинуклеотидами, находящимися в различных конформациях, одинакова и соответствует связыванию иона с двумя фосфатными группами ($n=0,5$), что должно быть характерно для кулоновского взаимодействия двухвалентных катионов с полианионами. Однако ионы, имеющие d-электроны на внешних орбиталях (Ni^{2+} , Cd^{2+} и др.), способны, в принципе, образовывать координационные связи с гетероатомами азотистых оснований [8]. Этот тип взаимодействия может характеризоваться значениями n и K , отличными от наблюдаемых для ионов щелочноземельных металлов. В связи с этим, сделанное нами ранее [7] предположение о том, что константы связывания ионов Ni^{2+} с однонитевыми полиА и полиU совпадают с таковыми для ионов Mg^{2+} , также нуждается в проверке.

В тоже время определение величин n и K прямыми методами представляет сложную экспериментальную задачу. Так, найденные методом равновесного диализа значения n даже для комплексов полинуклеотидов с ионами Mg^{2+} , полученные различными авторами, находятся в диапазоне от 0,25 до 1 [9]. С другой стороны, при экспериментальном определении констант связывания ионов Mt с полинуклеотидами также возникают трудности, связанные со сложностью определения концентрации свободных ионов. Всё это приводит к тому, что ошибка определения K достигает (20÷50)% [9], а в некоторых случаях величины K , полученные различными авторами, в сопоставимых условиях отличаются на порядок. Так, даже в достаточно простом случае взаимодействия однонитевой полиU с ионами Mn^{2+} , экспериментальные константы ассоциации составляют величину $2 \cdot 10^4 M^{-1}$ и $1,7 \cdot 10^5 M^{-1}$ (при $0,001 M Na^+$ [9]).

Наконец, значения ΔH , определённые методами дифференциальной сканирующей и изотермической титрующей калориметрий, также дают разброс значений, превосходящий оценку погрешности эксперимента. Так, энтальпия перехода A2U в AU (переход $3 \rightarrow 2$), определённая этими методами, составляет величину от 2 до 4,2 ккал/моль [10,11], то есть отличается на краях разброса значений ΔH в два раза. Это связано с трудностью определения базовой линии на зависимости теплопоглощения от температуры, тепловыми эффектами при возможной агрегации макромолекул из-за их большой концентрации в калориметрических измерениях, возможностью наложения конформационных переходов разного типа. Различия в значениях ΔH этого перехода, найденных из температурных зависимостей констант равновесия (метод Вант – Гоффа: $d \ln K / d(1/T) = -\Delta H / R$), ещё больше и находятся в пределах от 2 до 8 ккал/моль [11].

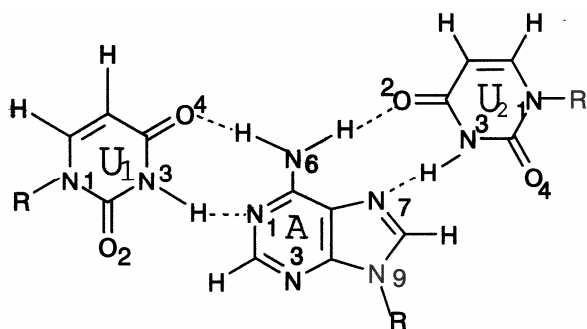


Рис. 1. Структура триплета U_1 -A- U_2 , являющегося мономерным звеном трёхнитевого полинуклеотида полиU·полиА·полиU [7]. Отделение от триплета U_2 – переход $3 \rightarrow 2$; разделение U_1 и A – переход $2 \rightarrow 1$.

В связи с изложенным выше, цель настоящей работы состояла в демонстрации возможностей анализа фазовой диаграммы только одного типа (комплексов ионов Ni^{2+} с A2U – её структура показана на рис.1) в приближении теории “скрепок” для

определения всех термодинамических параметров комплексообразования этих ионов с полинуклеотидами, находящимися в любой из возможных конформаций, с ограниченным привлечением экспериментальных данных, касающихся значений K , n и ΔH , а также информации о фазовых диаграммах комплексов другого типа (например, $Ni^{2+}+AU$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 показана полученная нами ранее [7] фазовая диаграмма комплексов ионов Ni^{2+} с $A2U$. Видно, что фазовое пространство распадается на 3 области, разделённые концентрационными зависимостями температур соответствующих конформационных переходов.

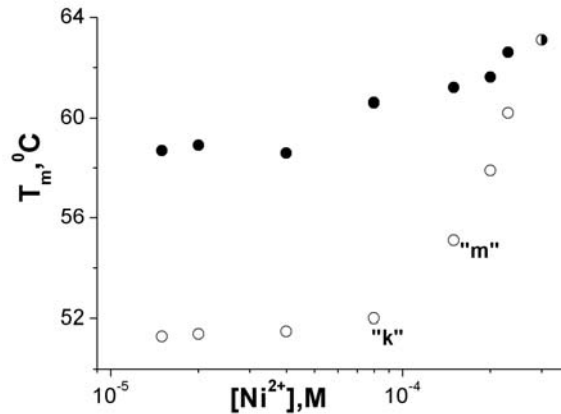


Рис. 2. Фазовая диаграмма комплекса $A2U$ с ионами Ni^{2+} [7].

Светлые и тёмные кружки – соответственно температуры переходов $3 \rightarrow 2$ и $2 \rightarrow 1$.

“k” и “m” – точки, соответствующие максимальному отличию между опытом и теорией (см. рис. 3).

Согласно теории [12], изменение температуры перехода полинуклеотида из конформации d в конформацию e в присутствии ионов может быть представлено в виде суммы:

$$(\delta T_m)_{d \rightarrow e} = (T_m - T_{m_0})_{d \rightarrow e} = B \ln E + B \ln F, \quad (1)$$

где $B_{d \rightarrow e} = \frac{R(T_{m_0} - T_m)_{d \rightarrow e}}{\Delta H_{d \rightarrow e}}$.

Здесь $(\Delta H)_{d \rightarrow e}$ – энтальпия конформационного перехода; $(T_{m_0})_{d \rightarrow e}$ – экспериментально определённая температура перехода в отсутствие ионов; $(T_m)_{d \rightarrow e}$ – теоретическое значение температуры перехода при определённой концентрации свободных ионов (A_f). Поскольку при $0,1 \text{ M Na}^+$ значения констант связывания ионов Ni^{2+} с полинуклеотидами невелики [7], то в рассмотренной области их концентраций в пределах $0,5\%$ $A_f = [Ni^{2+}]$. В связи с этим в теоретических формулах вместо A_f использовали полную концентрацию ионов ($[Ni^{2+}]$).

Для перехода $3 \rightarrow 2$

$$E_{32} = \frac{(1 + K_{A2U} \cdot [Ni^{2+}])^{n_{A2U}}}{(1 + K_{AU} \cdot [Ni^{2+}])^{n_{AU}}}; \quad F_{32} = \frac{(1 + K_{A2U} \cdot [Ni^{2+}])^{n_{A2U}}}{(1 + K_U \cdot [Ni^{2+}])^{n_U}}, \quad (2)$$

для перехода $2 \rightarrow 1$

$$E_{21} = \frac{(1 + K_{AU} \cdot [Ni^{2+}])^{n_{AU}}}{(1 + K_A \cdot [Ni^{2+}])^{n_A}}; \quad F_{21} = \frac{(1 + K_{AU} \cdot [Ni^{2+}])^{n_{AU}}}{(1 + K_U \cdot [Ni^{2+}])^{n_U}}, \quad (3)$$

$(T_{m_0})_{21} = 58,8^{\circ}C$, $(T_{m_0})_{32} = 50,3^{\circ}C$. Индексы при К и n относятся к соответствующим конформациям.

Численное определение параметров К, n и ΔH производилось следующим образом. Экспериментальная фазовая диаграмма комплекса $A_2U + Ni^{2+}$ (рис.2) аппроксимировалась теоретическими зависимостями (1)-(3) по методу наименьших квадратов. При этом считалось, что значения параметров К, n, ΔH являются оптимальными, а теоретические значения температур переходов $(T_m)_{теор}$ дают наилучшее приближение к экспериментальным значениям $(T_m)_{эксп}$ (рис.2), когда сумма

$$S(K, n, \Delta H) = \sum_{[Ni^{2+}]} [(T_m)_{эксп} - (T_m)_{теор}]^2 = \sum_{[Ni^{2+}]} [\Delta(T_m)]^2 \quad (4)$$

имеет наименьшее значение по сравнению с суммой $S(K, n, \Delta H)$, вычисленной при всех других допустимых значениях параметров из табл. 1. Минимальное значение функции S определяли с использованием симплекс метода [13]. Так как в формулах (2) и (3) четыре параметра K_{AU} , K_U , n_{AU} , n_U являются общими для обоих переходов, процесс поиска оптимальных значений несколько усложнялся. Он был разбит на два этапа и использовался метод итераций.

Таблица 1. Начальные (А) и допустимые (В) значения параметров переходов, принятые на первой итерации.

Параметр	К, M^{-1}				ΔH_{32}	ΔH_{21}	n
	A2U	AU	полиА	полиU	ккал/моль		
А	1500	900	200	250	4	8,2	0,5
В	900÷2000	300÷1200	140÷260	170÷320	3÷6	5÷11	0,2÷1

Начальные значения, принятые на первой итерации, приведены в табл. 1. На i-ой итерации за начальные значения параметров брали их значения, полученные при минимизации суммы (4) на предыдущей итерации. На первом этапе i-ой итерации варьировались четыре параметра K_{AU} , K_U , n_{AU} , n_U при фиксированных значениях остальных шести параметров, причём в сумму (4) включались разности $\Delta(T_m)$ для обоих переходов. На втором этапе i-ой итерации найденные значения четырёх параметров фиксировались, и далее для каждого перехода отдельно решалась задача о минимизации суммы (4) по оставшимся трём параметрам. Итерационный процесс продолжался до тех пор, пока последующая итерация практически не изменяла значения параметров. Для этого достаточно было выполнить 4÷5 итераций.

Результаты расчётов представлены в табл. 2 и 3.

Таблица 2. Термодинамические параметры связывания ионов Mg^{2+} и Ni^{2+} с полинуклеотидами, находящимися в различных конформациях.

Константа связывания, M^{-1}	Ион	
	Mg^{2+} [7]	Ni^{2+}
K_{A_2U}	* 1000	1010 * 1300 [7]
K_{AU}	(a) 345 [7]	834 * 850 [7]
K_A	(a) 200 [7]	224
K_U	(a) 250 [7]	244
Стехиометрия комплекса		
n_{A_2U}		0,60
n_{AU}	(a) 0,5 [14- 17] (b)	0,51
n_A	(a) 0,19÷1,0 [9]	0,58
n_U	(a) 0,2÷0,5 [9]	0,4

Жирный шрифт – оптимизированные значения, рассчитанные в настоящей работе; * - расчётные значения, полученные нами ранее; (а) – экспериментальные значения; (b) – значения, соответствующие стехиометрии комплексов ионов Mg^{2+} с нативной ДНК (нДНК). Кулоновское взаимодействие нДНК с ионами Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} также характеризуется близкими значениями n ($0,36 \div 0,52$) [9].

Таблица 3. Энтальпии конформационных переходов в полинуклеотидах, индуцированные нагреванием (ккал/моль).

	Эксперимент	Расчёт
ΔH_{32}	2÷4,2 [10,11]	3,21 * 3÷5 [7]
ΔH_{21}	8,2 [10]	8,22

Жирный шрифт и * – то же, что в табл. 2.

Как видно из рис. 3, различие между экспериментальными и теоретическими значениями T_m для обоих переходов не превышает ± 1 °С, что находится в пределах экспериментальной ошибки T_m , составляющей $\pm 1,5$ °С. Исключением являются две точки “к” и “m” (рис. 2, 3), где различие составляет 1,7 °С и 1,4 °С соответственно.

Анализ табл. 2 позволяет сделать следующие выводы. Стехиометрия комплексов ионов Ni^{2+} со всеми полинуклеотидами мало отличается от сделанного нами ранее [7] предположения, что $n_{A2U} = n_{AU} = n_A = n_U = 0,5$, основанного на принципе компенсации заряда при кулоновском взаимодействии двухвалентного иона ($Z=+2$) с двумя зарядами

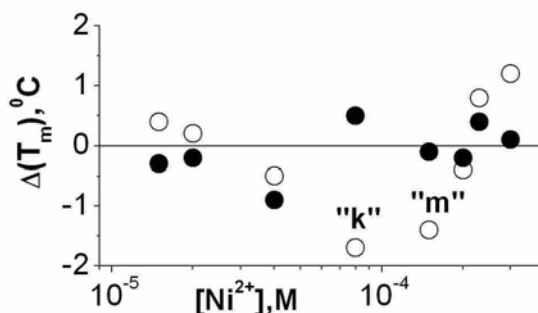


Рис. 3. Отклонение теоретических значений T_m , соответствующих оптимизированным величинам параметров формул (1)-(3), от экспериментальных. $\Delta(T_m) = (T_m)_{\text{экс}} - (T_m)_{\text{теор}}$.

Светлые и тёмные кружки – относятся соответственно к переходам 3→2 и 2→1.
“к” и “m” – то же, что и на рис. 2.

($Z=-1$) на поверхности полинуклеотидов. Соответственно константы связывания ионов Ni^{2+} с $A2U$, полиА и полиU практически совпадают с таковыми, полученными для ионов Mg^{2+} (табл. 2). По-видимому, это связано с тем, что в трёхнитеном полинуклеотиде $A2U$ наиболее предпочтительные для образования координационных связей с d-ионами атомы N7 и N1 аденина вовлечены в систему водородных связей (рис.1), а взаимодействие с O2 и O4 урацила в триплете и одонитовой полиU является очень слабым [8], как и взаимодействие с N7 и N1 одонитовой полиА: константа связывания ионов Ni^{2+} с этими атомами при малых степенях связывания ($85 M^{-1}$ [18]) даже меньше константы связывания ионов Mg^{2+} с атомами кислорода фосфатных групп, равной $200 M^{-1}$ (табл. 2).

Согласно табл.2, оптимизированное значение K_{AU} для ионов Ni^{2+} , в 2,5 раза большее, чем для ионов Mg^{2+} , обусловлено, по-видимому, дополнительным взаимодействием ионов Ni^{2+} с N7 AU, отсутствующим у магния.

Из неё следует также, что предположение о том, что для ионов Ni^{2+} K_A и K_U близки к таковым для ионов Mg^{2+} , сделанное в [7], является вполне корректным.

Из табл. 3 видно, что оптимизированная величина энтальпии перехода 3→2 попадает в середину интервала значений, полученных методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Что касается энтальпии перехода 2→1, то её значение отлично согласуется с данными, полученными Кракауэром и Стюртевантом [10]. В целом, проведенный анализ позволяет сделать вывод о том, что достаточно простой метод “фазовых диаграмм”, предложенный в настоящей работе, позволяет определять термодинамические параметры, характеризующие образование комплексов ионов Mt^{2+} с полинуклеотидами, находящимися в различных конформациях, с ошибкой, не превышающей её величину при использовании прямых экспериментальных методов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

- [1] Дж. В. Мур, С. Рамамурти. Тяжёлые металлы в природных водах: контроль и оценка влияния, 1987, Москва, Мир, 288 с.
- [2] J. Durlach, M. Bara, A. Guiet-Bara. In: Metal Ions in Biological Systems; H. Sigel, A. Sigel, Eds.; Marcel Dekker: New York 1990; vol.26, p.243.
- [3] M. A. Sirover, L. A. Loeb // Science., 1976, vol. 194, p. 1434-1436.
- [4] T. P. Coogan, D. M. Latta, R. J. Imbra, M. Costa // Biol. Trace Elem. Res., 1989, vol. 21, p.13-21.
- [5] H. Dally, A. Hartwig //Carcinogenesis, 1997, vol. 18, p.1021-1026.
- [6] A. Hartwig // Pure Appl. Chem., 2000, vol.72, p.1007-1014.
- [7] V. A. Sorokin, E. L. Usenko, V. A. Valeev // Int. Fed. Med. Biol. Engr. Proc., 2008, vol. 20, p.628-631.
- [8] K. Aoki, In: *Nucleosides, nucleotides and metal ions* // Metalloproteins: Chemical properties and biological effects; S. Otsuka, T. Yamanaka, Eds; Elsevier: Amsterdam, Oxford, N.Y., Tokio, 1988, p.457-490.
- [9] 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.
- [10] H. Krakauer, J. M. Sturtevant // Biopolymers, 1968, vol. 6, p. 491 – 512.
- [11] G. E. Plum, D. S. Pilch, S. C. Singleton, K. J. Breslauer // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 1995, vol. 24, p. 319 – 350.
- [12] V. A. Sorokin, V. A. Valeev, G. O. Gladchenko, M. V. Degtyar, V. A. Karachevtsev, Yu. P. Blagoi // Int.J.Biol.Macromol., 2003, vol. 31, p. 223-233.
- [13] Т. Е. Шуп. Решение инженерных задач на ЭВМ, 1982, Москва, Мир, 235 с.
- [14] R. M. Clement, J. Sturm, M. Daune // Biopolymers, 1973, vol.12, p.405-421.
- [15] M. Daune // Studia biophys., 1970, vol. 24/25, p.287-297.
- [16] J. Reuben, E. J. Gabbay // Biochemistry, 1975, vol.14, p.1230-1235.
- [17] A. R. Mathieson, J. Y. Olayemi //Archiv. Biochem.Biophys., 1975, vol. 169, p.237-243.
- [18] В. А. Сорокин, В. А. Валеев, Е. Л. Усенко // Биополимеры и клетка, 2008, т. 24, с.158-170.