

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

Влияние ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} на термостабильность ДНК в области образования металлизированных форм полинуклеотидов*(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Д. Н. Говоруном)*

Проведено порівняння залежностей параметрів індукованого нагріванням переходу спіраль—клубок ДНК від концентрації іонів Mg^{2+} та Ca^{2+} у водних розчинах, що мають рН 6,5 та 8,5. Виявлено аномальне зменшення температури і зростання кооперативності цього переходу в лужному розчині при концентрації $MgCl_2$, що перевищує $2 \cdot 10^{-4}$ М. Припускається, що за цих умов відбувається кооперативний перехід В-форми ДНК у нову конформацію, що має меншу термостабільність, але зберігає двоспіральну упорядковану структуру. Реалізація цього переходу обмежена розмірами катіона та величиною рН: аномальна поведінка параметрів переходу спіраль—клубок відсутня в розчинах, що містять іони Mg^{2+} і Ca^{2+} , за умов, що наближаються до нейтральних, а в присутності іонів Ca^{2+} (їх кристалографічний радіус у 1,5 раза більший, ніж у іонів Mg^{2+}) і в лужних.

В настоящее время установлено, что ионы щелочных и щелочноземельных металлов повышают термостабильность ДНК и РНК за счет экранирования отрицательных зарядов на атомах кислорода фосфатных групп двухнитевых полинуклеотидов. Однако этот результат, подтвержденный многочисленными работами, справедлив для нейтральных растворов (рН 6,0–7,5) (см., например, [1–5]). Представляет интерес выяснить, сохраняется ли эта ситуация в щелочных растворах (рН 8–9), в которых обнаружен переход двухнитевых молекул в металлизированную форму (М-ДНК) в присутствии ионов Zn^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} , обладающую большей термостабильностью, чем термостабильность двойных спиралей, находящихся в В- или А-формах [6–8]. Природа такого увеличения термостабильности остается неясной, поскольку кулоновское отталкивание между ионами, расположенными внутри двойной спирали вдоль ее оси [8], должно приводить к обратному эффекту.

В связи с вышеизложенным наша цель состояла в сравнительном изучении зависимостей термостабильности ДНК от концентрации ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} в растворах, имеющих рН 6,5 и 8,5. Эти измерения должны позволить выделить составляющую повышения термостабильности ДНК, обусловленную чисто электростатическим взаимодействием с фосфатами, которое характерно и для двухвалентных ионов цинка, никеля и кобальта, способных, помимо того, образовывать координационные связи с гетероатомами азотистых оснований [9].

Материалы и методы. В работе использовали натриевую соль ДНК спермы лосося (“Serva”, Германия); соли $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ и $NaCl$ марки х. ч. (“Реахим”, Россия); буферы: какодилат натрия (рН 6,5) и трис \cdot HCl (рН 8,5). ДНК растворяли в буфере (0,01 М), в который добавляли 0,005 М $NaCl$. Концентрацию хлоридов металлов определяли по массе и контролировали методом трилонометрического титрования. Концентрацию фосфора ДНК (Р), составлявшую $(2 \div 5) \cdot 10^{-5}$ М, определяли по коэффициенту молярной экстинкции в максимуме ее поглощения [10].

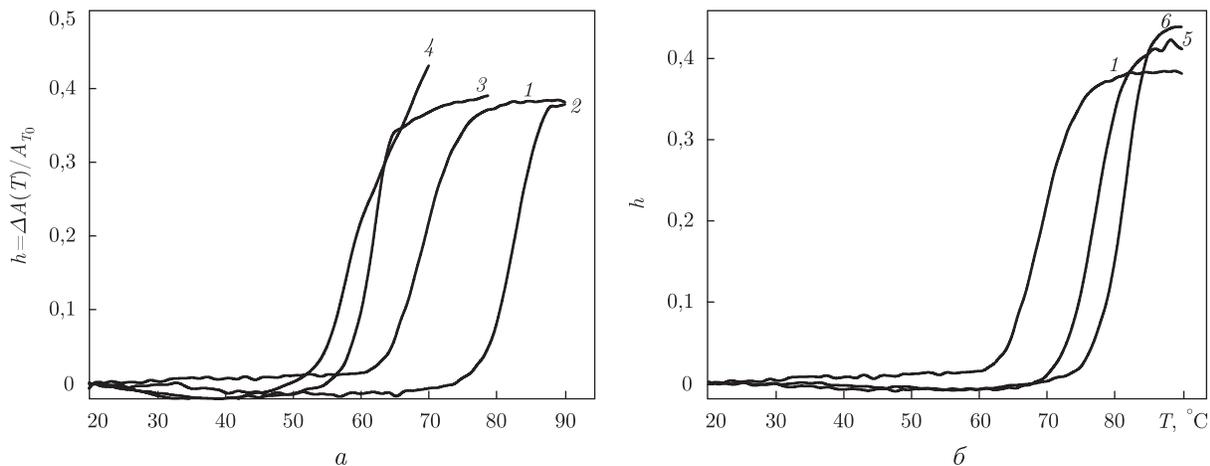


Рис. 1. Кривые плавления ДНК при pH 8,5 в присутствии MgCl_2 (а) и CaCl_2 (б): 1 — без ионов Mg^{2+} ; 2 — $2 \cdot 10^{-4}$ М; 3 — $3 \cdot 10^{-4}$ М; 4 — $4 \cdot 10^{-4}$ М; 5 — 10^{-4} М; 6 — $2 \cdot 10^{-3}$ М. Перед нагреванием растворы выдерживали при $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 2 ч

Кривые плавления регистрировали на спектрофотометре UV VIS фирмы “Carl Zeiss Jena” (Германия) в форме $h(T)$

$$h(T) = \frac{\Delta A(T)}{A_{T_0}},$$

где h — гиперхромизм в максимуме поглощения ДНК; $\Delta A(T)$ — индуцированное нагреванием изменение оптического поглощения ДНК; A_{T_0} — ее поглощение при комнатной температуре, $T_0 = (22 \pm 2)^\circ\text{C}$. Эти измерения осуществлялись дифференциальным способом: в кюветах рабочего и эталонного каналов спектрофотометра находились идентичные растворы. Эталонную кювету термостатировали при $T = T_0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, а рабочую медленно нагревали со скоростью 0,25 град/мин, чтобы при всех температурах обеспечить термодинамическое равновесие в растворах. Их температуру определяли с ошибкой, не превышающей $0,5^\circ\text{C}$. Однако различие в измеренных значениях температуры плавления ДНК (T_m) в одинаковых условиях достигало $\pm 1^\circ\text{C}$.

Расчеты параметров перехода спираль—клубок проводили с помощью присоединенного к спектрофотометру персонального компьютера. T_m определяли как температуру, соответствующую переходу в неупорядоченное состояние 50% звеньев полимера. В пределах градуса это значение совпадало с температурой, определенной по положению максимума на зависимости от температуры производной $\alpha = dh(T)/dT$.

Результаты и обсуждение. Типичная форма кривых плавления ДНК при различных концентрациях ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} в растворах, имеющих pH 8,5, приведена на рис. 1. Она остается такой же и в нейтральных растворах, содержащих ионы Mg^{2+} и Ca^{2+} . Исключение составляет кривая плавления 4 (см. рис. 1), форма которой обусловлена появлением при $T > 61^\circ\text{C}$ рассеивающих свет частиц.

Из рис. 2 видно, что зависимости температуры плавления ДНК (T_m) от концентрации ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} при pH 6,5, а также от содержания ионов Ca^{2+} при pH 8,5 в пределах экспериментального разброса описываются универсальной кривой (кривая *a-b-e*). Эта зависимость определяется различием чисто кулоновского сродства ионов к фосфатным группам двухспиральной и однонитевой клубкообразной ДНК, имеющих разную линей-

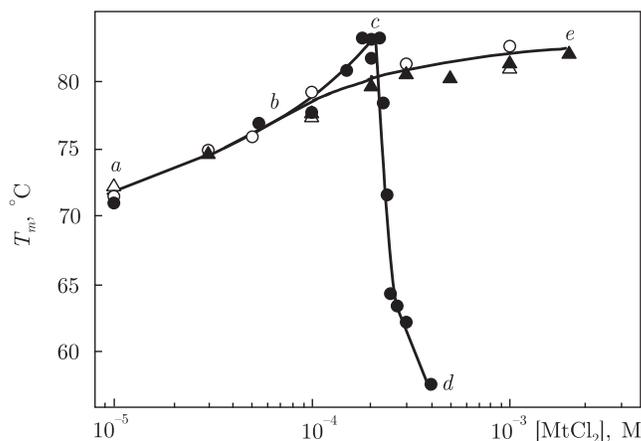


Рис. 2. Зависимость температуры плавления ДНК от концентрации MgCl_2 и CaCl_2 при pH 6,5 и 8,5. pH 6,5: \circ — MgCl_2 ; \triangle — CaCl_2 ; pH 8,5: \bullet — MgCl_2 ; \blacktriangle — CaCl_2

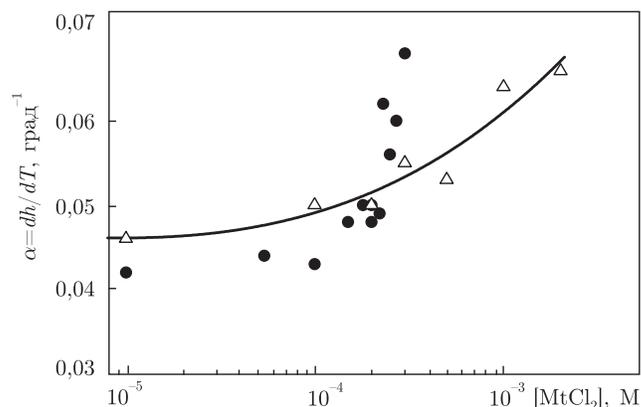


Рис. 3. Зависимость кооперативности перехода спираль—клубок ДНК от концентрации ионов Mg^{2+} (\bullet) и Ca^{2+} (\triangle) при pH 8,5. Сплошная линия рассчитана методом наименьших квадратов

ную плотность отрицательных зарядов на поверхности ее “кристаллической” и “расплавленной” форм [11]. Таким образом, в изученных ионных условиях максимальное изменение T_m ДНК, обусловленное взаимодействием двухвалентных катионов с ее фосфатами, составляет ~ 11 °C (см. рис. 2). При pH 8,5 возрастание T_m ДНК наблюдается и для ионов Mg^{2+} при их низких концентрациях (см. рис. 2, участок *a-b*). Однако при концентрациях MgCl_2 , превышающих критическую ($[\text{Mg}^{2+}]_{\text{cr}} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$), производная $|\gamma| = |dT_m/d[\text{MgCl}_2]|$ скачком меняет знак на обратный. При этом возрастание концентрации MgCl_2 от $2 \cdot 10^{-4}$ до $4 \cdot 10^{-4}$ M приводит к уменьшению ее температуры плавления на 26 °C (рис. 2). Такое поведение T_m ДНК в присутствии магния является совершенно неожиданным, поскольку ранее подобный эффект наблюдали лишь в присутствии ионов переходных металлов при нейтральных значениях pH [4, 5]. В отличие от некооперативного изменения T_m , соответствующего кривой *a-b-e*, для которой при $2 \cdot 10^{-4}$ M Mg^{2+} $|\gamma| = 2000$ град/моль, для кривой *c-d* величина $|\gamma|$ в 100 раз больше — $2 \cdot 10^5$ град/моль.

Аномальный вид для ионов Mg^{2+} имеет также концентрационная зависимость производной $\alpha = dh(T)/dT$, определяющей кооперативность перехода спираль—клубок (рис. 3). Хотя знак производной $\beta = d\alpha/d[\text{Mg}^{2+}]$ для ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} одинаков, возрастание

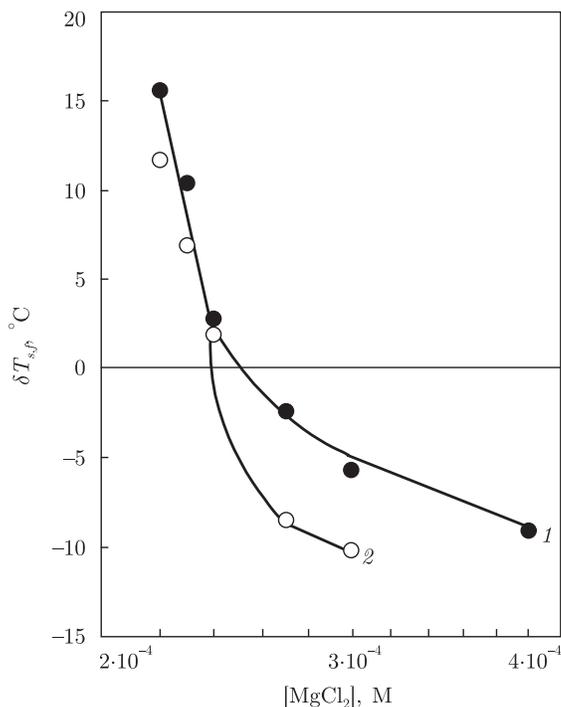


Рис. 4. Зависимость изменения температур начала (1) и конца (2) перехода спираль—клубок ДНК от концентрации MgCl_2 .

T_s и T_f — температуры, при которых касательная к кривой плавления при $T = T_m$ пересекает соответственно ось абсцисс и параллельную ей прямую, соответствующую минимальному значению производной $dh(T)/dT$. $\delta T_{s,f} = T_{s,f} - (T_{s,f})_0$, где индекс “нуль” соответствует T_s и T_f ДНК при $[\text{Mg}^{2+}] = 0$. (При $4 \cdot 10^{-4}$ М Mg^{2+} из-за появления рассеяния света при $T > 61$ °С определить температуру окончания плавления ДНК невозможно)

кооперативности перехода в присутствии магния значительно больше, чем в присутствии кальция. Так, при $3 \cdot 10^{-4}$ М для Mg^{2+} $\beta = 100$ (моль · град)⁻¹, тогда как для Ca^{2+} величина β на порядок меньше. Ионы Mg^{2+} также в большей степени понижают температуру окончания плавления ДНК (T_f), определяемую стабильностью ее блоков, обогащенных GC-парами, по сравнению с уменьшением температуры его начала (T_s), определяемой стабильностью блоков, обогащенных AT-парами. Это позволяет предположить преимущественную дестабилизацию магнием GC-пар ДНК, которая и может быть причиной сильного возрастания кооперативности перехода спираль—клубок ДНК в присутствии ионов Mg^{2+} .

В целом можно предположить, что при pH 8,5 и $[\text{MgCl}_2] > 2 \cdot 10^{-4}$ М изменения параметров перехода спираль—клубок ДНК обусловлены взаимодействием ионов Mg^{2+} с коллективным облаком π -электронов колец азотистых оснований. Его принципиальная возможность была показана для комплексов гидратированных ионов магния с декамером и додекамером Дикерсона [12]. Такое взаимодействие требует внедрения иона в структуру ДНК [12]. Этим, в частности, можно объяснить отсутствие подобных взаимодействий для больших ионов Ca^{2+} , имеющих кристаллографический радиус по Полингу $R = 0,99$ Å, т.е. в 1,5 раза больший, чем у ионов Mg^{2+} (0,65 Å) [13]. Образование комплекса катион— π -электроны колец требует, по-видимому, флуктуационных раскрытий двойной спирали, интенсивность которых резко возрастает в щелочных рас-

творях, поскольку значения рН 8–9 близки к величинам рК_а депротонирования N1 dGMP (9,5 [14]) и N3 dTMP (10,0 [14]) — обстоятельство, обеспечивающее, в частности, образование М-ДНК в этой области рН в присутствии хлоридов цинка, никеля и кобальта [6].

Поскольку в области аномального поведения параметров перехода спираль—клубок структура ДНК остается упорядоченной (это следует из сохранения больших значений h и dh/dT), а изменения этих параметров носят кооперативный характер, можно предположить, что при рН 8,5 и $[MgCl_2] > [MgCl_2]_{cr}$ имеет место переход В-формы ДНК в новую конформацию, структурные особенности которой, однако, не могут быть определены методами термодинамики.

Авторы выражают благодарность Ю. Н. Гуру за помощь в проведении анализов.

1. Gruenwedel G. W., Hsu Ch.-H., Lu D. S. The effect of aqueous neutral-salt solutions on the melting temperature of deoxyribonucleic acids // *Biopolymers*. – 1971. – **10**, No 1. – P. 47–68.
2. Record M. Th., jr. Effect of Na⁺ and Mg²⁺ ions on the helix-coil transition of DNA // *Ibid.* – 1975. – **14**, No 10. – P. 2137–2158.
3. Blagoi Yu. P., Sorokin V. A., Valeev V. A. et al. Magnesium ion effect on the helix-coil transition of DNA // *Ibid.* – 1978. – **17**, No 5. – P. 1103–1118.
4. Eichhorn G. L., Shin Y. A. Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1968. – **90**, No 26. – P. 7323–7328.
5. Blagoi Yu. P., Sorokin V. A., Valeev V. A., Gladchenko G. O. Effect of calcium and manganese ions on the helix-coil transition of DNA // *Biopolymers*. – 1983. – **22**, No 8. – P. 1641–1656.
6. Lee J. S., Latimer L. J. P., Reid R. S. A cooperative conformational change in duplex DNA induced by Zn²⁺ and other divalent metal ions // *Biochem. Cell Biol.* – 1993. – **71**. – P. 162–168.
7. Wood D. O., Dismore M. J., Bare G. A., Lee J. S. M-DNA is stabilized in GC tracts or by incorporation of 5-fluorouracil // *Nucl. Acids Res.* – 2002. – **30**. – P. 2244–2250.
8. Aich P., Labiuk S. L., Tari L. W. et al. M-DNA: A complex between divalent metal ions and DNA which behaves as a molecular wire // *J. Mol. Biol.* – 1999. – **294**. – P. 477–485.
9. Aoki K. *Bioactive Molecules // Metalloproteins* / Eds. S. Otsuna, T. Yamanaka. – Amsterdam; Oxford; New York; Tokio: Elsevier, 1988. – P. 457.
10. Доусон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Дженс К. Справочник биохимика. – Москва: Мир, 1991. – 544 с.
11. Sorokin V. A., Galkin V. L., Volchok V. L., Blagoi Yu. P. Theories of “condensation” and “ligands” on describing the DNA helix-to-coil transition: comparative analysis // *Biophysics*. – 1996. – **41**. – P. 1233–1239.
12. McFail-Isom L., Shui X., Williams L. D. Divalent cations stabilize unstacked conformations of DNA and RNA by interacting with base π systems // *Biochemistry*. – 1998. – **37**, No 49. – P. 17105–17111.
13. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии. – Москва: Химия, 1971. – 454 с.
14. Бородавкин А. В., Будовский Е. И., Морозов Ю. В. и др. Электронная структура, УФ-спектры поглощения и реакционная способность компонентов нуклеиновых кислот // *Итоги науки и техники*. – Москва: ВИНТИ, 1977. – 228 с.

Физико-технический институт
низких температур им. Б. И. Веркина
НАН Украины, Харьков

Поступило в редакцию 01.07.2009

Mg²⁺ and Ca²⁺ ion effect on DNA thermal stability in the field of formation of polynucleotide metallic forms

Dependences of parameters of the heating-induced helix-coil transition in DNA on Mg²⁺ and Ca²⁺ ion concentrations in water solutions with pH 6.5 and 8.5 are compared. An abnormal decrease in the temperature and an increase in the cooperativity of the transition are revealed in an alkaline solution at the MgCl₂ concentration higher than $2 \cdot 10^{-4}$ M. It is supposed that the cooperative transition of the DNA B form into a new conformation takes place, being of a lower thermal stability but holding the double-helical ordered structure. The realization of the transition is limited with cation sizes and pH value, and the abnormal behavior of the helix-coil transition parameters is absent in solutions containing Mg²⁺ and Ca²⁺ ions under conditions close to neutral ones. In the presence of Ca²⁺ ions (their crystallographic radius is by 1.5 times higher than that of Mg²⁺ ones), such an abnormal behavior is not observed in alkaline solutions as well.