



УДК 535.343.3.577.323

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

Влияние температуры и концентрации ионов Zn^{2+} на конформацию одонитевой полиС в нейтральном растворе

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Д. Н. Говоруном)

Методами дифференциальной УФ-спектроскопии и термической денатурации изучена зависимость степени спиральности полиС от температуры и концентрации ионов Zn^{2+} в какодилатном буфере (0,015 М Na^+ , рН 7). Установлены атомы полиС, координирующие ионы Zn^{2+} . Определены температуры и концентрации цинка, при которых наблюдается переход расплавленных звеньев полиС в упорядоченную структуру, стабилизируванную внутривещечными связями $N3-Zn^{2+}-N3$.

Негативные последствия загрязнения окружающей среды солями тяжелых и переходных металлов (мутагенез, канцерогенез [1]) составляют серьезную экологическую проблему, особенно актуальную для стран с развитой металлургической промышленностью, к которым относится и Украина. С другой стороны, оптимальная концентрация ионов переходных металлов (ПМ) является необходимым условием нормального функционирования клеток живых организмов. Например, дефицит ионов Zn^{2+} приводит к замедлению полового созревания, снижению иммунитета, нарушению всех обменных процессов в организме [2]. Одним из возможных механизмов воздействия ионов ПМ на клеточные процессы является их специфическое взаимодействие с гетероатомами азотистых оснований ДНК и РНК, приводящее, в частности, к конформационным превращениям в макромолекулах. Его следствием является нарушение таких процессов, как репликация, транскрипция, трансляция [1], которые промотируются инициацией полимеразы одонитевых участков в структуре макромолекул.

В связи с этим особый интерес представляет изучение комплексов ионов ПМ с одонитевыми полиС, поскольку цитидиновые последовательности, входящие в состав GC-пар, характерны для блочной ДНК высших организмов [3]. Такие повторяющиеся последовательности содержатся также в теломерных ДНК, регулирующих, в частности, продолжительность жизненного цикла клеток [4].

© В. А. Сорокин, Е. Л. Усенко, В. А. Валеев, 2014

К малоизученным комплексам одонитовой полиС с ионами ПМ относятся комплексы этого полинуклеотида с ионами Zn^{2+} , являющимися необходимым компонентом нормального функционирования различных специализированных клеток. Так, например, в плазме эритроцитов концентрация этих ионов достигает $\sim 2 \cdot 10^{-4}$ М [5], а в плазме спермы человека — $2 \cdot 10^{-3}$ М [6]. В последнее время интерес к комплексам ионов Zn^{2+} с полинуклеотидами возрос в связи с возможностью их применения в технологиях создания элементов нанoeлектроники [3].

В настоящее время данные о влиянии ионов Zn^{2+} на конформацию одонитовой полиС ограничены качественными результатами пионерской работы Shin (см. [7]), в которой методом дисперсии оптического вращения (ДОВ) показано, что при комнатной температуре эти ионы понижают степень спиральности полинуклеотида. Кроме того, в [7] рассмотрен узкий диапазон относительных концентраций цинка $\gamma = [Zn^{2+}/P] \leq 10$ (P — концентрация фосфора).

Цель настоящей работы — изучение конформации одонитовой полиС в широком интервале концентраций ионов Zn^{2+} в диапазоне температур от 20 до 90 °С.

Материалы. Калиевая соль полиС (молекулярная масса $M_w = 4 \cdot 10^5$ Да) (Sigma, США). Полинуклеотид растворяли в: 1) какодилатном буфере (10^{-3} М, рН 7) (Serva, Германия), содержащем $1,4 \cdot 10^{-2}$ М NaCl; 2) деионизованном тридистилляте (рН₀ 6,67), содержащем $1,5 \cdot 10^{-2}$ М NaCl, кислотность которого повышалась от рН₀ до рН 4,45 добавлением HCl.

Химически чистые хлориды цинка ($ZnCl_2 \cdot 6H_2O$), NaCl и HCl (Реахим, Россия). Концентрацию ионов Zn^{2+} ($[Zn^{2+}]$) определяли взвешиванием и контролировали методом трилонометрического титрования, а фосфора (P) полиС — по коэффициенту молярной экстинкции в максимуме поглощения ($\varepsilon_m = 6500 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ при $\nu_m = 37300 \text{ см}^{-1}$). Рассмотренный диапазон концентраций ионов Zn^{2+} $10^{-5} \div 10^{-2}$ М. Концентрация полиС составляла $(2 \div 4) \cdot 10^{-5}$ М. Погрешность определения P и $[Zn^{2+}]$ не превышала 0,5%.

Методы. Дифференциальная УФ (ДУФ)-спектроскопия. ДУФ-спектры одонитовой полиС ($\Delta A_a(\nu)$), индуцированные ионами Zn^{2+} , были получены при $T = T_0 = 20$ °С с использованием четырехкюветной схемы [3] на спектрофотометре “Specord UV VIS” (Carl Zeiss Jena, Германия) и нормированы на P ($\Delta \varepsilon_a(\nu) = \Delta A_a(\nu)/P$).

Термическая денатурация. Профили зависимости $\Delta A(T)$ при фиксированных концентрациях ионов Zn^{2+} и волнового числа (ν) регистрировали на том же спектрофотометре по двухкюветной схеме [3]: эталонную кювету термостатировали при $T = T_0 \pm 0,5$ °С, а рабочую медленно нагревали со скоростью 0,25 град/мин.

Регистрация зависимостей $h(T) = \Delta A_a(T)/A_{T_0}$ и их дифференцирование по температуре (A_{T_0} — оптическая плотность раствора при $T = T_0$) осуществлялись присоединенным к спектрофотометру персональным компьютером.

Результаты и обсуждение. Форма ДУФ-спектров, индуцированных протонированием полиС и ее свободных мономеров (СМР), практически одинакова (рис. 1) и обусловлена ионизацией атомов N3 цитозина, приводящей к красному сдвигу его первой полосы поглощения, расположенной при $\nu = 37200 \text{ см}^{-1}$, и возрастанием ее интенсивности [7]. Различие в интенсивности спектров 5 и 6 (см. рис. 1) обусловлено тем, что в кислых растворах одонитовая полиС образует двухспиральную структуру, стабилизированную двумя межмолекулярными связями N4–H–O2 (N — азот аминогруппы) и связью N3–H⁺–N3 [7], которая и формирует спектр 5 (см. рис. 1). Хотя интенсивность ДУФ-спектров полиС, индуцированных ионами Zn^{2+} , существенно меньше, чем спектров 5 и 6 (см. рис. 1), их форма позволяет

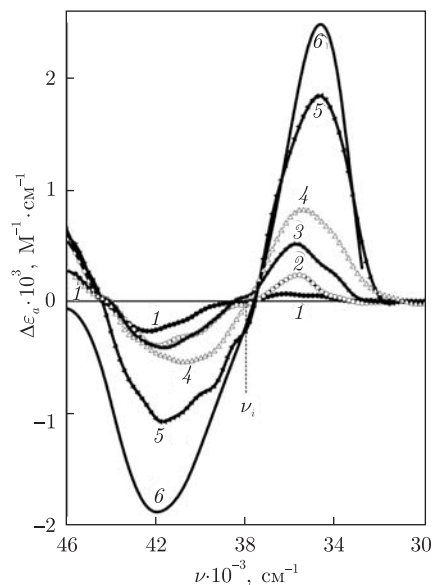


Рис. 1. ДУФ-спектры полиС, индуцированные ионами Zn^{2+} (кривые 1–4) и протонированием (кривая 5) при $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$:
 1 – 10^{-4} М; 2 – $6 \cdot 10^{-4}$ М; 3 – 10^{-3} М; 4 – 10^{-2} М (эти спектры получены при рН 7); 5 – рН 4,45 ($[Zn^{2+}] = 0$); 6 – протонирование атома N3 СМР [8] (его интенсивность уменьшена в три раза)

сделать однозначный вывод о том, что они обусловлены координацией ионов цинка с атомом N3 — результат, согласующийся с данными ИК-спектроскопии и рентгеноструктурного анализа, полученными для комплексов ионов Zn^{2+} с СМР [9]. Образование такого комплекса в полиС может, в принципе, привести к изменению конформации полинуклеотида. Последнее можно зарегистрировать по особенностям температурных зависимостей изменения поглощения полиС при ее нагревании (рис. 2). При этом существенно, что спектры 1–4 имеют изобестическую точку $\nu_i = 38000\text{ см}^{-1}$ (см. рис. 1). При таком волновом числе все изменение поглощения полинуклеотида в присутствии цинка будет обусловлено только изменением его конформации. Поэтому измерение зависимостей $\Delta\varepsilon_a(T)$ было проведено при $\nu = \nu_i$ (см. рис. 2). Последние были пересчитаны в температурные зависимости степени спиральности полиС ($\Theta(T)$) по формуле [10]

$$\Theta(T) = \Theta_{T_0} + \Delta\Theta(T) = \left[\frac{h_{1m}}{h_{2m}} - \frac{h_1(T)}{h_2m} \right] \cdot 100\%, \quad (1)$$

где Θ_{T_0} — степень спиральности полиС при $T = T_0$; $\Delta\Theta(T)$ — ее изменение при нагревании; h_{1m} и h_{2m} — максимальные значения гиперхромного коэффициента соответственно одно- и двухнитевого полинуклеотидов при переходе в состояние полностью разупорядоченного клубка (табл. 1). Отметим, что в отсутствие цинка определенные из зависимостей

Таблица 1. Концентрационная зависимость максимального значения гиперхромного коэффициента для однонитевой полиС (h_{1m})*

| $[Zn^{2+}] \cdot 10^4, \text{ М}$ | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| h_{1m} | 0,127 | 0,092 | 0,078 | 0,063 | 0,078 |

*Для двухнитевой полиС $h_{2m} = 0,21$ [10].

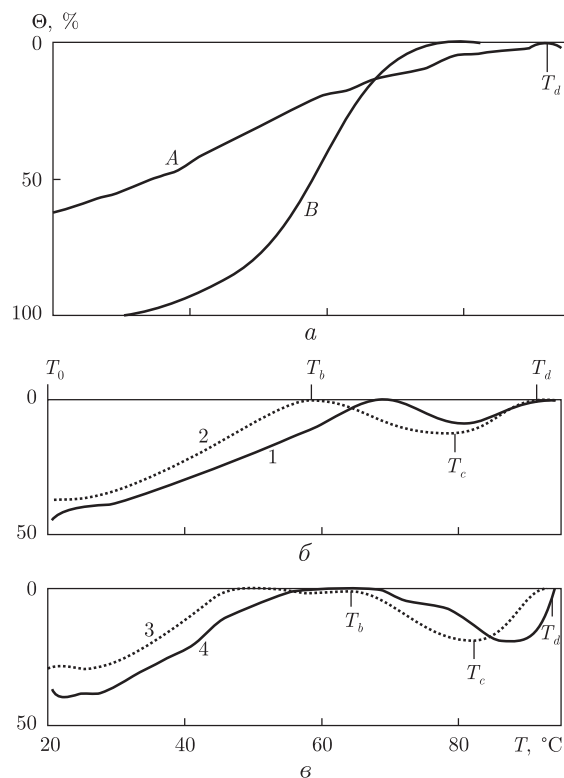


Рис. 2. Зависимости степени спиральности полиС от температуры в отсутствие цинка (а) и в присутствии его ионов (б, в):

а — А — одонитовой полинуклеотид (рН 7); В — двухнитовой (рН 4) [10]. На рис. б и в цифры возле кривых — $[Zn^{2+}] \cdot 10^4$, М; $T_0 = 20$ °С — стартовая температура; T_b и T_c — соответственно температуры начала образования новой спиральной конформации и ее термического разрушения; T_d — температура перехода всех упорядоченных звеньев в неупорядоченное состояние; T_b , T_c и T_d — температуры, при которых производная $d\Theta/dT$ обращается в нуль

$h(T)$ при $\nu = \nu_m$ и $\nu = \nu_i$ значения Θ_{T_0} совпадают в пределах 5%. Как видно из рис. 2, а, кривые А и В являются монотонно убывающими функциями во всем изученном интервале температур. Однако кооперативность перехода спираль — клубок в двухнитовой полиС, пропорциональная максимальному значению производной $|\alpha_m| = |d\Theta/dT|$, в четыре раза больше $|\alpha_m|$ для одонитового полинуклеотида (табл. 2).

В присутствии ионов Zn^{2+} форма кривых плавления меняется кардинальным образом (рис. 2, б, в). Так, при нагревании от T_0 до T_b Θ уменьшается до нуля, а при дальнейшем нагревании начинает увеличиваться вплоть до $T = T_c$, выше которой знак производной α меняется на обратный (см. табл. 2), так что при $T \geq T_d$ все звенья полиС переходят в конформацию полностью разупорядоченного статистического клубка.

Возрастание степени спиральности полиС при высокой температуре свидетельствует об индуцируемом цинком образованием частью звеньев упорядоченных структур со стекингом оснований. Последние могут быть либо двухнитовыми, со структурой, подобной “кислой” форме полиС, либо петлями в одиночных нитях, как это предполагалось в качестве альтернативы при интерпретации ДОВ спектров комплексов ионов Cu^{2+} с одонитовыми полиС и полиА [11]. Наиболее вероятными связями, стабилизирующими эти структуры, являются мостики $N3-Zn^{2+}-N3$.

Из табл. 2 видно, что при 10^{-4} М Zn^{2+} на всех участках кривой плавления модуль α_m одинаков и совпадает с таковым для кривой B на рис. 2, *a*. Это означает, что при такой концентрации образующиеся петли являются однопетлевыми. Вероятность их образования должна повышаться с увеличением гибкости одиночных нитей при повышении температуры [12] и/или уменьшением жесткости сахарофосфатного остова полимера, зависящей от его нуклеотидного состава ($polyU < polyC < polyA$ [7]). Напротив, вероятность образования межнитевых связей, индуцирующих переход однопетлевых полинуклеотидов в мультицепочечную конформацию (включая двухнитевую) повышается при понижении температуры [7]. Кроме того, последний процесс является достаточно медленным. Так, время перехода 70% звеньев однопетлевой полиС в двухспиральную конформацию даже при благоприятных условиях ($pH\ 4$, $T = 4\ ^\circ C$) составляет ~ 70 ч [7], тогда как время образования упорядоченных звеньев на участке $T_b - T_c$ на порядок меньше (не превышает 2 ч) (см. рис. 2, *b*, *в*). Последнее также является доводом в пользу предположения о том, что повышение степени спиральности полиС при высокой температуре (см. рис. 2, *b*, *в*) обусловлено внутримолекулярным процессом.

Данные табл. 2 не противоречат этому предположению. Так, хотя при $[Zn^{2+}] > 10^{-4}$ М увеличение концентрации цинка приводит к возрастанию величины $|\alpha_m|$, его причиной на участке $T_0 - T_b$ является понижение термостабильности спиральных звеньев однопетлевой полиС, не образующих петель, а на участках $T_b - T_c$ и $T_c - T_d$ — увеличением их длины, которое, в принципе, должно повышать кооперативность переходов $1 \leftrightarrow 2$ [13]. Однако при $4 \cdot 10^{-4}$ М Zn^{2+} и $T > T_c$ (см. рис. 2) аномально большое значение $|\alpha_m|$ (см. табл. 2) обусловлено не столько этим процессом, сколько, по-видимому, частичной деполимеризацией полиС, имеющей место при высоких температурах для одноцепочечных гомополинуклеотидов разного состава (включая полиС) в присутствии ионов Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и Cu^{2+} [7].

Как видно из рис. 3, все изотермы степени спиральности имеют экстремум, расположенный в области $\gamma = 12 \div 15$. При этом вплоть до $T \sim 65\ ^\circ C$ при $\gamma < 12$ повышение концентрации цинка уменьшает величину Θ за счет связывания его ионов с атомами N3 спиральных звеньев полиС, а обратный эффект при $\gamma > 15$ можно интерпретировать как результат образования связей N3- Zn^{2+} -N3, индуцирующего переход расплавленных звеньев в конформацию однопетлевых петель. При $T > 65\ ^\circ C$ ситуация зеркально противоположная: образование петель наблюдается в области низких концентраций ионов цинка, а при больших происходит их разрушение.

Во всем изученном интервале температур экспериментальные данные, представленные на рис. 3, удовлетворительно описываются полиномом вида

$$\Theta([Zn^{2+}]) = a - b[Zn^{2+}] + c[Zn^{2+}]^2. \quad (2)$$

Таблица 2. Концентрационная зависимость максимального значения производной $\alpha = d\Theta(T)/dT$

| $[Zn^{2+}] \cdot 10^4, M$ | Участок на кривых $\Theta(T)$ (рис. 2) | | | |
|---------------------------|--|-------------|-------------|-------------|
| | $T_0 - T_d$ | $T_0 - T_b$ | $T_b - T_c$ | $T_c - T_d$ |
| 0 (pH 7) | -0,011 | | | |
| 0 (pH 4) | -0,043 | | | |
| 1 | | -0,011 | +0,011 | -0,011 |
| 2 | | -0,016 | +0,011 | -0,018 |
| 3 | | -0,019 | +0,016 | -0,029 |
| 4 | | -0,022 | +0,018 | -0,075 |

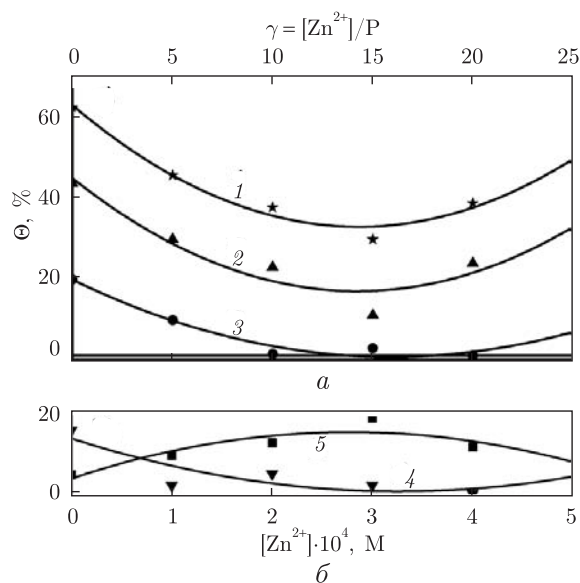


Рис. 3. Изотермы зависимости степени спиральности полиС от концентрации ионов Zn^{2+} : 1 – 20 °С; 2 – 40 °С; 3 – 60 °С; 4 – 65 °С; 5 – 80 °С. Сплошные линии получены методом наименьших квадратов (см. формулу (2) и табл. 3)

Температурные зависимости коэффициентов полинома представлены в табл. 3, данные которой позволяют рассчитать степень спиральности полиС при концентрациях цинка, недоступных для экспериментального определения из-за образования рассеивающих свет частиц.

Известно, что в некоторых бинарных растворах простых жидкостей наблюдается эффект, получивший название “ретроградная конденсация” (РК) [14]. Из рис. 2, 3 вытекает, что комплекс одонитевой полиС с ионами Zn^{2+} является полимерным аналогом такого раствора. Аномальная форма кривых плавления наблюдалась также и для комплексов полиС с ионами Cu^{2+} [7] и полиА с ионами Cd^{2+} [15] и Zn^{2+} [3]. Это позволяет предположить, что комплексы ионов ПМ с одонитевыми гомополинуклеонидами разного состава относятся к этому классу растворов. Поскольку необходимым условием реализации эффекта РК является достаточно высокая степень разупорядочения оснований, то для одонитевых полиИ и полиУ, имеющих самый низкий уровень стекинга при комнатной температуре [7], возможность реализации РК должна определяться только их способностью образовывать координационные связи с гетероатомами азотистых оснований, достаточно большой для гипоксантина и очень малой для урацила.

В заключение можно отметить, что реализации РК на одонитевых участках ДНК и РНК может влиять на функционирование полимераз, реализующих процессы передачи генетической информации в клеточных и бесклеточных системах.

Таблица 3. Температурная зависимость коэффициентов формулы (2)

| $T, ^\circ C$ | 20 | 40 | 60 | 65 | 80 |
|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| a | 0,62 | 0,44 | 0,19 | 0,13 | 0,03 |
| b | 2126 | 1984 | 1210 | 797 | –821 |
| c | $3,7 \cdot 10^6$ | $3,5 \cdot 10^6$ | $1,9 \cdot 10^6$ | $1,2 \cdot 10^6$ | $-1,5 \cdot 10^6$ |

Основные результаты. 1. Причиной впервые обнаруженного при высоких температурах повышения степени спиральности полиС в присутствии ионов Zn^{2+} является переход части ее звеньев, находящихся в состоянии разупорядоченного клубка, в конформацию со стекингом оснований. 2. Этот переход индуцируется образованием однонитевых петель, стабилизированных связями $N3-Zn^{2+}-N3$. 3. Образование петель зависит от температуры и концентрации ионов Zn^{2+} . При этом максимальная эффективность этого процесса наблюдается при концентрациях цинка, близких к биологической, как при комнатной, так и физиологической температуре (37 °С) и кислотности (рН 7).

1. *Hartwig A.* Recent advances in metal carcinogenicity // *Pure Appl. Chem.* – 2000. – **72**, No 6. – P. 1007–1014.
2. *Prasad A. S.* Zinc deficiency: Has been known of for 40 years but ignored by global health organizations // *Brit. Med. J.* – 2003. – **326**, No 7386. – P. 409–10.
3. *Sorokin V. A., Valeev V. A., Usenko E. L., Andrushchenko V. V.* Effect of Zn^{2+} and temperature on the conformational equilibrium of single – stranded polyA in neutral solutions // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2013. – **61**. – С. 448–452.
4. *Галицкий В. А.* Эпигенетическая природа старения // *Цитология.* – 2009. – **51**. – С. 388–397.
5. *Vallee B. L., Gibson J. G.* The zinc content of whole blood, plasma, leukocytes and erythrocytes in the anemias // *Blood.* – 1949. – **4**. – P. 455–466.
6. *Henkel R., Bittner J., Weber R. et al.* Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility // *Fertility and Sterility.* – 1999. – **71**, No 6. – P. 1138–1143.
7. *Благой Ю. П., Галкин В. Л., Гладченко Г. О. и др.* Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах. – Киев: Наук. думка, 1991. – 270 с.
8. *Бородавкин А. В., Будовский Э. И., Морозов Ю. В. и др.* Электронная структура, УФ-спектры поглощения и реакционная способность компонентов нуклеиновых кислот // *Итоги науки и техники. Сер. Мол. биол.* – Москва: ВИНТИ, 1977. – **14**. – С. 1–227.
9. *Aoki K.* Nucleosides, nucleotides and metal ions // *Metalloproteins: Chemical properties and biological effects* / Eds. S. Otsuka, T. Yamanaka. – Amsterdam; Oxford; New York; Tokio: Elsevier, 1988. – P. 457–490.
10. *Sorokin V. A., Blagoi Yu. P., Valeev V. A., Antonova O. A.* Studies of bivalent copper ion binding to polyC // *J. Inorg. Biochem.* – 1985. – **24**. – P. 97–111.
11. *Rifkind J. M., Shin Y. A., Heim J. M., Eichhorn G. L.* Cooperative disordering of single – stranded polynucleotides through copper crosslinking // *Biopolymers.* – 1976. – **15**, No 9. – P. 1879–1902.
12. *Костюков В. В.* Стабильность коротких шпилечных структур нуклеиновых кислот и их комплексов с ароматическими соединениями: Дис. . . канд. физ.-мат. наук: 03.00.02. – Севастополь, 2007. – 207 с.
13. *Веденов А. А., Дыхне А. М., Франк-Каменецкий М. Д.* Переход спираль–клубок в ДНК // *Усп. физ. наук.* – 1971. – **105**, № 3. – С. 479–519.
14. *Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М.* Статистическая физика. Т. 5. – Москва: Наука, 1964. – 568 с.
15. *Sorokin V. A., Valeev V. A., Usenko E. L. et al.* The nature of different influence of Cd^{2+} ions on the conformational equilibrium of triple – stranded polyribonucleotides poly(U) · poly(A) · poly(U) and poly(I) · poly(A) · poly(I) in aqueous solutions // *Biophysics.* – 2007. – **52**, No 6. – P. 545–557.

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

Поступило в редакцию 25.07.2014

В. О. Сорокін, Є. Л. Усенко, В. О. Валєєв

Вплив температури і концентрації іонів Zn^{2+} на конформацію однострочної поліС в нейтральному розчині

Методами диференційної УФ-спектроскопії та термічної денатурації вивчено залежність ступеня спіральності поліС від температури і концентрації іонів Zn^{2+} в какодильному буфері (0,015 М Na^+ , рН 7). Встановлено атоми поліС, що координують іони Zn^{2+} . Визначено температури і концентрації цинку, при яких спостерігається перехід розплавлених ланок поліС в упорядковану структуру, стабілізовану внутрішньоланцюговими зв'язками $N3-Zn^{2+}-N3$.

V. A. Sorokin, E. L. Usenko, V. A. Valeev

Effects of temperature and Zn^{2+} ion concentration on the single-stranded polyC conformation in neutral solution

The dependence of the polyC helicity degree on the temperature and the Zn^{2+} ion concentration in cacodylate buffer (pH 7, 0.015 M Na^+) is studied by the methods of differential UV-spectroscopy and thermal denaturation. PolyC atoms coordinating Zn^{2+} ions were ascertained. Temperatures and zinc concentrations were established, at which the transition of polyC melted chains into an ordered structure being stabilized with intrachained connections $N3-Zn^{2+}-N3$ was observed.