

Фазовая диаграмма комплексов ионов Ni^{2+} с полиU полиА полиU

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

Физико-технический институт низких температур им. Б. И. Веркина НАН Украины
Пр. Ленина, 47, Харьков, Украина, 61103

sorokin@ilt.kharkov.ua

Цель. Изучить влияние ионов Ni^{2+} на конформационное равновесие трехцепочечного полинуклеотида полиU полиА полиU и определить термодинамические параметры образования металлокомплексов. **Методы.** Дифференциальная УФ-спектроскопия и термическая денатурация. **Результаты.** Получены зависимости конформационных переходов (T_m) полиU полиА полиU (A2U) от концентрации ионов Ni^{2+} (до 0,001 M) в условиях, близких к физиологическим (0,1 M Na^+ , pH 7). При $[Ni^{2+}] < 3 \cdot 10^{-4}$ M на фазовой диаграмме наблюдаются две ветви, соответствующие переходам A2U полиА полиU (AU) + полиU (3' 2') и AU полиА + полиU (2' 1'). При более высоких концентрациях Ni^{2+} и нагревании A2U реализуется только переход A2U полиU + полиА + полиU (3' 1'). Оценены эффективные константы связывания ионов Ni^{2+} с AU ($850 M^{-1}$) и A2U ($1300 M^{-1}$) и энтальпия перехода 3' 2' ($\Delta H_{3' 2'} = 4 \pm 1$ ккал/моль триплет). **Выводы.** С помощью теории равновесного связывания установлена термодинамическая природа качественно различного поведения (T_m)_{2, 3} на фазовой диаграмме AU в присутствии ионов Mg^{2+} и Ni^{2+} , обнаруженного нами ранее: большее различие между сродством магния к A2U и AU по сравнению с различием между сродством к AU и полиА приводит к понижению (T_m)_{2, 3}, тогда как противоположное соотношение в константах связывания для ионов Ni^{2+} – к ее повышению.

Ключевые слова: полинуклеотиды, ионы металлов, конформационные переходы.

Введение. В настоящее время установлено, что трехнитчатые олиго- и полинуклеотиды обладают биологической функциональностью [1–3]. Это делает актуальным изучение их комплексов с ионами переходных металлов, загрязнение окружающей среды которыми может, в принципе, приводить (при неблагоприятных условиях) к нарушению нормального функционирования биологических макромолекул [4–6].

Цель настоящей работы состояла в изучении влияния ионов Ni^{2+} и температуры на конформационное состояние трехнитчатого полинуклеотида полиU полиА полиU (A2U) при содержании в рас-

творе 0,1 M Na^+ – концентрации, близкой к суммарной внутриклеточной концентрации ионов Na^+ и K^+ [7]. Ранее такую информацию мы получили для комплексов A2U с ионами Cd^{2+} [8]. Подобно последним ионы Ni^{2+} увеличивают количество мутаций при транскрипции ДНК животного и растительного происхождения, а также ингибируют специфическое ДНК-белковое узнавание, что может быть причиной канцерогенеза [4–6]. Можно отметить также, что никель (наряду с хромом) имеет наиболее высокий индекс канцерогенности (21), принятый за единицу для алюминия [9].

Материалы и методы. Растворы калиевой соли полирибоуридиловой кислоты (полиU) («Ser-va», ФРГ) и натриевой соли двухнитчатого поли-

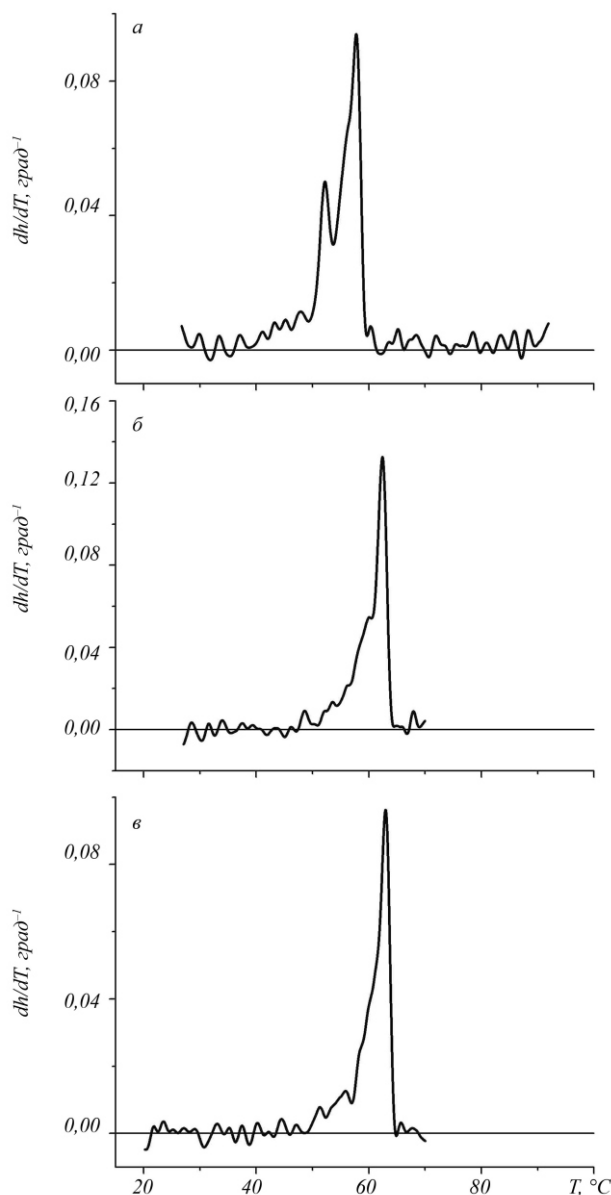


Рис. 1. Дифференциальные кривые плавления A2U (0,1 М Na⁺, рН 7): а – [Ni²⁺] = 0; б – 2,3 · 10⁻⁴ М Ni²⁺; в – 3 · 10⁻⁴ М Ni²⁺

нуклеотида полиАполиУ («Sigma Chemical Company», США) смешивали для получения A2U по методу, описанному в [8]. Соль NiCl₂ · 6H₂O марки х. ч. («Реахим», РФ), как и полинуклеотиды, дополнительной очистке не подвергали.

Температуры конформационных переходов (T_m) в отсутствие и в присутствии ионов Ni²⁺ различной концентрации в растворах, содержащих 0,001 М какодилат натрия (рН 7) и 0,099 М NaCl,

измеряли на спектрофотометре Specord UVVIS (ФРГ).

Величины T_m определяли по положению максимумов на дифференциальных кривых плавления (ДКП), то есть на температурных зависимостях производных $dh(T)/dT$ при $\lambda = 38500$ см⁻¹ (положение максимума на УФ-спектре A2U). ДКП (рис. 1) рассчитывали на персональном компьютере по формуле: $h(T) = A(T)/A_{T_0}$, где $A(T)$ – изменение поглощения раствора A2U, индуцированное нагреванием; A_{T_0} – его поглощение при комнатной температуре $T_0 = 22 \pm 2$ °С. Концентрацию фосфора AU и полиУ (P), равную $(1-2) \cdot 10^{-5}$ М, определяли по коэффициенту молярной экстинкции в максимуме УФ-поглощения ($\epsilon_{261} = 9600$ М⁻¹см⁻¹ для полиУ и $\epsilon_{260} = 7140$ М⁻¹см⁻¹ для AU; индекс – положение максимума на УФ-спектрах в нм). Концентрацию ионов Ni²⁺ ([Ni²⁺]) находили комплексонометрическим методом. Ошибка измерения P и [Ni²⁺] не превышала 0,5 % [8].

Результаты и обсуждение. В работе сделана попытка измерить изменение спектра поглощения A2U в диапазоне $(30-46) \cdot 10^3$ см⁻¹, индуцированное ионами Ni²⁺, при $T = T_0$. Однако, как и в присутствии ионов Cd²⁺ [8], оно обнаружено не было вплоть до концентрации Ni²⁺ 0,001 М. Этот результат свидетельствует об отсутствии внутрисферных координационных связей с гетероатомами азотистых оснований A2U не только для ионов Cd²⁺ [8], но и для ионов Ni²⁺. Обусловлено это, по-видимому, тем, что потенциально возможные для связывания атомы N7 и N1 полиА, а также N3 двух цепей полиУ включены в систему водородных связей, а взаимодействие никеля с O2 и O4 полиуридиловых нитей A2U (рис. 2) не реализуется из-за очень слабого сродства его ионов к этим атомам [10].

В соответствии с данными [9, 11–13], нагревание A2U в отсутствие ионов Мt²⁺ индуцирует два последовательных процесса (рис. 1). Первый интенсивный максимум на дифференциальной кривой плавления соответствует отделению от A2U одной нити полиУ (U₂) (рис. 2), то есть реализации перехода A2U → AU + U (переход 3 → 2), второй интенсивный максимум – плавлению AU, то есть более кооперативному переходу 2 → 1 (U + AU → U + A + U). При повышении концентрации никеля

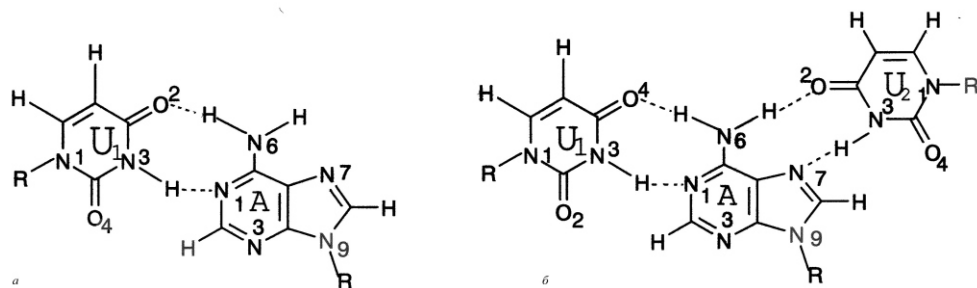


Рис. 2. Структура триплета U-A-U [8]. Пара (U₁-A) – уотсон-криковская; (A-U₂) – обратная хугстиновская

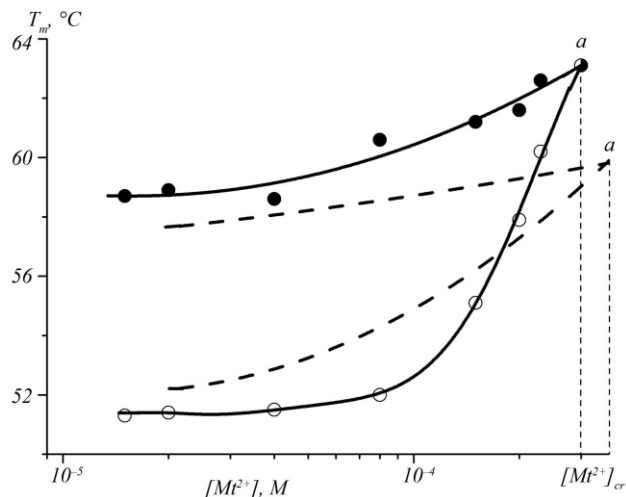


Рис. 3. Фазовая диаграмма комплекса ионов Ni²⁺ с A2U (0,1 M Na⁺, pH 7). Экспериментальные значения T_m показаны значками: ○ – (T_m)_{3,2}; ● – (T_m)_{2,1}; сплошные линии – экспериментальные концентрационные зависимости, рассчитанные по методу наименьших квадратов; штриховая линия – фазовая диаграмма комплекса A2U + Cd²⁺ [8]; «a» – «критические» точки

различие между температурами обоих переходов уменьшается и при $\sim 3 \cdot 10^{-4}$ M Ni²⁺ (рис. 3) оно, если и существует, то находится в пределах экспериментальной ошибки. Таким образом, точку «a» на фазовой диаграмме комплексов A2U + Ni²⁺ (рис. 3) можно интерпретировать как «критическую» (T_{мкр} = 63,1 С). При [Ni²⁺] [Ni²⁺]_{кр} плавление A2U становится одностадийным, то есть реализуется переход A2U → A + U + U (переход 3 → 1). Нам не удалось получить зависимость (T_m)_{3,1} от [Ni²⁺] при концентрациях, превышающих $3 \cdot 10^{-4}$ M, из-за появления рассеяния света в этой области концентраций, искажавшего форму кривых плавления.

Можно отметить, что хотя форма фазовых диаграмм комплексов A2U с ионами Ni²⁺ и Cd²⁺ несколько отличается, значения критических концентраций для обоих ионов разнятся не более чем на 15 % (рис. 3).

В работах [14, 15] нами показано, что особенности формы фазовых диаграмм металлокомплексов двух- и трехнитчатых полинуклеотидов могут быть качественным, а иногда и количественным образом объяснены в рамках теории равновесного связывания. Согласно этой теории, при стехиометрии комплекса, соответствующей связыванию одного иона с парой фосфатов, характерной для связывания ионов M^{t2+} с полианионами различной структуры [9, 14, 15], температура перехода (T_m) из конформации «a» в конформацию «b» определяется выражением

$$(T_m)_{ab} = (T_{m_0})_{ab} - (T_m)_{ab} \quad (1)$$

$$(T_{m_0})_{ab} = B \ln E - B \ln F;$$

для перехода 3 → 2

$$E_{3 \rightarrow 2} = \frac{(1 - K_{A2U} A_f)^{1/2}}{(1 - K_{AU} A_f)^{1/2}};$$

$$F_{3 \rightarrow 2} = \frac{(1 - K_{A2U} A_f)^{1/2}}{(1 - K_U A_f)^{1/2}}; \quad (2)$$

для перехода 2 → 1

$$E_{2 \rightarrow 1} = \frac{(1 - K_{AU} A_f)^{1/2}}{(1 - K_A A_f)^{1/2}};$$

$$F_{2 \rightarrow 1} = \frac{(1 - K_{AU} A_f)^{1/2}}{(1 - K_U A_f)^{1/2}}; \quad (3)$$

где (T_m)_{ab} = (T_m - T_{m₀})_{ab} – изменение температуры перехода полинуклеотида, индуцированное ионами M^{t2+}; a, b – соответственно начальная и новая

Таблица 1

Эффективные константы связывания (M^{-1}) ионов Mg^{2+} и Ni^{2+} с полинуклеотидами, содержащими аденин и урацил (0,1 M Na⁺, рН 7)

Ион	AU	A2U	polyA	polyU
Mg^{2+} [14]	345	1000	200	250
Ni^{2+}	850±50*	1300±100*	200	250

*Получены расчетом по формулам (1), (3) и (4).

Таблица 2

Начальные температуры (T_{m_0}) и энтальпии (H) конформационных переходов в AU [17] и A2U

Параметр	Переход			
	3 2	2 1	3 1	2 3
T_{m_0} , C	50,3±2***	58***; 57**	59**	59**
H	4 1 ккал/моль триплет*	8,2 ккал/моль пар [11]	12,7 ккал/моль триплет [11]	4,2 ккал/моль пар [11]

*Значение энтальпии, полученное в настоящей работе по формулам (1) и (2); ** T_{m_0} для AU; *** T_{m_0} для A2U.

конформации полинуклеотида; $B = RT_{m_0} T_m / H$, где T_m – температура перехода в новую конформацию половины звеньев полинуклеотида; $T_{m_0} = T_m$ при $[M^{2+}] = 0$; H – энтальпия соответствующего конформационного перехода; K – константы связывания ионов с соответствующими полинуклеотидами; A_f – концентрация свободных ионов.

Формулы (1)–(3) могут быть, в принципе, использованы для расчета неизвестных констант связывания ионов Ni^{2+} с AU и A2U в предположении, что значения K_A и K_U (табл. 1) для Mg^{2+} и Ni^{2+} одинаковы. Анализ этих значений K для магния, полученных различными авторами [16], показал, что наилучшим образом линейным зависимостям логарифма K_A и K_U от логарифма концентрации ионов Na^+ соответствуют данные работы [8]. Поэтому именно их (табл. 1) мы использовали для расчета констант связывания ионов Ni^{2+} с AU и A2U. При этом в формулах (2) и (3) произведения $K A_f$ были заменены на произведения $K [Ni^{2+}]$. Расчет показывает, что при $K = 10^3 M^{-1}$ различие между $[Ni^{2+}]$ и A_f составляет около 0,5 %, то есть не превышает ошибки определения $[Ni^{2+}]$. Во всей области концентраций ионов при расчетах по формулам (1)–(3) в произведении $T_{m_0} T_m$ использованы экспериментальные значения этих температур (табл. 2, рис. 3). При расчете K_{AU} по формулам (1), (3) применили экспериментальную величину $H_{2 1}$ (табл. 2). Однако расчет константы связывания ионов Ni^{2+} с

A2U по формулам (1) и (2) затруднен из-за очень большого разброса значений (H)_{3 2}, полученных различными авторами (от 2 до 8 ккал/моль триплет) [3]. В связи с этим K_{A2U} была определена по зависимости (T_m)_{3 1} (температура перехода 3 1) от $[Ni^{2+}]$ на фазовой диаграмме AU, полученной нами ранее в [17]. В этом случае

$$E_{3 1} = \frac{(1 - K_{A2U} A_f)^{1/3}}{(1 - K_A A_f)^{1/3}}; \tag{4}$$

$$F_{3 1} = \frac{(1 - K_{A2U} A_f)^{2/3}}{(1 - K_U A_f)^{2/3}}.$$

При расчете K_{A2U} по формулам (1), (4) использовали достаточно надежно определенное экспериментально значение $H_{3 1}$ (табл. 2). Значения K_{AU} и K_{A2U} подбирали таким образом, чтобы различие между экспериментальными и расчетными величинами T_m не превышало (0,5 – 1 C) во всем диапазоне концентраций никеля для соответствующего конформационного перехода.

Как видно из табл. 1, для ионов Ni^{2+} K_{A2U} на 30 % выше, чем для ионов Mg^{2+} [14]. Такое различие находится в пределах разброса экспериментальных значений K для комплексов ионов металлов с полинуклеотидами, полученных различными авторами в сопоставимых условиях [16]. В связи с этим можно считать этот результат подтверждающим кулоновскую природу взаимодействия ионов Ni^{2+} с

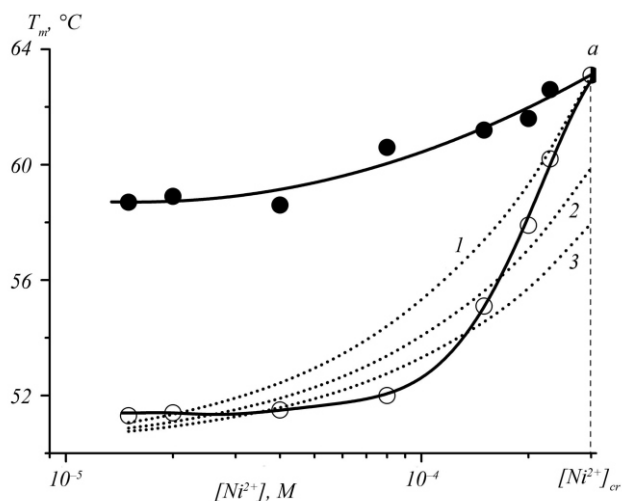


Рис. 4. Фазовая диаграмма комплекса ионов Ni²⁺ с A2U (0,1 M Na⁺, pH 7). Обозначения те же, что на рис. 3. Пунктирные линии – концентрационные зависимости (T_m)_{3 2}, рассчитанные по формулам (1) и (2): 1 – H = 3; 2 – H = 4; 3 – H = 5 ккал/моль триплет

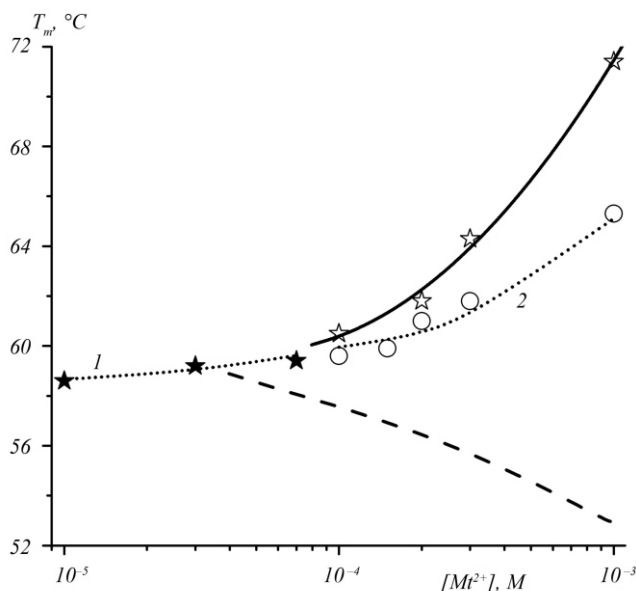


Рис. 5. Сравнение экспериментальной [17] и теоретической фазовых диаграмм комплекса ионов Ni²⁺ с AU (0,1 M Na⁺, pH 7). Экспериментальные значения T_m показаны значками: ★ – (T_m)_{2 1}; ○ – (T_m)_{2 3}; ★ – (T_m)_{3 1}; сплошная линия – экспериментальная концентрационная зависимость (T_m)_{3 1}, рассчитанная по методу наименьших квадратов (такие линии для переходов 2 1 и 2 3 не показаны, так они совпадают с рассчитанными по формулам (1), (3) и (5); пунктирные линии: 1 – переход 2 1; 2 – переход 2 3); штриховая линия – экспериментальная концентрационная зависимость (T_m)_{2 3} для комплекса AU + Mg²⁺ [14]

A2U. Разница в значении K_{AU} для ионов Ni²⁺ и Mg²⁺ (соответственно 850 и 345 M⁻¹ – табл. 1) существенно больше. Это может быть связано, во-первых, с различием в кулоновском взаимодействии гидратированных ионов никеля и магния с фосфатами AU и, во-вторых, с дополнительной внешнесферной координацией ионов Ni²⁺ с N7 AU, при которой они связаны с N7 аденинов через молекулу воды. При образовании водородных связей соединениями, содержащими азот, сдвиги полос поглощения малы [18] и потому ДУФС могут не регистрироваться.

Используя полученные для Ni²⁺ значения K_{A2U} и K_{AU}, была рассчитана концентрационная зависимость (T_m)_{3 2} для A2U. Из рис. 4 видно, что описать всю концентрационную зависимость (T_m)_{3 2} при одном значении (H)_{3 2} невозможно. Однако, согласно рис. 4, ее величина должна находиться в диапазоне между 3 и 5 ккал/моль триплет. Эти величины значительно сужают интервал неопределенности значений (H)_{3 2} [3]. Кроме того, полученный результат согласуется со значением энтальпии перехода 3 2, равным 5 ккал/моль триплет, найденным для комплексов ионов Cd²⁺ с A2U в работе [8]. Из формул (1)–(3) видно также, что различие в значениях H_{2 1} и H_{3 2} является постоянным фактором появления «критических» точек на фазовых диаграммах A2U в присутствии не только двухвалентных, но и одновалентных ионов металлов [11].

Полученные в настоящей работе данные позволяют установить термодинамическую природу качественно различного поведения (T_m)_{2 3} на фазовой диаграмме AU в присутствии ионов Mg²⁺ и Ni²⁺, обнаруженного нами ранее [17]. Согласно данным рис. 5, ионы Mg²⁺ понижают эту температуру, тогда как ионы Ni²⁺ – повышают. Другими словами, в отличие от ионов Mg²⁺, расширяющих область существования трехнитчатой A2U, ионы Ni²⁺ ее сужают, соответственно увеличивая границы стабильного состояния двухнитчатой AU.

В соответствии с теорией [14] в случае перехода 2 3:

$$E_{2 3} = \frac{(1 - K_{AU} A_f)^{1/2}}{(1 - K_{A2U} A_f)^{1/2}};$$

Таблица 3

Концентрационная зависимость составляющих изменения температур конформационных переходов (C) комплекса (AU + Ni²⁺), рассчитанная по формулам (1), (3)–(5)

[Ni ²⁺], М	Переход											
	2 1				3 1				2 3			
	BlnE	BlnF	(T _m) _{theor}	(T _m) _{exp}	BlnE	BlnF	(T _m) _{theor}	(T _m) _{exp}	BlnE	BlnF	(T _m) _{theor}	(T _m) _{exp}
10 ⁻⁵	0,09	0,08	0,17	0,1	–	–	–	–	–	–	–	–
10 ⁻⁴	0,6*	0,5*	1,1*	0,9*	0,6	1,1	1,7	1,1	–1	1,6	0,6	0,2
10 ⁻³	–	–	–	–	3,9	7,2	11,1	12	–5,8	11,5	5,7	5,9

*Значение (T_m)_{2 1}, соответствующее [Ni²⁺]_{кр} = 7·10⁻⁵М на фазовой диаграмме AU + Ni²⁺. При большей концентрации ионов этот переход отсутствует.

$$F_{2 3} = \frac{(1 - K_{AU} A_f)^{1/2}}{(1 - K_A A_f)^{1/2}} \quad (5)$$

Концентрационные зависимости (T_m)_{2 3} рассчитывали по формулам (1) и (5) для ионов Mg²⁺ и Ni²⁺. В первом случае использовали экспериментальные значения K, во-втором – значения K_{A2U} и K_{AU}, найденные в настоящей работе (табл. 1). Значения (T_{m0})_{2 3} и (H)_{2 3} для AU приведены в табл. 2. Из рис. 5 видно, что расчетная и экспериментальная зависимости (T_m)_{2 3} практически совпадают.

Из табл. 3 и 4 следует, что интегральный эффект изменения (T_m)_{2 3} обусловлен суммой противоположных по знаку членов: BlnE < 0, так как K_{AU} < K_{A2U}, и BlnF > 0, поскольку K_{AU} > K_A (табл. 1). Таким образом, в соответствии с полученными нами данными отличие в поведении (T_m)_{2 3} в присутствии ионов Mg²⁺ и Ni²⁺ связано с тем, что в первом случае |BlnE| > |BlnF| (табл. 4), тогда как для ионов Ni²⁺ величина дестабилизирующей составляющей суммы меньше стабилизирующей (табл. 3).

Из данных табл. 4 следует также, что доминирующим фактором сужения области стабильного состояния двухнитчатой конформации на фазовых диаграммах металлокомплексов (и, следовательно, расширения трехнитчатой) в присутствии ионов Mg²⁺ является большее различие между их сродством к A2U и AU по сравнению с различием между сродством к AU и полиА. Соответственно противоположные соотношения в различии констант связывания ионов Ni²⁺ с полинуклеотидами приводят к противоположному влиянию на равновесие между трех- и двухнитчатыми спиральями (рис. 5, табл. 3).

Казалось бы, подобная ситуация должна наблюдаться и в присутствии ионов Cd²⁺. Однако они, как и ионы Mg²⁺, понижают (T_m)_{2 3} [19]. Можно предположить наличие дополнительной дестабилизации AU ионами Cd²⁺ за счет образования ими координационных связей с атомами азота аденина одонитчатой полиА, которое в двойной спирали AU может быть затруднено для ионов Cd²⁺ по тем же причинам, что и для ионов Ni²⁺. Однако справедливость этого предположения требует дополнительного исследования.

В итоге проведенные вычисления позволяют установить термодинамическую природу наблюдаемых в опыте зависимостей и для переходов 2 1, 3 1, 3 2. Используя данные табл. 1 и 2, рассчитаны концентрационные зависимости (T_m)_{2 1} для AU в присутствии ионов Mg²⁺ и Ni²⁺. Расчет дает практически полное совпадение с экспериментальными зависимостями. Так, в области малых концентраций ионов Mg²⁺ и Ni²⁺ опыт и расчет (табл. 3, 4; рис. 4, 5) показывают очень слабую зависимость (T_m)_{2 1} от содержания ионов. Согласно формуле (3), это связано с тем, что в таком случае произведения K_{AU}, K_A и K_U на A_f много меньше единицы и соответственно (T_m)_{2 1} мало отличаются от нуля.

Исходя из формул (2) и (4) повышение температур переходов 3 2 и 3 1 в присутствии обоих ионов обусловлено тем, что K_{A2U} > K_{AU}, а также K_U и K_A. Возрастание (T_m)_{2 1}, наблюдаемое на фазовой диаграмме комплекса ионов Ni²⁺ с A2U (рис. 4), обусловлено выполнением условия K_{AU} > K_U и K_A.

Существенно, что полученные в работе эффективные значения K и H являются самосогласован-

Таблица 4

Концентрационная зависимость составляющих изменения температур конформационных переходов (T_m) комплекса ($AU + Mg^{2+}$), рассчитанная по формулам (1), (3)–(5)

$[Mg^{2+}]_M$	Переход											
	2 1				3 1				2 3			
	$B \ln E$	$B \ln F$	$(T_m)_{theor}$	$(T_m)_{exp}$	$B \ln E$	$B \ln F$	$(T_m)_{theor}$	$(T_m)_{exp}$	$B \ln E$	$B \ln F$	$(T_m)_{theor}$	$(T_m)_{exp}$
10^{-5}	0,02	0,01	0,03	-0,7	–	–	–	–	–	–	–	–
10^{-4}	0,09*	0,06*	0,15*	0,3*	0,5	0,9	1,4	1,4	-1,7	0,4	-1,3	-1,8
10^{-3}	–	–	–	–	2,9	5,4	8,3	7,9	-10,4	3	-7,4	-6,2

*Значение $(T_m)_{2 1}$, соответствующее $[Mg^{2+}]_{cr} = 5 \cdot 10^{-5} M$ на фазовой диаграмме $AU + Mg^{2+}$. При большей концентрации ионов этот переход отсутствует.

ными, хотя и найдены из независимых экспериментальных данных.

Несмотря на то, что вышеизложенные результаты носят в основном фундаментальный характер, они могут быть, в принципе, использованы при решении задач, связанных с регуляцией стабильности многоцепочечных структур полинуклеотидов ионами металлов.

Выводы. 1. Показана принципиальная возможность оценки параметров комплексообразования и конформационных переходов в полинуклеотидах с помощью фазовых диаграмм с неопределенностью, не превышающей экспериментальную. Впервые рассчитаны константы связывания ионов никеля с AU и $A2U$.

2. На фазовых диаграммах $AU + Mg^{2+}$ основным фактором расширения области существования трехнитчатой $A2U$ в присутствии ионов Mg^{2+} является большее различие в их сродстве к $A2U$ и AU по сравнению с различием в сродстве к AU и полиА. Противоположные соотношения в значениях констант связывания ионов Ni^{2+} с полинуклеотидами приводят к расширению области существования двухнитчатой AU в присутствии последних.

3. Данные ДУФС свидетельствуют о том, что структура жестких многоцепочечных полинуклеотидов, образованных как уотсон-криковскими, так и хугстиновскими AU -парами, не позволяет d-ионам (ионам, имеющим d-электроны на внешних орбиталях) формировать внутрисферные координационные связи с гетероатомами аденина и урацила вплоть до очень больших концентраций ионов. Следствием этого является конформационная и

термическая устойчивость соответствующих пар и триплетов по отношению к таким ионам.

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

Phase diagram of Ni^{2+} ions complexes with polyU polyA polyU

Summary

Aim. To investigate Ni^{2+} ion effect on the conformational equilibrium of the three-stranded polynucleotide polyUpolyA polyU and to ascertain thermodynamic parameters of the metal complex formation. **Methods.** The differential UV spectroscopy and thermal denaturation. **Results.** Dependences of conformational transition (T_m) of polyUpolyA polyU ($A2U$) on Ni^{2+} ion concentration (up to 0.001 M) under conditions close to physiological ones (0.1 M Na^+ , pH 7) were obtained. At $[Ni^{2+}] < 3 \cdot 10^{-4} M$ two branches are observed in the phase diagram, corresponding to $A2U$ polyA polyU (AU) + polyU (3 2) and AU polyA + polyU (2 1) transitions. Only $A2U$ polyU + polyA + polyU (3 1) transition is realized at higher Ni^{2+} concentrations and upon $A2U$ heating. Effective binding constants are determined for Ni^{2+} ions with AU (850 M^{-1}) and $A2U$ (1300 M^{-1}) as well as 3 2 transition enthalpy ($H_3 2 = 4 \pm 1$ kcal/mol triplet). **Conclusions.** By the equilibrium binding theory the thermodynamic nature of $(T_m)_{2 3}$ different behavior in the phase diagram of AU in the presence of Mg^{2+} and Ni^{2+} ions was determined. A larger difference of the magnesium affinity to $A2U$ and AU as compared with that to AU and poly A results in $(T_m)_{2 3}$ decrease whereas the opposite ratio of Ni^{2+} ion binding constants induces its increasing.

Keywords: polynucleotides, metal ions, conformational transitions.

V. O. Sorokin, V. O. Valsev, E. L. Usenko

Фазова діаграма комплексів іонів Ni^{2+} з поліУ поліА поліУ

Резюме

Мета. Вивчити вплив іонів Ni^{2+} на конформаційну рівновагу триланцюгового полінуклеотиду поліУ поліА поліУ та визначити термодинамічні параметри утворення металокомплексів. **Методи.** Диференційна УФ-спектроскопія і термічна денатурація. **Результати.** Отримано залежності конформаційних переходів (T_m) поліУ поліА поліУ ($A2U$) від концентрації іонів Ni^{2+} (до 0,001 M) за умов, близьких до фізіологічних (0,1 M Na^+ ,

pH 7). При $[Ni^{2+}] < 3 \cdot 10^{-4}$ M на фазовій діаграмі спостерігаються дві гілки, що відповідають переходам A2U поліАполіU (AU) + поліU (3 2) та AU поліА + поліU (2 1). При вищих концентраціях Ni²⁺ і нагріванні A2U реалізується лише перехід A2U поліU + поліА + поліU (3 1). Оцінено ефективні константи зв'язування іонів Ni²⁺ з AU (850 M⁻¹) і A2U (1300 M⁻¹) та ентальпійні переходи $3 \cdot 2$ ($H_3 \cdot 2 = 4 \pm 1$ ккал/моль триплет). **Висновки.** З використанням теорії рівноважного зв'язування з'ясовано термодинамічну природу якісно різної поведінки $(T_m)_{2 \cdot 3}$ на фазовій діаграмі AU за присутності іонів Mg²⁺ і Ni²⁺, що виявлено нами раніше: більша різниця між спорідненістю магнію до A2U і AU у порівнянні з різницею між спорідненістю до AU і поліА спричиняє зниження $(T_m)_{2 \cdot 3}$, тоді як протилежне співвідношення у константах зв'язування для іонів Ni²⁺ – її підвищення.

Ключові слова: полінуклеотиди, іони металів, конформаційні переходи.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Field A. K. Oligonucleotides as inhibitors of human immunodeficiency virus // *Curr. Opin. Mol. Ther.*–1999.–**1**.–P. 323–331.
- Giovannangeli C., Rougee M., Garestier T., Thuong N. T., Helene C. Triple-helix formation by oligonucleotides containing the three bases thymine, cytosine and guanine // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*–1992.–**89**, N 18.–P. 8631–8635.
- Plum G. E., Pilch D. S., Singleton S. C., Breslauer K. J. Nucleic acid hybridisation: triplex stability and energetic // *Annu. Rev. Biophys. and Biomol. Struct.*–1995.–**24**.–P. 319–350.
- Coogan T. P., Latta D. M., Imbra R. J., Costa M. Effect of nickel (II) on DNA-protein interactions // *Biol. Trace Elem. Res.*–1989.–**21**, N 3.–P. 13–21.
- Dally H., Hartwig A. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells // *Carcinogenesis.*–1997.–**18**, N 5.–P. 1021–1026.
- Hartwig A. Recent advances in metal carcinogenicity // *Pure Appl. Chem.*–2000.–**72**, N 6.–P. 1007–1014.
- Saenger W. Principles of nucleic acid structure.–New York: Springer, 1984.–584 p.
- Sorokin V. A., Valeev V. A., Usenko E. L., Blagoi Yu. P. Effect of Cd²⁺ ions on conformational equilibrium of three-stranded polyU polyA polyU polynucleotide under near-physiological conditions // *Biopolymers and Cell.*–2007.–**23**, N 5.–P. 433–440.
- Andronikashvili E. L. Malignization and change of some physico-chemical properties of biomacromolecules and supra-molecular structures // *Biophysics.*–1987.–**32**, N 5.–P. 782–799.
- Aoki K. Nucleosides, nucleotides and metal ions // *Metallo-proteins: Chemical properties and biological effects* / Eds S.Otsuka, T.Yamanaka.–Amsterdam etc.: Elsevier, 1988.–P. 457–490.
- Krakauer H., Sturtevant J. M. Heats of the helix-coil transition of the polyA–polyU complexes // *Biopolymers.*–1968.–**6**, N 4.–P. 491–512.
- Krakauer H. A thermodynamic analysis of the influence of simple mono- and divalent cations on the conformational transitions of polynucleotide complexes // *Biochemistry.*–1974.–**13**, N 12.–P. 2579–2589.
- Klump H. H. Energetics of order /order transition in nucleic acids // *Can. J. Chem.*–1988.–**66**.–P. 804–811.
- Sorokin V. A., Valeev V. A., Gladchenko G. O., Degtyar M. V., Karachevtsev V. A., Blagoi Yu. P. Mg²⁺ ion effect on the conformational equilibrium of polyUpolyApolyU and polyApolyU in aqueous solutions // *Int. J. Biol. Macromol.*–2003.–**31**.–P. 223–233.
- Sorokin V. A., Valeev V. A., Gladchenko G. O., Degtyar M. V., Andrus E. A., Karachevtsev V. A., Blagoi Yu. P. Mg²⁺ and Ni²⁺ ion effect on stability and structure of triple polyIpolyApolyI helix // *Int. J. Biol. Macromol.*–2005.–**35**.–P. 201–210.
- Sorokin V. A., Valeev V. A., Gladchenko G. O., Degtyar M. V., Andrus E. A., Blagoi Yu. P., Karachevtsev V. A. Effect of Mg²⁺ ions on the stability of polyA/2polyU three-stranded helices in aqueous solutions // *Macromol. Biosci.*–2002.–**2**, N 4.–P. 155–162.
- Sorokin V. A., Valeev V. A., Usenko E. L. Ni²⁺ ion effect on conformational equilibrium of polynucleotides: polyApolyU, polyA and polyU under conditions close to physiological ones // *Biopolymers and Cell.*–2008.–**24**, N 2.–P. 158–170.
- Higasi K., Baba H., Rembaum A. Quantum organic chemistry.–New York: Intersci. publ. A division of John Wiley & sons, 1965.–379 p.
- Blagoi Yu. P., Gladchenko G. O., Nafie L. A., Freedman T. B., Sorokin V. A., Valeev V. A., He Ya. Phase equilibrium in poly(rA)poly(rU) complexes with Cd²⁺ and Mg²⁺ ions, studied by ultraviolet, infrared, and vibrational circular dichroism spectroscopy // *Biopolymers.*–2005.–**78**, N 5.–P. 275–286.

УДК 577.3

Надійшла до редакції 20.10.08