

Конформационные переходы поли(C) и поли(dC): исследование методом протонной буферной емкости

М. И. Зарудная, А. Л. Потягайло, Д. Н. Говорун

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

По литературным данным рассчитаны кривые протонной буферной емкости поли(C) (при 0,1 М Na⁺) и поли(dC) (при 0,05 М Na⁺). Проведено их разложение по базисным функциям, соответствующим ионизации атомных групп с одинаковыми значениями рК. Обнаружено, что кривая протонной буферной емкости поли(C) имеет четыре пика — два узких и два широких. Первый узкий пик (рК = 5,6) отождествлен с кооперативным процессом образования двойных спиралей, индуцируемым протонированием нуклеотидных оснований по атому азота N3. Второй узкий пик (рК = 2,9) отнесен к кооперативному распаду этих спиралей. Первый широкий пик (рК = 5,3) соответствует некооперативному протонированию двойных спиралей поли(C) по атому азота N3, частично экспонированных в раствор цитидиновых оснований. Второй широкий пик (рК = 3,1) отнесен к некооперативному протонированию электронейтральных цитидиновых оснований по атому кислорода с цис-ориентацией присоединенного протона относительно гликозидной связи. Эта реакция приводит к уменьшению термодинамической стабильности двойных спиралей поли(C) и, в конечном счете, к их диссоциации. Обсуждаются также конформационные переходы поли(dC), индуцированные его протонированием.

Введение. Все гомополимеры канонических рибонуклеотидов являются биологическими макромолекулами, поскольку они не только входят в состав природных РНК, но и выполняют определенные функции [1]. Однако в большинстве случаев механизмы функционирования гомополимерных трактов РНК неизвестны. Поэтому представляется целесообразным дальнейшее исследование физико-химических свойств синтетических гомополирибонуклеотидов, в частности, их конформационных возможностей.

Известно, что поли(A), поли(C) и поли(G) претерпевают конформационные изменения в кислых растворах [2]. Переходы индуцируются протонированием нуклеотидных оснований. На первый взгляд кажется, что изучение таких структурных переходов не представляет биологического интереса, поскольку внутриклеточная среда слабощелоч-

ная. Однако в клетке протонирование нуклеотидных оснований гомополимерных участков РНК может происходить не за счет свободных протонов водной среды, как в экспериментах *in vitro*, а путем переноса протонов от кислых боковых аминокислотных остатков белков, специфически взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами. Так, например, перенос протона от карбоксильной группы аминокислот на нуклеотидные основания наблюдался в ряде модельных экспериментов с низкомолекулярными соединениями [3—5]. Кроме того, методом Рамановской спектроскопии [6, 7] зафиксировано протонирование цитидиновых и адениновых остатков РНК в составе тимовирусных вирионов. Предполагается, что оно обусловлено близкими контактами между основаниями и кислыми аминокислотными остатками белка оболочки [8].

Таким образом, структуры полинуклеотидов, наблюдаемые *in vitro* при кислых значениях pH, вполне могут быть реализованы в условиях клетки.

Настоящая работа посвящена изучению конформационных переходов полирибозитидиловой

(поли(С)) и полидезоксирибозитидиловой (поли(dC)) кислот.

Поли(С)-тракты длиной от нескольких десятков до нескольких сотен нуклеотидов обнаружены в 5'-нетранслируемой области РНК двух групп вирусов (кардиовирусы и вирусы ящура) из семейства пикорнавирусов [9]. Биологические функции этих участков в настоящее время неясны. Наибольшее значение они имеют в случае менговирусов: искусственное укорачивание их поли(С)-последовательностей приводит к значительному уменьшению патогенности вирусов этого типа [10].

Конформационные переходы поли(С) наиболее близки по характеру к переходам поли(А) [2]. При щелочных и нейтральных рН оба полимера представляют собой одноцепочечные структуры, состоящие из спиральных и разупорядоченных участков. При подкислении раствора они образуют двойные спирали ($pK \approx 5,8$ при 0,1 М NaCl [11]). В обоих случаях конформационные переходы имеют высококооперативный характер. В отличие от классической антипараллельной ориентации цепей в двойных спиралях РНК и ДНК, цепи в двойных спиралях поли(С) и поли(А) параллельны [2].

Основные различия между структурными переходами поли(С) и поли(А) заключаются в следующем. Поли(А) может образовывать в зависимости от условий окружения три различные двухспиральные формы: D, D_r и D' [12, 13], а поли(С) — лишь одну [2]. В поли(А) присоединяющиеся к нуклеотидным основаниям протоны не участвуют в образовании водородных связей между ними, а в поли(С) — участвуют. Температура плавления (T_m) двухспиральной поли(А) непрерывно возрастает с увеличением степени протонирования полимера [14], а зависимость T_m двухспиральной формы поли(С) от рН имеет колоколообразный характер: при степени протонирования полимера меньше 50% она возрастает, а затем при дальнейшем уменьшении рН падает [15—18]. При высокой степени протонирования ($\approx 70\%$) двойная спираль поли(С), в отличие от поли(А), разрушается [11, 16, 18, 19].

Особенности структурных переходов поли(С) связаны с характером протонирования его нуклеотидных оснований. На рис. 1 показана схема спаривания оснований в двойной полупротонированной спирали поли(С), впервые предложенная в работах [15, 20]. Следует отметить, что эта схема основывается на результатах исследования кристаллической структуры цитозин-5-уксусной кислоты и других низкомолекулярных модельных соединений, а также на некоторых физико-химических свойствах самого полимера, так как в на-

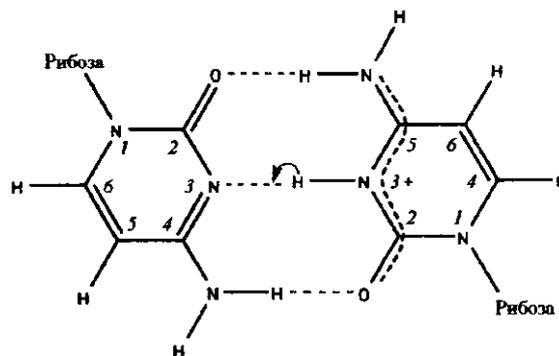


Рис. 1. Схема спаривания оснований в полупротонированных двойных спиралях поли(С) и поли(dC) [15, 20]. Пунктирной линией изображена делокализация избыточного положительного заряда, стрелкой — внутрипарный перенос протона

стоящее время прямые рентгеноструктурные данные для двойных спиралей поли(С) и поли(dC) отсутствуют. Как видно из этого рисунка, на пару комплементарных оснований в двойной спирали поли(С) приходится один протон, т. е. при степени протонирования полимера 50% все водородные связи между основаниями уже образованы. При этом между электронейтральным Cyt и Cyt(N3H)⁺, несущим на себе избыточный положительный заряд, образуются, как и в случае классической Уотсон-Криковской пары Gua:Cyt, три водородные связи.

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что поли(С) может быть протонирован полностью. Однако единого устоявшегося мнения о механизме протонирования полупротонированной двойной спирали поли(С) в настоящее время нет. Авторы ряда работ [16, 18, 21, 22], в которых структурные переходы поли(С) исследовали методом потенциометрического титрования, а также некоторыми другими физико-химическими методами, пришли к довольно противоречивым выводам.

Так, Гартман и Рич [16] полагают, что дополнительные протоны могут присоединяться к электронейтральным цитидиновым остаткам только посредством раскрытия пары. Этот процесс снижает термодинамическую стабильность двойной спирали поли(С) и регистрируется, как понижение T_m . В то же время Кламп [18] считает маловероятным присоединение протонов к образовавшейся двойной спирали поли(С) в ее центре по положению атома азота N3 непротонированного Cyt и склоняется к мнению о внешнем механизме протонирования. В

этой связи он предлагает обратить внимание на возможность существования равновесия между протонированными иминными и аминными протопропными таутомерами цитозина и представляет схему спаривания цитидиновых остатков, подобную той, что показана на рис. 1, но с локализацией избыточного положительного заряда не на имино- (как это традиционно представляют [2]), а на аминогруппе, считая, что электрическое отталкивание протонов в этом случае будет меньше.

Авторы вышеупомянутых работ [16] и [18], так же как и других, например [11, 19], считают, что при высокой степени протонирования оснований (более 70 %) двойные спирали поли(С) разрушаются. В то же время Сулейманова и соавт. [21, 22], напротив, утверждают, что полностью протонированные двойные спирали поли(С) существуют как стабильные конформации, не выдвигая, однако, при этом каких-либо предположений об их структуре.

С целью внесения ясности в этот вопрос мы использовали для анализа кривых потенциометрического титрования, имеющих в литературе, метод протонной буферной емкости, разработанный и обоснованный для биохимических объектов Опансенко и соавт. [23].

Метод заключается в дифференцировании кривых потенциометрического титрования с последующим их аддитивным разложением на базисные функции, соответствующие протонированию атомных групп с одинаковыми pK . Применение этого метода не только значительно облегчает выделение на кривых потенциометрического титрования участков, соответствующих разным по своей природе процессам протонирования, но и позволяет получать дополнительную информацию об этих процессах. Метод протонной буферной емкости успешно применяли ранее для исследования структурных переходов ДНК [24] и поли(А) [12, 25].

На основании результатов, полученных этим методом, а также анализа литературы мы предлагаем новый, с должным квантовохимическим и термодинамическим обоснованием, микроструктурный механизм присоединения протонов к полупротонированной двойной спирали поли(С), влекущий за собой соответствующий структурный переход, а именно — ее диссоциацию.

Методы. Буферную емкость β определяли как $\Delta b/\Delta pH$ [26], где Δb — изменение концентрации титранта при добавлении его малой порции, ΔpH — малое изменение pH реакционной среды, вызванное Δb . Использовали интервалы: $\Delta pH = 0,01$ на участках с высокой буферной емкостью и $\Delta pH \leq 0,1$ — на остальных участках.

Базисные функции i -го типа рассчитывали по формуле [24]

$$\beta_i(pH) = \frac{c_i \gamma_i \ln 10}{10^{\gamma_i(pH - pK_i)} + 10^{\gamma_i(pK_i - pH)} + 2}, \quad (1)$$

где c_i — концентрация способных к ионизации атомных групп i -го типа, определяющих i -й пик на кривой буферной емкости, pK_i — термодинамический параметр ионизации атомных групп i -го типа, γ_i — параметр кооперативности, показывающий, во сколько раз сужается pH-диапазон присоединения или отщепления протонов по сравнению с некооперативным процессом для такого же количества протонорецепторных групп.

Расчеты и визуализация данных осуществлены с помощью компьютерной программы Mathcad PLUS 5.0.

Результаты и обсуждение. Кривые протонной буферной емкости поли(С) рассчитывали по данным работ [16, 18, 22]. Зависимости, построенные по данным Гартмана и Рича [16], а также Клампа [18], практически совпадают. Кривая, построенная по данным работы Аполонника и соавт. [22], имеет такой же характер, как и две предыдущие, но значительно (на $\approx 0,9$ единиц pH) смещена в щелочную область. Поскольку, как будет показано ниже, значение pK перехода поли(С) из одноцепочечной спирали в двухцепочечную, рассчитанное по данным этой работы, не согласуется с величинами, приводимыми в работах других авторов, то в качестве типичного примера кривой протонной буферной емкости поли(С) мы приводим зависимость (рис. 2), построенную по данным работы [16]. Она имеет два узких пика, соответствующих двум участкам с высокой буферной емкостью, наблюдаемых на кривых потенциометрического титрования поли(С) [16, 18, 21, 22], и может быть удовлетворительно представлена в виде суперпозиции четырех базисных функций вида (1), параметры которых приведены в таблице.

Учитывая, что, согласно теории [23], узкие ($\gamma > 1$) пики на кривых pH-зависимости буферной емкости биополимеров соответствуют конформационным переходам, мы относим узкий пик 1 на кривой буферной емкости поли(С) к кооперативному образованию двойных спиралей из одноцепочечных структур. Таким образом, pK первого конформационного перехода поли(С) (pK_1) равен 5,58 в 0,1 М NaCl. Именно в интервале pH, соответствующем пику 1, регистрируется конформационный переход поли(С) в двухспиральное состояние методом УФ-спектроскопии [16]. Все известные нам из литературы значения pK образования двойных спиралей поли(С) согласуются между собой с учетом

условий эксперимента. Они располагаются на одной и той же кривой зависимости pK от ионной силы при комнатной температуре (рис. 3) [11, 16, 18, 27—29]. В то же время значение pK_1 в 0,1 М КСl, рассчитанное нами по данным работы Аполлоника и соавт. [22], получается значительно завышенным и равно 6,5. Кривая буферной емкости поли(С), построенная по данным этой работы, хорошо раскладывается на два узких и два широких пика, и расстояние по шкале рН между ее двумя узкими пиками примерно соответствует расстоянию между пиками 1 и 4 на рис. 2. Однако пики 1 и 4 шире, а пики 2 и 3 выше, чем соответствующие пики на рис. 2.

Пик 2 на кривой протонной буферной емкости поли(С) (рис. 2) мы интерпретируем как процесс некооперативного присоединения протонов к двойным спиральям поли(С) по положению атома азота N3 непротонированных нуклеотидных оснований, еще не вовлеченных в спаривание по схеме, представленной на рис. 1, и частично экспонированных в раствор. Этот процесс происходит наряду с образованием двойных спиралей и продолжается после их формирования, поскольку при завершении конформационного перехода (рН 5,4) поли(С) протонирован не на 50, а примерно на 40 %.

Широкий пик 3 на кривой протонной буферной емкости поли(С) соответствует процессу некооперативного присоединения протонов к двойной спирали поли(С) иной природы, чем в случае пика 2. Этот процесс, по-видимому, и подготавливает второй конформационный переход полимера (узкий пик 4).

Согласно спектроскопическим и вискозиметрическим данным, в интервале рН между двумя структурными переходами полимер остается в

двухспиральной форме, и его конформация не претерпевает сколь-нибудь заметных структурных изменений [15, 17]. При рН = 4,6 (рис. 2) степень протонирования поли(С) достигает 50 %. Это так называемая полупротонированная двойная спираль, обладающая максимальной термодинамической стабильностью и имеющая максимальную T_m [18]. Мы, как и Кламп [18], полагаем, что присоединение протонов к двойной полупротонированной спирали поли(С) изнутри сильно затруднено. Это связано с тем, что ориентированные навстречу

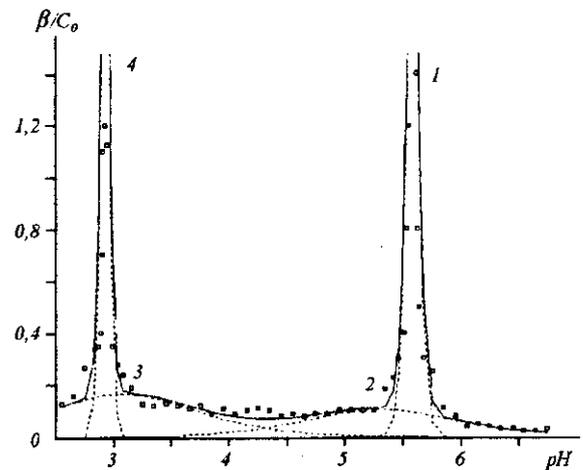


Рис. 2. Протонная буферная емкость поли(С), рассчитанная по данным работы [16], и ее разложение. Пунктирные линии — базисные функции, сплошная линия — суммарная кривая. $T = 25^\circ\text{C}$; 0,1 М NaCl (параметры обозначенных пиков см. в таблице)

Параметры пиков разложения кривых буферной емкости поли(С) (рис. 2) и поли(dC) (рис. 5) по базисным функциям β_i

| Полимер | Номер пика, i | pK_i | γ_i | C_i/C_0 |
|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Поли(С) | 1 | $5,58 \pm 0,01$ | 13 ± 2 | $0,30 \pm 0,1$ |
| | 2 | $5,30 \pm 0,05$ | 1 | $0,18 \pm 0,02$ |
| | 3 | $3,07 \pm 0,05$ | 1 | $0,29 \pm 0,02$ |
| | 4 | $2,92 \pm 0,01$ | 20 ± 5 | $0,25 \pm 0,05$ |
| Поли(dC) | 1 | $7,37 \pm 0,02$ | $3,5 \pm 0,2$ | $0,31 \pm 0,03$ |
| | 2 | $7,3 \pm 0,1$ | 1 | $0,16 \pm 0,03$ |
| | 3 | $3,2 \pm 0,1$ | $0,45 \pm 0,01$ | $0,46 \pm 0,02$ |

Примечание. C_0 — концентрация одноцепочечного полимера.

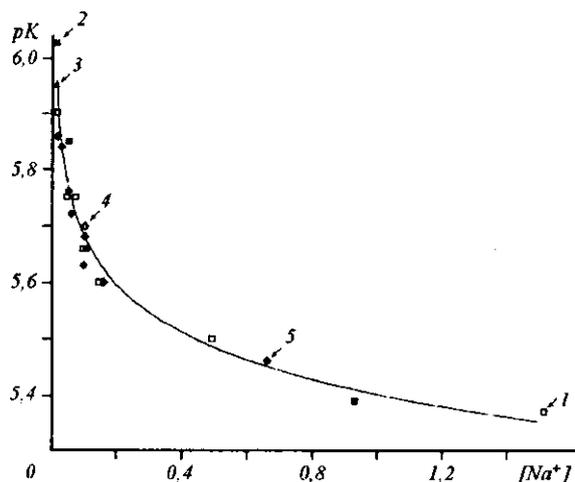


Рис. 3. Зависимость pK первого конформационного перехода поли(С) от ионной силы, построенная по литературным данным: 1 — [27], $T = 25^\circ\text{C}$; 2 — [28]; 3 — [11], $T = 20^\circ\text{C}$; 4 — [16, 18], $T = 25^\circ\text{C}$; 5 — [29], $T = 20^\circ\text{C}$

друг другу неподеленные электронные пары атомов азота N3 в паре $\text{Cyt}:\text{Cyt}(\text{N3H})^+$ образуют протонную ловушку, вследствие чего протофильность атома N3 спаренного непротонированного Cyt оказывается намного ниже, чем свободного, где он доступен протонированию. Кроме того, по квантовохимическим расчетам [30], энергия комплексообразования пары $\text{Cyt}:\text{Cyt}(\text{N3H})^+$ в изолированном состоянии (41,7 ккал/моль) в 1,7 раза превышает таковую для Уотсон-Криковской пары $\text{Gua}:\text{Cyt}$ (23,7 ккал/моль). Это свидетельствует о том, что процесс полного раскрытия пары $\text{Cyt}:\text{Cyt}(\text{N3H})^+$ при комнатной температуре является крайне маловероятным событием с термодинамической точки зрения. Кстати, согласно квантовохимическим расчетам [31], основной вклад в энергию комплексообразования изолированной пары $\text{Cyt}:\text{Cyt}(\text{N3H})^+$ вносит водородная связь $\text{N3H}\dots\text{N3}$ и при удалении протона из протонной ловушки пара диссоциирует.

Согласно квантовохимическим расчетам, [32, 33], наиболее вероятными местами протонирования изолированного Cyt считают атомы N3 и O2, причем атом кислорода — слегка более предпочтительным [33]. При переходе в водный раствор протофильность атома N3 Cyt несколько превышает протофильность атома O2 [33]. С учетом этого мы относим пик 3 на кривой буферной емкости поли(С) к протонированию двойной спирали по положению атома кислорода O2 непротонированных цитидиновых остатков с *цис*-ориентацией гид-

роксила относительно гликозидной связи. В пользу такой интерпретации свидетельствует также появление полосы при 1440 см^{-1} (значения частот определены из спектрограммы (рис. 2 в работе [19])), соответствующей, по нашему мнению, валентному колебанию протонированной карбонильной группы в ИК-спектрах поли(С) при низких pH [16, 19]. Такое отнесение согласуется с расчетом колебательного спектра протонированного по месту O2 изолированного цитозина, а также с частотой аналогичного колебания, наблюдаемого в Рамановском спектре водного раствора протонированного по атому O2 Cyt и его кристалла на частотах 1418 и 1408 см^{-1} соответственно [33].

Реакция протонирования двойной спирали поли(С) по атому O2 электронейтральных цитидиновых остатков с неизбежностью приводит к ее распаду при высокой степени протонирования ($\approx 70\%$).

Во-первых, протонирование атома кислорода O2 электронейтрального Cyt если не разрушает, то сильно дестабилизирует пару $\text{Cyt}(\text{O2H cis})^+:\text{Cyt}(\text{N3H})^+$. Вполне уместна здесь аналогия с Уотсон-Криковской парой $\text{Gua}:\text{Cyt}$, протонирование которой по этому же атому O2 (с *цис*-ориентированным гидроксилом относительно гликозидной связи N1H), согласно квантовохимическим расчетам [34], приводит к ее преддиссоциации. Кроме того, протонирование атомов O2 возмущает равновесную конформацию сахарофосфатного остова из-за сильного кулоновского отталкивания присоединенных водородов с близлежащими атомами рибозы N1'.

Во-вторых, вышеупомянутое протонирование дестабилизирует также стэкинговые взаимодействия вследствие сильного электростатического расталкивания протонов, присоединенных к атомам N3 и O2 соседних по цепи цитидиновых остатков. В полупротонированной двойной спирали поли(С) протоны при атомах азота N3 располагаются, очевидно, вдоль каждой цепи через основание, т. е. зигзагообразно, что позволяет минимизировать их кулоновское расталкивание.

Наконец, протонирование атомов кислорода двойной спирали поли(С) дестабилизирует ее и с энтропийной точки зрения, так как вначале затрудняет, а затем делает невозможным синхронное коллективное туннелирование протонов вдоль внутрипарных водородных связей $\text{N3H}\dots\text{N3}$. Квантовохимические расчеты [31] указывают на то, что в изолированной паре $\text{Cyt}:\text{Cyt}(\text{N3H})^+$ осуществляется туннельный перенос протона вдоль связи $\text{N3H}\dots\text{N3}$; есть основание полагать, что в двухспиральной поли(С) этот процесс коллективизируется. Не иск-

лючено, что такое явление может иметь непосредственное биологическое значение, поскольку оно сопровождается, как правило, протонной гиперполяризуемостью [35] и позволяет управлять им при помощи направленных электрических полей (создающихся локальным окружением в микрокомпартементе) сравнительно невысокой напряженности.

Что же касается точки зрения Клампа [18] на процесс протонирования поли(С) (см. «Введение»), то она не имеет достаточного квантовохимического обоснования [31]. Следует отметить, что относительная концентрация редкой иминной формы Cyt в водном растворе оценивается как 10^{-5} [36], а энергия комплексообразования пары Cyt:Cyt (imino) [30] — на 22 ккал/моль ниже, чем аналогичная величина для пары Cyt:Cyt(N3H)⁺. Следовательно, «сценарий» образования двойной спирали поли(С) через образование пары Cyt:Cyt (imino) с последующим ее протонированием по аминному атому азота N4 редкой таутомерной формы Cyt является нереальным.

Узкий пик 4 на кривой протонной буферной емкости поли(С) соответствует протонированию одноцепочечных участков, образующихся при распаде двойных цепей поли(С). Этот процесс имеет псевдокооперативный характер, отражая кооперативный процесс распада двойных спиралей. Считается (см. краткий обзор литературы, приведенный в работе [21]), что нуклеотидные остатки в составе одноцепочечных полинуклеотидов протонируются примерно в том же диапазоне рН, что и свободные мономеры. Таким образом, поскольку рК ионизации цитидин-5'-фосфата (СМР) в 0,1 М NaCl при 20 °С равен 4,42 [37], то цитидиновые остатки в составе одноцепочечных макромолекул в интервале рН 2,7—3,1, в котором происходит разрушение двойной спирали, должны быть практически полностью протонированы. Поэтому одноцепочечные структуры, образующиеся при разрушении двойной спирали поли(С), протонируются (по положению атома азота N3) сразу же после своего появления, в том числе и вследствие перехода протона при атоме O2 на соседний атом N3 вдоль внутримолекулярной водородной связи O2H...N3; такому внутримолекулярному переносу протона предшествует ротационный переход гидроксила O2H из *цис*- в *транс*-положение.

Однако не все авторы относят участок протонирования поли(С), соответствующий пику 4, к распаду двойной спирали. Сулейманова и соавт. [21, 22] предлагают схему протонирования поли(С), отличную от таковых в работах [16, 18]. Они считают, что в 0,1 М KCl при степени прото-

нирования поли(С) ≈ 50 % сосуществуют полностью протонированные двойные спирали, куда входит 50 % всех оснований, и одноцепочечные не протонированные структуры, которые также содержат 50 % оснований. Эти одноцепочечные участки полностью протонируются при дальнейшем понижении рН, а двойные спирали при этом остаются стабильными.

Такое представление, на наш взгляд, является ошибочным. Оно не имеет достаточных физико-химических предпосылок и не подтверждается другими экспериментальными данными. Так, анализ спектров КД [11] и ОРД [38] поли(С) при степени ее протонирования в интервале 40—70 % свидетельствует об отсутствии сколько-нибудь заметного количества одноцепочечных участков в ее структуре. С другой стороны, при рН 3 спектр КД поли(С) значительно отличается от спектра двухспиральной формы и соответствует неструктурированному состоянию полимера [11]. Кроме того, схема протонирования поли(С), предлагаемая авторами работ [21, 22], не может объяснить резкого уменьшения температуры плавления двухспиральных участков полимера в интервале рН, соответствующем степени протонирования 50—70 % [15-18].

Кламп [18] рассматривает процесс протонирования поли(С) как четыре последовательные стадии. Третьей стадией, по его мнению, является реакция протонирования двойных спиралей поли(С), а четвертой — их кооперативный распад. Такая точка зрения согласуется с нашими представлениями. Однако мы считаем некорректным его мнение о начальных стадиях процесса, согласно которому сначала протонируются одноцепочечные структуры до степени протонирования поли(С) ≈ 40 %, а затем протонированные одноцепочечные поли(С) превращаются в двойные спирали. Мы полагаем, что значения рК протонирования одноцепочечных участков поли(С) близки к значениям рК ионизации соответствующего мономера, и если такие участки в полимере присутствуют, то они должны протонироваться примерно в интервале рН 3,4—5,4 (при комнатной температуре в 0,1 М KCl) [16, 37], т. е. уже после того, как образовались двойные спирали. Но в этом интервале рН, как уже упоминалось выше, одноцепочечные участки поли(С) не регистрируются. Однако они присутствуют в интервале рН между двумя узкими пиками на кривой протонной буферной емкости поли(С) (рис. 2) при высоких температурах, когда происходит плавление двойных спиралей. Результаты спектроскопических исследований поли(С) при высоких температурах [17, 39] достаточно убедительно свидетельствуют, по нашему мнению, о близости зна-

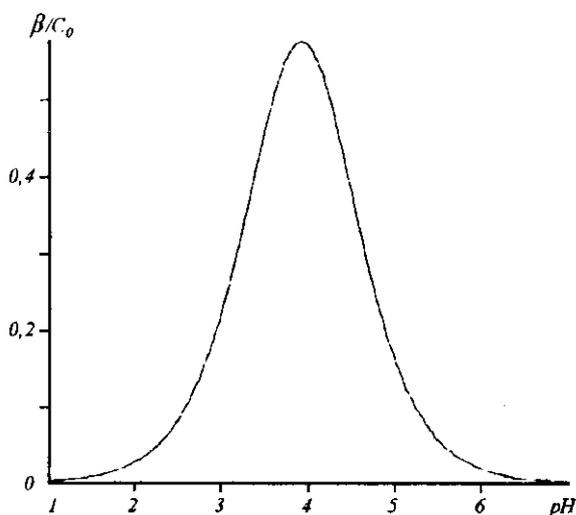


Рис. 4. Расчетная pH-зависимость протонной буферной емкости CMP ($pK = 3,88$; $\gamma = 1$)

чений pK протонирования мономеров и одноцепочечных участков.

В этих работах показано, что плавление двойных спиралей поли(С), степень протонирования которых не превышает 50 %, сопровождается диссоциацией протонов, а при более высоком уровне ионизации высвобождается значительно меньшее количество протонов. Эти результаты легко объяснить, учитывая значения степени протонирования CMP в зависимости от pH и температуры. На рис. 4 показана кривая буферной емкости этого нуклеотида в 0,1 М NaCl при температуре 83 °С, соответствующей завершению процесса плавления двухспирального поли(С) при pH = 4,0 [17], т. е. при степени протонирования полимера более 50 % (pK CMP в этих условиях равен 3,88 [37]). При pH 5,0 (степень протонирования полимера меньше 50 %) поли(С) практически полностью расплавлен при 70 °С [17], pK ионизации CMP при этой же температуре равен 3,94 [37]. Кривая буферной емкости мономера при этом значении pK будет иметь точно такую же форму, как и при pK , равном 3,88, но со сдвигом по шкале pH на 0,06 единицы в щелочную область. Из рис. 4 видно, что количество протонированных молекул CMP при pH = 4,0 (43 %) значительно больше, чем при pH = 5,0 (8 %), поскольку степень протонирования исследуемого вещества прямо пропорциональна площади под его кривой протонной буферной емко-

сти [23]. Поли(С) при этих же значениях pH протонирован на 56 и 46 % соответственно [16]. Следовательно, в том случае, когда одноцепочечные участки поли(С) протонируются при том же значении pK , что и мономер, они оказываются при распаде двойных спиралей протонированными на 13 % больше при pH = 4 и на 38 % больше при pH = 5,0 по сравнению со степенью ионизации в этих условиях. Избыточные протоны диссоциируют, причем в тем большей степени, чем выше pH, и этот процесс, по нашему мнению, регистрируют методами УФ и Рамановской спектроскопии [17, 39]. Следует отметить, что Кламп [18] на основании данных калориметрических и спектроскопических исследований делает вывод о том, что при плавлении двойной спирали поли(С) протоны в интервале pH, соответствующем степени протонирования полимера 40—70 %, не высвобождаются, однако его аргументы при этом являются косвенными, а не прямыми, как в работах [17, 39].

В двойной спирали поли(ДС), как показано методом КД-спектроскопии [11], основания спарены таким же образом, как и в поли(С) (рис. 1). Но этот полимер кооперативно переходит из одноцепочечного состояния в двухспиральное при значительно более щелочных pH. Авторы работы [11] связывают это с тем, что одноцепочечный поли(ДС) является наименее структурированной макромолекулой среди всех рибо- и дезоксигомополирибонуклеотидов, содержащих адениновые и цитидиновые основания, поэтому его переход в двойную спираль со значительно большим стэкингом спаренных оснований является энергетически выгодным при значениях pH, намного превышающих pK протонирования мономера. Следует отметить, что двойная полупротонированная спираль поли(ДС) значительно стабильнее аналогичной спирали поли(С) — ее T_m не менее чем на 18 °С выше T_m поли(С) [15, 40].

Кривая протонной буферной емкости поли(ДС), рассчитанная по данным Инмана [40], приведена на рис. 5. Она удовлетворительно описывается суперпозицией трех базисных функций, параметры которых приведены в таблице. Первые два пика, по аналогии с поли(С), мы относим соответственно к кооперативному образованию двойных спиралей и к их некооперативному протонированию по положению атома азота N3 цитидиновых остатков, не вовлеченных в протонные ловушки. Третий пик соответствует процессу протонирования полимера, характеризуемому параметром кооперативности $\gamma < 1$. Как видно из рис. 5, в области pH вплоть до значения 3,1 (степень протонирования поли(ДС) составляет при этом 76 %) конфор-

мационный переход, соответствующий распаду двойной спирали, не наблюдается. Конформационное поведение двойной спирали поли(dC) при более низких рН в настоящее время неизвестно.

Следует отметить, что хотя мы и пишем в соответствии с цитируемыми работами [11, 40] о конформационном переходе поли(dC) как об образовании двухцепочечной спирали, на самом деле, учитывая работы последних лет, логично предположить, что при протонировании поли(dC) образуется не двойная спираль, а более энергетически выгодная структура, называемая *i*-(intercalated) мотивом [41]. В *i*-мотиве две двухцепочечные структуры (дуплексы), состоящие из параллельно ориентированных цепей со спаренными основаниями, связаны между собой таким образом, что пары оснований этих дуплексов полностью интеркалированы; при этом сами дуплексы ориентированы антипараллельно. Особо подчеркнем, что основания в двухцепочечных структурах *i*-мотива спарены поперечными Н-связями таким же образом, как и в двухспиральных поли(C) и поли(dC) (рис. 1). В качестве примера на рис. 6 приведена схема *i*-мотива, образованного тримером d(TCC) [42]. Интеркалированная ДНК может быть образована не только при ассоциации четырех отдельных цепей, но и при самосворачивании одной макромолекулы, содержащей не менее четырех С-трактов [42].

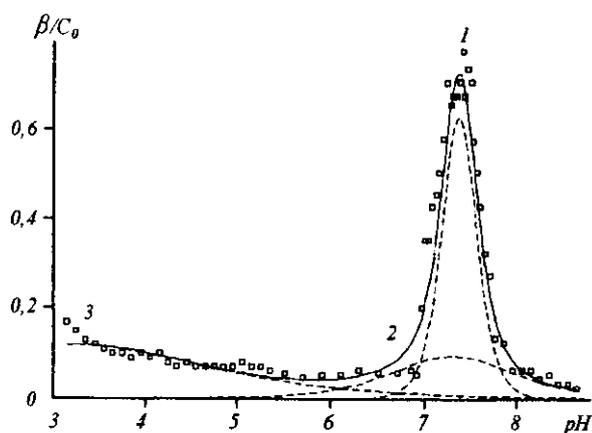


Рис. 5. Протонная буферная емкость поли(dC), рассчитанная по данным работы [40], и ее разложение. Пунктирные линии — базисные функции, сплошная линия — суммарная кривая. $T = 25^\circ\text{C}$; $0,05\text{ M NaCl}$ (параметры обозначенных пиков см. в таблице)

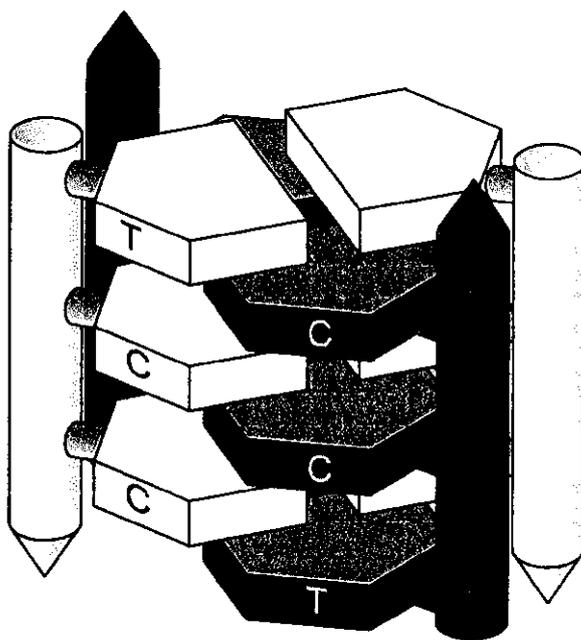


Рис. 6. Схема *i*-мотива, образованного d(TCC) [41, 42]

Образование *i*-структуры наблюдается экспериментально для многих С-богатых олигодезоксирибонуклеотидов [42]. Однако, как показано в ряде работ, например [43, 44], в отличие от дезоксирибонуклеотидов, С-богатые олигорибонуклеотиды (по крайней мере короткие — гексамеры) *i*-мотива не образуют. Это может быть связано, в частности, с тем, что определенный вклад в стабильность *i*-структуры вносят энергетически выгодные стэкинг-подобные взаимодействия соседних остатков дезоксирибозы в узких желобках [43]. Считается [43], что поли(C) не способен образовывать интеркалированную структуры. Однако полностью исключить возможность образования *i*-поли(C) нельзя, поскольку, согласно неопубликованным данным, приведенным в недавнем обзоре [42], интеркалированную РНК все же обнаружить удалось.

Не исключено также, что поли(C), подобно поли(A), может образовывать так называемую «замороженную» форму, представляющую собой объемистую структуру, состоящую из неспаренных одноцепочечных участков и беспорядочно расположенных коротких двухспиральных участков [45, 46]. Предполагается, что эта форма возникает в результате одновременного образования как межмолекулярных, так и внутримолекулярных двой-

ных спиралей при протонировании поли(A) [25]. Поли(C) может сворачиваться с образованием внутримолекулярных двойных спиралей по тем же схемам, что и поли(A) (см., например, [1]).

В заключение кратко охарактеризуем поэтапные реакции протонирования полицитидиловой кислоты, влекущие за собой ее конформационные перестройки:

— кооперативное образование двойных спиралей из одноцепочечных структур, индуцируемое протонированием атомов азота N3 оснований;

— некооперативное протонирование двойных спиралей по положению атомов азота N3 оснований, не вовлеченных в протонные ловушки;

— внешнее некооперативное протонирование двойных спиралей по положению атома кислорода O2 электронейтральных цитидиновых остатков, дестабилизирующее двойную спираль;

— кооперативная диссоциация двойных спиралей, сопровождающаяся полным протонированием образовавшихся одноцепочечных структур по положению атома азота N3, в том числе и вследствие перехода протонов с атома O2 на соседний атом N3 цитидиновых остатков.

М. И. Зарудна, А. Л. Потягайло, Д. М. Говорун

Конформаційні переходи полі(C) і полі(dC): дослідження методом протонної буферної ємності

Резюме

На основі літературних даних розраховано криві протонної буферної ємності полі(C) (при 0,1 М Na⁺) та полі(dC) (при 0,05 М Na⁺) і розкладено їх на базисні функції, які відповідають іонізації атомних груп з однаковими значеннями рК. Виявлено, що крива протонної буферної ємності полі(C) має чотири піки — два вузьких і два широких. Перший вузький пік (рК = 5,6) ототожнено з кооперативним процесом утворення подвійних спиралей, спричиненим протонуванням атома азоту N3 нуклеотидних основ. Другий вузький пік (рК = 2,9) віднесено до кооперативного розпаду цих спиралей. Перший з широких піків (рК = 5,3) відповідає некооперативному протонуванню подвійних спиралей полі(C) на атомах азоту N3 цитидинових основ, які частково експоновані в розчин, другий (рК = 3,1) — віднесено до некооперативного протонування атома кисню електронейтральних цитидинових основ з цис-орієнтацією присьданого протона відносно глікозидного зв'язку. Ця реакція знижує термодинамічну стабільність подвійної спіралі полі(C), призводячи врешті-решт до її дисоціації. Обговорюються також конформаційні переходи полі(dC), спричинені його протонуванням.

М. И. Zarudnaya, A. L. Potyaha'ylo, D. M. Hovorun

Conformational transitions of poly(C) and poly(dC): study by the proton buffer capacity method

Summary

On the basis of the literature data the pH-dependencies of proton buffer capacity of poly(C) (at 0,1 M Na⁺) and poly(dC) (at 0,05 M

Na⁺) are computed. These dependencies are expanded into basic functions corresponding to ionized groups of equal pK. It is found that the buffer capacity curve of poly(C) has four peaks: two narrow and two wide ones. The first narrow peak (pK = 5,6) reflects the process of cooperative formation of double helices, which is induced by the protonation of the N3 atom of the nucleotide bases partly exposed in the solution. The second narrow peak (pK = 2,9) is assigned to the cooperative dissociation of these helices. The first wide peak (pK = 5,3) corresponds to the noncooperative process of the poly(C) double helices protonation at the N3 nitrogen atom. The second wide peak (pK = 3,1) is assigned to the noncooperative protonation of electroneutral cytidine bases at the oxygen atom with cis-orientation of added proton about glycosidic bond. This reaction leads to the decrease of thermodynamic stability of the poly(C) double helices and finally results in their dissociation. The conformational transitions of the poly(dC) induced by its protonation are discussed as well.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Зарудная М. И., Говорун Д. Н. Самоассоциаты гомополимерных трактов клеточных РНК: физические механизмы образования и функционирования // Физика живого.— 1999.—7, № 2.—С. 38—52.
2. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.—Москва: Мир, 1987.—584 с.
3. Samijlenko S. P., Kolomiets I. M., Kondratyuk I. V., Stepanyugin A. V. Model considerations on physico-chemical nature of protein-nucleic acid contacts through amino acid carboxylic groups: spectroscopic data // Биополимеры и клетка.—1998.—14, № 1.—С. 47—53.
4. Takenaka A., Sasada Y. Elementary patterns in protein-nucleic acid interactions. III. Crystal structure of adenine: phthalic acid (3:1) complex hexahydrate // Bull. Chem. Soc. Jap.—1982.—55, N 3.—P. 680—686.
5. Fujita S., Takenaka A., Sasada Y. Crystal structure of adenine-1-(2-carboxyethyl) uracil (1:1) complex. A model for interactions of amino acid side chains with nucleic acid base pair // Bull. Chem. Soc. Jap.—1983.—56, N 8.—P. 2234—2237.
6. Hartman K. A., McDonald-Ordzie P. E., Kaper J. M., Prescott B., Thomas G. J., Jr. Studies of virus structure by laser-Raman spectroscopy. Turnip yellow mosaic virus and capsids // Biochemistry.—1978.—17, N 11.—P. 2118—2123.
7. Prescott B., Sitarman K., Argos P., Thomas G. J., Jr. Protein-RNA interactions in belladonna mottle virus investigated by laser Raman spectroscopy // Biochemistry.—1985.—24, N 5.—P. 1226—1231.
8. Hellendoorn K., Michiels P. J. A., Buitenhuis R., Pleij C. W. A. Protonatable hairpins are conserved in the 5'-untranslated region of tyrovirus RNAs // Nucl. Acids Res.—1996.—24, N 24.—P. 4910—4917.
9. Вирусология / Под редакцией Б. Филдса и Д. Найпа.—Москва: Мир, 1989.—Т. 2.—С. 190—256.
10. Martin L. R., Duke G. M., Osorio J. E., Hall D. J., Palmenberg A. C. Mutational analysis on the Mengovirus poly(C) tract and surrounding heteropolymeric sequences // J. Virol.—1996.—70, N 3.—P. 2027—2031.
11. Antao V. P., Gray D. M. CD spectral comparisons of the acid-induced structures of poly[d(A)], poly[r(A)], poly[d(C)], and poly[r(C)] // J. Biomol. Struct. and Dyn.—1993.—10, N 5.—P. 819—839.
12. Зарудная М. И. Исследование конформационных переходов в поли(A) методом буферной емкости // Молекулярная биология.—1998.—32, № 3.—С. 508—514.
13. Zarudnaya M. I. Double helical forms of poly(A): possible

- involvement in biological processes // Биополимеры и клетка.—1999.—15, № 3.—С. 195—199.
14. *Holcomb D. N., Timasheff S. N.* Temperature dependence of the hydrogen ion equilibria in poly(riboadenylic acid) // *Biopolymers*.—1968.—6, N 4.—P. 513—529.
 15. *Akinrimisi E. O., Sander C., Ts'o P. O. P.* Properties of helical polycytidylic acid // *Biochemistry*.—1963.—2, N 2.—P. 340—344.
 16. *Hartman K. A., Rich A.* The tautomeric form of helical polyriboctyidylic acid // *J. Amer. Chem. Soc.*—1965.—87, N 9.—P. 2033—2039.
 17. *Guschlbauer W.* Protonated polynucleotide structures. I. The thermal denaturation of polycytidylic acid in acid solution // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1967.—57, N 5.—P. 1441—1448.
 18. *Klump H.* A calorimetric study of the helix-coil transition of poly(cytidylic acid) in acid solution // *Biochim. et biophys. acta*.—1975.—383, N 1.—P. 1—8.
 19. *Chou C. H., Thomas G. J., Jr.* Raman spectral studies of nucleic acids. XVI. Structures of polyriboctyidylic acid in aqueous solution // *Biopolymers*.—1977.—16, N 4.—P. 765—789.
 20. *Langridge R., Rich A.* Molecular structure of helical polycytidylic acid // *Nature*.—1963.—198, N 4882.—P. 725—728.
 21. *Сулейманова Р. С., Аполонник Н. В., Кузнецов И. А.* Кислотно-основные свойства изоионных растворов полирибозитидиловой кислоты // *Биофизика*.—1987.—32, № 3.—С. 413—416.
 22. *Аполонник Н. В., Сулейманова Р. С., Кузнецов И. А.* Кондуктометрическое подтверждение существования полностью протонированной двойной спирали полирибозитидиловой кислоты // *Молекуляр. биология*.—1987.—21, № 2.—С. 428—433.
 23. *Опанасенко В. К., Герц С. М., Макаров А. Д.* Буферная емкость полипротонных объектов // *Биохимия*.—1978.—43, № 8.—С. 1357—1368.
 24. *Сухоруков Б. И., Монтель М. М., Опанасенко В. К., Золотарева Е. К.* Изучение взаимодействия ДНК с протонами среды методом буферной емкости // *Молекуляр. биология*.—1983.—17, № 5.—С. 1009—1018.
 25. *Зарудна М. И., Говорун Д. М.* Структурні переходи в поліадениловій кислоті: можливі молекулярні механізми функціонування полі(А)-хвостів мРНК // *Доповіді НАН України*.—1998.—№ 12.—С. 155—160.
 26. *Опанасенко В. К.* Определение и анализ зависимости буферной емкости хлоропластов от pH среды // *Физиология растений*.—1980.—27, № 1.—С. 195—202.
 27. *Guschlbauer W., Blandin M., Drocourt J. L., Thang M. N.* Poly-2'-deoxy-2'-fluoro-cytidylic acid: enzymatic synthesis, spectroscopic characterization and interaction with poly-inosinic acid // *Nucl. Acids Res.*—1977.—4, N 6.—P. 1933—1943.
 28. *Thiele D., Guschlbauer W.* Polynucleotides protonés. VII. Transitions thermiques entre différents complexes de l'acide polyinosinique et de l'acide polycytidylique en milieu acide // *Biopolymers*.—1969.—8, N 3.—P. 361—378.
 29. *Aronsohn G., Travers F.* Electrostatic potential modulation on polynucleotides as a function of ionic content: potentiometric determinations // *Nucl. Acids Res.*—1976.—3, N 5.—P. 1373—1385.
 30. *Šponer J., Leszczyński J., Hobza P.* Hydrogen bonding and stacking of DNA bases: a review of quantum-chemical *ab initio* studies // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*—1996.—14, N 1.—P. 117—135.
 31. *Мишук Я. Р.* Вивчення фізико-хімічної природи елементарних актів білково-нуклеїнового та нуклеїново-нуклеїнового впізнавання на низькомолекулярних модельних системах: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.—Київ: Ін-т молекуляр. біології і генетики НАН України, 1993.—21 с.
 32. *Говорун Д. М., Кондратюк І. В.* Газофазні кислотно-лужні властивості канонічних нуклеотидних основ // *Доповіді НАН України*.—1998.—№ 1.—С. 207—212.
 33. *Florian J., Baumruk V., Leszczyński J.* IR and Raman spectra, tautomeric stabilities, and scaled quantum mechanical force fields of protonated cytosine // *J. Phys. Chem.*—1996.—100, N 13.—P. 5578—5589.
 34. *Войтюк А. А., Близняк А. А.* Влияние протонирования оснований нуклеиновых кислот на энергию образования Уотсон-Криковских пар // *Молекуляр. биология*.—1988.—22, № 4.—С. 1080—1086.
 35. *Zundel G.* Proton polarizability of hydrogen bonds and proton transfer processes, their role in electrochemistry and biology.—München.: Inst. Phys. Chem. der Univ., 1997.—250 p.
 36. *Sowers L. C., Shaw B. R., Veigl M. L., Sedwick W. D.* DNA base modification: Ionized base pairs and mutagenesis // *Mutat. Res.*—1987.—177, N 2.—P. 201—208.
 37. *Wróbel A., Rabzenko A., Shugar D.* Conformation of acid forms of poly(C): temperature and ionic strength dependence of protonation of cytidine and cytidine-5'-phosphate // *Acta biochim. pol.*—1970.—17, N 4.—P. 339—349.
 38. *Green G., Mahler H. R.* Comparative study of polyribonucleotides in aqueous and glycol solutions // *Biochemistry*.—1970.—9, N 2.—P. 368—387.
 39. *O'Connor T., Scovell W. M.* pH-dependent Raman spectra and thermal melting profiles for polycytidylic acid // *Biopolymers*.—1981.—20, N 11.—P. 2351—2367.
 40. *Inman R. B.* Transitions of DNA homopolymers // *J. Mol. Biol.*—1964.—9, N 3.—P. 624—637.
 41. *Gehring K., Leroy J.-L., Guéron M.* A tetrameric DNA structure with protonated cytosine-cytosine base pairs // *Nature*.—1993.—363, N 6429.—P. 561—565.
 42. *Guéron M., Leroy J.-L.* The *i*-motif in nucleic acids // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—2000.—10, N 3.—P. 326—331.
 43. *Lacroix L., Mergny J.-L., Leroy J.-L., Hélène C.* Inability of RNA to form the *i*-motif: implications for triplex formation // *Biochemistry*.—1996.—35, N 26.—P. 8715—8722.
 44. *Collin D., Gehring K.* Stability of chimeric DNA/RNA cytosine tetrads: implications for *i*-motif formation by RNA // *J. Amer. Chem. Soc.*—1998.—120, N 17.—P. 4069—4072.
 45. *Janik B., Sommer R. G., Bobst A. M.* Polarography of polynucleotides. II. Conformations of poly(adenylic acid) at acidic pH // *Biochim. et biophys. acta*.—1972.—281, N 2.—P. 152—168.
 46. *Зарудная М. И., Желтовский Н. В.* Исследование взаимодействия гомополирибонуклеотидов с дикатионом эфира лизина методом аффинного электрофореза // *Молекуляр. биология*.—1992.—26, № 1.—С. 110—117.

УДК 577.323.7

Поступила в редакцию 14.09.99