

sicochemical conditions of their existence. IR-spectra of methanol solutions of the above compounds are obtained. Spectral analysis and comparison between results obtained and literature data allow to conclude that tautomeric equilibrium of *i*-Cyt is of keto-amine—keto-imine type. The supposition of the energetic advantage of the existence of the tautomer with lesser dipole moment due to the lesser polar environment gives an argument for the increase of the rare imine form concentration at the increase of the solution temperature.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.— М.: Мир, 1987.— 584 с.
2. *Experimental* and theoretical studies of molecular structure features of cytosine/ E. D. Radchenko, G. G. Sheina, N. A. Smorygo, Yu. P. Blagoi // *J. Mol. Struct.*— 1984.— **116**.— P. 387—396.
3. *Инфракрасные спектры и таутомерия изоцитозина в аргониновой матрице* / С. Г. Степаньян, Г. Г. Шенна, Е. Д. Радченко, Ю. П. Благой // *Журн. физ. химии.*— 1989.— **63**, № 11.— С. 3008—3014.
4. *MNDO* and IR spectroscopic studies of tautomerism of isocytosine / S. G. Stepanian, E. D. Radchenko, G. G. Sheina, Yu. P. Blagoi // *J. Mol. Struct.*— 1990.— **216**.— P. 77—90.
5. *Keto-enol* tautomer of uracil and thymine / Y. Tsuchija, T. Tamura, M. Fujii, M. Ho // *J. Phys. Chem.*— 1988.— **92**.— P. 1760—1765.
6. *Tautomerism* in cytosine and 3-methylcytosine. A thermodynamic and kinetic study / M. Dreyfus, O. Bensaude, G. Dodin, I. E. Dubois // *J. Amer. Chem. Soc.*— 1976.— **98**, N 20.— P. 6338—6349.
7. *Tautomerism* of purines. 2. Amino-imino tautomerism in 1-alkyl-adenines / M. Dreyfus, G. Dodin, O. Bensaude, I. E. Dubois // *Ibid.*— 1977.— **99**, N 21.— P. 7027—7037.
8. *Квантовохимическое и УФ-спектроскопическое исследование изоцитозина* / С. Г. Семенов, А. А. Тулуб, А. И. Стеценко, Е. К. Скалецкий // *Журн. общ. химии.*— 1988.— **58**, № 4.— С. 901—905.
9. *Спектроскопическое и квантовохимическое исследование изоцитозина* / А. А. Тулуб, С. Г. Семенов, А. И. Стеценко, Е. Е. Юдович // *Теор. и эксперим. химия.*— 1988.— № 1.— С. 29—36.
10. *Sharma B. O., McConnel I. E.* The crystal and molecular structure of isocytosine // *Acta crystallogr.*— 1965.— **19**, N 5.— P. 797—806.
11. *Platinum (II) complexes with aminopyrimidines* / K. I. Yakovlev, A. I. Stetzenko, A. A. Tulub et al. // 5th Int. symp. on platinum and other coordination compounds in cancer chemotherapy (Padua, 29 Jun.— 2 Jul. 1987).— Padua, 1987.— P. 361—362.
12. *Беллами Л.* Инфракрасные спектры сложных молекул.— М.: Изд-во иностр. лит., 1963.— 590 с.
13. *Conserved* unpaired adenine residues are important for ordered structures of 5S ribosomal RNA / S. Böhm, S. Yu. Venyaminov, H. Fabian et al. // *J. Biochem.*— 1985.— **147**.— P. 503—510.

Физ.-техн. ин-т низких температур АН Украины,  
Харьков

Получено 03.07.91

УДК 577.3:547.963.3

**Е. Б. Круглова**

#### СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОВЕДЕНИЯ РАСТВОРОВ ДНК В ВОДЕ И ПРИ НИЗКИХ ИОННЫХ СИЛАХ

*С помощью УФ-спектроскопии изучены концентрационные зависимости гиперхромного эффекта растворов ДНК с разным составом пар оснований в воде. Показано, что в воде и при низких ионных силах протонизация ДНК начинается с АТ-пар. Получены значения констант протонизации АТ-пары  $K_1$  в зависимости от концентрации противоионов. Проведено сравнение  $K_1$  с константой протонизации GC-пар ДНК  $K_2$  при разных ионных силах. Обсуждаются ранее полученные экспериментальные данные на основе предложенного механизма протонизации.*

**Введение.** Исследование влияния ионной силы и pH растворов на процессы комплексообразования ДНК с биологически активными веществами, ионами щелочноземельных и переходных металлов имеет важное

© Е. Б. КРУГЛОВА, 1992

значение для определения функциональной активности ДНК. В работах последних лет изучению процессов комплексообразования ДНК с лигандами, в том числе и с ионом  $H^+$ , при низких ионных силах уделяется особое внимание [1—3]. Это можно объяснить целым рядом особенностей, наблюдающихся в поведении растворов ДНК в воде и при низких концентрациях поддерживающего электролита ( $Na^+$ ), не характерных для средних и высоких концентраций  $Na^+$  [4, 5]. Наибольший интерес при этом вызывает зависимость физико-химических свойств растворов ДНК от концентрации биополимера.

В настоящей работе спектрофотометрическим методом исследованы концентрационные и рН-зависимости гиперхромного эффекта растворов

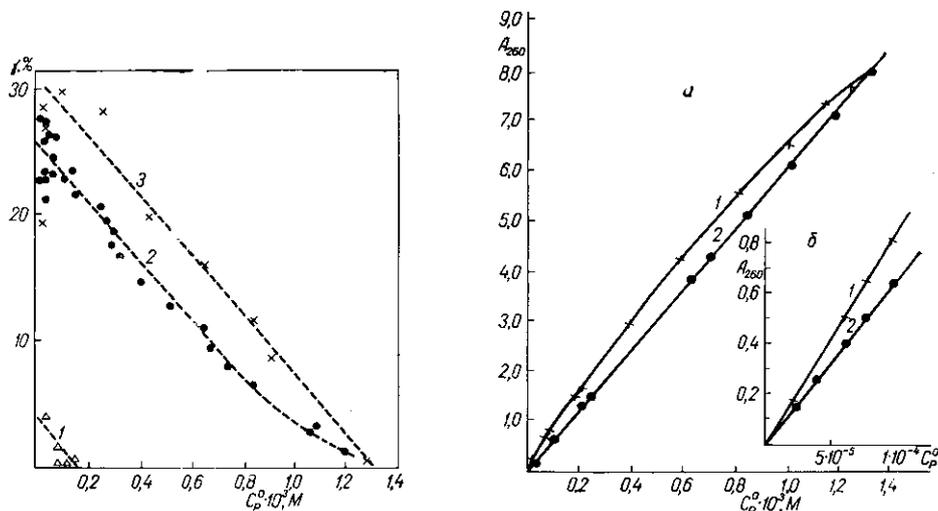


Рис. 1. Зависимость гиперхромного эффекта  $\gamma$  от концентрации ДНК  $C_p^0$  в воде для ДНК с разным (АТ):(ГС)-составом: 1 — *M. luteus* (28:72); 2 — тимусной ДНК (57:43); 3 — *Cl. perfringens* (72:28)

Рис. 2. Зависимость поглощения ДНК *Cl. perfringens* в воде (1) и в 0,2 М NaCl (2) от  $C_p^0$  (а); те же зависимости в увеличенном масштабе (б)

ДНК с разным содержанием АТ- и ГС-пар в воде при комнатной температуре (23 °С). Полученные зависимости применены для вычисления констант протонизации АТ-пар и анализа кривых титрования ДНК при разных ионных силах.

**Материалы и методы.** В работе использовали препараты ДНК с разным (АТ):(ГС)-составом — *Micrococcus luteus* (28:72) («Serva», ФРГ), ДНК тимуса телянка (57:43) («Serva»), ДНК *Clostridium perfringens* (72:28) («Sigma», США). При определении концентрации ДНК  $C_p^0$  молярные коэффициенты экстинкции составляли (260 нм):  $6,923 \cdot 10^3$ ;  $6,412 \cdot 10^3$  и  $6,225 \cdot 10^3 M^{-1} cm^{-1}$  [6]. Значения рН растворов получали на иономере И-130. УФ-спектры поглощения измеряли на спектрофотометре Spescord M40 в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 20, 10 и 1 мм.

Растворы ДНК в воде готовили из исходных концентрированных растворов,  $C_p^0$  которых была не ниже, чем  $1,5 \cdot 10^{-3} M$ ; концентрированные растворы ДНК в воде — постепенным добавлением к навеске полинуклеотида небольших порций воды, чтобы исключить появление локальных областей с малыми концентрациями. Кривые титрования тимусной ДНК в 0,2 и 0,8 М NaCl получены путем постепенного добавления к одному и тому же объему раствора ДНК  $C_p^0 = 2,35 \cdot 10^{-4} M$  раствора HCl в 0,2 и 0,8 М NaCl соответственно (рН=1,3).

**Результаты и обсуждение.** Концентрационные зависимости гиперхромного эффекта  $\gamma$  для разных типов ДНК при комнатной температуре приведены на рис. 1. Величина  $\gamma$  вычисляется как  $\gamma = (A^* - A)/A$ , где  $A^*$  — поглощение определенной концентрации ДНК в воде;  $A$  —

поглощение той же концентрации в 0,2 М NaCl. Из рисунка видно, что в широкой области  $C^0_p$  для ДНК с разным составом пурин-пиримидиновых оснований зависимость  $\gamma$  от  $C^0_p$  носит линейный характер. При очень малых концентрациях  $C^0_p$  существует достаточно большой разброс значений  $\gamma$ . Для уточнения поведения величин  $\gamma$  в этой области концентраций и уменьшения кюветной ошибки все растворы готовили непосредственно в 20-мм кюветах. В кюветах сравнения находились либо вода, либо 0,2 М раствор NaCl.

На рис. 2 (а, б) приведены полученные значения поглощения как функции от  $C^0_p$  для ДНК *Cl. perfringens*. Видно, что в области малых

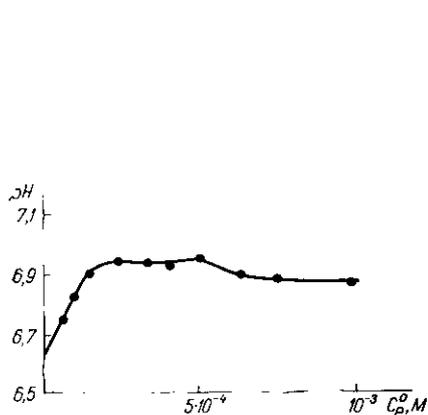


Рис. 3. Зависимость рН водных растворов тимусной ДНК от концентрации ДНК  $C^0_p$

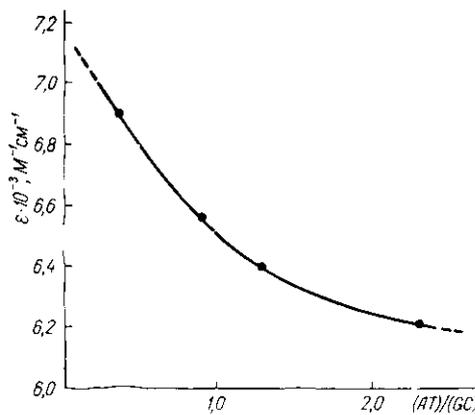


Рис. 4. Зависимость величины молярного коэффициента экстинкции природных ДНК от (АТ) : (GC)-состава по данным работы [6]

значений концентраций ДНК (см. рис. 2, б) сохраняется линейная зависимость  $A^*$  от  $C^0_p$ , откуда следует, что величина  $\gamma$  при  $C^0_p \rightarrow 0$  должна стремиться к постоянной величине. Тем не менее проверка достоверности этого факта требует использования более точных методик измерений.

Поскольку изменение гиперхромного эффекта от  $C^0_p$ , наблюдаемое ранее для тимусной ДНК в воде, связывалось с протонизацией GC-пар [4, 5], нами были измерены величины рН этих растворов.

Хорошо известно, что, если в воде растворяется вещество, способное протонироваться, т. е. слабое основание, то рН растворов увеличивается и зависит от концентрации [7]. На рис. 3 представлена концентрационная зависимость рН для водных растворов тимусной ДНК, из которой следует, что по мере роста  $C^0_p$  концентрация ионов водорода  $[H^+] = 10^{-рН}$  уменьшается (рН увеличивается). (Влияние растворенного углекислого газа на смещение кислотно-основного равновесия в настоящем сообщении не учитывается.)

Таким образом, можно заключить, что при растворении в воде ДНК происходит, с одной стороны, расплетение двойной спирали, которое зависит от  $C^0_p$ , а с другой — изменение рН тех же растворов, причем именно АТ-пары ответственны за наблюдаемые изменения. Этот вывод следует из результатов измерений  $\gamma$  для разных типов ДНК (см. рис. 1).

Можно предположить, как минимум, два возможных объяснения наблюдаемых экспериментальных данных. В первом предполагается, что двойная спираль ДНК расплетается в воде при комнатной (или более низкой) температуре, а затем происходит протонизация оснований на денатурированной ДНК. Второй вариант объяснения может заключаться в том, что частичная денатурация ДНК в воде и при низких ионных силах происходит за счет протонизации АТ-пар, на что указывалось ранее [8]. Центры протонизации находятся, по-видимому, на аденине, что приводит к нарушению комплементарных водородных связей и расплетению АТ-обогащенных участков.

Остановимся более подробно на втором предположении и оценим параметры протонизации, используя найденные величины  $\gamma$  и рН для водных растворов тимусной ДНК. Если связать количество протонированных АТ-пар ( $X$ ) с концентрацией расплетенных АТ-пар и предположить одновременно, что GC-пары в воде остаются в неденатурированном состоянии (идеальный случай), то по уравнению

$$K_1 = \frac{X}{\langle C_A^0 - X \rangle [H^+]}, \quad (1)$$

где  $C_A^0 = (C_P^0/2) \cdot 0,57$  — концентрация АТ-пар для тимусной ДНК, можно оценить величину константы протонизации. Значения  $X$  для каждой из рассматриваемой  $C_P^0$  определяем из следующего уравнения

$$A^* = 2X\epsilon^* + (C_P^0 - 2X)\epsilon, \quad (2)$$

которое характеризует поглощение раствора при условии выполнения вышеописанных приближений.

Величина  $\epsilon^*$  — молярный коэффициент экстинкции денатурированной ДНК, значение которого при 260 нм берем как  $8,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  на один нуклеотид. Для величины  $\epsilon$  (молярный коэффициент экстинкции ДНК в нативном состоянии) при вычислении значения  $X$  из уравнения (2) использовали в одном случае стандартное значение  $\epsilon$ , приведенное в разделе «Материалы и методы» (способ I). При вычислении  $X$  другим способом учитывали, что по мере расплетения АТ-пар оставшаяся часть нерасплетенных пар становится GC-обогащенной и величина  $\epsilon$  будет зависеть от (АТ)/(GC)-соотношения. Во втором случае величину  $X$  вычисляли итерационным способом до самосогласования  $X$  и  $\epsilon(X)$  (способ II), используя зависимость  $\epsilon$  от (АТ)/(GC)-отношения, полученную в работе [6] для разных природных ДНК (рис. 4).

По уравнениям (1) и (2), применяя найденное значение  $X$ , получим величины констант протонизации для разных  $C_P^0$ . Необходимо отметить, что уравнение (1) может быть использовано только в некотором приближении, поскольку оно не учитывает кооперативности рассматриваемых процессов.

Для подтверждения выдвинутых предположений о механизме расплетения ДНК в воде и проверки вычисленных значений  $K_1$  были получены такие же, как на рис. 1, концентрационные зависимости гиперхромного эффекта  $\gamma^*$  при одном и том же значении рН. Для этого все растворы ДНК доводили раствором HCl до значения рН=6,5 (рис. 5). Полученные значения  $\gamma^*$  при  $[H^+] = 10^{-6,5}$  также были использованы для вычисления  $K_1$  по уравнениям (1) и (2).

В таблице приведены вычисленные двумя способами константы протонизации АТ-пар в воде и при рН=6,5 для одних и тех же концентраций ДНК. Видно, что значения констант, полученные вторым способом для одинаковых  $C_P^0$ , совпадают с хорошей степенью точности. Если связать наблюдаемые изменения констант протонизации с измене-

*Результаты расчета констант протонизации АТ-пар в ДНК с составом оснований (АТ):(GC) (57:43) двумя разными способами в воде и растворе HCl с рН 6,5*

В воде				рН 6,5			
$C_P^0$	$\lg [Na^+]$	$\lg K_1$		$C_P^0$	$\lg [Na^+]$	$\lg K_1$	
		(I)	(II)			(I)	(II)
$1,136 \cdot 10^{-3}$	-2,94	6,17	6,03	$1,12 \cdot 10^{-3}$	-2,95	6,18	6,03
$7,570 \cdot 10^{-3}$	-3,12	6,52	6,38	—	—	—	—
$5,300 \cdot 10^{-1}$	-3,28	7,09	6,85	$5,24 \cdot 10^{-4}$	-3,28	6,97	6,70
$3,786 \cdot 10^{-4}$	-3,42	7,29	7,00	$3,75 \cdot 10^{-4}$	-3,42	7,62	6,90
$1,514 \cdot 10^{-4}$	-3,82	8,84	7,29	—	—	—	—

Примечание. Значения рН растворов ДНК в воде, использованные в расчетах, приведены на рис. 3.

нием концентрации противоионов, которые в первом приближении совпадают с  $C^0_p$ , и отложить значения  $\lg K_1$  как функцию  $\lg [Na^+]$ , то получим линейную зависимость в некоторой узкой области концентраций ионов  $Na^+$ . Аппроксимируя эту линейную зависимость к средним и высоким концентрациям ионов  $Na^+$ , можно попытаться качественно

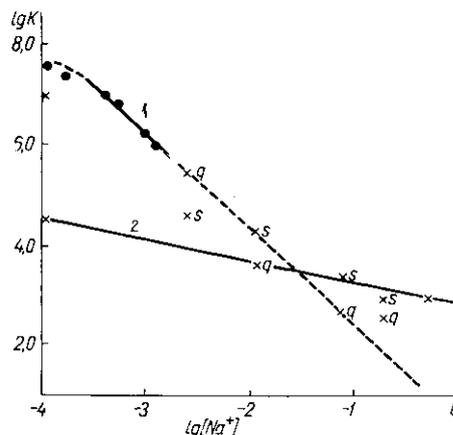
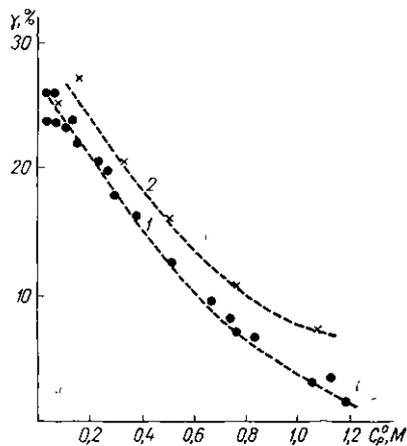


Рис. 5. Зависимость гиперхромного эффекта от  $C^0_p$  в воде (1) и при  $pH=6,5$  (2) для тимусной ДНК

Рис. 6. Зависимость рассчитанных (точки) и экспериментальных (крестики) значений  $\lg K$  от логарифма концентрации ионов  $Na^+$ : 1 — зависимость  $\lg K_1$  от  $\lg [Na^+]$ ; 2 — то же для  $\lg K_2$ . Экспериментальные значения взяты из работ [1, 4, 9]; обозначения  $q$  и  $S$  — из работы [11]

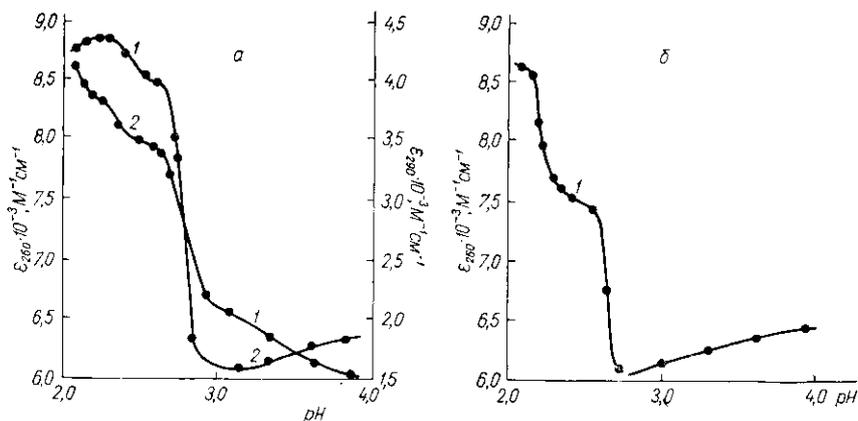


Рис. 7. Зависимость  $\epsilon_{260}$  (1) и  $\epsilon_{290}$  (2) растворов ДНК от  $pH$  в 0,2 М  $NaCl$  (а) и 0,8 М  $NaCl$  (б)

проанализировать полученные ранее разными авторами экспериментальные данные по протонированию молекул тимусной ДНК при разных ионных силах.

Так, хорошо видно, что в области концентраций ионов  $Na^+ \sim 0,1 \div 1$  М протонизация АТ-пар не может быть ответственна за изменения в спектрах поглощения ДНК при  $pH \sim 3,5-2,5$ , которые наблюдались для тимусной ДНК в целом ряде работ [1, 4, 9, 10], поскольку значения  $K_1$  для каждой из этих ионных сил существенно ниже. Можно предположить, как это и делалось ранее, что при таких ионных силах протонизация начинается с GC-пар. На рис. 6 отложены значения  $\lg K_2$  в зависимости от  $\lg [Na^+]$ , где  $K_2$  — константа протонизации GC-пар. Величины  $K_2$  взяты нами из работ разных авторов [1, 4, 9]. На этом же рисунке отмечены положения  $q$  и  $S$ -пиков, соответствующих макси-

мумам двух областей протонизации, полученных методом буферной емкости для разных ионных сил [11].

Обобщая приведенные результаты, можно заключить, что предложенный механизм протонизации ДНК в воде и при низких ионных силах позволяет объяснить целый ряд экспериментальных данных. Так, при низких ионных силах или в воде протонизация начинается в области нейтральных или слабокислых рН с АТ-пар, а затем при более кислых значениях рН идет протонизация ГС-пар. При очень низких ионных силах, когда разница между  $K_1$  и  $K_2$  существенна, кривые титрования могут быть двухступенчатыми, что и наблюдается в действительности [1, 4]. В этих областях ионных сил кривые титрования отличаются для разных концентраций ДНК, поскольку величина константы протонизации  $K_1$  зависит от концентрации противоионов. По мере увеличения ионной силы концентрационные различия исчезают [4].

Можно ожидать, что в области высоких ионных сил, для которых значения  $K_1$  и  $K_2$  также существенно отличаются, кривые титрования будут иметь особенности при значениях рН более кислых, чем те, которые соответствуют области протонизации ГС-пар. Полученные нами кривые титрования тимусной ДНК в 0,2 и 0,8 М NaCl подтверждают высказанные предположения (рис. 7, а, б).

В заключение важно отметить, что сделанные в работе выводы о механизме протонизации молекулы ДНК и найденные значения констант протонизации молекулы ДНК в широкой области ионных сил носят предварительный характер.

Тем не менее полученные данные и предложенная в работе модель позволяют объяснить и увязать между собой целый ряд наблюдавшихся ранее экспериментальных данных.

Резюме. За допомогою УФ-спектроскопії вивчено концентраційні залежності гіперхромного ефекту розчинів ДНК з різним складом пар основ у воді. Показано, що в воді та при низьких іонних силах протонізація ДНК починається із АТ-пар. Одержано значення констант протонізації АТ-пари  $K_1$  в залежності від концентрації противіонів. Порівняно  $K_1$  з константою протонізації ГС-пар ДНК  $K_2$  при різних іонних силах. Обговорюються одержані раніше експериментальні дані на основі запропонованого механізму протонізації.

Summary. Dependences of the observed hyperchromism on DNA concentrations for DNA with different bases contents in the water were studied by UV-spectroscopy. It has been shown that DNA protonation begins with AT-pairs in the water and at low ionic strengths. The dependences of protonation constants values of AT-pair  $K_1$  on counterion concentration were obtained. It was carried out the comparison  $K_1$  with protonation constant of GC-pair  $K_2$  at different ionic strengths. Experimental data earlier obtained on the basis of proposed mechanism of protonation are discussed.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Слоницкий С. В., Куцов В. Ю. Влияние ионной силы раствора на протонирование молекулы ДНК // Молекуляр. биология.— 1988.— 22, № 3.— С. 741—759.
2. Sorokin V. A., Glachenko G. O., Valeev V. A. DNA protonation at low ionic strength of solution // Macromol. Chem.— 1986.— 187.— P. 1053—1063.
3. Крушова Е. Б. Один из возможных подходов к учету влияния противоионов на процессы комплексообразования в системах полиэлектролит — лиганд // Молекуляр. биология.— 1991.— 25, № 1.— С. 60—68.
4. Cavaliere L. F., Rosoff M., Rosenberg B. H. Studies on the structure of nucleic acids. X. On the mechanism of denaturation // J. Amer. Chem. Soc.— 1956.— 78, N 20.— P. 5239—5247.
5. Cavaliere L. F., Rosenberg B. H. Studies on the structure of nucleic acids. XI. The roles of heat and acid in deoxyribonucleic acid denaturation // Ibid.— 1957.— 79, N 20.— P. 5352—5357.
6. Müller W., Crothers D. M. Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids // Eur. J. Biochem.— 1975.— 54, N 2.— P. 267—277.
7. Комарь И. П. Гомогенные ионные равновесия.— Харьков: Вища шк., 1983.— 207 с.

8. Hermann Ph., Fredericq E. The role of the AT pairs in the acid denaturation of DNA // Nucl. Acids Res.— 1977.— 4, N 8.— P. 2939—2947.
9. Dore E., Frontali C., Gratton E. The role of ions in the acid melting of DNA // Biopolymers.— 1972.— 11, N 10.— P. 2033—2041.
10. Микельсон А. Химия нуклеозидов и нуклеотидов.— М.: Мир, 1966.— 667 с.
11. Изучение взаимодействия ДНК с протонами среды методом буферной емкости; Б. И. Сухоруков, М. М. Монтрель, В. К. Опанасенко, Е. К. Золотарева // Молекуляр. биология.— 1983.— 17, № 5.— С. 1009—1018.

Ин-т радиофизики и электроники АН Украины,  
Харьков

Получено 22.07.91

УДК 543.42

Е. Д. Радченко, И. Д. Рева, А. М. Плохотниченко,  
С. Г. Степаньян, Г. Г. Шеина, Ю. П. Благой

## ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ ГЛИЦИНА МЕТОДОМ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ В КРИОМАТРИЦАХ

*Получены высокоразрешенные ИК-спектры глицина и модельных соединений методом «матричной изоляции». Проведен эмпирический анализ спектров и показано, что при замораживании в матрицах аминокислоты переходят из цвиттерионной в молекулярную форму. Обнаружено, что в матрицах присутствует несколько конформаций, возбужденных при температуре испарения. «Расщепление» конформационно-чувствительных пиков свидетельствует о наличии в матрице по крайней мере трех конформеров глицина. Выполнено предварительное отнесение конформеров.*

**Введение.** Задачи установления пространственного строения белков требуют знания структуры и конформационной динамики мономерных звеньев, включенных в полимерные цепи. Однако экспериментальное получение такой информации весьма затруднено, поскольку большинство аминокислот в кристаллах и растворах существует в виде цвиттерионов, молекулярная структура которых нехарактерна для полипептидных цепей. Кроме того, попытки получения необходимой информации на модельных соединениях в кристаллическом состоянии или в растворах наталкиваются на значительные искажения результатов вследствие сильного влияния эффектов окружения. Поэтому в настоящее время исследования наиболее выгодных с энергетической точки зрения конформеров аминокислот, их структуры и термодинамики взаимных переходов выполняются, в основном, расчетными методами квантовой химии в вакуумном приближении. Полученные таким путем структурные и энергетические параметры используются в дальнейшем для решения задач машинного моделирования более сложных полимерных систем.

Одно из первых теоретических исследований [1] подтвердило масс-спектрометрические измерения [2], из которых следовало, что аминокислоты в изолированном состоянии существуют в молекулярной форме. Это, в свою очередь, подсказало пути экспериментального решения проблемы конформационной динамики аминокислот — исследования структуры в газовой фазе. Впервые такие измерения были выполнены для простейшей аминокислоты — глицина в 1978 г. методом микроволновой радиоспектроскопии [3, 4]. Но дальнейший анализ [5, 6] ставит под сомнение выводы экспериментов [3, 4] о наблюдении наиболее стабильной структуры вследствие специфики экспериментальной методики.

*Ab initio* расчеты с оптимизацией геометрических параметров конформеров глицина [6] показывают, что в газофазных экспериментах могут реализоваться три равновесные молекулярные формы ( $E$  — отно-

© Е. Д. РАДЧЕНКО, И. Д. РЕВА, А. М. ПЛОХОТНИЧЕНКО, С. Г. СТЕПАНЬЯН,  
Г. Г. ШЕЙНА, Ю. П. БЛАГОЙ, 1992