

A STUDY OF COMPLEXES BETWEEN CYTOSINE  
AND AMINO ACID CARBOXYLIC GROUP BY NMR SPECTROSCOPY

*I. V. Kondratyuk, I. N. Kolomiets, S. A. Samoilenko, N. V. Zheltovsky*

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

It has been shown by UV spectroscopy that of all the nucleotide bases only cytosine interacts with undissociated amino acid carboxylic group in DMSO solution. H-bonded complexes of cytosine with some amino acid N-acyl derivatives (N-formyl aspartic acid, N-acetyl aspartic acid,  $\alpha$ -methyl ester of N-acetyl aspartic acid, N-acetyl glutamic acid, N-formyl glycine) were studied by the PMR spectroscopy. It has been determined by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy that while complexing cytosine is protonated at N3 atom by carboxylic group proton. It was shown that in triple complex N-formyl aspartic acid: cytosine: 9-methyl guanine amino acid carboxylic group, binding to cytosine, loosens H-bonds inside the base pair.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Взаимодействие* нуклеотидных оснований с карбоксильной группой аминокислот в ДМСО: модель точечных белково-нуклеиновых контактов / Н. В. Желтовский, С. А. Самойленко, И. Н. Коломиец, И. В. Кондратюк // Докл. АН УССР. Сер. Б.—1988. — № 8.— С. 68—71.
2. *Lancelot G., Helene C.* Selective recognition of nucleic acids by proteins: The specificity of guanine interaction with carboxylate-ion // PNAS.—1977.—74, N 11.— P. 4872—4875.
3. *Брусков В. И., Бушнев В. Н.* Исследование методом протонного магнитного резонанса комплексообразования между нуклеозидами и соединениями, моделирующими аминокислотные остатки белков, в диметилсульфоксиде // Биофизика.—1977.—22, № 1.— С. 26—31.
4. *Carbon-13 magnetic resonance. 17. Pyrimidine and purine nucleosides* / A. J. Jones, D. M. Grant, M. W. Winkley, R. K. Robins // J. Amer. Chem. Soc.—1970.—92, N 13.— P. 4079—4087.
5. *Breitmaier E., Voelter W.* Carbon-13 NMR spectroscopy.—Weinheim: VCH, 1987.
6. *Job M. P.* Etude spectrographique de la formation des complexes en solution et de leur stabilité // Compt. Rend.—1925.—180, N 12.— P. 928—930.
7. *Comparative structural analysis of cytidine, ethenocytidine and their protonated salts* III.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR studies at normal isotope abundance / L. Kozerski, H. Sierzpulowska-Cracz, W. Krzyzosiak et al. // Nucl. Acids Res.—1984.—12, N 4.— P. 2205—2223.
8. *Benoit R. L., Frechette M.*  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance an ultraviolet studies of the protonation of cytosine, uracil, thymine, and related compounds // Can. J. Chem.—1986.—64, N 12.— P. 2348—2352.
9. *Колебательный спектр и структура комплекса цитозина с N-формилглицином в твердой фазе* / Н. В. Желтовский, С. А. Самойленко, М. И. Губайдуллин, И. В. Кондратюк // Докл. АН УССР. Сер. Б.—1988.— № 5.— С. 75—78.
10. *Studies of virus structure by laser-Raman spectroscopy. Turnip yellow mosaic virus and capsids* / K. A. Hartman, P. E. McDona'd-Ordzie, J. M. Kaper et al. // Biochemistry.—1978.—17, N 11.— P. 2118—2123.

Ин-т молекуляр биологии и генетики  
АН УССР, Киев

Получено 23.06.89

УДК 577.3:547.963.3

**С. В. Корнилова, А. Г. Шкорбатов, Ю. П. Благой**

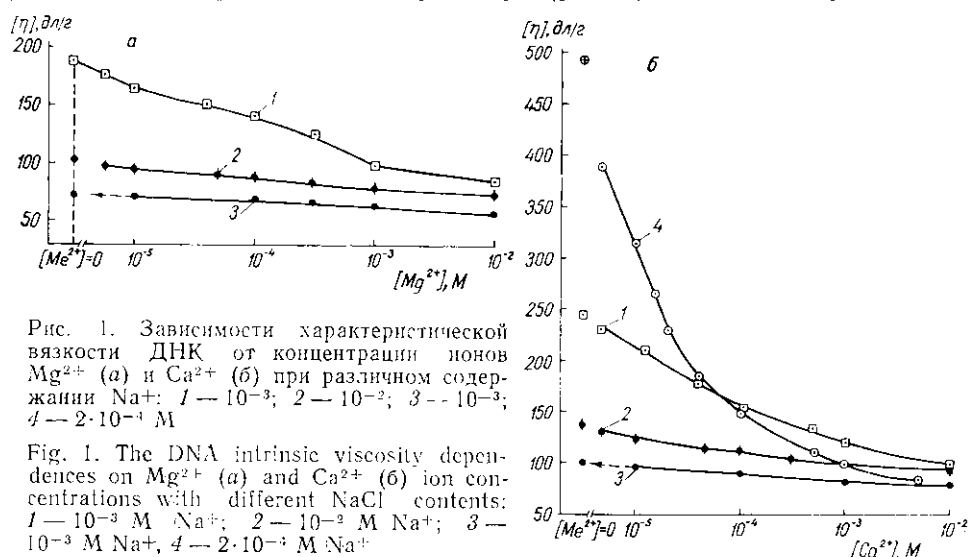
**ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЩЕЛОЧНОЗЕМЕЛЬНЫХ  
И ПЕРЕХОДНЫХ МЕТАЛЛОВ НА ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ  
И МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ДНК**

*Изучено влияние ионов  $\text{Me}^{2+}$  щелочноземельных ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) и переходных металлов ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) на характеристическую вязкость  $[\eta]$  и величину параметра исключенного объема ДНК  $\epsilon$ . Показано что ионы  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$  оказывают больший эффект на величины  $[\eta]$  и  $\epsilon$ , чем ионы  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , вследствие связывания с азотистыми основаниями ДНК уже при малых концентрациях ( $5 \cdot 10^{-6}$  М). Установлены универсальные зависимости величин  $[\eta]$  и  $\epsilon$  от степени связывания  $\text{Me}^{2+}$ .*

**Введение.** Активная биологическая роль ионов двухвалентных металлов в процессах жизнедеятельности, в канцерогенезе и мутагенезе определяет интерес к исследованию взаимодействия ионов с макромолекулами ДНК. Однако механизмы влияния катионов на структуру и физические свойства ДНК выяснены недостаточно полно. В настоящей работе рассмотрены малоизученные вопросы, связанные с различием действия ионов щелочноземельных и переходных металлов на конформацию ДНК, молекулярные параметры и величину исключенного объема. Изучено связывание ионов  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  и  $Cu^{2+}$  с ДНК в широком диапазоне ионных сил ( $2 \cdot 10^{-4}$ — $10^{-1}$  М) и выполнен количественный анализ влияния степени связывания на конформационные параметры макромолекул.

**Материалы и методы.** Исследования проводили на препаратах ДНК, выделенных из тимуса телят и содержащих примеси двухвалентных ионов ( $Me^{2+}$ ) в концентрации не более  $5 \cdot 10^{-4}$  М  $Me^{2+}$  на моль фосфора. Содержание белка и РНК не превышало 0,5 и 0,1 % соответственно. Препараты ДНК обладали следующими характеристиками, которые сохранялись на протяжении всей серии экспериментов:  $A_{260/230} = 2,39 \pm 0,01$ ,  $A_{260/280} = 1,85 \pm 0,02$ , величина гипохромного эффекта 39 %, коэффициент молярной экстинкции 6600. Молекулярная масса (м. м.) ДНК составляла  $(1,3-1,9) \cdot 10^7$  и определялась по значению характеристической вязкости  $[\eta]$ . Подробно методика приготовления растворов и измерения  $[\eta]$  ДНК на вискозиметре типа Зимма — Крозерса описана в наших предыдущих работах [1, 2]. Исследования были выполнены при температуре  $24,0 \pm 0,05^\circ C$  в растворах с рН  $6,4 \pm 0,05$ . В условиях низкой ионной силы ( $2 \cdot 10^{-4}$  М  $Na^+$ ) измерения  $[\eta]$  ДНК проводили при  $16 \pm 0,05^\circ C$  и градиентах скорости  $g < 0,03$  с $^{-1}$ . Концентрации двухвалентных ионов металлов, вводимых в виде хлоридов, определяли по массе и контролировали методом трилометрического титрования. Концентрации свободных ионов металлов и параметр связывания  $r_1$  численно оценивали по уравнениям Скетчарда для системы ионов, учитывающих конкуренцию при связывании [3, 4].

**Результаты и обсуждение.** Экспериментальные зависимости характеристической вязкости ДНК от концентрации ионов  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  при различном содержании  $Na^+$  в растворе (рис. 1) свидетельствуют о том,



что уже малые концентрации ионов щелочноземельных металлов ( $10^{-5}$  М  $Ca^{2+}$ ) вызывают существенное уменьшение величины  $[\eta]$  ДНК (в  $\sim 1,2$  раза по сравнению со значением  $[\eta]$  в растворе  $10^{-3}$  М  $Na^+$ ). Сравнение относительных изменений  $[\eta]$  ДНК, соответствующих одинаковым концентрациям двухвалентных ионов и ионов  $Na^+$ , показывает, что при  $10^{-3}$  М  $Na^+$  и концентрациях  $Ca^{2+} > 10^{-4}$  М ионы  $Ca^{2+}$  оказывают большее влияние на  $[\eta]$  ДНК. При высоком содержании  $Na^+$

( $\geq 0,01$ ) значения  $[\eta]$  ДНК, соответствующие одинаковым концентрациям ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , становятся близкими, что согласуется с результатами работы [5]. Соответствующие величины  $[\eta]$  могут быть достигнуты в растворах  $\text{NaCl}$  при  $[\text{Na}^+] \approx 1 \text{ M}$ .

Сравнивая действие ионов переходных и щелочноземельных металлов на характеристическую вязкость, можно видеть (рис. 2), что при одинаковых концентрациях  $\text{Na}^+$  ионы  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$  вызывают более значительное уменьшение  $[\eta]$  ДНК, чем ионы  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , и что особенно сильным оказывается влияние ионов  $\text{Cu}^{2+}$ . В настоящей работе обнаружены различия в действии  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  на характеристическую вяз-

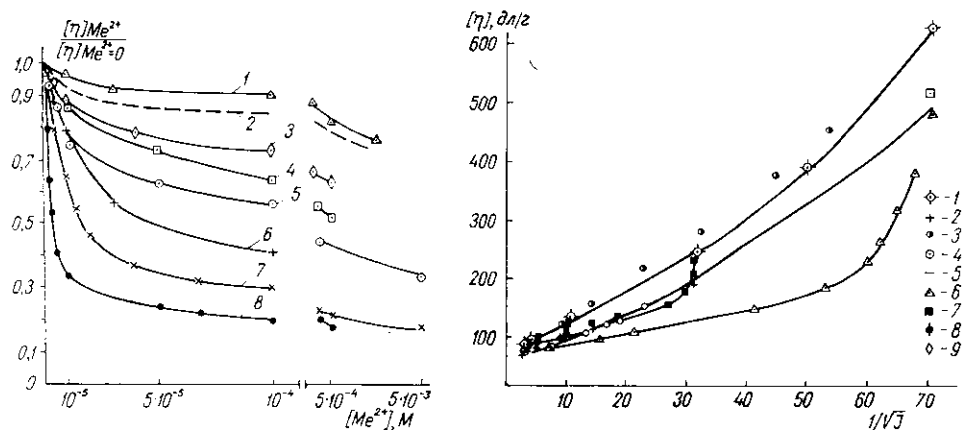


Рис. 2. Относительные изменения приведенных значений  $[\eta]$  ДНК от концентрации двухвалентных ионов при различном содержании  $\text{Na}^+$ : 1 —  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $2 \cdot 10^{-2} \text{ M Na}^+$ ; 2 —  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $10^{-2} \text{ M Na}^+$ ; 3 —  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $10^{-3} \text{ M Na}^+$ ; 4 —  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $10^{-3} \text{ M Na}^+$ ; 5 —  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $10^{-3} \text{ M Na}^+$ ; 6 —  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $10^{-3} \text{ M Na}^+$ ; 7 —  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $2 \cdot 10^{-4} \text{ M Na}^+$ ; 8 —  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $2 \cdot 10^{-4} \text{ M Na}^+$ .

Fig. 2. The relative changes of  $[\eta]$  values of DNA due to the bivalent ion concentrations with different  $\text{NaCl}$  contents: 1 —  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $2 \cdot 10^{-2} \text{ M Na}^+$ ; 2 —  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $10^{-2} \text{ M Na}^+$ ; 3 —  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $10^{-3} \text{ M Na}^+$ ; 4 —  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $10^{-3} \text{ M Na}^+$ ; 5 —  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $10^{-3} \text{ M Na}^+$ ; 6 —  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $10^{-3} \text{ M Na}^+$ ; 7 —  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $2 \cdot 10^{-4} \text{ M Na}^+$ ; 8 —  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $2 \cdot 10^{-4} \text{ M Na}^+$ .

Рис. 3. Зависимости величины  $[\eta]$  от  $1/\sqrt{I}$  при взаимодействии с ионами  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ .  $\text{Na}^+$ : 1 — м. м.  $19 \cdot 10^6$ ; 2 — м. м.  $13 \cdot 10^6$ ; 3 — м. м.  $21 \cdot 10^6$  [17]; 4 — м. м.  $13 \cdot 10^6$  [18]; 5 — м. м.  $13 \cdot 10^6$  [17];  $\text{Ca}^{2+}$ : 6 — м. м.  $13 \cdot 10^6$ ,  $[\text{Na}^+] = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ; 7 — м. м.  $19 \cdot 10^6$ ,  $[\text{Na}^+] = 10^{-3} \text{ M}$ ; 8 — м. м.  $19 \cdot 10^6$ ,  $[\text{Na}^+] = 10^{-2} \text{ M}$ ; 9 — м. м.  $19 \cdot 10^6$ ,  $[\text{Na}^+] = 10^{-1} \text{ M}$ .

Fig. 3. The  $[\eta]$  value dependence on  $1/\sqrt{I}$  during the binding to  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  ions.  $\text{Na}^+$ : 1 — m. w.  $19 \cdot 10^6$ ; 2 — m. w.  $13 \cdot 10^6$ ; 3 — w. m.  $21 \cdot 10^6$  [17]; 4 — m. w.  $13 \cdot 10^6$  [18]; 5 — m. w.  $13 \cdot 10^6$  [17];  $\text{Ca}^{2+}$ : 6 — m. w.  $13 \cdot 10^6$ ,  $[\text{Na}^+] = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ; 7 — m. w.  $19 \cdot 10^6$ ,  $[\text{Na}^+] = 10^{-3} \text{ M}$ ; 8 — m. w.  $19 \cdot 10^6$ ,  $[\text{Na}^+] = 10^{-2} \text{ M}$ ; 9 — m. w.  $19 \cdot 10^6$ ,  $[\text{Na}^+] = 10^{-1} \text{ M}$ .

кость ДНК при концентрации  $\text{Me}^{2+}$  в растворе  $10^{-6}$ — $10^{-5} \text{ M}$ , что соответствует степеням связывания  $r_i \approx 0,2$  при  $[\text{Na}^+] = 10^{-3} \text{ M}$ . Метод анализа против низкой концентрации двухвалентных ионов, использованный в работе [5], не позволил обнаружить различий между действием  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , так как приводит к значительно большим значениям параметра связывания  $r_i \sim 0,4$ , при которых влияние  $\text{Me}^{2+}$  на  $[\eta]$  ДНК осуществляется, в основном, по механизму дебай-хюккелевского экранирования.

Сильная нелинейность зависимости  $[\eta]$  ДНК от  $1/\sqrt{I}$  ( $I$  — ионная сила раствора) в присутствии  $\text{Me}^{2+}$  обусловлена связыванием двухвалентных ионов с ДНК (рис. 3). Двухвалентные ионы ( $\text{Me}^{2+}$ ) присутствуют в растворе в соотношении  $[\text{Me}^{2+}] \ll [\text{Na}^+]$  ( $10^{-6}$ — $10^{-5} \text{ M Me}^{2+}$  и  $2 \cdot (10^{-4}$ — $10^{-3}) \text{ M Na}^+$ ). В таком случае частичное связывание двухвалентных ионов с ДНК практически не меняет ионной силы раствора, и уменьшение  $[\eta]$  нельзя объяснить усилением дебай-хюккелевского экранирования отрицательных зарядов ДНК при повышении общей ионной силы раствора. Вследствие высоких значений констант связывания  $\text{Me}^{2+}$  с ДНК [3, 6] уже при малых их концентрациях число двух-

валентных ионов, связанных с макромолекулой, значительно. Это приводит к сильному уменьшению объема, занимаемого макромолекулой ДНК, что определяет уменьшение ее  $[\eta]$  в результате частичной компенсации отрицательного заряда при равновесном связывании ионов. При больших концентрациях  $Me^{2+}$  наряду со связыванием следует учитывать и их экранирующее действие.

Изменение  $[\eta]$  ДНК при взаимодействии с ионами металлов определяется изменением дальнего действия в макромолекуле, описываемого

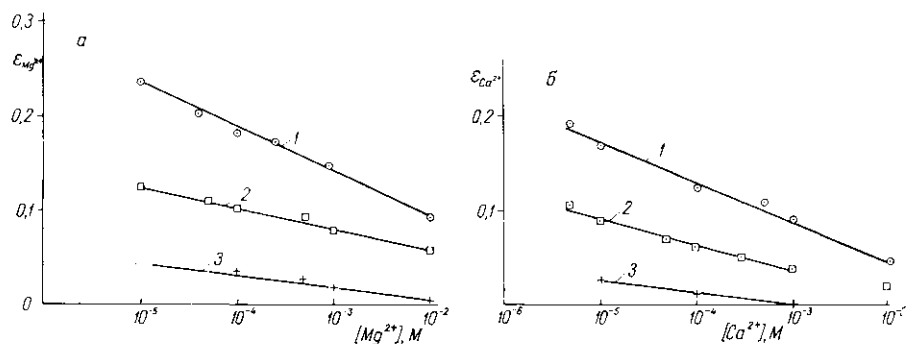


Рис. 4. Зависимости величины параметра  $\epsilon$  от концентрации ионов  $Mg^{2+}$  (а) и  $Ca^{2+}$  (б) при разном содержании  $Na^+$ : 1 —  $10^{-3}$ ; 2 —  $10^{-2}$ ; 3 —  $10^{-1}$  М

Fig. 4. The parameter  $\epsilon$  dependences on the  $Mg^{2+}$  (a) and  $Ca^{2+}$  (б) concentrations with different  $NaCl$  contents. 1 —  $10^{-3}$ ; 2 —  $10^{-2}$ ; 3 —  $10^{-1}$  М  $Na^+$

параметром исключенного объема  $\epsilon$ , и ближнего действия, которое ответственно за величину персистентной длины  $a$ . Представляется интересным оценить вклад дальнего действия в изменение размеров ДНК при взаимодействии с двухвалентными ионами, так как предполагается, что именно эти эффекты определяют поведение  $[\eta]$  ДНК в области ионных сил  $\sim 10^{-3}$  М и выше.

Чтобы рассчитать параметр исключенного объема ДНК при различных концентрациях ионов металлов, мы использовали подход, описанный нами ранее [4].

При вычислениях учитывали слабую зависимость персистентной длины ДНК от концентрации ионов  $Na^+$  в области  $[NaCl] > 10^{-3}$  М [7, 8], а для двухвалентных ионов — в области  $[Mg^{2+}] \geq 6 \cdot 10^{-5}$  М, что соответствует  $I > 2 \cdot 10^{-4}$  М [8]. В связи с этим допускали, что увеличение  $[Me^{2+}]$  в растворе  $10^{-3}$  М  $Na^+$  не вызывает изменений величины  $a$ , и полагали  $a = 60$  нм [7, 8]. При больших ионных силах, в соответствии с данными работ [7–9], считали  $a = 50$  нм. Значение  $[\eta]$  в точке  $\Theta$  считали равным значению  $[\eta]$  в 1 М  $NaCl$ , так как известно, что при увеличении концентрации противоионов свыше 1 М величина характеристической вязкости остается практически постоянной вследствие полного подавления электростатических объемных эффектов [5, 7, 10]. Параметр исключенного объема ДНК в  $\Theta$  точке приняли равным 0, так как имевшиеся в литературе данные о высоких значениях  $\epsilon$  при больших ионных силах связаны, как показывает анализ, с сильным завышением эффектов исключенного объема [9].

Сравнивая действие ионов переходных и щелочноземельных металлов на эффекты дальнего действия в макромолекуле ДНК, можно видеть (рис. 4, 5), что связывание ионов  $Mn^{2+}$  и  $Sr^{2+}$  при концентрациях  $Mn^{2+} \sim 10^{-3}$  М и  $Sr^{2+} \sim 10^{-4}$  М приводит к значительному уменьшению параметра  $\epsilon$ , в то время как для ионов  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  эти значения  $\epsilon$  достигаются при концентрациях  $\sim 10^{-2}$  М и выше.

Исследование, выполненное нами ранее [11] методами кругового дихроизма (КД) и УФ-дифференциальной спектроскопии, показывает, что значительное уменьшение величины  $[\eta]$  ДНК и параметра  $\epsilon$  при добавлении малых количеств  $Me^{2+}$  ( $\sim 10^{-5}$  М) сопровождается актив-

ным связыванием двухвалентных ионов с фосфатами и азотистыми основаниями макромолекул. Так, при концентрациях ионов  $Mn^{2+}$  и  $Cu^{2+}$   $5 \cdot 10^{-6}$  М в растворе  $10^{-3}$  М  $Na^+$  можно наблюдать дифференциальный УФ-спектр (ДУФС) комплексов ДНК, свидетельствующий о связывании этих ионов с основаниями, а также изменение оптической активности положительной полосы спектра КД ДНК (рис. 6). В отличие от ионов переходных металлов ионы  $Mg^{2+}$  не взаимодействуют с азотистыми основаниями ДНК [6, 12]. Только при  $5 \cdot 10^{-3}$  М  $Ca^{2+}$  в растворе, содержащем  $10^{-3}$  М  $Na^+$ , можно наблюдать ДУФС ДНК в комплексе с ионами  $Ca^{2+}$ , а также значительное уменьшение оптической активности положительной полосы спектра КД, свидетельствующие о связывании  $Ca^{2+}$  с основаниями ДНК.

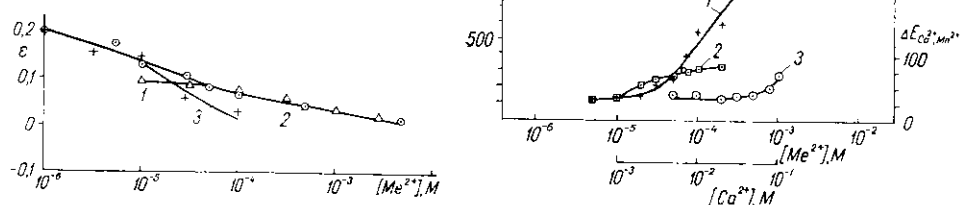


Рис. 5. Зависимости параметра исключенного объема ДНК от концентрации ионов  $Mn^{2+}$  и  $Cu^{2+}$  при разном содержании  $Na^+$ : 1 —  $Mn^{2+}$ ,  $2 \cdot 10^{-2}$  М  $Na^+$ ; 2 —  $Mn^{2+}$ ; 3 —  $Cu^{2+}$ ,  $10^{-3}$  М  $Na^+$

Fig. 5. The DNA excluded volume parameter dependences on  $Mn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  ion concentrations with different  $NaCl$  contents. 1 —  $Mn^{2+}$ ,  $2 \cdot 10^{-2}$  М  $Na^+$ ; 2 —  $Mn^{2+}$ ; 3 —  $Cu^{2+}$ ,  $10^{-3}$  М  $Na^+$

Рис. 6. Зависимости относительного изменения положительной амплитуды спектра КД (а) и положительной амплитуды ДУФС (б) в комплексе с ионами двухвалентных металлов от их концентрации в растворе при  $10^{-3}$  М  $Na^+$ : 1 —  $Cu^{2+}$ ; 2 —  $Mn^{2+}$ ; 3 —  $Ca^{2+}$

Fig. 6. Dependences of the relative change of the CD spectrum positive amplitude (a) and that of the UFDS (б) of DNA in complex with bivalent metal ions on their concentrations in solution at  $10^{-3}$  М  $Na^+$ . 1 —  $Cu^{2+}$ ; 2 —  $Mn^{2+}$ ; 3 —  $Ca^{2+}$

Анализ экспериментальных результатов показал [11], что ионы  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  могут взаимодействовать с гуанином ДНК, образуя хелаты типа  $N(7)-Me^{2+}-O(6)$ , а ионы  $Cu^{2+}$  — и с цитозином, формируя хелаты типа  $N(3)-Cu^{2+}-O(2)$ . При связывании с ионами  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  конформация ДНК изменяется в пределах В-семейства форм. Ионы  $Cu^{2+}$  вызывают особенно сильное изменение конформации ДНК и при  $[Cu^{2+}] > 4 \cdot 10^{-4}$  М в буферном и  $[Cu^{2+}] > 10^{-4}$  М в солевом растворах разрушают двухспиральное состояние биополимера при комнатных температурах. На основании полученных данных можно заключить, что уменьшение  $[\eta]$  ДНК и параметра исключенного объема  $\epsilon$  при взаимодействии с ионами  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  (при  $[Ca^{2+}] < 5 \cdot 10^{-3}$  М) происходит в результате экранирования фосфатных групп макромолекулы при непосредственном связывании двухвалентных ионов. В случае, когда  $[Ca^{2+}] \geq 5 \cdot 10^{-3}$  М, существенное уменьшение характеристической вязкости  $[\eta]$ , а также параметра  $\epsilon$  ДНК обусловлено связыванием  $Ca^{2+}$  с азотистыми основаниями, приводящими к более сильному подавлению внутримолекулярных взаимодействий и уменьшению объема макромолекулы.

Менее существенное уменьшение  $[\eta]$  ДНК и параметра исключенного объема  $\epsilon$  при взаимодействии со щелочноземельными ионами  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  (по сравнению с действием переходных ионов  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) вызвано их связыванием в основном с фосфатными группами, в то время как ионы  $Mn^{2+}$  и  $Cu^{2+}$  взаимодействуют одновременно и с азотистыми основаниями, что вызывает более сильное уменьшение характеристиче-

ской вязкости и дальних внутримолекулярных взаимодействий, определяемых величиной параметра  $\epsilon$ .

Таким образом, наблюдаемое в эксперименте уменьшение  $[\eta]$  ДНК при связывании ионов щелочноземельных и переходных металлов (при  $I \geq 10^{-3}$  М) сопровождается подавлением дальнего действия в макромолекуле в результате компенсации отрицательного заряда ДНК при равновесном связывании ионов, а при  $[Me^{2+}] \geq 5 \cdot 10^{-5}$  М — также и вследствие их экранирующего действия. При рассмотрении эффектов исключенного объема в области  $I < 2 \cdot 10^{-4}$  М и их вклада в изменение  $[\eta]$

ДНК при связывании  $Me^{2+}$  необходимо учитывать значительное возрастание изгибной жесткости макромолекул, а также влияние двухвалентных ионов на ее величину.

Количественный анализ влияния связывания двухвалентных ионов на величину  $[\eta]$  ДНК и параметра  $\epsilon$  можно провести при помощи теории равновесного связыва-

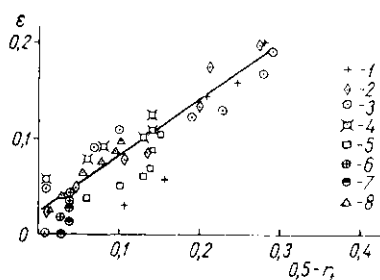
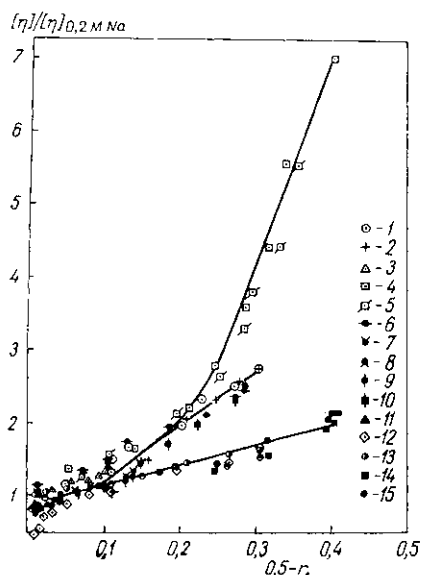


Рис. 7. Зависимости характеристической вязкости ДНК от величины  $(0,5 - r_t)$ : 1 —  $Mn^{2+}$ ; 2 —  $Cu^{2+}$  ( $[Na^+] = 10^{-3}$  М, м. м.  $19 \cdot 10^6$ ); 3 —  $Mn^{2+}$  ( $[Na^+] = 2 \cdot 10^{-2}$  М, м. м.  $12 \times 10^6$ ); 4 —  $Mn^{2+}$  ( $[Na^+] = 2 \cdot 10^{-4}$  М, м. м.  $19 \cdot 10^6$ ); 5 —  $Ca^{2+}$  ( $[Na^+] = 2 \cdot 10^{-4}$  М, м. м.  $13 \cdot 10^6$ ); 6 —  $Mg^{2+}$  ( $[Na^+] = 10^{-3}$  М, м. м.  $13 \cdot 10^6$ ); 7 —  $Mg^{2+}$  ( $[Na^+] = 10^{-2}$  М, м. м.  $13 \cdot 10^6$ ); 8 —  $Mg^{2+}$  ( $[Na^+] = 10^{-2}$  М, м. м.  $13 \cdot 10^6$ ); 9 —  $Ca^{2+}$  ( $[Na^+] = 10^{-2}$  М, м. м.  $19 \cdot 10^6$ ); 10 —  $Ca^{2+}$  ( $[Na^+] = 10^{-1}$  М, м. м.  $19 \cdot 10^6$ ); 11 —  $Ca^{2+}$  ( $[Na^+] = 10^{-1}$  М, м. м.  $19 \cdot 10^6$ ); 12 —  $Cu^{2+}$  ( $[Na^+] = 10^{-3}$  М, м. м.  $2,6 \cdot 10^5$ ); 13 —  $Mn^{2+}$  ( $[Na^+] = 10^{-3}$  М, м. м.  $2,6 \cdot 10^5$ ); 14, 15 —  $Mn^{2+}$  ( $[Na^+] = 2 \cdot 10^{-4}$  М, м. м.  $3,9 \cdot 10^5$  и  $2,1 \cdot 10^5$  соответственно)

Fig. 7. Dependences of the DNA intrinsic viscosity on the  $(0,5 - r_t)$  value: 1 —  $Mn^{2+}$ ; 2 —  $Cu^{2+}$  ( $[Na^+] = 10^{-3}$  M; m. w.  $19 \cdot 10^6$ ); 3 —  $Mn^{2+}$  ( $[Na^+] = 2 \cdot 10^{-2}$  M, m. w.  $12 \times 10^6$ ); 4 —  $Mn^{2+}$  ( $[Na^+] = 2 \cdot 10^{-4}$  M, m. w.  $19 \cdot 10^6$ ); 5 —  $Ca^{2+}$  ( $[Na^+] = 2 \cdot 10^{-4}$  M, m. w.  $13 \cdot 10^6$ ); 6 —  $Mg^{2+}$  ( $[Na^+] = 10^{-3}$  M, m. w.  $13 \cdot 10^6$ ); 7 —  $Mg^{2+}$  ( $[Na^+] = 10^{-2}$  M, m. w.  $13 \cdot 10^6$ ); 8 —  $Mg^{2+}$  ( $[Na^+] = 10^{-2}$  M, m. w.  $13 \cdot 10^6$ ); 9 —  $Ca^{2+}$  ( $[Na^+] = 10^{-2}$  M, m. w.  $19 \cdot 10^6$ ); 10 —  $Ca^{2+}$  ( $[Na^+] = 10^{-1}$  M, m. w.  $19 \cdot 10^6$ ); 11 —  $Ca^{2+}$  ( $[Na^+] = 10^{-1}$  M, m. w.  $19 \cdot 10^6$ ); 12 —  $Cu^{2+}$  ( $[Na^+] = 10^{-3}$  M, m. w.  $2,6 \cdot 10^5$ ); 13 —  $Mn^{2+}$  ( $[Na^+] = 10^{-3}$  M, m. w.  $2,6 \cdot 10^5$ ); 14, 15 —  $Mn^{2+}$  ( $[Na^+] = 2 \cdot 10^{-4}$  M, m. w.  $3,9 \cdot 10^5$  and  $2,1 \cdot 10^5$ , respectively)

Рис. 8. Зависимость параметров исключенного объема ДНК от величины  $(0,5 - r_t)$ : 1 —  $Cu^{2+}$ ; 2 —  $Mn^{2+}$ ; 3 —  $Ca^{2+}$ ,  $10^{-3}$  М Na<sup>+</sup>; 4 —  $Mg^{2+}$ ; 5 —  $Ca^{2+}$ ,  $10^{-3}$  М Na<sup>+</sup>; 6 —  $Mg^{2+}$ ; 7 —  $Ca^{2+}$ ,  $10^{-1}$  М Na<sup>+</sup>; 8 —  $Mn^{2+}$ ,  $2 \cdot 10^{-2}$  М Na<sup>+</sup>

Fig. 8. Dependences of the DNA excluded volume parameter on the  $(0,5 - r_t)$  value: 1 —  $Cu^{2+}$ ; 2 —  $Mn^{2+}$ ; 3 —  $Ca^{2+}$ ,  $10^{-3}$  M Na<sup>+</sup>; 4 —  $Mg^{2+}$ ; 5 —  $Ca^{2+}$ ,  $10^{-3}$  M Na<sup>+</sup>; 6 —  $Mg^{2+}$ ; 7 —  $Ca^{2+}$ ,  $10^{-1}$  M Na<sup>+</sup>; 8 —  $Mn^{2+}$ ,  $2 \cdot 10^{-2}$  M Na<sup>+</sup>

ния ионов и экспериментальных данных о константах связывания. Изучая действие степени связывания ионов  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  на  $[\eta]$  ДНК, использовали систему уравнений Скэтчарда для случая конкуренции ионов и учета антикооперативности связывания, примененную нами ранее для ионов  $Mn^{2+}$  и  $Cu^{2+}$  [4]. При вычислении степени связывания  $r_t$  значение константы связывания для ионов  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  было заим-

ствовано из работы [13], а значение параметра  $\omega$ , характеризующего электростатическую энергию отталкивания связанных с ДНК  $\text{Me}^{2+}$ , — из [6]. Полученные зависимости  $[\eta]$  ДНК и параметра исключенного объема  $\epsilon$  от степени связывания ионов щелочноземельных металлов  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  представлены на рис. 7 и 8, где они сравниваются с аналогичными зависимостями для ионов переходных металлов  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ . Величина  $(n-r_i)$  (где  $n$  — число возможных мест связывания, приходящихся на нуклеотид и для ДНК равно 0,5 [3, 6, 12, 13]) пропорциональна эффективному среднему заряду сегмента. При значениях  $(0,5-r_i) < 0,2$  зависимость характеристической вязкости имеет универсальный характер. Сильное возрастание  $[\eta]$  ДНК при  $2 \cdot 10^{-4}$  М  $\text{Na}^+$  обусловлено существенным увеличением статистического сегмента ДНК в этой области  $l$  [7, 8] вследствие усиления ближних внутримолекулярных электростатических взаимодействий заряженных групп макромолекул при малых степенях экранирования. В возрастание величины  $[\eta]$  при  $r_i < 0,2$  также вносит вклад и дальное действие, характеризуемое параметром  $\epsilon$ . Зависимость параметра исключенного объема ДНК от величины  $(0,5-r_i)$  является универсальной для различных ионов и имеет линейный характер. Характер этой зависимости обусловлен пропорциональностью  $\epsilon$  параметру  $z$ , линейно зависящему от заряда мономерной единицы макромолекулы и характеризующему средний эффективный потенциал взаимодействия сегментов [14].

Вычисление степени связывания двухвалентных ионов в соответствии с теорией Мэннинга [15] привело в условиях  $[\text{Na}^+] = 2 \cdot 10^{-4}$  М к изменению величины  $r_i$  от 0,40 при  $[\text{Me}^{2+}] = 5 \cdot 10^{-6}$  М до 0,44 при  $[\text{Me}^{2+}] = 5 \cdot 10^{-3}$  М. Столь малое изменение степени связывания не может объяснить значительного уменьшения характеристической вязкости ДНК, наблюдаемого в эксперименте. Как показано в работе [16], эта теория имеет ограниченную область применимости и дает точные результаты при низких ионных силах только при рассмотрении ситуации вдали от полииона.

Универсальные зависимости характеристической вязкости ДНК и параметра исключенного объема от степени связывания различных ионов металлов свидетельствуют в пользу того, что связанные с макромолекулой ионы, а не входящие в диффузное облако, определяют структуру раствора вблизи биополимера и его конформационное состояние.

За многочисленные и плодотворные обсуждения и стимулирующий интерес к данной работе авторы выражают благодарность Э. В. Фрисман, М. Д. Франк-Каменецкому и В. И. Иванову.

#### EFFECT OF ALKALI-EARTH AND TRANSITION METAL IONS ON HYDRODYNAMIC AND MACROMOLECULAR PARAMETERS OF DNA

*S. V. Kornilova, A. G. Shkorbatov, Yu. P. Blagoi*

Institute for Low Temperature Physics and Engineering,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kharkov

#### S u m m a r y

DNA intrinsic viscosity  $[\eta]$  and the excluded volume parameter  $\epsilon$  are stated to depend on the concentrations and the binding degrees of  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ions with different NaCl contents ( $2 \cdot 10^{-4}$ – $10^{-1}$  М). The substantial changes of the  $[\eta]$  value and the parameter  $\epsilon$  in the presence of small contents of bivalent metal ions are shown to be due to the ion binding to the phosphate groups and nitrogen bases of DNA. Bivalent ion ( $\text{Me}^{2+}$ )-DNA binding results in the suppression of long-range effects in a macromolecule with concentrations by some orders of magnitude lower than those in the case of monovalent ions. The effect of transition metal ions ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) on the value and the excluded volume parameter is greater than that of the alkali-earth ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) ones due to their binding not only to DNA phosphate groups but also to the nitrogen bases even with small concentrations ( $5 \cdot 10^{-6}$  М). The intrinsic viscosity and the excluded volume parameter are shown to depend universally on the binding degree of bivalent ions.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Благой Ю. П., Корнилова С. В., Сохан В. И.* Изучение изменения характеристической вязкости ДНК при взаимодействии с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  // Молекуляр. биология.— 1982.—16, № 1.— С. 210—216.
2. *Bivalent metal ion effects on chain stiffness and excluded volume of DNA / Yu. P. Blagoi, S. V. Kornilova, A. G. Shkorbatov, S. A. Egupov* // Stud. biophys.— 1985.—108, N 1.— P. 17—24.
3. *Reuben J., Gabbay E.* Binding of manganese (II) to DNA and the competitive effects of metal ions and organic cations. An electron paramagnetic resonance study // Biochemistry.— 1975.—14, N 6.— P. 1230—1235.
4. *Kornilova S. V., Blagoi Yu. P., Shkorbatov A. G.* Metal ion effect on molecular sites and intermolecular interaction in DNA // Water and ions in biol. syst.— New York: Plenum press, 1985.—856 p.
5. *Исследование влияния ионов  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  на конформацию молекулы ДНК / Н. А. Косьяненко, Г. Сэзьман-Хусейн Соса, В. Н. Уверский, Э. В. Фрисман* // Молекуляр. биология.— 1987.—21, № 1.— С. 140—144.
6. *Clement R. M., Strum J., Daune M. P.* Interaction of metallic cations with DNA. 6. Specific binding of  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  // Biopolymers.— 1973.—12, N 2.— P. 405—421.
7. *Фрисман Э. В.* Оптическое и гидродинамическое поведение ДНК и ее комплексов с биологически активными молекулами // IV Междунар. биофиз. конгр.: Тез. докл.— Пушкино, 1973.— Т. 1.— С. 301.
8. *Hagerman P. I.* Investigation of the flexibility of DNA using transient electric birefringence // Biopolymers.— 1983.— 20, N 4.— P. 1503—1535.
9. *Франк-Каменецкий М. Д.* Флуктуационная подвижность ДНК // Молекуляр. биология.— 1983.—17, № 3.— С. 539—652.
10. *Ross P. D., Scruggs R. L.* Viscosity study of DNA. II. The effect of simple salt concentration of the viscosity of high-molecular weight DNA and application of viscometry to the study of DNA isolated from TH and TS bacteriophage mutants // Biopolymers.— 1968.—6, N 4.— P. 1005—1018.
11. *Влияние ионов металлов на структуру ДНК разного молекулярного веса / Ю. П. Благой, С. В. Корнилова, В. А. Сорокин, А. Г. Шкорбатов* // Stud. biophys.— 1986.—114, N 1/3.— С. 263—268.
12. *Благой Ю. П., Сорокин В. А., Валеев В. А.* Спектральное исследование связывания оснований ДНК с ионами магния и кальция // Молекуляр. биология.— 1980.—14, № 3.— С. 595—605.
13. *Zimmer Ch.* Binding von Divalent Metallionen un Nucleinsäuren und Wirkungen auf die Konformation der Deoxyribonucleinsäure // Zeitschrift Chem.— 1971.—11, N 12.— P. 441—458.
14. *Лифшиц И. М., Гросберг А. Ю., Хохлов А. Р.* Объемные взаимодействия в статистической физике полимерных макромолекул // Успехи физ. наук.— 1979.—127, № 3.— С. 353—388.
15. *Manning G. S.* The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides // Quart. Rev. Biophys.— 1978.—11, N 2.— P. 179—246.
16. *Лукашин А. В., Анишелевич В. В., Франк-Каменецкий М. Д.* Современное состояние теории сильно заряженных полиэлектролитов типа ДНК.— Пушкино, 1985.— 29 с.
17. *Расчет характеристической вязкости синтетических и биологических полиэлектролитов различной жесткости / С. В. Слонцкий, Э. В. Фрисман, А. К. Валеев и др.* // Молекуляр. биология.— 1980.—14, № 3.— С. 484—495.
18. *Reinert K. E., Geller K.* Interactions of different substances with polyelectrolyte DNA // Stud. biophys.— 1968.—30, N 10.— С. 65—73.

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

Получено 11.05.89

УДК 577.963.32;539.199

**С. Н. Волков, А. М. Косевич, Г. Е. Вайнреб**

## ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ

## НИЗКОЧАСТОТНЫХ КОЛЕБАНИЙ МАКРОМОЛЕКУЛ ДНК

*Исследованы колебания структурных элементов полинуклеотидной цепи относительно равновесной конформации двутяжевых ДНК. В рассмотрение включены относительные движения нуклеотидов, связанных попарно водородными связями, изгибания полинуклеотидных цепей и внутринуклеозидная подвижность. Выполнен анализ нормальных колебаний двутяжевой цепи и определена структура низкочастотного спектра колебаний ДНК. Используя теоретические результаты и их согласие с данными спектроскопии комбинационного рассеяния (КР), предложена интерпретация наблюдаемых особенностей в спектрах низкочастотных колебаний ДНК.*