

# Влияние ионов $\text{Cd}^{2+}$ на конформационное равновесие трехцепочечного полинуклеотида полиU полиA полиU в условиях, близких к физиологическим

В. А. Сорокин, В. А. Валеев, Е. Л. Усенко, Ю. П. Благой

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

sorokin@ilt.kharkov.ua

*Методом дифференциальной УФ-спектроскопии изучено влияние ионов  $\text{Cd}^{2+}$  на конформационное равновесие трехцепочечного полинуклеотида полиU полиA полиU (0,1 М  $\text{Na}^+$ , рН 7). Показано, что эти ионы не связываются с гетероатомами азотистых оснований полиA и полиU, находящихся в составе тройной (A2U) и двойной (AU) спиралей, и не изменяют их конформации. Нагревание A2U индуцирует два последовательных процесса: первый соответствует отделению от A2U одной нити полиU, то есть реализации перехода 3 → 2, второй – более кооперативному плавлению AU, т. е. переходу 2 → 1. Концентрационные зависимости температур плавления, соответствующие этим процессам, имеют точку пересечения ( $T_m = 60^\circ\text{C}$ ; концентрация  $\text{Cd}^{2+} = 3,5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ ), при которой термостабильности A2U и AU становятся одинаковыми. Теоретические расчеты концентрационных зависимостей ( $T_m$ )<sub>3 → 2</sub> показали, что наилучшее согласие между опытом и теорией наблюдается при энтальпии перехода  $H_{3 → 2} = 5 \text{ ккал моль}^{-1} \text{ триплет}^{-1}$ .*

*Ключевые слова:* ионы металлов, трехцепочечные полинуклеотиды, конформационные переходы.

**Введение.** Загрязнение окружающей среды солями тяжелых металлов [1–3], основным источником которого являются химические и металлургические предприятия интенсивно развивающихся стран (Индия, Китай) с характерным для них низким уровнем экологических контроля и защиты, составляет одну из самых важных экологических проблем. К наиболее токсичным металлам относится кадмий [1, 4]. По данным [1], скорость его поступления в окружающую среду во второй половине 20-го века непрерывно возрастала и в 80-е гг. про-

шлого столетия концентрация кадмия в дождевой воде вблизи предприятий цветной металлургии на два порядка превосходила его концентрацию в гидросфере Земли. Особую опасность представляет загрязнение вод при аварийных ситуациях. Так, в результате аварии, имевшей место в Юго-восточном Китае в конце 2005 года, концентрация кадмия в речной воде в десятки раз превысила предельно допустимую. Попадание солей тяжелых металлов из рек в Мировой океан представляет особую опасность из-за постоянно увеличивающегося потребления населением в качестве продуктов питания

морских организмов, способных накапливать металлы в процессе своей жизнедеятельности.

Известно, что ионы металлов, имеющие d-электроны на внешних орбиталях (d-ионы), способны образовывать специфические комплексы с гетероатомами азотистых оснований нуклеиновых кислот [5], вследствие чего появляются ошибки при синтезе полинуклеотидных последовательностей [6]. Последнее может приводить к нарушению нормального функционирования генетического и регуляторного аппаратов клеточных и субклеточных организмов, что проявляется, в частности, в возникновении у солей никеля и кадмия мутагенной и канцерогенной активности [1, 6]. При этом хром и никель обладают максимальным индексом канцерогенности [7], а Международное агентство по исследованию раковых заболеваний отнесло кадмий к человеческим канцерогенам первой категории [4].

В связи с этим по-прежнему актуальным остается изучение комплексов d-ионов с биологически функциональными макромолекулами различного уровня структурной организации. Сравнительно недавно было установлено, что такой функциональностью обладают трехнитчатые олиго- и полинуклеотиды, структура которых остается стабильной в физиологических условиях (0,1 М  $Mt^+$ , pH 7) [8]. Интерес к этим структурам обусловлен также возможностью их использования при лечении вирусных (включая СПИД [9]) и онкологических [9, 10] заболеваний.

Экспериментальных данных о комплексах триплексов с d-ионами очень мало. В настоящее время получены диаграммы конформационного равновесия для комплексов ионов  $Ni^{2+}$  с трехцепочечными полинуклеотидами полиАполиАполиГ [11] и полиУполиАполиУ (A2U) [12]. Однако в последнем случае [12] влияние ионов  $Ni^{2+}$  на температуры конформационных переходов рассмотрено только при низких ионных силах раствора ( $[Na^+] = 0,03$  М). Подобная информация для ионов  $Cd^{2+}$  отсутствует.

Основываясь на вышеизложенном, цель настоящей работы состояла в получении данных о влиянии температуры и концентрации ионов  $Cd^{2+}$  на структуру и стабильность трехцепочечной A2U при высокой ионной силе раствора (0,1 М  $Na^+$ ), близкой

к содержанию ионов  $Mt^+$  в клетке и потому представляющей наибольший интерес.

**Материалы и методы.** Трехцепочечные A2U получали длительной (не менее месяца) выдержкой при температуре 4 °С в буферном растворе (0,001 М какодилат натрия, pH 7; 0,099 М NaCl) эквивалентного раствора двухцепочечного полинуклеотида полиАполиУ (AU) и калиевой соли одноцепочечной полиУ. Чтобы процесс образования A2U прошел достаточно полно, растворы полинуклеотидов имели довольно большую концентрацию фосфора (Р 0,008–0,01 М). Перед измерениями раствор разбавляли до Р (2–3)  $10^{-5}$  М. Величину Р определяли по значениям молярных коэффициентов экстинкции A2U и AU в максимумах поглощения [12].

Концентрацию ионов  $Cd^{2+}$  ( $[Cd^{2+}]$ ), вводимых в раствор непосредственно перед измерениями в виде солей  $CdCl_2 \cdot 0,5 H_2O$  («Реахим», РФ), определяли по массе и дополнительно контролировали комплексометрическим методом. Ошибка определения  $[Cd^{2+}]$  и Р не превышала 0,5 %. Несмотря на довольно большое значение pH, в изученном диапазоне концентраций ионов  $Cd^{2+}$  (до 0,001 М) образованием их гидроокисей можно пренебречь [13]. Все полинуклеотиды, изготовленные фирмой «Sigma» (США), дополнительной очистке не подвергали.

Кривые плавления A2U, то есть зависимости изменения оптической плотности растворов от температуры ( $A(T)$ ) при волновом числе  $\nu = 38500$   $cm^{-1}$ , а также дифференциальные УФ спектры (ДУФ), то есть зависимости  $A(\nu)$  ( $\nu$  – волновое число) при температуре  $T_0 = 20 \pm 2$  °С, измеряли соответственно на спектрофотометрах UV-VIS и M40 («Carl Zeiss Jena», ФРГ). Запись кривых плавления A2U в форме  $h(T) = A(T)/A_{T_0}$ , где  $A_{T_0}$  – оптическая плотность раствора при  $T = T_0$ , а также их производных  $dh(T)/dT$  осуществляли с помощью персональных компьютеров. Температуры плавления ( $T_m$ ), соответствующие переходу в новую конформацию примерно половины звеньев полинуклеотида, определяли по положению максимумов на зависимостях  $dh(T)/dT$ . Кривые плавления получали с использованием дифференциальной схемы: две кюветы, расположенные в рабочем и эталонном каналах спектрофотометра, содержали идентичные растворы,

имевшие одинаковые концентрации полинуклеотида и ионов  $\text{Cd}^{2+}$ . Эталонную кювету термостатировали при  $T = T_0$  в пределах  $\pm 0,5$  °C, а рабочую – медленно нагревали со скоростью 0,25 град/мин, чтобы обеспечить равновесное состояние полимера при каждой температуре. ДУФ-спектры A2U и AU, индуцированные ионами  $\text{Cd}^{2+}$ , измеряли, используя четырехкюветную схему, компенсирующую собственное поглощение полинуклеотидов и ионов в обоих каналах спектрофотометра.

**Результаты и обсуждение.** В настоящее время однозначно установлено, что наиболее предпочтительным типом комплексов большинства d-ионов с нуклеотидами (NMP) пуриновых оснований (AMP, GMP, IMP) являются так называемые макрохелаты [14]. В этих комплексах ионы одновременно внутрисферно связаны с N7 пуринового кольца и внешнесферно (то есть через одну из молекул октаэдрической гидратной оболочки ионов) – с атомом кислорода фосфатной группы. Формированию подобных структур способствует как энергетическая выгода хелатирования, так и структурная, обусловленная анти-конформацией сахарного кольца [15]. Дикатионы d-ионов способны связываться также только с атомами кислорода фосфатных групп, поскольку NMP являются дианионами. Последний тип взаимодействия предпочтителен для комплексов NMP с ионами щелочно-земельных металлов, а также для комплексов d-ионов с пиримидиновыми нуклеотидами [14, 16]. В случае производных урацила d-ионы могут взаимодействовать также с N3 и/или O4 азотистого основания [5, 17]. Однако это взаимодействие является слабым [16].

Внутрисферное взаимодействие d-ионов с гетероатомами азотистых оснований вызывает изменение положения и интенсивности их полос поглощения и, как следствие, появление ДУФ-спектров определенной формы. Их обнаружение в случае комплексов одноцепочечных полиА и полиU с ионами  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Cd}^{2+}$  [12, 18] свидетельствует о наличии их взаимодействия с N7 (в форме макрохелатов) и N1 полиА, а также O4 и N3 полиU.

Оказалось, однако, что при 0,1 М  $\text{Na}^+$  изменение спектра поглощения A2U в присутствии ионов  $\text{Cd}^{2+}$  не превышает  $80 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (то есть находится в пределах ошибки измерения) вплоть до 0,02 М  $\text{Cd}^{2+}$ .

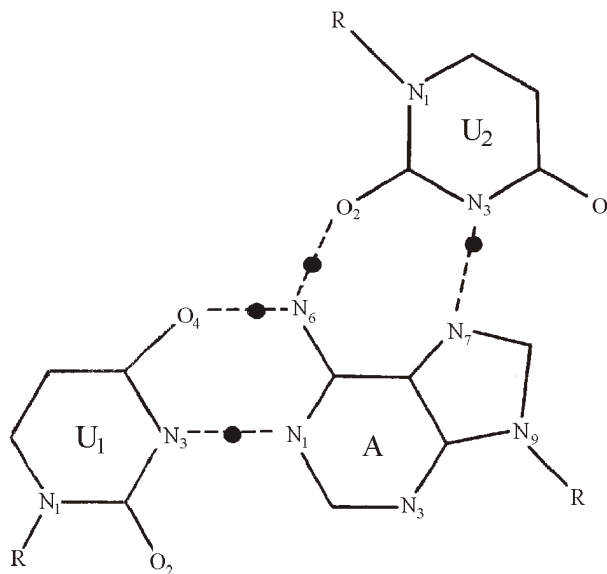


Рис. 1. Структура триплета U-A-U [19]. Пара (U<sub>1</sub>-A) Уотсон-Криковская; (A-U<sub>2</sub>) обратная Хугстиновская

Это означает, что при  $T = T_0$  кадмий не связывается с гетероатомами азотистых оснований полиА и полиU в составе тройной спирали A2U и не изменяет ее конформации. Этот результат кажется естественным, поскольку в структуре триплета U-A-U (рис. 1) потенциально возможные для связывания атомы N7 и N1 полиА, а также N3 двух цепей полиU включены в систему водородных связей, что делает их недоступными для взаимодействия с ионами  $\text{Cd}^{2+}$ , а также, по-видимому, другими d-ионами. Возможное же в принципе взаимодействие кадмия с O4 (рис. 1) не реализуется в этом диапазоне концентраций из-за очень слабых контактов их ионов с урацилом полиU [18].

Примечательно, однако, что при 0,1 М  $\text{Na}^+$  и  $T = T_0$  ионы  $\text{Cd}^{2+}$  не изменяют также спектров поглощения двухспиральной полиАполиU вплоть до 0,003 М  $\text{Cd}^{2+}$ , хотя в этом случае наиболее активные для связывания атомы N7 полиА, казалось бы, открыты для взаимодействия. Этот результат качественно согласуется с данными, полученными ранее [12], согласно которым с N7 AU не взаимодействуют также ионы  $\text{Ni}^{2+}$ .

Причина малой чувствительности AU-пар полиАполиU к присутствию в растворе d-ионов, очевидно, состоит в следующем. Согласно данным

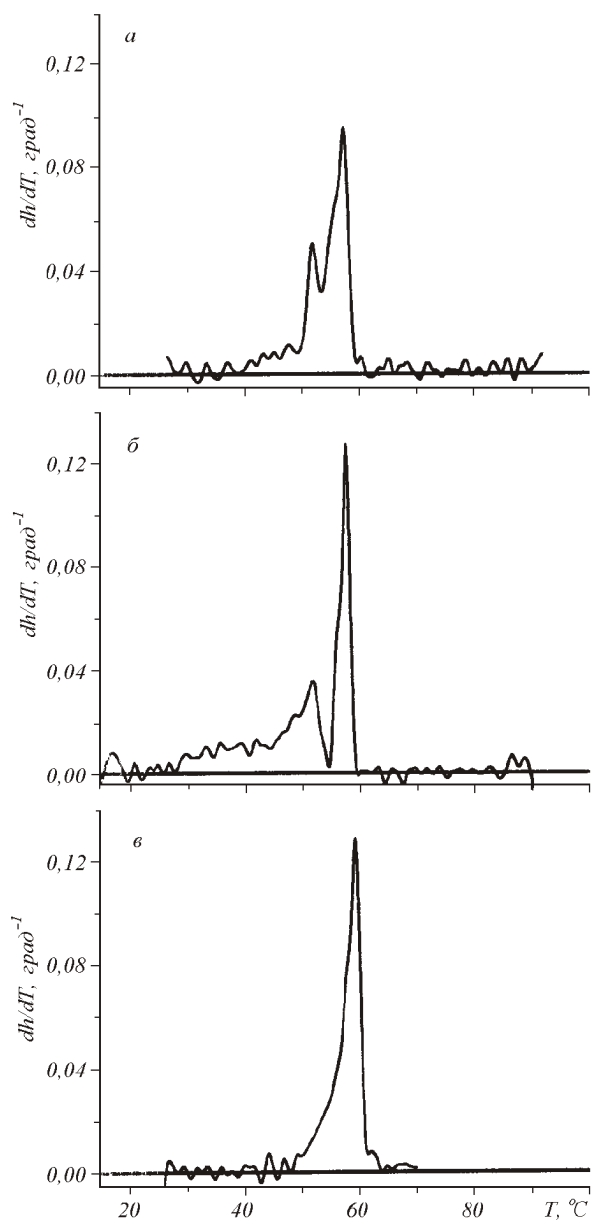


Рис. 2. Дифференциальные кривые плавления А2U (0,1 М Na<sup>+</sup>, рН 7): а – [Cd<sup>2+</sup>] = 0; б – 3,5·10<sup>-5</sup> М Cd<sup>2+</sup>; в – 3,5·10<sup>-4</sup> М Cd<sup>2+</sup>

[20–22], образование макрохелатов осуществляется за счет изменения конформации одноцепочечных полинуклеотидов, приводящего к образованию коротких петель длиной 4–5 нуклеотидов [20]. Это связано с тем, что длины статистического сегмента ( $\bar{a}$ ) и поперечного размера (D) в одноцепочечных спиральных соизмеримы (D  $\bar{a}$  2 нм) [23]. В двухнитчатых полинуклеотидах D = 2 нм,  $\bar{a}$  100 нм [23]. Большая жесткость их молекул делает невозможным формирование подобных петель, что,

Таблица 1  
Температуры плавления А2U (0,1 М Na<sup>+</sup>, рН 7) в отсутствие ионов Мt<sup>2+</sup>

Переход	Т <sub>мо</sub> , °С		
	Настоящая работа	[26]	[27]
3 2	50,3±2	50,8	55,5
2 1	56,6±1,5	56	57,7

по-видимому, препятствует образованию макрохелатов. Взаимодействие d-ионов только с атомами N7, моделируемое их взаимодействием с N7 аденозина (Ado), должно быть слабым. Действительно, константы связывания ионов Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> и Cd<sup>2+</sup> с N7 AMP в форме макрохелатов равны соответственно 310, 1380 и 480 М<sup>-1</sup> [14], тогда как константы связывания ионов Ni<sup>2+</sup> и Cu<sup>2+</sup> с Ado – соответственно 8 и 20 М<sup>-1</sup> [24], то есть в 40 и 70 раз меньше.

**Фазовые диаграммы.** В соответствии с данными [25–27], нагревание А2U в отсутствие ионов Мt<sup>2+</sup> индуцирует два последовательных процесса (рис. 2). Первый интенсивный максимум на дифференциальной кривой плавления соответствует отделению от А2U одной нити полиU (U<sub>2</sub>) (рис. 1), то есть реализации перехода А2U → AU+U (переход 3 2), второй интенсивный максимум – плавлению AU, то есть более кооперативному переходу 2 1 (U+ → UA → U+A+U).

Хотя при различных приготовлениях растворов соответствующие значения Т<sub>мо</sub> отличались довольно существенно: (Т<sub>мо</sub>)<sub>3 2</sub> = 50,3±2 °С; (Т<sub>мо</sub>)<sub>2 1</sub> = 56,6±1,5 °С, они удовлетворительно согласуются с данными других авторов, полученными при 0,1 М Na<sup>+</sup> (табл. 1).

Как видно из данных рис. 3, зависимости (Т<sub>м</sub>)<sub>3 2</sub> и (Т<sub>м</sub>)<sub>2 1</sub> от концентрации ионов Cd<sup>2+</sup> пересекаются в точке, отвечающей критической концентрации ([Cd<sup>2+</sup>]<sub>кр</sub> = 3,5·10<sup>-4</sup> М) и температуре (Т<sub>м</sub>)<sub>кр</sub> = 60 °С. Таким образом, при [Мt<sup>2+</sup>] = [Мt<sup>2+</sup>]<sub>кр</sub> термостабильности А2U и AU становятся одинаковыми (рис. 3) и при нагревании А2U реализуется только один переход А2U → U+A+U (переход 3 1) (рис. 2, в). Получить зависимость (Т<sub>м</sub>)<sub>3 1</sub> от [Cd<sup>2+</sup>] нам не удалось из-за сильной деформации кривых плавления,

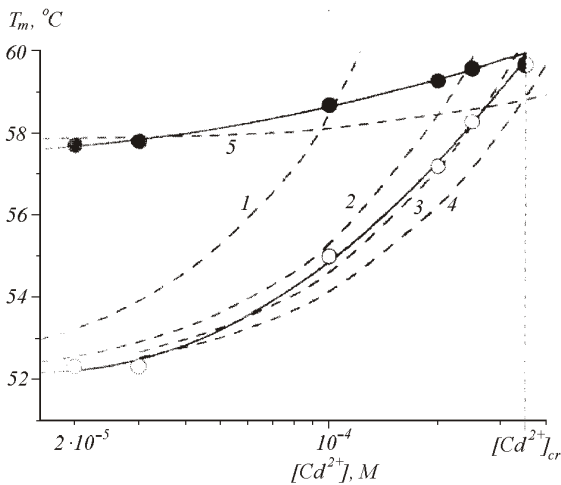


Рис. 3. Фазовая диаграмма комплекса A2U с ионами Cd<sup>2+</sup> (0,1 M Na<sup>+</sup>, pH 7). T<sub>m</sub> – температура конформационного перехода. Светлые и заштрихованные кружки относятся соответственно к переходам 3 → 2 и 2 → 1; сплошные линии – экспериментальные зависимости T<sub>m</sub>([Cd<sup>2+</sup>]), рассчитанные по методу наименьших квадратов; штриховые – зависимости T<sub>m3 → 2</sub> от [M<sup>2+</sup>] (1–4) и (T<sub>m2 → 1</sub>)<sub>P</sub> от [M<sup>2+</sup>] (5), рассчитанные по формулам (1)–(6)

обусловленной частичным осаждением металлокомплексов одонитчатой полиА в области конформационного перехода.

Из результатов, представленных на рис. 3, видно также, что изменение (T<sub>m</sub>)<sub>2 → 1</sub> A2U при повышении концентрации ионов Cd<sup>2+</sup> до 3·10<sup>-4</sup> M находится в пределах 2 °C, тогда как в том же концентрационном диапазоне (T<sub>m</sub>)<sub>3 → 2</sub> увеличивается на 8 °C. Эти особенности формы полученной фазовой диаграммы можно объяснить, сравнив экспериментальные концентрационные зависимости T<sub>m</sub> с рассчитанными по теории равновесного связывания [11, 12, 28].

Для случая двух независимых типов связывания ионов с полинуклеотидом (фосфатами – индекс Р и азотистыми основаниями – индекс N) эта зависимость имеет вид [28]

$$T_m([M^{2+}]) = T_{m0} + T_m([M^{2+}]) - T_{m0} \frac{RT_{m0} T_m}{H} \ln \left( \frac{P}{N} \right), \quad (1)$$

где T<sub>m0</sub> = T<sub>m</sub> при [M<sup>2+</sup>] = 0; H – энтальпия конформационного перехода.

Для перехода 3 → 2

$$\frac{P}{N} = \left[ \frac{(1 - K_3 A_f)^{2n_3}}{(1 - K_2 A_f)^{n_2} (1 - K_U A_f)^{n_U}} \right], \quad (2)$$

Здесь K – константы связывания; n – стехиометрия комплекса (количество ионов, приходящееся на одно место связывания). Индексы 3 и 2 относятся к связыванию ионов соответственно с A2U и AU; индекс U – с одноцепочечной полиU; A<sub>f</sub> – концентрация свободных ионов

$$A_f = [M^{2+}] - A_b, \quad (3)$$

где

$$A_b = \sum_{P,N} [P (C_3 n_3)^3 (C_2 n_2)^2 (C_U n_U)^U]. \quad (4)$$

Здесь  $\theta$  – доля звеньев полинуклеотидов, находящихся в соответствующей конформации при T = T<sub>m</sub> (табл. 2); C – степень заполнения мест связывания, которую можно рассчитать по формуле C = KA<sub>f</sub> / (1 + KA<sub>f</sub>).

Согласно данным настоящей работы, ионы Cd<sup>2+</sup> связываются только с фосфатами A2U и AU, а их взаимодействие с урацилом полиU является очень слабым (K<sub>N</sub> < 100 M<sup>-1</sup>) [18]. В связи с этим можно считать, что для перехода 3 → 2 в формуле (1) N = 1. Константы связывания ионов Cd<sup>2+</sup> с фосфатами A2U, AU и составляющими их одноцепочечными полинуклеотидами неизвестны. Однако взаимодействие катионов с отрицательно заряженными атомами кислорода фосфатов является чисто кулоновским и определяется лишь величиной взаимодействующих зарядов. Исходя из этого при расчете зависимости (T<sub>m</sub>)<sub>3 → 2</sub> от [Cd<sup>2+</sup>] можно воспользоваться значениями K, полученными для ионов Mg<sup>2+</sup> (табл. 2). Из условия компенсации ионами M<sup>2+</sup> зарядов на фосфатах полинуклеотидов полагали, что n<sub>3</sub> = n<sub>2</sub> = n<sub>U</sub> = 0,5 [29]. Расчет показывает, что из-за малых величин P и K концентрация A<sub>b</sub> не превышает 2 % от [Cd<sup>2+</sup>], так что в пределах этой величины A<sub>f</sub> = [Cd<sup>2+</sup>].

Как следует из формул (1, 2), величина изменения (T<sub>m</sub>)<sub>3 → 2</sub>, кроме K и n, существенно зависит от величины (H)<sub>3 → 2</sub>, значения которой, определенные методами дифференциальной сканирующей (ДСК) и изотермической титрующей калориметрий (ИТК), находятся в пределах 2–4,2 ккал/моль [27, 30], то есть отличаются на краях разброса значений (H)<sub>3 → 2</sub> в два раза. Причина этого может быть связана с недостаточной равновесностью перехода 3 → 2 при быстром нагревании раствора (этот процесс бо-

Таблица 2

Параметры уравнений (1)-(6) [29]

Переход	Доля звеньев				M <sup>-1</sup>				ккал моль <sup>-1</sup> триплет <sup>-1</sup>	ккал моль <sup>-1</sup> пар <sup>-1</sup>
	A2U 3	AU 2	A	U	K <sub>A2U</sub> K <sub>3</sub>	K <sub>AU</sub> K <sub>2</sub>	K <sub>A</sub>	K <sub>U</sub>	H <sub>3 2</sub>	H <sub>2 1</sub>
A2U AU+U (3 2)	1/2	1/3	0	1/6	1000	345	200	250	2,1 [27]; 4; 5; 6	–
AU+U A+U+U (2 1)	0	1/3	1/6	1/2	–	–	–	–	–	8,2

Примечание. – доля звеньев полинуклеотидов, находящихся в соответствующей конформации при T = T<sub>m</sub>. Индексы 3 и 2 относятся соответственно к A2U и AU; индексы A и U – соответственно к одноцепочечным полиA и полиU. K – константы связывания ионов Mg<sup>2+</sup>; H – энтальпия соответствующих переходов; P = 3·10<sup>-5</sup> M, (n<sub>A</sub>)<sub>P</sub> = 0,5 [29].

лее медленный, чем переход 2 1 [30]), с влиянием агрегации, сложностью учета влияния нулевой линии на расчет величины теплового эффекта при использовании метода ДСК, с разной конформацией одноцепочечных полинуклеотидов при низкой и высокой температурах (последнее относится к полиA и полиC, которые при T = T<sub>0</sub> на 50–60 % спирализованы [31]). Различия в значениях (H)<sub>3 2</sub>, найденных из температурных зависимостей констант равновесия (метод Вант-Гоффа: d lnK/d(1/T) = – H/R) еще больше и находятся в пределах от 2 до 8 ккал/моль [30].

Полученные нами фазовые диаграммы позволяют уточнить значение (H)<sub>3 2</sub> для A2U, используя формулы (1)–(4). Концентрационная зависимость (T<sub>m</sub>)<sub>3 2</sub> рассчитана для четырех значений H<sub>3 2</sub>, равных 2, 4, 5 и 6 ккал моль<sup>-1</sup> триплет<sup>-1</sup>. Видно, что наилучшее согласие между опытом и теорией наблюдается при H<sub>3 2</sub> = 5 ккал моль<sup>-1</sup> триплет<sup>-1</sup>. Это значение хорошо согласуется с величиной H<sub>3 2</sub> = 5,3 ккал моль<sup>-1</sup> триплет<sup>-1</sup>, следующей из анализа фазовой диаграммы (T<sub>m</sub> = f([Na<sup>+</sup>])) полиAполиU [32], и значениями H<sub>3 2</sub> = 4,6 и 4,9 ккал моль<sup>-1</sup> триплет<sup>-1</sup>, найденными соответственно для триплета ГАТ (метод ИТК) [33] и олигонуклеотида dA<sub>15</sub>–2dT<sub>10</sub> (расчет с использованием модели «застежка молния», соответствующий большим значениям константы нуклеации [34]).

Для перехода 2 1 формулы (2) и (4) имеют вид:

$$P \cdot N \left[ \frac{(1 - K_2 A_f)^{2n_3}}{(1 - K_U A_f)^{n_U} (1 - K_A A_f)^{n_A}} \right]_P \left[ \frac{1}{(1 - K_A A_f)^{n_A}} \right]_N; \quad (5)$$

$$A_b^{P,N} [P (C_2 n_2 C_A n_A C_U n_U)], \quad (6)$$

где K<sub>A</sub> и n<sub>A</sub> – параметры связывания ионов Mt<sup>2+</sup> с одноцепочечной полиA.

Достаточно надежно в этом случае можно рассчитать только составляющую [(T<sub>m</sub>)<sub>2 1</sub>]<sub>P</sub>, обусловленную связыванием ионов с фосфатами (табл. 2), поскольку для ионов Cd<sup>2+</sup> (K<sub>A</sub>)<sub>N</sub> и (n<sub>A</sub>)<sub>N</sub> неизвестны. Однако оказалось, что при учете только фосфатной составляющей T<sub>m</sub> расчетная и экспериментальная зависимости (T<sub>m</sub>)<sub>2 1</sub> от [Mt<sup>2+</sup>] согласуются в пределах одного градуса. Причина малого влияния связывания ионов Cd<sup>2+</sup> с аденином одноцепочечной полиA на понижение термостабильности A2U состоит, по-видимому, в том, что n<sub>AN</sub> < 1/2. Действительно, как уже отмечалось выше, взаимодействие ионов Cu<sup>2+</sup> с одноцепочечной полиC, структура которой подобна структуре одноцепочечной полиA [31], приводит к образованию петель длиной 4–5 нуклеотидов [20], что соответствует значению n = 0,2–0,25. Кроме того, согласно [35], для комплексов ионов Ni<sup>2+</sup> с одноцепочечной полиA n = 0,26.

Если предположить, что для ионов Cd<sup>2+</sup> n<sub>AN</sub> также равно 0,2 (K<sub>AN</sub> = 1000 M<sup>-1</sup> [18]), то ((T<sub>m</sub>)<sub>2 1</sub>)<sub>N</sub> = –1,3 °C – значение, находящееся в пределах стандартной ошибки определения T<sub>m</sub>, составляющей 2 °C.

Большая величина H<sub>2 1</sub> и малые различия в константах связывания ионов Cd<sup>2+</sup> с AU и одноцепочечными полиA и полиU приводят к тому, что ее термостабильность изменяется мало даже при отношении [Cd<sup>2+</sup>]/P = 10. Хотя различия между значе-

ниями  $K_3$  и  $K_1$  несколько больше, значительный вклад в повышение термостабильности A2U, индуцированное ионами  $Cd^{2+}$ , вносит меньшее по сравнению с величиной  $H_2$  значение  $H_3$ . Таким образом, различие между энтальпиями этих переходов является постоянным существенным фактором появления «критических» точек на фазовых диаграммах A2U в присутствии не только двух-, но и одновалентных ионов металлов [12, 26, 27, 29].

Полученные данные указывают на то, что структура жестких многоцепочечных полинуклеотидов, образованных как Уотсон-Криковскими, так и Хугстиновскими AU-парами, не позволяет d-ионам образовывать эффективные координационные связи с гетероатомами аденина и урацила вплоть до очень больших концентраций ионов. Следствием этого является конформационная и термическая устойчивость соответствующих пар и триплетов по отношению к этим ионам. Таким образом, их мутагенная и канцерогенная активности вряд ли могут быть обусловлены специфическим взаимодействием с AU- или AT-парами двухнитчатых РНК и ДНК живых организмов.

Более того, можно предположить, что консерватизм в передаче генетической информации молекулами ДНК и РНК при изменении условий существования организмов обеспечивается конформационной устойчивостью AT или AU-пар по отношению к действию не только d-ионов металлов, но и, по-видимому, других биологически активных веществ, тогда как альтернативный процесс эволюции – их взаимодействием с парами азотистых оснований, содержащими 6-оксопурины (гуанин или гипоксантин).

*V. A. Sorokin, V. A. Valeev, E. L. Usenko, Yu. P. Blagoi*

Effect of  $Cd^{2+}$  ions on conformational equilibrium of three-stranded polyUpolyApolyU polynucleotide under near-physiological conditions

#### Summary

$Cd^{2+}$  ions effect on the conformational equilibrium of three-stranded polyUpolyApolyU polynucleotide (0.1M  $Na^+$ , pH 7) has been studied by the method of differential UV spectroscopy. It has been revealed that  $Cd^{2+}$  ions do not bind heteroatoms of nitrogen bases of polyA and polyU being in triple (A2U) and double (AU) helices and do not change their conformation. The heating of A2U results in two subsequent processes: the first one represents separation of one strand of poly U from A2U i. e.  $A2U \rightarrow AU + U$

transition ( $3 \rightarrow 2$  transition) is realized, and the second one corresponds to more cooperative melting of AU, i. e.  $2 \rightarrow 1 (U + A$

$U + A + U)$  transition. The concentration dependences of melting temperatures for these processes have some intersection point ( $T_m = 60^\circ C$ ;  $[Cd^{2+}] \sim 3.5 \cdot 10^{-4} M$ ) at which thermal stability of A2U and AU become identical. The theoretical calculations of concentration dependences ( $T_m$ )<sub>3,2</sub> revealed that the best agreement between experiment and theory is observed at the enthalpy of transition  $H_3$  <sub>2</sub> = 5 kcal/mol triplet.

*Keywords:* metal ions, three-stranded polynucleotides, conformational transitions.

*V. O. Sorokin, V. O. Valeev, E. L. Usenko, Yu. P. Blagoi*

Вплив іонів  $Cd^{2+}$  на конформаційну рівновагу триланцюгового полінуклеотиду поліUpоліAполіU за умов, близьких до фізіологічних

#### Резюме

Методом диференційної УФ-спектроскопії вивчено вплив іонів  $Cd^{2+}$  на конформаційну рівновагу триланцюгового полінуклеотиду поліUpоліAполіU (0,1 M  $Na^+$ , pH 7). Показано, що ці іони не зв'язуються з гетероатомами азотистих основ поліA та поліU, що знаходяться у складі потрійної (A2U) та подвійної (AU) спіралей, та не змінюють їхньої конформації. Нагрівання A2U індукує два послідовних процеси: перший відповідає відділенню від A2U однієї нитки поліU, тобто реалізації переходу  $3 \rightarrow 2$ , другий – більш кооперативному плавленню AU, тобто переходу  $2 \rightarrow 1$ . Концентраційні залежності температур плавлення, які відповідають цим процесам, мають точку перетину ( $T_m=60^\circ C$ ;  $[Cd^{2+}] \sim 3,5 \cdot 10^{-4} M$ ), при якій термостабільності A2U та AU стають однаковими. Теоретичними розрахунками концентраційних залежностей ( $T_m$ )<sub>3,2</sub> показали, що результати дослідів та теорії найкраще узгоджуються при ентальпії переходу  $H_3$  <sub>2</sub> = 5 ккал·моль<sup>-1</sup> триплет<sup>-1</sup>.

*Ключові слова:* іони металів, триланцюгові полінуклеотиди, конформаційні переходи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мур Дж. В., Рамамурти С. Тяжелые металлы в природных водах: контроль и оценка влияния.–М.: Мир, 1987.–288 с.
2. Durlach J., Bara M., Guiet-Bara A. Metal ions in biological systems / Eds H. Sigel, A. Sigel.–New York: Marcel Dekker, 1990.–Vol. 26.–243 p.
3. Hartwig A., Asmus M., Ehleben I., Herzer U., Kostelac D., Pelzer A., Schwerdtle T., Burkle A. Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms // Environ. Health. Perspect.–2002.–110.–P. 797–799.
4. Hartwig A. Recent advances in metal carcinogenicity // Pure Appl. Chem.–2000.–72.–C. 1007–1014.
5. Aoki K. Nucleosides, nucleotides and metal ions // Metalloproteins: Chemical properties and biological effects / Eds S. Otsuka, T. Yamanaka.–Amsterdam etc.: Elsevier, 1988.–P. 457–490.

6. *Sirover M. A., Loeb L. A.* Infidelity of DNA synthesis *in vitro*: screening for potential metal mutagens or carcinogens // *Science*.—1976.—**194**.—P. 1434–1436.
7. *Андроникашвили Э. Л.* Малигнизация и изменение некоторых свойств биомолекул и надмолекулярных структур // *Биофизика*.—1987.—**23**, № 5.—С. 782–799.
8. *Mills M., Vxlker J., Klump H. H.* Triple helical structures involving inosine: there is a penalty for promiscuity // *Biochemistry*.—1996.—**35**.—P. 13338–13344.
9. *Field A. K.* Oligonucleotides as inhibitors of human immunodeficiency virus // *Curr. Opin. Mol. Ther.*—1999.—**1**.—P. 323–331.
10. *Giovannangeli C., Rougee M., Garestier T., Thuong N. T., Helene C.* Triple-helix formation by oligonucleotides containing the three bases thymine, cytosine and guanine // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1992.—**89**.—P. 8631–8635.
11. *Sorokin V. A., Valeev V. A., Gladchenko G. O., Degtyar M. V., Andrus E. A., Karachevtsev V. A., Blagoi Yu. P.* Mg<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> ion effect on stability and structure of triple polyIpolyApolyI helix // *Int. J. Biol. Macromol.*—2005.—**35**.—P. 201–210.
12. *Sorokin V. A., Valeev V. A., Gladchenko G. O., Degtyar M. V., Blagoi Yu. P.* Ni<sup>2+</sup> ion effect on conformations of single-, double- and three-stranded homopolynucleotides containing adenine and uracil // *Macromol. Biosci.*—2001.—**1**.—P. 191–203.
13. *Лурье Ю. Ю.* Справочник по аналитической химии.—М.: Химия, 1971.—454 с.
14. *Sigel H., Massoud S. S., Corfu N. A.* Comparison of the extent of macrochelate formation in complexes of divalent metal ions with guanosine (GMP<sup>2-</sup>), inosine (IMP<sup>2-</sup>), and adenosine 5'-monophosphate (AMP<sup>2-</sup>). The crucial role of N-7 basicity in metal ion-nucleic base recognition // *J. Amer. Chem. Soc.*—1994.—**116**.—P. 2958–2971.
15. *Hellert R., Bau R., Martin R. B., Mariam J. H.* Nucleotides and derivatives: their ligating ambivalence // *Metal ions in biological systems* / Ed. H. Sigel.—New York: Marcel Dekker, 1979.—Vol. 8.—P. 102–114.
16. *Massoud S. S., Sigel H.* Metal ion coordinating properties of pyrimidine – nucleoside 5'-monophosphates (CMP, UMP, TMP) and of simple phosphate monoesters, including D-ribose 5'-monophosphate. Establishment of relations between complex stability and phosphate basicity // *Inorg. Chem.*—1988.—**27**.—P. 1447–1453.
17. *Kotowycz G.* A carbon-13 nuclear magnetic resonance study of binding of copper (II) to pyrimidine nucleotides and nucleosides // *Can. J. Chem.*—1974.—**52**.—P. 924–929.
18. *Blagoi Yu. P., Gladchenko G. O., Nafie L. A., Freedman T. B., Sorokin V. A., Valeev V. A., He Ya.* Phase equilibrium in poly(rA)poly(rU) complexes with Cd<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ions, studied by ultraviolet, infrared, and vibrational circular dichroism spectroscopy // *Biopolymers*.—2005.—**78**.—P. 275–286.
19. *Andrushchenko V., Blagoi Yu., Van de Sande J. H., Wieser H.* Poly(rA)poly(rU) with Ni<sup>2+</sup> ions at different temperatures: infrared absorption and vibrational circular dichroism spectroscopy // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*—2002.—**19**.—P. 889–906.
20. *Rifkind J. M., Shin Y. A., Heim J. M., Eichhorn G. L.* Cooperative disordering of single-stranded polynucleotides through copper cross-linking // *Biopolymers*.—1976.—**15**.—P. 1879–1902.
21. *Yamada A., Akasaka K., Hatano H.* Proton and phosphorus-31 magnetic relaxation studies on the interaction of polyriboadenylic acid with Mn<sup>2+</sup> // *Biopolymers*.—1976.—**15**.—P. 1315–1331.
22. *Enmanji K.* Proton, phosphorus and carbon nuclear magnetic relaxation studies on the interaction of poly(riboadenylic acid) with Cu<sup>2+</sup> // *J. Polym. Sci.*—1987.—**22**.—P. 883–895.
23. *Сорокин В. А., Спольник А. Н., Карачевцев В. А.* Взаимодействие одностенных углеродных нанотрубок с полинуклеотидами // *Доп. НАН України*.—2006.—№ 3.—С. 68–73.
24. *Kim S.-H., Martin R. B.* Binding sites and stabilities of transition metal ions with nucleosides and related ligands // *Inorg. Chim. Acta*.—1984.—**91**.—P. 19–24.
25. *Krakauer H.* A thermodynamic analysis of the influence of simple mono- and divalent cations on the conformational transitions of polynucleotide complexes // *Biochemistry*.—1974.—**13**.—P. 2579–2589.
26. *Klump H. H.* Energetics of order /order transition in nucleic acids // *Can. J. Chem.*—1988.—**66**.—P. 804–811.
27. *Krakauer H., Sturtevant J. M.* Heats of the helix-coil transition of the polyA-polyU complexes // *Biopolymers*.—1968.—**6**.—P. 491–512.
28. *Каранетян А. Т., Вардеванян П. О., Терзикян Г. А., Франк-Каменецкий М. Д.* Влияние двух способов связывания лигандов на параметры перехода спираль-клубок ДНК // *Биополимеры и клетка*.—1989.—**5**, № 5.—С. 38–43.
29. *Sorokin V. A., Valeev V. A., Gladchenko G. O., Degtyar M. V., Karachevtsev V. A., Blagoi Yu. P.* Mg<sup>2+</sup> ion effect on the conformational equilibrium of polyUpolyApolyU and polyApolyU in aqueous solutions // *Int. J. Biol. Macromol.*—2003.—**31**.—P. 223–233.
30. *Plum G. E., Pilch D. S., Singleton S. C., Breslauer K. J.* Nucleic acid hybridisation: triplex stability and energetic // *Annu. Rev. Biophys. and Biomol. Struct.*—1995.—**24**.—P. 319–350.
31. *Благой Ю. П., Галкин В. Л., Гладченко Г. О., Корнилова С. В., Сорокин В. А., Шкорбатов А. Г.* Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах.—Киев: Наук. думка, 1991.—270 с.
32. *Pörschke D.* Cooperative nonenzymic base recognition II. Thermodynamics of the helix-coil transition of oligoadenylic + oligouridylic acids // *Biopolymers*.—1971.—**10**.—P. 1989–2013.
33. *Kamiya M., Torigoe H., Shindo H., Sarai A.* Temperature dependence and sequence specificity of DNA triplex formation: an analysis using isothermal titration calorimetry // *J. Amer. Chem. Soc.*—1996.—**118**.—P. 4532–4538.
34. *Blagoi Yu. P., Zozulya V. N., Egupov S. A., Ryazanova O. A., Shcherbakova A. S.* Thermodynamic analysis of 3/2 transition in oligonucleotide triple-helix complexes dA<sub>n</sub>-2dT<sub>m</sub> // *Біофіз. вісн.*—2002.—**10**.—P. 5–10.
35. *Hynes M. J., Diebler H.* The binding of Ni<sup>2+</sup> to adenylyl-3', 5'-adenosine and to poly(adenylic acid) // *Biophys. Chem.*—1982.—**16**.—P. 79–88.