

УДК 573.3

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИОНОВ ДВУХВАЛЕНТНОЙ МЕДИ С ДНК

Е.Б. ДАЛЯН

Ереванский государственный университет

(Поступила в редакцию 15 октября 2001 г.)

УФ-спектрофотометрическим методом исследовано влияние ионов двухвалентной меди на структуру ДНК. Показано, что: 1) ионы Cu^{2+} вызывают инверсию термостабильностей АТ- и GC-нуклеотидных пар ДНК (концентрация инверсии $r \approx 0.65 \text{ M/P}$); 2) уже при низких концентрациях этих ионов ($0.2 < r < 1.0$) происходит внутримолекулярная агрегация в GC-богатых участках ДНК.

Известно, что ионы металлов оказывают существенное влияние на все уровни организации ДНК – от первичной структуры до ее пространственной организации в составе хромосом [1-3]. Установлено, что ни один жизненно важный функциональный процесс в клетке не происходит без участия иона того или иного металла [4-7]. С другой стороны, известно, что большие концентрации ионов переходных металлов (особенно, Cu^{2+}) в клетке могут вызывать точечные мутации в ДНК [5-7]. Поэтому любые данные о физических свойствах комплексов ДНК с ионами металлов могут представлять несомненный интерес для понимания молекулярно-биологических механизмов функционирования нуклеиновых кислот.

К настоящему времени о структуре ДНК – Cu^{2+} комплексов известно немало [1-9]. Известно, например, что ионы Cu^{2+} предпочитают связываться с N(7) атомом пуриновых оснований, особенно гуанина. Причем, для связывания с ДНК весьма принципиальным является тот факт, где именно на ДНК расположена нуклеотидная пара оснований, а также в каком состоянии (спиральном или расплавленном) она находится. Однако влияние стехиометрических концентраций ($< 10^{-4} \text{ M}$) ионов Cu^{2+} на ДНК изучено недостаточно. А как установлено, основной биологический эффект этих ионов в клетке проявляется именно при низких стехиометрических концентрациях. Остаются невыясненными также некоторые моменты, касающиеся избирательности действия этих ионов на АТ- и GC-нуклеотидные пары ДНК.

Материалы и методы. Были использованы: ДНК из тимуса теленка (содержание GC-пар в ДНК $X_{GC} = 42\%$), выделенная в ИБОХ АН Республики Беларусь Д.Ю.Ландо (содержание РНК $< 0.1\%$, содержание белка $< 0.2\%$, молекулярная масса ДНК $\sim 3 \cdot 10^7$ Да) и коммерческие препараты ДНК *M.Luteus* ($X_{GC} = 72\%$), *Cl.Perfringens* ($X_{GC} = 72\%$) фирмы "Sigma". Ионы Cu^{2+} вводились в буферный раствор 10^{-3} М NaCl в виде соли $CuCl_2$. Концентрацию ионов определяли взвешиванием и контролировали титрованием с помощью $AgNO_3$ с добавлением индикатора K_2MnO_7 . Концентрация ДНК $\sim 5-7$ мкг/мл, что в расчете на моль нуклеотидов составляет $\sim 10^{-5}$ М.

Область исследованных концентраций ионов $Cu^{2+} = 10^{-6} \div 10^{-4}$ М. Однако, для того чтобы сравнить результаты различных экспериментов, в которых не всегда удастся подобрать точно одинаковую концентрацию ДНК, удобно концентрацию ионов (r) считать в относительных единицах (М/Р) (М/Р = концентрация ионов (в М)/концентрация нуклеотидов ДНК (в М)).

Кривые плавления снимались на спектрофотометре "UNICAM-SP 8000". Скорость сканирования температуры при снятии кривых плавления $0.25^\circ\text{C}/\text{мин}$. Поскольку ряд особенностей структурной организации ДНК слабо проявляется на обычной интегральной кривой плавления, был осуществлен переход к дифференциальным кривым плавления (ДКП). Размер точек на рисунках соответствует среднему значению из 5-6 измерений.

Результаты и обсуждение. Наиболее распространенным методом исследования избирательности влияния лигандов на нуклеотидные пары ДНК является анализ дифференциальных кривых плавления (ДКП), согласно которому по сдвигу ДКП вдоль температурной оси и изменению ее формы можно делать определенные выводы о GC-специфичности воздействия данного лиганда на ДНК [10,11]. Как видно из приведенных на рис.1 дифференциальных кривых плавления ДНК тимуса теленка в присутствии ионов меди, в области концентраций $0.2-0.6$ М/Р ионов Cu^{2+} наблюдается уширение ДКП, сопровождаемое тенденцией к появлению двухфазности плавления. При более высоких (> 0.65 М/Р) концентрациях ионов Cu^{2+} происходит резкое сужение дифференциальной кривой плавления ДНК, сопровождаемое слиянием отдельных пиков в один узкий пик, с широким малоинтенсивным высокотемпературным пиком. То есть в присутствии ионов меди на фоне уменьшения термостабильности ДНК происходит также изменение формы ДКП. Как видно из рис.1, при добавлении ионов меди к ДНК наибольшим изменениям подвергается конец дифференциальной кривой плавления, т.е. GC-богатые участки ДНК. Следовательно, анализ ДКП показывает, что ионы меди избирательно влияют на плавление GC-богатых областей ДНК.

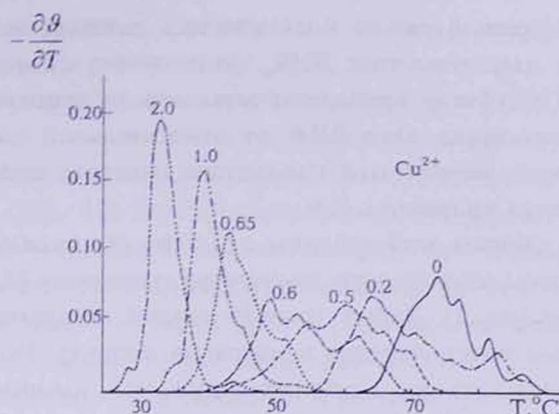


Рис.1. Дифференциальные кривые плавления ДНК тимуса теленка в 10^{-3} М NaCl при различных концентрациях ионов Cu^{2+} . θ – степень спиральности ДНК. Цифры у кривых – концентрации ионов Cu^{2+} в молях на моль нуклеотидов (М/Р).

Однако известно, что в некоторых случаях в процессе плавления ДНК–лиганд комплекса могут появиться дополнительные факторы, изменяющие структуру расплавленных областей ДНК (например, агрегационные эффекты [12,13] или перераспределение лигандов в процессе плавления [14]), которые в свою очередь могут изменять форму ДКП. В таких случаях метод ДКП может дать неверную информацию о специфичности связывания лиганда с АТ или GC нуклеотидными парами. Как было показано нами в работах [14,15], заключение о специфичности связывания лиганда с нуклеотидными парами можно делать только на основании исследования изменения температур плавления ДНК с различным GC-содержанием.

Табл.1. Зависимости температуры (T_m) и интервала (ΔT) плавления ДНК с различным GC-содержанием от концентрации ионов меди (r).

r (М/Р)	ДНК <i>M.Luteus</i>		ДНК тимуса теленка		ДНК <i>Cl.Perfringens</i>	
	T_m (°C)	ΔT (°C)	T_m (°C)	ΔT (°C)	T_m (°C)	ΔT (°C)
0	78.6	9.1	63.0	18.0	54.0	12.0
0.1	80.0	9.5	63.0	15.5	61.7	10.6
0.2	80.7	16.0	68.0	15.9	64.8	10.2
0.4	75.0	18.5	62.5	9.7	59.5	9.5
0.5	63.5	20.5	59.3	13.7	54.4	10.6
0.6	52.4	10.1	50.7	12.4	48.7	12.0
0.7	42.3	4.8	43.3	7.0	46.3	8.0
0.8	40.7	4.1	43.2	6.6	44.8	6.0
1.0	38.3	3.3	40.4	5.4	42.6	4.9
1.5	32.9	2.8	37.0	4.7	41.3	4.7
2.0	32.2	2.7	33.8	4.0	38.3	4.5

Поэтому в данной работе исследовалось влияние ионов двухвалентной меди на плавление трех ДНК, существенно отличающихся по GC-содержанию. В таблице приведены зависимости температуры (T_m) и интервала (ΔT) плавления этих ДНК от относительной концентрации ионов меди. Способ расчета этих параметров перехода спираль-клубок из кривых плавления приведен в [14].

Затем, по данным этой таблицы для каждой концентрации иона Cu^{2+} были построены зависимости температур плавления (T_m) этих ДНК от GC-содержания (рис.2). Видно, что для каждой концентрации ионов экспериментальные точки хорошо ложатся на прямую. По изменению наклона приведенных на рис.2 прямых видно, что, начиная с концентраций Cu^{2+} $r \sim 0.65$ М/Р, ДНК с высоким GC-содержанием (более термостабильные) начинают плавиться при более низких температурах, чем ДНК с высоким AT-содержанием. И если судить по изменению температур плавления ДНК с различным GC-содержанием, можно утверждать, что увеличение концентрации ионов Cu^{2+} приводит к инверсии относительных термостабильностей AT- и GC-нуклеотидных пар ДНК (концентрация инверсии $r \approx 0.65$ М/Р Cu^{2+}). Но по определению инверсии [16], в точке инверсии интервал плавления ДНК должен проходить через нулевой минимум. Однако, как видно из таблицы, интервал плавления, все время уменьшаясь, остается все же достаточно большим ($\sim 3.5 - 4.0^\circ\text{C}$), т.е. второй критерий инверсии не соблюдается. Следовательно, в процессе плавления ДНК в присутствии ионов меди возникают дополнительные факторы, приводящие к уширению интервала плавления ДНК.

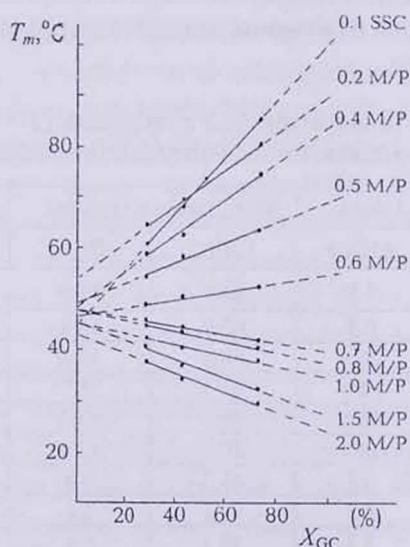


Рис.2. Зависимости температур плавления ДНК – Cu^{2+} комплексов от GC-содержания ДНК при различных концентрациях ионов Cu^{2+} (цифры у прямых).

При обратимом связывании лигандов известны три причины, приводящие к уширению и двухступенчатости кривых плавления: 1) кооперативный характер взаимодействия лигандов с ДНК [10,13], 2) сильные отличия в значениях констант связывания лиганда со спиральными и расплавленными участками ДНК [10] и 3) внутримолекулярная агрегация ДНК [17,18]. На первый взгляд, наиболее вероятной является первая причина, поскольку известно, что ионы Cu^{2+} кооперативно связываются с одноцепочечными полинуклеотидами polyA и polyC [19]. Однако проведенные нами (согласно работе [18]) расчеты показывают, что при столь низких концентрациях вклад кооперативности связывания Cu^{2+} с ДНК незначителен. Как показано в работах [20,21], при низких степенях заполнения ДНК ионами меди отличия в константах связывания ионов меди со спиральными и расплавленными участками могут привести к перераспределению ионов с расплавленных на спиральные участки в процессе плавления ДНК и, следовательно, могут быть причиной уширения и двухступенчатости кривой плавления ДНК. Что касается третьей причины, то обычно образование агрегатов в ДНК происходит при значительно более высоких концентрациях лигандов. Однако, в данном случае, даже при столь низких концентрациях лигандов нельзя исключать возможность образования внутримолекулярных агрегатов. Эта уверенность основывается на том, что при нагревании раствора ДНК с ионами меди (при концентрациях ионов Cu^{2+} $r \geq 0.5$ М/Р) наблюдается увеличение оптической плотности при $\lambda = 320$ нм. Поскольку ДНК на этой длине волны не поглощает, то увеличение оптической плотности раствора может быть обусловлено появлением рассеивающих свет агрегатов.

Кроме того, проведенные исследования выявили еще один интересный результат. До сих пор считалось, что наблюдаемая при связывании с некоторыми лигандами агрегация ДНК неспецифична к нуклеотидным парам. Проведенные же нами исследования на ДНК с различным GC-содержанием показали, что наблюдаемое увеличение оптической плотности при $\lambda = 320$ нм растет пропорционально росту GC-содержания ДНК. На GC-специфичность полученных агрегатов указывает также наличие и местоположение отдельного высокотемпературного пика на ДКП ДНК — Cu^{2+} комплексов (рис.1), как это было показано нами ранее для других ионов переходных металлов Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} [14]. Следовательно, при стехиометрических концентрациях ионов меди в процессе плавления образуются внутримолекулярные агрегаты в GC-богатых областях ДНК, приводящие к уширению интервала плавления.

Работа выполнена при поддержке гранта CRDF №AB2-2006.

ЛИТЕРАТУРА

1. M.Boudvillian, R.Dalbies, M.Leng. Metal Ions in Biological Systems, 33, 87 (1996).
2. E.Hackl, S.Kornilova, Yu.Blagoi. Metal Ions in Biology and Medicine, 5, 99 (1998).
3. M.Egli, R.-V.Gessener. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 92 (1995).
4. V.N.Ptaman, V.N.Soyfer. J. Biomol. Struct. Dyn., 11, 1035 (1994).
5. M.Daune. Metal Ions in Biological Systems, 3, 1 (1974).
6. Г.Зигель. Ионы металлов в биологических системах. М., Мир, 1982.
7. L.G.Marzilli, T.J.Kistenmacher, G.L.Eichhorn. Nucleic acid - metal ion interactions. New York, 1980.
8. S.V.Kornilova, P.Miskovsky, A.Tomkova, L.E.Kapinos, E.V.Hackl, V.V.Adrushenchenko, D.N.Grigoriev, Yu.P.Blagoi. J. Mol. Struct., 408/409, 219 (1997).
9. V.A.Sorokin, V.A.Valeev, G.O.Gladchenko, I.V.Sysa, Yu.P.Blagoi, I.V.Volchok. J. Inorg. Biochem, 63(2), 79 (1996).
10. А.А.Ахрем, Д.Ю.Ландо. Мол. биол., 15, 1083 (1981).
11. W.B.Melchior Jr., P.H.Von Hippel. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 298 (1973).
12. A.P.Yurgaitis, Yu.S.Lazurkin. Biopolymers, 20, 917 (1981).
13. D.Y.Lando, A.S.Fridman, V.I.Krot, A.A.Akhrem. J. Biomol. Struct. Dynam., 16(1), 59 (1998).
14. S.G.Haroutiunian, Y.B.Dalyan, V.M.Aslanian, D.Yu.Lando, A.A.Akhrem. Nucl. Acids Res., 18, 6413 (1990).
15. S.G.Haroutiunian, Y.B.Dalyan, V.F.Morozov, Eu.Sh.Mamasakhlisov, M.S.Shahinian, A.A.Akhrem, D.Y.Lando, L.Messori, and P.Orioli. Inorganica Chimica Acta, 275-276, 510 (1998).
16. Д.Ю.Ландо, А.Г.Шаповский, А.А.Ахрем. Вести АН БССР, серия хим. наук, 5, 21 (1984).
17. G.S.Ott, D.Bastia, W.R.Bauer. Biochim. Biophys. Acta, 58, 216 (1978).
18. Ю.П.Благой, В.А.Сорокин, В.А.Валеев, Г.О.Гладченко. Мол. биол., 12, 795 (1978).
19. J.Rifkind, Y.A. Shin, J.M.Heim, G.L.Eichhorn. Biopolymers, 15, 1879 (1976).
20. Ю.П.Благой, В.А.Сорокин, Г.Х.Божко, В.А.Валеев, С.А.Хоменко. Studia Biophys., 65, 55 (1977).
21. Yu.S.Lazurkin, Yu.L.Lyubchenko, V.M.Pavlov, M.D.Frank-Kamenetskii, I.V.Berestetskaya. Biopolymers, 14, 1551 (1975).

ԴՆԹ-Ի ՀԵՏ ԵՐԿՎԱԼԵՆՏ ՊՐՆՁԻ ԻՈՆՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ե.Բ. ԴԱԼՅԱՆ

ՈՒՄ-սպեկտրոֆոտոմետրիայի եղանակով ուսումնասիրվել է երկվալենտ պղնձի իոնների ազդեցությունը ԴՆԹ-ի վրա: Ցույց է տրված, որ՝ 1) Cu^{2+} իոնների ներկայությամբ նկատվում է AT- և GC-նուկլեոտիդային զույգերի ջերմակայունությունների ինվերսիա (ինվերսիայի կոնցենտրացիան է՝ $r \approx 0.65$ M/P); 2) իոնների ցածր կոնցենտրացիաների դեպքում ($0.2 < r < 1.0$) առաջանում են ներմոլեկուլային ագրեգատներ ԴՆԹ-ի GC-հարուստ տեղամասերում:

FEATURES OF INTERACTION OF BIVALENT COPPER IONS WITH DNA

Y. B. DALYAN

Using the method of UV-spectrophotometry the influence of bivalent copper ions on the structure of DNA is investigated. It is shown that 1) Cu^{2+} ions cause the inversion of thermostability of AT- and GC-nucleotide base pairs (the concentration of inversion is $r \approx 0.65$ M/P); 2) just at low concentrations of these ions ($0.2 < r < 1.0$) the formation of intramolecular aggregates in GC-rich regions of DNA takes place.