

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР
им. В.И.Веркина

На правах рукописи

КАПИНОС Лариса Евгеньевна

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ ПЕРЕХОДОВ
МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ ДНК МЕТОДАМИ КОЛЕБАТЕЛЬНОЙ
СПЕКТРОСКОПИИ.

(01.04.14- Теплофизика и молекулярная физика)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата физико-
математических наук

Харьков - 1995

39.19
Диссертацией является р...
Работа выполнена в Физико-техническом институте низких температур им. Б.И.Веркина

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00761447 (Т)

Научные руководители -

доктор физико-математических наук,
профессор Вячеслав...

кандидат физико-математических наук,
старший научный сотрудник
ФТИНТ НАН Украины Корнилова
Светлана Викторовна

Официальные оппоненты - доктор физико-математических наук,
профессор Суходуб Леонид Федорович,

доктор физико-математических наук,
старший научный сотрудник
Шкорбатов Александр Георгиевич

Ведущая организация - Институт радиоэлектроники НАН Украины.

Защита состоится "9" ноября 1995 г. в 15⁰⁰ часов на заседании Специализированного совета К 02.35.03 при Физико-техническом институте низких температур им. Б.И.Веркина НАН Украины (310164, Харьков, пр. Ленина, 47).

Замечания и отзывы по данной работе присылать по адресу: 310164, Харьков, пр. Ленина 47, Физико-технический институт низких температур им. Б.И.Веркина).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Физико-технического института низких температур НАН Украины. Автореферат разослан "6" октября 1995 г.

Ученый секретарь Специализированного совета
доктор физико-математических наук

Е.С.Сыркин

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность темы. Постоянный интерес к изучению механизмов взаимодействия ионов двухвалентных металлов с макромолекулами ДНК поддерживается активной ролью этих ионов в процессах функционирования нуклеиновых кислот в клетке, а также канцерогенезе и мутагенезе. В настоящее время имеется большое число работ, посвященных этой проблеме [1]. В результате этих исследований открыто широкое конформационное многообразие двойной спирали ДНК [2, 3], разработан ряд теоретических моделей, описывающих структурные перестройки ДНК. Уже в первых работах [4] по исследованию структуры ДНК было показано, что в организации двухспиральной структуры биополимера огромную роль играют вода и ионы. По результатам многих исследований [1] было установлено, что ионы двухвалентных металлов взаимодействуют с фосфатными группами и азотистыми основаниями ДНК, вызывая конформационные изменения, стабилизируя вторичную структуру при невысоких концентрациях [5]. Широко исследовалось влияние одновалентных ионов и воды на В-А переход, а также влияние ионов на переход спираль-клубок [1, 6, 7]. Однако молекулярные механизмы сильных структурных изменений ДНК при связывании с ионами двухвалентных металлов изучены недостаточно, отсутствуют и однозначные представления о моделях такого взаимодействия [1].

Настоящая работа посвящена изучению этого вопроса методами ИК и Рамановской спектроскопии и пьезогравиометрии. Для полного понимания механизмов действия ионов металлов также необходимы данные о гидратации металлокомплексов. Данная работа позволяет не только получить эти сведения, но и исследовать конформационные изменения макромолекул ДНК и полинуклеотидов при связывании с ионами двухвалентных металлов, а также влияние на структуру ДНК межмолекулярных взаимодействий, вызванных высоким содержанием ионов в растворе и приводящих к компактизации.

В связи с вышесказанным представляется интересным провести комплексный анализ картины взаимодействия ион-вода-ДНК с учетом межмолекулярных эффектов, что позволяет дополнить существующие модели этих комплексов.

Цель исследования, проведенного в диссертационной работе-

1. Методами колебательной спектроскопии изучить влияние ионов двухвалентных металлов (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) на В-А переход ДНК в различных ион-гидратных условиях (концентрация ионов и содержание воды) и переход макромолекул ДНК в компактные структуры;

2. Исследовать структуру и гидратацию комплексов ДНК-ион.

3. Построить модели структурного поведения систем ДНК-вода-ион в условиях различного содержания ионов металлов и биополимера и определить константы связывания в данных условиях.

Научная новизна работы определяется результатами, входящими в основные положения, выносимые на защиту:

1. Все исследованные ионы двухвалентных металлов (Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}) при взаимодействии с биополимером стабилизируют конформацию В-типа при незначительных концентрациях Cu^{2+} и Ca^{2+} [$\text{Cu}^{2+}/[\text{P}] \leq 0,3$; $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}] \leq 1$ и во всем исследованном диапазоне концентраций - Mn^{2+} и Mg^{2+} концентрации ионов Cu^{2+} наблюдается разупорядочение структуры биополимера и частичная денатурация (при $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] \leq 0,45$ в пленках и растворах), а при повышении концентрации ионов Ca^{2+} наблюдается ст ($0,2 \leq [\text{Mn}^{2+}]/[\text{P}] \leq 1$ и $[\text{Mg}^{2+}]/[\text{P}] = 0,4$). Однако с повышением абилзация СЗ'-эндо конформации рибозы и переход в А-форму некоторых участков макромолекулы ДНК ($[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}] = 20$). Наблюдаемое отличие во влиянии на конформацию ДНК исследуемых ионов объясняется разным способом комплексообразования и сродством ионов к фосфатным группам и местам связывания на азотистых основаниях.

2. Полученные данные подтверждают возможность образования ионами Cu^{2+} хелатного комплекса (модель Циммера) с N7 и O6 гуанина и O2 и N3 цитозина, а также с кислородами фосфатных групп. Данные Рамановской спектроскопии позволяют отметить, что при связывании ДНК с ионами меди происходит поворот гуанина вокруг гликозидной связи в сторону, характерную для суп-конформации. Ионы Mn^{2+}

и Ca^{2+} образуют преимущественно комплексы с фосфатными группами и при повышении концентрации до $[\text{Mn}^{2+}]/[\text{P}] \geq 0,4$ и $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}] \geq 10$ с азотистыми основаниями, в частности, с N7 и O6 гуанина. Однако, по-видимому, ионы Ca^{2+} взаимодействуют с фосфатными группами предпочтительно через воду и не располагаются в узком желобке. Тогда как ионы Mn^{2+} , размещаясь в нем, способствуют его сужению, что вызывает стабилизацию В-формы. Данные согласуются с результатами рентгеноструктурных исследований [5] и полученными в работе данными по гидратации комплекса.

3. Ионы Cu^{2+} и Mn^{2+} уменьшают гидратацию ДНК при значениях $\text{O.V.} = 30-70$ %. В области, где наблюдается переход в двухспиральную структуру, уменьшение гидратации ионами Cu^{2+} ($[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] = 0,4$) составляет ~ 1-2 молекулы воды, а для Mn^{2+} ($[\text{Mn}^{2+}]/[\text{P}] = 1$) ~ 3-4. Эти

данные подтверждают предположение, что ионы Cu^{2+} и Mn^{2+} образуют в основном связи с разрушением гидратной оболочки. Тогда как ионы Ca^{2+} увеличивают степень гидратации во всем интервале О.В. уже при $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}] \geq 1$ на 1 молекулу и на 10 молекул воды при $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}] \geq 10$.

4. Переход макромолекул ДНК в комплексе с ионами Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} в двухспиральную структуру происходит при более высоком содержании воды на нуклеотид, минуя А-форму. Исключение составляет комплекс ДНК+ Ca^{2+} при $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}] \geq 20$, двухспиральная структура которого характеризуется как В-форма с небольшими фрагментами А-формы. Для формирования В-формы ДНК в присутствии ионов Cu^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} требуется 12, 14, 16 молекул воды соответственно. Для образования двухспиральной структуры комплекса Ca^{2+} -ДНК требуется $n=14$; 18; 23.5 при $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}]=0, 4-1$; 10; 20 соответственно.

5. Методом ИК спектроскопии обнаружена резкая зависимость степени связывания (r) от концентрации ионов в растворе (D) для всех типов исследуемых ионов, обусловленная, предположительно, высокой положительной кооперативностью процесса связывания. Природа такой кооперативности, по-видимому, заключается во взаимодействии ионов двухвалентных металлов либо с двумя и более макромолекулами (межмолекулярная агрегация), либо с удаленными участками одной цепи (внутримолекулярная агрегация). Рассчитанные изотермы связывания $r(C_e)$ для описанного процесса имеют немонотонный характер. Такие изотермы связывания характеризуются метастабильными и абсолютно нестабильными участками, которые для стабильных комплексов могут быть заменены зависимостями со скачком r , что эквивалентно фазовому переходу первого рода. Полученные экспериментально изотермы связывания для всех ионов имеют форму, близкую к критическим изотермам. Они сильно отличаются по величине констант связывания, что определяется сродством ионов к основаниям.

6. Анализ ИК спектров ДНК животных, подвергавшихся длительному хроническому воздействию ионизирующего излучения в зоне ЧЭС и получавших пищу с добавками ионов двухвалентных металлов, показал, что структура этих макромолекул в значительной степени нарушается. Наблюдается разупорядочение сахарофосфатного остова, ослабление спирали за счет частичного повреждения водородных связей, поддерживающих двухспиральную структуру. Характер модификации ИК полос поглощения азотистых оснований дает возможность предположить, что

повреждение ДНК происходит на А-Т участках. Эти эффекты в случае совместного действия ионов металлов и ионизирующего излучения возрастают.

Научная новизна и практическая ценность полученных результатов прежде всего состоит в их важности при построении реальных моделей ион-гидратного окружения макромолекул ДНК. Данные, полученные методом ИК спектроскопии, позволяют оценить количество молекул воды в гидратной оболочке биополимера в присутствии различных по способу комплексообразования двухвалентных ионов металлов, а также константы связывания ионов двухвалентных металлов с ДНК и характер конформационных изменений макромолекулы в этом процессе в условиях высокой концентрации полимера. Эти исследования позволили проверить справедливость теории равновесного связывания и теории конденсации для данных условий, а также рассмотреть процесс связывания и конформационных преобразований с учетом межмолекулярных взаимодействий, которые тем более вероятны при высокой концентрации ДНК в растворе.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы неоднократно докладывались на семинарах ФТИНТ НАН Украины и на 6 национальных и 7 международных конференциях: Second International Conference: "DNA, interaction with ligands and proteins. Problems of recognition and selforganization" (Russia, St. Petersburg, June 22-26, 1992), 11th International Biophysics Congress (Hungary, July 25-30, 1993), Joint Meeting European Soc. for Radiation Biology and Europ. Society for Hyperthermic Oncol. (Amsterdam, June 1-4, 1994), Symposium on Molecular modeling in genetic and protein engineering (Sopron, Hungary June 14-17, 1994), 22nd European Congress on Molecular Spectroscopy (EUCMOS XXII) (Essen, Germany September 11-16, 1994), Конференція молодих учених ФТИНТ АН УССР (Харьков, 1990), Всесоюзная VII конференція по спектроскопии биополимеров (Харьков, 1991), XI Українська школа-семинар "Спектроскопія молекул і кристалів" (Харків, 10-16 травня, 1993), Радиобіологічний съезд (Київ, 20-25 вересня, 1993), I Український з'їзд біофізичного товариства (Київ, 20-24 червня, 1994), XII Українська школа-семинар "Спектроскопія молекул і кристаллів" (Нежин, июнь 1995), 6th Eur. Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (V.d'Ascue, France, 3-8 September 1995), 2nd International Conference "Metal Ions on Biological Systems" (Can Miniato, Italy, 22-28 April, 1995).

Тезиси перелічених доповідей опубліковані.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения и списка литературы. В работе содержится 45 рисунков и 18 таблиц. Список литературы состоит из 160 наименований.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснован выбор темы диссертационной работы и сформулированы цели исследования, а также содержится краткий обзор диссертационной работы, включающий в себя ее основные результаты.

Первая глава является литературным обзором теоретических и экспериментальных исследований, посвященных проблемам влияния ионов металлов на гидратацию и конформационные параметры ДНК. Рассматриваются современные исследования возможных конформаций ДНК в двухспиральной системе ДНК-вода-ион и соответственно факторы, способные изменить стабильность основных конформаций макромолекулы. В частности рассматриваются модели связывания, описывающие взаимодействие ДНК с ионами металлов как неспецифическое взаимодействие их с полиэлектролитом [1, 4]. Однако эти теории недостаточно полно описывают возможный механизм взаимодействия ионов с ДНК. Представление биополимера в виде заряженного цилиндра исключает учет гибкости ДНК, возможность координации ионов двухвалентных металлов не только с двумя соседними центрами связывания макромолекул, но и центрами удаленных друг от друга участков ДНК, а также относящимися к различным нитям. Учет такого взаимодействия особенно важен при описании процесса связывания в растворах с высокими концентрациями биополимера и ионов двухвалентных металлов.

С другой стороны проблема влияния связывания ионов двухвалентных металлов с ДНК и ее компонентами на структуру макромолекул была исследована различными экспериментальными методами. Рассматриваются результаты исследования методами колебательной, КД, УФД спектроскопии, рентгенструктурного анализа, кинетического и механомеханического метода. По этим данным ионы кальция, марганца и магния стабилизируют В-конформацию. Однако недостаточно выяснены механизмы этих процессов и результаты различного действия ионов на конформацию ДНК. Данные о местах связывания довольно неоднозначны [1], и поэтому особый интерес сейчас связан с комплексным исследованием [8] мест связывания, структуры ДНК и гидратной оболочки для построения реальных моделей этих систем.

Метод колебательной спектроскопии позволяет проследить связывание с определенными группами атомов на фоне структурных изменений биополимера и вариации гидратного окружения. В настоящее время существует ряд работ [6, 7, 9, 10], в которых используются данные методы, но они еще не охватывают всех изменений в ион-гидратном окружении ДНК и мало внимания уделяют исследованию в высококонцентрированных растворах.

Во второй главе описаны методы ИК и Рамановской спектроскопии и пьезогравиометрии, которые использовались для решения поставленных задач. Приведены характеристики препаратов ДНК, их растворов и пленок.

Пленки готовились стандартным методом: в раствор ДНК ($[ДНК]=1.92 \cdot 10^{-3}$ М, $[Трис \cdot HCl]=5 \cdot 10^{-4}$ М, $pH=7.0$) добавлялся раствор хлоридов исследуемых ионов двухвалентных металлов ($CaCl_2$, $MnCl_2$, $CuCl_2$, $MgCl_2$). Из полученного раствора ДНК ($9.6 \cdot 10^{-3}$ М) с заданной солью на цинкселеновом или флюоритовом окошке высушивалась пленка в эксикаторе над P_2O_5 . Окошко с полученной пленкой помещалось в герметичную кювету с возможностью задавать в ней определенную относительную влажность с помощью растворов насыщенных солей. Измерения проводились в диапазоне О.В. 5-98%. Учет количества ионов, связавшихся с ДНК в пленке, осуществлялся из расчетов по полученным экспериментальным данным для растворов. Для исследования растворов природной ДНК методом ИК спектроскопии использовали раствор биополимера с концентрацией $\sim 0.056 \pm 0.001$ М и проводили измерения в диапазоне концентраций Cu^{2+} : $0.02 \leq [Cu^{2+}]/[P] \leq 1$; Ca^{2+} : $0.4 \leq [Ca^{2+}]/[P] \leq 100$; Mn^{2+} : $0.1 \leq [Mn^{2+}]/[P] \leq 10$.

Для исследования комплексов методом Рамановской спектроскопии использовали растворы ДНК с концентрацией $\sim 9.6 \cdot 10^{-2}$ М(Р). Растворы центрифугировали при 4-5 об/с, чтобы избавиться от неоднородности и уменьшить рассеивание при измерении спектра образца.

Спектры регистрировали на инфракрасном спектрометре UR-20 и рамановском спектрофотометре с использованием аргонового лазера ($\lambda=488$ нм) Jobin Yvon Ramanog VG2S. Эксперимент проводился на кафедре ядерной физики и биофизики Университета г. Кошице (Словакия).

Пленки нуклеиновых кислот для пьезогравиометрии получали из концентрированного раствора биополимера (0.2%), который наносили в виде микрокапли на контакты кварцевого резонатора и сушили при комнатной температуре. Масса нанесенной таким образом пленки толщиной 1 мк соответствовала в среднем смещению частоты кварцевого

резонатора на 2-3 кГц [6]. Эксперимент проводился в отделе биофизики ИРЭ НАН Украины.

Надежность интерпретации колебательных спектров основывается на характеристичности колебаний и теоретических расчетах частот при решении колебательной задачи азотистых оснований и сахарофосфатного остова ДНК в А- и В-формах [6, 11].

В третьей главе излагаются результаты ИК спектроскопического изучения гидратации и конформационных переходов ДНК в комплексе с ионами Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} и Mg^{2+} в дейтерированных и недейтерированных пленках при различной относительной влажности в диапазоне частот: $700-1800\text{ см}^{-1}$ и $2000-3800\text{ см}^{-1}$. Выявлены места связывания ионов металлов с ДНК при различной активности воды, оценено количество молекул воды в гидратной оболочке комплексов при различной относительной влажности. Установлено, что при низких относительных влажностях (до 64 %) все исследуемые ионы непосредственно связываются с сахарофосфатным остовом, а также в случае с ионами марганца и меди - с азотистыми основаниями ДНК. Исследования подтвердили, что взаимодействие перечисленных ионов стабилизирует дезоксирибозу в С2'-эндо конформации и переход макромолекул в двухспиральную структуру в присутствии исследуемых ионов происходит непосредственно в В-конформацию, минуя А-форму. Однако было отмечено, что при повышении концентрации Ca^{2+} в растворе и получении кристаллогидрата при высушивании пленки в ИК спектре этих образцов появляются полосы поглощения, характерные для С3'-эндо дезоксирибозы наряду с более интенсивными полосами поглощения, характерными для ДНК в В-форме. В частности полосы поглощения 865 см^{-1} , 898 см^{-1} и 1185 см^{-1} , ответственные за колебания групп С3'-эндо формы сахара. При $[Ca^{2+}]/[P] \sim 20$ изменения в ИК спектре комплекса ДНК с ионами кальция можно интерпретировать как переход некоторых участков макромолекулы в А-форму. Это вполне вероятный процесс для полимера с высоким молекулярным весом. Этот эффект наблюдался и для других ионов [5].

Ионы меди при низких относительных влажностях более активно связываются с N3 и O2 цитозина, что отражается в смещении ИК полос поглощения, характеризующих колебания этих групп. Однако при возрастании относительной влажности до 90% наблюдается более сильное изменение полос поглощения, характеризующих колебания С=N связей гуанина. Связывание с азотистыми основаниями наблюдается также для ионов марганца и при более высоких концентрациях для ионов кальция ($[Ca^{2+}]/[P] \sim 10$). Эти ионы способны образовывать комплексы с O6 и N гуанина. Они как и ионы

меди, специфичны к ГЦ парам. Ионы марганца образуют предположительно комплекс, располагаясь в малом желобке биополимера, а ионы Ca^{2+} координируют с макромолекулой преимущественно через воду, формируя внешнесферный комплекс, как это предполагалось также по данным рентгеноструктурного анализа. Такое различие в способе связывания этих ионов и обуславливает разницу в гидратации их комплексов с ДНК. Ионы Mn^{2+} и Mg^{2+} уменьшают гидратацию на 3-4 молекулы, так как вытесняют воду из узкого желобка при взаимодействии с сахарофосфатным остовом и наоборот ионы Ca^{2+} , по-видимому, не затрагивают гидратную воду в желобках и образуют внешнесферный комплекс через молекулы воды, что ведет к увеличению количества молекул воды в гидратной оболочке на ~1 молекулу на нуклеотид при $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}]=0.4-1$ и ~4-10 молекул при увеличении молярного соотношения до $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}]\sim 10$, что следует как из пьезогравиометрических, так и из ИК спектральных данных.

Проведен конформационный анализ ДНК в комплексе с исследуемыми ионами и количественно определены интервалы относительных влажностей, в пределах которых наблюдался переход в двухспиральную структуру. Замещение ионами молекул воды при связывании с ДНК уже при невысоких относительных влажностях ведет к тому, что переход ДНК в двухспиральную структуру в комплексе с исследуемыми ионами происходит при более высоком соотношении молекул воды на нуклеотид: $\Delta n=6, 10$ и 15 ± 1 при $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}]=0.4, 10, 20$ и $\Delta n=4$ при $[\text{Mn}^{2+}]/[\text{P}]=0.4-1$ и $\Delta n=4$ при $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]=0.4$ соответственно.

Представлены результаты исследования структуры ДНК животных, подвергавшихся длительному хроническому облучению в зоне Чернобыля. Обнаружены значительные структурные изменения ДНК печени животных, которые содержались в зоне ЧАЭС и подвергались длительному хроническому воздействию ионизирующего облучения. Наблюдается частичное разрушение двухспиральной структуры макромолекул и заметная модификация полос поглощения азотистых оснований, позволяющая сделать вывод о преимущественном повреждении АТ-участков ДНК.

В четвертой главе рассматриваются результаты ИК спектроскопических исследований растворов ДНК в комплексе с ионами двухвалентных металлов и проводится теоретический анализ связывания этих ионов с ДНК на основании экспериментальных данных, полученных в условиях высокой концентрации макромолекул. Предлагаются модели связывания ионов Ca^{2+} , Mn^{2+} и Cu^{2+} с ДНК с учетом межмолекулярного взаимодействия и проводится конформационный анализ комплексов. В частности, в эксперименте наблюдалось

резкое увеличение оптической плотности полос поглощения как фосфатов, так и азотистых оснований в достаточно узком интервале концентраций всех трех ионов, обусловленное предположительно высокой положительной кооперативностью процесса связывания. Природу такой кооперативности можно связывать с межмолекулярным взаимодействием ионов с удаленными участками одной макромолекулы, стимулирующим внутримолекулярную агрегацию и с двумя и более разными нитями ДНК, что приводит к межмолекулярной агрегации и конденсации. Используя выражение для константы связывания ионов с ДНК с учетом положительной кооперативности: $K = K_0 \cdot \exp(\omega \cdot r) \cdot C_f$, где ω - параметр кооперативности, r - степень связывания ионов с ДНК, C_f - концентрация свободных ионов в растворе, можно получить простое уравнение связывания, устанавливающее зависимость степени r от полной концентрации ионов в растворе (D):

$$\frac{r}{(0,5-r)} = K_0 \times \exp(\omega \times r) \times C_f; \quad (1)$$

$$D = C_f + P \times r;$$

Величина параметра кооперативности ω определяется изменением свободной энергии Гиббса системы при связывании иона с полимером:

$$\omega = -\Delta G / RT; \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S;$$

Положительное значение ω , обеспечивающее высокую кооперативность процесса связывания, обусловлено энтропийным фактором, т.е. уменьшением величины ΔS при компактизации макромолекул.

Таблица 1.

ДНК+	K_0, M^{-1}		ω	
	ДУФС, денатур. ДНК	ИК, нативная ДНК	ДУФС, денатур. ДНК	ИК, нативная ДНК
Ca^{2+}	90	0.8	5	6
Mn^{2+}	$8 \cdot 10^3$	6,5	5,6	7
Cu^{2+}	$9 \cdot 10^3$	11	10	12

При больших ω ($\omega > 8$) расчетные изотермы связывания имеют метастабильные участки и абсолютно нестабильные. (с

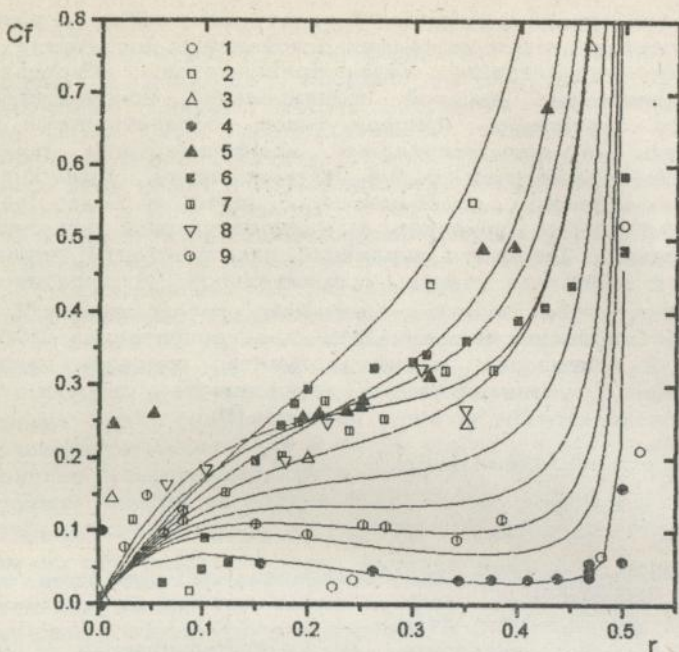


Рис. 1. Изотермы связывания для ионов Cu^{2+} (1,4), Ca^{2+} (2,5) и Cu^{2+} (3,6) с фосфатами (1-3) и азотистыми основаниями (4-6) нативной ДНК ($T \sim 26^\circ\text{C}$, $[\text{Na}^+] = 5 \cdot 10^{-2}$, данные ИК) и однострессовой ДНК ($T \sim 80-90^\circ\text{C}$, $[\text{Na}^+] = 10^{-3}$, данные УФДС); Cu^{2+} (7), Ca^{2+} (8), Cu^{2+} (9). Расчетные изотермы связывания приведены для $K_0=1$ и различных $\omega=5, 6, 7, 8, 9, 10, 12$ (—).
 По оси X: степень связывания ионов с ДНК (r).
 По оси Y: C_f - реальная концентрация свободных ионов двухвалентных металлов в растворе, нормированная к $K_0=1$.

обратной зависимости γ от C_T) и для стабильных комплексов должны быть заменены зависимостями со скачком γ , что эквивалентно фазовому переходу первого рода. В закритической области $\omega < \omega_c$ их характер монотонный. Результаты расчета для полученных в эксперименте данных представлены в таблице 1. Изотермы связывания имеют форму, близкую к окологритическим (рис.1), и близкие значения ω для случая всех ионов (5-6 для Ca^{2+} , 7 для Mn^{2+} , 12 при Cu^{2+}). Они сильно отличаются по величине K_0 , что определяется родством ионов к основаниям ($K_0=0.5-0.7$ для Ca^{2+} , ~ 5 для Mn^{2+} и ~ 11 для Cu^{2+}).

В пятой главе конформационные изменения ДНК при связывании с ионами марганца, меди и кальция исследуются на основании данных Рамановской спектроскопии. Их анализ показал, что все ионы вызывают стабилизацию конформации В-типа, хотя в присутствии ионов меди наблюдается наблюдаются изменения в спектре, характеризующие поворот пуринов вокруг гликозидной связи в сторону суп конформации, что вполне вероятно при образовании хелатных комплексов, предложенных Циммером. Проанализирована структура комплексов и места связывания ионов металлов на биополимере при моделировании взаимодействия с ДНК на примере комплексов ионов металлов с полинуклеотидами.

В заключении сформулированы основные результаты, полученные в диссертационной работе:

1. Установлено, что ионы двухвалентных металлов (Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+}) при взаимодействии с исследуемыми ионами металлов стабилизируют конформацию В-типа. Однако ионы Cu^{2+} вызывают частичное разупорядочение структуры биополимера при $[Cu^{2+}]/[P] \geq 0,45$ в пленках и растворах. Впервые найдено, что при повышении концентрации ионов кальция наблюдается стабилизация $3' \text{-эндо}$ конформации дезоксирибозы и переход в А-форму некоторых участков ДНК.

2. Обнаружено, что ионы Cu^{2+} и Mn^{2+} уменьшают гидратацию ДНК при значениях О.В.=30-70 %. В области, где наблюдается переход в двухспиральную структуру, это уменьшение составляет $\sim 1-2$ молекулы воды на нуклеотид при $[Cu^{2+}]/[P]=0.4$, а для Mn^{2+} ($[Mn^{2+}]/[P]=1$) $\sim 3-4$. В это же время ионы Ca^{2+} увеличивают степень гидратации во всем интервале О.В. уже при $[Ca^{2+}]/[P] \geq 1$ на одну молекулу воды и на $\sim 6-10$ при $[Ca^{2+}]/[P] \geq 10$.

3. Установлено, что переход ДНК в комплексе с исследуемыми ионами в двухспиральную структуру происходит при более высоком содержании молекул воды на нуклеотид: $n=14$, 16 и 12 соответственно. А для образования

двухспиральной структуры комплекса Са-ДНК требуется $n=14, 18, 23.5$ при $[Ca^{2+}]/[P]=0.4, 10, 20$.

4. Экспериментально подтверждена возможность образования ионами Cu^{2+} хелатного комплекса (модель Цаммера) с N7 и O6 гуанина и C2 и N3 цитозина, а также с кислородами фосфатных групп. Ионы Mn^{2+} и Ca^{2+} образуют преимущественно комплексы с фосфатными группами и при повышении концентрации до $[Mn^{2+}]/[P] \geq 0.4$, а $[Ca^{2+}]/[P] \geq 10$ с азотистыми основаниями, в частности, с N7 и O6 гуанина.

5. Впервые наблюдался индуцируемый ионами двухвалентных металлов переход нативной ДНК в компактное состояние, который может быть классифицирован как фазовый переход первого рода. Процесс связывания ионов при этом характеризуется положительной кооперативностью, характер кооперативности универсален для всех ионов.

6. Показано, что структура ДНК животных, подвергавшихся длительному хроническому воздействию ионизирующего излучения в зоне ЧАЭС и получавших пищу с добавками ионов двухвалентных металлов, в значительной степени нарушается. Наблюдаются разупорядочение сахарфосфатного остова, ослабление спирали за счет частичного повреждения водородных связей, поддерживающих двухспиральную структуру. Эти эффекты в случае совместного действия ионов металлов и ионизирующего излучения возрастают.

Публикации. Материалы, вошедшие в диссертационную работу, опубликованы в 20 научных работах, включая пять статей в реферируемых журналах:

1. Благой Ю.П., Корнилова С.В., Леонтьев В.С., Сорокин В.А., Гладченко Г.О., Валеев В.А., Григорьев Д.Н., Капинос Л.Е. Изменение свойств ДНК животных при хроническом воздействии ионизирующего излучения, Доклады академии наук Украины, 10, 1256 (1993).

2. Корнилова С.В., Капинос Л.Е., Благой Ю.П. Изучение взаимодействия ДНК с ионами марганца методом ИК спектроскопии. Молекулярная биология, 27, 6, 1276 (1993).

3. Корнилова С.В., Капинос Л.Е., Благой Ю.П. Изучение взаимодействия ДНК с ионами кальция методом ИК спектроскопии. Молекулярная биология, 28, 3, 574 (1995).

4. Корнилова С.В., Капинос Л.Е., Томкова А., Мишковский П., Благой Ю.П., Вольбух Т.В. Изучение взаимодействия ДНК с ионами меди методом ИК и Рамановской спектроскопии. Биофизика, 39, 3, 423 (1994).

5. Корнилова С.В., Благой Ю.П., Леонтьев В.С., Сорокин В.А., Гладченко Г.О., Валеев В.А., Григорьев Д.Н., Капинос Л.Е., Вондаренко В.Н., Колод В.Ю. Структурные и физико-

химические свойства ДНК из тканей животных, подвергшихся хроническому облучению в Чернобыльской зоне. Биофизика, 39, 4, 637 (1994).

6. Kapinos L.E., Kornilova S.V., Blagoi Yu.P., IR spectroscopic study of divalent metal ion effect on DNA conformation transitions., The Proceed. of 6th Eur. Conf. on the Spectr. of Biolog. Mol., September 3-8, 1995, 351 (1995).

7. Kornilova S.V., Kapinos L.E., Leontiev V.S., Blagoi Yu.P., Spectroscopic investigation of structural changes in DNA under the action of ionizing radiation and metal ions., The Proceed. of 6th Eur. Conf. on the Spectr. of Biolog. Mol., 3-8 September 1995, 352 (1995).

Конкретный вклад диссертанта в разработку научных результатов, выносимых на защиту, заключается в том, что им выполнены:

-экспериментальные исследования пленок и растворов ДНК и полинуклеотидов в комплексе с ионами двухвалентных металлов: кальция, марганца, магния и меди, методами ИК и Рамановской спектроскопии в широком диапазоне относительных влажностей и концентраций;

-выявлены полосы поглощения в ИК и Рамановских спектрах, наиболее чувствительные к взаимодействию нуклеиновых кислот с ионами и изменению конформации при этом;

-проведен анализ спектральных параметров комплексов макромолекул с ионами двухвалентных металлов и определена конформация ДНК в комплексе с ионами кальция, магния, марганца и меди;

-получены изотермы гидратации комплексов ДНК с этими ионами и проанализирована гидратация комплексов на основании как ИК, так и пьезогравиометрических данных;

-предложены модели систем ДНК-ион-вода; проанализированы места связывания ионов кальция, магния, марганца и меди и предложены модели комплексов;

-рассчитаны изотермы связывания ДНК с ионами Cu^{2+} , Ca^{2+} и Mn^{2+} на основании уравнений, предложенных с учетом обнаруженной высокой кооперативности процесса связывания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Благой Ю.П., Галкин В.Л., Гладченко Г.О., Корнилова С.В., Сорокин В.А., Шкорбатов А.Г., Металлокомплексы нуклеиновых кислот. Киев: Наукова думка, 200 с. (1991).
2. Бириштейн Т.М., Птицын О.Б., Конформация макромолекул., М: Наука, 1964, 250 с.

3. Иванов В.И. Двойная спираль ДНК. Молекулярная биология., 22, 1, 691 (1990).
4. Франк-Каменецкий М.Д., Аншелевич В.В., Лукашин А.В., Полиэлектродлитная модель ДНК., Успехи физ. наук, 151, 595 (1987).
5. Скуратовский И.Я., Вартенев В.Н., Исследование магниевой и литиевой соли ДНК фага T2 методом дифракции рентгеновских лучей., Мол. биология, 12, 6, 1359 (1978)
6. Семенов М.А., Вольбух Т.В., ИК спектроскопия проявлений гидратации и конформационного состояния ДНК., Харьков, ИРЭ, М:МГУ, 400 с. (1989).
7. Семенов М.А., Вольбух Т.В., Кашпур В.А., Малеев В.Я., Мревлишвили Г.М., Гидратация и стабильность В-формы Li-ДНК, Биофизика, 39, 1, 50 (1994).
8. Букин В.А., Экспериментальные исследования гидратации ДНК., Молекулярная биология, 21, 3, 615 (1987).
9. Fritzsche H., Infrared spectroscopy and infrared linear dichroism of Nucleic Acids., 242, 245 (1990).
10. Tajmir H.A., Messaoudi S., The effects of monovalent cation Li^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Rb^+ and Cs^+ on the solid and Solution Structures of the Nucleic Acid Components. Metal ion binding and suggest conformation. J. of Biomol. Str. and Dyn., 10, № 2, 345 (1992).
11. Ghomi M., Letellier R., Liquier J., Taillander E., Interpretation of DNA vibrational spectra by normal coordinate analysis, 22, № 1, 691 (1990).

Капінос Лариса Євгенівна. Study on structural transitions of DNA metal complexes by the methods of vibrational spectroscopy.

Thesis to the competition of the candidate's degree of physical and mathematical sciences on speciality 01.04.14 - thermophysics and molecular physics.

B.I.Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, 1995.

7 scientific works are being defended, presenting the results of experimental studies on structural changes of DNA metal complexes.

The effect of Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} and Cu^{2+} on B-A transitions and the hydration of DNA was studied. The intermolecular interactions of the DNA structure was considered, resulting in the aggregation in solution. Isotherms of the ion binding to the macromolecule were calculated, taking into account the high cooperativity of this process. On the basis of the data obtained the models are proposed for the structural behaviour of the systems water-ion-DNA.

Капінос Л.Є. Дослідження структурних переходів металокомплексів ДНК за допомогою методів коливальної спектроскопії.

Дисертація на здобуття вченого ступеню кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 01.04.14 - Теплофізика і молекулярна фізика.

Фізико-технічний інститут низьких температур ім. В.І. Веркіна, Харків, 1995.

Захищається 7 наукових робіт, які містять експериментальні дослідження структурних змін металокомплексів ДНК.

Досліджено вплив іонів Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} та Cu^{2+} на B-A перехід та гідратацію ДНК. Розглядаються межмолекулярні взаємодії металокомплексів ДНК у розчинах, що супроводжується агрегацією. Розраховані ізотерми зв'язування іонів з макромолекулою з урахуванням високої кооперативності цього процесу. На підставі цих результатів пропонуються моделі структурної поведінки систем вода-іон-ДНК.

Ключові слова:

ДНК, іони металів, конформаційний стан, ІЧ і Раманівська спектроскопія, ступень зв'язку, іон-гідратна оболонка.

Ответственный за выпуск — кандидат физ.-мат. наук Рубин Ю.В.

Подписано к печати 02.10.95

Физ. п. л. I, I. Уч.- изд. п. л. I, I

Тираж 100. Зак. 38. Бесплатно.

Ротапринт Физико-тех. института низ. темп.,
Харьков-№164, пр. Ленина, 47

1855, 1856, 1857

44611

AB 33.222