

П-327426

ISSN 0453-8048

K-14038

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ УКРАЇНИ

Вісник Харківського університету № 466

Біофізичний Вісник

3199

Biophysical Bulletin

1999

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ

В редакцію подається рукопис українською, російською або англійською мовою у двох екземплярах з направленням установи і експертним висновком. Рукописи, які подаються до редакції, повинні точно відповідати наступним вимогам.

Текст друкується на білих аркушах формату А4, через один інтервал, з високою якістю друку, придатною для фотокопіювання (рекомендується лазерний або струйний принтер). Використовується редактор MS Word, шрифт Times New Roman (Сут), розмір шрифту 10 pt., вирівнювання тексту по ширині. Поля справа і зліва по 2,5 см, зверху 3 см, знизу 2 см. Сторінки нумеруються послідовно на зворотному боці аркуша олівцем.

Математичні та хімічні символи, рівняння і формули вводяться до тексту статті за допомогою комп'ютерної техніки. Рисунки, у вигляді повністю придатному до репродукції, вставляються до тексту в межах площі сторінки, вказаної вище. Рисунки виготовляються з використанням комп'ютерної техніки або виконуються тушшю на білому папері з друкованими цифрами і буквами на осях. Підписи під рисунками друкуються шрифтом 9 pt. Формули, таблиці й рисунки нумеруються послідовно арабськими цифрами, наприклад, (1); Табл. 1; Рис. 1.

Послідовність розміщення матеріалу:

На першій сторінці зверху пропускаються два рядка; на третьому рядку в лівому верхньому куті друкується УДК (курсив, 9 pt.). Потім, після пропуску одного рядка, розміщується назва статті (прямий напівжирний шрифт, 12 pt., всі букви прописні, вирівнювання по центру). Після пропуску одного рядка друкуються спочатку ініціали, потім прізвища авторів (прямий напівжирний шрифт, 12 pt., вирівнювання по центру). На наступному рядку друкуються повні назви й адреси установ, де виконувалась робота (курсив, 9 pt., вирівнювання по центру), адреса електронної пошти друкується за бажанням авторів. Потім вміщується дата надходження статті до редакції: число-цифра, місяць-прописом, рік-цифра (шрифт прямий, 9 pt., вирівнювання по центру).

Після пропуску одного рядка вміщується реферат статті, не менше 6 і не більше 12 рядків, з коротким викладом об'єкту дослідження, мети або задач, методичних підходів, використаних у роботі, та основних результатів і висновків. Слово "реферат" не пишеться (для тексту реферату використовується прямий шрифт розміром 9 pt.). На наступному рядку вміщуються 5-8 ключових слів (9 pt., заголовок "КЛЮЧОВІ СЛОВА:" пишеться прописом на тому ж рядку, що й ключові слова і виділяється напівжирним шрифтом).

Текст реферату і ключові слова мають ширину на 1 см меншу, ніж основний текст (по 0,5 см з кожного боку).

Потім, після пропуску одного рядка, вміщується основний текст статті. Абзаци починаються з червоного рядка (0,75 см). Рекомендується розбиття статті на такі розділи: вступ (назва розділу не пишеться), **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** (обов'язково для експериментальних робіт), **РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ**, **ВИСНОВКИ**. Для теоретичних робіт передбачається більш вільне розташування матеріалу, наприклад, замість розділу **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** рекомендуються розділи **ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ**, **МОДЕЛЬ** та ін. Розділи не нумеруються (в назвах розділів усі букви прописні і виділяються напівжирним шрифтом, вирівнювання по центру). При необхідності розділи поділяються на підрозділи. Назви підрозділів пишуться з великої букви і виділяються напівжирним шрифтом (вирівнювання по центру). Після кожного розділу або підрозділу іде один пустий рядок. Після назв розділів і підрозділів крапка не ставиться.

У кінці тексту статті, після пропуску одного рядка, якщо необхідно, зазначається назва фонду, який фінансував роботу, і номер гранту.

Використані в роботі літературні джерела нумеруються в порядку цитування в тексті, номер посилання пишеться у квадратних дужках. Не допускаються посилання на неопубліковані роботи. Список літератури (шрифт 9 pt.) розміщується одразу за основним текстом статті й виділяється як розділ.

На окремому аркуші з полями справа і зліва по 2,5 см, зверху 3 см, знизу 2 см до статті додається реферат англійською мовою. Слово "Abstract" не пишеться. Назва статті: прописом, шрифт прямий 10 pt., напівжирний, вирівнювання по центру. На наступному рядку - ініціали та прізвища авторів (шрифт прямий 10 pt., напівжирний, вирівнювання по центру). На наступному рядку друкується повна назва організації та її адреса (курсив 9 pt., вирівнювання по центру). Після пропуску одного рядка вміщується текст реферату (шрифт прямий 9 pt., вирівнювання по ширині, без червоного рядка). На наступному рядку після слів "KEY WORDS:" (прописом, шрифт прямий напівжирний, 9 pt.) вміщуються ключові слова (шрифт прямий 9 pt., вирівнювання по ширині).

Для статей написаних англійською мовою, крім окремого реферату англійською мовою, у кінці статті, після списку літератури наводиться реферат українською мовою за тими ж правилами.

Зверніть увагу на компактне викладення матеріалу статті, бо друкування журналу здійснюється на підставі самофінансування.

Рукописи оформлені не у відповідності до наведених правил не розглядатимуться.

**Харків
1999**

УДК 577.3

Від редакції:

Шановні читачі та автори !

Випуск журналу "БІОФІЗИЧНИЙ ВІСНИК" є новою серією "Вісника Харківського університету" (ISSN 0453-8048). ерідичність журналу – від двох до чотирьох разів на рік у залежності від набору матеріалу.

"БІОФІЗИЧНИЙ ВІСНИК" публікує огляди, статті та короткі повідомлення, які містять оригінальні результати вирішення фізико-математичних проблем, що відносяться до біологічних систем різного рівня організації, методами експериментальної, теоретичної фізики та математичного моделювання. Журнал має традиційні для біофізики підрозділи: МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА, БІОФІЗИКА КЛІТИНИ, БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ, ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОБ'ЄКТИ.

До публікації приймаються статті, що написані українською, російською чи англійською мовами згідно з правилами для авторів і мають позитивні рекомендації двох рецензентів, яких призначає редакція.

Журнал розрахований на науковців, викладачів вузів, аспірантів, студентів, що працюють у галузі біофізики, чи цікавляться біофізичними проблемами.

Запрошуємо до плідного співробітництва!

Редакційна колегія

д.ф.-м.н., проф. Малєєв В.Я. – відповідальний редактор

д.ф.-м.н. Благой Ю.П.
д.б.н. Бондаренко В.А.
д.б.н. Гордієнко Є.О.
д.ф.-м.н. Казанський В.Б.
д.б.н. Моїсєєв В.О.

д.ф.-м.н. Осецький О.І.
д.б.н. Перський Є.Е.
д.ф.-м.н. Семенов М.О.
д.ф.-м.н. Сорокін В.О.
д.ф.-м.н. Товстяк В.В.

Відповідальний секретар: к.б.н., доц. Гаташ С.В.

Друкується за рішенням вченої ради Харківського національного університету ім В.Н. Каразіна протокол № 11 від 24.12.99

Адреса редакційної колегії: 310077, м. Харків, пл. Свободи, 4,
Харківський національний університет, кафедра молекулярної та прикладної біофізики,
тел.: (0572)-457576, e-mail: Sergiy.V.Gatash@univer.kharkov.ua

© Харківський державний університет, 1998

© Гаташ С.В., 1998 – оформлення

Центральна наукова бібліотека
ХНУ ім. В.Н.Каразіна

ISSN 0453-8048

MINISTRY OF EDUCATION OF UKRAINE

Visnyk Kharkivskogo universytetu
№ 466, 1999

BIOPHYSICAL BULLETIN

Founded in 1998

Issue 5(3)

Kharkiv
1999

Dear readers and authors:

Biophysical Bulletin is a new series of *Visnyk* of V.N.Karazin Kharkiv National University. The periodicity of the journal varies from two times per year depending on the number of the papers submitted.

The journal publishes reviews, articles, and short communications, that contain original results of solution of physical and mathematical problems corresponding to biological systems of various levels of organization by using the methods of experimental and theoretical physics and biology and mathematical modelling. The journal contains sections, which are traditional for biophysics: MOLECULAR BIOPHYSICS, CELL BIOPHYSICS, BIOPHYSICS OF COMPLEX SYSTEMS, ACTION OF PHYSICAL AGENTS ON BIOLOGICAL OBJECTS.

Contributions should be written in English, Ukrainian or Russian according to the Instructions for Authors and would be accepted for publication after the approval of two reviewers appointed by the editors.

You are welcome for fruitful cooperation !

Editorial Board

D.Sc., Prof. Maleev V.Ya. – *Editor-in-Chief*

D.Sc. Blagoi, Yu.P.

D.Sc. Bondarenko, V.A.

D.Sc. Gordienko, Ye.A.

D.Sc. Kazanskiy, V.B.

D.Sc. Moiseev V.A.

D.Sc. Osetskiy A.I.

D.Sc. Perskiy Ye.Ye.

D.Sc. Semenov M.A.

D.Sc. Sorokin V.A.

D.Sc. Tovstiak, V.V.

Executive Secretary: Ph.D., Assoc. Prof. Gatash S.V.

Address:

Chair of Molecular and Applied Biophysics

Radio Physics Department

V.N.Karazin Kharkiv National University

4 Svobody Sq.,

61077, Kharkov, Ukraine,

phone: 38 0572 45 75 76, e-mail: Sergiy.V.Gatash@univer.kharkov.ua

ЗМІСТ

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

- Zozulya V.N., Shcherbakova A.S., Blagoi Yu.P.* Effect of Mg^{2+} on double and triple helix formations between poly(dA) and poly(dT) 7
- Данилов В.И.* Влияние гидратации на таутомерию оснований нуклеиновых кислот: компьютерное моделирование методом Монте-Карло 11
- Шестопалова А.В., Анищенко Д.Б., Малеев В.Я.* Изучение гидратации различных структурных форм полирибонуклеотида и ее компонентов методом Монте-Карло. 2. Влияние протонирования на гидратацию ассоциатов цитозина 15
- Степаньян С.Г.* Колебательный анализ Уотсон-Криковской пары аденин-урацил. Неэмпирическое квантовохимическое исследование 21
- Kashpur V.A., Semenov M.A., Sagaidakova N.N.* Relaxation and spectroscopic manifestations of hydration of polyribocytidylic acid 29
- Sorokin V.A., Valeev V.A., Degtiar M.V., Gladchenko G.O., Blagoi Yu.P.* Interaction of Ni^{2+} ions with homopolynucleotides containing adenine and uracil and their monomers 33
- Рубин Ю.В.* Влияние гидратации на таутомерию 6-тиогуанина 38
- Гаврик В.А., Ромоданова Э.А., Дюбко Т.С., Гаташ С.В.* Влияние режимов замораживания на взаимодействие фибриногена с флуоресцентным зондом ДСМ 41
- Глибицкий Г.М.* Свойства раствора глицина в интервале температур 20°-70°С по данным СВЧ-диэлектromетрии и вискозиметрии 44

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

- Зима А.В., Повстан А.В., Шуба М.Ф.* Кальцийзависимые калиевые каналы большой проводимости в мембране гладкомышечных клеток *Taenia coli* морской свинки 47
- Безуглый Н.Д., Трохименко А.Г.* Изучение проницаемости цитоплазматических мембран к воде и энергии активации переноса воды через клеточную мембрану 52
- Останков М.В., Костяев А.А.* Численное моделирование процесса удаления криопротектора из клеточной суспензии 56

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

- Шестопалов В.П.** О возможном сценарии пространственно-временной эволюции самоорганизующихся биологических сред 61
- Колобов А.В., Полежаев А.А., Соляник Г.И.** Роль клеточной подвижности в явлении доминирования метастатически активных клеток в опухоли 72
- Ляховецький Р.В., Палатний Т.П., Коробко Т.В., Ляховецький В.Р., Зима В.Л.** Моделювання рецептивних полів клітин зорового аналізатора 76

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІООб'єкти

- Финашин А.В., Ткаченко В.Н., Товстяк В.В.** Исследование пострadiaционных изменений активности микросомальных оксидоредуктаз в присутствии мембранотропных агентов 83
- Корнилова С.В.** Влияние длительного хронического облучения в зоне Чернобыля на структуру ДНК 92
- Кузьмис А.Э., Гарбузенко О.Б., Перский Е.Э., Утевская Л.А.** Молекулярные механизмы формирования вязко-упругих свойств соединительной ткани под действие внешнего механического напряжения 99
- Круглова Е.Б., Гладковская Н.А.** Спектрофотометрический анализ кривых плавления смесей биологически активных нуклеозидов с ДНК как метод изучения повреждений в молекулах ДНК 103
- Батюк Л.В., Гаташ С.В.** Влияние рентгеновского облучения и радипротектора альтана на резистентность эритроцитов 108
- Емец Б.Г.** Влияние низкоинтенсивного СВЧ-излучения на эффективную толщину неперемешиваемого слоя воды, примыкающего к мембране эритроцита 112
- Юрий Павлович Благой.** К 70- летию со дня рождения 116
- Abstracts** 118

УДК 577.3

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

EFFECT OF Mg^{2+} ON DOUBLE AND TRIPLE HELIX FORMATIONS BETWEEN POLY(dA) AND POLY(dT)**V.N. Zozulya, A.S. Shcherbakova, Yu.P. Blagoi***Institute for Low Temperature Physics and Engineering, Ukrainian Academy of Sciences,
Kharkov, 310164, Lenin Ave. 47, Ukraine.*

Received: November 29, 1999

The Mg^{2+} ion effect on conformational transitions in double- and triple-helical structures formed by poly(dA) with poly(dT) has been studied in 10 mM cacodylate buffer, pH 7, containing 0.1 M Na^+ . The investigations were carried out by the method of thermal denaturation using UV absorbance and Rayleigh light scattering detections of melting transitions. Temperatures of helix-to-coil transition of poly(dA)·poly(dT) and triplex-to-duplex of poly(dA)·2poly(dT) increase linearly with $\log[Mg^{2+}]$ and more quickly in the last case that results in superposition of these transitions at $[Mg^{2+}] \geq 15$ mM. At $[Mg^{2+}] \geq 20$ mM during the melting of the both structures aggregation was observed, which arised, according to Bloomfield and co-workers, due to formation of cross-links by Mg^{2+} ions bridges between partially unplaited polymer strands and disappeared after the end of melting. It is established that at the presence of 0.1 M NaCl magnesium ions do not induce the partial formation of the triplex structure in poly(dA)·poly(dT) (disproportionation) as is postulated by other authors in some papers.

KEY WORDS: polynucleotides, double and triple helices, magnesium ions, helix-to-coil transitions, Rayleigh scattering

Up to now the effect of Mg^{2+} ions on the stability of duplex and triplex structures and conformational transitions of nucleic acids has not been completely studied. It has been shown [1] that Mg^{2+} ions stabilize the DNA duplex but at increased concentration they induce also the polymer aggregation during the process of helix-to-coil transition. Because of the completeness of the phenomenon, it is worth-while to study similarly more simple systems with synthetic polynucleotides. In one of such works [2] using calorimetric measurements it was studied the Mg^{2+} ion effect on the helix-to-coil transition of poly(dA)·poly(dT) but gave no attention to the possible occurrence of polymer aggregation. The other authors [3] studied by absorption spectroscopy the Mg^{2+} ion effect on the transition of poly(dA)·poly(dT) duplex as well as of poly(dA)·2poly(dT) triplex, but the scanty information was obtained. The aim of the present work was detailed study of the Mg^{2+} ion effect on conformational transitions of duplex and triplex structures formed by poly(dA) with poly(dT) at the physiological Na^+ ion concentration.

MATERIALS AND METHODS

Sodium salts of poly(dA)·poly(dT) and poly(dT) were purchased from Sigma Chemical Co. and other chemicals used were of analytical grade. For all the experiments 10 mM sodium cacodylate buffer, pH 7, containing 0.1 M NaCl was used as a solvent. The required concentration of Mg^{2+} ions was created by addition of $MgSO_4$. Polynucleotide concentrations were determined by UV absorbance, using extinction coefficients of $12000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for poly(dA)·poly(dT) and $8460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for poly(dT) at 260 nm and the temperature of 25 °C.

Thermal denaturation profiles for the polynucleotides were obtained by registration of the absorbance change at 260 nm as a function of temperature. To investigate aggregation processes, the temperature dependence of Rayleigh scattering of light was measured at a right angle to incident beam, at 540 nm. Absorption melting experiments were carried out on SPECORD UV/VIS spectrophotometer (VEB Carl Zeiss, Jena). Rayleigh scattering was measured by the method of photon counting on a laboratory spectrofluorimeter constructed on the basis of a double monochromator DFS-12 (Russia). Absorbance and light scattering were measured in the same 1.0×0.2 cm quartz cuvette. The cuvette was inserted into a copper holder which was heated by a computer-operated Peltier element. Moreover, a personal computer collected the melting data. Melting experiments were carried out at a heating rate of 1 °C/min.

RESULTS AND DISCUSSION

Figs. 1 and 2 show melting curves for poly(dA)·poly(dT) and poly(dA)·2poly(dT) in buffer solution with 0.1M NaCl without Mg^{2+} ions and at different Mg^{2+} concentrations. It is seen from Fig. 1 that for poly(dA)·poly(dT) the only sharp double-helix-to-coil transition (2→1) is realized, shifting to high temperatures with the increase

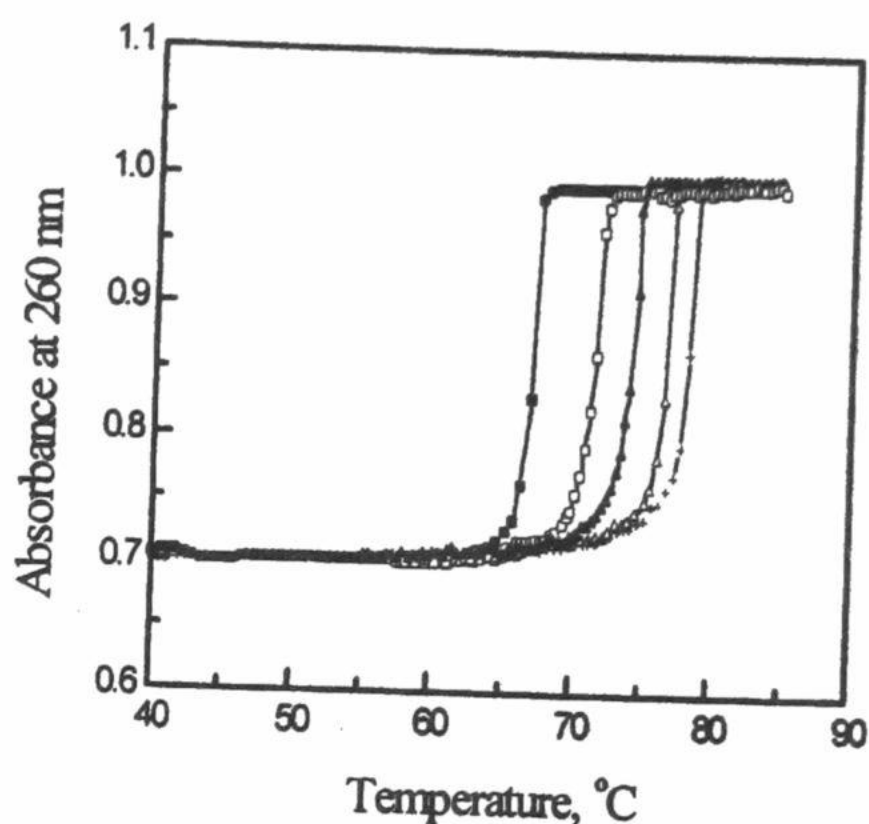


Fig.1. Thermal denaturation profiles of poly(dA)·poly(dT) in 10 mM cacodylate buffer, pH 7, at 0.1 M NaCl alone (■) and with different concentration of added Mg^{2+} ions: (□) 1mM, (▲) 2mM, (Δ) 5mM, (+) 10mM. The polymer concentration was 55 μ M in base pairs.

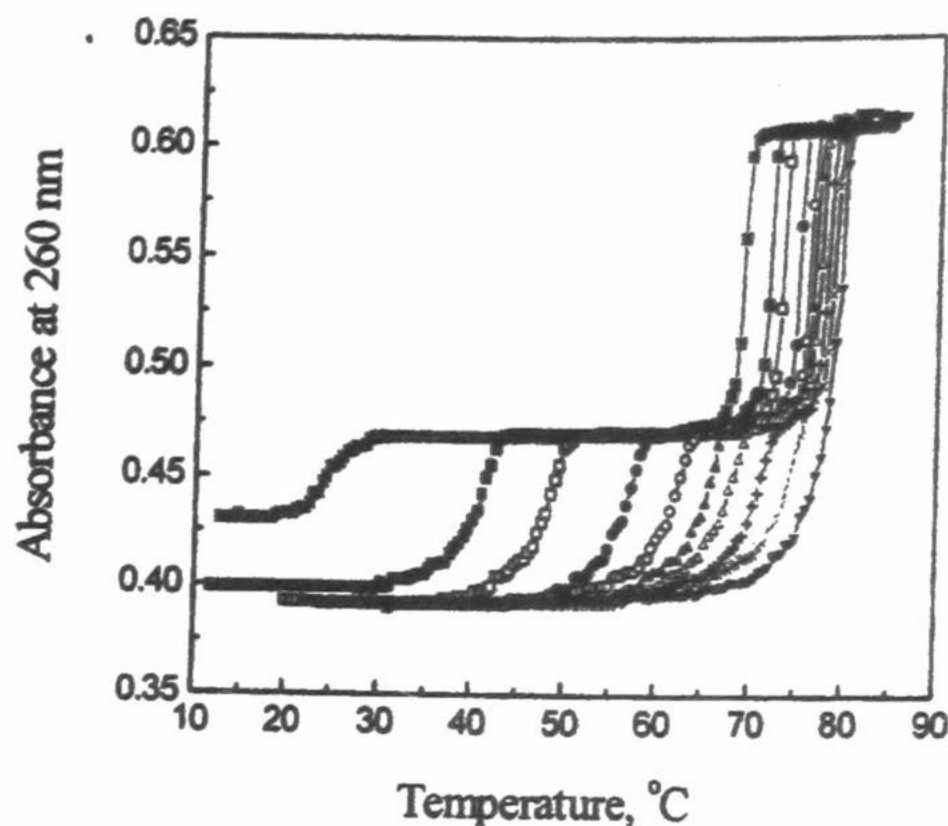


Fig.2. Thermal denaturation profiles of poly(dA)·2poly(dT) in 10mM cacodylate buffer, pH 7, at 0.1 M NaCl alone (*) and with different concentration of added $MgSO_4$: (■) 0.5mM, (□) 1 mM, (●) 2 mM, (o) 3 mM, (▲) 4 mM, (Δ) 5mM, (+) 7 mM, (x) 10 mM, (▼) 15 mM. The polymer concentration was 110 μ M in base triplets.

in Mg^{2+} concentration. For the triplex system poly(dA)·2poly(dT) two transitions are observed (Fig. 2). The low temperature transition characterizes the separation of poly(dT) strand bound with poly(dA)·poly(dT) by Hoogsteen hydrogen bonds (transition 3→2) while the high temperature transition corresponds to melting of poly(dA)·poly(dT) itself (2→1). Hyperchromicity following the triplex melting in the absence of Mg^{2+} ions, lower than that in the presence of the ions, evidences the incompleteness of the triplex structure formation at 0.1M NaCl. However, Mg^{2+} ions added, beginning with 1 mM concentration, promote the complete attachment of poly(dT) to poly(dA)·poly(dT). As Figs. 1 and 2 show, Mg^{2+} ions increase temperatures of the both transitions but for the transition 3→2 this effect is essentially higher than for the transition 2→1. This results in the fact that at $[Mg^{2+}] \approx 15$ mM the both transitions merge into one continuous transition from the triplex structure to disordered strands.

At $[Mg^{2+}] \geq 20$ mM a strong increase of Rayleigh light scattering was observed during the melting process both for the double- and triple-helical polymers that was not yet observed at 15 mM Mg^{2+} (Fig. 3). In this case absorption melting curves become two-phase and the temperature interval of the transition broadened. This is due to arising of turbidity in the solution (that was well observed visually), which contributes into the absorption increase. It is remarkable that the scattering intensity increased with the temperature rise to a value approximately corresponding to the temperature of the transition midpoint (T_m) after which it decreased sharply at the transition end. Some "steps" on absorption melting curves induced with the absorption increase due to the medium turbidity are observed in the region of this point (Fig. 3). On cooling down to the room temperature the systems studied returned to the starting structure that was evidenced by the absorption data. But at $[Mg^{2+}] \geq 30$ mM for the poly(dA)·2poly(dT) system and at $[Mg^{2+}] \geq 50$ mM for poly(dA)·poly(dT) system ordinary aggregation was observed already at the room temperature, resulting in the precipitation of the polymers.

Arising of the turbidity in the melting process was observed in the work [1] in the case of thymus DNA in the presence of some divalent metal ions. The authors explained this phenomenon with "net aggregation" caused by ionic bridge cross-linking between partially unwound different DNA strands. However, the bridges break after the complete melting of the double-strand polymer structure. Such an interpretation based on theoretical calculations [4, 5] suits completely our case. The work [4] shown that the divalent cation-induced decrease of the free energy on cross-linking is significant and is about 35% of the free energy change on stacking of nucleotide bases. The work [2] studied by calorimetry interactions of poly(dA)·poly(dT) with Mg^{2+} ions, and in the concentration range of 30-50 mM the bands in d.s.c. curves in the premelting region were registered. The bands being assigned to the formation of the triple-helical structure (disproportionation) as intermediates in the melting process. But, in our opinion, these bands evidence the occurrence of the "net

Effect of Mg^{2+} on double and triple helix formations...

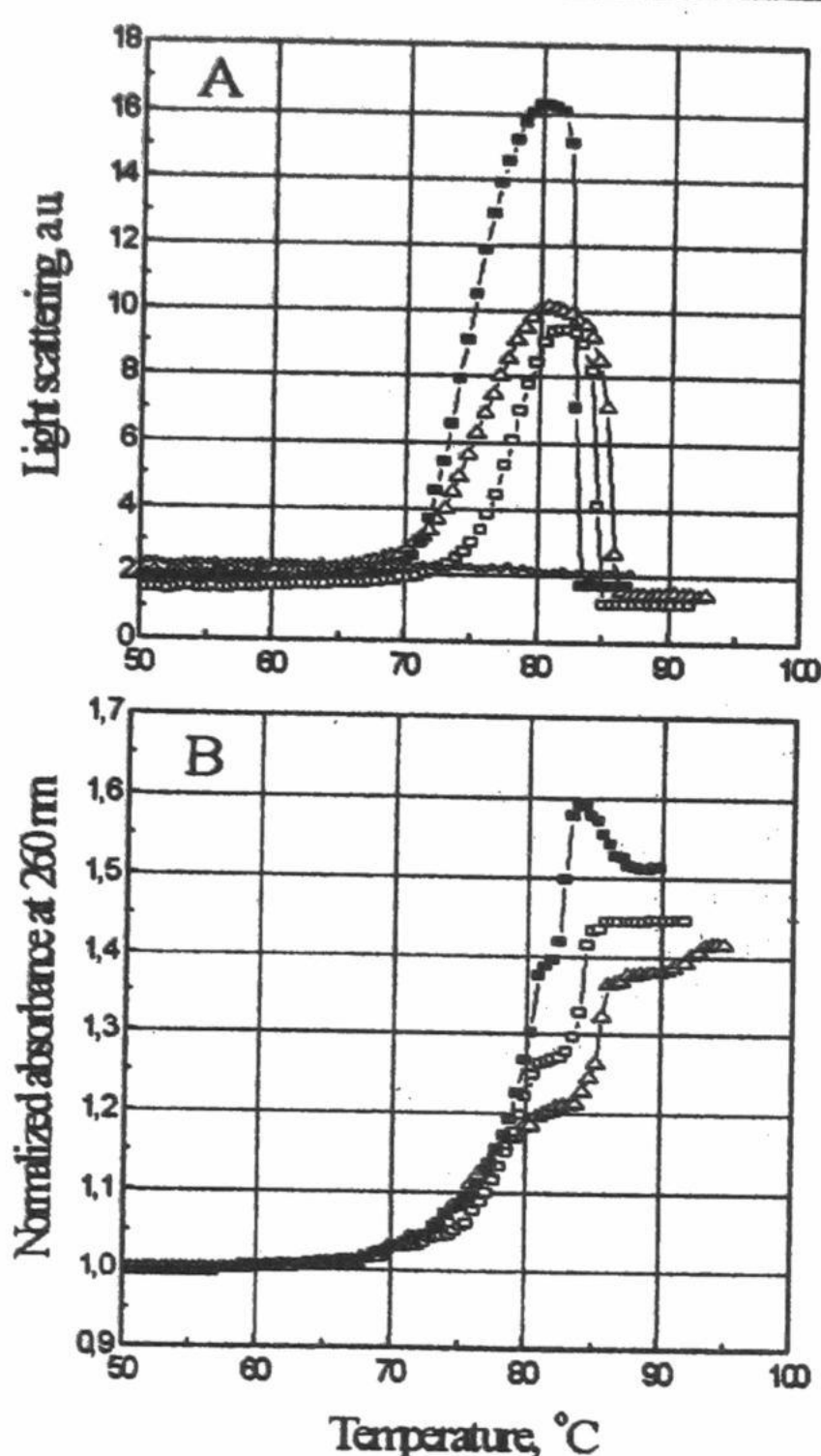


Fig.3. Temperature dependence of the light scattering at 540 nm (A) and absorbance at 260 nm (B) measured in the buffer containing 0.1M NaCl for poly(dA)·poly(dT) with 20mM (□) or 30mM (Δ) Mg^{2+} and for poly(dA)·2poly(dT) at 15mM (○) or 20mM (■) Mg^{2+} . Concentrations of the polymers were as in Figs. 1 and 2.

At $[Mg^{2+}] \approx 15$ mM the both dependencies are crossing. This means that at high magnesium ion concentration the duplex and triplex formations melt simultaneously. Fig.4. shows data from the work [2] about the Mg^{2+} effect on the transition 2→1, obtained from calorimetric measurements, but at low Na^+ ion concentration in solutions (PIPES buffer). In this case the T_m versus $\lg[Mg^{2+}]$ plot is steeper than that in our case, that evidences the enhancement of Mg^{2+} effect on T_m with decreasing in sodium ion concentration.

The data obtained for Mg^{2+} effect can be explained by model theory of Crothers [6] and Frank-Kamenetskii [7], where the change in T_m of helix-to-coil transition is expressed by the equation

$$\Delta T_m = (RT_0 T_m / \Delta H) \ln \left[(1 + K_2 c)^{B_2} / (1 + K_1 c)^{B_1} \right] \quad (1)$$

where ΔH is the transition enthalpy, T_0 and T_m are the melting temperatures of the transition in the absence and presence of a ligand respectively, K_2 and K_1 are binding constants of the ligand with native and melted polymer, B_2 and B_1 are the number of phosphate groups per one bound ion, c is the ligand concentration.

If K_2 and K_1 are independent on c and $K_2 c \gg 1$, $K_1 c \gg 1$ then from (1) one can obtain

$$\partial(\Delta T_m) / \partial(\ln c) = (RT_0 T_m / \Delta H) [B_2 - B_1] \quad (2)$$

Equation (2) explains the linearity of T_m versus $\lg[Mg^{2+}]$ plots (Fig.4). Because of ΔH for the 3→2 transition is about threefold less than that for 2→1 [8], the steeper dependence for the first transition in comparison with that for the second one is observed.

aggregation" that was revealed in our experiments under the same conditions. This conclusion is confirmed by the fact that, for example, at 30 mM Mg^{2+} the temperature value at the maximum of the pretransition band on d.s.c. curve, 75 °C, established in this work coincides with the maximum of derivative for an ascending branch of light scattering intensity curve obtained in our work.

Obtained in our work T_m values for the 2→1 transition of poly(dA)·poly(dT) at the presence of 2 mM and 5 mM of Mg^{2+} are in well accordance with data obtained by absorption method in [3]. However, in contrast to our work, the authors in [3] have also observed the 3→2 transition in addition to the 2→1 one (Fig.1). They have postulated that at the indicated concentrations Mg^{2+} ions induce a disproportionation of stoichiometric poly(dA)·poly(dT). However, our attention has been drawn to the fact that the authors in [3] have used lower molar extinction coefficient $E_{257} = 8600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in the measurements of the poly(dA) concentration on the mixing poly(dA) with poly(dT) at the sample preparation. Because of this the molar ratio 1:1 was not ensured, which probably lead to the partially formed triplex structure.

Fig. 4 demonstrates the variation of the temperature of the transition midpoint for 2→1 and 3→2 with magnesium ion concentration in the range 0-15 mM, where the aggregation did not arise. As can be seen, it is fitted well by linear dependence on $\lg[Mg^{2+}]$ for the both transitions.

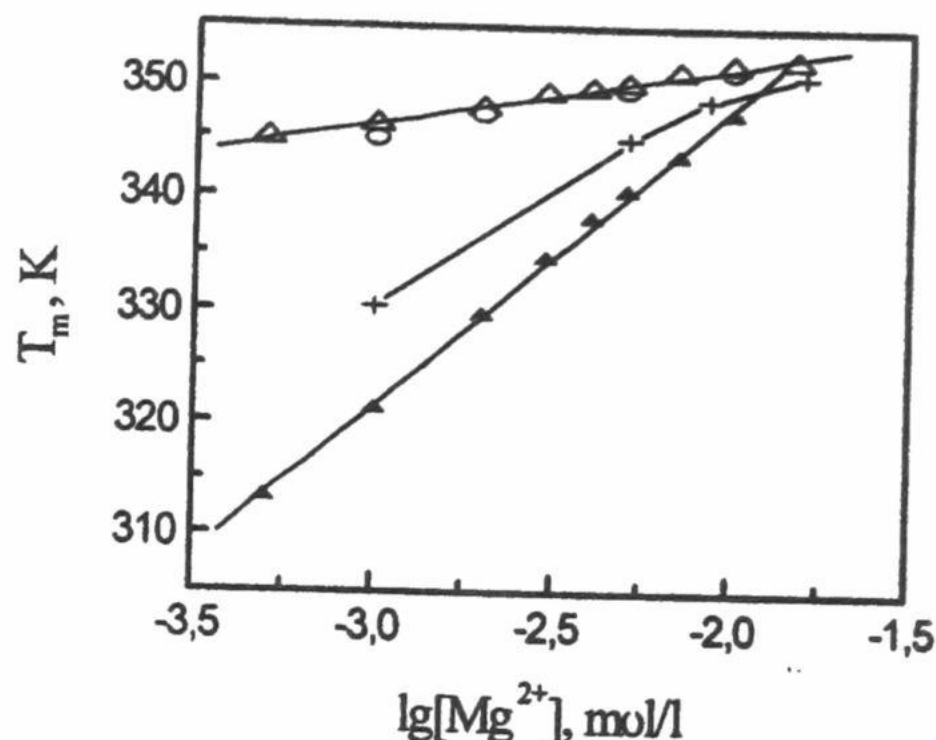


Fig.4. Effect of Mg^{2+} on the temperature at transition midpoints (T_m) for double- and triple-stranded complexes formed between poly(dA) and poly(dT): T_m^{2-1} determined from Fig.1 (o) and Fig.2 (Δ); T_m^{3-2} determined from Fig.2; (+) are the data of Hopkins et al. [2] calorimetrically derived for poly(dA)-poly(dT) in aqueous PIPES buffer (+).

CONCLUSIONS

At the physiological concentration of sodium ions Mg^{2+} stabilizes double- and triple-helix structures formed by poly(dA) with poly(dT). Temperatures of duplex-random coil and triplex-duplex transitions increase linearly with $\lg[Mg^{2+}]$ and more quickly in the second case that results in superposition of the both transitions at the determined concentration of Mg^{2+} ions. This was observed in the present work at $[Mg^{2+}] \geq 15$ mM for poly(dA)-2poly(dT) with the concentration of 100 μ M base triplets. At high molar ratios Mg^{2+} / polynucleotide (in our case it is more than 200). During melting of the polymers aggregation is occurred due to formation of cross-links by Mg^{2+} bridges between partially unplaited polymer strands. It is established that at the presence of 0.1 M NaCl magnesium ions do not induce the partial formation of the triplex structure in poly(dA)-poly(dT) (disproportionation) as is postulated by other authors in some papers.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Government of Ukraine and U.S. Civilian Research and Development Foundation for the Independent States of the Former Soviet Union (Award № UN 1-435).

REFERENCES

1. Duguid J.G., Bloomfield V.A., Benevise J.M. and Thomas G.J.Jr. // *Biophys. J.* 1995. V.69. P.2623-2640.
2. Hopkins H.P., Hamilton D.D., Wilson W.D. // *J. Chem. Thermodynamics*. 1993. V.25. P.111-126.
3. Sehlstedt U., Aich P., Bergman J., Vallberg H., Norden B. and Graslund A. // *J. Mol. Biol.* 1998. V.278. P.31-56.
4. Duguid J.G. and Bloomfield V.A. // *Biophys. J.* 1995. V.69. P.2642-2648.
5. Shibata J.H. and Schurr J.M. // *Biopolymers*. 1981. V.20. P.525-549.
6. Crothers D.M. // *Biopolymers*. 1971. V.10. P.2147.
7. Anshelevich V.V., Vologodskii A.V., Lukashin A.V. and Frank-Kamenetskii M.D. // *Biopolymers*. 1984. V.23. P.39-58.
8. Pilch D., Brouseau R. and Shafer R.H. // *NAR*. 1990. V.18. P.5743-50.

ВПЛИВ ІОНІВ Mg^{2+} НА ДВОХ- ТА ТРЬОХСПІРАЛЬНІ ФОРМУВАННЯ МІЖ POLY(dA) ТА POLY(dT)

В.М. Зозуля, А.С. Щербакова, Ю.П. Благой

Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна Національної Академії Наук України
Харків, 310164, пр. Леніна 47, Україна.

Вивчено вплив іонів Mg^{2+} на конформаційні переходи у двох- та трьохспіральных структурах, сформованих між poly(dA) та poly(dT) у 10 mM какодильному буфері, pH 7, що містить 0.1 M Na^+ . Дослідження проведено методом термічної денатурації з використанням УФ спектроскопії та релєйського розсіювання світла для отримання кривих плавлення. Температури переходів спіраль-клубок для poly(dA)-poly(dT) та триплекс-дуплекс для poly(dA)-2poly(dT) лінійно підвищуються з $\lg[Mg^{2+}]$, та більш швидко в останньому випадку, що призводить до злиття переходів при $[Mg^{2+}] \geq 15$ mM. При $[Mg^{2+}] \geq 20$ mM впродовж плавлення обох структур було виявлено агрегацію, що виникала, згідно Блумфілду та співавторам, із-за поперечних зшивок, що формуються мітками іонів Mg^{2+} між частково розплетеними ланцюгами полімеру, та зникала в кінці плавлення. Виявлено, що в присутності 0.1 M NaCl іони магнію не індують виникнення частково сформованих триплексних структур у poly(dA)-poly(dT) (диспропорційність), як постульовано іншими авторами в деяких роботах.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: полінуклеотиди, подвійні та потрійні спіралі, іони магнію, перехід спіраль-клубок, релєйське розсіювання світла

УДК 577.2:577.323.425:577.323.427

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

ВЛИЯНИЕ ГИДРАТАЦИИ НА ТАУТОМЕРИЮ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ: КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕТОДОМ МОНТЕ-КАРЛО

В.И. Данилов

Институт молекулярной биологии и генетики, Национальная Академия Наук Украины,
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

Поступила в редакцию 17 ноября 1999 г.

Проведено экстенсивное компьютерное моделирование гидратации оснований нуклеиновых кислот и их основных таутомерных форм методом Монте-Карло. Показано, что в воде лактамная форма гуанина и аминная форма цитозина энергетически более предпочтительны, чем их лактимная и иминная формы соответственно. Большая стабильность в водном кластере обычных форм этих оснований по сравнению с их редкими таутомерными формами целиком обусловлена энергетически более выгодным взаимодействием молекул воды друг с другом. В то же время обнаружено, что иминная форма аденина и лактимная форма тимина и урацила более стабильны, чем соответствующие аминная и лактамная формы. Этот факт определяется более выгодным взаимодействием редких форм оснований с водой.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нуклеотидные основания, таутомерия, гидратация, метод Монте-Карло, компьютерное моделирование

Возникновение точечных спонтанных мутаций частично связывают с существованием редких таутомерных форм пуриновых и пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот и, как следствие этого, образованием ошибочных (не уотсон-криковских) пар оснований. Поэтому весьма важным является знание относительных стабильностей таутомерных форм нуклеотидных оснований и родственных модельных систем.

Для того, чтобы оценить относительные стабильности таутомерных форм оснований в последние годы было выполнено большое количество экспериментальных и теоретических работ (см., например, обзоры [1-4]). Теоретические исследования были проведены для изолированных оснований (оснований в вакууме), т.е. в отсутствии межмолекулярного взаимодействия между основаниями и их окружением. Результаты таких расчетов следует сравнивать с данными экспериментального изучения ИК-спектров оснований, изолированных в инертных матрицах [3]. В то же время подавляющая часть экспериментальных данных была получена в растворах и твердой фазе [1]. В этом случае изучение действия окружения на относительные стабильности таутомеров обычно проводилось в рамках взаимодействия полярной системы с непрерывной диэлектрической средой (см., например, [5]).

Однако для исследования стабильности таутомеров в растворах необходимо изучить взаимодействия растворитель-растворитель, растворитель-растворенное вещество и растворенное вещество-растворенное вещество на молекулярном уровне. Правильное описание влияния сольватации на таутомерию оснований должно рассматривать взаимодействие между молекулами растворителя и растворенного вещества в явном виде. Таких теоретических данных до настоящего времени не имеется.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В связи с этим мы провели компьютерное моделирование гидратации пуриновых и пиримидиновых оснований Ade, Gua, Cyt, Ura, Thy и их основных таутомерных форм. Была изучена амино-иминная и лактам-лактимная таутомерия этих соединений. При этом были рассмотрены оба возможных положения имино- и гидроксильной групп по отношению к атому N(1) пуриновых и атому N(3) пиримидиновых оснований - *anti*- и *syn*-конформации. В дальнейшем эти таутомерные формы для оснований обозначаются как *imino (anti)*, *imino (syn)*, *lactim (anti)*, *lactim (syn)*.

Расчеты были выполнены методом Монте-Карло в каноническом (T, V, N) ансамбле, используя выборку Метрополиса [6]. В каждой изученной системе (основание + водный кластер) число молекул воды составляло 400. Температура системы была равной 298K. В качестве граничных условий мы воспользовались кластерным приближением Абрахама и др. [7-10], так как оно хорошо описывает образование ядра жидкости и жидких растворов из пара.

Для вычисления энергий межмолекулярного взаимодействия были использованы полуэмпирические атом-атомные потенциальные функции, предложенные Полтевым и его коллегами (см. сводку данных в работах [11-13]). В соответствии с этими функциями заряды на различных атомах оснований и их таутомерных формах вычислены так же, как в наших недавних работах [11-13]. При проведении расчетов для всех изученных молекул была использована

геометрия, полученная с помощью многоконфигурационной теории самосогласованного поля с оптимизацией геометрии в рамках гамильтониана метода AM1 (см. [14]). Атомы водородов метильных групп были учтены в явном виде.

Первоначально радиус сферы был равен радиусу сферы для найденной начальной конфигурации водного кластера вокруг каждой молекулы растворенного вещества ($R_c=23.0$ Е). Для создания в такой сфере «водоподобной» структуры были проведены вычисления, включающие 2.4×10^6 конфигураций. Затем согласно кластерной теории [7-10] радиус сферы для рассматриваемых систем был увеличен до 25.0 Е и выполнены дальнейшие вычисления, которые содержали 2.4×10^6 конфигураций. Таким образом, для того, чтобы уравновесить каждую из систем, были использованы 4.8×10^6 конфигураций, которые при вычислении средних свойств были отброшены.

В наших вычислениях статистическая ошибка (значение дисперсии) была вычислена с точностью ± 0.005 . Для того, чтобы при вычислении термодинамических данных достичь указанной точности, длины генерируемых марковских цепей для изучаемых систем (основание + водный кластер) были следующими: Ade – 1.6×10^7 конфигураций, Ade imino (*anti*) – 1.68×10^7 конфигураций, Ade imino (*syn*) – 1.76×10^7 конфигураций, Gua – 2.08×10^7 конфигураций, Gua imino (*anti*) – 1.72×10^7 конфигураций, Gua imino (*syn*) – 1.68×10^7 конфигураций, Cyt – 2.32×10^7 конфигураций, Cyt imino (*anti*) – 1.32×10^7 конфигураций, Cyt imino (*syn*) – 2.04×10^7 конфигураций, Thy – 1.44×10^7 конфигураций, Thy imino (*anti*) – 1.76×10^7 конфигураций, Thy imino (*syn*) – 1.2×10^7 конфигураций, Ura – 2.44×10^7 конфигураций, Ura imino (*anti*) – 1.96×10^7 конфигураций, Ura imino (*syn*) – 2.28×10^7 конфигураций, вода – 2.64×10^7 конфигураций.

Все расчеты были выполнены в Киеве на группе рабочих станций UltraSparc-II Ракового института им. Розвел парк в Баффало (США) с помощью глобальной сети INTERNET.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты расчетов средних значений потенциальной энергии системы U , энергии взаимодействия вода-вода U_{ww} и энергии взаимодействия вода-основание U_{wb} даны в табл. 1. Величины энергии гидратации ΔU_{hyd} для всех систем, полученные из приведенных данных, также представлены в этой таблице. Здесь же приведены значения статистической ошибки (стандартного отклонения) для U и ΔU_{hyd} .

Таблица 1. Энергетические характеристики гидратации оснований нуклеиновых кислот и их основных таутомерных форм^a

Основание	U^b	U_{ww}^b	U_{wb}^b	U_{hyd}^c
Ade	-8.331 ± 0.005	-8.091	-0.240	-43.6 ± 2.8
Ade imino (<i>anti</i>)	-8.374 ± 0.005	-8.053	-0.321	-60.8 ± 2.8
Ade imino (<i>syn</i>)	-8.429 ± 0.005	-8.102	-0.327	-82.8 ± 2.8
Gua	-8.407 ± 0.005	-8.111	-0.296	-74.0 ± 2.8
Gua lactim	-8.381 ± 0.005	-8.085	-0.296	-63.6 ± 2.8
Gua lactim (<i>syn</i>)	-8.390 ± 0.005	-8.083	-0.307	-67.2 ± 2.8
Cyt	-8.341 ± 0.005	-8.128	-0.213	-47.6 ± 2.8
Cyt imino (<i>anti</i>)	-8.301 ± 0.005	-8.087	-0.214	-31.6 ± 2.8
Cyt imino (<i>syn</i>)	-8.333 ± 0.005	-8.118	-0.215	-44.4 ± 2.8
Thy	-8.321 ± 0.005	-8.177	-0.144	-39.6 ± 2.8
Thy lactim (<i>anti</i>)	-8.335 ± 0.005	-8.104	-0.231	-45.2 ± 2.8
Thy lactim (<i>syn</i>)	-8.342 ± 0.005	-8.130	-0.212	-48.0 ± 2.8
Ura	-8.333 ± 0.005	-8.194	-0.139	-44.4 ± 2.8
Ura lactim (<i>anti</i>)	-8.383 ± 0.005	-8.133	-0.250	-64.4 ± 2.8
Ura lactim (<i>syn</i>)	-8.376 ± 0.005	-8.162	-0.214	-61.6 ± 2.8
Water	-8.222 ± 0.005	-8.222	–	–

^aНекоторые отличия энергетических характеристик обычной формы оснований от аналогичных данных, полученных в [11, 12], обусловлены использованием в данной работе иной геометрии (см. выше).

^bКкал/моль растворителя. ^cКкал/моль системы.

Видно, что величины энергии гидратации для всех изученных систем отрицательны. Это находится в согласии с экспериментальными данными по энтальпии гидратации обычных таутомерных форм оснований, которые легко могут быть вычислены из измеренных теплот растворения и сублимации [15-21].

Сравнение теоретических и экспериментальных значений ΔU_{hyd} для А, U, Т, G и С (см. Табл. 1 и данные [15-21]) показывает неудовлетворительное согласие между ними. Экспериментальные значения существенно ниже значений, приведенных в Табл. 1.

Можно предположить, что потенциальные функции, которые мы использовали для описания взаимодействия вода-растворенное вещество, приводят к переоценке этого взаимодействия. Другими словами, основания нуклеиновых кислот гидратируются в водном кластере намного сильнее, чем в реальной воде. Тогда следует ожидать, что в более реалистической воде член, ответственный за взаимодействие вода-основание, будет несколько меньше.

Однако параметры этих потенциальных функций были выбраны так, чтобы длины Н-связей между молекулой воды и основаниями и экспериментальные положения молекул воды в кристаллогидратах оснований, нуклеозидов, нуклеотидов и родственных соединений могли быть воспроизведены. В результате потенциальные функции для взаимодействия вода - растворенное вещество позволили нам найти схемы моногидратации нуклеотидных оснований и их пар и значения энергии взаимодействия вода-основание [22, 23], которые очень близки к значениям, полученным с помощью *ab initio* атом-атомных потенциальных функций [24, 25] и уточненных полуэмпирических потенциальных функций [26]. Эти потенциальные функции также позволили нам получить значения энтальпии образования моно-, ди- и тригидратов Ade [27] и метилпроизводных Ura и Thy [28], которые находятся в количественном согласии с экспериментальными данными, определенными в вакууме на основании масс-спектрометрического изучения [15, 16].

В то же время следует подчеркнуть, что моделирование гидратации метилпроизводных Ura и Thy в кластере, состоящем из 200 молекул воды [28], с теми же потенциальными функциями, что и в данной работе, правильно воспроизводит последовательность их экспериментальных значений ΔU_{solv} . Аналогичное моделирование гидратации кофеина [29, 30] показало, что значения энтальпии гидратации, вычисленные на основе теоретических и экспериментальных данных, находятся в хорошем согласии.

Несмотря на все сказанное взаимодействие вода-основание действительно может быть переоценено из-за недооценки взаимодействия вода-вода в кластерной теории, так как между этими взаимодействиями всегда существует конкуренция. Фактически, это было прямо подтверждено изучением гидратации обычных форм оснований методом Монте-Карло с использованием периодических граничных условий [31]. Применение в этой работе уточненных полуэмпирических атом-атомных потенциальных функций привело к энергетическим и структурным характеристикам жидкой воды и значениям энергии образования моногидратов оснований, которые подобны, полученным нами данным. В то же время это позволило авторам [31] вычислить энергии гидратации для Ura, Thy и Ade, которые хорошо согласуются с экспериментальными значениями.

Таким образом, различие между теоретическими и экспериментальными значениями энтальпии гидратации определяется не выбором потенциалов взаимодействия для систем вода-основание, а связано с использованием кластерной теории. Недооценка взаимодействия растворитель-растворитель, приводящая к переоценке взаимодействия растворитель-растворенное вещество, является причиной завышенных значений энергии гидратации для изученных оснований. Однако, так как дальнейшее рассмотрение основано на энергетических различиях, кажется невероятным, чтобы данные, приведенные в Табл. 1, могли существенно измениться.

Как видно из этой таблицы, из двух рассмотренных конформаций (*anti* и *syn*) каждой из редких форм более стабильной является *syn*-конформация. Исключение составляет Ura. Однако для Thy и Ura этот вывод недостоверен, поскольку разность энергий между *anti*- и *syn*-конформациями равна статистической ошибке.

Из этой же таблицы следует, что лактамная форма Gua и аминная форма Cyt энергетически более выгодны, чем каждая из конформаций лактимной и иминной таутомерных форм соответственно. Этот вывод для Cyt согласуется с результатом работы [32], в которой были вычислены разности свободных энергий между аминной и иминной таутомерными формами Cyt методом молекулярной динамики. Из Табл. 1 видно также, что большая стабильность в воде обычных форм этих оснований по сравнению с их редкими формами целиком обусловлена энергетическим членом U_{ww} , который описывает взаимодействие молекул воды друг с другом. Иначе говоря, вода вокруг обычных форм оснований Gua и Cyt более структурирована, чем вокруг редких форм.

В то же время обнаружено (см. Табл. 1), что в воде каждая из конформаций иминоформы Ade и лактимной формы Thy и Ura более стабильна, чем их амино- и лактамная формы соответственно. Это определяется более выгодным взаимодействием редких форм оснований с водой, т.е. членом U_{wb} .

Здесь следует отметить, что, большая (меньшая) выгодность энергетического члена U_{ww} и, следовательно, большая (меньшая) структурированность воды вокруг оснований не всегда обусловлены большим (меньшим) числом водородных связей, образуемых между молекулами воды. Об этом свидетельствует анализ функций распределения для воды, которые здесь не приводим.

Хотя сопоставление теоретических результатов по энергетической выгодности обычных и редких форм с экспериментальными данными невозможно из-за отсутствия последних для

большинства моделируемых систем, однако, как легко вычислить из Табл. 1, количественное значение энергетической разности значительно превосходит статистическую ошибку, возникающую при вычислениях методом Монте-Карло. Только в случае Cyt разность энергий между *syn*-конформацией его иминоформы и аминоконформой составляет 3.2 ккал/моль, что лишь незначительно превосходит статистическую ошибку, равную 2.8 ккал/моль.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kwiatkowski J.S., Pulman B. // *Adv. Heterocyclic Chem.* 1975. V.18. P.199-335
2. Kwiatkowski J.S., Zielinski T.J., Rein R. // *Adv. Quant. Chem.* 1986. V.18. P.85-131
3. Nowak M. J., Lapinski L., Kwiatkowski J.S., Leszczynski J. // In "Computational Chemistry: Reviews of Current Trends". World Scientific Publication. 1997. V.II. P.140-216
4. Leszczynski J. // In "The Encyclopedia of Computational Chemistry", John Wiley & Sons. 1998
5. Tapia O., Silvi B. // *J. Phys. Chem.* 1980. V.84. P.2646-2652
6. Metropolis N., Rosenbluth A.W., Rosenbluth M.N., Teller A.N., Teller E. // *J. Chem Phys.* 1953. V.21. P.1087-1092
7. Lee J.K., Barker J.A., Abraham F.F. // *J. Chem. Phys.* 1973. V.58. P.3166-3180
8. Abraham F.F., Lee J.K., Barker J.A. // *J. Chem. Phys.* 1974. V.60. P.246-250
9. Abraham F.F. // *J. Chem. Phys.* 1974. V.61. P.1221-1225
10. Mruzik M.R., Abraham F.F., Schreiber D.E., Pound G.M. // *J. Chem. Phys.* 1976. V.64. P. 481-491
11. Данилов В.И., Желтовский Н.В., Слюсарчук О.Н., Альдерфер Дж.Л. // *Биополимеры и клетка.* 1997. V.13. С.46-54
12. Danilov V.I., Zheltovsky N.V., Slyusarchuk O.N., Poltev V.I., Alderfer J.L. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1997. V.15. P.69-80
13. Alderfer J.L., Danilov V.I., Poltev V.I., Slyusarchuk O.N. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1999. V.16. P.1107-1117
14. В.И. Данилов, Дж.Л. Альдерфер // *Биополимеры и клетка.* 1999. Т.15. N 6.
15. Sukhodub L.F., Yanson I.K., Shelkovski V.S., Wierzchowski K. // *Biophys. Chem.* 1982. V.15. P.149-155
16. Веркин Б.И., Янсон И.К., Суходуб Л.Ф., Теплицкий А.Б. Взаимодействия биомолекул: Новые экспериментальные подходы и методы. К. Наукова Думка, 1985. 164 с.
17. Teplitsky A.B., Yanson I.K., Glukhova O.T., Zielenkiewicz A., Zielenkiewicz W., Wierzchowski K.L. // *Biophys. Chem.* 1980. V.11. P.17-21
18. Глухова О.Т., Киселев В.Д., Теплицкий А.Б., Устюгов А.Н., Янсон И.К. // *Биофизика.* 1981. Т.26. С.351-352
19. Teplitsky A.B., Glukhova O.T., Sukhodub L.F., Yanson I.K., Zielenkiewicz A., Zielenkiewicz W., Kosinski J., Wierzchowski K.L. // *Biophys. Chem.* 1982. V.15. P.139-147
20. Zielenkiewicz A., Zielenkiewicz W., Sukhodub L.F., Glukhova O.T., Teplitsky A.B., Wierzchowski K.L. // *J. Solution. Chem.* 1984. V.13. P. 757-765
21. Kilday M.V. // *J. Res. Nat. Bur. Stand. (U.S.).* 1981. V.86. P. 367-382
22. Danilov V.I., Shvartsman A.S. // *Молекулярная генетика и биофизика.* 1982. N 7. С.28-35
23. Danilov V.I., Shestopalova A.V. // *Молекулярная генетика и биофизика.* 1984. N 9. С.47-54
24. Scordamaglia R., Cavallone F., Clementi E. // *J. Am. Chem. Soc.* 1977. V.99. С.5545-5550
25. Clementi E., Corongiu G. // *J. Chem. Phys.* 1980. V.72. P.3979-3992
26. Poltev V.I., Grokhina T.I., Malenkov G.G. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1984. V.2. P.413-429
27. Шарафутдинов М.Р., Данилов В.И., Полтев В.И. // *Доклады Академии Нук Украинской ССР.* 1983. N 12. С.69-72
28. Danilov V.I., Tolokh I.S. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1990. V.7. С.1167-1183
29. Шестопалова А.В., Данилов В.И., Малеев В.Я. // *ДАН СССР.* Т.282. С.1000-1003
30. Danilov V.I., Shestopalova A.V. // *Int. J. Quant. Chem.* 1989. V.35. P.103-112
31. Poltev V.I., Malenkov G.G., Gonzalez E.J., Teplukhin A.V., Rein R., Shibata M., Miller J.H. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1996. V.13. P.717-725
32. Cieplak P., Bash P., Singh U.C., Kollman P.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1987. V.109. P.6283-6289

УДК 577.32

ИЗУЧЕНИЕ ГИДРАТАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРНЫХ ФОРМ ПОЛИРИБОЦИТИДИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ КОМПОНЕНТОВ МЕТОДОМ МОНТЕ КАРЛО. 2. ВЛИЯНИЕ ПРОТОНИРОВАНИЯ НА ГИДРАТАЦИЮ АССОЦИАТОВ ЦИТОЗИНА.

А.В. Шестопалова, Д.Б. Анищенко*, В.Я. Малеев

Институт радиофизики и электроники НАН Украины, ул. Академика Проскуры 12, 310085, Харьков;

Харьковский государственный университет, пл. Свободы, 4, 310077, Харьков

Статья поступила в редакцию 20 октября 1999 г.

Методом Монте Карло изучены процессы ассоциации нейтральной и протонированной по N3 положению форм цитозина в воде и влияние протонирования на взаимодействие ассоциатов цитозина с водным окружением. Получены энергетические и структурные характеристики систем, содержащих водородносвязанную (BC-) пару нейтрального (C) и протонированного (C⁺) цитозина, стэкинг-димеры обеих форм цитозина и 200 молекул воды. Показано, что образование BC-пары в воде энергетически невыгодно, а в вакууме такая пара стабильна. Образование стэкинг-димеров C-C и C⁺-C⁺ в воде энергетически выгодно. Энергетическая предпочтительность образования стэкинг-димера C-C в воде обусловлена как взаимодействием димер-вода, так и энергетически выгодным изменением структуры воды при образовании стэкинг-димера из двух изолированных цитозинов. Энергетическая предпочтительность формирования стэкинг-димера C⁺-C⁺ в воде определяется сильным взаимодействием димер-вода и образованием водных мостиков между цитозинами, которые стабилизируют такой ассоциат. Определены схемы гидратации трех ассоциатов

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ассоциаты цитозина, протонирование, гидратация, метод Монте Карло.

Изучение влияния протонирования цитозина по N3 положению на взаимодействие его ассоциатов - водородносвязанных (BC-) пар и стэкинг-димеров - с водным окружением является следующим этапом при исследовании нами роли воды в стабилизации различных структурных форм полирибозитидиловой кислоты (polyrC) [1-3].

Известно, что в водных растворах polyrC образует несколько структурных форм, определяемых внешними условиями, в частности, pH. В нейтральных и слабощелочных растворах polyrC находится в односпиральной форме [4], в области $3.7 < \text{pH} < 5.5$ - в двухспиральной, а при $\text{pH} < 3.5$ - в полностью протонированной, разупорядоченной форме [5]. Стабилизацию односпиральной структуры объясняют наличием стэкинга между соседними цитозинами, расположенными вдоль цепи polyrC, и водородными связями (BC), возникающими между гидроксильными группами C2'OH рибозы [4,6], а стабилизацию двойной спирали полупротонированной формы polyrC - образованием трех BC между цитозинами двух соседних цепей [5]. Недавние исследования показали, что существенную роль в стабилизации различных структурных форм polyrC играет взаимодействие с водным окружением, и стабилизация достигается при связывании 10-12 молекул воды на нуклеотид для односпиральной формы и не менее 9 молекул воды на нуклеотид для двухспиральной формы [1,3]. Методами ИК спектроскопии и пьезограмметрии определены гидратноактивные центры и степень гидратации polyrC, предложена возможная схема локализации молекул воды в двухспиральном комплексе polyrC - polyrC⁺. Но энергетические и структурные изменения водного окружения polyrC и ее компонентов, возникающие при протонировании цитозина, не изучались.

Заслуживает внимания и исследование ассоциации в водном растворе нейтральной и протонированной форм цитозина с образованием основных структурных компонентов polyrC - BC-пар двух цитозинов, образующих три BC и определяющих межцепочечные взаимодействия в polyrC - polyrC⁺, а также стэкинг-димеров нейтрального и протонированного цитозинов, ответственных за внутрицепочечные взаимодействия polyrC. В течение многих лет общепринятым было мнение, что стабильность двойных спиралей нуклеиновых кислот в воде определяется не столько водородным связыванием, сколько стэкинг-взаимодействиями оснований. Это мнение основывалось на результатах исследований, доказавших предпочтительность формирования BC-пар в вакууме и их нестабильность в водном растворе и, наоборот, энергетическую выгодность образования стэкинг-ассоциатов оснований в воде и их нестабильность в вакууме и неполярных растворителях [7-10]. Процессы ассоциации двух форм

цитозина могут отличаться от процессов ассоциации оснований нуклеиновых кислот тем, что ассоциаты образуются между нейтральной молекулой цитозина и ее молекулярным ионом. Поэтому изучение ассоциации различных форм цитозина в водном растворе может расширить представления о роли воды в формировании и стабилизации ассоциатов производных оснований нуклеиновых кислот.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью данной работы было изучение влияния протонирования цитозина по N3-положению на процессы его ассоциации в воде с образованием ВС-пары $C...C^+$ и двух типов стэкинг-димеров нейтральной (C-C) и протонированной (C^+-C^+) форм цитозина и их гидратацию. Для описания таких процессов необходимо получить энергетические и структурные характеристики систем, содержащих изучаемые соединения и молекулы воды. Как и на предыдущем этапе при изучении влияния протонирования на гидратацию мономеров цитозина [2], для решения поставленной задачи нами использовался метод Монте Карло. Применение метода Монте Карло для изучения процессов ассоциации биомолекул подробно описано в работах [9,10].

Координаты плоской пары с тремя ВС взяты из работы [11], а координаты стэкинг-димера нейтрального цитозина - из рентгеноструктурных данных для односпиральной непротонированной polyrC [4]. Координаты стэкинг-димера протонированного цитозина определены из расположения цитозинов в цепи двухспиральной полупротонированной polyrC - polyrC⁺, построенной нами с помощью программ молекулярного моделирования. Положение цитозинов в ассоциатах в процессе расчетов не изменялось. Расчеты проводились в сферах радиуса 22 Å при температуре 298K с последующим уточнением положения молекул воды вблизи центров гидратации при 5K. Для расчетов энергии взаимодействия вода-ассоциат и цитозин-цитозин в ассоциате использовался модифицированный потенциал Леннарда-Джонса 1-6-12 с параметрами, полученными Полтевым и соавторами [12], а для расчетов взаимодействий вода-вода - полуэмпирический потенциал 1-6-exp [13]. Протонирование учитывалось посредством модификации частичных атомных зарядов, рассчитанных *ab initio* с использованием метода MP2 (Moller-Plesset) / 6-31G* [11,14].

При установлении равновесного состояния каждой системы длина генерируемой марковской цепи составляла 4.000.000 элементарных конфигураций. На стационарном участке, при вычислении средних значений энергетических характеристик и функций распределения, генерировались 4.000.000 элементарных конфигураций.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения влияния протонирования на гидратацию различных компонентов polyrC нами получены энергетические и структурные характеристики систем, содержащих ВС-пару нейтрального и протонированного цитозинов ($C...C^+$) (рис.1), стэкинг-димеры нейтрального (C-C) (рис.3) и протонированного цитозина (C^+-C^+) (рис.4) в кластере из 200 молекул воды.

Энергетические характеристики исследованных систем представлены в таблице 1. Здесь U_{sum} - полная средняя энергия взаимодействия в системе, U_{ww} - средняя энергия взаимодействия вода-вода, U_{wb} - средняя энергия взаимодействия вода-основание, U_{bb} - средняя энергия взаимодействия основание-основание, $U_{ww/1}$ и $U_{sum/1}$ - удельные значения энергий взаимодействия вода-вода и полной энергии систем, n_{BC} - число ВС, приходящихся на одну молекулу воды в кластере (показатель структурированности растворителя), N_{BC} - число молекул воды, образующих ВС с ассоциатом.

Таблица 1. Энергетические и структурные характеристики ассоциатов цитозина с различной геометрией в кластере из 200 молекул воды.

Система	U_{sum} ккал/моль	U_{ww} ккал/моль	U_{wb1}, U_{wb2} ккал/моль	U_{bb} ккал/моль	$U_{sum/1}$ ккал/моль	$U_{ww/1}$ ккал/моль	n_{BC}	N_{BC}
$C...C^+$	-1702.0	-1468.0	-86.6 -129.9	-17.6	-8.51	-7.34	1.74	5,9: 12 2 мостика
C-C	-1788.4	-1575.6	-129.8 -139.1	1.0	-8.94	-7.58	1.75	5,5: 10 0 мостиков
C^+-C^+	-1814.6	-1438.8	-212.1 -209.1	37.4	-9.07	-7.15	1.73	14,12: 20 6 мостиков

Наиболее стабильной является система $C^+-C^++H_2O$. Значения U_{wb} показывают, что более низкая потенциальная энергия этой системы связана с увеличением взаимодействия вода-димер C^+-C^+ по сравнению с такими взаимодействиями в системах $C...C^++H_2O$ и $C-C+H_2O$, хотя взаимодействие

их стэкинг-ассоциатов в воде [9,10]. При этом стабилизация пары $C...C^+$ осуществляется двумя типами взаимодействия - взаимодействием между цитозинами с образованием трех ВС и взаимодействием цитозинов с молекулами растворителя. Эти два типа взаимодействия значительно более «сильные» в случае образования пары «нейтральная молекула (C) - молекулярный ион (C^+)» по сравнению с обычными парами оснований, входящими в состав нуклеиновых кислот. Наличие у такого ассоциата заряда +1, делокализованного на C^+ , существенно влияет на водное окружение, вызывая переориентацию молекул воды и увеличение числа ВС, образуемых между цитозинами и молекулами воды. Выполненные нами расчеты устойчивости всех трех видов ассоциатов в вакууме методом Монте Карло показали, что ВС-пара в вакууме стабильна (рис.2), тогда как стэкинг-ассоциаты в вакууме неустойчивы (рис. 3,4).

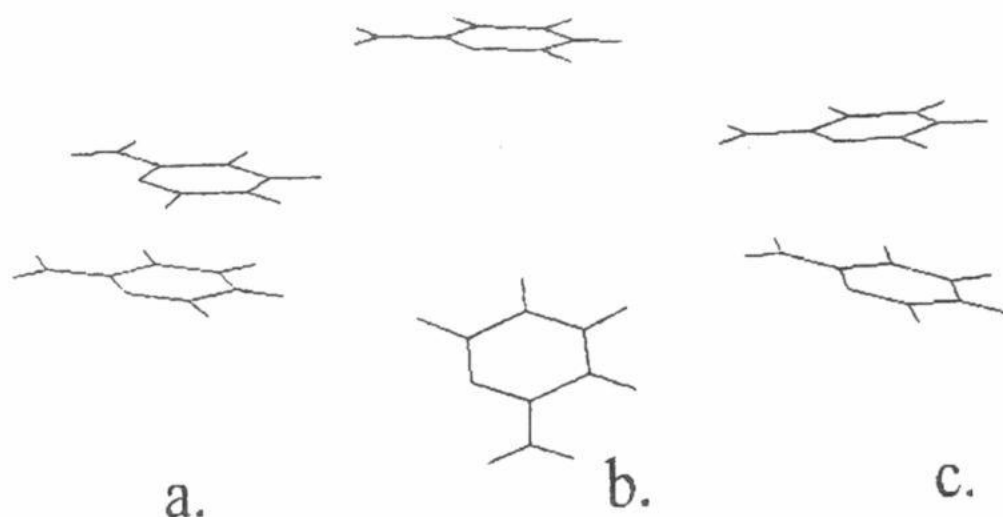


Рис.3. Конфигурации димера C-C: а. стартовая в вакууме; б. наиболее выгодная конфигурация в вакууме; с. равновесная конфигурация в воде.

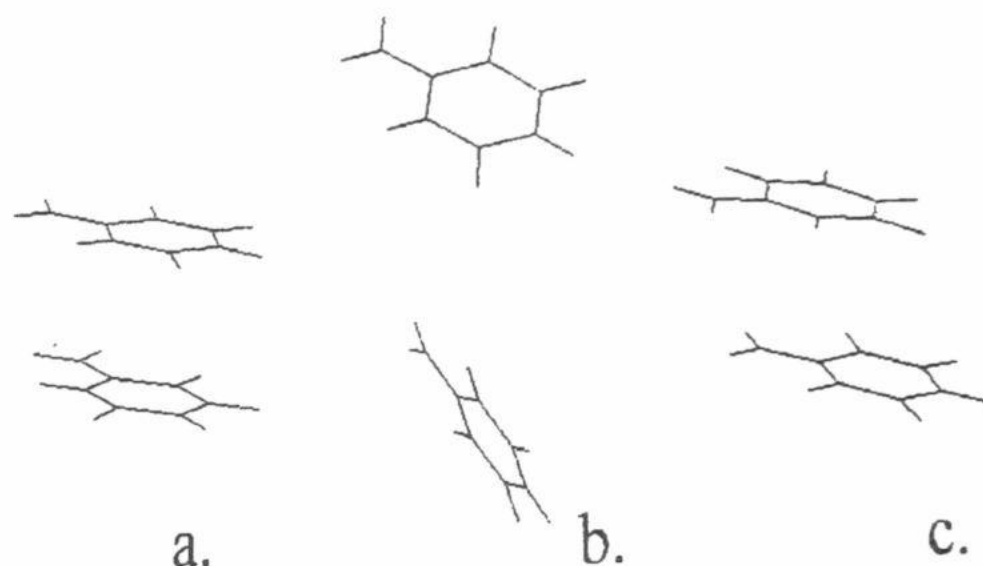
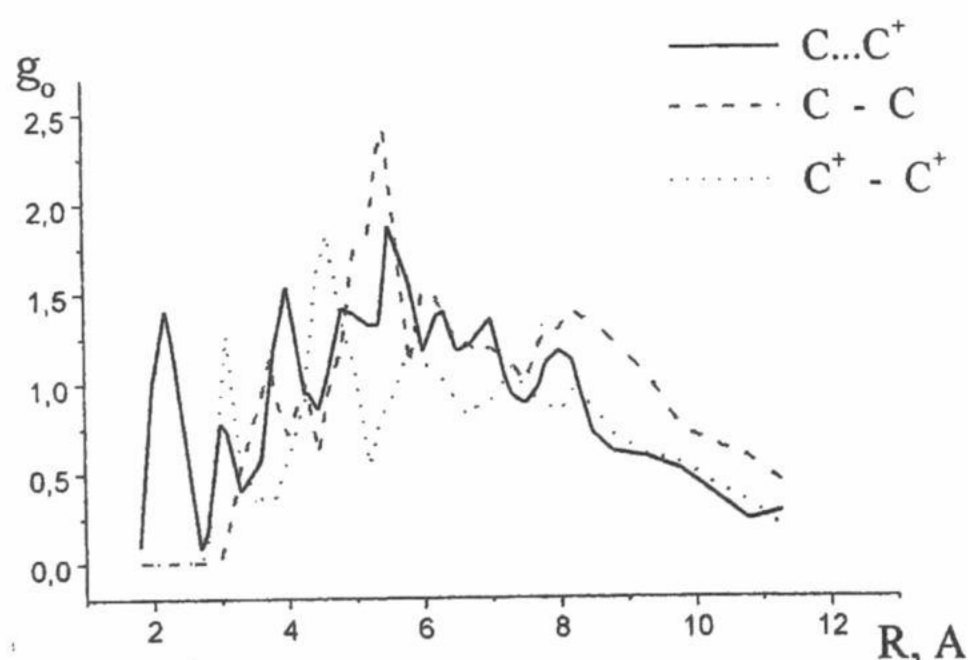


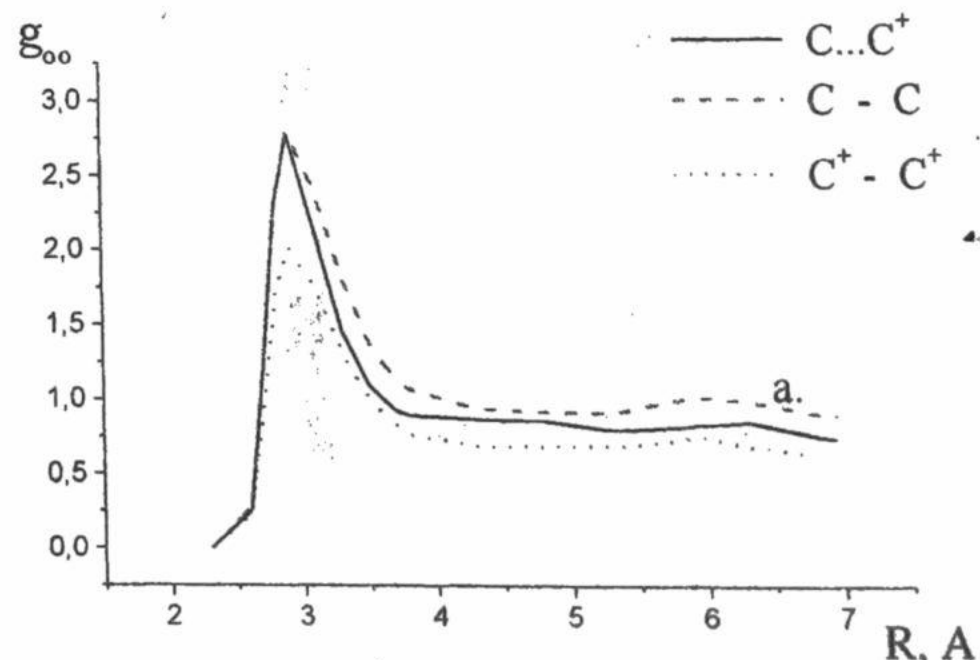
Рис.4. Конфигурации димера C^+-C^+ : а. стартовая в вакууме; б. Наиболее выгодная конфигурация в вакууме; с. равновесная конфигурация в воде.

При образовании стэкинг-димеров двух протонированных цитозинов заряд ассоциата равен +2, что вызывает значительное усиление взаимодействия вода-димер. Из-за увеличения числа ВС молекул воды с ассоциатом C^+-C^+ , приводящего к разрушению упорядоченной структуры водного кластера, взаимодействие вода- C^+ и вода-вода становятся конкурентными, так что изменение последнего является дестабилизирующим фактором при ассоциации двух протонированных цитозинов в стопку. Образование водных мостиков между цитозинами служит дополнительным фактором, повышающим устойчивость стэкинг-димера C^+-C^+ . Даже сильно дестабилизирующее димер стэкинг-взаимодействие между цитозинами не приводит к «развалу» стопки.

О различном разрушении структуры воды у трех изученных систем можно судить и по радиальным функциям распределения, приведенным на рис.5. В случае системы, содержащей димер C-C, наблюдается наименьшее разрушение структуры растворителя. Наличие двух выраженных максимумов функции распределения атомов кислорода молекул воды g_o для системы C-C (рис.4а) подтверждает такой вывод. Структура воды у двух других систем, содержащих $C...C^+$ и C^+-C^+ , разрушена больше.



а.



б.

Рис.5. Графики функции g_o (а) и g_{oo} (б) для ассоциатов цитозина.

Изучение гидратации различных структурных форм...

Протяженность первой гидратной оболочки можно определить по положению первого минимума функции g_o , а при интегрировании получить число молекул воды, ее образующих. Для системы $C...C^+ + H_2O$ можно рассматривать первую гидратную оболочку в пределах 2.7 - 4.4 Å, ее образуют ~ 6 - 7 молекул воды (рис.5а.). Положение первого максимума функции g_o связывают с образованием ВС между гидрофильными группами основания и молекулами воды. По положению второго максимума определяют вторую гидратную оболочку, в которой молекулы воды, не попавшие в первую гидратную оболочку, формируют упорядоченный слой молекул растворителя [15]. В случае системы $C...C^+ + H_2O$ вторую гидратную оболочку можно рассматривать в пределах 5.5 - 7.55 Å с входящими в нее ~ 40 молекулами воды.

Первый минимум функции g_o стэкинг-димера С-С расположен на расстоянии 4.45 Å, определяемая им первая гидратная оболочка димера С-С содержит ~7 молекул воды. Вторая гидратная оболочка расположена в пределах 5.45 - 7.5 Å и состоит из ~54 молекул воды.

Для стэкинг-димера $C^+ - C^+$ первая гидратная оболочка имеет протяженность в пределах 3.3 - 3.4 Å и содержит ~ 2-3 молекулы воды, а вторая гидратная оболочка, имеющая границу 5.15 Å, состоит из ~15 молекул воды. То есть, наиболее упорядоченная структура растворителя может формироваться вблизи стэкинг-димера С-С, тогда как ВС-пара $C...C^+$ и, особенно, стэкинг-димер $C^+ - C^+$, разрушают структуру воды вблизи себя, вызывая переориентацию молекул воды с образованием ВС с цитозинами, входящими в состав ассоциатов, или "выталкивая" молекулы воды в более дальние слои.

По значениям функции g_{oo} можно судить об относительной средней плотности молекул воды в изученных системах (рис.5в). Как видно из представленных графиков, в системах $C...C^+ + H_2O$ и $C-C + H_2O$ плотности растворителя практически не отличаются, а в системе $C^+ - C^+ + H_2O$ плотность воды несколько ниже, особенно в близких к стэкинг-димеру слоях. Эти результаты подтверждают вывод о более сильном разрушении структуры воды в системе, содержащей стэкинг-димер $C^+ - C^+$.

Анализ равновесных мгновенных конфигураций позволил определить точки гидратации всех изученных ассоциатов. Для пары $C...C^+$ ВС образуются с 12 молекулами воды, из них 5 приходится на С, 9 - на C^+ , при этом 2 молекулы воды занимают мостиковое положение между цитозинами. Число мест гидратации отличается от их числа, определенного для изолированных мономеров С и C^+ , и равных 4 и 5, соответственно [10]. Такое изменение числа точек гидратации означает появление дополнительных точек гидратации. У нейтрального цитозина в паре $C...C^+$ центрами гидратации являются группы N1H, C2=O и C6-H, образующие ВС с 3, 1 и 1 молекулами воды, соответственно. Для протонированного основания ВС с 9 молекулами воды образовали группы N1H (2 молекулы H_2O), C2=O (3 молекулы H_2O), N3H (2 молекулы H_2O), а также группы C5H и C6H (по 1 молекуле H_2O). В системе обнаружены две молекулы воды, образующие мостик между основаниями, связывая атом О группы C2=O нейтрального цитозина с группами N3H и NH_2 протонированного. Эти молекулы воды лежат вне плоскости пары, располагаясь над и под группами, образующими ВС между основаниями (рис. 6).

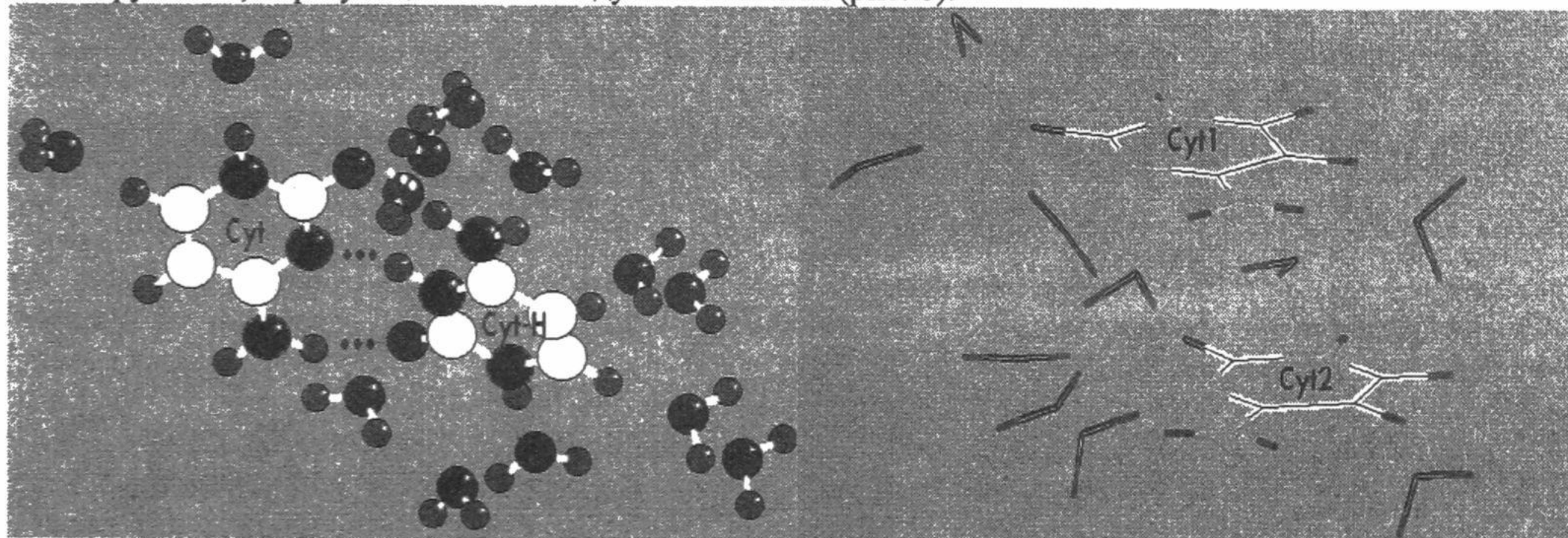


Рис.6. Равновесная конфигурация ВС-пары $C...C^+$ и молекулы воды, образующие с ней ВС.

Рис.7. Равновесная конфигурация стэкинг-димера С-С и молекулы воды, образующие с ним ВС.

Основной вклад в энергию взаимодействия стэкинг-димера С-С с водой вносят 10 молекул H_2O , образующих по 5 ВС с каждым цитозином. С группами N1H и N3 каждого цитозина в димере связываются по одной, а с группами C2=O и NH_2 - по две молекулы H_2O . Для системы $C-C + H_2O$ не обнаружены молекулы воды, занимающие мостиковое положение между группами двух различных цитозинов (рис. 7).

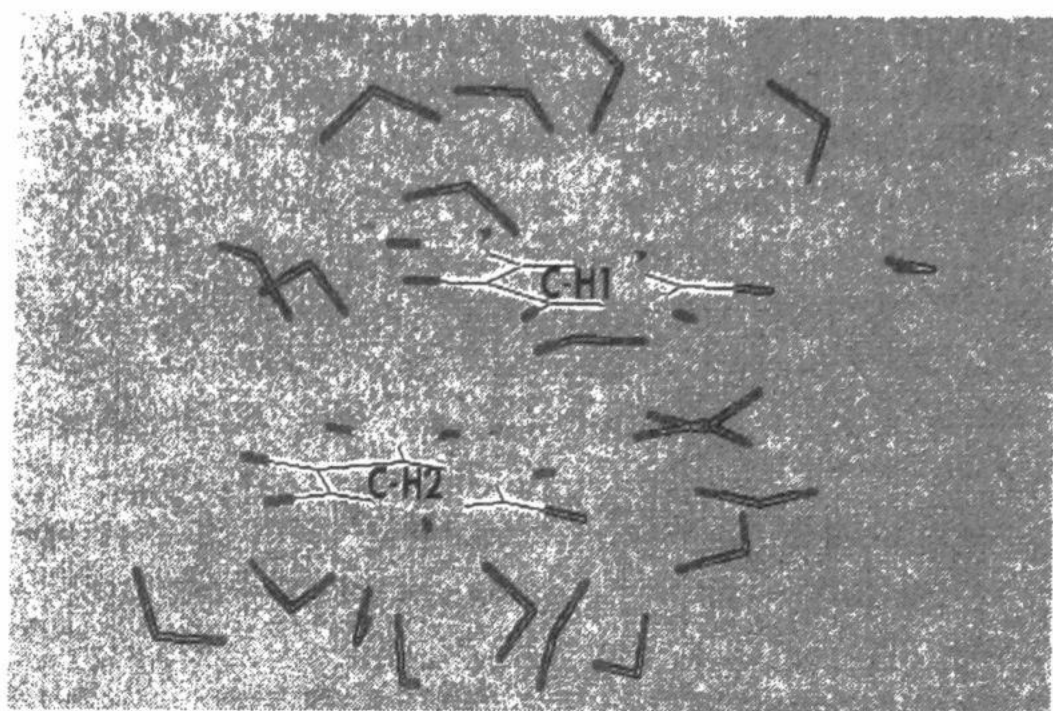


Рис.8. Равновесная конфигурация стэкинг-димера C^+-C^+ и молекулы воды, образующие с ним ВС.

В системе, содержащей димер C^+-C^+ , 14 молекул воды образуют ВС с первым основанием (это $N1H - 2 H_2O$, $C_2=O - 2 H_2O$, $N3H - 2 H_2O$, $NH_2 - 4 H_2O$, $C5H$ и $C6H$ - по 2 H_2O), 12 молекул воды - со вторым основанием ($N1H - 2 H_2O$, $C_2=O - 2 H_2O$, $N3H - 2 H_2O$, $NH_2 - 4 H_2O$, $C5H$ и $C6H$ - по 1 H_2O), при этом 6 молекул воды занимают мостиковые положения между $N3H$, NH_2 и $C_2=O$ группами цитозинов, образующих стэкинг-димер C^+-C^+ (рис.8).

ВЫВОДЫ

Методом Монте-Карло определены энергетические и структурные характеристики и схемы гидратации трех систем, содержащих ассоциаты нейтрального и протонированного цитозина и показано, что:

1. Образование ВС-пары нейтральной и протонированной форм цитозина в воде энергетически невыгодно. Три ВС между основаниями и взаимодействие их с молекулами воды стабилизируют пару, но изменение структуры воды при образовании пары из двух изолированных мономеров энергетически невыгодно. В вакууме ВС-пара стабильна.
2. Образование стэкинг-ассоциатов нейтральной и протонированной форм цитозина в воде энергетически выгодно, а в вакууме они нестабильны.
3. Факторами, стабилизирующим стэкинг-ассоциаты оснований, являются изменение взаимодействия молекул воды с основаниями при образовании димера, а в случае нейтрального цитозина - и энергетически выгодное изменение структуры воды при переходе от мономерной к ассоциированной форме.
4. Стэкинг-димер протонированной формы цитозина в водном растворе энергетически более стабилен, чем стэкинг-димер нейтральной формы цитозина за счет образования большего числа водородных связей с молекулами воды и водных мостиков, тогда как собственно межплоскостные взаимодействия оснований в стопке дестабилизируют стэкинг-димеры.
5. В рассмотренных системах при переходе от более простых систем (мономеры) к более сложным (димеры) число молекул воды, образующих ВС с отдельными мономерами в ассоциатах, возрастает несмотря на уменьшение доступности гидрофильных участков молекул цитозина при их ассоциации.

Список литературы

1. Семенов М.А., Стариков Е.Б., Больбух Т.В., Малеев В.Я. // Биофизика, 1989, т.34, № 3, с.38-46.
2. Шестопалова А.В., Анищенко В.Д., Малеев В.Я. // Вісник ХДУ №450, Біофізичний вісник, 1999, №2, с.17-22.
3. Maleev V.Ya. and oth. // Spectroscopy of biological molecules: new directions, Abs.8th Eur.Conf., 29 Aug.-9 Sept. 1999, The Netherlands, p.227-228.
4. Arnott S., Chandrasekaran R., Leslie A.G.W. // J.Mol.Biol., 1976, v.106, p.735-748.
5. Chou C.H., Thomas G.J. // Biopolymers, 1977, v.16, N5, p.765-775.
6. Egli M., Portman S., Usman N. // Biochemistry, 1996, v.35, N 26, p.8489-8494.
7. Ts'o P.O.P. // Basic Principles in Nucleic Acids Chemistry, Ed., Ts'o P.O.P., New York; London: Acad. Press, 1974, v.1, p.453-584.
8. Yanson I.K., Teplitsky A.B., Sukhodub L.F. // Biopolymers, 1979, v.18, N 11, p.1149-1170.
9. Danilov V.I., Tolokh I.S. // J.Biomol.Struct.Dyn., 1990, v.7, N 5, p.1167-1183.
10. Danilov V.I. and oth. // J.Biomol.Struct.Dyn., 1997, v.15, N 1, p.69-80.
11. Spöner J., Leszczynski J., Vetterl V., Hobza P. // J.Biomol.Struct.Dyn., 1996, v.13, N.4, p.695-706.
12. Poltev V.I. and oth. // J.Biomol.Struct.Dyn., 1998, v.16, N 2, p.289-300.
13. Poltev V.I., Groklina T.I., Malenkov G.G. // J.Biomol.Struct.Dyn., 1984, v.2, N 3, p.413-429.
14. Florian J., Baumruk V., Leszczynski J. // J.Phys.Chem., 1996, v.100, N 13, p.5578-5589.
15. Kulinska K., Kulinski T., Stawinski J., Laaksonen A. // J.Biomol.Struct.Dyn., 1998, v.15, N 5, p. 987-998.

УДК 577.3

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

КОЛЕБАТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УОТСОН-КРИКОВСКОЙ ПАРЫ АДЕНИН-УРАЦИЛ. НЕЭМПИРИЧЕСКОЕ КВАНТОВОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ.

С.Г.Степаньян

Физико-технический институт низких температур НАН Украины
Харьков, пр. Ленина 47, 61164. E-mail: stepanian@ilt.kharkov.ua

Поступила в редакцию 26 ноября 1999 года

Впервые проведены расчеты колебательных спектров Уотсон-Криковской пары аденин-урацил методом DFT/B3LYP/6-31++G** учитывающим эффекты электронной корреляции. Проведен полный анализ фундаментальных колебаний и определены силовые поля мономерных молекул и димера. Установлены спектральные проявления Н-связывания в паре аденин-урацил. Рассчитанные методами MP2 и DFT с расширенным базисным набором и с учетом поправок на энергию нулевых колебаний энергии образования пары А-У составляют -47.8 и -46.0 кДж/моль соответственно и находятся в хорошем согласии с экспериментом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аденин-урацил, квантовохимические *ab initio* расчеты, колебательные спектры, молекулярные параметры.

Колебательная спектроскопия является традиционным методом исследования структуры нуклеиновых кислот и их межмолекулярных комплексов. Для получения точной структурной информации необходима максимально полная интерпретация спектров, т.е. отнесение наблюдаемых полос к колебаниям различных структурных фрагментов нуклеиновых кислот. В первом приближении достаточно разделить полосы колебаний сахарофосфатного остова и оснований. Уже такое разделение позволяет, например, определять изменения конформаций нуклеиновых кислот в результате анализа изменений частот и интенсивностей колебаний отнесенных к сахарофосфатному остову. С другой стороны, по сдвигам полос колебаний оснований можно определять места присоединения к нуклеиновым кислотам различных лигандов. При этом более точная интерпретация колебательных спектров позволяет получать более точную информацию о структуре нуклеиновых кислот и их межмолекулярных комплексов.

К настоящему времени наиболее подробную информацию о колебаниях компонентов нуклеиновых кислот удалось получить при совместном использовании метода ИК-спектроскопии в матрицах инертных газов и квантовохимических расчетов различных уровней сложности. Для основных и 'редких' таутомерных форм аденина [1-5], урацила [6-11], тимина [12, 13], гуанина [14-16] и цитозина [17-19] проведена полная интерпретация колебательных спектров, определены частоты, интенсивности и формы всех фундаментальных колебаний. Однако прямое использование этой информации при изучении нуклеиновых кислот осложнено тем, что условия существования оснований в реальных биосистемах и, соответственно, их колебательные спектры отличаются от изолированного состояния. Во многих случаях такие спектральные отличия составляют десятки и даже сотни обратных сантиметров.

Можно выделить три причины определяющие различия колебательных спектров изолированных оснований от спектров оснований в составе нуклеиновых кислот: водородное связывание в парах, взаимодействие с гидратной оболочкой и стопочные (стэкинг) взаимодействия. Недавние экспериментальные и теоретические исследования стэкинг взаимодействий в модельных системах показали, что сдвиги полос колебаний вызванные стэкинг взаимодействием не превышают 10 см^{-1} [20-22]. Поэтому можно утверждать, что основными возмущающими факторами являются взаимодействия в парах оснований и с гидратной оболочкой. В данной работе на примере Уотсон-Криковской пары аденин-урацил с помощью неэмпирических квантовохимических расчетов исследуется влияние одного из этих факторов, а именно межмолекулярного водородного связывания (Н-связывания) на колебательные спектры и структуру канонических оснований нуклеиновых кислот аденина и урацила.

Главными задачами исследования являются:

- Полная интерпретация фундаментальных колебаний пары аденин-урацил основанная на результатах неэмпирических квантовохимических расчетов высокой точности.
- Определение спектральных проявлений (изменений частот и интенсивностей нормальных колебаний) Н-связывания в паре аденин-урацил.
- Установление влияния Н-связывания в парах оснований на молекулярные характеристики мономерных звеньев (геометрия, силовые постоянные, заряды атомов).

Уотсон-Криковская пара аденин-урацил является традиционным объектом теоретических исследований Н-связывания проводимых с использованием различных квантовохимических методов

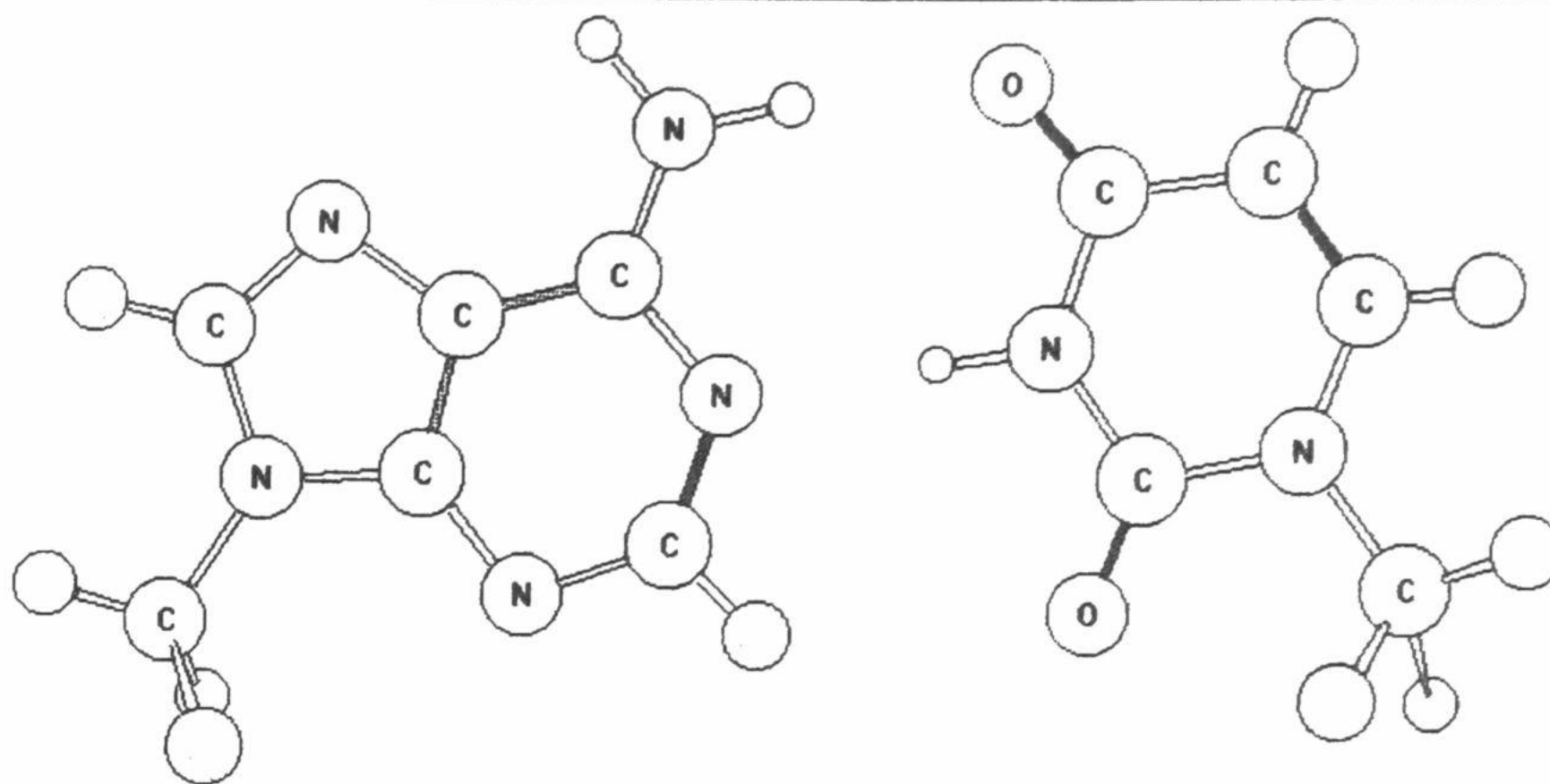


Рис. 1. Равновесная структура Уотсон-Криковской пары 9-метиладенин – 1-метилурацил, рассчитанная методом DFT/B3LYP/6-31++G**. Геометрические параметры пары приведены в Таблицах 1 и 2.

[23-29]. Однако до настоящего времени основной задачей таких исследований было определение энергий межмолекулярных взаимодействий в паре. Расчеты частот колебаний спектров проводились лишь для определения изменений энергии нулевых колебаний и выполнялись либо полуэмпирическими методами, либо методом Хартри-Фока (ХФ) без учета эффектов электронной корреляции и с ограниченными базисными наборами. Поэтому можно утверждать, что решение поставленных в данной работе задач с помощью квантовохимических расчетов высокой точности является весьма актуальным.

ДЕТАЛИ РАСЧЕТОВ

В качестве объектов исследования были выбраны метилированные основания – 9-метиладенин ($m^9\text{Ade}$) и 1-метилурацил ($m^1\text{Ura}$). Метильные группы этих соединений позволяют моделировать влияние рибозного и дезоксирибозного заместителей в нуклеиновых кислотах.

На первом этапе геометрия Н-связанного димера была полностью оптимизирована с помощью неэмпирического метода DFT (Density Functional Theory, Теория Функционала Плотности). Был использован комбинированный функционал электронной плотности, обозначаемый как B3LYP, который включает градиентную обменную коррекцию [30], корреляционный функционал Ли с соавт. [31], а также корреляционный функционал Воско с соавт. [32]. Выбор метода DFT/B3LYP определяется тем, что в настоящее время он позволяет рассчитывать наиболее точные ИК-спектральные характеристики [33]. Так, например, отличия частот колебаний рассчитанных этим методом от экспериментальных в 5-7 раз меньше отличий частот предсказываемых методом ХФ и в среднем составляют около 10 см^{-1} [33]. В расчетах был использован базисный набор 6-31++G** включающий наборы поляризационных и диффузных гауссовых функций на всех атомах. Включение в базисный набор поляризационных функций позволяет правильно описывать радиальную неоднородность распределения электронной плотности вокруг атомов и как было показано рядом авторов, является исключительно важным для правильного предсказания пирамидальной структуры аминогруппы оснований [27, 34, 35]. Использование диффузных функций, описывающих распределение электронной плотности на периферии атомов, является необходимым для точного предсказания структуры и колебательных спектров систем с внутри- или межмолекулярными водородными связями [33, 36, 37].

Найденная равновесная структура димера, стабилизированная двумя межмолекулярными водородными связями приведена на Рис. 1. Далее, для рассчитанного димера были проведены расчеты гармонических частот и интенсивностей колебаний. Дополнительно энергия взаимодействия в димере была рассчитана методом MP2/6-31++G** с учетом электронной корреляции с помощью теории возмущений [38, 39]. Энергия взаимодействия в димере рассчитывалась с учетом поправок на энергию нулевых колебаний (ZPVE, zero point vibration energy) и с учетом ошибки суперпозиции базисных наборов (BSSE, basis set superposition error). BSSE поправка рассчитывалась с помощью метода предложенного Бойзом и Бернарди [40]. Этот метод включает проведение одного расчета димера и двух расчетов мономеров с базисным набором димера. BSSE поправка рассчитывается как разница энергий мономера рассчитанных с базисными наборами мономера и димера.

Расчеты выполнялись на супер-ЭВМ SGI-2000 с использованием программы GAUSSIAN-94 [41].

Колебательный анализ Уотсон-Криковской пары...

Табл. 1. Структурные параметры 9-метиладенина (r – длина связи в ангстремах, α – валентный угол в градусах, γ – двугранный угол в градусах) и их изменения при образовании Уотсон-Криковской пары А-У (Δr , $\Delta \alpha$, $\Delta \gamma$).

Связь	r	Δr	Угол	α	$\Delta \alpha$	Двугранный угол	γ	$\Delta \gamma$
N1-C2	1.345	.004	N1-C2-N3	128.5	-.5	N1-C2-N3-C4	.0	.0
C2-N3	1.337	-.004	C2-N3-C4	111.4	.1	C2-N3-C4-C5	.1	-.1
N3-C4	1.341	.002	N3-C4-C5	126.7	.2	N3-C4-C5-C6	.0	.0
C4-C5	1.400	-.002	C4-C5-C6	116.0	.5	N3-C4-C4-N7	180.1	-.1
C5-C6	1.411	.004	C4-C5-N7	111.1	.0	C4-C5-N7-C8	.0	.0
C5-N7	1.383	.000	C5-N7-C8	103.8	.0	C5-N7-C8-N9	.0	.1
N7-C8	1.314	.000	N7-C8-N9	114.0	-.1	C4-N3-C2-H10	179.9	.1
C8-N9	1.381	.000	N3-C2-H10	116.1	.9	C4-C5-C6-N11	179.3	.7
C2-H10	1.087	.000	C5-C6-N11	122.4	.7	C5-C6-N11-H12	176.0	4.0
C6-N11	1.355	-.011	C6-N11-H12	119.0	1.7	C5-C6-N11-H13	4.8	-4.8
N11-H12	1.008	.014	C6-N11-H13	120.2	-1.3	C5-N7-C8-H14	180.0	.0
N11-H13	1.007	.001	N7-C8-H14	125.0	.1	N7-C8-N9-C15	180.2	.2
C8-H14	1.082	.000	C8-N9-C15	127.9	.0	C8-N9-C15-H16	-2.2	-1.8
N9-C15	1.455	.000	N9-C15-H16	108.8	.0	C8-N9-C15-H17	117.8	-1.8
C15-H16	1.091	.000	N9-C15-H17	110.4	.0	C8-N9-C15-H18	237.9	-1.8
C15-H17	1.093	.000	N9-C15-H18	110.2	.0			
C15-H18	1.093	.000						

Табл. 2. Структурные параметры 1-метилурацила (R – длина связи в ангстремах, α – валентный угол в градусах, γ – двугранный угол в градусах) и их изменения при образовании Уотсон-Криковской пары А-У (Δr , $\Delta \alpha$, $\Delta \gamma$).

Связь	r	Δr	Угол	α	$\Delta \alpha$	Двугранный угол	γ	$\Delta \gamma$
N1-C2	1.398	.006	N1-C2-N3	114.4	.6	N1-C2-N3-C4	.0	.0
C2-N3	1.384	-.005	C2-N3-C4	128.2	-1.8	C2-N3-C4-C5	.0	.0
N3-C4	1.409	-.016	N3-C4-C5	113.0	1.5	N3-C4-C5-C6	.0	.0
C4-C5	1.455	-.004	C4-C5-C6	119.9	-.5	N3-C2-N1-C7	180.0	.0
C5-C6	1.354	.001	C2-N1-C7	116.7	.1	C4-N3-C2-O8	180.0	.0
N1-C7	1.465	.000	N3-C2-O8	123.3	.2	C5-C4-N3-H9	180.0	.0
C2-O8	1.223	.002	C4-N3-H9	116.5	.8	C6-C5-C4-O10	180.0	.0
N3-H9	1.014	.034	C5-C4-O10	126.5	-1.8	N1-C6-C5-H11	180.0	.0
C4-O10	1.224	.013	C6-C5-H11	121.6	.2	C2-N1-C6-H12	180.0	.0
C5-H11	1.081	.000	N1-C6-H12	114.9	.3	C2-N1-C7-H13	-59.5	-.4
C6-H12	1.085	.000	N1-C7-H13	110.2	.0	C2-N1-C7-H14	60.1	-.5
C7-H13	1.092	.000	N1-C7-H14	110.2	.0	C2-N1-C7-H15	180.3	.5
C7-H14	1.092	.000	N1-C7-H15	108.5	.1			
C7-H15	1.090	.000						

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Равновесная структура пары $m^9\text{Ade}-m^1\text{Ura}$

Оптимизированные длины связей, валентные и двугранные углы $m^9\text{Ade}$ и $m^1\text{Ura}$ суммированы в Табл. 1 и 2 соответственно. Кроме этого также приведена равновесная геометрия Уотсон-Криковской пары в виде изменений геометрических параметров при образовании димера. Найденная структура включает две практически линейные межмолекулярные Н-связи $N11(\text{Ade})\cdots O10(\text{Ura})$ и $N1(\text{Ade})\cdots N9-N3(\text{Ura})$ с длинами 1.914 Å и 1.827 Å соответственно. Приведенные в Табл. 1 и 2 данные позволяют сделать следующие выводы:

- Оба основания имеют практически плоскую структуру сопряженных циклов. Максимальное искажение плоской структуры составляет 0.1° для аденина. Плоская структура циклов полностью сохраняется при образовании пары.
- Аминогруппа аденина имеет слабо выраженную пирамидальную структуру. Двугранный угол C4-C5-C6-N11 имеет значение 179.3° , что соответствует отклонению атома азота аминогруппы от плоскости

кольца на 0.01 Å. Отклонения протонов аиногруппы от плоскостной структуры составляют 4-5°, что существенно меньше значений, определяемых с помощью полуэмпирических квантовохимических методов AM1 и MNDO – до 15° [23, 42]. Это демонстрирует, что указанные методы переоценивают пирамидальность аиногруппы оснований нуклеиновых кислот.

- При образовании пары наибольшее изменение претерпевает структура тех фрагментов оснований, которые непосредственно участвуют в образовании водородных связей. При этом равновесные длины связей оснований увеличиваются на 0.014 Å (N11-H12 аденина), 0.013 Å (C4-O10 урацила) и 0.034 Å (N3-H9 урацила). Следует также отметить существенное перераспределение электронной плотности в молекулах оснований при образовании пары. Изменения зарядов атомов, участвующих в образовании Н-связей составляют (в единицах заряда электрона): +0.4 (Н9 урацила), -0.1 (О10 урацила), -0.1 (N1 аденина и +0.2 (Н12 урацила).
- В соответствии с результатами неэмпирических расчетов аиногруппа аденина при образовании пары принимает практически плоскую структуру, что отличается от результатов полуэмпирических исследований [23,42].

Табл. 3. Рассчитанные методами DFT/B3LYP/6-31++G** и MP2/6-31++G** энергии (Е, а.е.), теплоты образования (ΔH , кДж/моль) и энергии нулевых колебаний (ZPVE, а.е.) пары 9-метиладенин – 1-метилурацил, а также теплоты образования с учетом BSSE и ZPVE поправок. Все энергии получены для равновесной геометрии пары рассчитанной методом DFT/B3LYP/6-31++G**. Энергии нулевых колебаний получены с использованием масштабирующего коэффициента 0.95. BSSE поправки определялись как разница энергий равновесной геометрии мономеров рассчитанных в базисных наборах мономера и димера.

	DFT/B3LYP/6-31++G**	MP2/6-31++G**
E	-960.847441	-958.104829
ΔH	-54.3	-67.9
ZPVE	0.243302	0.243302
BSSE поправки:		
$m^1\text{Ura}$	0.000666	0.002951
$m^9\text{Ade}$	0.000510	0.002745
Σ	0.001176	0.005696
ΔH (+ BSSE поправка)	-51.2	-53.0
ΔH (+ BSSE и ZPVE поправки)	-46.0	-47.8

Теплота образования пары

В Табл. 3 представлены энергетические характеристики Уотсон-Криковской пары $m^9\text{Ade}-m^1\text{Ura}$ полученные двумя методами – DFT и MP2. Несмотря на то что эти методы по разному учитывают эффекты электронной корреляции, они дают близкие теплоты образования пары составляющие с учетом BSSE и ZPVE поправок -46.0 и -47.8 кДж/моль для DFT и MP2 методов соответственно. Полученные данные находятся в хорошем соответствии с результатами экспериментальных измерений энергий взаимодействия в паре 9-метиладенин - 1-метилтимин, составляющей 54.6 ± 5.0 кДж/моль [43]. Следует отметить важность учета BSSE и ZPVE поправок для определения теплот образования пар оснований. Как видно из Табл. 3, теплоты образования, рассчитанные без учета этих поправок, существенно отличаются от приведенного выше экспериментального значения.

Источником ZPVE поправки является изменение энергии нулевых колебаний мономеров при образовании пары. Энергия нулевых колебаний определяется как полусумма всех фундаментальных частот и ее изменение в случае пары $m^9\text{Ade}-m^1\text{Ura}$ составляет +5.8 кДж/моль, т.е. приводит к уменьшению рассчитываемой теплоты образования. Величины BSSE поправок существенно отличаются для методов DFT и MP2: +3.1 и +14.9 кДж/моль соответственно. Причины этого отличия подробно рассмотрены в нашей работе [44] на примере димера 1-метилурацил-акриламид. Приведенные данные демонстрируют особую важность учета BSSE поправки при использовании метода MP2.

Колебательные спектры

Рассчитанные частоты и интенсивности нормальных колебаний пары $m^9\text{Ade}-m^1\text{Ura}$, а также соответствующие им частоты и интенсивности мономеров приведены в Табл. 4.

Прежде всего необходимо дать оценку точности частот колебаний рассчитанных методом DFT/6-31++G**. Тестовые расчеты [33] показали, что при использовании масштабирующих коэффициентов

Колебательный анализ Уотсон-Криковской пары...

Табл. 4. Рассчитанные методом DFT/B3LYP/6-31++G** частоты (ω , cm^{-1}) и интенсивности (I , km/mol) нормальных колебаний 9-метиладенина, 1-метилурацила и Уотсон-Криковской пары $m^9\text{Ade}-m^1\text{Ura}$. Приведены отнесения частот колебаний полученные в результате анализа распределений потенциальной энергии колебаний по естественным координатам. Частоты колебаний пары, соответствующие 6 межмолекулярным колебаниям, выделены курсивом. Обозначения колебаний: str - валентное, bend - деформационное, tor – торсионное.

9-метиладенин			Пара $m^9\text{A}-m^1\text{U}$		1-метилурацил		
ω	I	Отнесение	ω	I	ω	I	Отнесение
3568	62.0	N11-H12 str, N11-H13 str	3513	140.6			
3435	101.3	N11-H13 str, N11-H12 str	3235	1134.8			
			3096	0.4	3097	0.8	C5-H11 str
3088	0.4	C8-H14 str	3088	0.4			
			3052	5.9	3056	4.1	C6-H12 str
3029	20.3	C2-H10 str	3035	2.9			
			3004	7.6	3006	7.2	CH ₃ str
2996	8.0	CH ₃ str	2996	8.0			
			2983	9.1	2984	8.8	CH ₃ str
2975	9.6	CH ₃ str	2975	9.6			
			2914	29.9	2915	31.9	CH ₃ str
2907	41.0	CH ₃ str	2907	38.2			
			2823	2304.1	3428	67.6	N3-H9 str
			1741	633.4	1747	418.9	C2-O8 str, C4-O10 str
			1705	597.6	1735	979.5	C4-O10 str, C2-O8 str
1632	690.0	C5-C6 str, NH ₂ bend	1655	419.0			
			1635	55.3	1640	82.6	C5-C6 str
1597	97.2	N3-C4 str, ring bend	1609	314.7			
1580	13.3	NH ₂ bend, C4-C5 str	1583	12.2			
			1517	34.4	1388	19.2	N3-H9 bend
1511	28.1	Imidazole ring bend	1512	22.6			
			1492	58.7	1492	38.5	CH ₃ bend
1489	23.9	CH ₃ bend	1490	39.3			
1474	64.5	C2-H10 bend	1484	44.7			
1454	10.0	CH ₃ bend	1454	10.1			
			1450	40.8	1448	18.8	CH ₃ bend
			1447	9.3	1448	13.5	CH ₃ bend
1439	18.7	N7-C8 str, CH ₃ bend	1440	16.6			
			1435	67.2	1429	97.6	Ring bend, CH ₃ bend
1416	18.3	CH ₃ bend, N7-C8 str	1420	14.5			
1373	40.9	C2-H10 bend, C4-C5 str	1380	33.9			
			1369	134.8	1359	110.8	C2-N3 str, N3-H9 bend
1342	22.3	C8-N9 str	1345	19.4			
1341	38.4	C5-N7 str, N1-C2 str	1339	32.1			
			1330	84.3	1321	73.5	C6-H12 bend, ring bend
1318	72.2	C2-N3 str, N1-C2 str	1328	100.1			
1253	52.2	C8-H14 bend, N1-C2 str	1261	82.8			
1240	18.9	C8-H14 bend, N7-C8 str	1241	17.7			
			1224	27.9	1208	19.7	C5-H11 bend
1197	8.5	C8-H14 bend, C5-N7 str	1202	6.1			
			1194	16.9	1177	14.9	C2-N3 str, N1-C7 str
			1146	32.5	1146	36.0	C5-H11 bend
			1128	0.1	1128	0.1	CH ₃ bend
1128	0.2	CH ₃ bend	1127	0.4			
1056	1.9	Ring bend, CH ₃ bend	1070	1.4			
1038	34.2	Imidazole ring bend	1042	29.6			
			1028	15.4	1024	10.5	Ring bend, N1-C2 str
984	15.3	Pyrimidine ring bend	1003	28.5			
			982	11.1	954	11.1	C4-C5 str, N3-C4 str
			981	39.5	659	65.5	N3-H9 tor

Табл. 4. Продолжение.

9-метиладенин			Пара А-У		1-метилурацил		
ω	I	Отнесение	ω	I	ω	I	Отнесение
954	3.4	C2-H10 tor	969	22.8			
889	5.0	Ring bend	948	0.1	947	1.0	C6-H12 tor
830	6.4	C8-H14 tor	899	8.4			
			827	6.9			
790	10.7	Pyrimidine ring tor	795	10.0	793	50.1	C5-H11 tor
			792	38.1			
			790	5.9	782	2.2	Ring bend, N1-C7 str
526	0.7	NH ₂ tor	749	27.2	741	5.7	C4-C5 str, ring bend
733	7.0	N9-C15 str, ring bend	737	42.4			
			734	6.4			
716	14.0	Ring str, ring bend	733	14.3	735	42.6	Ring tor
			718	12.1			
674	0.0	Ring tor	702	8.6	701	0.9	Ring tor
643	27.9	Ring tor	681	0.4			
			641	13.7			
577	3.7	Ring bend	615	8.4	610	2.4	Ring bend, C4-O10 bend
555	3.0	Ring tor	596	11.1			
			560	1.6			
530	3.9	Ring bend	547	49.0	533	8.7	C2-O8 bend, ring bend
520	2.2	Pyrimidine ring bend	533	3.2			
			524	0.8			
86	180.9	NH ₂ tor	468	20.2	458	20.3	Ring bend
			418	102.1			
			408	51.4	399	7.4	Ring tor, C4-O10 tor
309	2.4	C6-N11 bend	400	77.5	379	22.3	C4-O10 bend, ring bend
			335	10.8			
296	0.6	Ring tor	326	7.2	322	3.0	N1-C7 bend
252	1.9	Ring tor	296	0.0			
			259	1.5			
214	8.6	N9-C15 bend	231	1.2	226	3.6	N1-C7 tor
190	14.9	Ring tor	230	16.8			
			192	0.6			
			166	1.2	156	2.3	C2-O8 tor, ring tor
			118	0.6	108	0.1	Ring tor
			112	1.5			
111	34.6	N9-C15 tor	111	1.3			
			94	0.3			
			64	0.6			
			60	0.1			
			49	3.7			
16	0.0	CH ₃ tor	32	0.3	40	0.0	CH ₃ tor
			26	0.2			
			21	6.4			

0.95 (для частот $> 2000 \text{ см}^{-1}$) и 0.98 (для частот $< 2000 \text{ см}^{-1}$) среднее расхождение рассчитанных и экспериментальных частот, регистрируемых для изолированных молекул, составляет около 10 см^{-1} . При этом точность метода DFT выше точности других неэмпирических методов ХФ и MP2 и существенно – в десятки раз превышает точность полуэмпирических методов, которые, как правило, не параметризованы для расчета колебательных спектров.

Сравнение частот и интенсивностей мономеров и димера позволяет прямо установить влияние Н-связывания оснований на их колебательные спектры. Поскольку в Табл. 4 приведен подробный анализ всех фундаментальных колебаний мономерных молекул и димера, остановимся лишь на основных особенностях колебательного спектра пары $m^9\text{Ade}-m^1\text{Ura}$.

- При образовании пары наибольшие изменения наблюдаются для валентных колебаний связей N3-H9 $m^1\text{Ura}$ и N11-H13 $m^9\text{Ade}$. Низкочастотные сдвиги, найденные для этих колебаний, составляют 605 и

- 200 см^{-1} соответственно. При этом существенно – в 30 и 10 раз повышается интенсивность этих колебаний. Высокочастотная полоса при 3513 см^{-1} относится к валентному колебанию связи N11-H12 аминогруппы аденина которая не участвует в межмолекулярных Н-связях.
- В области 1800-1700 см^{-1} присутствуют две полосы соответствующие валентным колебаниям связей C2=O8 и C4=O10 урацила. Анализ распределения потенциальной энергии этих колебаний по естественным координатам показывает смешанный характер C=O валентных колебаний как в мономере урацила, так и в паре. В колебание мономера с частотой 1747 см^{-1} основной вклад дает связь C2=O8, которая не участвует в образовании Н-связей и рассчитанный низкочастотный сдвиг этой полосы составляет всего 6 см^{-1} . Более сильный низкочастотный сдвиг полосы мономера 1735 см^{-1} , составляющий 30 см^{-1} , связан с тем, что основной вклад в колебание с этой частотой дает связь C4=O10, участвующая в Н-связывании с аденином.
 - Все деформационные и внеплоскостные (торсионные) колебания функциональных групп участвующих в Н-связывании претерпевают высокочастотный сдвиг. Наиболее сильные сдвиги наблюдаются для деформационного и внеплоскостного колебания связи N3-H9 урацила, которые составляют 129 и 322 см^{-1} соответственно. Также существенно повышается частота крутильного колебания аминогруппы – с 86 до 418 см^{-1} . Высокочастотные сдвиги деформационных и внеплоскостных колебаний карбонильных групп составляют до 20 см^{-1} .
 - Изменения частот колебаний ольца урацила и пиримидинового фрагмента аденина выражены слабо и не превышают 10 см^{-1} . Н-связывание практически не влияет на колебания имидазольного фрагмента аденина и метильных групп обоих оснований.

ВЫВОДЫ

Анализ изменений молекулярных характеристик (равновесные геометрические параметры, заряды атомов, частоты и интенсивности колебаний) аденина и урацила при образовании Уотсон-Криковской пары показывает, что Н-связывание оказывает избирательное влияние на параметры фрагментов молекул, непосредственно участвующих во взаимодействии. Причем это влияние оказывается наиболее сильным для частот и интенсивностей нормальных колебаний. При этом сдвиги частот достигают сотен обратных сантиметров, а интенсивности отдельных колебаний меняются в десятки раз. Вместе с тем, изменения характеристик фрагментов удаленных от места связывания незначительны как для геометрических так и для колебательных параметров.

Найденная равновесная структура пары стабилизирована за счет двух межмолекулярных водородных связей N11(Ade)-H13...O10(Ura) и N1(Ade)...H9-N3(Ura). Приведенные в работе данные позволяют сделать вывод о существенной неэквивалентности этих водородных связей. Связь N1(Ade)...H9-N3(Ura) существенно короче – почти на 0.1 Å. При образовании пары изменение связи H9-N3 мономера урацила (0.034 Å) значительно превышает изменение связи N11-H13 мономера аденина (0.014 Å). Сдвиги частот валентных колебаний связей H9-N3 урацила и N11-H13 аденина также значительно отличаются и составляют 605 и 200 см^{-1} соответственно. Все это свидетельствует о том, что Н-связь N1(Ade)...H9-N3(Ura) в паре аденин-урацил существенно сильнее Н-связи N11(Ade)-H13...O10(Ura).

Автор благодарит научный фонд NATO (Грант CRG.CRG973389) за финансовую поддержку исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Радченко Е.Д., Плохотниченко А.М., Шеина Г.Г., Благой Ю.П. // Биофизика. 1984. Т. 29. С. 553.
2. Stepanian S.G., Sheina G.G., Radchenko E.D., Blagoi Yu.P. // J. Molec. Struct. 1985. V. 131. P. 333.
3. Sheina G.G., Radchenko E.D., Stepanian S.G., Blagoi Yu.P. // Studia Biophys. 1986. V. 114. P. 123.
4. Novak M.J., Lapinski L., Kwiatkowski J.S. // Chem. Phys. Lett. 1989. V. 157. P. 14.
5. Novak M.J., Lapinski L., Kwiatkowski J.S. et al. // Spectrochimica Acta. 1991. V. 47A, N 1. P. 87-103.
6. Радченко Е.Д., Плохотниченко А.М., Шеина Г.Г., Благой Ю.П. // Биофизика. 1983. Т. 28. С. 980.
7. Szczesniak M., Novak M.J., Rostkowska H. et al. // J. Am. Chem. Soc. 1983. V. 105. P. 5969.
8. Chin S., Scott., Szczepaniak K., Person W.B. // J. Am. Chem. Soc. 1984. V. 106. P. 3415.
9. Barnes A.J., Stuckey M.A., Le Gall L. // Spectrochimica Acta. 1984. V. 40A. P. 419.
10. Graindourze M., Smets J., Zeegers-Huyskens Th., Maes G. // J. Molec. Struct. 1990. V. 222. P. 345.
11. Les A., Adamowicz L., Novak M.J., Lapinski L. // Spectrochimica Acta. 1992. V. 48A. P. 1385.
12. Novak M.J. // J. Molec. Struct. 1989. V. 193. P. 35-49.
13. Stepanian S.G., Smorygo N.A., Sheina G.G. et al. // Spectrochimica Acta. 1990. V. 46A, N 3. P. 355-361.
14. Шеина Г.Г., Радченко Е.Д., Благой Ю.П. // Докл. Акад. Наук СССР. 1985. Т. 282. С. 1497.
15. Sheina G.G., Stepanian S.G., Radchenko E.D., Blagoi Yu.P. // J. Molec. Struct. 1987. V. 158. P. 275.
16. Szczepaniak K., Szczesniak M. // J. Molec. Struct. 1987. V. 156. P. 294.
17. Radchenko E.D., Sheina G.G., Smorygo N.A., Blagoi Yu.P. // J. Molec. Struct. 1984. V. 116. P. 387-396.
18. Szczesniak M., Szczepaniak K., Kwiatkowski J.S. et al. // J. Am. Chem. Soc. 1988. V. 110, N 25. P. 8319-8330.

19. Nowak M.J., Lapinski L., Fulara J. // *Spectrochimica Acta*. 1989. V. 45A, N 2. P. 229-242.
20. MacCarthy W., Smets J., Adamowicz L. et al. // *Molec. Phys.* 1997. V. 91, N 3. P. 513-525.
21. MacCarthy W., Plokhotnichenko A.M., Radchenko E.D. et al. // *J. Phys. Chem.* 1997. V. 101A. P. 7208-7216.
22. Plokhotnichenko A.M., Radchenko E.D., Stepanian S.G. et al. // *Resent Res. Devel. In Phys. Chem.* 1998. V. 2. P. 1087.
23. Komarov V.M. // *J. Biol. Phys.* 1999. V. 24. P. 167-184.
24. Sponer J., Leszczynski J., Hobza P. // *J. Biomol. Struct. Dynamics*. 1996. V. 14. P. 117-135.
25. Sponer J., Leszczynski J., Hobza P. // *J. Phys. Chem.* 1996. V. 100. P. 1965-1974.
26. Sponer J., Hobza P. // *Chem. Phys.* 1996. V. 204. P. 365-372.
27. Sponer J., Florian J., Hobza P., Leszczynski J. // *J. Biomol. Struct. Dynamics*. 1996. V. 13. P. 827-833.
28. Gould I.R., Kollman P.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1994. V. 116. P. 2493-2499.
29. Komarov V.M. // *Biophysics*. 1994. V. 39, N 5. P. 863-868.
30. Becke A.D. // *Phys. Rev. B*. 1988. V. 38. P. 3098.
31. Lee C., Yang W., Parr R.G. // *Phys. Rev. B*. 1988. V. 37. P. 785.
32. Vosko S.H., Wilk L., Nusair M. // *Can. J. Phys.* 1980. V. 58. P. 1200.
33. Stepanian S.G., Reva I.D., Rosado M.T.S. et al. // *J. Phys. Chem.* 1998. V. 102A. P. 1041-1054.
34. Leszczynski J. // *Int. J. Quant. Chem.: Quant. Biol. Symp.* 1992. V. 19. 43-45.
35. Sponer J., Hobza P. // *J. Phys. Chem.* 1994. V. 98. P. 3161-3164.
36. Stepanian S.G., Reva I.D., Radchenko E.D., Adamowicz L. // *J. Phys. Chem.* 1998. V. 102A. P. 4623-4629.
37. Stepanian S.G., Reva I.D., Radchenko E.D., Adamowicz L. // *J. Phys. Chem.* 1999. V. 103A. P. 4404-4412.
38. Binkley J.S., Pople J.A. // *Int. J. Quant. Chem.* 1975. V. 9. P. 229.
39. Pople J.A., Binkley J.S., Seeger R. // *Int. J. Quant. Chem.: Quant. Chem. Symp.* 1976. V. 10. P. 1.
40. Boys S.F., Bernardi F. // *Molec. Phys.* 1970. V. 19. P. 553.
41. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B. et al. *Gaussian 94, Revision E.2*. Gaussian Inc. Pittsburgh, PA, 1994.
42. Говорун Д.Н., Мишук Я.Р., Кондратюк И.В. // *Доповіді НАН України*. 1995. Т. 11. С. 121-123.
43. Yanson I.K., Teplitsky A.B., Sukhodub L.F. // *Biopolymers*. 1979. V. 18. P. 1149-1179.
44. Galetich I., Kosevich M., Shelkovsky V., Stepanian S.G. // *J. Molec. Struct.* 1999. V. 478. P. 155-162.

УДК 577.3

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

RELAXATION AND SPECTROSCOPIC MANIFESTATIONS OF HYDRATION OF POLYRIBOCYTIDYLIC ACID

V.A. Kashpur, M.A. Semenov, N.N. Sagaidakova

Institute for Radiophysics and Electronics, National Academy of Sciences of Ukraine

Address: 12, Acad. Proskura St, 310085, Kharkov, Ukraine

Tel. 0038-0572-448337, Fax 0038-0572-441105, E-mail: berez@ire.kharkov.ua

Received October 12, 1999

Hydration and structure state of polyribocytidylic acid (poly(rC)) have been studied in solutions and humid films. The role of water in forming different structures of poly(rC) was elucidated. In solutions, the hydration values of single-strand (pH 4.5), double-strand (pH 7.8) and disordered (pH 3.3) forms of poly(rC) were determined with a differential EHF-dielectrometer using the measurements of dielectric permittivity at wavelength 7.6 mm. In humid films, distribution of water molecules on the hydration sites for these structures has been found with IR spectroscopy. Hydration models of the single and double-strand structures of poly(rC) were developed using X-ray and these data.

KEY WORDS: polycytidylic acid, hydration, infrared spectra, millimeter region, structural transitions.

The use of dielectric measurements in the range of millimeter range (extremely high frequencies (EHF)) is important in a number of areas of biology and medicine. In particular, they allow one to study the state of water in biological solutions [1].

The methods of X-ray diffraction analysis, NMP, IR and CD spectroscopy, dielectrometry and others have established the presence of bound water around biomacromolecules [2]. Such solvent molecules attach to the hydration-active sites on the biopolymer surface through hydrogen bonding. In energy terms the water molecule may be considered «bound» if its energy of interaction with any hydration center exceeds the mean energy of water-water interaction in the liquid phase.

Numerous investigations demonstrated that without detailed knowledge of the features of the interaction of biomolecules with water there could be no complete understanding the properties and behavior of the macromolecules. Because the bound molecules have a lower mobility, the corresponding relaxation peak is observed near 100 MHz while the peak due to ordinary water locates around 20 GHz [3].

Unfortunately, the dispersion of dielectric permittivity of biomolecules is also observed near 100 MHz creating substantial difficulties in the interpretation of dielectric data. On the other hand, in the millimeter range the dispersion observed is only due to the relaxation of bulk water and hydration leads to a lowering of the dielectric permittivity of solution as compared with that of solvent [1]. This decrement can be used to study the interaction of biomolecule with water.

The present work is devoted to the investigation of the hydration environment existing around poly(rC) (polyribocytidylic acid). This polynucleotide is known to form different structures in aqueous solutions as a function of the pH, temperature and ion content [4]. At room temperature and neutral pH, poly(rC) is an ordered single-strand helix. In the range $3.7 < \text{pH} < 5.5$ it forms a helical double-strand complex in which a proton is added to the ring nitrogen for each pair of bases (Fig.1). Below pH 3.5, through the addition of a second proton per base pair, a dissociation into two disordered chains with protonated cytosines occurs. It is believed that the hydrogen bond between the protonated and unprotonated rings mainly stabilizes the hemiprotonated complex.

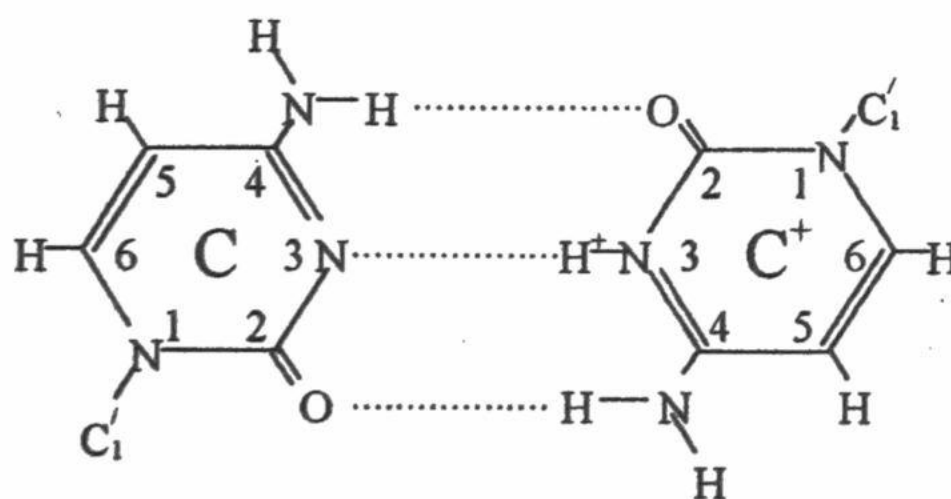


Figure 1. Hydrogen bonding between bases in the hemiprotonated complex.

The aim of the work is to elucidate the role of water environment in the formation of the different structures of poly(rC).

MATERIALS AND METHODS

We used samples of poly(rC), K⁺ salt, obtained from «Serva» (Germany) and «Reanal» (Hungary). The content of the K⁺ ions in relation to the dry mass of the biomolecule was 6.7% («Serva») and 8.5% («Reanal»). Solutions in the range 3<pH<5.5 were prepared by the addition of HCl. For microwave measurements, 1% solution was used. For infrared studies, thin uniform films of poly(rC) were prepared and deuterated as described previously [5]. The wet films in the relative humidity (r.h.) interval from 0 to 96% were derived in the special cuvette. The degree of protonation was constant up to r.h.=86%.

Measurements in millimeter range were carried out by the differential dielectrometric method developed by us [6]. The decrement of the complex dielectric permittivity $\Delta\epsilon^x = \epsilon_{\text{solvent}}^* - \epsilon_{\text{solution}}^* = \Delta\epsilon' - i\Delta\epsilon''$ was determined. The knowledge of the complex permittivity and conductivity σ measured at $f=10\text{kHz}$ made it possible to calculate the effective dielectric constant of solution ϵ_s , which is characteristic parameter of the Debye theory of fluids

$$\epsilon_s = \epsilon' + \frac{(\epsilon'' - \sigma/f)^2}{\epsilon' - \epsilon_\infty}, \quad (1)$$

where ϵ_∞ is the high-frequency limit of dielectric permittivity. The validity of the Debye equation to the description of the relaxation of pure water was shown in a number of works [3].

The IR spectra were recorded with the UR-20 two-beam spectrometer, NaCl prism, spectral slit width 6 cm^{-1} at 1700 cm^{-1} .

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 presents the results of dielectric measurements. The initial experimental values are the differences between the attenuation $\Delta\alpha$ and phase shifts $\Delta\beta$ of the solvent and solution. From these findings the analogous differences $\Delta\epsilon'$, $\Delta\epsilon''$ and $\Delta\epsilon_s$ have been determined (for water $\epsilon'=18$ and $\epsilon''=28.5$ at 23°C). Experimental errors for $\Delta\epsilon'$ and $\Delta\epsilon''$ are within 0.02 and 0.03, respectively.

The degree of hydration ω (g water per g solute) or n (the number of bound water molecules per nucleotide) may be found from the data obtained. Its value is proportional (in the first approximation) to the dielectric decrement and can be derived as

$$\omega = \Delta\epsilon_s / p \cdot c \cdot (\epsilon_s - \epsilon_\infty) - v, \quad (2)$$

where c is the concentration of poly(rC), v is the specific volume of poly(rC), p is coefficient depending upon the form of the polymers. According to the earlier paper [7], its meaning varies from 1.5 (sphere) to 1.66 (cylinder). Recently, it became possible to obtain the degree of DNA hydration (B form) using the dielectric measurements in the range of dispersion of bound water [3]. This value ($n=19$) is in agreement with our estimation of DNA hydration if the value of p is assumed to be 1.65. All the values of n in the Table have been calculated using this value.

Table 1. Results of the dielectric measurements ($T=23^\circ\text{C}$) of poly(rC)

Parameters measured	pH 8 $c=1.18\%$	pH 4.5 $c=0.97\%$	pH 3.3 $c=1.3\%$
$\Delta\alpha$ (nep/mm)	0.0161	0.0114	0.0151
$\Delta\beta$ (rad/mm)	0.0168	0.0164	0.0120
$\Delta\epsilon'$	0.07	0.10	0.04
$\Delta\epsilon''$	0.07	0.09	0.25
r/f	0.12	0.17	0.32
$\Delta\epsilon_s$	1.34	1.26	2.16
$n(\pm 1)$	7-8	8-9	11

The millimeter measurements demonstrate that at pH 8 the amount of water molecules which got into strong interaction with single-stranded poly(rC) is equal to 7-8.

IR spectroscopy in wet films make it possible to study the stages of the formation of different structures of biopolymers and their hydration shells. Analysis of the changes in IR spectra occurring with wetting allows one to find the atomic groups which are hydration centers and to determine the order and degree of their fitting by water molecules.

To obtain such information on poly(rC) we derived IR spectra of the films for different humidities in the region of absorption of the intra- and the extraring vibrations of bases ($1500-1750\text{ cm}^{-1}$) and in the region of absorption of ribose and phosphates PO_2^- ($900-1350\text{ cm}^{-1}$). The dependences of the frequencies ν and intensities R on n were found from these spectra.

At the initial stage of sorption ($0 < \text{r.h.} < 44\%$) the results of IR studies in the above regions point to the bonding of water molecules with such centers as atoms of the N_1 , N_3 and, possibly, the groups $\text{C}_2=\text{O}$ and NH_2 (base), O_4 , and OH (ribose), PO_2^- (phosphate).

With further change in n in the interval $44\% < \text{r.h.} < 86\%$ (to $n \cong 10$), the IR hypochromism and high-frequency shifts of the bands of the intraring vibrations and also the appearance of the band at 1292 cm^{-1} appear to be due to the ordering of cytosine rings and to the transition of poly(rC) to the fully ordered single-strand structure.

Thus, EHF (solution) and IR (wet films) results at pH 8 are close to each other and show that 8-10 bound water molecules are necessary to form the ordered structure of poly(rC).

From the dielectric data presented in Table 1, it follows that at pH 4.5 the hydration of poly(rC) is 8-9 molecules of water per nucleotide (double-stranded helical structure).

The dependences of ν and R on n (pH 4.6, $0 < n < 2-3$) for the absorption bands associated with the intra- and the extraring vibrations of cytosine may also be explained by hydration. The hydration centers are the same as those at neutral pH region and take part in the hydrogen bond between the cytosines of two opposite poly(rC) chains.

The rise of the intensity of the band at 970 cm^{-1} as well as the appearance of the bands at 1059 cm^{-1} and 1293 cm^{-1} ($0 < n < 5$) of ribose correspond to the formation of bonds between water molecules and the atoms $\text{O}_{4'}$ and OH . The water bridges connecting these atoms and phosphates, cytosines and atoms $\text{O}_{2'}$ and $\text{O}_{5'}$ of neighbouring strands are formed. This process stabilizes the double-helical complex.

Further wetting ($2 < n < 7$) leads to the changes in intensity and position of some bands associated with vibrations of bases and ribose. These effects indicate the formation of the double-helical conformation. Final stabilization of the complex takes place with increase in the water content to $n=9$.

This value fully agrees with the EHF findings. Thus, this amount may be considered to be necessary for the stabilization of double-helix poly(rC) both in solution and in films.

Dielectric measurements show that the poly(rC) hydration at pH 3.3 is 11 water molecules per nucleotide. Since in this case the double-stranded complex dissociates with elimination of base pairing, water bridges and ordered helical conformation, it might be anticipated that the hydration at pH 3.3 might not exceed the hydration at pH 8. The greater value which is observed is apparently due to the protonation of N_3 (65% at pH 3.3). It is known that the hydration number for proton is 10 [8], so that the poly(rC) chain, except N_3 , binds 5 water molecules. This value is very close to IR data ($n=6$). However, the latter value may also be explained by aggregation of poly(rC) in acid region (pH<3).

CONCLUSIONS

Analysis of EHF and IR studies demonstrates that hydration of the poly(rC) helical forms is about 10 water molecules per nucleotide. The hydration sites of poly(rC) are atomic groups $\text{C}_2=\text{O}$, NH_2 , $\text{O}_{4'}$, N_1 , N_3 and PO_2^- . It is shown that the binding of water molecules together these groups plays a main role for the formation of the helical structures of poly(rC).

We thank I.V. Sysa for help in EHF measurements. This work was supported by the State Foundation of Fundamental Investigations (Grant No2.4/759).

REFERENCES

1. E.H. Grant, R.J. Sheppard, G.P. South, «Dielectric Behaviour of Biological Molecules in Solution», Clarendon Press, Oxford, pp.237, 1978.
2. V.Ya. Maleyev, M.A. Semenov, A.I. Gasan, V.A. Kashpur, «Physical Properties of the DNA-Water System», Biofizika, Vol.38, No.5, pp.789-811, 1983.
3. T. Umehara, S. Kuwabara, S. Mashimo, S. Yagihara, «Dielectric Study on Hydration of B-, A- and Z-DNA», Biopolymers, Vol.30, No.7/8, pp.649-656, 1990.
4. C.H. Chou, G.J. Thomas, «Raman Spectral Studies of Nucleic Acids», Biopolymers, Vol.16, No.4, pp.765-789, 1977.
5. M.A. Semenov, B.I. Sukhorukov, V.Ya. Maleyev, «Are Nitrogen Bases of DNA Hydrated at Low Humidity?», Biofizika, Vol.26, No.6, pp.979-984, 1981.
6. V.A. Kashpur, V.Ya. Maleyev, T.Yu. Shchegoleva, «Investigation of Hydration of Globular Proteins by Differential Dielectrometric Method», Mol. Biol., Vol.10, No.3, pp.568-575, 1976.
7. T.J. Buchanan, G.M. Haggis, I.B. Hasted, «The Dielectric Estimation of Protein Hydration», Proc. Roy. Soc., A213, No.1114, pp.379-391, 1952.
8. L.I. Antropov, «Theoretical electrochemistry», Moscow, pp.568, 1975.

**РЕЛАКСАЦІЙНІ ТА СПЕКТРОСКОПІЧНІ ПРОЯВИ ГІДРАТАЦІЇ
ПОЛІРИБОЦИТИДИЛОВОЇ КИСЛОТИ****В.А. Кашпур, М.О. Семенов, Н.М. Сагайдакова***Інститут радіофізики та електроніки НАН України, вул. Академіка Проскури 12, 310085, Харків, Україна**Тел. 0038-0572-448337, Факс 0038-0572-441105, E-mail: berez@ire.kharkov.ua*

В роботі досліджено гідратацію та структурне становище полірибоцитидилової кислоти (полі-рЦ) в розчинах та вологих плівках. Визначено роль води у формуванні різних структур полі-рЦ. За допомогою диференційного НВЧ-діелектрометра виміряно діелектричну проникність розчинів полі-рЦ на довжині хвилі 7,6 мм. Знайдено гідратаційні числа односпіральної (рН=4,5), двохспіральної (рН=7,8) та неупорядкованої (рН=3,3) форм полі-рЦ. Центри гідратації цих структур винайдено з інфрачервоних спектрів вологих плівок. За цими та рентгенівськими даними розвинуто гідратаційну модель одно- та двохспіральної структури полі-рЦ.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: полірибоцитидилова кислота, гідратація, інфрачервоні спектри, міліметровий діапазон, структурні переходи.

UDC 577.323.425

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

INTERACTION OF Ni^{2+} IONS WITH HOMOPOLYNUCLEOTIDES CONTAINING ADENINE AND URACIL AND THEIR MONOMERS

V.A.Sorokin, V.A.Valeev, M.V.Degtiar, G.O.Gladchenko, Yu.P.Blagoi

B.I.Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov
November 25, 1999

Interactions of Ni^{2+} ions with AMP, UMP, single-chain poly A, poly U, double-chain poly A·poly U and three-chain poly A·2 poly U have been studied by the method of differential UV spectroscopy. The coil→helix transition observed in polynucleotides is due to the Ni^{2+} ion binding to oxygen atoms of phosphate groups. The nickel coordination to bases takes place only in the case of single AMPs and single-chain poly A. The formation of a chelate $\text{N7-Ni}^{2+}-(\text{PO}_4)^-$ induces melting of this polymer. Melted parts form compact particles with the effective radius ~100Å.

KEY WORDS: UV spectroscopy, homopolynucleotides, metal ions.

Among transition metals nickel (along with chrome) being of the maximum cancerogenic index is one of the most toxic [1]. Its possibility to influence functions of biological macromolecules makes interesting studies of the Ni^{2+} interaction not only with natural DNA and nitrogen base derivatives [2,3] but as well with homopolynucleotides forming noncanonical single- and multichain helices being of biological functions [4]. Experimental results available for these systems are not enough. So, interactions of Cu^{2+} ions with four-chain poly G [5] and of Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} ions with double-chain poly A and poly C [6] have been studied.

The present work was aimed at the determination of atoms coordinating Ni^{2+} ions in single-, double- and three-chain polynucleotides monomers of which are AMP and UMP. To ascertain ion-induced conformational transitions in these polynucleotides is another task of the work.

MATERIALS AND METHOD

Research objects were potassium salts of poly A, poly U, poly A·poly U (AU) and poly A·2 poly U (A2U) as well as disodium salt nucleoside-5'-phosphates (AMP and UMP). Poly A, poly U and nucleotides were supplied by Serva (Germany) and AU and A2U - by Sigma Chemical Company (USA). $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ was doubly recrystallized. To increase the binding constant of Ni^{2+} ions, nucleotides were solved in acetate buffer with the low (10^{-3}M) concentration of Na^+ ions. But under these conditions at room temperature AU and A2U are in a partially melted state [7] therefore AU as a more stable polymer [7] was solved in 10^{-2}M NaAc and A2U (and poly U) was solved in the same solution added with NaCl. In this case the total Na^+ ion concentration was $3 \cdot 10^{-2}\text{M}$. To avoid the formation of nickel hydroxides, acetate buffer with pH6 was used. But at 10^{-2}M Na^+ and pH6 poly A are able to form double helices [8]. To eliminate this process, poly A was dissolved in cacodilate buffer 10^{-2}M Na^+ with pH7.

Concentrations of nucleotide and polynucleotide phosphorus (P) were determined by values of extinction molar coefficients in UV absorption maxima [7, 9, 10] with an error not exceeding 0,5%. In all the cases the value of P was $(1 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}\text{M}$. The Ni^{2+} ion concentration ($[\text{Ni}^{2+}]$) was evaluated by weight and controlled by the complexometric method. An error in determining $[\text{Ni}^{2+}]$ was not more than 0,5%.

Ni^{2+} ion-induced differential UV spectra ($\Delta\epsilon_a$ -DUVS) were registered at $T=(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ with a Specord M40 spectrophotometer (Carl Zeiss Jena, Germany), using the four-cuvette measuring scheme. All the DUV spectra obtained correspond to the equilibrium situation that follows from their form and intensity retained for (30-40) min. In the case of single-chain poly A at $[\text{Ni}^{2+}] > 10^{-3}\text{M}$ kinetics of spectral changes induced with the formation of light scattering particles was observed.

In this case DUV spectra induced with changes in the poly A absorption ($\Delta\epsilon_a(\nu)$) were determined by the extrapolation method using the formula [11]:

$$\Delta\epsilon_a(\nu) = [\Delta A(\nu) - \Delta A_{\nu_0}(\nu/\nu_0)^i] / p \quad (1)$$

where $\Delta A(\nu)$ is a change in the optical density of the poly A solution immediately after the addition of Ni^{2+} ions. $\Delta A_{\nu_0} = \Delta A$ at $\nu = \nu_0 = 32000 \text{ cm}^{-1}$. The value of the wave exponent i in Angström formula was determined by the $\Delta A(\nu)$ dependence at $\nu < \nu_0$ where the light absorption is absent.

As well, differential spectra conditioned with melting of polynucleotide helical links ($\Delta \epsilon_h$) were registered with a Specord UV VIS spectrophotometer. In this case the standard cuvette was thermostatted at $T = T_0$ while the working one was heated up to 96°C and then the spectrum $\Delta \epsilon_h$ was taken.

EXPERIMENTAL RESULTS

Monomers

AMP. In the range of $(10^{-4} \div 5 \cdot 10^{-2}) \text{ M}$ Ni^{2+} ions induce AMP DUV spectra the shape of which coincides with that of DUV spectra of Ni^{2+} -dAMP complexes [2]. This evidences the ion interaction with nitrogen atoms of the adenine ring (Figs 1, 2). In aqueous solutions of Ado atoms coordinating Ni^{2+} ions are N1 and N7. In the range of neutral pH values the interaction with N1 is preferential [13]. But in AMP the main atom binding M^{2+} ions is N7 [3, 9, 14]. This is, in particular, promoted with the Ado anti-conformation that is suitable for the formation of a chelate including the simultaneous ion binding to N7 and the phosphate group oxygen (O(P)) [14]. The very strong difference between the shape of AMP (and dAMP [2]) DUV spectra induced by Ni^{2+} ions and that of AMP DUV spectra resulted from N1 protonation (Fig. 1) evidences these data.

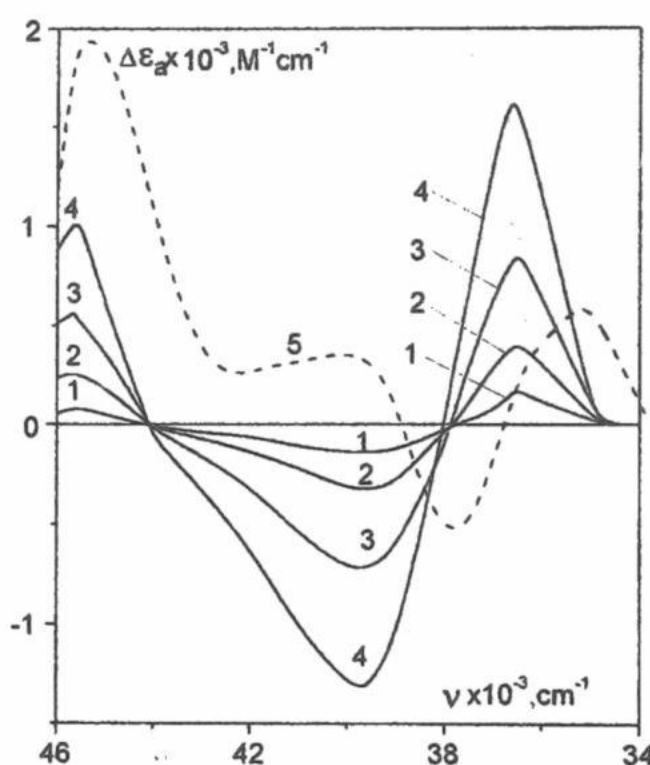


Fig. 1. Differential UV spectra of AMP, induced with Ni^{2+} ions. 1 - $1,25 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Ni^{2+} ; 2 - $7 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; 3 - $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; 4 - $3,5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$; 5 - AMP DUV spectrum induced with N1 protonation (calculated by data from [12]).

UMP. As in the case of dTMP [2], Ni^{2+} ions induce no changes in UMP absorption spectra up to $[\text{Ni}^{2+}] = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ that evidences the absence of ion interactions with heteroatoms of the uracil ring as well as with oxygen of the sugar ring because deprotonation of hydroxyl groups of the pyrimidine ribose induces significant changes in absorption spectra of bases [12]. Besides (and it is essential), for ribose hydroxile groups of UMP $\text{pK}_a = 13 \div 13,7$ [12] that makes improbable the substitution of their protons with Ni^{2+} ions. Thus, in accordance with the data from [3], the only UMP atom binding nickel is O(P). But the interaction with this atom has no influence on absorption spectra of nucleotides [12].

Polynucleotides

Poly A. In the range of their low concentrations Ni^{2+} ions induce DUV spectra the shape of which is "reverse" to that of DUV spectra resulted from the helix-coil transition of the single-chain poly A (Fig. 3a). Thus, at $[\text{Ni}^{2+}] \leq 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ DUV spectra of metal complexes are mainly conditioned with the rise of the helicity degree of the single-chain poly A, induced by the Ni^{2+} ion interaction with O(P) that is characteristic of poly A complexes with all the M^{2+} (Cu, Mn, Co, Mg, Sr, Ba, Be) ions [9]. At $[\text{Ni}^{2+}] > 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ the ion binding to adenine of poly A becomes pronounced and is followed with melting of helical parts. Indeed, at these ion

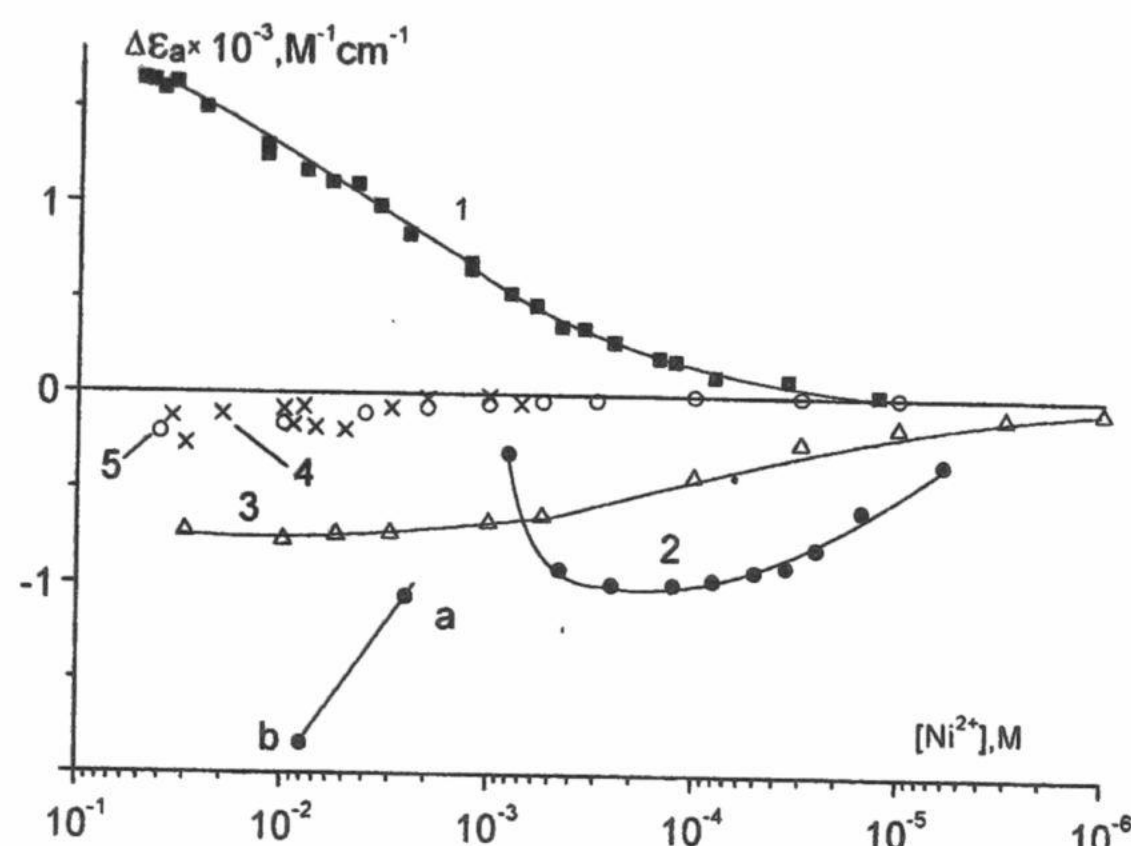


Fig. 2. Concentrational dependences of intensities of DUVS extrema of AMP and polynucleotides, induced with Ni^{2+} ions. 1 - $\nu=36500\text{ cm}^{-1}$ (AMP); 2 - $\nu=39500\text{ cm}^{-1}$ (single-chain polyA); 3 - $\nu=39000\text{ cm}^{-1}$ (AU); 4 - $\nu=39000\text{ cm}^{-1}$ (single-chain polyU); 5 - $\nu=37000\text{ cm}^{-1}$ (A2U). a and b - $\Delta\epsilon_a$ values calculated by formula (1) ($i=4$).

concentrations the longwave isobestic point on DUV spectra of poly A shifts to the shortwave side (Fig. 3b) and with the rise of the nickel content the derivative $[\partial(\Delta\epsilon_a)/\partial([\text{Ni}^{2+}])]$ goes through zero and changes its sign (Fig. 2). This result is in a qualitative agreement with other experimental data [9], according to which, melting of helical parts of the single-chain poly A is observed in the presence of all the transition metal ions. It is essential that at $2.5 \cdot 10^{-3}\text{ M Ni}^{2+}$ the shape of poly A DUV spectra is similar to that of DUV spectra of Ni^{2+} complexes with AMP that evidences the ion coordination with N7 (Fig. 3b). Accordingly to the NMR spectroscopic data obtained for poly A complexes with Mn^{2+} and Cu^{2+} ions [15, 16], melting of helical parts is conditioned with the formation of chelates $\text{N7-Mt}^{2+}\text{-O(P)}$. As Fig. 2 shows, the melting process is cooperative that is, perhaps, conditioned with positive cooperativity of the Mt^{2+} ion binding to bases of single-chain polynucleotides [9]. Light scattering observed at $[\text{Ni}^{2+}] > 10^{-3}\text{ M}$ meets the Angström formula [11] with the exponent index $i \approx 4$. Such a value of i evidences the formation of particles with the effective radius $r_e \leq 100\text{ \AA}$ [17]. The inertial radius (R_i) of the single-chain statistical coil is an order of magnitude higher [18]. Such a difference between r_e and R_i evidences compaction of the single-chain poly A in the range of concentrations

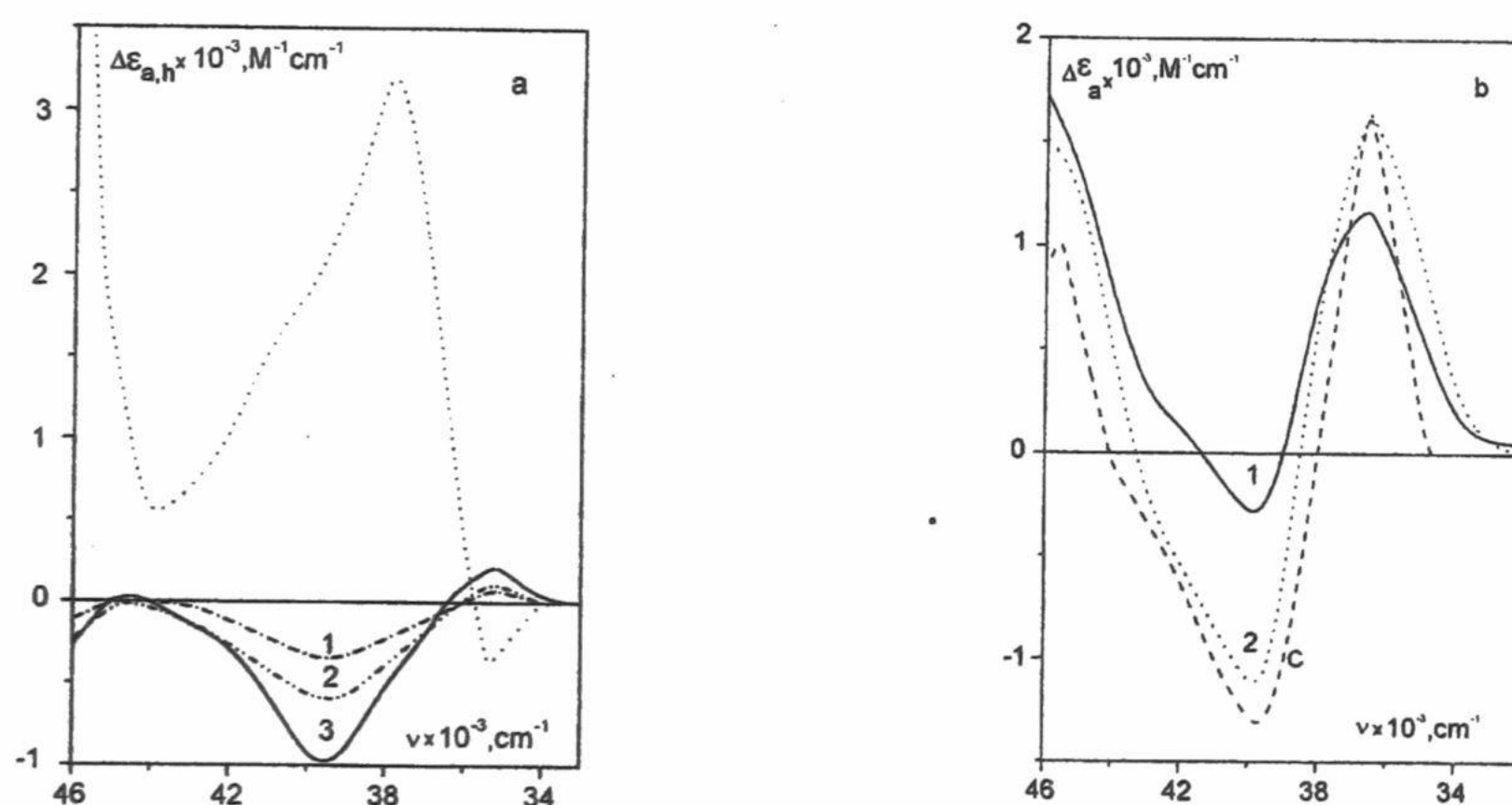


Fig. 3. Differential UV spectra of single-chain poly A, induced with Ni^{2+} ions.

a: region of preferential binding to phosphates - 1 - $6 \cdot 10^{-6}\text{ M Ni}^{2+}$; 2 - $1.5 \cdot 10^{-5}\text{ M}$; 3 - $1.25 \cdot 10^{-4}\text{ M}$; 4 - spectrum $\Delta\epsilon_h$ induced with helix-coil transition of single-chain poly A.

b: region of ion binding to adenine - 1 - $8 \cdot 10^{-4}\text{ M Ni}^{2+}$, 2 - $2.5 \cdot 10^{-3}\text{ M}$ (calculated by formula 1, $i=4$). C - AMP DUV spectrum induced with 0.035 M Ni^{2+} (See Fig. 1).

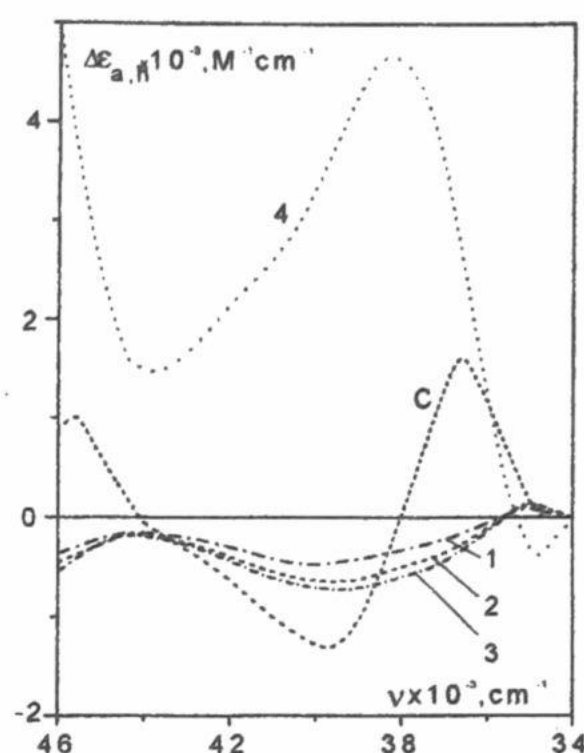


Fig. 4. Differential UV spectra of double-chain polyA-polyU, induced with Ni^{2+} ions. 1 - 10^{-4}M Ni^{2+} ; 2 - $5.5 \cdot 10^{-4}\text{M}$; 3 - 10^{-2}M ; 4 - spectrum $\Delta\epsilon_h$ induced by helix-coil transition of AU. C - the same as in Fig. 3.

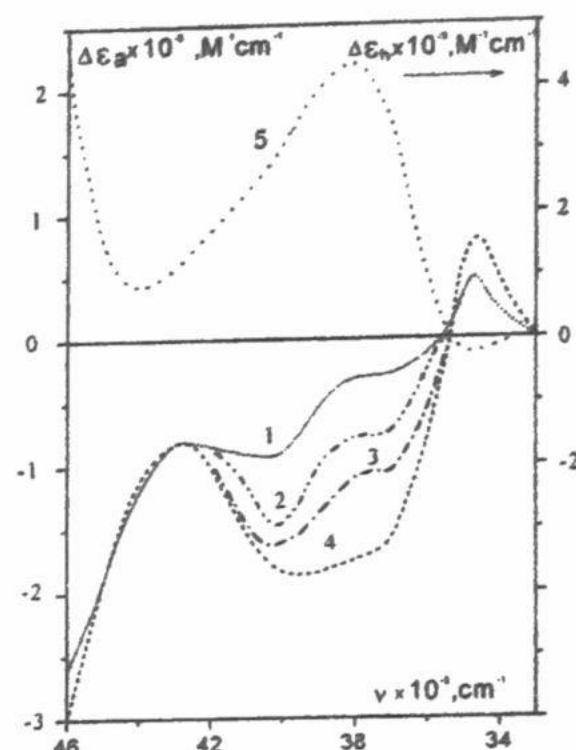


Fig. 5. Differential UV spectra of three-chain poly A-2 polyU, induced by Ni^{2+} ions. 1 - $5.5 \cdot 10^{-5}\text{M}$ Ni^{2+} ; 2 - $2 \cdot 10^{-3}\text{M}$; 3 - $4 \cdot 10^{-3}\text{M}$; 4 - 10^{-2}M (spectra refer to left ordinate); 5 - spectrum $\Delta\epsilon_h$ induced by helix-coil transition of A2U (refers to right ordinate).

corresponding to the Ni^{2+} ion binding to the adenine ring. The formation of compact particles with $r_e \sim 100\text{\AA}$ was observed by us earlier in microphotographies of poly A in the presence of the high concentration of Ca^{2+} ions [19]. Compaction of poly A is a cause of new hypochromicity of its absorption at $[\text{Ni}^{2+}] > 10^{-3}\text{M}$ (Fig. 2).

Poly U. Ni^{2+} ions induce no changes in absorption spectra of the coiled poly U up to $2 \cdot 10^{-3}\text{M}$ Ni^{2+} (Fig. 2). In the range of $2 \cdot 10^{-3}\text{M} < [\text{Ni}^{2+}] \leq 3 \cdot 10^{-2}\text{M}$ only a weak hypochromicity of the poly U absorption (Fig. 2) is observed (in the absence of light scattering), conditioned by ordering of the small number of poly U links on the ion interaction with O(P). Thus, in the range from 10^{-5}M to $3 \cdot 10^{-3}\text{M}$ Ni^{2+} ions do not bind to heteroatoms of the uracil ring and their interaction with phosphates induces no compaction of the polymer.

Poly A-poly U. The shape of the AU DUV spectra induced by Ni^{2+} ions is a "mirror reflection" of that of the AU DUV spectra resulted from the disruption of the double helix (Fig. 4). This means that at 0.01M Na^+ AU at 20°C a) has some number of disordered links and b) Ni^{2+} ions eliminate these "defects" and restore the helical structure of the polynucleotide. In accordance with Fig. 2, the nickel-induced coil-helix transition is an essentially noncooperative process that may be induced with negative cooperativity of the Ni^{2+} ion interaction with AU, characteristic, in principle, of the M^{2+} ion binding to ordered helices of different structural organization levels [20, 21]. As in the nickel presence poly U retains mainly the nonordered state, the rise of the helicity degree of AU is induced by the Ni^{2+} ion interaction with single-chain parts of poly A. The shape of nickel-induced DUV spectra of AU shows that up to $3 \cdot 10^{-2}\text{M}$ Ni^{2+} ions do not interact with ring heteroatoms of the polynucleotide adenine though the binding to N7A in the polynucleotide is principally possible [22]. The absence of the Ni^{2+} interaction with this atom of the AU double helix is, perhaps, conditioned by the high rigidity of its sugar-phosphate bone, preventing from the formation of $\text{N7-Ni}^{2+}-(\text{PO}_4)^-$ type chelates while Ni^{2+} -N7A complexes are characterized with very low binding constants. For example, for Ni^{2+} +N7 Ado complexes the value of K is 8M^{-1} [13] that is such a binding type is able to manifest itself only at molar nickel concentrations. Besides, the steric accessibility of N7A in helical structures is lower than its value in AMP (by 2.5 times, in accordance with theoretical calculations [23]). Thus, the data obtained permit to conclude that the restoration of the AU helical structure with Ni^{2+} ions results from their interaction with oxygen atoms of phosphate groups.

Poly A-2 poly U. Very low hypochromicity of A2U absorption, induced by Ni^{2+} atoms, evidences that the number of "defects" in its structure is insignificant (Figs 2, 5). The shape of DUV spectra shows that, as in the case of AU, Ni^{2+} ions restore the A2U helical structure on their interaction with phosphate groups of melted parts of the adenine chain while the binding to N7A is absent up to $4 \cdot 10^{-2}\text{M}$ Ni^{2+} . The participation of this atom in the system of hydrogen bonds supporting the triple helix [22] makes this result natural. As well, the data obtained show that the Ni^{2+} ion binding to phosphates of ordered parts of the adenine chain as well as to ordered and nonordered parts of uracil chains has no influence on the conformational state of the polynucleotides studied.

As Fig. 2 shows, quantitative changes in absorption spectra of poly U and A2U are similar. But small values of spectral changes for the both polynucleotides are conditioned with different causes - with the small

number of melted parts in the A2U triple helix and with a low tendency of uracil derivatives to form stacked structures [22].

The work has been performed under the financial support of the US Civilian Research and Development Foundation (CRDF Grant UN1-435).

REFERENCES

1. E.L.Andronikashvili// *Biofizika*, 1987, V. 23, N 5, p. 782-799.
2. V.A.Sorokin, V.A.Valeev, G.O.Gladchenko, I.V.Sysa, I.V.Volchok, Yu.P.Blagoi// *J. Inorg. Biochem.*, 1996, V. 63, N 2, p. 79-98.
3. K.Aoki, in: *Nucleosides, Nucleotides and Metal Ions in Bioactive Molecules*. Elsevier: Amsterdam, Oxford, New York, Tokio, 1988, V. 8, Chapt. 13.
4. I.A.II'icheva, V.L.Florentiev// *Mol. Biol.*, 1992, V. 26, N 3, p. 512-551.
5. V.A.Sorokin// *Mol. biol.*, 1988, V. 22, N 6, p. 1590-1598.
6. V.A.Sorokin, V.A.Valeev, G.O.Gladchenko, Yu.P.Blagoi// *Biophysics*, 1994, V. 39, N 5, p. 821-832.
7. H.Krakauer, J.M.Sturtevant// *Biopolymers*, 1968, vol. 6, p. 491-512.
8. D.N.Holcomb, S.N.Timasheff// *Biopolymers*, 1968, vol. 6, N 4, p. 513-529.
9. Yu.P.Blagoi, V.L.Galkin, G.O.Gladchenko, S.V.Kornilova, V.A.Sorokin, A.G.Shkorbatov, *Metallokompleksy nukleinovyykh kislot v rastvorakh*, Kiev, Naukova Dumka, 1991.
10. M.Riley, B.Maling, M.J.Chamberlin// *J. Mol. Biol.*, 1966, V. 20, p. 359-389.
11. V.A.Sorokin, Yu.P.Blagoi, V.A.Valeev, S.A.Khomenko, L.A.Morozova// *Mol. Biol.*, 1982, V. 16, N 2, p. 369-378.
12. A.V.Borodavkin, E.I.Budovskii, Yu.V.Morozov, F.A.Savin, N.A.Simukova, In: *Itogi Nauki i Tekhniki. Ser. Mol. Biol.* Vol. 14. Moscow: VINITI, 1977.
13. S.-H.Kim, R.B.Martin // *Inorg. Chim. Acta*, 1984, V. 91, N 1, p. 19-24.
14. R.W.Gellert, R.Bau, R.B.Martin, Ya.H.Mariam, In: *Metal Ions in Biological Systems*. New York: 1979, V. 8, Chapt. 1-2.
15. A.Yamada, K.Akasaka, H.Hatano// *Biopolymers*, 1976, V. 15, N 7, p. 1315-1331.
16. K.Enmanji// *J. Polym. Sci.*, 1987, V. 22, N 3, p. 883-895.
17. I.Ya.Slonim// *Optika i Spektroskopiya*, 1960, V. 8, N 1, p. 98-108.
18. A.Yu.Grosberg, A.R.Khokhlov, *Statisticheskaya Fizika Makromolekul*, Moscow: Nauka, 1989.
19. V.A.Sorokin, Yu.P.Blagoi, V.A.Valeev, Yu.V.Lisnyak// *J. Inorg. Biochem.*, 1983, V. 19, p. 143-153.
20. H.Krakauer// *Biochemistry*, 1974, V. 13, N 12, p. 2579-2589.
21. R.M.Clement, J.Sturm, M.Daune// *Biopolymers*, 1973, V. 12, N 2, p. 405-421.
22. W.Saenger, *Printsypy strukturnoi organizatsii nukleinovyykh kislot*, Moscow: Mir, 1987.
23. R.Lavery, A.Pullman, B.Pullman// *Int. J. Quant. Chem.*, 1981, V. 20, N 1, p. 49-62.

УДК 577.332

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

ВЛИЯНИЕ ГИДРАТАЦИИ НА ТАУТОМЕРИЮ 6-ТИОГУАНИНА

Ю.В. Рубин

Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины, 310164 Харьков, пр. Ленина, 47.

Статья поступила 23 октября 1999 г.

С помощью методов B3LYP и HF проведен теоретический расчет комплексов тионного и тиольного таутомеров 6-тиогуанина с одной молекулой воды. Показана большая стабильность комплекса, включающего тионный таутомер, соответственно на 17.6 кДж/моль и 8.1 кДж/моль. Это согласуется с экспериментальными данными, что в воде 6-тиогуанин существует преимущественно в виде тионного таутомера, хотя в газовой фазе он существует в виде тиольного таутомера.

Ключевые слова : 6-тиогуанин, таутомерия, квантово-механические расчеты

6-Тиогуанин (6SG) является противоопухолевым препаратом и давно используется для лечения лейкозов [1]. Его уникальные оптические свойства позволяют использовать его как люминесцентную метку для изучения структурных переходов в ДНК [2].

Ранее было экспериментально показано, что 6-тиогуанин в газовой фазе существует преимущественно в виде тиольного SH-таутомера [3], в кристалле - в виде N7H тионного таутомера [4], а в воде и ДНК - в виде N9H-тионного таутомера [2, 5].

Теоретические расчеты с использованием методов *ab initio* подтвердили, что в газовой фазе 6-тиогуанин должен существовать в виде N9H-тиольного таутомера [5]. Эти расчеты показали также, что учет влияния объемной воды (полярного растворителя) с помощью континуальной модели Онзагера приводит к увеличению стабильности тионного таутомера. В полярном растворителе N9H тионный таутомер на 1 кДж/моль более стабилен, чем тиольный цис-таутомер. Однако экспериментально в полярных растворителях тиольный таутомер не наблюдается, наблюдается лишь тионный таутомер 6SG [2].

С целью изучения влияния первой гидратной оболочки на таутомерное равновесие 6SG проведен расчет полной энергии и геометрии комплексов тионной и тиольной форм 6SG с одной молекулой воды.

МЕТОД РАСЧЕТА

Теоретические квантово-механические расчеты структурных и энергетических параметров комплексов были проведены с помощью метода B3LYP теории функционала плотности (DFT) и неэмпирического метода Хартри-Фока (HF) [6-8] с использованием пакета программ GAUSSIAN-94 [9]. Вначале были проведены оптимизация геометрии и расчеты полной энергии комплексов с помощью метода B3LYP/6-31G**. Затем геометрия реоптимизировалась методом HF/6-31G** и был проведен расчет полной энергии комплексов этим же методом. Расчет энергии взаимодействия был проведен с использованием формулы :

$$E_i = E_c - (E_t + E_h) \quad (1),$$

где E_i - энергия взаимодействия в комплексе, E_c - полная энергия комплекса, E_t - полная энергия таутомера, E_h - полная энергия молекулы воды.

Была учтена поправка на энергию нулевых колебаний - ZPE и базисную суперпозиционную ошибку - BSSE. Для оценки константы таутомерного равновесия K была использована известная формула:

$$K = (q_b / q_a) \exp [-\Delta E_{a,b} / RT] \quad (2),$$

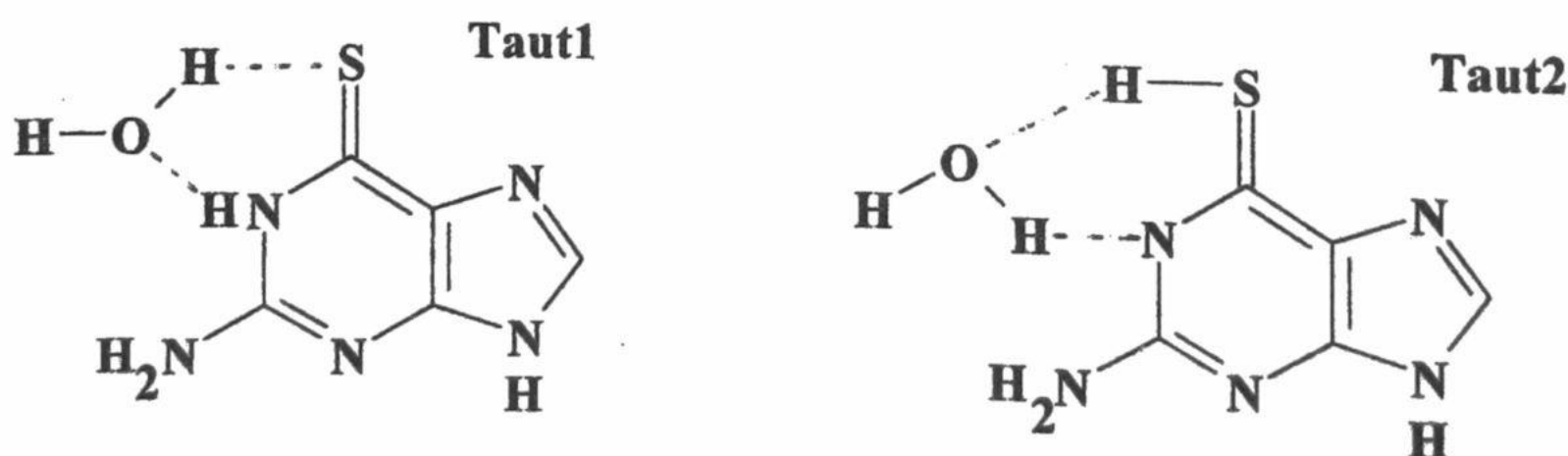


Рис. 1. Структурные формулы комплексов таутомеров 1 и 2 с молекулой воды.

Влияние гидратации на таутомерию 6-тиогуанина

где q_a и q_b соответственно концентрации первого и второго таутомеров, $E_{a,b}$ - относительная энергия таутомера a , R - газовая постоянная, T - температура.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис.1 показаны структурные формулы рассчитанных комплексов таутомеров 6SG с одной молекулой воды. На рисунке и в тексте приняты следующие обозначения: таутомером 1 названа тионная форма N9H таутомера 6SG, а таутомером 2 - тиольная форма этого же таутомера. Соответственно комплексом 1 назван комплекс тионной формы 6SG с одной молекулой воды, а комплексом 2 - комплекс тиольной формы.

Таблица 1

Рассчитанные относительные энергии таутомера 1 в газовой фазе и полярном растворителе [5], а также комплекса 1 в газовой фазе. Расчет выполнен относительно полной энергии таутомера 2 и комплекса 2

	kJ/моль
Мономерная форма 6SG:	
в газовой фазе (метод MP2 /6-31**)	+11.2
полярном растворителе (метод SCRF MP2)	- 1
Комплекс 6SG с H₂O в газовой фазе :	
метод B3LYP/6-31G**	- 17.6
метод HF/6-31**	- 8.1

Проведенный расчет методом HF геометрии комплексов 1 и 2 показал, что они являются неплоскими. Водороды аминогрупп и водород воды, который не участвует в образовании водородной связи значительно выведены из плоскости. Дипольный момент комплекса 1 уменьшен по сравнению с дипольным моментом изолированной молекулы (соответственно 6.46 D и 8.44 D), в то время как дипольный момент комплекса 2 немного увеличен (соответственно 3.62D и 3.54 D)

Выполненный расчет энергии взаимодействия в исследованных комплексах с использованием результатов расчета полной энергии с помощью метода HF (с учетом ZPE и BSSE) дал для комплекса 1 величину 8.0 ккал/моль, а для комплекса 2 - 3.5 ккал /моль. Возможно эти значения являются заниженными, т.к. расчет методом HF не учитывает вклад корреляции электронов в энергию межмолекулярного взаимодействия.

Как видно из таблицы 1, присоединение только одной молекулы воды к молекуле 6-тиогуанина приводит к значительному (на 8.1 кДж/ моль при расчете неэмпирическим методом HF и на 17.6 кДж /моль при расчете методом DFT) возрастанию стабильности комплекса 1 по сравнению со стабильностью комплекса 2.

Проведенные ранее расчеты комплексов гуанина с одной молекулой воды [10] показали большую стабильность (относительную величину полной энергии) комплекса с участием кетонной формы по сравнению с комплексом с участием енольной формы. Добавление второй молекулы воды приводит к возрастанию относительной стабильности комплекса кетонной формы еще на 10 кДж/моль. Учет влияния растворителя (объемной воды) в случае комплекса с участием кетонной формы гуанина [10], приводит к дополнительному увеличению стабильности этого комплекса на 2 кДж/моль.

Как видно из табл 1, наши расчеты качественно согласуются с расчетами в работе [10] и объясняют присутствие 6SG в этаноле и воде преимущественно в виде таутомера 1. Проведенный расчет стабильности комплекса 1 совместно с данными работы [10] о влиянии присоединения второй молекулы воды и влиянии объемной воды позволяет предположить, что реальная стабильность таутомера 1 в воде более, чем на 3 ккал/ моль превышает стабильность таутомера 2, и следовательно согласно формуле 2, константа таутомерного равновесия таутомеров 1 и 2 в воде имеет величину больше, чем 10^2 .

Автор благодарит профессора Е. Лещинского и доктора Л. Горб за помощь в проведении расчетов, а компьютерный центр государственного Университета г. Джексон (Миссиссипи, США) за предоставление машинного времени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Химиотерапия злокачественных опухолей. Ред. Н.Н. Блохин - М.: Медицина 1977.
2. Rubin Yu.V., Bokovoy V.A., Blagoy Yu.P.: // J.Fluorescence. 1995, V. 5, N 3, P.263-272.

-
3. Szczepaniak K., Person W.B., Leszczynski J., Kwiatkowski J.S. // Adv. Biochem. 1995, 41, P.300-312
 4. Bugg C.E., Thewalt U.J. // J. Am. Chem. Soc. 1970. 92 . P.3520-3526.
 5. Stewart M., Leszczynski J., Rubin Yu. V., Blagoi Yu.P. // J.Phys.Chem. 1997. 101, P.4753-4760
 6. Binkly J., Pople J // Int. J. Quant. Chem. 1975, 9, P.229-241
 7. Becke A. Phys Rev B, 1988, 38, P.3098-3109
 8. Lee C., Yang ., Parr // Phys. Rev. B, 1988, 37, P.785-794
 9. Frish M., Trucks G., Schlegel H Gaussian 94 Gaussian Inc., Pittsburg, PA 1994
 10. Gorb L., Leszczynski J // J Amer. Chem. Soc. 1998, 120, P.5024-5032

УДК 577.352.335

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

ВЛИЯНИЕ РЕЖИМОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФИБРИНОГЕНА С ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ ЗОНДОМ ДСМ

В.А. Гаврик, Э.А. Ромоданова, Т.С. Дюбко*, С.В. Гаташ

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, 61077, Харьков, пл.Свободы, 4, Украина

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 61015, Харьков, ул. Переяславская, 23, Украина; e-mail: cryo@online.kharkov.ua, tdyubko@lincom.kharkov.ua

Поступила в редакцию 15 февраля 1999 г.

Методом флуоресцентной спектроскопии исследовано взаимодействие фибриногена с флуоресцентным зондом ДСМ после замораживания растворов белка до -8 и -196°C с различной скоростью. На молекуле фибриногена обнаружено два типа центров связывания зонда, различающихся величинами параметров спектров флуоресценции. Показано, что при медленном замораживании происходят большие конформационные нарушения молекулы фибриногена, чем при быстром.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фибриноген, конформация, флуоресцентная спектроскопия, зонд, связывание, замораживание, скорость охлаждения

Ранее было показано [1], что режим замораживания растворов фибриногена приводит к изменению спектральных свойств собственных хромофоров белка и взаимодействующего с ним флуоресцентного зонда - 4-диметиламинохалкона (ДМХ). В настоящей работе исследовано влияние режимов охлаждения растворов фибриногена на взаимодействие белка с флуоресцентным зондом 4-(N-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний N-толуолсульфонатом (ДСМ) [2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на растворах фибриногена в бидистиллированной воде, концентрация которого составляла 2 мг/мл. Степень очистки белка (94%) контролировалась по осаждению фибриногена тромбином. В опытах использовали препараты белков Харьковской областной станции переливания крови. Замораживание образцов производили по двум режимам: до -196°C со скоростью $\sim 200^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (V_1) при быстром погружении пробирки с образцом в жидкий азот и до -8°C со скоростью $\sim 5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (V_2) в морозильной камере. Оттаивание образцов проводили на водяной бане (40°C) со встряхиванием.

В эксперименте использовали зонд ДСМ производства кооператива «Zonde» (Латвия). Спектры флуоресценции ДСМ регистрировали при термостатировании образцов при 22°C на спектрофлуориметре «Hitachi F-4010» (Япония) с автоматической коррекцией спектров. Точность поддержания температуры составляла $\pm 1^{\circ}\text{C}$. Возбуждение флуоресценции проводили на длине волны 460 нм. Ширины входной и выходной щелей составляли 5 нм. Анализ спектров флуоресценции ДСМ в образцах проводили на ЭВМ, с помощью специально разработанной программы, после предварительного вычитания фона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие молекулы флуоресцентного зонда со сложной макроструктурой белка может характеризоваться кинетикой изменения спектральных характеристик зонда [1]. На рис.1 приведены зависимости изменения интенсивности (I_{max}) спектров флуоресценции зонда в растворах фибриногена от времени. Интенсивность спектра флуоресценции раствора ДСМ, используемой в эксперименте концентрации, в бидистиллированной воде составляла 7,759 отн. ед. Присутствие белка в растворе вначале, после добавления, резко увеличивает интенсивность флуоресценции зонда и это изменение интенсивности зависит от режимов замораживания. Далее, в течение часа, интенсивность I_{max} монотонно уменьшается в растворах как нативного, так и охлажденного со скоростью V_1 белка. В то же время, для белка, охлажденного со скоростью V_2 после 40-минутной инкубации наблюдается незначительное увеличение I_{max} , но для всех образцов после 60 минут инкубации устанавливается стационарное значение I_{max} , примерно на 10% меньше первоначальной величины.

Более сложную зависимость от времени инкубации и скорости охлаждения имеет изменение длины волны максимума (λ_{max}) спектра флуоресценции ДСМ. Для раствора ДСМ в дистиллированной воде $\lambda_{\text{max}} = 616$ нм. При связывании с белком наблюдается смещение λ_{max} в коротковолновую область. Наиболее яркий «синий» сдвиг наблюдается при взаимодействии ДСМ с нативным белком. Кривая зависимости λ_{max} от времени имеет небольшой подъем при 50-60 минутах инкубации и выходит на постоянное

значение после 90 минут инкубации (~ 591 нм). Для образца, охлажденного со скоростью V_2 , наблюдается плавное незначительное уменьшение λ_{max} (в пределах 2 нм) в течение 30 мин. Более сложный характер имеет зависимость λ_{max} от времени инкубации при охлаждении раствора фибриногена со скоростью V_1 . Именно для этого случая сложному виду зависимости $\lambda_{\text{max}} = f(t)$ соответствует и более сложная зависимость $I_{\text{max}} = f(t)$. В таблице 1 приведены величины параметров спектров флуоресценции ДСМ при достижении ими постоянных значений.

Таблица 1. Влияние режимов замораживания фибриногена на спектральные свойства ДСМ

Образец	λ_{max} , nm	I_{max} , nm
Бидистиллированная вода	616,0	7,759
Раствор нативного фибриногена (контроль)	586 (591)	147 (130)
Раствор фибриногена, охлажденный со скоростью V_1	586 (590)	133 (135)
Раствор фибриногена, охлажденный со скоростью V_2	586 (587)	194 (185)

Спектры флуоресценции ДСМ анализировали, используя модель формирования электронно-колебательных спектров многоатомных молекул, по формуле [3]:

$$S_{\Sigma}(v, \{C_i, v_i^c, \sigma_i\}_N) = \sum_{i=1}^N \int \frac{1}{\pi} \cdot \frac{\Gamma(v_s)}{(v - v_s)^2 + \Gamma^2(v_s)} \mu^2(v_s) \frac{C_i}{\sqrt{2\pi}\sigma_i} \exp\left[-\frac{1}{2} \left(\frac{v_i^c - v_s}{\sigma_i}\right)^2\right] dv_s, \quad (1)$$

где v и v_s – частоты излучаемого света и перехода системы, v_i^c и σ_i – центр и дисперсия распределения неоднородного уширения i -й компоненты спектра, C_i – нормировочные коэффициенты, N – число различающихся по физико-химическим характеристикам центров сорбции зонда в молекуле белка, $\Gamma(v_s)$ – полуширина лоренцовой линии перехода, $\mu^2(v_s)$ – вероятность распада возбужденного электронного состояния

Анализ параметров неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ в растворах фибриногена позволил выделить кроме водной составляющей ДСМ еще три спектральные компоненты, соответствующие различной локализации зонда на белковой молекуле. Результаты анализа спектров представлены в таблице 2.

Таблица 2. Влияние режимов замораживания на параметры неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ в растворах фибриногена

Параметры неоднородного уширения спектров	Образцы (растворы)			
	Дистиллированная вода	Нативный фибриноген (контроль)	Фибриноген, охлажденный со скоростью V_1	Фибриноген, охлажденный со скоростью V_2
$v_1^c, \text{см}^{-1}$	15710	16820	16820	16820
$\sigma_1, \text{см}^{-1}$	890	880	875	945
k_1	0.54	0.30	0.30	0.27
$v_2^c, \text{см}^{-1}$		17300	17300	17300
$\sigma_2, \text{см}^{-1}$		880	880	890
k_2		0.08	0.08	0.18
$v_3^c, \text{см}^{-1}$		18550	18550	18550
$\sigma_3, \text{см}^{-1}$		860	860	860
k_3		0.08	0.09	0.01

Из таблицы 2 видно, что из всех центров неоднородного уширения компонент, v_1^c наиболее близок к значению, характерному для спектра флуоресценции ДСМ в дистиллированной воде. Принимая это во внимание, а также учитывая данные [2], можно предположить, что центры сорбции ДСМ этого типа (I) расположены на поверхности белковой молекулы. Поскольку молекула ДСМ имеет единичный положительный заряд, вероятно, что центры связывания типа I включают отрицательно заряженные полярные группы боковых радикалов аминокислот. Положение полосы и дисперсия всех трех исследованных видов растворов фибриногена имеют одинаковое значение, а вклад первой составляющей (k_1) в суммарный спектр уменьшается почти в восемь раз для образцов, охлажденных со скоростью V_2 .

При этом вклад составляющей k_2 (центры типа II) в случае медленного охлаждения увеличивается более, чем в 2 раза. Что касается третьей компоненты, то большие изменения наблюдаются для дисперсии (σ_3), характеризующей сольватное окружение этих центров связывания (типа III). Для растворов, охлажденных со скоростью V_2 , этот параметр увеличивается на 7,3 %, а вклад третьей компоненты в общий спектр снижается.

Анализ спектров флуоресценции ДСМ в растворах фибриногена позволил разделить вклад зонда в свободном и связанном с белковой молекулой состояниях в величину параметров неоднородного уширения спектров и идентифицировать два типа центров сорбции на молекуле фибриногена ($\nu_2^c = 16980 \text{ см}^{-1}$, $\sigma_2 = 945 \text{ см}^{-1}$ и $\nu_3^c = 18550 \text{ см}^{-1}$, $\sigma_3 = 800 \text{ см}^{-1}$).

Режимы замораживания оказывают влияние на характеристики центров сорбции зонда на белковой молекуле. При быстром замораживании до температуры жидкого азота возрастает количество зонда, сорбированного на поверхностных участках молекулы. При этом возрастают величины ν_i^c (полярность) и σ_i (подвижность). При медленном режиме замораживания уменьшается количество зонда, сорбированного в наиболее неполярных центрах сорбции ($\nu_3^c = 18550 \text{ см}^{-1}$) и, в то же время, существенное количество зонда остается в достаточно гидрофобном окружении ($\nu_2^c = 16980 \text{ см}^{-1}$). Можно предположить, что в результате медленного замораживания становятся менее доступны гидрофобные участки связывания зонда. В целом, сравнение этих двух режимов замораживания показывает, что при медленном замораживании имеют место большие конформационные изменения молекулы фибриногена, чем при быстром.

ВЫВОДЫ

Флуоресцентный зонд ДСМ является чувствительным индикатором изменения структуры фибриногена. При связывании с молекулой белка спектр флуоресценции зонда испытывает коротковолновый сдвиг на 30 нм и почти 20-кратное увеличение интенсивности. Взаимодействие ДСМ с молекулой фибриногена зависит от времени инкубации в растворе белка; параметры спектров достигают стационарных значений только через 70-90 минут инкубации. Зависимости параметров спектров ДСМ от времени инкубации различны для разных режимов замораживания растворов белка.

Анализ параметров спектров флуоресценции ДСМ позволил выявить три спектральные компоненты зонда, соответствующие трем центрам сорбции зонда с различной локализацией на молекуле фибриногена. Режимы замораживания растворов оказывают влияние на свойства центров связывания зонда. При более медленной скорости охлаждения раствора фибриногена большая относительная доля молекул зонда связывается гидрофобными центрами сорбции по сравнению с гидрофильными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Е.К., Ромоданова Э.А., Дюбко Т.С., Гаташ С.В., Гаврик В.А.// Проблемы криобиологии. 1998. № 3. С. 18-21.
2. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов.- М.: Наука, 1989.- 277 с.
3. Бойцов В.М., Орлов С.Н.// Биофизика. 1982. Т.27, №6. С.1049-1052.
4. Бойцов В.М., Южаков В.И.// ДАН СССР. 1985. Т.281, №2. С.358-361.
5. Бойцов В.М.// Биологические мембраны. 1987. Т.4, №7. С.677-695.
6. Горбенко Г.П., Нардид О.А., Дюбко Т.С.// Вісн. Харк. Ун-ту. 1998. №410. Біофізичний вісн. Вип. 1. С. 86-95.

УДК 621.3.029.65:577

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

СВОЙСТВА РАСТВОРА ГЛИЦИНА В ИНТЕРВАЛЕ ТЕМПЕРАТУР 20°-70°С ПО ДАННЫМ СВЧ-ДИЭЛЕКТРОМЕТРИИ И ВИСКОЗИМЕТРИИ

Г.М. Глибицкий

*Институт Радиофизики и электроники НАН Украины им. А.Я. Усикова,**г. Харьков 310085, ул. Ак. Проскуры, 12.*

Поступила в редакцию 8 октября 1999 г.

Проведено исследование изменения вязкости и времени релаксации 20% раствора глицина в интервале температур 20-70°С. Методика измерения вязкости описывается. Приводятся данные расчета статической проницаемости и времени релаксации по модели Дебая, учитывающей среднее время релаксации в растворе. Обсуждается отличие рассчитанных величин от значений, измеренных альтернативными методами. Предлагается возможный механизм, объясняющий изменение параметров в диапазоне температур.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: глицин, время релаксации, диэлектрическая проницаемость, водные растворы.

Как известно [1], измерения диэлектрических свойств растворов дают информацию о структуре гидратного окружения растворенных молекул. При этом использование данных совместных вискозиметрических измерений позволяет расширить диапазон исследуемых параметров растворов. В этом случае появляется возможность провести разделение между временем релаксации всей молекулы и временем релаксации групп, проводить анализ изменения свободной энергии, теплоты и энтропии активации и аналогичные параметры активации вязкостного процесса [2]. Целью данной работы является исследование релаксационных параметров растворов глицина в диапазоне 20°-70°С.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для приготовления 20% растворов глицина в дистиллированной воде использовался химически чистый препарат фирмы "REANAL". Измерения относительной вязкости растворов проводились с помощью термостабилизированного вискозиметра Оствальда (рис.1). Вязкость растворов рассчитывалась из соотношения [3]

$$\eta = \eta_0 S t / S_0 t_0$$

где η , η_0 - вязкости раствора и растворителя, S , S_0 - плотности раствора и растворителя; t , t_0 - соответствующие времена протекания через капилляр.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Плотность раствора изменялась практически линейно от 1.07 г/см³ при 20° С до 0.88 г/см³ при 70°С. Зависимость изменения вязкости раствора от температуры изображена на рис.2. Относительная погрешность измерения плотности и вязкости не превышает соответственно 5 % и 8%.

Как следует из теории Дебая, время релаксации может быть рассчитано из выражения [4]:

$$\epsilon' = \epsilon_{\infty} + (\epsilon_s - \epsilon_{\infty}) / (1 + (\omega\tau)^2) \quad (1)$$

$$\epsilon'' = \epsilon_{\infty} + (\epsilon_s - \epsilon_{\infty}) \omega\tau / (1 + (\omega\tau)^2) \quad (2)$$

где ϵ_{∞} и ϵ_s - предельная высокочастотная и статическая диэлектрические проницаемости, ω - круговая частота, τ - время релаксации.

Для расчета времени релаксации использовались значения комплексных составляющих $\epsilon^* = \epsilon' - j\epsilon''$ из работы [5]; при этом была учтена систематическая погрешность, определяемая как разность между

Свойства раствора глицина в интервале температур...

измеренным значением проницаемости при данной температуре для воды и расчетным значением проницаемости для той же температуры и частоты [6]. Зависимости ϵ' , ϵ'' и τ от температуры изображены на рисунках 3 и 4.

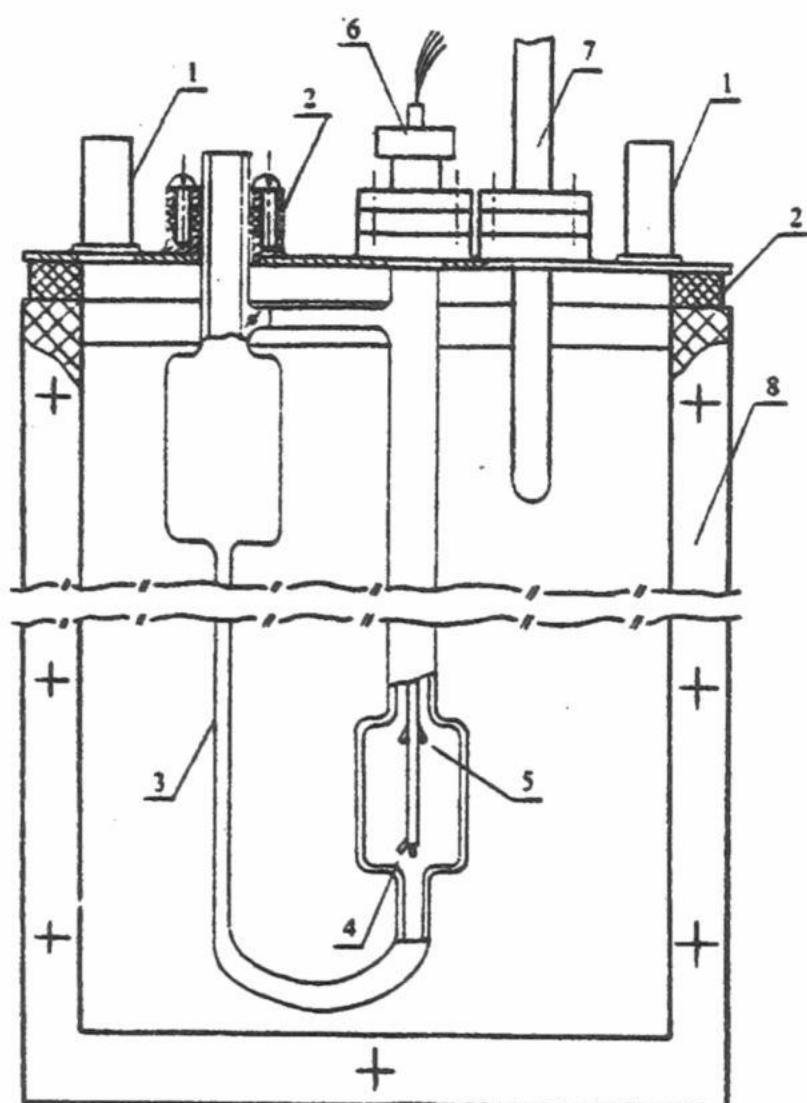


Рис.1. Конструкция вискозиметра.

1-оливки для подачи воды из термостата; 2-резиновые уплотнители; 3-измерительный капилляр; 4,5 -контактные пары, при замыкании которых раствором производится включение и выключение секундомера; 6-вставка со стержнем, на котором крепятся контактные пары; 7-термометр; 8-корпус камеры.

С целью проверки адекватности применения модели Дебая в расчетах параметров раствора были подсчитаны величины статической проницаемости по нашим данным (табл.1) и по данным измерений комплексной проницаемости других авторов (табл.2) при температуре 20°C и концентрации 1М (для сравнения с величинами статической проницаемости, полученными из эксперимента на низкой частоте, в таблицах приведены величины ϵ_{∞} , взятые из [7]).

Как можно видеть, расчетные и экспериментальные величины существенно различаются.

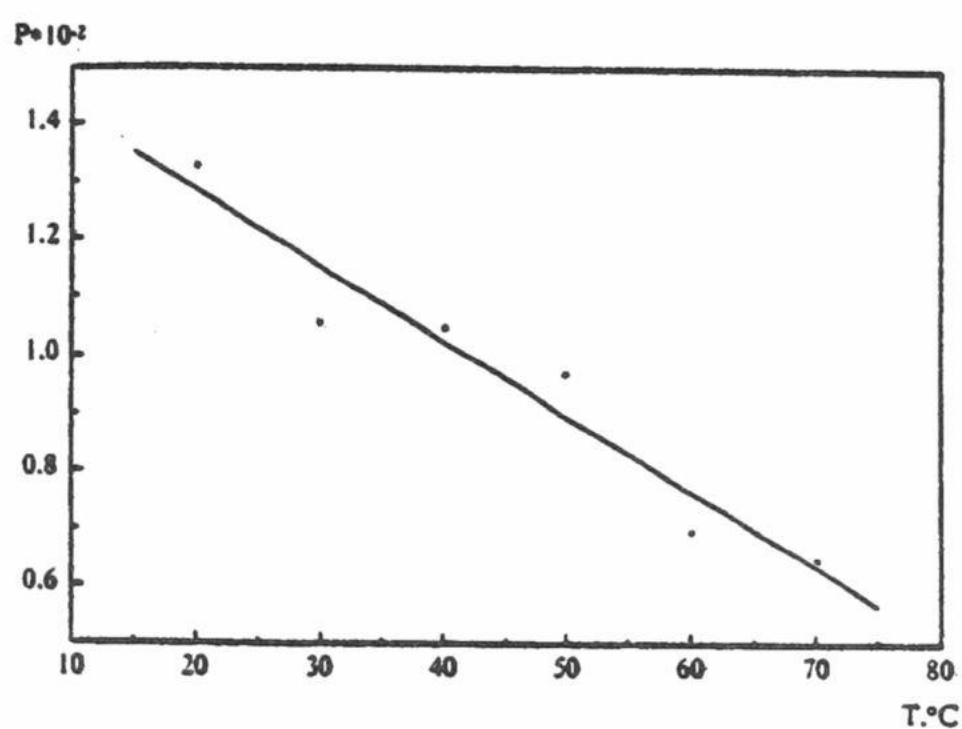


Рис.2.

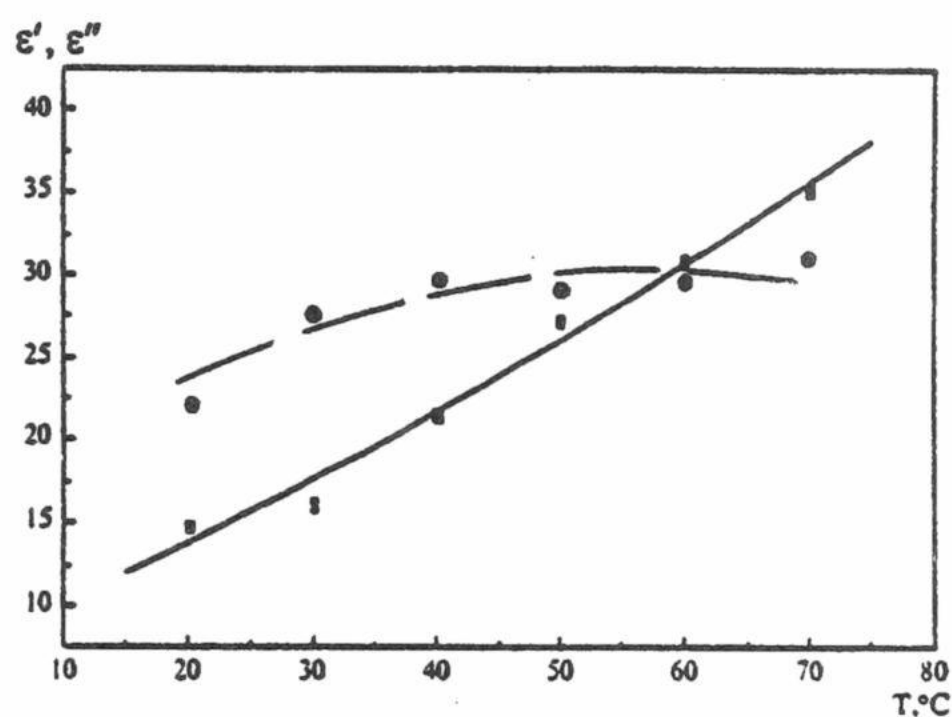


Рис.3. Сплошная линия соответствует зависимости ϵ' ; пунктирная линия - зависимости ϵ'' .

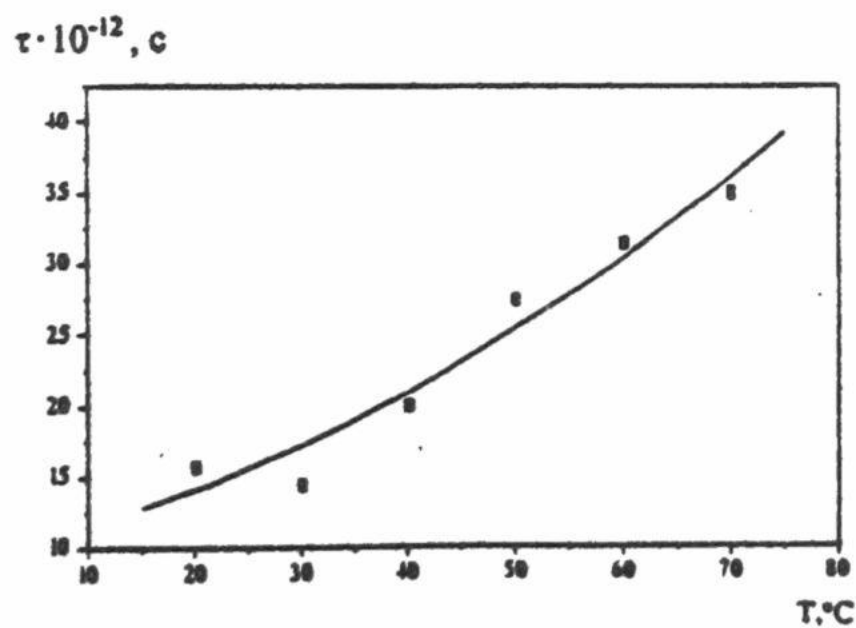


Рис.4

Это можно объяснить [8] существованием в растворе глицина нескольких релаксационных процессов:

$$\tau_c = \sum C_i \tau_i$$

где τ_c - среднее время релаксации, C_i -коэффициенты, характеризующие вклад каждого типа релаксации; τ_i соответствуют процессам, созданным гидратированными мультимерами и мономерами цвиттерионов глицина (в первом приближении $i=2$). В связи с этим приведенные расчеты по модели Дебая могут отражать только качественный характер изменения свойств раствора с изменением температуры. При этом увеличение времени релаксации с ростом температуры может являться результатом распада мультимеров глицина (вносящих незначительный вклад в среднее время релаксации) и, соответственно, увеличением доли мономеров глицина, вносящих больший вклад в величину τ_c . Для получения количественных данных о распределении релаксационных процессов при изменении температуры необходимо провести измерения в широком диапазоне частот.

Таблица 1

T, °C	ϵ_s	ϵ_{sg}
20	16.6	130
30	17.9	-
40	26.6	-
50	40.2	-
60	50.6	-
70	63.7	-

Таблица 2.

f, MHz	ϵ'	ϵ''	ϵ_s	ϵ_{sd}
7462	65.2	37.1	223.7	100
9287	59.2	37.1	174.8	
9463	61.4	38.2	184.3	
14285	44.5	37.1	89.2	
21428	31.2	35.5	45.47	
35294	19.1	28.9	22.4	

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брандт А.А. Исследование диэлектриков на сверхвысоких частотах. М. Физматгиз, 1963. 404 с.
2. Ахадов Я.Ю. Диэлектрические свойства бинарных растворов. М., Наука, 1977, 400 с.
3. Оствальд В., Лютер Р., Друкер Д. Физико-химические измерения. Л. Госхимтехиздат, 1934, ч.1., 279 с.
4. Дебай П., Полярные молекулы. ГТТИ, 1931, 240 с.
5. Глибицкий Г.М. // Біофіз. вісник. 1999, N4, с.31-34.
6. Глибицкий Г.М. // Радиофизика и электроника. 1997. Т. 2, № 2, с. 156-159.
7. Grant E.H. Sheppard R.J., South G.P. Dielectric behavior of biological molecules in solution. Oxford, Claredon press 1978.
8. Зульфугурзаде К.Э., Мирзоев Ф.Г., Иманов Л.М. // Изв. АН Азерб. ССР. 1979, № 4, с. 111-114.

УДК 577.352: 612.73

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

КАЛЬЦИЙЗАВИСИМЫЕ КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ БОЛЬШОЙ ПРОВОДИМОСТИ В МЕМБРАНЕ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК TAENIA SOLI МОРСКОЙ СВИНКИ

А.В.Зима, А.В.Повстан, М.Ф.Шуба

Институт физиологии им. А.А.Богомольца НАН Украины, 252601 ГСП, Киев-24, ул. Богомольца, 4

e-mail: onmf@serv.biph.kiev.ua

Поступила в редакцию 7 октября 1999 г.

Методом фиксации потенциала с помощью присасывающейся микропипетки исследовали кальцийзависимые калиевые (K(Ca)) каналы большой проводимости в изолированных фрагментах мембраны гладкомышечных клеток (ГМК) taenia coli морской свинки, а также токи, переносимые этими каналами в условиях внутриклеточного диализа одиночных клеток. Показано наличие высокой плотности харибдотоксинчувствительных K(Ca) каналов большой проводимости (125 ± 24 пС при $[K^+]_i/[K^+]_o = 23$). Кроме Ca^{2+} -зависимости эти каналы проявляли также и потенциалзависимые свойства, однако не имели потенциалзависимой инактивации, а инактивировались только при уменьшении примембранной внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). Установлено, что скорость спада тока, переносимого этими каналами отражает кинетику инактивации Ca^{2+} тока. Высказано предположение, что основным источником Ca^{2+} , необходимым для активации K(Ca) каналов большой проводимости является вход Ca^{2+} в клетку через потенциалзависимые Ca^{2+} каналы L-типа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гладкомышечные клетки, мембрана, K(Ca) каналы, проводимость, $[Ca^{2+}]_i$, харибдотоксин, потенциалзависимость, инактивация

В ГМК идентифицировано несколько типов K^+ каналов: K(Ca) каналы, каналы задержанного выпрямления, быстроинактивирующиеся каналы переносящие "А-ток", АТФ-чувствительные каналы, каналы аномального выпрямления [1-5]. Активность этих каналов имеет важное значение в контроле мембранного потенциала покоя и модуляции возбудимости ГМК. В частности, активация выходящего калиевого тока отвечает за фазу реполяризации потенциала действия и генерацию тормозного постсинаптического потенциала (ТПСП) [6, 7]. В свою очередь, почти каждый из этих типов K^+ каналов включают в себя несколько подтипов. Так, к типу K(Ca) каналов принадлежит два подтипа - каналы большой (100 - 250 пС) и каналы малой (до 18 пС) проводимости, первые чувствительны к блокирующему действию харибдотоксина [5, 8-10], а вторые - апамина [5, 11-13]. K(Ca) каналы большой проводимости обнаружены во многих возбудимых клетках и практически во всех типах гладких мышц. Они активируются при увеличении $[Ca^{2+}]_i$ и деполяризации мембраны, блокируются наружным ТЭА и харибдотоксином. Этот подтип каналов является "отрицательной обратной связью", реагирующей на увеличение $[Ca^{2+}]_i$. Гиперполяризуя мембрану, он предотвращает возникновение потенциала действия, а следовательно и входа Ca^{2+} в ГМК при действии многих возбуждающих агентов.

Хотя K(Ca) каналы большой проводимости были описаны довольно давно и к настоящему моменту накопилось множество работ, характеризующих токи, переносимые этими каналами в различных отделах желудочно-кишечного тракта [1, 14-18], многие вопросы их функционирования и регуляции остаются открытыми. Например, вопрос об источнике Ca^{2+} , который их активирует, так окончательно и не решён. Также следует отметить имеющиеся в литературе разногласия относительно свойств K(Ca) каналов большой проводимости.

Ранее нами были проведены фармако-биофизические исследования K(Ca) токов мембраны ГМК taenia coli морской свинки в режиме внутриклеточного диализа [19, 20]. В настоящей работе представлены результаты экспериментов, проведенных на уровне регистрации одиночных K(Ca) каналов большой проводимости, а также предпринята попытка проанализировать работу этих каналов при изменении $[Ca^{2+}]_i$ различными способами (входом Ca^{2+} в клетку извне через потенциалзависимые Ca^{2+} каналы и освобождением Ca^{2+} из саркоплазматического ретикула (СР)). Необходимость проведения исследований на уровне одиночных каналов объясняется следующими обстоятельствами. Во-первых, на уровне макротоксов очень сложно в изолированном виде исследовать K(Ca) ток, так как его кинетика и амплитуда модулируются количеством Ca^{2+} поступающего в клетку. Во-вторых, только исследования одиночных каналов позволяют выяснить, какие биофизические параметры каналов изменяются под действием того или иного фактора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на одиночных свежеизолированных ГМК *taenia coli* морских свинок обоих полов весом 250 - 350 г. Процедура получения функционально полноценных изолированных ГМК детально описана в нашей предыдущей работе [19]. В течение эксперимента суспензию клеток хранили при 4°С.

Для отведения ионных токов в работе использовался стандартный метод фиксации потенциала при помощи присасывающейся микропипетки ("patch-clamp") [21]. Регистрация активности одиночных каналов осуществлялась в конфигурациях "inside-out" и "outside-out" этого метода, а общий трансмембранный ионный ток исследовался в режиме внутриклеточного диализа клетки ("whole-cell" конфигурация метода "patch-clamp") [21]. Стекланные микропипетки изготавливались из мягкого молибденового стекла и оплавливались до сопротивления 2 - 4 МОм (для исследования одиночных каналов микропипетки оплавливались до сопротивления 5 - 7 МОм и покрывались силгардом). Усиление ионных токов осуществлялось при помощи усилителя "РОК-3М". Данные регистрировались, обрабатывались и сохранялись в компьютере IBM PC/AT.

Растворы. Для исследования одиночных каналов использовался раствор А, содержащий (мМ): KCl 5.9, NaCl 120.4, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2.5, D-глюкоза 11.5, HEPES 5; (pH 7.4, NaOH) и раствор Б, содержащий (мМ): KCl 135, CaCl₂ 0.2, ЭГТА 0.6, HEPES 10; (pH 7.3, KOH), [Ca²⁺]_i в этом растворе была близка к физиологической - около 100 нМ. Для опытов, проведенных в режиме внутриклеточного диализа исходным наружным раствором являлся раствор А, раствор в пипетке содержал (мМ): KCl 135, MgSO₄ 1, Na₂АТФ 3, ЭГТА 0.3, HEPES 10; (pH 7.3, KOH) (раствор В). Подача тестирующих растворов производилась при помощи системы, обеспечивающей полную замену раствора в экспериментальной камере за время, не превышающее 2 - 3 с. Исследуемые вещества добавлялись к оmywающему раствору в концентрациях, указанных в тексте.

В работе использовали коллагеназу (тип IА), бычий сывороточный альбумин, динатриевую соль аденозин-5-трифосфорной кислоты (Na₂АТФ), этиленгликоль (β-аминоэтиловый эфир) - N,N'-тетрауксусную кислоту (ЭГТА), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES), 4-аминопиридин, апамин и харибдотоксин фирмы "Sigma" (США); соевый ингибитор трипсина фирмы "Reanal" (Венгрия). Остальные реактивы отечественного производства.

Все эксперименты проводились при комнатной температуре.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

K(Ca) каналы впервые были описаны в 1981 году в мембране хромафинных клеток [22] и до настоящего времени обнаружены в мембране большинства, если не всех исследованных объектов, в том числе и в ГМК *taenia coli* морской свинки [1, 3, 17-20]. Ранее на этом объекте нами было показано [19, 20], что в нормальных условиях при ступенчатой деполяризации в переносе выходящего тока принимает участие по крайней мере два типа K(Ca) каналов, а именно: Ca²⁺-зависимые K⁺ каналы большой проводимости, чувствительные к блокирующему действию харибдотоксина и Ca²⁺-зависимые K⁺ каналы малой проводимости, чувствительные к блокирующему действию апамина. Причём вклад первых в общий трансмембранный ионный ток существенно больше. Проводимость этих каналов по литературным данным [4, 5] варьирует от 100 до 250 пС. Также было показано наличие потенциалзависимых K⁺ каналов задержанного выпрямления, не зависящих от Ca²⁺.

В первой части работы было произведено исследование одиночных K(Ca) каналов изолированных фрагментов мембраны ГМК *taenia coli* морской свинки.

На рис. 1 представлены регистрации активности K(Ca) каналов при различных мембранных потенциалах, полученные в конфигурации "outside-out" и их вольт-амперная характеристика (ВАХ). В этих опытах в качестве внутривипеточного раствора использовался раствор Б, наружного - раствор А. При использовании этих растворов соотношение $[K^+]_i/[K^+]_o \approx 23$. В такой конфигурации K(Ca) каналы большой проводимости наблюдались во всех исследованных клетках. Обычно на участке мембраны под пипеткой находилось от 3 до 8 каналов. Вероятность открытого состояния каналов (p_o) экспоненциально зависела от уровня деполяризации мембраны, увеличиваясь в e раз при увеличении уровня деполяризации на 12.5 мВ. Проводимость этих каналов, рассчитанная в пределах мембранного потенциала от -40 до +60 мВ (см. ВАХ, рис. 1, Б) составляла 125 ± 24 пС ($n = 8$). Ранее на этом же объекте с использованием "inside-out" конфигурации метода "patch-clamp" было получено немного большее значение проводимости - 147 пС [17, 18]. Это отличие обусловлено тем, что в данных работах был несколько увеличен концентрационный градиент для K⁺ по сравнению с нашими экспериментами: $[K^+]_i/[K^+]_o = 25$. Нами была также рассчитана проводимость этих же каналов в конфигурации "cell-attached" с использованием растворов симметричных по [K⁺] (140 мМ) [23]. В таких условиях проводимость составляла 240 пС. Известно, что проводимость K(Ca) каналов возрастает с увеличением $[K^+]_o$ и наши данные совпадают с

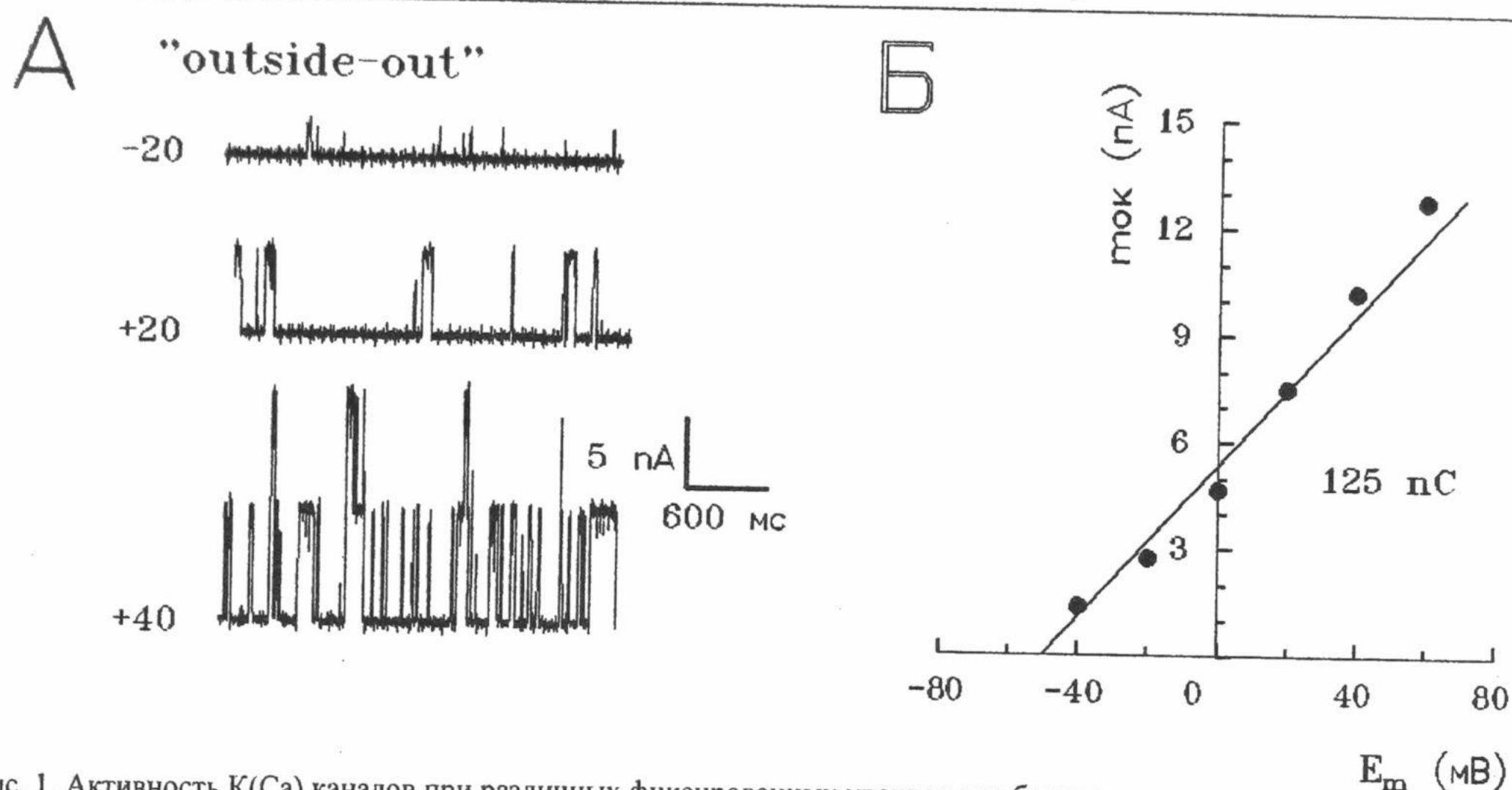


Рис. 1. Активность K(Ca) каналов при различных фиксированных уровнях мембранного потенциала, указанных возле каждого трека (в мВ), зарегистрированная в конфигурации "outside-out" (А) и их ВАХ (Б).

полученными ранее результатами [24, 25], показавшими аналогичное уменьшение проводимости при уменьшении $[K^+]_o$ со 140 мМ до физиологических значений.

Для идентификации исследуемых каналов был использован харибдотоксин, селективно блокирующий K(Ca) каналы большой проводимости. Харибдотоксин (50 нМ), добавленный к наружному раствору, приводил к блокированию K(Ca) каналов, при этом p_0 уменьшалась в 4 раза без изменения амплитуды тока одиночного канала. На рис. 2, представлено действие харибдотоксина (50 нМ) на активность каналов в конфигурации "outside-out" при потенциале фиксации +20 мВ. Увеличение концентрации харибдотоксина до 100 нМ приводило практически к полному блокированию активности канала. В противоположность харибдотоксину, ТЕА (1 мМ) блокировал K(Ca) каналы с наружной

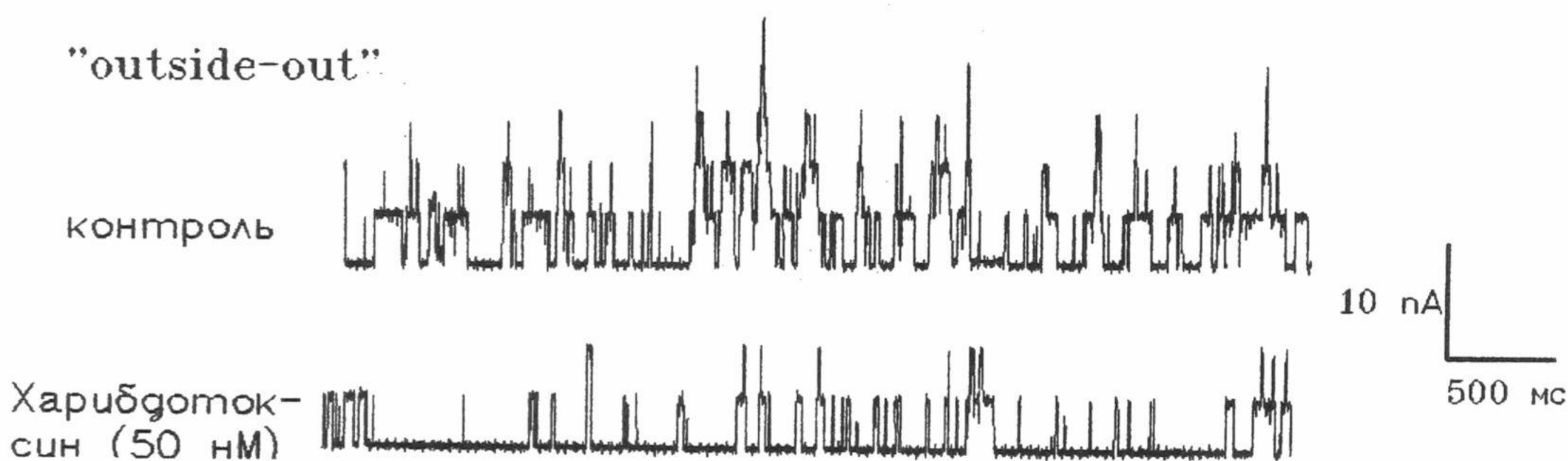


Рис. 2. Действие харибдотоксина (50 нМ) на активность K(Ca) каналов в конфигурации "outside-out" при потенциале фиксации +20 мВ.

стороны за счёт уменьшения амплитуды тока одиночного канала (данные не показаны). Другие блокаторы K^+ каналов - 4-аминопиридин (блокатор K^+ каналов А-типа) и апамин (блокатор K(Ca) каналов малой проводимости), добавленные к наружному раствору в концентрациях 5 мМ и 500 нМ соответственно, не приводили к изменению амплитуды и p_0 K(Ca) каналов большой проводимости.

Для подтверждения того, что регистрируемые каналы являются Ca^{2+} -зависимыми, было произведено исследование влияния растворов с различной концентрацией Ca^{2+} на активность каналов, используя конфигурацию "inside-out". При такой конфигурации имеется доступ к внутренней стороне K(Ca) канала, где находится участок связывания для Ca^{2+} . В этих экспериментах использовали наружный раствор Б и пипеточный раствор А (по отношению к клеточной мембране эти растворы в данных условиях являлись соответственно внутренним и наружным). При таких условиях p_0 K(Ca) канала составляла 0,067, а среднее время открытого состояния канала (τ_0) - 55 мс. Действие наружного раствора с пониженной концентрацией свободного Ca^{2+} (для этой цели концентрация ЭГТА в растворе Б повышалась в 5 раз и достигала 3 мМ) приводило к уменьшению активности канала - p_0 уменьшалась до 0,01, а τ_0 - до 11 мс

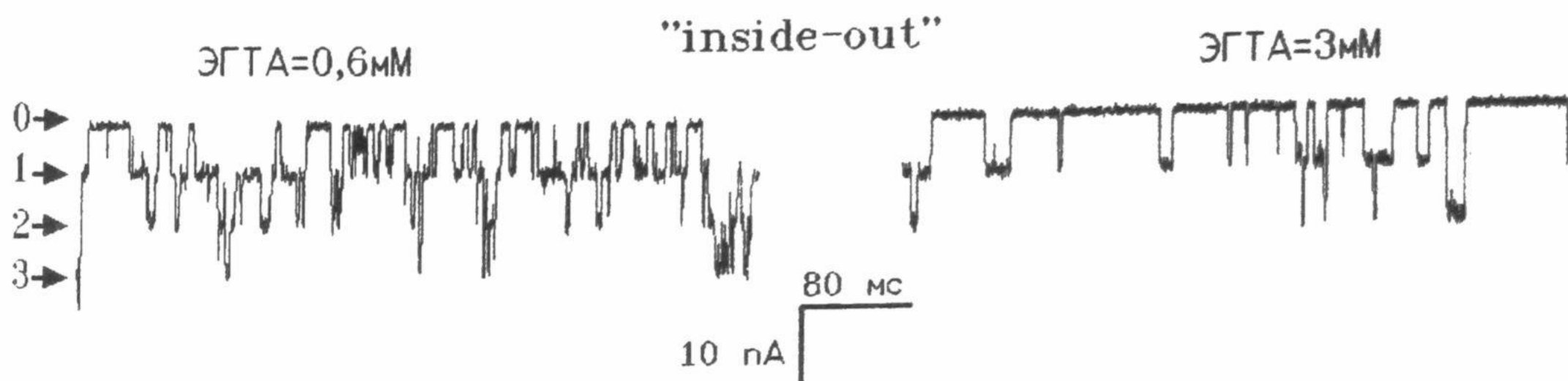


Рис. 3. Зависимость активности K(Ca) каналов от $[Ca^{2+}]_i$ снятая в конфигурации "inside-out" при потенциале фиксации -30 мВ. Приведены регистрации активности каналов в растворах с концентрацией ЭГТА 0,6 мМ ($[Ca^{2+}]_i \approx 100$ нМ) и при повышении концентрации ЭГТА в омывающем растворе до 3 мМ.

(рис. 3). Аналогичный эффект наблюдался и для других исследованных ГМК. Таким образом, уменьшение $[Ca^{2+}]_i$ при постоянном мембранном потенциале приводит к ингибированию активности K(Ca) каналов, за счет уменьшения pR_0 и τ_0 .

В следующей части работы было произведено фармакологическое исследование тока, переносимого K(Ca) каналами в режиме внутриклеточного диализа. Во всех последующих экспериментах поддерживаемый потенциал составлял -60 мВ, наружный раствор готовился на основании раствора А, а в качестве внутрипипеточного раствора использовался раствор В. На рис. 4, А показано блокирующее действие харибдотоксина (100 нМ) на трансмембранный ионный ток и "чистый" K(Ca) ток большой проводимости (трек 3), полученный вычитанием тока в присутствии харибдотоксина (трек 2) из контрольного тока (трек 1). Токи вызывались деполяризующими смещениями мембранного потенциала длительностью 300 мс до +10 мВ (потенциал максимума Ca^{2+} тока для этих клеток [19, 26, 27]). Видно, что в составе K(Ca) тока большой проводимости можно выделить две составляющие: начальную быстроинактивирующуюся и последующую, с медленной инактивацией, которые, по-видимому, отражают вход Ca^{2+} в клетку через Ca^{2+} каналы, открывающиеся при деполяризации мембраны. Как известно, входящий ток в ГМК *taenia coli* морской свинки переносится только через потенциалактивируемые Ca^{2+} каналы L-типа [19, 26, 27]. Кинетика инактивации этого тока, при деполяризации до +10 мВ, хорошо описывается двухэкспоненциальной функцией [28].

Однако, полученный таким образом "чистый" K(Ca) ток большой проводимости трудно сравнивать с входящим Ca^{2+} током данной клетки из-за невозможности его регистрации в данных экспериментальных условиях. Как уже отмечалось выше, на уровне макротоков очень сложно в изолированном виде исследовать K(Ca) ток и сравнивать его с Ca^{2+} током той же клетки. Эту проблему частично можно решить, используя ранее описанный оригинальный прием с использованием апамина, гиперкалиевого и кобальтсодержащего растворов [2, 19, 29]. Результаты одного из таких экспериментов представлены на рис. 4, Б. Видно, что кинетика спада "чистого" K(Ca) тока большой проводимости (трек

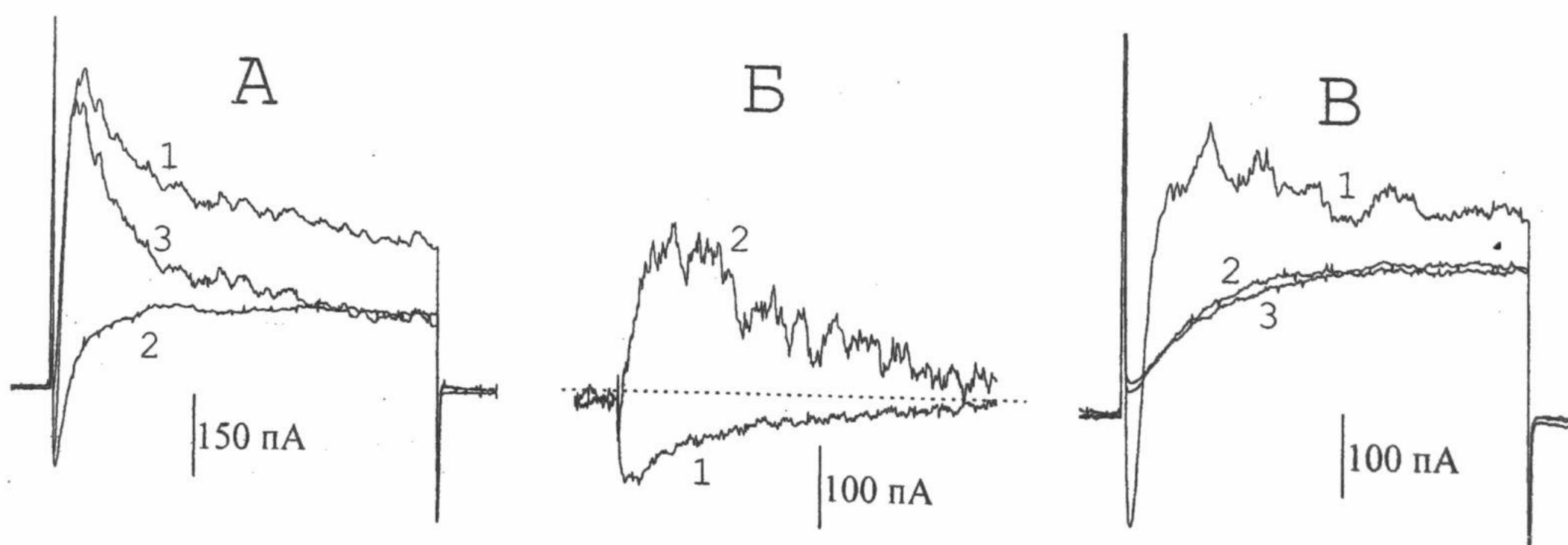


Рис. 4. Фармако-биофизические характеристики тока, переносимого K(Ca) каналами большой проводимости.

А. Действие харибдотоксина (100 нМ) на трансмембранный ионный ток: 1 - контроль; 2 - после добавления токсина; 3 - "чистый" K(Ca) ток. Б. Кинетические характеристики Ca^{2+} (1) и K(Ca) (2) токов; В. Отсутствие действия харибдотоксина при блокировании входящего Ca^{2+} тока ионами Co^{2+} : 1 - контроль; 2 - после эквимоллярной замены Ca^{2+} на Co^{2+} ; 3 - добавление харибдотоксина на фоне кобальтсодержащего раствора. Токи вызывались ступенчатым смещением мембранного потенциала от -60 мВ до +10 мВ (А и В) или до 0 мВ (Б). Длительность деполяризующего импульса во всех случаях составляла 300 мс.

2) практически полностью совпадает с кинетикой инактивации входящего Ca^{2+} тока (трек 1).

Низкие концентрации ТЭА (до 1 мМ) вызывают блокирование тока, переносимого K(Ca) каналами большой проводимости, сравнимое с действием харибдотоксина [20].

Ранее было показано [3, 16, 19], что амплитуда выходящего K^+ тока сильно зависит от количества Ca^{2+} , входящего в клетку через потенциалактивируемые Ca^{2+} каналы во время деполяризующего смещения мембранного потенциала. Блокирование этих каналов приводит к значительному подавлению выходящего тока. На рис. 4, В показано отсутствие блокирующего действия харибдотоксина на фоне кобальтсодержащего раствора, в котором ионы Ca^{2+} эквимоларно были заменены ионами Co^{2+} .

Исходя из полученных результатов можно сделать предположение, что для активирования харибдотоксинчувствительных K(Ca) каналов большой проводимости обязательно необходим вход Ca^{2+} в клетку извне через Ca^{2+} каналы. Однако, было обнаружено, что Ca^{2+} , спонтанно высвобождающийся из СР (Ca^{2+} спарки) [30, 31], также может вызывать активацию этих K(Ca) каналов, но последние в этом случае проявляют свою активность в виде спонтанных выходящих токов (СВТ) [20, 31, 32]. Ca^{2+} спарки приводят к локальному повышению $[\text{Ca}^{2+}]_i$, что в свою очередь приводит к активации небольшого числа (10 - 100 [29, 32]) K(Ca) каналов, которые и активруют генерацию СВТ. Только существенный выброс Ca^{2+} из СР (вызванный, например, кофеином) может привести к активации большого числа K(Ca) каналов большой проводимости и вызвать выходящий макроток [33]. Однако, в реальных условиях, такое массовое истощение Ca^{2+} депо представляется маловероятным.

ВЫВОДЫ

Исходя из представленных выше данных, можно сделать заключение, что в мембране ГМК *taenia coli* морской свинки имеется высокая плотность харибдотоксинчувствительных K(Ca) каналов большой проводимости (125 ± 24 пС при $[\text{K}^+]_i/[\text{K}^+]_o = 23$). В отличие от других потенциалактивируемых каналов, K(Ca) каналы большой проводимости не имеют потенциалзависимой инактивации (не инактивируются с течением времени при постоянном потенциале), а инактивируются только при уменьшении примембранной $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Основным источником Ca^{2+} , необходимым для активации этих каналов является вход Ca^{2+} в клетку через потенциалзависимые Ca^{2+} каналы L-типа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А.В. Жолос, В.А. Бурый, М.Ф. Шуба // Биол. мембраны, 3, № 8: 804-815, (1986).
2. V.A. Buryi, M.F. Shuba, A.V. Zholos // "Receptors and Ion Channels", W. Gruyter et al., Berlin (1987): 179-185
3. Y. Yamamoto, S.L. Hu, C.Y. Kao // Gen. J. Physiol., 93, № 3, 551-564, (1989).
4. H. Kolb // Rev. Physiol. Biochem. and Pharmacol., 115: 52-91, (1990).
5. S.H.P. Alexander, J.A. Peters // "TiPS Receptor & Ion Channel Nomenclature Supplement", (1997): 1-84.
6. T. Tomita // J. Physiol., 225: 693-703, (1972).
7. И.А. Владимирова // Физиол. журнал, 33, № 5: 624-627, (1975).
8. C. Miller, E. Moczydlowski, R. Latorre, M. Phillips // Nature, 313: 316-318, (1985).
9. H. Meves // "Handbook of Experimental Pharmacology", H. Herken and F. Hucho, Berlin, (1992): 739-774.
10. M.L. Garcia, H.-G. Knaus, P. Munujos, et al. // Am. J. Physiol., 269 (Cell Physiol. 38): C1-C10, (1995).
11. M. Hugues, H. Schmid, G. Romey, et al. // EMBO J., 1: 1039-1042, (1982).
12. A.L. Blatz, K.L. Magleby // Nature, 323: 718-720, (1986).
13. T. Capiod, D.C. Ogden // J. Physiol., 409: 285-295, (1989).
14. J.J. Singer, J.V. Walsh // Pflug. Arch., 408: 98-111, (1987).
15. T. Tomita // Jpn. J. Physiol., 38: 1-18, (1988).
16. W.C. Cole, K.M. Sanders // Am. J. Physiol., 26, № 3: C461-C469, (1989).
17. S.L. Hu, Y. Yamamoto, C.Y. Kao // Gen. J. Physiol., 94, № 5: 833-847, (1989).
18. S.L. Hu, Y. Yamamoto, C.Y. Kao // Gen. J. Physiol., 94, № 5: 849-862, (1989).
19. А.В. Повстан, А.В. Зима, В.Л. Резников и др. // Нейрофизиология, 29, № 4/5: 340-350, (1997).
20. А.В. Повстан, А.В. Зима, М.И. Хархун, М.Ф. Шуба // Нейрофизиология, 31, № 6, (1999).
21. O.P. Hamill, A. Marty, E. Neher, et al. // Pflug. Arch., 391, № 1: 85-100, (1981).
22. A. Marty // Nature, 291: 497-500, (1981).
23. А.В. Зима, А.Э. Белевич, Я.Д. Цицора, М.Ф. Шуба // Физика живого, 4, № 1: 67-72, (1996).
24. J.N. Barrett, K.L. Magleby, B.S. Pallotta // J. Physiol., 331: 211-230, (1982).
25. A. Marty, E. Neher // J. Physiol., 367: 117-141, (1985).
26. Y. Yamamoto, S.L. Hu, C.Y. Kao // Gen. J. Physiol., 93, № 3: 521-550, (1989).
27. А.В. Зима, А.Э. Белевич, А.М. Цугорка, М.Ф. Шуба // Нейрофизиология, 26, № 3: 218-222, (1994).
28. В.В. Рекалов, А.М. Цугорка // Биол. мембраны, 6, № 1: 59-66, (1989).
29. В.А. Бурый, Д.В. Гордиенко, М.Ф. Шуба // Биол. мембраны, 9, № 2: 595-601, (1992).
30. M.T. Nelson, H. Cheng, M. Rubart, et al. // Science 270 (5236): 633-637, (1995).
31. D.V. Gordienko, T.B. Bolton, M.B. Cannell // J. Physiol., 507: 707-720, (1998).
32. C.D. Benham, T.B. Bolton // J. Physiol., 381: 385-406, (1986).
33. Д.В. Гордиенко, В.А. Бурый, М.Ф. Шуба // Биол. мембраны, 12 № 2: 129-137, (1995)

УДК 591.15.16.

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

ИЗУЧЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН К ВОДЕ И ЭНЕРГИИ АКТИВАЦИИ ПЕРЕНОСА ВОДЫ ЧЕРЕЗ КЛЕТОЧНУЮ МЕМБРАНУ.

Н.Д.Безуглый, А.Г.Трохименко

Харьковский биотехнологический центр, 312120 Харьков, п/о Кулинич, E-mail cryo@animal.Kharkov.ua

Поступила в редакцию 14 декабря 1999 года.

В статье описан метод количественного определения проницаемости цитоплазматических мембран к воде. Метод волюмометрии позволяет измерять изменения клеточного объема во времени в растворах различного состава и температуры. Использование физико-математической модели мембранного транспорта Кедема-Качальского и аналитической модели осмотической реакции клеток в растворах непроницающих веществ дает возможность определять коэффициенты проницаемости цитоплазматических мембран ооцитов, яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих к воде и энергию активации транспорта воды через клеточную мембрану.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: осмотическая реакция, проницаемость цитоплазматических мембран, клеточный объем, энергия активации.

Перемещение воды через мембрану из одной части системы в другую вызывается двумя основными причинами: повышением гидростатического давления в одной из частей системы и увеличением в другой ее части концентрации растворенного вещества, для которого мембрана менее проницаема, чем для воды. Второй случай известен как осмос. Помещая клетки в растворы различной тоничности или температуры, мы сталкиваемся с осмотическими эффектами, влияние которых необходимо оценить на всех этапах как замораживания, так и оттаивания.

В начале экспозиции клетки будут изменять свой объем в соответствии с законом Вант-Гоффа. Скорость изменения объема клетки при данной температуре зависит от значения коэффициента проницаемости к воде и веществам, проникающим в клетку, и поверхностно-объемного отношения. Скорость транспорта веществ через цитоплазматические мембраны можно изучать с помощью волюмометрии [1, 2].

В основу изучения проницаемости мембран к воде и проникающим веществам положен метод измерения изменений клеточного объема при помещении в растворы различного состава и осмолярности. Количественное описание процесса переноса воды через биологические мембраны дает система уравнений модели Кедема-Качальского [3, 4]. Применив данную систему для обоснования методики волюмометрии и анализа осмотического поведения клетки в растворах криопротекторов, была разработана аналитическая модель осмотической реакции клеток в растворах различного состава и осмолярности [5].

Рассмотрим поведение одиночной, изолированной клетки при помещении ее в раствор непроницающих веществ неизотонической концентрации. Изменение объема клетки будет происходить, в основном, из-за перераспределения воды между клеткой и окружающей клетку средой. При таких условиях коэффициент проницаемости к проникающему веществу равен нулю, а коэффициент отражения - единице, следовательно, поток растворенного вещества отсутствует и КК-уравнения принимают вид:

$$J_v = L_p (\Delta p - RT \Delta C_i) \quad (1),$$

где: J_v - общий объемный поток клетки, L_p - коэффициент проницаемости к воде, R - универсальная газовая постоянная, T - температура, Δp и ΔC_i - разности гидростатического давления и концентрации непроницающего вещества на клеточной мембране, соответственно.

Учитывая, что потоки через цитоплазматическую мембрану прямо пропорциональны изменениям соответствующих объемов в клетке, получаем уравнение изменения объема внутриклеточной воды:

$$\frac{dV_w}{dt} = L_p S \cdot (\Delta p - RT \Delta C_i) \quad (2),$$

где S - площадь поверхности мембраны

Так как упругостью цитоплазматических мембран для клеток животных можно пренебречь, то есть $\Delta p = 0$, выражение (2) запишется следующим образом:

$$\frac{dV_w}{dt} = -L_p S R T \Delta C_i \quad (3).$$

Переходя от абсолютных к относительным значениям объема внутриклеточной воды $\hat{V}_w = \frac{V_w}{V_w^{iso}}$, и безразмерной концентрации $\hat{C}_i^e = \frac{C_i^e}{C_i^{iso}}$, где C_i^{iso} - изотоническая концентрация непроникающих веществ, а V_w^{iso} - изотонический объем внутриклеточной воды, получим

$$\frac{d\hat{V}_w}{dt} = \left[L_p \left(\frac{S}{V_w} \right)_0 RTC_i^0 \right] \left(\frac{1}{\hat{V}_w} - \hat{C}_i^e \right) \quad (4).$$

Выражение, обратное стоящему в квадратных скобках, имеет размерность времени и может быть определено как характерное время осмотической реакции в растворах непроникающих веществ, которое обратно пропорционально коэффициенту проницаемости к воде и поверхностно-объемному отношению:

$$\tau = \frac{1}{L_p RTC_i^0 \left(\frac{S}{V_w} \right)_0} \quad (5)$$

Введя равновесное (конечное) значение относительного объема $\hat{V}_w^{eq}$, определяющееся из условия равновесия при $t \rightarrow \infty$:

$$\hat{V}_w^{eq} = \frac{1}{\hat{C}_i^e},$$

и, интегрируя методом разделения переменных, получим решение уравнения (4) в пределах от $\hat{V}_w^0$ до $\hat{V}_w$, где $\hat{V}_w^0$ - начальное значение относительного объема. Решение будет иметь вид:

$$t_i = \tau \times \left[\hat{V}_w^{eq} (\hat{V}_w^0 - \hat{V}_w) + \hat{V}_w^{eq2} \left(\ln \frac{\hat{V}_w^{eq} - \hat{V}_w^0}{\hat{V}_w^{eq} - \hat{V}_w} \right) \right] \quad (6)$$

Применив метод наименьших квадратов для аппроксимации опытных данных к уравнению (6), получаем:

$$\tau = \frac{\sum_{i=1}^n \left[\hat{V}_w^{eq} (\hat{V}_w^0 - \hat{V}_w) + \hat{V}_w^{eq2} \left(\ln \frac{\hat{V}_w^{eq} - \hat{V}_w^0}{\hat{V}_w^{eq} - \hat{V}_w} \right) \right] \times t_i^{exp}}{\sum_{i=1}^n \left[\hat{V}_w^{eq} (\hat{V}_w^0 - \hat{V}_w) + \hat{V}_w^{eq2} \left(\ln \frac{\hat{V}_w^{eq} - \hat{V}_w^0}{\hat{V}_w^{eq} - \hat{V}_w} \right) \right]^2} \quad (7),$$

где n - количество экспериментальных значений, t_i^{exp} - значение времени, при котором фиксировалось изменение клеточного объема.

Проницаемость к воде изучали в гипертонических растворах NaCl. Так как NaCl в норме является непроникающим через цитоплазматические мембраны веществом при переносе клетки в его гипертонический раствор осмотическое равновесие достигается путем обезвоживания цитоплазмы. Массив экспериментальных данных, характеризующий кинетику выхода воды из клетки, является базовым для определения удельной проницаемости. Через массив экспериментальных точек проводилась расчетная кривая, которая наименьшим образом отклоняется от экспериментальных данных (рис.1). Определялись время осмотической реакции клеток в растворах непроникающих веществ и искомый коэффициент проницаемости к воде, характеризующие данную кривую.

Температурная зависимость коэффициента проницаемости изучалась в диапазоне положительных температур в предположении, что она подчиняется закону Аррениуса:

$$L_p = L_p(T_o) \exp \frac{\Delta E_{act}}{R} \left(\frac{1}{T_o} - \frac{1}{T} \right) \quad (8),$$

где: $L_p(T_0)$ - коэффициент проницаемости при температуре T_0 , ΔE_{act} - энергия активации переноса воды через клеточную мембрану.

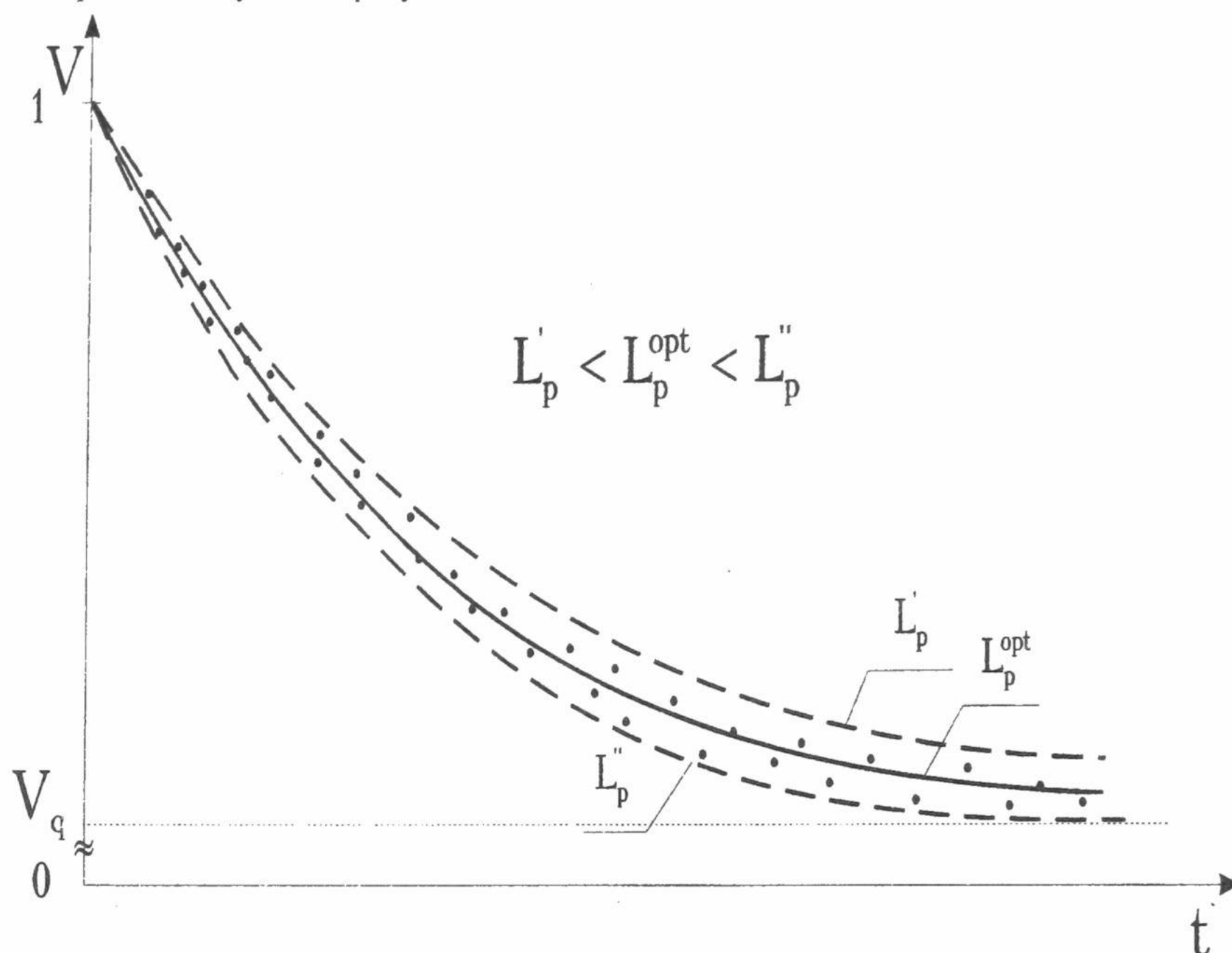


Рис.1. Изменение относительного объема клетки во времени и аппроксимация экспериментальных данных методом вариационного анализа. Точки - экспериментальные данные, линии - расчетные данные. Пунктиром показаны поисковые значения L_p , сплошной линией - оптимальное значение L_p . V_q - равновесное значение клеточного объема.

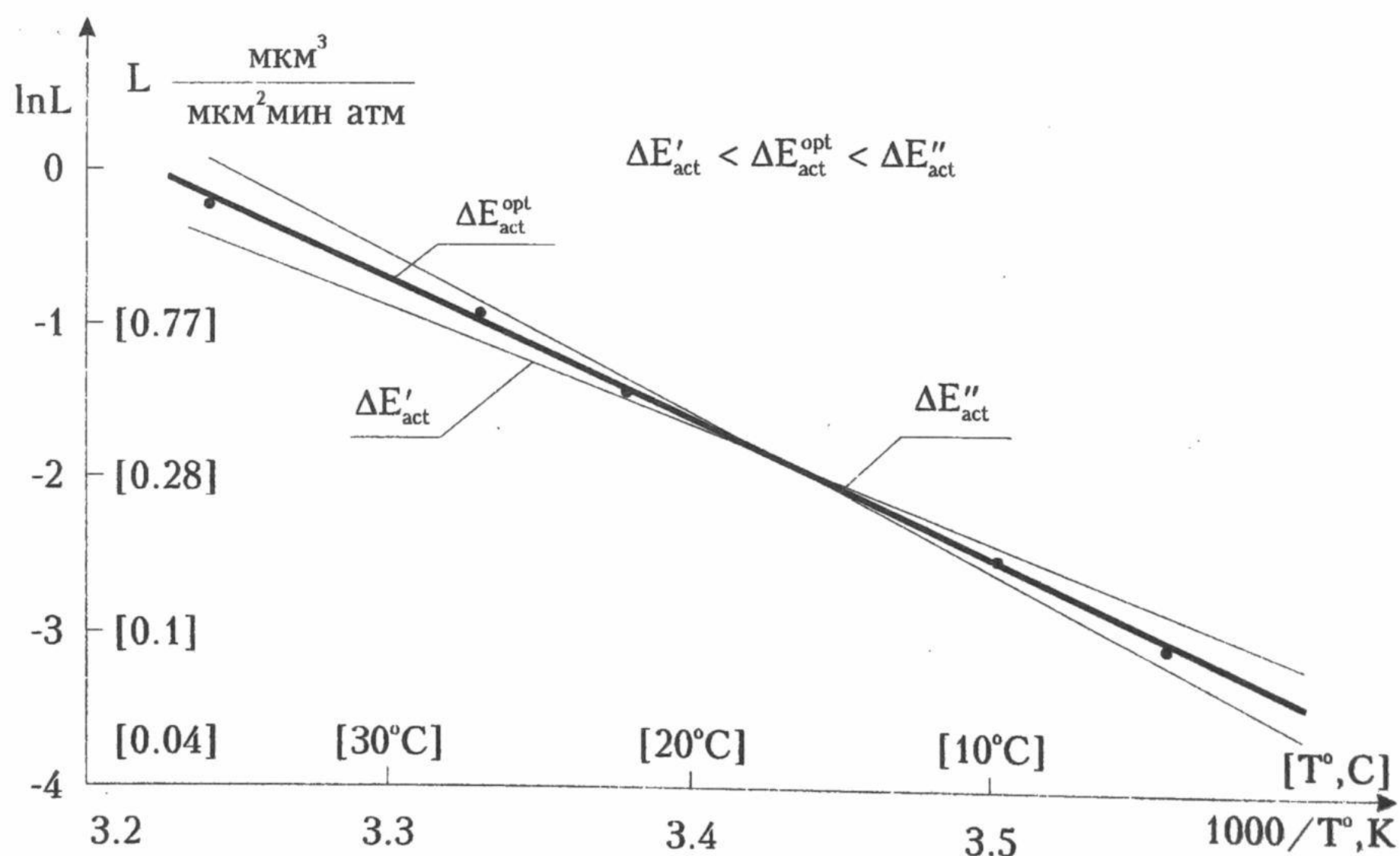


Рис.2. График Аррениуса коэффициента проницаемости к воде, по оси ординат в квадратных скобках указаны значения коэффициента проницаемости.

Искомая энергия активации определялась как коэффициент, характеризующий температурную зависимость в координатах Аррениуса (рис. 2), применяя метод наименьших квадратов к уравнению (8):

$$\Delta E_{act} = R \frac{\sum_{j=1}^k \left(\ln L_{P_j}^{exp} - \ln L_P(T_0) \right) \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T_j} \right)}{\sum_{j=1}^k \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T_j} \right)^2} \quad (9),$$

где k - количество экспериментальных точек, T_0 и T_j - начальное и текущее значения температуры, соответственно.

Таким образом, вышеописанные методы позволяют рассчитать коэффициенты проницаемости цитоплазматических мембран половых клеток млекопитающих, определить характерные времена осмотической реакции и энергию активации транспорта воды через клеточную мембрану, что дает возможность оценить дегидратацию клеток при снижении температуры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безуглий М.Д., Медведовський О.В. Напівавтоматичний метод вивчення осмотичної реакції зародків та яйцеклітин ссавців //Тези доповіді І Республ. конференції "Біотехнологічні дослідження і перспективи їх розвитку". - Львів. - 1990 - с.6.
2. Безуглый Н.Д., Гордиенко Н.А., Медведовский А.В. Волюмометрия яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих. I. Физико-математические основы и технические подходы к измерению изменений клеточного объема. - Биофизический вестник. - Выпуск 4 (2), 1999. - с. 72 - 79.
3. Kedem O., Katchalsky A. A thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. //Biochem. et biophys. acta. - 1958. - V. 27. - № 2. - p. 229-246.
4. Kedem O., Katchalsky A. A physical interpretation of the phenomenological coefficient of membrane permeability. //J. Gen. Physiol. - 1961. - V. 45. - N 1. - p. 143-179.
5. Безуглый Н.Д. Осмотическая реакция яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих при криоконсервации. //Автореф. диссертации канд. биол. наук. - Харьков. - 1984.

УДК 577.352.4:611.018.51

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

ЧИСЛЕННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА УДАЛЕНИЯ КРИОПРОТЕКТОРА ИЗ КЛЕТОЧНОЙ СУСПЕНЗИИ

М.В. Останков*, А.А. Костяев**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г.Харьков**
*Кировский НИИ гематологии и переливания крови РАН, г.Вятка***

Поступила в редакцию 3 декабря 1999г.

Методом численного моделирования с использованием уравнений трансмембранного массопереноса исследована устойчивость деконсервированных клеток к постгипертоническому лизису в процессе их однократной отмывки от криопротектора. Показано, что наиболее сильное влияние на результат этой процедуры оказывают величины разведения оттаянной клеточной суспензии отмывающим раствором и концентрация не проникающего в клетки вещества в нем.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: численное моделирование, криопротектор, постгипертонический криогемолиз

После оттаивания замороженной клеточной суспензии из нее, как правило, должен быть удален проникающий в клетки криопротектор. Необходимость этой процедуры обусловлена, в частности, возможным токсическим действием больших концентраций криопротектора на организм реципиента. Однако, кроме того, даже в том случае, когда количество криопротектора в оттаянной клеточной суспензии недостаточно для непосредственного токсического действия на организменном уровне, трансфузия деконсервированного биологического материала в организм реципиента может привести к повреждению клеток, попадающих в изотоническую среду, за счет постгипертонического лизиса. Последний возникает из-за того, что в процессе удаления криопротектора из деконсервированной клеточной суспензии объем клеток может увеличиваться и, если это увеличение объема достаточно велико (для эритроцита человека - примерно в 1,8 раз по сравнению с нормальным объемом), то клеточная мембрана принимает форму сферы и подвергается изотропному натяжению. Большое изотропное натяжение мембраны, в свою очередь, приводит к ее разрыву, вследствие чего клетка погибает. Обычно предполагается [1], что существует определенное критическое натяжение мембраны, при котором она разрушается, что и является причиной постгипертонического лизиса клеток. Именно по этой причине перемещение деконсервированных клеток в изотонический раствор является опасным для них.

Цель этой статьи состоит в теоретическом обосновании оптимизации процедуры однократного удаления криопротектора из деконсервированной клеточной суспензии путем перемещения оттаянных клеток в отмывающий раствор не проникающего в клетки вещества, последующего центрифугирования и удаления надосадочной жидкости.

Пусть до начала криоконсервирования клеточная суспензия имела объем $V_c(0)$, суммарный объем клеток в ней был $V_c^{in}(0)$, объем внеклеточного раствора $V_c^{out}(0) = V_c(0) - V_c^{in}(0)$ и объемная доля клеток в ней составляла H_0 , разведение клеточной суспензии криоконсервирующим раствором с концентрацией проникающего в клетки криопротектора $n_k(0)$ и не проникающего в клетки вещества $n_b(0)$ осуществлялось в Q раз. Пусть далее после замораживания-оттаивания клеточная суспензия разводилась отмывающим раствором с концентрацией не проникающего в клетки вещества $n_d(0)$ в R раз и доля неразрушившихся после замораживания - оттаивания клеток (до отмывания) составляет 100% (то есть режим замораживания - оттаивания является оптимальным). Если обозначить через $V_a(0)$ и $V_b(0)$ объемы указанных выше криоконсервирующего и отмывающего растворов соответственно, то по определению имеем:

$$\begin{aligned} V_c^{in}(0) / [V_c^{in}(0) + V_c^{out}(0)] &= H_0 \\ V_c(0) + V_a(0) &= QV_c(0) \\ V_c(0) + V_a(0) + V_b(0) &= R[V_c(0) + V_a(0)] \end{aligned} \quad (1)$$

Из закона сохранения масс растворенных в системе компонентов после разведения оттаянной клеточной суспензии отмывающим раствором получаем:

$$\begin{aligned} N_c^{in} &= N_c^{in}(0), N_c^{out} = N_c^{out}(0), N_b = N_b(0) \\ N_d &= N_d(0), N_k^{in} + N_k^{out} = N_k(0) \end{aligned} \quad (2)$$

где $N_c^{in}(0)$ и $N_c^{out}(0)$ - число молей не проникающего через клеточную мембрану вещества во внутри- и внеклеточном растворах в клеточной суспензии до ее смешения с криозащитным раствором, N_c^{in} и N_c^{out} - число молей не проникающего через клеточную мембрану вещества во внутри- и внеклеточном растворах после смешения оттаянной клеточной суспензии с отмывающим раствором, $N_b(0)$ и $N_d(0)$ - число молей не проникающего в клетки вещества в криозащитном и отмывающем растворах соответственно, N_b и N_d - число молей b-го и d-го не проникающих в клетки веществ в разведенной отмывающим раствором оттаянной клеточной суспензии, N_k^{in} и N_k^{out} - число молей проникающего через клеточную мембрану криопротектора внутри и вне клеток соответственно в разведенной отмывающим раствором оттаянной клеточной суспензии, $N_k(0)$ - число молей криопротектора в криозащитном растворе.

По определению:

$$\begin{aligned} n_c^{in} &= N_c^{in} / (V^{in} - V_n) \\ n_c^{out} &= N_c^{out} / [V_c(0) + V_a(0) + V_b(0) - V^{in}] \\ n_b &= N_b / [V_c(0) + V_a(0) + V_b(0) - V^{in}] \\ n_d &= N_d / [V_c(0) + V_a(0) + V_b(0) - V^{in}] \\ n_k^{in} &= N_k^{in} / (V^{in} - V_n) \\ n_k^{out} &= N_k^{out} / [V_c(0) + V_a(0) + V_b(0) - V^{in}] \end{aligned} \quad (3)$$

где V^{in} - суммарный объем клеток на стадии отмывания, V_n - суммарный объем осмотически неактивных внутриклеточных веществ в исходной клеточной суспензии, n_c^{in} и n_k^{in} - концентрации с-го вещества и криопротектора во внутриклеточном растворе на стадии отмывания оттаянной клеточной суспензии от криопротектора, n_c^{out} , n_b , n_d и n_k^{out} - концентрации с-го, b-го, d-го вещества и криопротектора во внеклеточной среде на стадии отмывания оттаянной клеточной суспензии от криопротектора.

Комбинируя (1) - (3), находим:

1) для внутриклеточной концентрации не проникающего через клеточную мембрану вещества

$$n_c^{in} = n_c^{in}(0) (1 - \alpha) / (y - \alpha) \quad (4)$$

2) для внеклеточной концентрации не проникающего через клеточную мембрану вещества, растворенного в подлежащей криоконсервированию клеточной суспензии до ее разведения криоконсервирующим раствором

$$n_c^{out} = n_c^{in}(0) (1 - H_0) / [QR - H_0 y] \quad (5)$$

(здесь принято во внимание, что $n_c^{in}(0) = n_c^{out}(0)$);

3) для внеклеточной концентрации b-го не проникающего через клеточную мембрану вещества

$$n_b^{out} = n_b(0) (Q - 1) / [QR - H_0 y] \quad (6)$$

4) для внеклеточной концентрации d-го не проникающего через клеточную мембрану вещества

$$n_d^{out} = n_d^{out}(0) Q (R - 1) / [QR - H_0 y] \quad (7)$$

5) для внеклеточной концентрации проникающего через клеточную мембрану криопротектора

$$n_k^{out} = [n_k(0) (Q - 1) - H_0 n_k^{in} (y - \alpha)] / [QR - H_0 y] \quad (8)$$

где α - объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ, $y = V^{in} / V^{in}(0)$ - относительный объем клеток.

Трансмембранный перенос воды и криопротектора описывается системой обыкновенных дифференциальных уравнений Кедем-Качальского в модификации [2]:

$$\left\{ \begin{aligned} & \frac{d}{dt} \frac{V_c^{in}}{V_c^{in}(0)} = SL_p rT [\sigma_k (n_k^{in} - n_k^{out}) + \\ & + n_c^{in}(0) \frac{1-\alpha}{V_c^{in}/V_c^{in}(0) - \alpha} - n_c^{in}(0) \frac{1-H_0}{QR-H_0y} - \\ & - n_b(0) \frac{Q-1}{QR-H_0y} - n_d(0) \frac{Q(R-1)}{QR-H_0y}] \\ & \frac{dn_k^{in}}{dt} = - \frac{SP/V_0}{V_c^{in}/V_c^{in}(0) - \alpha} \{ [n_k^{in} - n_k^{out}] + \sigma_k n_k^{in} \frac{dV_c^{in}}{dt V_c^{in}(0)} \} \end{aligned} \right. \quad (9)$$

где t - время, S и L_p - площадь поверхности и коэффициент фильтрации клеточной мембраны, σ_k - коэффициент отражения клеточной мембраны для молекул криопротектора, P - коэффициент проницаемости клеточной мембраны для криопротектора, r - универсальная газовая постоянная, T - абсолютная температура, V_0 - объем консервируемой клетки в физиологической среде.

Поскольку характерное время проникновения молекул воды через мембраны эритроцитов $\tau_0 = V_0 / SL_p rT$ составляет только 10 миллисекунд, а характерное время проникновения молекул криопротектора через клеточную мембрану $\tau_1 = V_0 / SP$ во всяком случае превышает десятки секунд, то трансмембранный перенос веществ с очень большой точностью можно описывать следующей системой уравнений, которая вытекает из (9) с учетом (4) - (8) при $\tau_0 \rightarrow 0$:

$$\left\{ \begin{aligned} & y - \alpha = \frac{(1 - \alpha) (QR - H_0 \alpha)}{n_k(0) (Q-1) + 1 - \alpha H_0 + n_b(0) (Q-1) + n_d(0) Q(R-1) - (QR - H_0 \alpha) n_k^{in}} \\ & \frac{d}{dt} n_k^{in} = - \frac{1}{y - \alpha} \left[n_k^{in} - \frac{n_k(0) (Q-1) - H_0 n_k^{in} (y - \alpha)}{QR - H_0 \alpha - H_0 (y - \alpha)} \right] \end{aligned} \right. \quad (10)$$

Исходя из (10), можно получить временные зависимости относительного объема клеток и внутриклеточной концентрации криопротектора на стадии отмывания оттаянной клеточной суспензии от криопротектора в зависимости от параметров $n_d(0)$, n_k^{in} , Q , R , $n_b(0)$, H_0 , $n_k(0)$. Эти расчетные зависимости представлены на рис. 1-4. Анализ представленных на них результатов численного моделирования однократной отмывки оттаянной клеточной суспензии от криопротектора показывает, что этот процесс протекает более оптимально (то есть быстрее и без нарушения целостности мембран за счет их изотропного натяжения), когда разность между концентрацией криопротектора в криозащитной среде и концентрацией криопротектора внутри размороженных клеток имеет меньшее значение, то есть после более быстрых режимов охлаждения-отогрева. Результат отмывания клеточной суспензии от криопротектора улучшается и с увеличением количества отмывающего раствора, то есть R , при фиксированных значениях прочих параметров. Улучшение режима отмывки, хотя и незначительное, имеет место при увеличении концентрации клеток в консервируемой клеточной суспензии H_0 и концентрации не проникающего в клетки вещества в криозащитной среде $n_b(0)$. Наиболее сильное влияние на эффективность процесса отмывки наряду с параметром R оказывает концентрация не проникающего в клетки компонента отмывающего раствора $n_d(0)$. С увеличением этого параметра процесс удаления криопротектора из размороженных клеток протекает более оптимально, чем при более низких значениях этого параметра. Учитывая то обстоятельство, что значения большинства фигурирующих в построенной модели параметров при изменении их в разумных пределах слабо влияют на процесс отмывки, либо не могут задаваться произвольно, так как только их определенные значения обеспечивают необходимую эффективность при замораживании - оттаивании, можно утверждать, что

оптимизация процесса однократной отмывки клеток от криопротектора состоит в подборе оптимальных значений только двух параметров отмывающего раствора R и $n_d(0)$, то есть количества отмывающего раствора и концентрации в нем не проникающего в клетки вещества. Последнее, очевидно, должно иметь высокую осмотическую активность, то есть иметь как можно более низкую молекулярную массу при сохранении непроницаемости через мембраны консервируемых клеток и быть нетоксичным на клеточном уровне при как можно более высоких концентрациях. Возможная токсичность не проникающего через клеточные мембраны компонента отмывающей среды, по существу, является единственным серьезным ограничением для эффективного применения однократной отмывки размороженных клеток.

Как видно из представленных результатов, процесс однократной отмывки практически полностью завершается за время порядка $0,5 (SP / V_o)^{-1}$. По истечении указанного промежутка времени избыток отмывающей среды должен быть удален путем осаждения клеток осторожным центрифугированием и удаления надосадочной жидкости. Очевидно, последующее перемещение отмываемых таким образом клеток в изотоническую среду не повлечет за собой их повреждения путем постгипертонического лизиса.

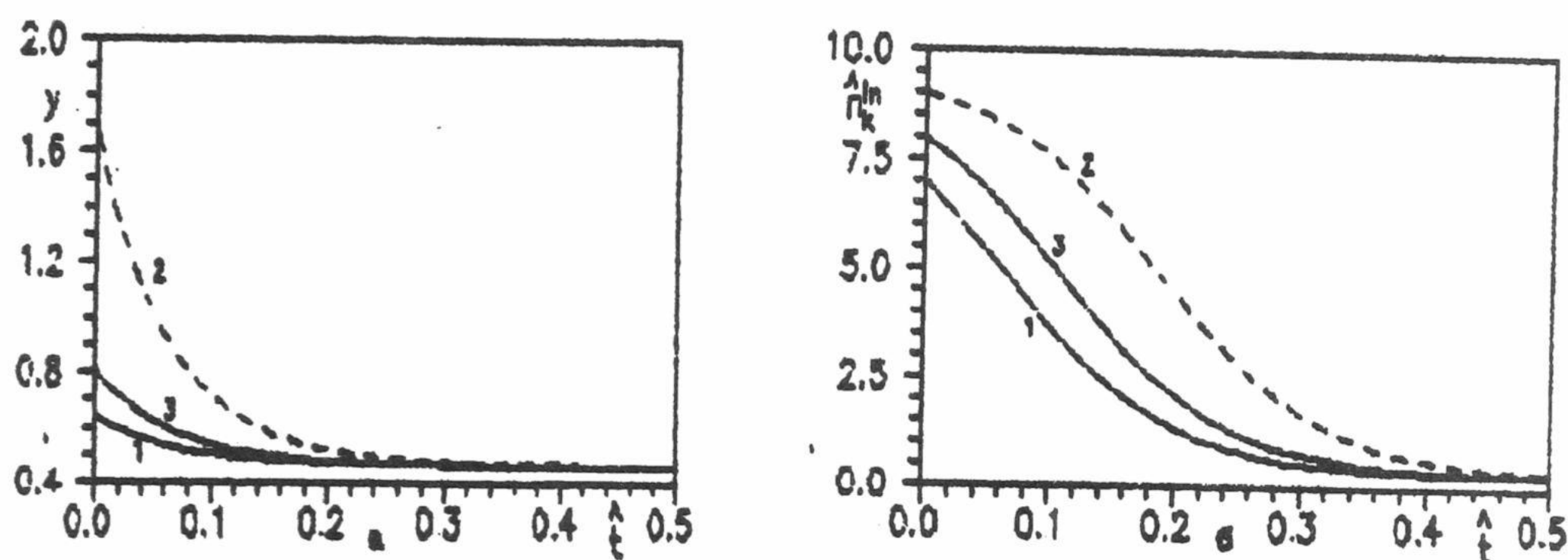


Рис. 1 Зависимость относительного объема (а) отмываемых клеток и приведенной внутриклеточной концентрации криопротектора (б) от безразмерного времени при различных значениях параметра

$$\hat{n}_k^m:$$

1 - 7; 2 - 9; 3 - 8.

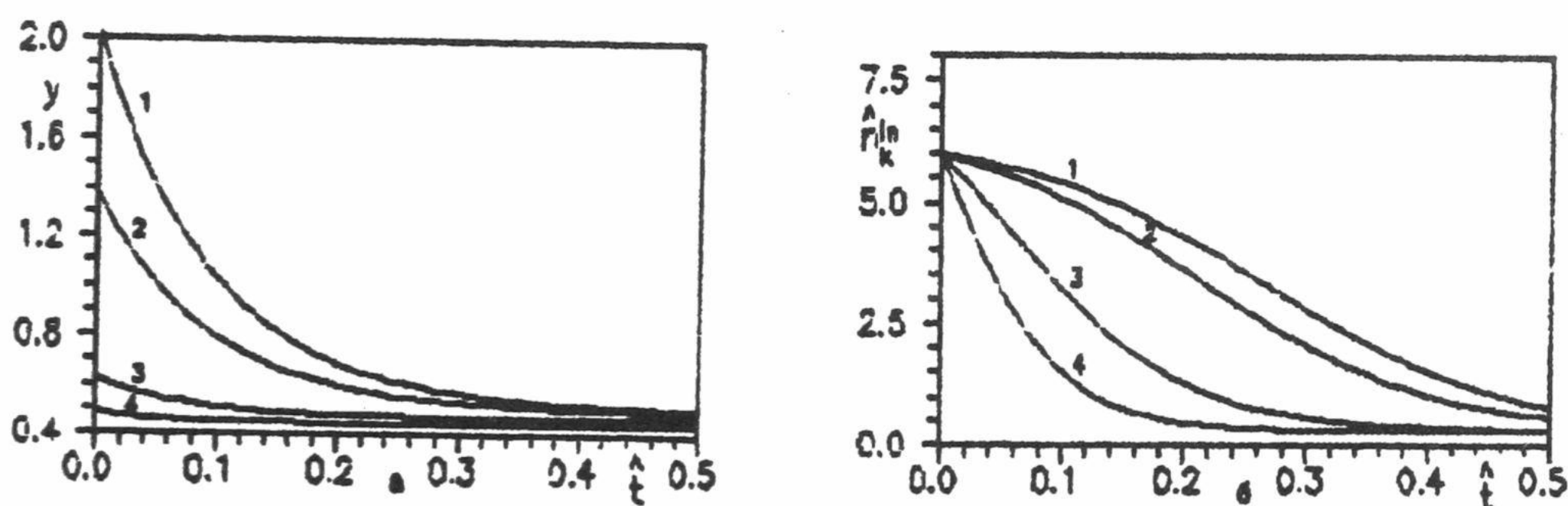


Рис. 2 Зависимость относительного объема (а) отмываемых клеток и приведенной внутриклеточной концентрации криопротектора (б) от безразмерного времени при различных значениях параметра $n_d(0)$:

$$\hat{n}_k^m = 6; \quad 1 - 7,2; 2 - 7,5; 3 - 10; 4 - 15.$$

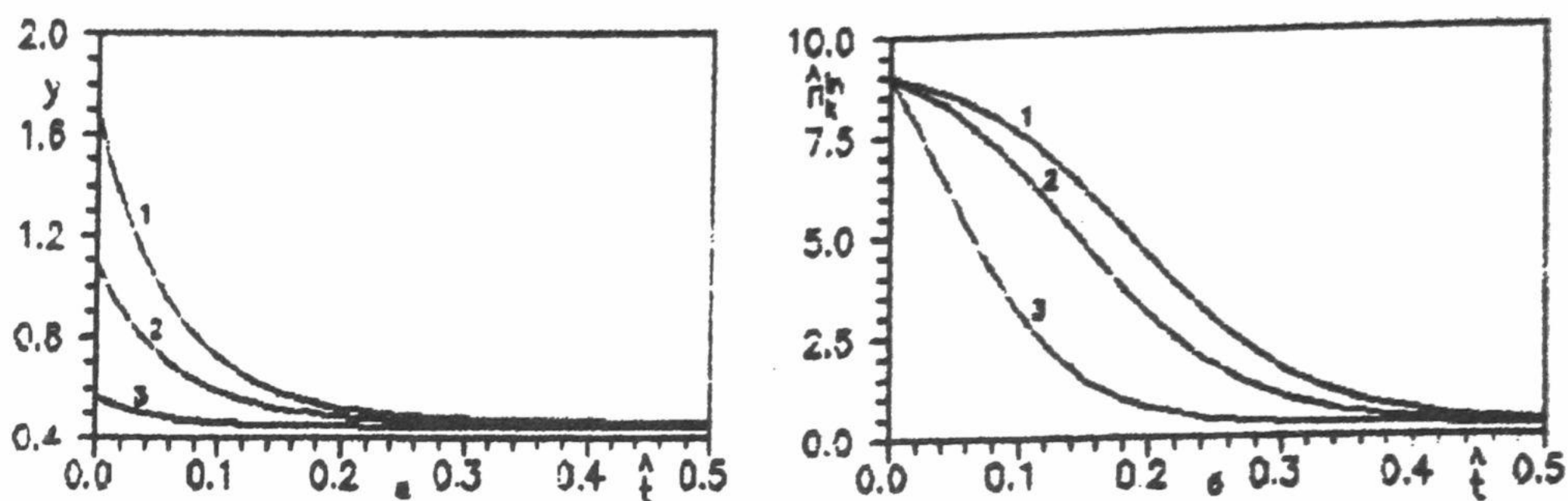


Рис. 3 Зависимость относительного объема (а) отмываемых клеток и приведенной внутриклеточной концентрации криопротектора (б) от безразмерного времени при различных значениях параметра $p_d(0)$:

$\hat{p}_k^{in} = 9$; 1 - 11; 2 - 12; 3 - 15.

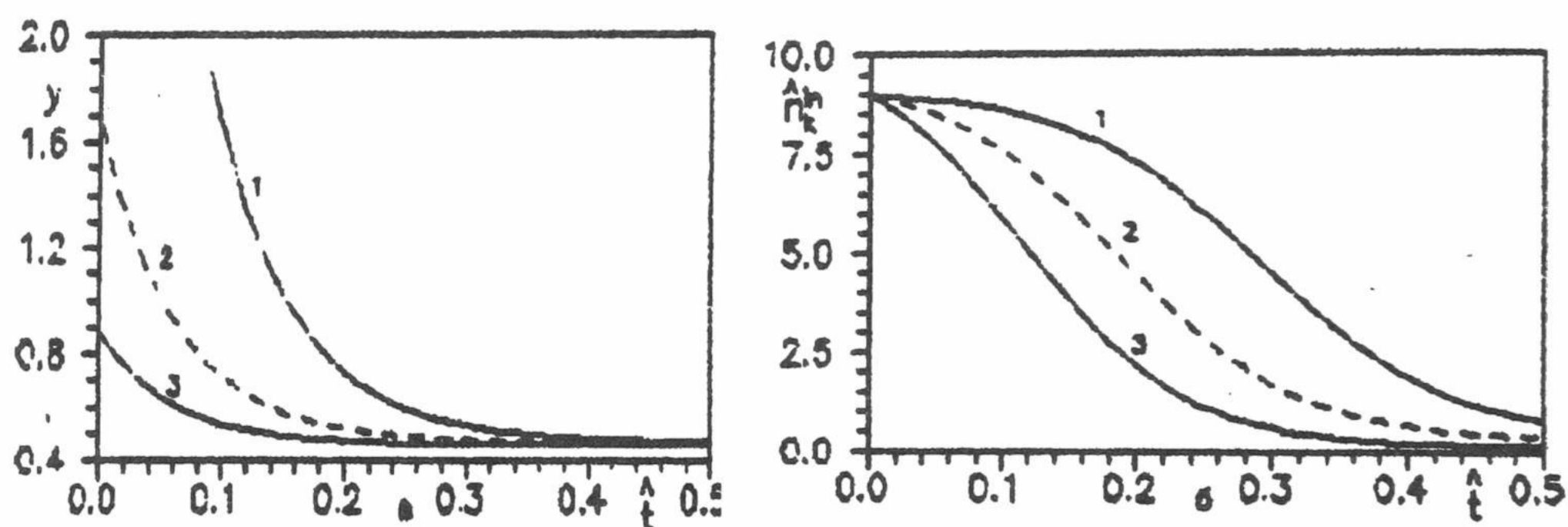


Рис. 4 Зависимость относительного объема (а) отмываемых клеток и приведенной внутриклеточной концентрации криопротектора (б) от безразмерного времени при различных значениях параметра R :

1 - 4; 2 - 5; 3 - 10.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Evans E.A., Leblond P.F. Geometric properties of individual red blood cell discocyte-spherocyte transformations// Biorheology. -1973.-V.10.-P.393-404.
2. Гордиенко Е.А., Пупкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий/К.:Наук.думка, 1994.-143с.