

Влияние ионов Ni^{2+} на конформационное равновесие полинуклеотидов полиА полиУ, полиА и полиУ в условиях, близких к физиологическим

В. А. Сорокин, В. А. Валеев, Е. Л. Усенко

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

sorokin@ilt.kharkov.ua

Методами дифференциальной УФ спектроскопии и термической денатурации в водных растворах, содержащих $0,1 M Na^+$, изучено взаимодействие ионов Ni^{2+} с однонитчатыми полиА и полиУ, а также с двухнитчатым полинуклеотидом полиА полиУ (AU). В области больших концентраций никеля обнаружено образование внутрисферных координационных связей его ионов с атомами N7 и N1 аденина полиА. На фазовой диаграмме комплекса $AU + Ni^{2+}$ наблюдаются участки, соответствующие переходам $2 \rightarrow 1$, $2 \rightarrow 3$ и $3 \rightarrow 1$. В отличие от ионов Mg^{2+} , понижающих температуру перехода $(T_m)_{2 \rightarrow 3}$, ионы Ni^{2+} ее повышают. Предполагается, что доминирующим вкладом в повышение $(T_m)_{2 \rightarrow 3}$ в этих условиях является различие между константами связывания ионов Ni^{2+} с AU и полиА и/или уменьшение числа связывающих ионы центров на A2U.

Ключевые слова: металлокомплексы нуклеиновых кислот, полинуклеотиды, конформационные переходы.

Введение. Загрязнение окружающей среды солями металлов составляет в настоящее время одну из самых серьезных экологических проблем [1]. Негативное влияние ионов переходных металлов (ПМ) может проявляться на различных этапах жизнедеятельности организмов, включая функционирование их генетического аппарата, что может быть, в частности, источником канцерогенеза. Действительно, канцерогенная активность обнаружена у многих ионов переходных металлов, включая и ионы Ni^{2+} [2–5].

Молекулярные механизмы биологического действия ионов металлов не могут быть выяснены без установления координирующих их атомов полимеров, структуры образующихся макромолеку-

лярных комплексов, природы межмолекулярных взаимодействий и их влияния на конформационное состояние полинуклеотидов в зависимости от концентрации одно- и двухвалентных ионов металлов, а также температуры. Подобные исследования представляют также фундаментальный интерес и для физики фазовых и конформационных переходов в наноразмерных системах, к которым можно отнести и молекулы полинуклеотидов, представляющие собой модели квазиодномерных кристаллов. К ним, в частности, относятся и двухнитчатые полинуклеотиды, образованные полирибоадениловой и полирибоуридиловой нитями (AU), имеющие каноническую вторичную структуру AU-богатых участков РНК некоторых вирусов и способные в определенных условиях переходить в трехнитчатую конформацию полиУполиАполиУ (A2U) [6]. Можно отметить также, что исследование металло-

комплексов трехнитчатых олиго- и полинуклеотидов представляет интерес, связанный с возможностью использования последних при лечении вирусных (включая СПИД [7]) и онкологических [7, 8] заболеваний (так называемые антигенная и антимысловая терапии [9]).

Цель настоящей работы состоит в изучении влияния концентрации ионов Ni^{2+} и температуры на конформационное равновесие AU и составляющих ее гомополинуклеотидов при высокой ионной силе раствора (0,1 М Na^+). Такая концентрация ионов Na^+ близка к суммарной концентрации одновалентных ионов во внутриклеточной жидкости [10], в связи с чем исследование металлокомплексов полинуклеотидов в подобных ионных условиях представляет наибольший интерес.

Материалы и методы. В работе использованы калиевые соли полирибоадениловой (полиА) и полирибоуридиловой (полиU) кислот («Serva», ФРГ), натриевая соль AU («Sigma Chemical Company», США). Соль $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ («Реахим», РФ) подвергали двойной перекристаллизации.

Концентрацию фосфора полинуклеотидов (Р) находили по значениям их молярных коэффициентов экстинкции в максимумах УФ поглощения ($\epsilon = \epsilon_m = 38500 \text{ см}^{-1}$) [6]. Чтобы уменьшить вероятность межмолекулярных взаимодействий, во всех измерениях величина Р составляла всего $(1-2) \cdot 10^{-5}$ М. Концентрацию ионов Ni^{2+} ($[Ni^{2+}]$), вводимых в раствор непосредственно перед измерениями, определяли по массе и дополнительно контролировали комплексонометрическим методом. Ошибка определения Р и $[Ni^{2+}]$ не превышала 0,5 %. Все препараты растворяли в тридистилляте, содержащем 0,001 М натрий-какодилатный буфер, рН 7, и 0,099 М NaCl. Несмотря на довольно большое значение рН, в изученном диапазоне концентраций ионов Ni^{2+} образованием их гидроксидов можно пренебречь [11], равно как и комплексов ионов Ni^{2+} с анионами какодилата из-за очень малой его концентрации [12], обеспечивавшей, тем не менее, стабильное значение рН в изученном диапазоне концентраций никеля.

Дифференциальная УФ спектроскопия (ДУФС). На спектрофотометре М40 («Carl Zeiss, Jena», ФРГ) при комнатной температуре ($T = T_0 =$

$= 22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) измеряли изменение спектров поглощения полинуклеотидов ($A(\lambda)$; λ – волновое число), индуцированное ионами Ni^{2+} . Сравнение их формы с формой ДУФС металлокомплексов отдельных нуклеотидов (NMP) или их протонированных форм позволяет, в принципе, определять гетероатомы азотистых оснований, координирующие ионы переходных металлов и в случае металлокомплексов полинуклеотидов [12], поскольку для NMP эти атомы в настоящее время установлены достаточно однозначно различными экспериментальными методами [13].

При измерениях $A(\lambda)$ применяли четырехкюветную схему, компенсирующую собственное поглощение полинуклеотидов и ионов в обоих каналах спектрофотометра. Полученные спектры $A(\lambda) = A(\lambda)/P$ являются равновесными. Критерием равновесности считали отсутствие изменения их формы и интенсивности в течение 20–40 мин.

Термическая денатурация. На спектрофотометре Specord UV VIS («Carl Zeiss, Jena») измерены кривые плавления полиА и AU, то есть изменения оптической плотности растворов от температуры ($A(T)$) при фиксированных концентрациях ионов Ni^{2+} и волновых числах, также используя дифференциальную схему: две кюветы, расположенные в рабочем и эталонном каналах спектрофотометра, содержали идентичные растворы, имеющие одинаковые концентрации полинуклеотида и ионов металлов. Эталонную кювету термостатировали при $T = T_0$ в пределах $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, а рабочую – медленно нагревали со скоростью 0,25 град/мин для обеспечения равновесности конформационных переходов, индуцируемых нагреванием. Кривые плавления AU регистрировали как при $\lambda = \lambda_m$, так и при $\lambda = \lambda_i$, где λ_i – волновое число, соответствующее изобестической точке на спектрах $A_h(\lambda) = A_h(\lambda)/P$, индуцированных изменением поглощения AU ($A_h(\lambda)$) при нагревании от $T = T_0$ до $T = 92 \text{ }^\circ\text{C}$, то есть обусловленным переходом полинуклеотида из упорядоченного спирального состояния в состояние полностью разупорядоченных одонитчатых полиА и полиU (переход 2 → 1). При $\lambda = \lambda_i$ и $T = 92 \text{ }^\circ\text{C}$ поглощение AU и одонитчатых полинуклеотидов совпадает (рис. 1), что позволяет по зависимости $A(T)$, измеряемой при таком волновом числе, за-

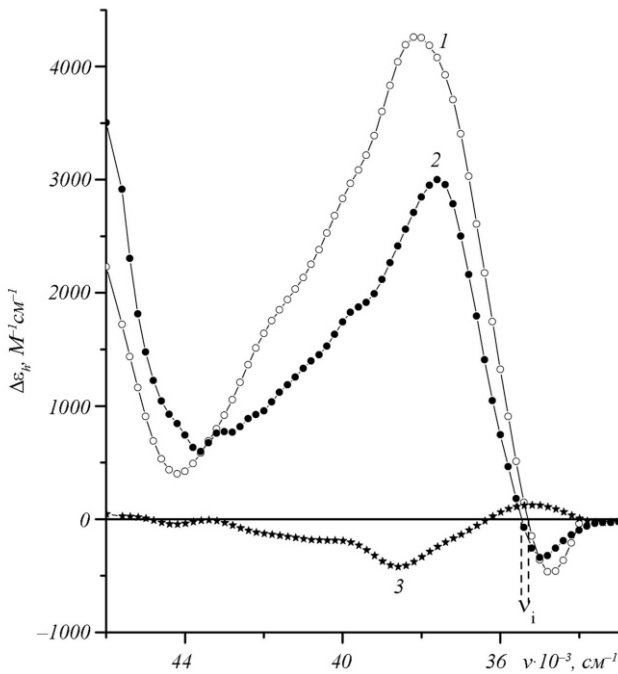


Рис. 1. Изменение спектров поглощения полиАполиU (1) и полиА (2) при нагревании от 20 до 92 °С, а также спектра поглощения полиА в присутствии $2 \cdot 10^{-4}$ М Ni^{2+} при комнатной температуре (3)

регистрировать возможный переход 2 → 3 [6], то есть переход AU в трехнитчатую форму A2U. Поскольку поглощение A2U при $\nu = \nu_i$ меньше такового AU, то этот переход должен сопровождаться гипохромизмом поглощения двойной спирали. Измерения показали, что вплоть до $[Ni^{2+}] = 0,001$ М положение изобестической точки оставалось постоянным в пределах ± 50 cm^{-1} и равным 35300 cm^{-1} .

С помощью персонального компьютера, соединенного со спектрофотометром, произведен пересчет зависимостей $A(T)$ в зависимости $h(T) = A(T)/A_{T_0}$ (A_{T_0} – поглощение полинуклеотида при $T = T_0$ и $\nu = \nu_m$ или ν_i), а также последние дифференцированы по температуре.

ПолиАполиU. Типичные кривые плавления AU, полученные при $\nu = \nu_m$, представлены на рис. 2, А. Они распадаются на три участка. Некооперативные участки *a–b* с производной $dh_1/dT \sim (4 \pm 1) \cdot 10^{-3}$ град⁻¹, характерной для плавления одноцепочечных спиралей [14]. Их появление может быть связано как с флуктуационным подплавлением двойной спирали с концов [6], так и с наличием у нее однонитчатых

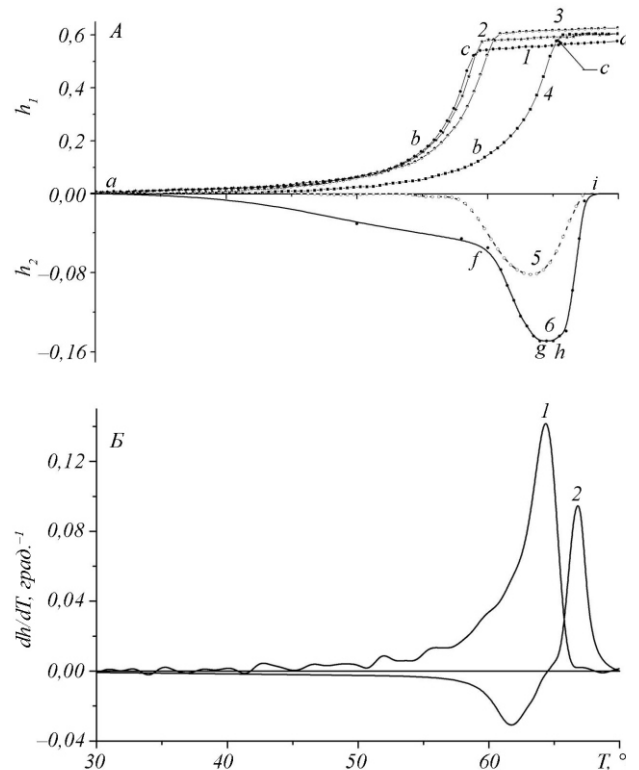


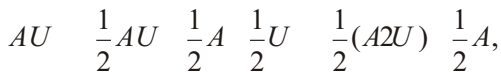
Рис. 2. Кривые плавления полиАполиU (А): 1 – $[Ni^{2+}] = 0$; 2 – 10^{-5} М Ni^{2+} ; 3 – $7 \cdot 10^{-5}$ М Ni^{2+} ; 4 – $3 \cdot 10^{-4}$ М Ni^{2+} ; 5 – $1,5 \cdot 10^{-4}$ М Ni^{2+} ; 6 – $3 \cdot 10^{-4}$ М Ni^{2+} ; кривые 1–4 получены при $\nu = \nu_m = 38500$ cm^{-1} ($\nu_m = 7140$ $M^{-1}cm^{-1}$); 5 и 6 – при $\nu = \nu_i = 35300$ cm^{-1} ($\nu_i = 2976$ $M^{-1}cm^{-1}$) и их производные (Б): 1 и 2 – производные по температуре соответственно от кривых 4 и 6 рис. 2, А

полиадениловых (и, следовательно, полиуридиловых) «хвостов». Участки *b–c*, характеризуемые производной $dh_1/dT \sim (0,12 \text{--} 0,14)$ град⁻¹, отвечают кооперативному разделению AU на две одиночные нити – клубкообразную полиU и частично спирализованную полиА (переход AU → A + U). Этот переход заканчивается в точках *c*, где наблюдается скачкообразное уменьшение производной dh_1/dT от $0,14$ град⁻¹ до $\sim (3 \pm 0,5) \cdot 10^{-3}$ град⁻¹, соответствующей плавлению оставшихся спирализованными звеньев однонитчатой полиА (участки *c–d*). Из рис. 2, А, видно, что такой процесс продолжается и при температуре $T > 70$ °С.

При $[Ni^{2+}] = 7 \cdot 10^{-5}$ М и $\nu = \nu_i$ нагревание AU до 92 °С не изменяет ее поглощения, что подтверждает отсутствие образования трехнитчатой A2U, име-

ющего место при больших концентрациях никеля. Об этом свидетельствуют зависимости $h_2(T)$, полученные при $\lambda = \lambda_i$. Типичная их форма представлена на рис. 2, А. В этом случае зависимости $h_2(T)$ также имеют несколько участков. Начальный участок $a-f$, по-видимому, соответствует плавлению одностранных полиА, которое в этом случае приводит не к гиперхромизму, как при $\lambda = \lambda_m$, а к гипохромизму поглощения, поскольку для полиА положение λ_i смещено в коротковолновую область по сравнению с таковым для AU (рис. 1). Дополнительным доводом в пользу этого предположения является некооперативность конформационного перехода. Как и для участка $a-b$, на участке $a-f$ (рис. 2, А) производная $dh_2/dT = 0,003 \text{ град}^{-1}$. Кроме того, из рис. 2 видно, что низкотемпературные «хвосты» для кривых 4 и 6 наблюдаются в одном и том же интервале температур.

Участок $f-g$ соответствует образованию трехнитчатой A2U (переход 2 → 3) в области плавления двойной спирали AU. Переход 2 → 3 может быть как меж-, так и внутримолекулярным процессом [15]. В первом случае реакция имеет вид $AU + AU \rightarrow A + U + A + U \rightarrow A2U + A$ (рис. 3, а), то есть после разделения каждой двух молекул AU происходит образование одной трехнитчатой молекулы A2U и одной свободной нити полиА. Во-втором –



то есть при разделении половины звеньев одной молекулы AU полиуридиловая нить взаимодействует с половиной спиральных звеньев AU, образуя A2U, а свободной остается половина звеньев полиадениловой цепи (рис. 3, б). Скорость образования трехнитчатых полинуклеотидов из отдельных нитей меньше, чем двухнитчатых [9], и пропорциональна квадрату их концентрации. Поскольку в нашем случае величина Р очень мала ($(1-2) \cdot 10^{-5} \text{ M}$), а скорость нагревания составляет 0,25 град/мин, то весь переход 2 → 3 осуществляется за время, не превышающее 20 мин. Это позволяет предположить в качестве более вероятного внутримолекулярный переход, соответствующий схеме б на рис. 3. Тем более, что в разведенном растворе время «поиска» гибкой нитью полиU комплемен-

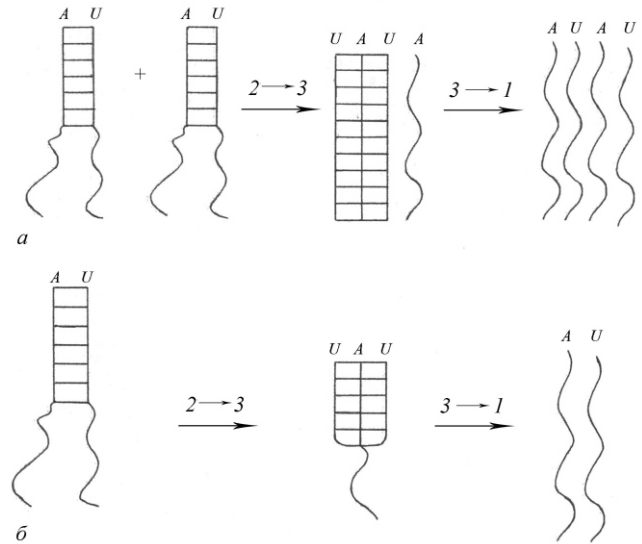


Рис. 3. Возможные процессы формирования трехнитчатой A2U при плавлении двухнитчатой AU: а – межмолекулярный; б – внутримолекулярный

тарной ей нити спиральной полиА внутри одной молекулы AU должно быть меньше, чем при образовании A2U из отдельных нитей, из которых к тому же две молекулы полиU находятся в состоянии полностью разупорядоченного клубка.

Переход 2 → 3 завершается в точке g (рис. 2, А). Дальнейший нагрев приводит к гиперхромизму поглощения на участке $h-i$, который должен соответствовать плавлению трехцепочечных спиралей (переход 3 → 1). Однако, как и при низкой ионной силе раствора (0,01 M Na⁺) [14], участки $h-i$ наблюдаются в области температур, превышающих температуры окончания плавления двух- и трехцепочечных спиралей, определяемых по зависимости $h_1(T)$ (например, точка c на кривой 4 рис. 2, А). Возможная причина этого [14] – формирование термостабильных компактных частиц одностранных полиА, образующейся в результате перехода 3 → 1 при больших концентрациях ионов Ni²⁺. В отличие от аналогичного процесса при 0,01 M Na⁺, когда превышение термостабильности этих частиц относительно таковой для A2U достигало 15–30 °С, в случае 0,1 M Na⁺ оно не превосходит 4 °С (рис. 4).

Полученные данные позволяют построить фазовые диаграммы комплексов AU с ионами Ni²⁺

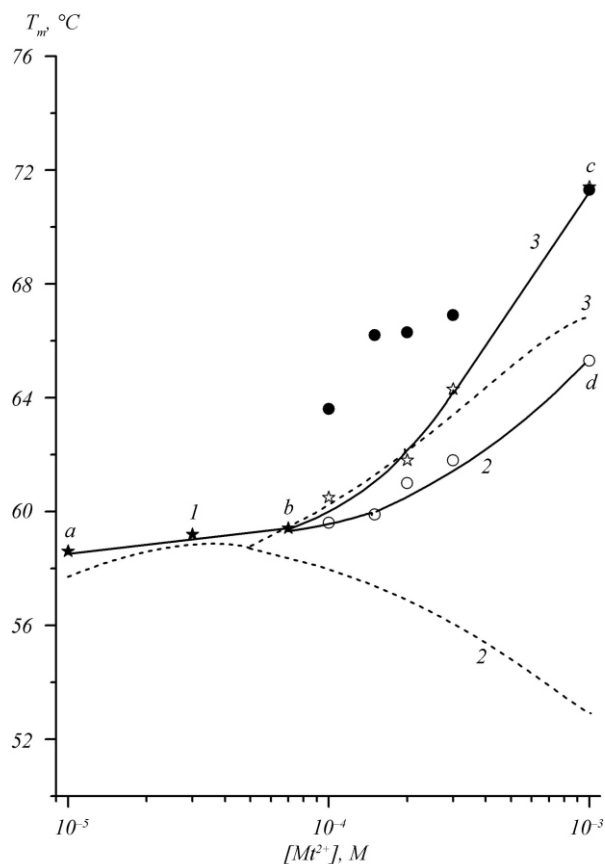


Рис. 4. Фазовые диаграммы комплексов ионов Ni^{2+} с AU при $0,1 \text{ M Na}^+$: 1 – $(T_m)_{2 \rightarrow 1}$ (темные звездочки); 2 – $(T_m)_{2 \rightarrow 3}$ (светлые кружки); 3 – $(T_m)_{3 \rightarrow 1}$ (светлые звездочки); темные кружки – температура плавления компактных частиц, образование которых индуцировано взаимодействием ионов Ni^{2+} с одностичной полиА; штриховая линия – фазовая диаграмма комплекса AU + Mg^{2+} [6]

(рис. 4). При этом температуры (T_m – температура, соответствующая плавлению 50 % звеньев полиА) переходов $2 \rightarrow 1$, $2 \rightarrow 3$ и $3 \rightarrow 1$ определяли как отвечающие максимуму производных dh/dT (рис. 2, Б). При таком способе определения T_m можно пренебречь искажающими ее значение концевыми эффектами (в частности, плавлением спиральных участков полиА при низких и высоких температурах, а также изменениями величины h_{\max}). В этом случае значения T_m , соответствующие переходу в новую конформацию половины звеньев полимера, отличаются от определенных по дифференциальным кривым плавления не более чем на 1°C .

Диаграммы конформационного равновесия для комплексов AU + Ni^{2+} состоят из трех областей,

разделенных линиями, соответствующими температурам перехода в новую конформацию (T_m) (рис. 4). На фазовой диаграмме наблюдается «критическая» точка $T_{\text{mer}} \sim 59^\circ\text{C}$, $[\text{Ni}^{2+}]_{\text{cr}} \sim (0,7 \cdot 1) \cdot 10^{-4} \text{ M}$, в которой при повышении концентрации ионов никеля меняется характер конформационного перехода. Вместо одностадийного перехода $2 \rightarrow 1$ наблюдаются два последовательных перехода $2 \rightarrow 3$ и $3 \rightarrow 1$. Проведенное на рис. 4 сопоставление фазовых диаграмм комплексов AU с ионами Mg^{2+} и Ni^{2+} показывает совпадение в пределах одного градуса концентрационных зависимостей $(T_m)_{2 \rightarrow 1}$ и $(T_m)_{3 \rightarrow 1}$ (в области $(0,1 \cdot 4) \cdot 10^{-4} \text{ M}$). При $[\text{Ni}^{2+}] > 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ кривые 3 на рис. 4 расходятся. Главное же отличие между фазовыми диаграммами этих металлокомплексов (как и при низком содержании ионов Na^+ [14]) состоит в поведении $(T_m)_{2 \rightarrow 3}$: ионы Mg^{2+} понижают эту температуру, тогда как ионы Ni^{2+} ее повышают (при $0,01 \text{ M Na}^+$ возрастание концентрации ионов Ni^{2+} практически не изменяло $(T_m)_{2 \rightarrow 3}$ [14]). В результате этого различие в значениях $(T_m)_{2 \rightarrow 3}$ при $0,001 \text{ M M}^{2+}$ для обоих ионов достигает 12°C . Таким образом, в отличие от ионов Mg^{2+} , расширяющих область существования трехнитчатой A2U, ионы Ni^{2+} ее сужают, соответственно увеличивая область стабильного состояния двухнитчатой AU.

Фазовая диаграмма комплекса AU + Mg^{2+} полностью определяется кулоновским взаимодействием с различными конформациями полинуклеотидов. Можно предположить, что соответствующие различия в действии ионов Mg^{2+} и Ni^{2+} на фазовую диаграмму AU связаны с наличием у никеля внутрисферных координационных взаимодействий с гетероатомами азотистых оснований, отсутствующих у магния.

Действительно, в отличие от A2U атомы N7 аденина AU, казалось бы, свободны для взаимодействия с ионами Ni^{2+} (рис. 5). Тем не менее, не только при низкой ионной силе раствора [14], но и при $0,1 \text{ M Na}^+$ изменение спектра поглощения AU в присутствии ионов Ni^{2+} вплоть до концентрации $0,01 \text{ M}$ находится в пределах экспериментальной ошибки определения ($\pm 80 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Это означает, что наиболее предпочтительными для связывания с AU ионов Ni^{2+} , как и ионов Mg^{2+} , являются атомы кислорода фосфатных групп. Отсутствие

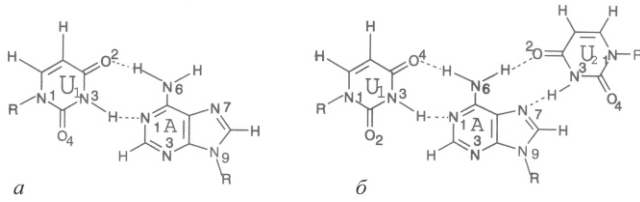


Рис. 5. Структуры дуплексов (а) и триплексов (б), образованных основаниями аденином и урацилом [16]. Пара U₁-А – уотсон-криковская; А-U₂ – обратная хугстиновская

спектральных изменений свидетельствует также о том, что это взаимодействие не изменяет степени спиральности полинуклеотида. Причиной же отсутствия внутрисферных координационных связей с атомом N7 аденина является, по-видимому, малая стерическая доступность (СД) этого атома в жесткой структуре двойной спирали: согласно теоретическим расчетам, даже в вакууме в спиральных структурах СД N7 аденина в 2,5 раза меньше, чем в АМР) [17]. В водном растворе она должна быть еще меньше из-за наличия у ионов октаэдрической гидратной оболочки.

ПолиА. Иная ситуация наблюдается в комплексах ионов Ni²⁺ с однонитчатой полиА. В этом случае никель начинает изменять ее спектры уже при [Ni²⁺] > 10⁻⁴ М. При этом в диапазоне 10⁻⁴ < [Ni²⁺] < 10⁻³ М ионы Ni²⁺ индуцируют ДУФС, являющиеся почти «зеркальным» отражением формы спектров $\epsilon_h(\lambda)$ полиА (рис. 1). Это означает, что ионы увеличивают степень спиральности полиА за счет взаимодействия с ее фосфатными группами. Данные рис. 1 позволяют оценить ее начальную степень спиральности $\epsilon_h(\lambda)$ при T = T₀ в присутствии только ионов Na⁺ по отношению

$$\tau_{T_0} = \left[\frac{\epsilon_h(\lambda)_A}{\epsilon_h(\lambda)_{AU}} \right]_{m \cdot}$$

Согласно данным рис. 1, при T = T₀ она равна ~60 %. Это значение соизмеримо с величиной $\tau_{T_0} = 50 \%$, определенной в [18], где $\epsilon_h(\lambda)$ нормировали на значение ϵ_h для двухспиральной протонированной полиА. Концентрационная зависимость ϵ_a при $\lambda = 39000 \text{ см}^{-1}$ (кривая 1, рис. 6) позволяет рассчитать изменение степени спиральности полиА $\epsilon_h(\lambda)$, индуцированное ионами Ni²⁺ по формуле

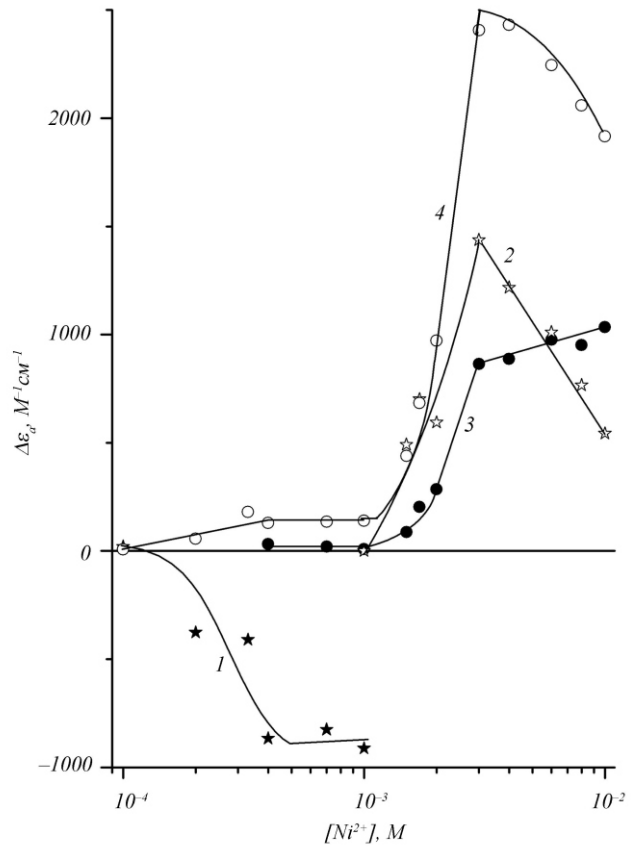


Рис. 6. Концентрационные зависимости интенсивности ДУФС комплексов полиА + Ni²⁺ при характеристических значениях волновых чисел: 1 – 39000 см⁻¹; 2 – 38000 см⁻¹ (для упрощения рисунка эта зависимость сдвинута вверх по ординате на 390 М⁻¹см⁻¹); 3 – 34000 см⁻¹; 4 – 36000 см⁻¹

$$\tau_{T_0} = \left[\frac{\epsilon_a([Ni^{2+}])}{\epsilon_h(\lambda)_A} \right] 100\% \quad (1)$$

Согласно формуле (1), предельное возрастание τ_{T_0} составляет 40 % и, таким образом, уже при 410⁻⁴ М Ni²⁺ полиА переходит в состояние полностью упорядоченной спирали, сохраняющееся вплоть до 0,001 М Ni²⁺.

В настоящее время однозначно установлено, что наиболее предпочтительным типом комплексов большинства ионов, имеющих электроны на внешних d-орбиталях, с нуклеотидами пуриновых оснований (АМР, GMP, IMP) являются так называемые макрохелаты [19]. В этих комплексах ионы одновременно внутрисферно связаны с N7 пурино-

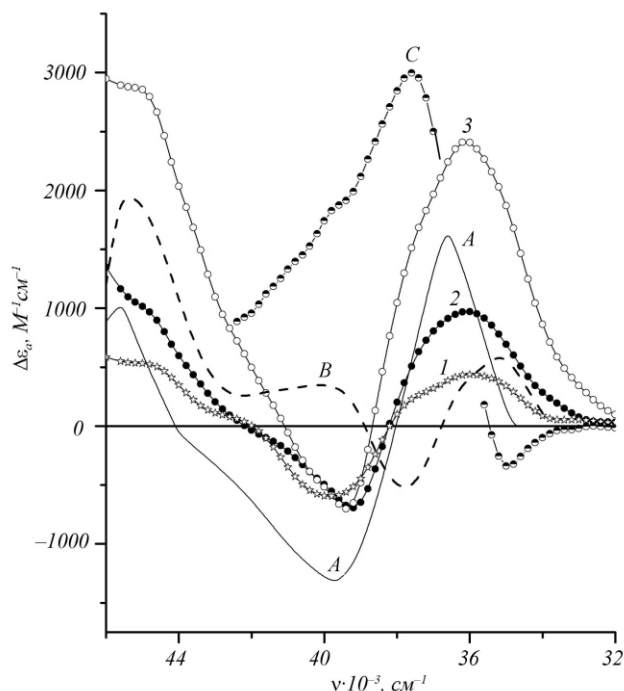


Рис. 7. ДУФ спектры полиА, индуцированные ионами Ni^{2+} : 1 – $1,5 \cdot 10^{-3}$ М Ni^{2+} ; 2 – $0,002$ М Ni^{2+} ; 3 – $0,003$ М Ni^{2+} (А – ДУФС АМР в присутствии $0,035$ М Ni^{2+} [14]; В – ДУФС АМР, индуцированный протонированием N1[14]; С – спектр $\epsilon(\nu)$ для полиА (полностью приведен на рис. 1))

вого кольца и внешнесферно (то есть через одну из молекул октаэдрической гидратной оболочки ионов) – с атомом кислорода фосфатной группы. Формированию подобных структур способствует как энергетическая выгодность хелатирования, так и структурная, обусловленная анти-конформацией сахарного кольца [20]. При низких ионных силах раствора взаимодействие ионов Ni^{2+} с атомами N7 и N1 одноцепочечной полиА показано нами ранее также методом ДУФС [14]. Координация с этими атомами полиА зарегистрирована и для ее комплексов с ионами Mn^{2+} , Cd^{2+} и Cu^{2+} различными спектроскопическими методами [21–23]. При образовании макрохелатов константы связывания должны быть большими, чем константы связывания с фосфатами [24] и соответственно проявляться при достаточно низких концентрациях ионов. Однако вполне четкие ДУФС полиА появляются лишь при $[\text{Ni}^{2+}] > 0,001$ М (рис. 7), то есть в области, где концентрация ионов на два порядка превосходит такую полиА. В этих условиях одновременное взаи-

модействие с N7 и фосфатами маловероятно, чему препятствует и высокая концентрация ионов Na^+ , также экранирующих фосфаты. Таким образом, наблюдаемые на рис. 7 ДУФС, скорее всего, соответствуют внутрисферному взаимодействию ионов Ni^{2+} с отдельными атомами N7 и/или N1 полиА.

Изучение формы этих спектров (рис. 7) показывает, что положения их длинноволновых максимумов и изобестической точки довольно хорошо (соответственно в пределах 500 и 200 cm^{-1}) согласуются с их положениями на ДУФС АМР, обусловленными внутрисферным взаимодействием ионов Ni^{2+} с N7 аденина. Однако в коротковолновой части спектра изобестическая точка комплексов полиА + Ni^{2+} смещена в красную сторону на 2000 cm^{-1} по отношению к ее положению на спектре А (рис. 7, $\nu = 44000$ cm^{-1}). Это позволяет предположить, что спектры 1 и 2 рис. 7 являются суперпозицией изменений спектра поглощения полиА, индуцированных взаимодействием ионов Ni^{2+} как с N7, так и с N1. Действительно, ионизация N1 (спектр В, рис. 7) должна приводить к гиперхромизму спектра поглощения при 44000 cm^{-1} и соответственно к сдвигу изобестической точки спектра А рис. 7 из коротковолновой в красную сторону.

Однако, кроме этих взаимодействий, на форму ДУФС может влиять и изменение спектра поглощения, вызванное плавлением спиральных участков полиА, моделируемое спектром С рис. 7, а также рассеянием света на компактных частицах (см. выше). Оба этих эффекта могут приводить к тому, что при $[\text{Ni}^{2+}] > 0,002$ М коротковолновая изобестическая точка сдвигается в длинноволновую, а длинноволновая – в коротковолновую части спектра (спектр 3 рис. 7).

Интенсивность спектра С при $\nu = 34000$ cm^{-1} равна нулю (рис. 7), поэтому концентрационная зависимость ϵ_a при этом волновом числе (кривая 3 рис. 6) представляет изотерму адсорбции ионов Ni^{2+} на полиА. Это позволяет рассчитать зависимость K от степени связывания для комплексов полиА + Ni^{2+} , образующихся при $[\text{Ni}^{2+}] > 0,001$ М, по формуле

$$K = \frac{C}{(1 - C) A_f}, \quad (2)$$

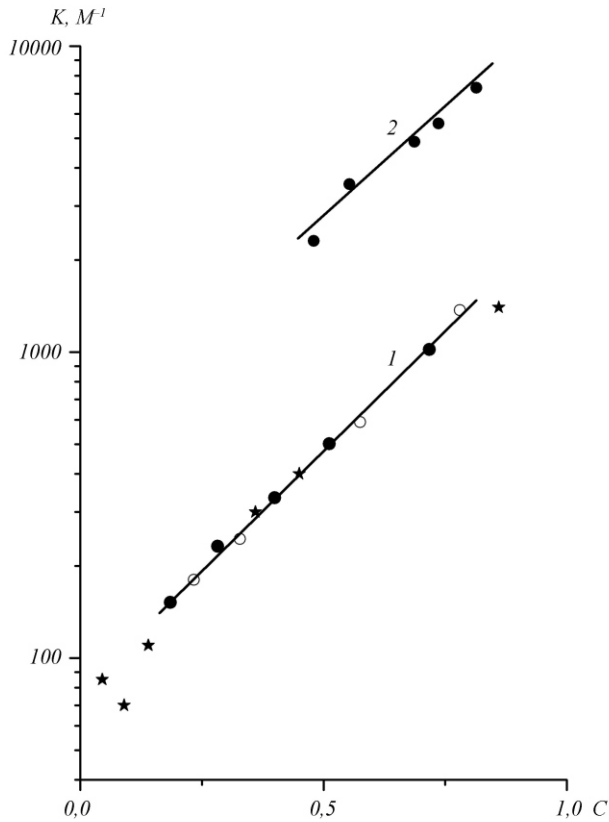


Рис. 8. Зависимости констант связывания ионов Ni²⁺, Mn²⁺ и Cd²⁺ с полиА от степени связывания (C): 1 – Ni²⁺ (светлые и темные кружки рассчитаны соответственно по концентрационным зависимостям ν_a при $\nu = 34000$ и 36000 см⁻¹; звездочки – Mn²⁺ [25]); 2 – Cd²⁺ [26]

где $C = [\nu_a / (\nu)_{lim}]$ – степень связывания; A_f – концентрация свободных ионов; $(\nu)_{lim} = 870$ М⁻¹см⁻¹ (рис. 6).

Поскольку в этом случае $[Ni^{2+}] \gg P$, то $A_f [Ni^{2+}]$.

Расчетная зависимость $lgK(C)$ (кривая 1, рис. 8) линейна и соответствует, по-видимому, связыванию ионов Ni²⁺ с N1 полиА, поскольку интенсивность спектра A рис. 7 при $\nu = 34000$ см⁻¹ равна нулю. В случае аденозина (то есть в отсутствие фосфатных групп) атом N1 (при нейтральных значениях рН) является наиболее предпочтительным не только для протонирования, но и связывания ионов Ni²⁺ и Cu²⁺ [27].

Полученная для ионов Ni²⁺ зависимость $K(C)$ совпадает с найденной нами ранее [25] для комплекса полиА с ионами Mn²⁺ и подобна рассчитанной для

комплекса полиА + Cd²⁺ [26]. Так, кривая 2 на рис. 8, также интерпретированная как соответствующая взаимодействию ионов Cd²⁺ с N1 [26], характеризуется примерно той же степенью положительной кооперативности и отличается лишь величиной K , которая для ионов Ni²⁺ примерно в 4 раза меньше, чем для ионов Cd²⁺.

По формуле (2) можно также рассчитать зависимость $K(C)$, соответствующую взаимодействию ионов Ni²⁺ с отдельными N7 полиА, по концентрационной зависимости ν_a при $\nu = 36000$ см⁻¹, т. е. волновом числе, близком к положению максимума на ДУФС макрохелата Ni²⁺ + AMP (рис. 6, 7). (В этом случае $(\nu_a)_{lim} = 2430$ М⁻¹см⁻¹.) Рассчитанные значения K также попадают на кривую 1, рис. 8. Экстраполяция этой кривой на $C = 0$ дает значение $K = 85$ М⁻¹, по порядку величины согласующееся с величинами констант связывания ионов Ni²⁺ с N1 и N7 аденозина, равными соответственно 25 и 8 М⁻¹ [27].

Довольно сильные изменения спектра поглощения полиА при $[Ni^{2+}] > 0,001$ М свидетельствуют о том, что комплексы никеля с N7 и N1 аденина являются внутрисферными. По-видимому, именно это обстоятельство является основной причиной положительной кооперативности связывания ионов Ni²⁺ с полиА в данной области их концентрации.

Действительно,

$$\frac{d \ln K(C)}{dC} = \frac{1}{R} \frac{d S(C)}{dC} - \frac{1}{RT^2} \frac{d H(C)}{dT}, \quad (3)$$

где S и H – соответственно энтропия и энтальпия связывания.

При взаимодействии с азотистыми основаниями H слабо зависит от C и конформации полинуклеотида [18], поэтому знак производной $d \ln K / dC$ должен, в основном, определяться изменением энтропии комплекса, увеличивающейся за счет вытеснения в раствор молекул воды гидратных оболочек иона и аденина при образовании внутрисферных комплексов с N7 и/или N1 полиА.

В области $\nu \sim 38000$ см⁻¹ (изобестическая точка спектра A , рис. 7) координационная составляющая спектра ν_a близка к нулю. Таким образом, можно рассчитать зависимость степени спиральности по-

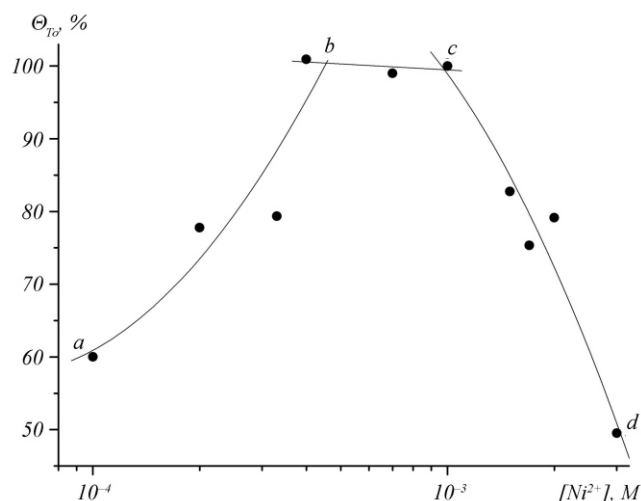


Рис. 9. Зависимость степени спиральности полиА от концентрации ионов Ni²⁺ при T = T₀. Кружки – значения T₀, рассчитанные по формулам (1) и (4); сплошные линии получены методом наименьших квадратов для каждого из участков: a–b, b–c и c–d

лиА от концентрации ионов Ni²⁺ при [Ni²⁺] > 0,001 М по формуле

$$A [1 - a ([Ni^{2+}]) / (h_A)] 100\%. \quad (4)$$

Формулы (1) и (4) позволяют получить общую фазовую диаграмму комплекса полиА + Ni²⁺ (рис. 9), из которой следует, что если связывание ионов Ni²⁺ с фосфатами полиА повышает степень ее спиральности (диапазон от 10⁻⁴ до 4·10⁻⁴ М Ni²⁺), то внутрисферное взаимодействие с атомами азота ([Ni²⁺] > 0,001 М) разупорядочивает ее структуру. Так что уже при 0,003 М Ni²⁺ величина T₀ составляет всего ~50 %. Разрушение спиральной структуры полиА также может быть источником положительной кооперативности взаимодействия ионов Ni²⁺ с этим полинуклеотидом.

При [Ni²⁺] > (3–4)·10⁻³ М величины a при = 36000 и 38000 см⁻¹ понижаются (рис. 6). Такой гипохромизм поглощения полиА обусловлен либо ее преципитацией, либо появлением компактных частиц уже при комнатной температуре, наблюдающихся в присутствии никеля и при низких концентрациях ионов Na⁺ в растворе [14]. Возрастание величины a при = 34000 см⁻¹ и [Ni²⁺] > 0,003 М (рис. 6) может быть связано с появлением рассеяния света на этих частицах.

Данные рис. 9 позволяют рассчитать кривые плавления полиА в форме (Т) (рис. 10) по формуле

$$(T) T_0 \left(1 - \frac{h(T)}{h_{max}}\right)^m, \quad (5)$$

где T₀ при T = T₀ (рис. 9); h(T) – измеряемые в опыте температурные зависимости гиперхромного коэффициента; h_{max} = 0,26 – гиперхромизм поглощения полиА при T = 92 °С и [Ni²⁺] = 0.

Из рис. 10 видно, что при повышении концентрации ионов Ni²⁺ до 0,001 М T_m возрастает на ~14 °С. Это подтверждает результаты анализа формы ДУФС, согласно которому в этой области концентраций доминирующим является экранирование ионами никеля отрицательных зарядов на фосфатных группах полиА. С другой стороны, известно, что образование макрохелатов приводит к значительным искажениям спиральной структуры одонитчатых полинуклеотидов [18, 22, 28], следствием чего должно быть уменьшение их термостабильности. Последнее наблюдается и при образовании внутрисферных комплексов с отдельными N7 и N1.

Так, повышение [Ni²⁺] от 10⁻³ до 0,003 М приводит к снижению термостабильности полиА на ~25 °С (рис. 10). При такой большой концентрации никеля плавление полиА наблюдается только до 30 °С. При T > 30 °С происходят либо ее компактизация, либо преципитация, то есть те же процессы, что имеют место при комнатной температуре при [Ni²⁺] > (3–4)·10⁻³ М.

ПолиУ. Ионы Ni²⁺ не изменяют спектра поглощения одонитчатой полиУ вплоть до концентрации 0,006 М. Как и в случае отдельных нуклеотидов [13, 29], ионы Ni²⁺ взаимодействуют только с фосфатными группами УМР полиУ, но это взаимодействие не приводит к спирализации ее звеньев из-за очень слабого стекинга оснований в этом полинуклеотиде [10,18].

В целом данные ДУФС показывают, что внутрисферные координационные взаимодействия ионов Ni²⁺ с полиА и полиУ не должны существенным образом влиять на поведение температур конформационных переходов в комплексах AU + Ni²⁺ вплоть до 0,001 М Ni²⁺.

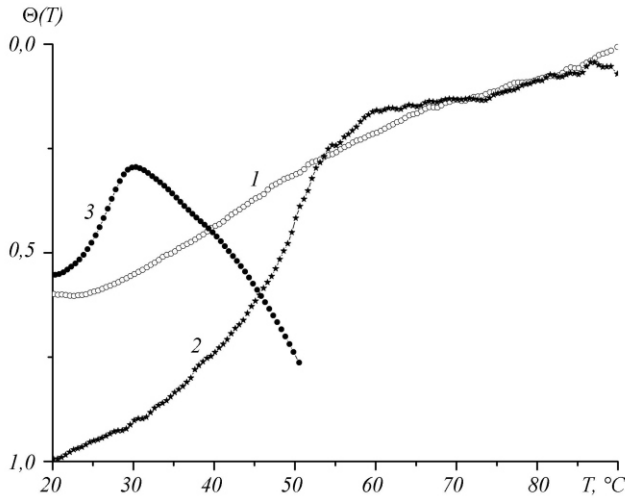


Рис. 10. Кривые плавления одноцепочечной полиА (0,1 M Na⁺): 1 – [Ni²⁺] = 0; 2 – 0,001 M Ni²⁺; 3 – 0,003 M Ni²⁺

Сравнение с теорией. Для выяснения физических причин различного влияния ионов Mg²⁺ и Ni²⁺ на форму экспериментальных фазовых диаграмм их комплексов с AU можно сравнить последние с рассчитанной по теории равновесного связывания [6] в форме $T_m([Mt^{2+}])$ (T_m – изменение температуры соответствующего перехода, индуцированное ионами металлов), согласно которой [6]

$$(T_m)_{a \rightarrow b} = B \ln E - B \ln F,$$

где $(T_m)_{a \rightarrow b} = (T_m - T_{m_0})$ – изменение температуры перехода полинуклеотида, индуцированное ионами Mt^{2+} ; a и b – соответственно начальная и новая конформации полинуклеотида; $B = (RT_{m_0} - T_m) / H$, где T_m – температура перехода в новую конформацию половины звеньев полинуклеотида; $T_{m_0} = T_m$ при $[Mt^{2+}] = 0$ (для переходов 3 → 1 и 2 → 3 $T_{m_0} = (T_m)_{cr}$); H – энтальпия конформационного перехода (таблица).

Для перехода 2 → 1

$$E_{21} = \frac{(1 - K_{AU} A_f)^{n_{AU}}}{(1 - K_A A_f)^{n_A}}; F_{21} = \frac{(1 - K_{AU} A_f)^{n_{AU}}}{(1 - K_U A_f)^{n_U}}; \quad (7)$$

для перехода 3 → 1

$$E_{31} = \frac{(1 - K_{A2U} A_f)^{(2/3)n_{A2U}}}{(1 - K_A A_f)^{(2/3)n_A}};$$

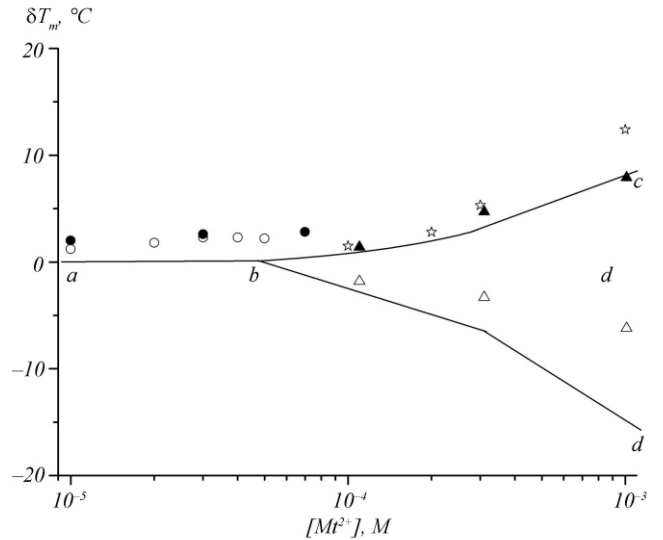


Рис. 11. Экспериментальные (значки) и расчетные (сплошные линии) зависимости изменения температур конформационных переходов от концентрации ионов Mg²⁺ [6] и Ni²⁺. Переход 2

1 (кривая a–b: светлые кружки – Mg²⁺; темные кружки – Ni²⁺); 3 → 1 (кривая b–c: темные треугольники – Mg²⁺; звездочки – Ni²⁺); 2 → 3 (кривая b–d: светлые треугольники – Mg²⁺). Для ионов Ni²⁺ экспериментальные значения $(T_m)_{2 \rightarrow 3}$ не показаны, поскольку они попадают на расчетную зависимость для перехода 3 → 1. Сплошные линии рассчитаны по формулам (6)–(9)

$$F_{31} = \frac{(1 - K_{A2U} A_f)^{(4/3)n_{A2U}}}{(1 - K_U A_f)^{(4/3)n_U}}; \quad (8)$$

для перехода 2 → 3

$$E_{23} = \frac{(1 - K_{AU} A_f)^{n_{AU}}}{(1 - K_{A2U} A_f)^{n_{A2U}}}; F_{23} = \frac{(1 - K_{AU} A_f)^{n_{AU}}}{(1 - K_A A_f)^{n_A}}. \quad (9)$$

Здесь K – константы связывания ионов с полинуклеотидами; n – стехиометрия комплекса (число ионов, приходящееся на фосфат); A_f – концентрация свободных ионов.

Изменение T_m является небольшим (рис. 4), что позволяет заменить произведение $T_{m_0} T_m$ на $T_{m_0}^2$. $[Mt^{2+}] \gg P$, поэтому $A_f \approx [Mt^{2+}]$.

Зависимости $T_m([Mt^{2+}])$ всех переходов можно рассчитать только для ионов Mg²⁺, для которых известны значения K и n ($n_{AU} = n_{A2U} = n_A = n_U = 0,5$ [6]). Константы связывания ионов Mg²⁺ с полинуклеоти-

Концентрационная зависимость составляющих изменения температур конформационных переходов ($^{\circ}\text{C}$) комплекса ($\text{AU} + \text{Mg}^{2+}$), рассчитанная по формулам (6)–(9)

[Mg ²⁺], М	Переход					
	2 1		3 1		2 3	
	$B \ln E$	$B \ln F$	$B \ln E$	$B \ln F$	$B \ln E$	$B \ln F$
10^{-5}	0,02	0,01	–	–	–	–
10^{-4}	0,2	0,1	0,5	0,9	–3,5	0,8
10^{-3}	–	–	2,9	5,4	–20,7	6
H [6]	8,2 ккал/(моль пар)		12,7 ккал/(моль трипл.)		2,1 ккал/(моль пар)	
T_{m_0} , К	330		332		332	
B , К	26		17		104	

дами (M^{-1}) при 0,1 М Na^+ [6] следующие: $\text{AU} - 345$; $\text{A2U} - 1000$; полиА – 200; полиU – 250.

Результаты вычисления, приведенные в таблице и на рис. 11, показывают, что в случае ионов Mg^{2+} для переходов 2 1 и 3 1 различия в экспериментальных и расчетных значениях T_m находятся в пределах экспериментальной ошибки.

При этом малая величина $(T_m)_{2-1}$ и ее независимость от $[\text{Mg}^{2+}]$ и $[\text{Ni}^{2+}]$ (рис. 11) определяются тем, что в диапазоне ($10^{-5} - 10^{-4}$) М Mg^{2+} произведение $K [\text{Mg}^{2+}] \ll 1$.

Повышение $(T_m)_{3-1}$ обусловлено тем, что $K_{\text{A2U}} > K_{\text{A}}$ и K_{U} . При этом отличие вкладов обоих членов суммы (6) не превышает 1,5 $^{\circ}\text{C}$ (таблица). Это связано с тем, что $K_{\text{A}} < K_{\text{U}}$.

Для перехода 2 3 второй член суммы (6) положительный и понижение $(T_m)_{2-3}$ полностью обусловлено тем, что $K_{\text{AU}} < K_{\text{A2U}}$. Однако для ионов Mg^{2+} в случае перехода 2 3 наблюдается лишь качественное согласие между расчетом и опытом: дестабилизирующий эффект в последнем случае существенно меньше. Наиболее вероятная причина этого состоит в следующем. Взаимодействие ионов двухвалентных металлов с фосфатами полинуклеотидов характеризуется отрицательной кооперативностью ($dK/dC < 0$) [18]. Величина этой производной для A2U должна быть больше, чем для AU , из-за большей линейной плотности заряда на трехцепочечном полинуклеотиде ($n_{\text{A2U}} = 6,2$, $n_{\text{AU}} = 4,98$ [14]). Таким образом, при повышении концентрации ионов Mg^{2+} различие в значениях K_{A2U} и K_{AU}

уменьшается. Формулы (6)–(9) этого не учитывают, что и приводит к возрастанию разницы между экспериментальными и расчетными значениями $(T_m)_{2-3}$ при повышении концентрации ионов Mg^{2+} (рис. 11). Следовательно, отсутствие понижения $(T_m)_{2-3}$ в растворах, содержащих ионы Ni^{2+} , позволяет сделать вывод о том, что в этом случае при $[\text{Ni}^{2+}] > [\text{Ni}^{2+}]_{\text{cr}}$ $|B \ln E|$ становится меньше $|B \ln F|$, что соответствует ситуации, когда доминирующий вклад в изменение $(T_m)_{2-3}$ вносит второй член суммы (6). Это означает, что в таких условиях различие между K_{A2U} и K_{AU} становится меньше, чем различие между K_{AU} и K_{A} .

Наряду с отрицательной кооперативностью связывания с фосфатами наиболее вероятной причиной указанного эффекта может быть образование ионами Ni^{2+} внешнесферных макрохелатов с N7 AU, в которых ионы Ni^{2+} связаны с N7 аденинов через молекулы воды. При образовании водородных связей соединениями, содержащими азот, сдвиги полос поглощения малы [30] и потому ДУФС могут не регистрироваться.

Существует еще одна возможная причина сдвига равновесия в сторону стабилизации AU при больших концентрациях никеля. При различном числе мест связывания на полинуклеотидах условием повышения $(T_m)_{2-3}$ при $C = 1$ должно быть выполнение неравенства $(n_2 K_2) / (n_3 K_3) > 1$ [31]. Таким образом, можно предположить, что повышение $(T_m)_{2-3}$ обусловлено тем, что при $[\text{Ni}^{2+}] > [\text{Ni}^{2+}]_{\text{cr}}$ число мест связывания на трехцепочечной A2U мень-

ше, чем на двухцепочечной АУ. Однако уравнения (6)–(9) содержат много неизвестных для ионов Ni²⁺ эмпирических параметров, что не позволяет количественно оценить влияние названных причин на зависимость $(T_m)_{2-3}$ от концентрации ионов Ni²⁺.

Выводы. 1. При [Ni²⁺] = 0,001 М ионы преимущественно взаимодействуют с атомами кислорода фосфатных групп полиА, что приводит к образованию новых спиральных участков в ее структуре и возрастанию их термостабильности. При больших концентрациях наблюдается внутрисферное взаимодействие ионов Ni²⁺ с N7 и N1 аденина, вызывающее разрушение спиральных звеньев и понижение термостабильности звеньев, оставшихся в спиральной конформации. Определены константы связывания ионов Ni²⁺, соответствующие формированию таких комплексов.

2. Ионы Ni²⁺ не образуют внутрисферных координационных связей с гетероатомами аденина и урацила АУ и полиУ, а их взаимодействие с фосфатами указанных полинуклеотидов не изменяет их структуры.

3. Получена фазовая диаграмма комплекса АУ + Ni²⁺, на которой регистрируются участки, соответствующие переходам 2 → 1 в области низких концентраций ионов Ni²⁺, и переходам 2 → 3 и 3 → 1 при [Ni²⁺] > [Ni²⁺]_{кр}.

Сравнение этой диаграммы с рассчитанной в рамках теории «скрепок» позволяет предположить, что обнаруженное при [Ni²⁺] > [Ni²⁺]_{кр} повышение $(T_m)_{2-3}$ обусловлено тем, что в таких условиях различие между константами связывания ионов Ni²⁺ с А2У и АУ становится меньше, чем таковое между константами их связывания с АУ и полиА. Другая возможная причина – уменьшение числа мест связывания ионов Ni²⁺ при реализации перехода 2 → 3.

V. A. Sorokin, V. A. Valeev, E. L. Usenko

Ni²⁺ ion effect on conformational equilibrium of polynucleotides: polyA polyU, polyA and polyU under conditions close to physiological ones

Summary

Ni²⁺ ion interactions with single-stranded polyA and polyU and double-stranded polynucleotide polyA polyU (AU) were studied in aqueous solutions containing 0.1 M Na⁺ using the methods of differential UV-spectroscopy and thermal denaturation. The formation of innerspheric coordination bonds of nickel ions with N7

and N1 of polyA adenine was revealed in the range of high nickel concentrations. The sections, corresponding to 2 → 1, 2 → 3, and 3 → 1 transitions, were observed in the phase diagram of (AU + Ni²⁺) complex. Unlike Mg²⁺ ions decreasing $(T_m)_{2-3}$, Ni²⁺ ions increase it. It is supposed that under these conditions the difference between binding constants of Ni²⁺ ions with AU and polyA and/or the decrease in the number of ion-binding centers at A2U contribute to the increase of $(T_m)_{2-3}$.

Key words: metal complexes of nucleic acids, polynucleotides, conformational transitions.

V. O. Sorokin, V. O. Valeev, E. L. Usenko

Вплив іонів Ni²⁺ на конформаційну рівновагу полінуклеотидів поліА поліУ, поліА та поліУ за умов, близьких до фізіологічних

Резюме

Методами диференційної УФ спектроскопії та термічної денатурації у водних розчинах, які вміщують 0,1 М Na⁺, вивчено взаємодію іонів Ni²⁺ з однонитчастими поліА та поліУ, а також двонитчастим полінуклеотидом поліА поліУ (АУ). В області великих концентрацій іонів нікелю виявлено утворення ними внутрішньосферних координаційних зв'язків з атомами N7 та N1 аденіну поліА. На фазовій діаграмі комплексу АУ + Ni²⁺ спостерігаються ділянки, які відповідають переходам 2 → 1, 2 → 3 та 3 → 1. На відміну від іонів Mg²⁺, які знижують температуру переходу $(T_m)_{2-3}$, іони Ni²⁺ її підвищують. Припускається, що домінуючим внеском у підвищення $(T_m)_{2-3}$ за цих умов є різниця між константами зв'язування іонів Ni²⁺ з АУ та поліА та/або зменшення числа центрів, які зв'язують іони на А2У.

Ключові слова: металокомплекси нуклеїнових кислот, полінуклеотиди, конформаційні переходи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мур Дж. В., Рамамурти С. Тяжелые металлы в природных водах: контроль и оценка влияния.–М.: Мир, 1987.–288 с.
2. Coogan T. P., Latta D. M., Imbra R. J., Costa M. Effect of nickel (II) on DNA-protein interactions // Biol. Trace Elem. Res.–1989.–**21**.–P. 13–21.
3. Dally H., Hartwig A. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells // Carcinogenesis.–1997.–**18**, N 5.–P. 1021–1026.
4. Hartwig A. Recent advances in metal carcinogenicity // Pure Appl. Chem.–2000.–**72**, N 6.–P. 1007–1014.
5. Андроникашвили Э. Л. Малигнизация и изменение некоторых свойств биомолекул и надмолекулярных структур // Биофизика.–1987.–**23**, № 5.–С. 782–799.
6. Sorokin V. A., Valeev V. A., Gladchenko G. O., Degtyar M. V., Karachevtsev V. A., Blagoi Yu. P. Mg²⁺ ion effect on the conformational equilibrium of polyU polyA polyU and polyA polyU in aqueous solutions // Int. J. Biol. Macromol.–2003.–**31**.–P. 223–233.
7. Field A. K. Oligonucleotides as inhibitors of human immunodeficiency virus // Curr. Opin. Mol. Ther.–1999.–**1**.–P. 323–331.

8. *Giovannangeli C., Rougee M., Garestier T., Thuong N. T., Helene C.* Triple-helix formation by oligonucleotides containing the three bases thymine, cytosine and guanine // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1992.—**89**.—P. 8631–8635.
9. *Plum G. E., Pilch D. S., Singleton S. C., Breslauer K. J.* Nucleic acid hybridisation: triplex stability and energetic // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*—1995.—**24**.—P. 319–350.
10. *Зенгер В.* Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.—М.: Мир, 1987.—584 с.
11. *Лурье Ю. Ю.* Справочник по аналитической химии.—М.: Химия, 1971.—454 с.
12. *Sorokin V. A., Valeev V. A., Gladchenko G. O., Degtyar M. V., Andrus E. A., Karachevtsev V. A., Blagoi Yu. P.* Mg²⁺ and Ni²⁺ ion effect on stability and structure of triple polyIpolyApolyI helix // *Int. J. Biol. Macromol.*—2005.—**35**.—P. 201–210.
13. *Aoki K.* Nucleosides, nucleotides and metal ions // *Metalloproteins: Chemical properties and biological effects / Eds S. Otsuka, T. Yamanaka.*—Amsterdam etc.: Elsevier, 1988.—P. 457–490.
14. *Sorokin V. A., Valeev V. A., Gladchenko G. O., Degtyar M. V., Blagoi Yu. P.* Ni²⁺ ion effect on conformations of single-double- and three-stranded homopolynucleotides containing adenine and uracil // *Macromol. Biosci.*—2001.—**1**.—P. 191–203.
15. *Stevens C. L., Felsenfeld G.* The conversion of two-stranded Poly(A + U) to three-strand Poly(A + 2U) and PolyA by heat // *Biopolymers.*—1964.—**2**.—P. 293–311.
16. *Andrushchenko V., Blagoi Yu., Van de Sande J. H., Wieser H.* Poly(rA)poly(rU) with Ni²⁺ ions at different temperatures: infrared absorption and vibrational circular dichroism spectroscopy // *J. Biomol. Struct. Dyn.*—2002.—**19**, N 5.—P. 889–906.
17. *Lavery R., Pullman A., Pullman B.* Steric accessibility of reactive centers in B-DNA // *Int. J. Quant. Chem.*—1981.—**20**, N 1.—P. 49–62.
18. *Благой Ю. П., Галкин В. Л., Гладченко Г. О., Корнилова С. В., Сорокин В. А., Шкорбатов А. Г.* Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах.—Киев: Наук. думка, 1991.—270 с.
19. *Sigel H., Massoud S. S., Corfu N. A.* Comparison of the extent of macrochelate formation in complexes of divalent metal ions with guanosine (GMP²⁻), inosine (IMP²⁻), and adenosine 5'-monophosphate (AMP²⁻). The crucial role of N-7 basicity in metal ion – nucleic base recognition // *J. Amer. Chem. Soc.*—1994.—**116**.—P. 2958–2971.
20. *Hellert R., Bau R., Martin R. B., Mariam J. H.* Nucleotides and derivatives: their ligating ambivalence // *Metal Ions in Biological Systems / Ed. H. Sigel.*—New York: Marcel Dekker, 1979.—Vol. 8.—P. 102–114.
21. *Blagoi Yu. P., Gladchenko G. O., Nafie L. A., Freedman T. B., Sorokin V. A., Valeev V. A., He Ya.* Phase equilibrium in poly(rA)poly(rU) complexes with Cd²⁺ and Mg²⁺ ions, studied by ultraviolet, infrared, and vibrational circular dichroism spectroscopy // *Biopolymers.*—2005.—**78**.—P. 275–286.
22. *Yamada A., Akasaka K., Hatano H.* Proton and phosphorus – 31 magnetic relaxation studies on the interaction of polyriboadenylic acid with Mn²⁺ // *Biopolymers.*—1976.—**15**, N 9.—P. 1315–1331.
23. *Enmanji K.* Proton, phosphorus and carbon nuclear magnetic relaxation studies on the interaction of poly(riboadenylic acid) with Cu²⁺ // *J. Polym. Sci.*—1987.—**22**, N 3.—P. 883–895.
24. *Diebler H., Secco F., Venturini M.* The binding of Mg(II) and Ni(II) to synthetic polynucleotides // *Biophys. Chem.*—1987.—**26**.—P. 193–205.
25. *Сорокин В. А., Благой Ю. П., Силина Л. К., Далян Е. Б., Бабаян Ю. С., Асланян В. М.* Спектроскопическое исследование влияния связывания ионов двухвалентного марганца на конформацию полирибоадениловой кислоты // *Молекуляр. биология.*—1982.—**16**, № 6.—С. 1223–1233.
26. *Сорокин В. А., Валеев В. А., Усенко Е. Л., Андрусъ Е. А., Благой Ю. П.* Природа различного влияния ионов Cd²⁺ на конформационное равновесие трехцепочечных полиУполиАполиУ и полиІполиАполиІ в водном растворе // *Биофизика.*—2007.—**52**, № 6.—С. 1017–1029.
27. *Kim S. H., Martin R. B.* Binding sites and stabilities of transition metal ions with nucleosides and related ligands // *Inorg. Chim. Acta.*—1984.—**91**.—P. 19–24.
28. *Rifkind J. M., Shin Y. A., Heim J. M., Eichhorn G. L.* Cooperative disordering of single-stranded polynucleotides through copper crosslinking // *Biopolymers.*—1976.—**15**, N 9.—P. 1879–1902.
29. *Massoud S. S., Sigel H.* Metal ion coordinating properties of pyrimidine-nucleoside 5'-monophosphates (CMP, UMP, TMP) and of simple phosphate monoesters, including D-ribose 5'-monophosphate. Establishment of relations between complexes stability and phosphate basicity // *Inorg. Chem.*—1988.—**27**, N 8.—P. 1447–1453.
30. *Хизаси К., Баба Х., Рембаум А.* Квантовая химия.—М.: Мир, 1967.—379 с.
31. *Франк-Каменецкий М. Д., Карапетян А. Т.* К теории плавления комплексов ДНК с низкомолекулярными веществами // *Молекуляр. биология.*—1972.—**6**, № 4.—P. 621–627.

УДК 577.3

Надійшла до редакції 10.07.07