

## УЛЬТРАЗВУКОВОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ДНК В КОМПЛЕКСАХ С КАТИОНАМИ Ag(I), Cu(II), Hg(II)

© 2013 г. С.Л. Гроховский\*, И.А. Ильичева\*, Л.А. Панченко\*\*\*, М.В. Головкин\*, Д.Ю. Нечипуренко\*\*, Р.В. Полозов\*\*\*\*, Ю.Д. Нечипуренко\* \*\*

\* Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32;

\*\* Физический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Воробьевы горы;

\*\*\* Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Воробьевы горы;

\*\*\*\* Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино Московской области

E-mail: grok@imb.ru, imb\_irina@rambler.ru, nech@imb.ru

Поступила в редакцию 24.09.12 г.

Исследовано ультразвуковое расщепление фрагментов ДНК, связанных с катионами переходных металлов Ag(I), Cu(II) и Hg(II). Проведенный статистический анализ позволил оценить влияние типа катиона и его концентрации на относительную интенсивность расщепления в каждом из 16 динуклеотидов. Каждый из катионов может вызвать два принципиально различных варианта искажения двойной спирали в зависимости от того, происходит его координация по широкой или узкой бороздке ДНК. Уменьшение интенсивности расщепления наблюдается в тех случаях, когда катионы связываются по широкой бороздке ДНК; увеличение интенсивности расщепления происходит в результате возмущения, вносимого катионами в структуру водородных связей комплементарных пар азотистых оснований, или в результате интеркаляции катионов. Оба типа деформации структуры ДНК способны повлиять на интенсивность  $N \leftrightarrow S$  интерконверсии дезоксирибозы.

*Ключевые слова:* ДНК, комплексы переходный металл-ДНК, ультразвуковое расщепление ДНК, псевдовращение цикла  $\beta$ -D-дезоксирибозы.

Катионы переходных металлов образуют устойчивые комплексы с ДНК, координируясь в местах, имеющих высокую плотность делокализованных электронов [1]. Значения их констант связывания с ДНК выше, чем у катионов щелочноземельных металлов, и, кроме того, уже при низких концентрациях (около  $10^{-5}$  М) катионы переходных металлов способны связываться с азотистыми основаниями, что приводит к изменениям конформации ДНК, вплоть до значительных перестроек ее структуры. При этом может происходить как стабилизация, так и дестабилизация двойной спирали ДНК. Катионы переходных металлов образуют с ДНК и с олигонуклеотидами различные варианты комплексов. Их структура зависит в первую очередь от типа катиона и молярного соотношения  $r$  – число связанных катионов/число фосфатных групп, на которое в существенной степени влияет концентрация катионов в растворе. Особенности нуклеотидной последовательности также могут повлиять на тип образующихся комплексов. Среди возможных вариантов свя-

зывания переходных металлов с ДНК можно выделить ассоциаты с кислородами фосфатных групп, хелатные комплексы с азотистыми основаниями и смешанные хелаты между фосфатами и гетероатомами азотистых оснований; возможно также интеркалирование катионов между плоскостями пар оснований с образованием комплексов типа «сэндвич» и встраивание катионов в комплементарные пары [1–4].

Исследования комплексов катионов с ДНК, выполненные различными методами (ИК- и УФ-спектроскопия, круговой дихроизм, ЯМР, седиментация, вискозиметрия, рентгеноструктурный анализ) показали, что катионы Ag(I) и Hg(II) образуют координационные связи только с атомами оснований, а катионы Cu(II) как с фосфатными группами, так и с атомами оснований.

В настоящей работе мы исследовали ультразвуковое расщепление ДНК, связанной с катионами Ag(I), Cu(II) и Hg(II). Расщепление фрагментов свободной ДНК под действием ультразвука на их растворы были исследованы

нами ранее [5–7]. Оказалось, что интенсивность расщепления конкретной межнуклеотидной связи зависит как от типа нуклеотидов, которые она связывает, так и от соседних нуклеотидов. Сопоставление полученных значений интенсивностей ультразвукового расщепления различных тетра- и пентануклеотидов с известными из литературы данными по конформационной динамике свободной ДНК дало нам основание предположить существование зависимости между интенсивностью  $N \leftrightarrow S$ -переходов цикла дезоксирибозы на 5'-конце центрального динуклеотида и относительной интенсивностью его расщепления [7,8]. Целью нашей работы является исследование характерных особенностей расщепления ДНК в комплексах с переходными металлами и возможность их интерпретации на основе полагаемой нами связи между локальной динамикой ДНК и характерными особенностями расщепления.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Меченые рестриктные фрагменты ДНК получали по методикам, опубликованным ранее [7]. Последовательности фрагментов и другие сопутствующие статье материалы приведены на сайте <http://groh.ru/imb>.

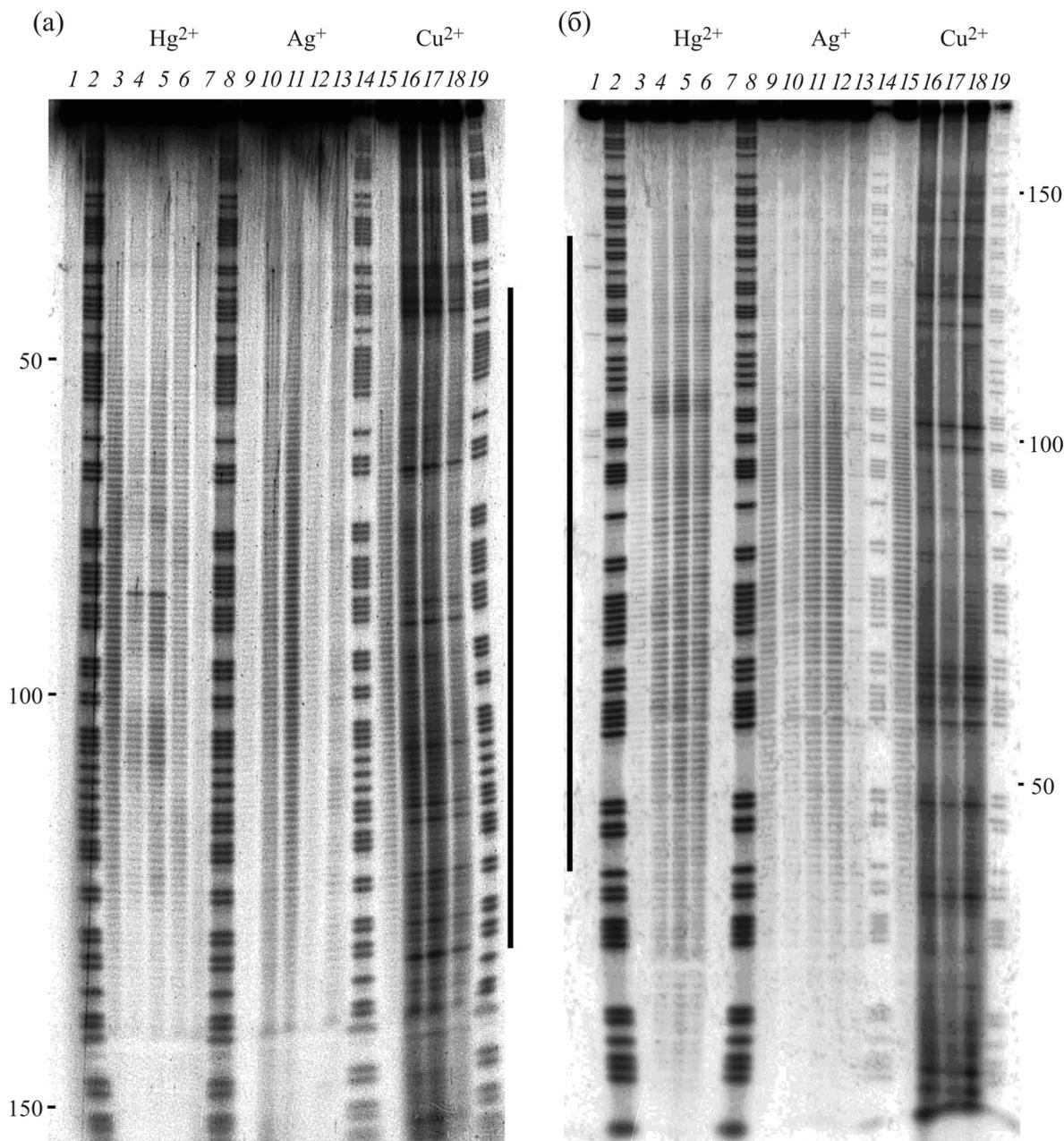
**Облучение фрагментов ДНК ультразвуком.** Для приготовления облучаемых ультразвуком образцов 10 мкл растворов фрагментов ДНК (примерно  $10^4$  Бк) в воде смешивали с 10 мкл растворов ацетатных солей металлов в 0,2 М NaOAc, pH 6,0 в тонкостенных полипропиленовых пробирках на 0,2 мл и выдерживали в темноте при  $+4^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. Конечная концентрация ДНК составляла около 20 мкМ пар оснований, или 40 мкМ фосфатных групп. (Концентрации катионов металлов в каждой группе опытов указаны в подписях к рисункам и таблицам). Облучение проводили с помощью ультразвукового диспергатора УЗДН-2Т (Украина). Использовали частоту 22 кГц при максимальной мощности. Продолжительность облучения образцов изменялась от 2 до 16 мин. Его проводили сериями по 2 мин. Пробирки с фрагментами ДНК помещали в тefлоновое кольцо, имеющее центральное отверстие 15 мм и радиальные отверстия для пробирок. Концы пробирок, в которых находились тестируемые растворы, располагали на расстоянии около 0,5 см ниже поверхности торца излучателя, диаметр которого составлял 12 мм. Кольцо закрепляли на дне бани со смесью воды и мелкокристаллического льда. Через каждые 2 мин кольцо переворачивали на  $180^\circ$ , и, если происходило сме-

щение капель растворов, пробирки подвергали короткому центрифугированию.

Разделение фрагментов в денатурирующем геле проводили в соответствии с методикой, описанной в работе [7]. После воздействия ультразвука на образцы двуспиральной ДНК, содержащей радиоактивную метку на конце одной из цепей, проводили их денатурацию, и реакционные смеси разделяли в геле. На каждой дорожке образовывались серии полос, которые соответствуют разрывам между нуклеотидами меченой цепи фрагмента. На рис. 1 приведены типичные электрофоретические профили расщепления ДНК ультразвуком, получаемые после сканирования флуоресцентного экрана, экспонированного на денатурирующем полиакриламидном геле после разделения фрагментов.

Для количественной обработки данных по расщеплению фрагментов ДНК ультразвуком необходимо получить численные значения интенсивностей всех полос на геле. Для этого мы использовали компьютерную программу SAFA [10]. Программа позволяет вычислять интенсивность каждой полосы на всех дорожках и соотносить их с заданной последовательностью нуклеотидов. Абсолютные величины интенсивностей полос на геле сильно варьируют в разных экспериментах, поэтому мы проводили нормализацию их значений. Изменение интенсивности полос на геле может охватывать как всю дорожку целиком (когда разные дорожки одного геля имеют различную общую интенсивность), но может происходить увеличение или уменьшение значений интенсивности полос и по длине дорожки. Для удаления такого рода трендов, возникающих как на стадиях обработки фрагментов ДНК, так и при последующем их разделении на геле, нами был использован «метод скользящего среднего» с разными размерами «окна» и введена величина относительной интенсивности расщепления  $i$ -й полосы,  $R_i$ . Варьирование величины «окна» показало, что оптимальной является величина «окна» в 31 нуклеотид. Всего было проанализировано 20 гелей для катиона Ag(I), 30 – для Hg(II) и 20 – для Cu(II).

**Статистический анализ интенсивностей расщепления динуклеотидов в ДНК, связанной с катионами Cu(II), Ag(I), Hg(II).** Нами были получены экспериментальные данные относительной интенсивности расщепления ультразвуком фосфодиэфирных связей после каждого из четырех нуклеотидов и в каждом из 16 динуклеотидов. Ультразвуковое расщепление регистрировали во фрагментах свободной ДНК и в тех же фрагментах ее комплексов с одним из катионов: Ag(I) при концентрациях 0,25; 0,50; 1,00



**Рис. 1.** Профили расщепления фрагмента ДНК длиной 166 п.о. из плазмиды pBR-322 (нуклеотиды 3159–3325) в 6%-м денатурирующем полиакриламидном геле. (а) – Радиоактивная метка находилась в 3'-конце верхней цепи, (б) – на нижней. Дорожки 1, 7, 13 – комплексы меченых фрагментов с 1,0 мМ катионов металлов без облучения ультразвуком; 2, 8, 14, 19 – обработка муравьиной кислотой в присутствии дифениламина [10]; 3, 9, 15 – после облучения фрагментов ультразвуком в течение 12 мин в отсутствие катионов в растворах; 4–6, 10–12, 16–18 – после облучение фрагментов ультразвуком в течение 12 мин в растворах катионов в концентрациях 1,0; 0,5 и 0,25 мМ соответственно.

мМ; Cu(II) при концентрациях 0,125; 0,25; 0,50; 1,00 мМ); Hg(II) при концентрациях 0,25; 0,50; 1,00 мМ. Таблицы основных выборочных характеристик этих экспериментальных данных приведены на сайте <http://groh.ru/imb>.

Для исследования влияния фактора концентрации каждого из катионов, Ag(I), Cu(II),

Hg(II), на интенсивность расщепления ДНК в комплексах с катионами мы применяли однофакторный дисперсионный анализ и непараметрические критерии (Kruskal–Wallis test, Brown–Mood test, Friedman test) [11,12]. В качестве зависимой переменной рассматривали R-величину относительной интенсивности расще-

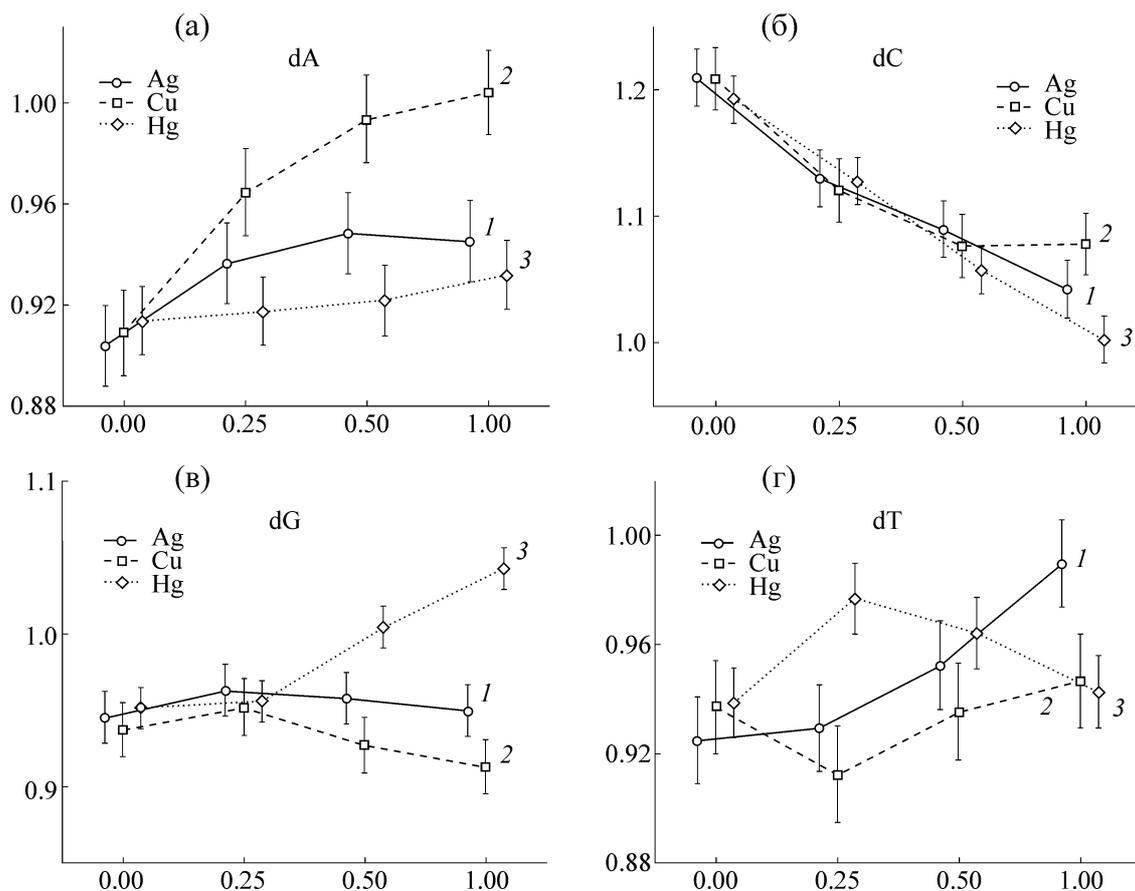


Рис. 2. Зависимости относительной интенсивности ультразвукового расщепления  $\bar{R}$  после каждого из нуклеотидов от концентрации катионов Ag(I) (1), Cu(II) (2), Hg(II) (3).

пления, фрагментов свободной ДНК и их комплексов при указанных выше концентрациях катионов. На рис. 2 приведены графики зависимости относительной интенсивности расщепления межнуклеотидных связей после каждого из четырех нуклеотидов от концентрации катионов Ag(I), Cu(II), Hg(II), а на рис. 3 – в каждом из 16 динуклеотидов.

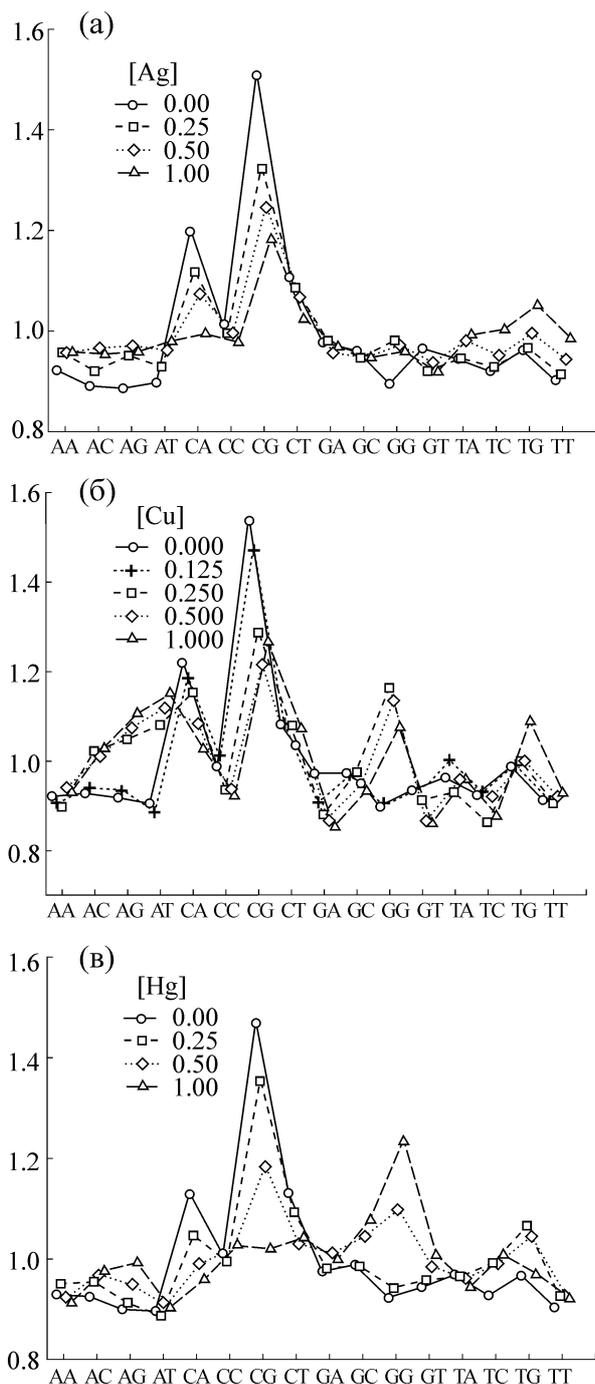
Если влияние концентрации катиона оказалось статистически значимым на уровне значимости  $\alpha = 0,05$ , для определения максимальных и минимальных значений средних относительной интенсивности расщепления,  $\bar{R}$ , мы использовали параметрический метод (Unequal N HSD) и непараметрические (Kruskal–Wallis test, Dunn test) методы множественного сравнения [11,12]. В табл. 1 и 2 приведены результаты анализа расщепления комплексов ДНК с теми катионами, для которых удалось выделить максимальное (минимальное) среднее значение относительных интенсивностей расщепления. Оказалось, что средние значения интенсивностей расщепления межнуклеотидных связей после каждого из четырех нуклеотидов во фрагментах

свободной ДНК и в тех же фрагментах ее комплексов с катионом Cu(II) при концентрации 0,125 мМ отличаются незначимо.

Мы исследовали влияние на относительную интенсивность расщепления двух факторов: типа катиона (с уровнями Ag(I), Cu(II), Hg(II)) и концентрации (0; 0,25; 0,50; 1,0 мМ для каждого из катионов). На расщепление динуклеотидов dApdA и dTpdA тип катиона и его концентрация влияют статистически незначимо. В табл. 3 приведены результаты множественного сравнения средних значений относительных интенсивностей расщепления для тех динуклеотидов, для которых удалось выделить максимальное (минимальное) значения. Результаты, полученные с помощью параметрических методов анализа, подтверждаются и непараметрическими методами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы показали [5,6], что воздействие ультразвука на растворы ДНК вызывает расщепление фосфодиэфирных связей (образуются фрагменты с 5'-концевой фосфатной группой),



**Рис. 3.** Зависимости относительной интенсивности ультразвукового расщепления  $\bar{R}$  в динуклеотидах от концентрации катионов Ag(I) (а), Cu(II) (б), Hg(II) (в).

а интенсивность их расщепления зависит от нуклеотидного окружения. Мы получили средние значения относительных интенсивностей расщепления в каждом из 16 динуклеотидов и центральной межнуклеотидной связи в каждом из 256 тетра-нуклеотидов [7] и представили ха-

рактерную картину зависимости ультразвукового расщепления от последовательности нуклеотидов в свободной ДНК с пиком расщепления, отвечающем динуклеотиду dCpdG. Мы обнаружили также, что относительные интенсивности ультразвукового расщепления каждого из 16 динуклеотидов в ДНК изменяются симбатно интенсивностям динамики N $\leftrightarrow$ S-переходов дезоксирибозы в нуклеотиде на 5'-конце [7,8]. Интенсивность таких переходов заметно повышена в дезоксицитидине, что может быть связано с наличием минимума его потенциальной энергии псевдповращения в N-области [13] и отличает дезоксицитидин от трех других нуклеозидов ДНК. По данным исследования додекамера d(CGCGAATTCGCG) с помощью  $C^{13}$  ЯМР-спектроскопии [14], конформационная подвижность в динуклеотидах dCpdG существенно выше, чем в остальных динуклеотидах этой последовательности. Мы предполагаем, что интенсивность динамики N $\leftrightarrow$ S-переходов цикла дезоксирибозы на 5'-конце динуклеотида является тем специфическим фактором, который определяет влияние последовательности на ультразвуковое расщепление ДНК. Действительно, соотношения интенсивностей интерконверсии цикла дезоксирибозы на 5'-конце центральных динуклеотидов в составе тетра-нуклеотидных фрагментов, качественную оценку которых можно получить на основании данных ЯМР [15], хорошо согласуются с полученными нами соотношениями интенсивностей ультразвукового расщепления этих динуклеотидов в свободной ДНК [7,8].

После связывания ДНК с катионами переходных металлов происходят конформационные перестройки в структуре двойной спирали, о характере которых можно судить по известным из литературы данным о местах координации катионов. Эти перестройки не могут не сказаться на локальной конформационной динамике в некоторой окрестности от места связывания.

В картинах расщепления ДНК, в комплексе с любым из трех катионов, мы обнаруживаем практически одинаковое, резкое уменьшение пика интенсивности расщепления после дезоксицитидина (рис. 2б), который был характерен для свободной ДНК. Наиболее заметно оно в динуклеотидах dCpdG и dCpdA (рис. 3). Изменения расщепления после остальных трех нуклеозидов различны для каждого из катионов и зависят от его концентрации в растворе, при которой происходит связывание с ДНК.

**Расщепление ДНК, связанной с катионом Ag(I).** Оптические методы и ЯМР показывают,

**Таблица 1.** Влияние концентрации катионов Ag(I), Cu(II), Hg(II) на относительную интенсивность ультразвукового расщепления  $\bar{R}$  после каждого из четырех нуклеозидов ( $\alpha = 0,05$ )

	Ag(I)	Cu(II)	Hg(II)
dA-dN	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ min при 0 мМ	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ min при 0 мМ	$p > \alpha$
dC-dN	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ min при 1,0 мМ max $\bar{R}$ при 0 мМ	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ max $\bar{R}$ при 0 мМ	$p \ll \alpha$ min при 1,0 мМ max при 0 мМ
dG-dN	$p > \alpha$	$p > \alpha$	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ max $\bar{R}$ при 1,0 мМ
dT-dN	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ max $\bar{R}$ при 1,0 мМ	$p > \alpha$	$p \ll \alpha$

**Таблица 2.** Влияние концентрации катионов Ag(I), Cu(II), Hg(II) на относительную интенсивность ультразвукового расщепления  $\bar{R}$  в каждом динуклеотиде ( $\alpha = 0,05$ )

	Ag(I)	Cu(II)	Hg(II)
dApdA	$p > \alpha$	$p > \alpha$	$p > \alpha$
dApdC	$p < \alpha$	$p > \alpha$	$p > \alpha$
dApdG	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ min при 0 мМ	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ min при 0 мМ	$p \ll \alpha$
dApdT	$p \ll \alpha$	$\frac{p}{\bar{R}} < \alpha$ min при 0 мМ	$p \ll \alpha$
dCpdA	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ min при 1,0 мМ max $\bar{R}$ при 0 мМ	$p < \alpha$	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ max $\bar{R}$ при 0 мМ;
dCpdC	$p > \alpha$	$p > \alpha$	$p > \alpha$
dCpdG	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ max $\bar{R}$ при 0 мМ;	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ max $\bar{R}$ при 0 мМ;	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ min при 1,0 мМ max $\bar{R}$ при 0 мМ
dCpdT	$p < \alpha$	$p > \alpha$	$p < \alpha$
dGpdA	$p > \alpha$	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ max $\bar{R}$ при 0 мМ	$p > \alpha$
dGpdC	$p > \alpha$	$p > \alpha$	$p < \alpha$
dGpdG	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ min при 0 мМ	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ min при 0 мМ	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ max $\bar{R}$ при 1,0 мМ
dGpdT	$p > \alpha$	$p < \alpha$	$p < \alpha$
dTpdA	$p > \alpha$	$p > \alpha$	$p > \alpha$
dTpdC	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ max $\bar{R}$ при 1,0 мМ	$p > \alpha$	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ min при 0 мМ
dTpdG	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ max $\bar{R}$ при 1,0 мМ	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ max $\bar{R}$ при 1,0 мМ	$p \ll \alpha$
dTpdT	$\frac{p}{\bar{R}} \ll \alpha$ max $\bar{R}$ при 1,0 мМ	$p > \alpha$	$p > \alpha$

что тип координации катиона Ag(I) на ДНК существенно зависит от его концентрации в растворе [16–20]. ИК-спектроскопия регистрирует связывание Ag(I) с N7 гуанина, когда один катион Ag(I) приходится на 80 фосфатных групп

( $r = 1/80$ ; т.е. один катион на 40 нуклеотидных пар), а при увеличении до 0,1 (один катион на пять нуклеотидных пар) регистрируется связывание катиона Ag(I) и с N7 аденина. В работе [20] с помощью капиллярного электрофореза

**Таблица 3.** Влияние концентрации и типа катионов на относительную интенсивность расщепления  $\bar{K}$  после каждого из четырех нуклеозидов в ДНК, а также в динуклеотидах

	max $\bar{K}$	min $\bar{K}$
Для нуклеотидов		
dA	Cu(II) при 0,5; 1,0 мМ	Hg(II) при 1,0 мМ
dC	Hg(II), Cu(II), Ag(I) при 0,0 мМ	
dG	Hg(II) при 1,0 мМ	
Для динуклеотидов		
dApdT	Cu(II) при 0,25; 0,5; 1,0 мМ	Cu(II) при 1,0; 0,5; 0,25 мМ
dCpdG	Hg(II), Ag(I), Cu(II) при 0,0 мМ	
dGpdA		
dGpdG	Hg(II) при 1,0 мМ	

Примечание. Названия катионов и значения концентраций указаны в порядке возрастания значений средних интенсивностей расщепления.

получены константы связывания Ag(I) с N7 гуанина –  $K_{1G} = 8,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ , и с N7 аденина –  $K_{1A} = 1,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Катион Ag(I) при такой координации – ее принято называть I-м типом связывания – находится в широкой бороздке ДНК. Результатом координации катиона вблизи комплементарных пар по широкой бороздке является ослабление их водородных связей, изменение геометрии пар и повышение вероятности раскрытия [21]. Строгая регулярность двойной спирали ДНК в этом случае может нарушаться. В результате могут ослабляться конформационные ограничения, вследствие которых, как мы полагаем, интенсивность динамики N $\leftrightarrow$ S-переходов в дезоксицитидине В-формы ДНК (регистрируемая с помощью ЯМР [14]) была повышена. Снижение интенсивности ультразвукового расщепления после дезоксицитидина, происходящее с увеличением концентрации Ag(I), свидетельствует о постепенном заполнении мест координации по N7 гуанина (рис. 2б). Одновременно мы наблюдаем значительно менее выраженное увеличение интенсивности расщепления после дезоксиаденозина и дезокситимидина (рис. 2а,г). Возможной причиной этого является усиление псевдоварщания в 5'-концевой дезоксирибозе динуклеотидов dA-dN и dT-dN. При значениях  $r > 0,2$  связывание Ag(I) по узкому желобу регистрируется оптическими методами. Катион встраивается в АТ-пары, замещая имино-протоны по N3 тимина, а при увеличении концентрации и по N1 гуанина, образуя комплексы II-го типа [16–20]. Константа связывания катиона Ag(I) в комплексы II-го типа зависит от рН раствора, поскольку сопровождается вытеснением протона. Связывание наблюдается и в слабых растворах [22], при этом подвижность катиона Ag(I) в узком желобе ДНК очень низка.

По нашим данным (рис. 2), начиная с концентрации Ag(I), равной 0,25 мМ, интенсивность расщепления после дезоксицитидина уменьшается, после дезоксигуанозина практически не меняется, после дезокситимидина и дезоксиаденозина увеличивается. Этот факт может свидетельствовать о том, что координацию по N7 гуанина и N7 аденина, а также встраивание Ag(I) в узкий желоб с замещением иминопротонов N3 тимина мы наблюдаем уже при концентрации Ag(I) 0,25 мМ. Все три процесса идут одновременно, но степень их влияния на интенсивность ультразвукового расщепления различна. Заполнение мест координации Ag(I) по N7 гуанина приводит к их насыщению, о чем и свидетельствует уменьшение влияния роста концентрации катионов на интенсивность расщепления после дезоксицитидина. Встраивание Ag(I) в узкий желоб с замещением иминопротонов N3 тимина мы наблюдаем также уже при концентрации Ag(I) 0,25 мМ – о нем свидетельствует увеличение интенсивности расщепления после дезокситимидина и дезоксиаденозина. Однако в то время как интенсивность расщепления после дезокситимидина продолжает повышаться с ростом концентрации Ag(I), после дезоксиаденозина она остается на прежнем уровне. Возможно, что это происходит вследствие несимметричности расположения Ag(I) в узком желобе АТ-пары – катион находится ближе к дезоксирибозе при тимине, а также благодаря конкуренции двух процессов – встраивания Ag(I) в АТ-пары и координации по широкому желобу на N7 аденина. Их влияние на изменение структуры противоположно – первый увеличивает стерические напряжения в динуклеотидах типа AN (N = A, C, G, T), что может увеличивать интенсивность расщепления после дезоксиаденозина, а второй, напротив,

ослабляя водородное связывание в АТ-парах, уменьшает его.

**Расщепление ДНК, связанной с катионом Cu(II).** Катионы Cu(II) в низкой концентрации связываются только с фосфатными группами ДНК [23,24]. Они нейтрализуют заряды на фосфатных группах, что способствует некоторому увеличению угла спирального вращения и стабилизации двойной спирали [1,2]. Небольшое увеличение концентрации может вызывать внутрицепочечное хелатирование катиона Cu(II) двумя гуаниновыми основаниями при наличии в последовательности двух следующих подряд GC-пар с образованием структуры типа «сэндвич». Водородные связи GC-пар при этом сохраняются, а конформация сахарофосфатов существенно изменяется. По данным исследований методами колебательной спектроскопии [24], такое связывание начинается при невысоких концентрациях Cu(II) и локально стабилизирует двойную спираль. Увеличение концентрации катионов приводит к образованию хелатов с участием фосфатных групп и атомов N7 гуанина, или хелатов, координированных только на гуанинах в широкой бороздке ДНК (в координации участвуют N7 гуанина и O6 гуанина). Оба типа хелатирования значительно уменьшают стабильность GC-пар, пары начинают раскрываться, и доступным для связывания Cu(II) становятся N3 цитозина. Происходит локальное расхождение цепей двойной спирали, но в участках, богатых АТ-парами, а также в возможных для dGpdG «сэндвичеобразных» структурах, цепи не расходятся и двойная спираль сохраняется. Хелатные комплексы между N7 аденина и фосфатными группами могут образовываться только при существенно более высоких концентрациях катиона Cu(II) (по данным [24] от  $r = 0,7$ ). Исследования связывания Cu(II) с dADP с помощью ЯМР-спектроскопии показало, что катион может образовывать хелатный комплекс, координируясь между N7 аденина и депротонированной аминогруппой N6 аденина [25]. Некоторые авторы предполагают, что возможен вариант межцепочечной координации катиона Cu(II) по узкой бороздке, когда катион встраивается в комплементарные пары за счет хелатных связей N1 пурина–Cu(II)–N3 пиримидина [2].

Средние значения интенсивности расщепления межнуклеотидных связей после каждого из четырех нуклеотидов в ДНК, связанной с катионами Cu(II) при их концентрации в растворе 0,125 мМ, практически идентичны полученным при расщепления свободной ДНК (рис. 3а). Следовательно, конформационно-динамические особенности свободной ДНК в таких комплек-

сах сохраняются. Это возможно, если катионы не связаны с азотистыми основаниями, что согласуется и с данными спектроскопических работ, полученными при низких степенях заполнения молекулы ДНК катионами Cu(II) ( $r < 0,3$ ). В интервале концентраций от 0,25 до 0,5 мМ Cu(II) в растворе ультразвуковое расщепление после дезоксицитидина резко падает (в динуклеотидах dCpdG, dCpdA и dCpdC, но не в dCpdT). Одновременно в динуклеотиде dGpdG происходит увеличение интенсивности расщепления. Также заметно увеличение интенсивности расщепления и после дезоксиаденозина (в dApdC, dApdG и dApdT) (рис. 3а). Согласно спектральным данным интеркаляция катиона Cu(II) между гуаниновыми основаниями в dGpdG происходит только при невысоких концентрациях Cu(II). Для нашего сравнения с данными спектроскопических экспериментов очень важным является тот факт, что расщепление этого динуклеотида оказывается наибольшим при концентрации 0,25 мМ и с ростом концентрации катиона снижается (рис. 3а). Образование структуры типа «сэндвич» в динуклеотидах dGpdG, согласно нашим рассуждениям о влиянии стерических ограничений на конформационную динамику дезоксирибозы, может повысить уровень интенсивности N↔S-переходов дезоксирибозы на 5'-конце динуклеотида dGpdG в том случае, если предпочтительная для дезоксигуанозина C2'-эндоконформация дезоксирибозы в присутствии катиона окажется невыгодной. Если это предположение верно, то увеличение расщепления dGpdG при концентрации Cu(II) 0,25 мМ, действительно, отражает хелатирование катиона. В интервале концентраций 0,25–0,5 мМ возможны и другие типы координации Cu(II) – это внутрицепочечные хелаты между N7 гуанина и 5'-фосфатной группой того же нуклеотида, а также хелаты между N7 гуанина и O6 гуанина (без взаимодействия с фосфатными группами). В обоих случаях катион располагается в широкой бороздке и дестабилизирует водородные связи GC-пар [21]. Характер колебательных спектров кругового дихроизма указывает на раскрытие GC-пар [24]. В этом случае, по аналогии со сказанным при обсуждении координации катиона Ag(I) по широкой бороздке ДНК, интенсивность динамики в дезоксицитидине на 5'-конце может снижаться. При этом мы наблюдаем снижение интенсивности ультразвукового расщепления (рис. 2б). Увеличение интенсивности ультразвукового расщепления в dApdC, dApdG и особенно в dApdT можно было бы объяснить хелатированием катионов Cu(II) внутри АТ-пар по узкой бороздке. Как мы уже упоминали выше, такая

схема хелатирования Cu(II) пурип-пиримидиновыми парами была предложена ранее [2]. В отличие от комплексов ДНК с Cu(II), межпочечные комплексы ДНК с Ag(I), хелатируемые АТ-парами по узкой бороздке, хорошо изучены. Они стабилизируют двойную спираль, и в 5'-концевом аденозине динуклеотидов dApdN (N = C, G, T) могут создавать стерические ограничения, в результате которых может повышаться уровень интенсивности интерконверсии дезоксирибозы. Мы не знаем данных спектральных методов, которые бы подтверждали или отвергали существование такой координации катиона Cu(II). Однако заметное увеличение интенсивности расщепления после аденина, которое мы регистрируем в интервале умеренных концентраций Cu(II) в данной работе, позволяет предположить, что мы имеем дело именно с таким комплексом. Важной особенностью картин ультразвукового расщепления ДНК, связанной с катионом Cu(II), которая отличает ее от катионов Ag(I) и Hg(II), является отсутствие зависимости интенсивности полос на геле от расстояния до концов фрагмента. Это может быть связано со свойством катиона Cu(II) участвовать в катализе гидролиза фосфодиэфирных связей [4]. Возможно также окисление C1' и C5' атомов дезоксирибозы, если катионы Cu(II) иммобилизованы в узком желобе [26]. Поэтому полосы расщепления фрагментов, которые мы регистрируем на геле, возникают не только вследствие ультразвуковых разрывов, но и как результат образования свободных радикалов в окрестности катиона Cu(II). Возможно, поэтому некоторые детали картины расщепления ДНК, связанной с катионом Cu(II), не могут быть интерпретированы в рамках конформационно-динамических представлений. К ним, например, относится отсутствие уменьшения интенсивности расщепления в динуклеотиде dCpdT и отсутствие увеличения интенсивности расщепления в динуклеотиде dApdA, а также ряд других менее заметных особенностей.

**Расщепление ДНК, связанной с катионом Hg(II).** Двойная спираль ДНК имеет чрезвычайно высокое сродство к катиону Hg(II), который способен образовывать координационные связи с атомами азота пуринов и пиримидинов. При низких ионных силах катион Hg(II) может связываться с C5 цитозина ковалентно, и такие производные очень устойчивы – однажды образовавшись, они практически не диссоциируют в растворе [27]. Сродство Hg(II) к нуклеотидам в составе ДНК при образовании координационных соединений убывает в ряду  $dT > dG \gg dA \sim dC$  [28]. При высоких

значениях pH Hg(II) координируется в первую очередь с N3 тимина, а в ДНК при физиологических значениях pH этот процесс затруднен термодинамически и кинетически [29]. В двойной спирали ДНК вероятным местом его координации является N7 гуанина, главным образом благодаря его стерической доступности, поскольку в свободном гуанозине сродство к N7 гуанина у Hg(II) вдвое ниже, чем к N1 гуанина при pH 7 [28]. Спектры КД указывают на возможность В–Z-перехода, индуцированного катионами Hg(II), в тех участках последовательности, где имеется чередование пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов [27].

Процесс титрования олигонуклеотида  $[d(CGCGAATTCGCG)]_2$  Hg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> при нейтральных pH в водном растворе, регистрируемый с помощью <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопии, указывает на возникновение в процессе титрования нового конформера этого додекамера. Поскольку на промежуточных стадиях титрования <sup>1</sup>H-сигналы от нового конформера сосуществуют с сигналами в иминообласти от N3H тимина, а к концу титрования последние исчезают, авторы предполагают, что Hg(II) взаимодействует с АТ-парами, вытесняя иминопротоны. Возможно, что в результате титрования происходит переход дуплекс-шпилька, который идет через образование промежуточной структуры с деформированными центральными АТ-парами [30].

Ультразвуковое расщепление ДНК, связанной с Hg(II), указывает на заметные изменения конформационно-динамических характеристик ДНК уже при концентрации катионов 0,25 мМ (подавление расщепления после dC, рис. 2б). Однако в отличие от связывания с катионами Cu(II) и Ag(I), которое подавляло расщепление после дезоксицитидина, но не вызывало увеличения интенсивности расщепления после дезоксигуанозина, связывание с катионом Hg(II) увеличивает интенсивность расщепления после дезоксинуанозина. Одновременно происходит резкое увеличение интенсивности расщепления после дезоксиаденозина и дезокситимидина. Таким образом, данные ЯМР, указывающие на АТ-пары, как преимущественные центры координации катиона Hg(II), не противоречат и нашим данным. Однако увеличение интенсивности расщепления после дезоксигуанозина с увеличением концентрации Hg(II) и одновременное уменьшение интенсивности расщепления после дезоксицитидина указывает на возможность сложной деформации двойной спирали, при которой возможны инверсии направления цепей и образование шпильчатых структур. Высокая вероятность такого рода перестроек может определяться большим сродством

катиона Hg(II) к N3 тимины. Вследствие этого дезокситимидины могут взаимодействовать между собой через посредство катиона Hg(II). Образование дуплексов олигонуклеотидов, в которых ТТ-пары образуются посредством координации катиона Hg(II), показано в работах [31,32]. В том случае, если расположение дезокситимидинов в нуклеотидной последовательности допускает их сближение без стерических напряжений, возможно образование шпильчатых структур олигонуклеотидов с участием ТТ-пар [33]. Разнонаправленность изменений ультразвукового расщепления после дезоксицитидина и дезоксигуанидина, которое мы наблюдаем только в комплексах ДНК с катионом Hg(II), может свидетельствовать о сложных перестройках пространственной структуры.

### ВЫВОДЫ

Мы провели исследование ультразвукового расщепления фрагментов ДНК, связанных с катионами переходных металлов Ag(I), Cu(II), Hg(II), при разных концентрациях катионов в растворах при pH 6,0. В результате комплексобразования ДНК с каждым из них происходит значительное понижение пика интенсивности ультразвукового расщепления после дезоксицитидина. Именно этот пик является характерной особенностью ультразвукового расщепления свободной ДНК. На расщепление после трех других нуклеозидов влияет тип катиона и его концентрация в растворе при связывании с ДНК. Мы сопоставили также изменения интенсивности ультразвукового расщепления с данными, полученными другими экспериментальными методами. Основной вывод нашей работы – ультразвуковое расщепление дает информацию о характере конформационно-динамических изменений в ДНК, которые происходят после ее связывания с катионами.

Уменьшение интенсивности расщепления наблюдается в тех случаях, когда катионы связываются по широкой бороздке ДНК. В связывании участвуют атомы N7 гуанина или N7 аденина. При этом происходит ослабление водородных связей в комплементарных парах, повышается вероятность их раскрытия и нарушается регулярность расположения. Интенсивность интерконверсии цикла дезоксирибозы в 5'-концевом нуклеозиде соответствующей комплементарной пары при этом может снижаться, поскольку появляется возможность релаксации конформационных напряжений. Особенно заметны проявления такого изменения в динуклеотидах с 5'-концевым дезоксицитидином, от-

личавшимся наиболее высоким уровнем ультразвукового расщепления в свободной ДНК.

Увеличение интенсивности расщепления происходит в результате встраивания катиона в комплементарные пары оснований или в результате интеркаляции катиона. В этом случае весьма вероятным является возникновение конформационных напряжений в нуклеозидах, которое может вызвать увеличение интенсивности интерконверсии цикла дезоксирибозы. Катион Cu(II) единственный из трех оказывает влияние на расщепление не только вследствие конформационно-динамических изменений в ДНК, но и посредством образования свободных радикалов в его окрестности.

Мы выражаем благодарность Г.В. Гурскому и В.И. Саянову за полезные дискуссии в процессе работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН по молекулярной и клеточной биологии, а также Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 11-04-02001а и 12-04-01584а).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ю. П. Благоев, В. Л. Галкин, Г. О. Гладченко и др., *Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах* (Наук. думка, Киев, 1991).
2. J. Sissoeff, J. Grisvald, and E. Guile, *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **31** (2), 165 (1976).
3. L. G. Marzilli, in *Progress in Inorganic Chemistry*, (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2007), **23**.
4. E. Sletten and N. A. Froystein, in *Metal Complex-DNA Interaction*, Ed. Nick Hadjilias & Einar Sletten (2009).
5. С. Л. Гроховский, *Молекуляр. биология* **40** (2), 317 (2006).
6. С. Л. Гроховский, И. А. Ильичева, Д. Ю. Нечипуренко и др., *Биофизика* **53** (3), 417 (2008).
7. S. L. Grokhovsky, I. A. Il'icheva, D. Yu. Nechipurenko, et al., *Biophys. J.* **100** (1), 117 (2011).
8. S. Grokhovsky, I. Il'icheva, D. Nechipurenko, et al., in *Gel Electrophoresis / Book 1*, ISBN 979-953-307-474-9 (2012).
9. R. Das, A. Laederach, S. M. Pearlman, et al., *RNA* **11** (3), 344 (2005).
10. W. P. Tate and G. B. Petersen, *Biochem. J.* **147** (3), 439 (1975).
11. В. Д. Мятлев, Л. А. Панченко, Г. Ю. Ризниченко и др., *Теория вероятностей и математическая статистика. Математические модели.* (Академия, М., 2009).
12. J. H. Zar, *Biostatistical Analysis*, 5th ed. (Pearson Prentice-Hall, Upper Saddle River, N. J., 2010)
13. N. Foloppe and A. D. MacKerell, Jr., *J. Phys. Chem.* **103** (49), 10955 (1999).

14. E. Duchardt, L. Nilsson, and J. Schleucher, *Nucl. Acids Res.* **36** (12), 4211 (2008).
15. R. J. Isaacs and H. P. Spielmann, *J. Mol. Biol.* **311** (1), 149 (2001).
16. R. H. Jensen and N. Davidson, *Biopolymers* **4** (1), 17 (1966).
17. R. E. Izatt, J. J. Christensen, and J. H. Rytting, *Chem. Rev.* **71**, 439 (1971).
18. K. F. S. Luk, A. H. Maki, and R. J. Hoover *J. Am. Chem. Soc.* **97** (5), 1241 (1975).
19. D. E. DiRico, Jr., P. B. Keller, and K. A. Hartman, *Nucl. Acids Res.* **13** (1), 251 (1985).
20. H. Arakawa, J. F. Neault, and H. A. Tajmir-Riahi, *Biophys. J.* **81** (3), 1580 (2001).
21. J. V. Burda, J. Spöner, and J. Leszczynski, et al., *J. Phys. Chem. B* **101** (46), 9670 (1997).
22. Th. Prusik and N. E. Geacintov, *FEBS Lett.* **71** (3), 236 (1976).
23. Ch. Zimmer, G. Luck, H. Fritzsche, et al., *Biopolymers* **10** (3), 441 (1971).
24. V. Andrushchenko, J. H. Van De Sande, and H. Wieser, *Biopolymers* **72** (5), 374 (2003).
25. G. V. Fazakerley and D. G. Reid, *Eur. J. Biochem.* **93** (3), 535 (1979).
26. С. Л. Гроховский, В. А. Николаев, В. Е. Зубарев, и др., *Молекуляр. биология* **26** (6), 1274 (1992).
27. R. M. K. Dale, E. Martin, D. C. Livingston, et al., *Biochemistry* **14** (11), 2447 (1975).
28. D. W. Gruenwedel and M. K. Cruikshank, *Biochemistry* **29** (8), 2110 (1990).
29. J. M. Thomas, R. Ting, and D. M. Perrin, *Org. Biomol. Chem.* **2** (3), 307 (2004).
30. N. A. Froystein and E. Sletten, *J. Am. Chem. Soc.* **116** (8), 3240 (1994).
31. Y. Tanaka, S. Oda, H. Yamaguchi, et al., *Nucl. Acids Symposium Series*, № 50, 47 (2006).
32. T. Uchiyama, T. Miura, H. Takeuchi, et al., *Nucl. Acids Res.* **40** (12), 5766 (2012).
33. Z. Kuklenyik and L. G. Marzilli, *Inorg. Chem.* **35** (19), 5654 (1996).

## Ultrasonic Cleavage of DNA in Complexes with Ag(I), Cu(II), Hg(II)

S.L. Grokhovsky\*, I.A. P'icheva\*, L.A. Panchenko\*\*\*, M.V. Golovkin\*,  
D.Yu. Nechipurenko\*\*, R.V. Polozov\*\*\*\*, and Yu.D. Nechipurenko\* \*\*

\* *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia*

\*\* *Department of Physics, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

\*\*\* *Department of Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

\*\*\*\* *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia*

We investigated a phenomenon of ultrasonic cleavage of DNA complexed with transition metal cations Ag(I), Cu(II) and Hg(II). We found the statistically significant dependence of relative intensity of cleavage on cation type and concentration. Each cation may cause two different types of distortion in the DNA double-helix depending on whether it binds to major or minor DNA groove. The intensity of ultrasonic cleavage decreases if cation binds to the major DNA groove; the intensity of cleavage increases if cation binds to the minor DNA groove and disturbs the hydrogen bonds of complementary base pairs or it intercalates between bases. Both types of DNA distortion can affect the intensity of N-S interconversion of deoxyribose.

*Keywords: DNA, transition metal-DNA complexes, ultrasonic cleavage of DNA, pseudorotation in  $\beta$ -D-deoxyribose*