

Zbigniew PRASAŁ, Tomasz BORKOWSKI,
Piotr PALUSZKIEWICZ

Oddziaływanie jonów manganu (II) z DNA *in vitro*

Взаимодействие ионов марганца (II) из ДНА *in vitro*Interaction of Manganese (II) Ions with DNA *in vitro*

Mangan jest jednym z pierwiastków śladowych występujących w organizmie człowieka, gdzie jego całkowita ilość wynosi 12—20 mg. Magazynowany jest głównie w wątrobie i nerkach, a wewnątrz komórki najbogatsze w mangan są mitochondria. W surowicy krwi łączy się wybiórczo z β -globuliną, a jego stężenie wynosi 40—200 $\mu\text{g/l}$. Mangan pełni swą funkcję fizjologiczną jako aktywator enzymów: dehydrogenazy izocytrynianowej, arginazy, fosfotransferaz oraz glikozylotransferaz, biorących udział w syntezie glikoproteidów i mukopolisacharydów chrząstek. Niektóre enzymy są ściśle związane z jonami Mn(II) , np. dysmutaza nadtlenkowa (7). Wykazano także rolę manganu w niektórych procesach patologicznych, między innymi w karcynogenezie (1). Stwierdzono wpływ jonów Mn(II) na procesy reprodukcyjne (8) na różnych etapach biosyntezy kwasów nukleinowych oraz w interakcji z DNA (6). W badaniu interakcji Mn(II) z DNA pozostały niezupełnie wyjaśnione następujące zagadnienia:

a) interkalacja międzyłańcuchowa jonów $Mn(II)$ z zasadami DNA na podobieństwo na przykład jonów $Cu(II)$ (13);

b) tworzenie kompleksów zasada—mangan—fosfor lub zasada—mangan (16);

c) stechiometria wiązania Mn(II)—fosforan DNA (19) (ze wzoru formalnego reszty fosforanowej wynikałoby, że jeden jon Mn(II) winien asocjować z dwiema resztami fosforanowymi DNA).

Celem niniejszej pracy jest wyjaśnienie tych zagadnień.

MATERIAŁ I METODY

Materiał. Kompleksowanie jonów $Mn(II)$ przeprowadzano na DNA z grasiicy cielęcej (Sigma Chemical Co., St. Louis) o zawartości G+C ok. 40% na drodze równowagowej dializy z użyciem worków wiskozowych (Visking Co., Chicago), uprzednio przygotowanych metodą Fu i wsp. (5). Worki przechowywano w wodzie redestylowanej z dodatkiem tymolu jako środka przeciwbakteryjnego. Roztwory $NaClO_4$ były oczyszczane od śladów metali ciężkich na żywicy wymiennej w formie kationowej Chelex-100 (Bio-Rad Laboratories, Los Angeles). Roztwory $NaClO_4$ służyły do sporządzenia standardowego roztworu DNA (4,3 mg DNA/10 ml). Źródło jonów manganu stanowił $Mn(NO_3)_2$ cz.d.a. Iloraz A_{280}/A_{280} równy 1,85 wskazywał, że DNA był pozbawiony zanieczyszczeń białkowych. Oddziaływanie DNA z jonami manganu (II) przeprowadzono z DNA natywnym i termicznie zdenaturowanym. Termicznie zdenaturowany DNA otrzymywano przez ogrzewanie we wrzącej łaźni wodnej standardowego roztworu DNA natywnego w 0,001 M $NaClO_4$. Doprowadzenie roztworu do żądanej siły jonowej dokonywano dodawaniem obliczonej ilości $NaClO_4$.

Równowagowa dializa. Nie buforowane roztwory DNA dializowano w ciemni chłodzonej podczas łagodnego mieszania względem wzrastających stężeń azotanu manganu (od 1,9 μM do 1,5 μM), w funkcji zmiennej siły jonowej (0,01—0,1 M $NaClO_4$), przy pH ok. 6, temp. 4°C i czasie 70 godz.

Oznaczanie $Mn(II)$ i DNA. Po zrównoważeniu próbek w każdej serii pobierano do analizy na mangan takie same objętości roztworów z zewnątrz i wewnątrz worków dializacyjnych. Mineralizacja próbek przebiegała w kwarcowych probówkach w czasie 1 godz. i temp. 130—140°C. $[Mn(II) \text{ związany}]$ uzyskiwano z różnicy $[Mn(II) \text{ związany}] = [Mn(II) \text{ wewnątrz worka}] - [Mn(II) \text{ zewnątrz worka}]$. Mangan oznaczano metodą kolorymetryczną Marczenki (12) przy $\lambda = 528 \text{ nm}$, stosując spektrofotometr Spekol (Carl Zeiss, Jena), zaopatrzony w kiuwety o grubości warstwy optycznej 5 cm. Molowe stężenie roztworu DNA w ilości fosforu (tzw. DNA-P) oznaczano metodą Tsaneva i Markova (18), stosując spektrofotometr Hilgera.

Metody graficzne. Wyniki pomiarów nanoszono na wykres Scatcharda (15):

$$r/c = K(n-r)$$

gdzie r jest ułamkiem molowym związanych jonów $Mn(II)$, odniesionych do stężenia DNA-P w próbce, c jest stężeniem molowym wolnych jonów manganu pozostających w równowadze z kompleksem, n jest $r_{\max}$, maksymalną liczbą miejsc wiązania w DNA (punkt przecięcia izotermy z osią odciętych) i K jest stałą wiązania. Jeżeli między miejscami wiązania ligandu nie ma oddziaływań, to wykresy r/c względem r winny być liniowe i mogłyby służyć do oznaczeń K i n : przecięcie na osi r/c jest $K \times n$, przecięcie na osi r jest n .

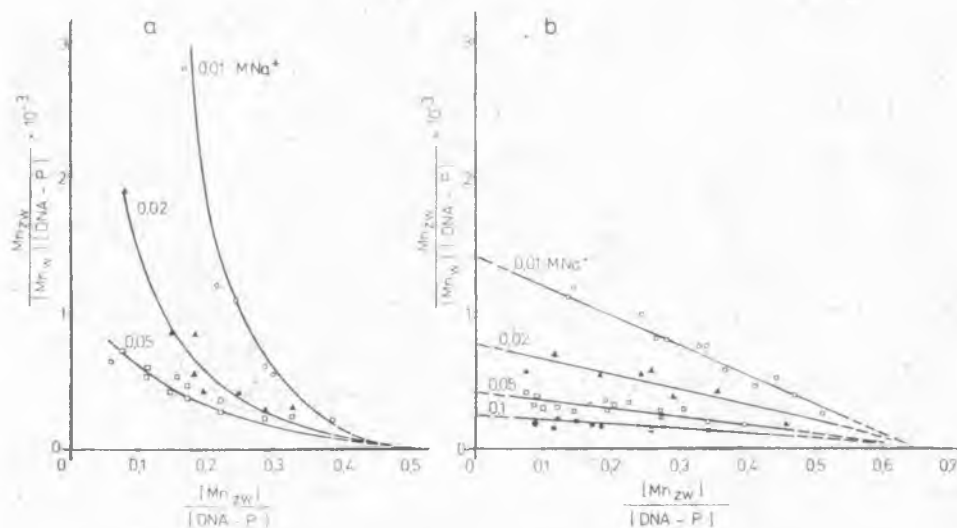
Metoda Recorda i wsp. (14) była stosowana do badań zależności doświadczalnych stałych wiązania K_{obsd} od stężenia Na^+ zgodnie z równaniem:

$$\log K_{\text{obsd}} = -m' \varphi \log [Na^+] + \log K_0$$

gdzie m' jest liczbą par jonowych utworzonych między jonami $Mn(II)$ i grupami fosforanowymi DNA, φ jest ułamkiem przeciwjonów zasocjowanych na reszcie fosforanowej i może być obliczany dla DNA ($\varphi = 0,88$) z odpowiednich równań teorii kondensacji polielektrolitów Manninga (11) oraz K_0 jest to K_{obsd} ekstrapolowana do stężenia 1 M $NaClO_4$ (K_0 nie dotyczy wiązań elektrostatycznych).

WYNIKI

W celu wyznaczenia $r_{\max}$ (ryc. 1a) ekstrapolowano krzywe z wykresu Scatcharda (15) do przecięcia z osią odciętych. Zstępująco-wklęsły przebieg krzywych (ryc. 1a) wskazuje na brak kooperatywności między miejscami wiązania. W przypadku kooperatywności krzywe miałyby przebieg wstępująco-wypukły. Izotermy wiązania dla DNA natywnego z jonami Mn(II), wykreślone dla różnych sił jonowych, były zbieżne po ekstrapolacji do $r_{\max}=0,5$. Wskazuje to na brak zależności pomiędzy wzrostem siły jonowej a ilością jonów Mn(II) związanych z DNA. Próby rozkładu tych krzywych na proste składowe metodami graficznymi (4) nie dały rezultatu. Świadczy to o jednym rodzaju wiązania chemicznego w kompleksie DNA—Mn(II). Ekstrapolacja prostych do przecięcia z osiami współrzędnych na wykresie Scatcharda (15) dla kompleksów DNA termicznie zdenaturowanego z jonami Mn(II) (ryc. 1b) umożliwiła wyznaczenie doświadczalnych stałych wiązania K_{obsd} dla poszczególnych



Ryc. 1. Wykresy Scatcharda dla kompleksów jonów manganu (II) z DNA grasiczym: a — natywnym, b — termicznie zdenaturowanym; warunki równowagowej dializy: temp. 4°C, pH ok. 6, czas równoważenia prób 70 godz.; stężenie jonów Mn(II) w każdej serii od 1,9 μ M do 1,5 mM, stężenia Na⁺ w różnych seriach prób zaznaczone na izotermach; punkty pomiarowe na wykresie stanowią średnie wartości przynajmniej z trzech doświadczeń

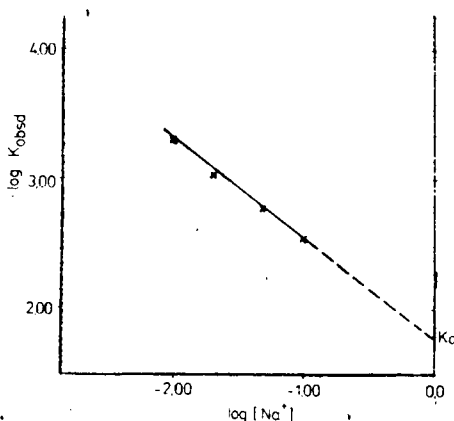
The Scatchard plots for the calf thymus DNA complexes with manganese (II) ions: a — for native, b — heat-denatured DNA; equilibrium dialysis conditions: temp. 4°C, pH $\approx$ 6, equilibrium time of samples 70 h; in each set of samples concentration of Mn(II) ions increased from 1.9 μ M to 1.5 mM; for various sets of samples concentrations Na⁺ were marked on the isotherms; the measured points on the plot are average values of at least three experiments

sił jonowych. Wartości liczbowe K_{obsd} malały w miarę wzrostu siły jonowej.

Po naniesieniu tych wartości K_{obsd} na wykres Recorda i wsp. (ryc. 2) otrzymano prostą o nachyleniu do osi odciętych $\alpha = -41^\circ$. Z tangensa kąta nachylenia prostej:

$$\text{tg} \alpha = -m' \psi, \quad \text{gdzie } \psi = 0,88, \quad \alpha = -41^\circ$$

obliczono wartość m' , informującą o stechiometrii wiązania jonów manganu (II) z resztami fosforanowymi DNA. Otrzymano wartość $m' \approx 1$, świadczącą o tym, że z każdą resztą fosforanową DNA wiąże się jeden jon Mn(II) . Z ekstrapolacji prostej do 1 M Na^+ (ryc. 2) wyznaczono stałą wiązania $K_o = 63 \text{ M}^{-1}$, odpowiadającą wiązaniom nieelektrostatycznym jonów Mn(II) z komponentami DNA w temp. 4°C i przy sile jonowej 1. Korzystając z zależności $\log K_{\text{obsd}} = \log K_o + \log K_p$, obliczono dla niskiej siły jonowej (0,01) stałą elektrostatycznego wiązania Mn(II) z resztami fosforanowymi DNA, $K_p = 32 \text{ M}^{-1}$.



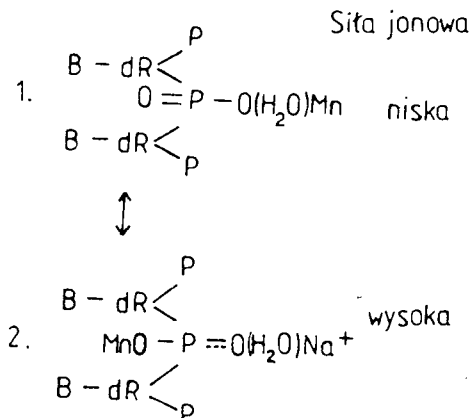
Ryc. 2. Zależność doświadczalnych stałych wiązania jonu Mn(II) z DNA, K_{obsd} , od stężenia jonów Na^+ na wykresie Recorda i wsp. (14); ekstrapolacja prostej do stężenia 1 M Na^+ pozwala wyznaczyć wartość liczbową stałej dla wiązań nieelektrostatycznych, K_o .

The Record et al. (14) plot for dependence of the experimental binding constants of DNA with Mn(II) ions, K_{obsd} , on the Na^+ concentration; the straight line extrapolated to 1 M Na^+ concentration yields a numerical value of non-electrostatic binding constant, K_o .

DYSKUSJA

Brak kooperatywności wiązania jonów Mn(II) z DNA (krzywe na ryc. 1a mają charakter zstępująco-wklęsły, a nie wstępująco-wypukły), prostoliniowy przebieg izoterm podczas kompleksowania jonów Mn(II) z DNA termicznie zdenaturowanym (ryc. 1b) i niepodatność krzywych z ryc. 1a na rozkład graficzny na składowe — wskazują na jeden rodzaj chemicznego wiązania jonów Mn(II) z DNA, z wykluczeniem interkalacyjnych wiązań międzyłańcuchowych. Chemiczne wiązanie jonów Mn(II) z DNA, zgodnie z badaniami Lucka i Zimmera (10), dotyczy śródłańcuchowego wiązania jonów Mn(II) z N^7 guaniny i resztami fosforano-

Schemat 1



wymi. Taki typ wiązania destabilizuje strukturę DNA, w przeciwieństwie do wiązań międzylańcuchowych.

Leroy i Guéron (9) oraz Granot (6) postulowali dwa typy wiązań Mn(II) z resztami fosforanowymi DNA (schemat 1), o charakterze kompleksu zewnętrznego i wewnętrznego, pozostających ze sobą w równowadze. Wzrost siły jonowej przesunąć miał równowagę w kierunku tworzenia silniejszego kompleksu wewnętrznego, to znaczy powstałego w wyniku bezpośredniego wiązania Mn(II) z tlenem reszty fosforanowej, bez udziału wody. Niezależność $r_{\max}$ (ryc. 1a) od wzrostu siły jonowej daje się wytłumaczyć tym, że wzrost stężenia jonów Na^+ nie usuwa jonów Mn(II) z wiązań elektrostatycznych z resztami fosforanowymi DNA do środowiska, lecz zachowuje jony Mn(II) w silniejszym wewnętrznym kompleksie. Zgodnie z zasadą wykluczenia najbliższego sąsiedztwa miejsc wiązania Crothersa (3), interkalacja międzylańcuchowa jonu metalu stanowi przeszkodę dla przejścia kompleksu zewnętrznego w kompleks wewnętrzny. Ze wzrostem siły jonowej musi dojść do ubytku jonów metalu z wiązań elektrostatycznych z resztami fosforanowymi i w rezultacie do spadku $r_{\max}$ (13). Stąd spadek $r_{\max}$ dla kompleksów jonów metalu z DNA natywnym ze wzrostem siły jonowej może stanowić kryterium rozpoznawcze międzylańcuchowych wiązań interkalacyjnych.

Porównując wartości liczbowe stałych K_o i K_p dla jonów Mn(II) i Cu(II) (13) w kompleksach z DNA stwierdzono, że wartości K_p są ze sobą zgodne w granicach błędu metody ($K_{p\text{Mn}} = 32 \text{ M}^{-1}$; $K_{p\text{Cu}} = 26 \text{ M}^{-1}$), natomiast K_o dla kompleksów DNA z jonami Mn(II) jest ok. 7-krotnie niższe ($K_{o\text{Mn}} = 63 \text{ M}^{-1}$) w porównaniu z K_o dla kompleksów DNA z jonami miedzi ($K_{o\text{Cu}} = 420 \text{ M}^{-1}$). Wartość $K_{o\text{Mn}}$ przeliczona za pomocą równania Vant Hoffa dla temperatury 82°C ($K_{o\text{Mn}} = 2,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) była zgodna z danymi Błagoia i wsp. (2): $K''_1 = 2,4 - 0,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ dla zakresu

siły jonowej 0,01—0,1. Wyznaczali oni stałe wiązania zasad DNA z Mn(II) w temperaturze topnienia kompleksu DNA—Mn(II), w 82°C.

Przy założeniu, że jony Mn(II) wiążą się w tym samym centrum aktywnym puryn (o tej samej gęstości elektronowej) co jony Cu(II), 7-krotnie niższa wartość K_o dla kompleksu DNA—Mn(II) od DNA—Cu(II) sugeruje powstanie w wiązaniach śródłańcuchowych kompleksu typu: Mn(II)—zasada, w przeciwieństwie do kompleksu: fosforan—Cu(II)—zasada (13, 17). Jeżeli natomiast Mn(II) i Cu(II) wiążą się w różnych centrach aktywnych puryn (o różnej gęstości elektronowej), to nie można wykluczyć jednoczesnego wiązania Mn(II) z fosforanem i zasadą DNA. Rozstrzygnięcie tego problemu wymaga zastosowania metod analizy instrumentalnej.

PÍSMIENNICTWO

1. Beach R. S. i wsp.: Zinc, Copper and Manganese Immunol Function of Experimental Oncogenesis. *Nutr. Cancer* 3, 172, 1982.
2. Blagoi Yu. P. i wsp.: Effects of Calcium and Manganese Ions on the Helix Transition of DNA. *Biopolymers* 22, 1641, 1983.
3. Crothers D. M.: Calculation of Binding Isotherms for Heterogenous Polymers. *Biopolymers* 6, 575, 1968.
4. Danchin A., Guéron M.: Cooperative Binding of Manganese to Transfer RNA. *Eur. J. Biochem.* 16, 532, 1970.
5. Fu L. i wsp.: Allosteric Interactions between the Membrane-bound Acetylcholine Receptor and Chemical Mediators: Equilibrium Measurements. *Biochemistry* 16, 678, 1977.
6. Granot J.: Effect of Finite Ionic Size on the Poisson-Boltzman Equation: Application to the Binding of Divalent Metal Ions to DNA. *Biopolymers* 22, 1831, 1983.
7. Harper H. A. i wsp.: Woda i przemiana mineralna [w:] Zarys chemii fizjologicznej. PZWL, Warszawa 1983, rozdz. 36, s. 831.
8. Hillebrand G. G. i wsp.: Template Dependent Variation in the Relative Fidelity of DNA Polymerase I of *Escherichia coli* in the Presence of Mn^{2+} Versus Mn^{2+} . *Nucleic Acids Res.* 12, 3173, 1984.
9. Leroy J. L., Guéron M.: The Distance of Manganese to Phosphorus Atoms of Polynucleotides and Dynamics of Binding. *Biochimie* 63, 815, 1981.
10. Luck G., Zimmer Ch.: Conformational Aspects and Reactivity of DNA. Effects of Manganese and Magnesium Ions on Interaction with DNA. *Eur. J. Biochem.* 29, 528, 1972.
11. Manning G. S.: The Molecular Theory of Polyelectrolyte Solutions with Applications to the Electrostatic Properties of Polynucleotides. *Quart. Rev. Biophys.* 11, 179, 1978.
12. Marczenko Z.: Metody oddzielania i oznaczania poszczególnych pierwiastków [w:] Spektrofotometryczne oznaczanie pierwiastków. PWN, Warszawa 1979, rozdz. 29, s. 390.
13. Prasał Z.: Structural Organisation of Copper Ions in Complexes with DNA. *Acta Biochim. Polon.* 33, 153, 1986.

14. Record M. T. i wsp.: Ion Effects on Ligand-nucleic Acid Interactions. *J. Mol. Biol.* **107**, 145, 1976.
15. Scatchard G.: The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 660, 1949.
16. Schweizer M. P. i wsp.: Quantitative Aspects of Metal Ion Binding to Certain Transfer RNA Anticodon Loop Modified Nucleotides. *Biochim. Biophys. Acta* **802**, 352, 1984.
17. Sundaralingam M., Prusiner P.: Zwitterionic Character of Nucleic Acids. *Nucleic Acids Res.* **5**, 4375, 1978.
18. Tsanev R., Markov G. G.: Substances Interfering with Spectrophotometric Estimation of Nucleic Acids and Their Elimination by the Two-wavelength Method. *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 442, 1960.
19. Woo N. H. i wsp.: Crystal Structure of Putrescine Diphosphatate. A Model System for Amine-Nucleic Acid Interaction. *Biopolymers* **18**, 539, 1979.

Otrzymano 1986.06.04.

РЕЗЮМЕ

Были соединены ионы марганца (II) с ДНК вилочковой нативной и термически денатурированной при помощи метода равновесного диализа (температура 4°C , pH 6, время 70 часов) в функции ионных сил, изменяющихся в пределах 0,01—0,1. Нисходяще-вогнутый ход изотерм при разных ионных силах на кривой Скечарда, невосприимчивость изотерм к графическому распределению и прямолинейный ход изотерм для соединений термически денатурированной ДНК с ионами Mn (II) — исключали появление межцепочных интеркаляционных связей ионов Mn(II) в комплексах с ДНК. Стехиометрия связи ионов Mn(II) с остаточным фосфатом (1:1) была обозначена по кривой Рекорда и соотр. (14) на основании экспериментальных констант связи, K_{obsd} .

SUMMARY

Binding studies on the native and heat-denatured DNA with manganese (II) ions by the equilibrium dialysis (temp. 4°C , pH ≈ 6 , equilibration time 70 h) in various ionic strengths (0.01—0.1) has been performed. The concave-downward Scatchard plots obtained at various ionic strengths, an insusceptibility of curvilinear isotherms against the graphical break-down and rectilinear run of isotherms for the heat-denatured DNA complexes with manganese (II) ions — ruled out an occurrence of intercalation of manganese (II) ions in the interstrand sites within DNA. From the Record et al. (14) plot and experimentally obtained binding constants, K_{obsd} , the stoichiometry binding of manganese (II) ions to phosphate residues of DNA (1 : 1) has been determined.

