

А. А. Ломзов<sup>1,2</sup>, Д. В. Пышный<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
пр. Акад. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет  
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия  
E-mail: pyshnyi@niboch.nsc.ru

## РАСЧЕТ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ НАТИВНЫХ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ КОМПЛЕКСОВ ДНК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ КАТИОНОВ МЕТАЛЛОВ С ПОМОЩЬЮ РАСШИРЕННОЙ МОДЕЛИ КОНДЕНСАЦИИ ПРОТИВОИОНОВ \*

Предложена новая модель, описывающая зависимость стабильности ДНК-комплексов, на основе олигонуклеотидов от ионной силы раствора. Модель предполагает, что связывание катионов с ДНК-полианионом сопряжено исключительно с изменением энтропии системы и имеет насыщающий характер. Эффективность связывания противоионов с одно- и двухцепочечными состояниями ДНК различна, и количество противоионов, дополнительно связывающихся с олигонуклеотидами при их комплексообразовании, зависит от концентрации катионов в растворе. Получены аналитические зависимости, описывающие влияние концентрации катионов натрия на температуру плавления ДНК-дуплексов в зависимости от их длины, GC-состава и наличия модификации (ненуклеотидной вставки). Методом термической денатурации, при различных концентрациях NaCl (0,01÷1 М), определены температуры плавления ( $T_{пл}$ ) и термодинамические параметры комплексообразования ( $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$ ) нативных и «мостиковых», несущих вставку на основе фосфодиэфира диэтиленгликоля, олигонуклеотидов с ДНК. На основании полученных нами и представленных в литературе величин создана база данных (685 наборов данных), характеризующая изменения термической стабильности олигонуклеотидных комплексов при варьировании их структуры и ионной силы раствора. Анализ базы данных позволил определить величины равновесных констант ассоциации противоионов с ДНК и количество противоионов, необходимое для насыщения отдельных сайтов связывания. Показано, что в рамках предложенной нами расширенной модели конденсации противоионов при использовании унифицированных термодинамических параметров образования элементов дцДНК возможно с хорошей точностью рассчитывать  $T_{пл}$  ДНК-дуплексов для широкого диапазона ионной силы раствора ( $[Na^+] = 0,01\div 1$  М).

*Ключевые слова:* ДНК-дуплексы, комплексы олигонуклеотидов, стабильность, ионная сила раствора, конденсация противоионов.

### Введение

Олигонуклеотиды – короткие, синтетические фрагменты нуклеиновых кислот (НК) – в настоящее время широко используются в качестве молекулярных инструментов для изучения различных биохимических процессов, протекающих с участием НК; ген-направленных биологически активных препаратов; специфических зондов в систе-

мах ДНК-диагностики [1]. Относительно недавно продемонстрирована возможность использования олигонуклеотидов как строительных блоков при формировании разнообразных наноструктур, обладающих заранее заданными геометрическими характеристиками [2]. Столь обширная область применения обусловлена способностью олигонуклеотидов образовывать прочные двухцепочечные комплексы при реализации комплементарного взаимодействия между двумя олигомерами.

\* Работа поддержана грантом РФФИ (проект № 06-04-49263а), междисциплинарными грантами СО РАН (55, 73), программой Президиума РАН «Молекулярная и Клеточная Биология» (10.6) и НШ-3689.2008.4. Авторы выражают благодарность Т. Ю. Бушуевой за синтез олигонуклеотидов.

Одной из основных характеристик комплексов нуклеиновых кислот (НК/НК) является их термическая стабильность, определяемая термодинамическими параметрами формирования дуплексной структуры (энтальпией  $\Delta H^\circ$  и энтропией  $\Delta S^\circ$  комплексообразования) [3]. Однако в качестве наглядной характеристики термостабильности НК-ассоциатов используют температуру плавления комплексов ( $T_{пл}$ ) – температуру, при которой половина взаимодействующих олигонуклеотидов находится в свободном, одноцепочечном состоянии.

Эффективность использования олигонуклеотидных конструкций во многом зависит от того, насколько точно мы знаем или можем предсказывать комплексообразующие свойства НК-олигомеров ( $\Delta H^\circ$  и  $\Delta S^\circ$ ) и тем самым стабильность формируемых ими дуплексов. Известно, что стабильность дуплекса зависит от целого ряда факторов как «внутренних» (его длина, нуклеотидная последовательность, наличие модификаций, концентрация олигомеров), так и «внешних» (буферные условия, растворитель, наличие НК-специфических лигандов и т. д.) [4–6]. Введение в структуру олигонуклеотидов различных модификаций является распространенным приемом для направленного изменения функциональных характеристик олигонуклеотидов. Использование «скованных» аналогов (LNA), несущих дополнительные оксиметиленовые «перемычки» в углеводных остатках нуклеотида, обеспечивает повышение стабильности комплексов за счет уменьшения числа степеней свободы олигонуклеотида в свободном состоянии [7]. Направленного снижения стабильности ДНК-ДНК-комплексов достигают при использовании «мостиковых» олигонуклеотидов, несущих во внутренней части сахарофосфатного остова ненуклеотидные вставки, например, на основе олигоэтиленгликолей [8–10]. Ранее мы провели систематическое исследование гибридных свойств «мостиковых» олигонуклеотидов. Было показано, что наличие вставки приводит к нарушению кооперативного контакта между основаниями на стыке нативных дуплексных фрагментов в составе модифицированного комплекса, что способствует инициации диссоциации дуплекса и, как следствие, приводит к снижению его стабильности [9; 11]. Использование модифицированных

олигонуклеотидов определяется наличием алгоритмов предсказания их гибридных свойств. Наиболее распространенной моделью для расчета стабильности дуплексных структур НК является модель «ближайших соседей» [4; 12–14], известная также как модель Изинга. Данная модель основывается на том, что термодинамические характеристики формирования НК-комплекса ( $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  и  $\Delta G_T^\circ$ ) могут быть представлены в виде суммы отдельных унифицированных термодинамических инкрементов, характеризующих инициацию связывания олигомеров и образование отдельных динуклеотидных шагов НК-спирали. К настоящему времени определены унифицированные параметры, позволяющие предварительно рассчитывать энергетические характеристики комплексообразования как нативных [10; 14], так и модифицированных («замкнутых» [7] и «мостиковых» [10]) олигонуклеотидов в стандартных условиях (1 М NaCl, нейтральные значения pH). Зная соответствующие характеристики для стандартных условий, температура плавления комплексов НК может быть рассчитана при использовании уравнения (1), если комплексообразование происходит в рамках приближения двух состояний (модель «все-или-ничего») [3]:

$$T_{пл} = \frac{\Delta H^\circ}{\Delta S^\circ + R \ln\left(\frac{C_m}{\delta}\right)}, \quad (1)$$

где  $\delta = 4$  для несамодополнительного комплекса и 1 – для самодополнительного комплекса;  $C_m$  – суммарная концентрация олигонуклеотидов в стехиометрической смеси,  $R$  – универсальная газовая постоянная.

Однако экспериментальные условия использования олигонуклеотидов могут существенно отличаться от стандартных. Наиболее часто варьируемыми параметрами являются ионная сила раствора и композиция связывающихся с НК катионов. Показано, что при увеличении ионной силы раствора стабильность НК-комплексов растет [15]. Такой стабилизирующий эффект связан с экранированием электростатического отталкивания между отрицательно заряженными цепями олигомеров, сближенными в составе дуплекса. В соответствии с общепринятыми представлениями это достигается за счет дополнительного неспецифического связывания с олигонуклеотидными цепями противоионов при комплексообразовании.

зовании. Учитывая энтропийный характер взаимодействия противоионов с НК, предложено выделять в наблюдаемой величине энтропии комплексообразования две компоненты – электростатическую ( $\Delta S_{el}^o$ ) и неэлектростатическую ( $\Delta S_{nel}^o$ ), т. е. зависящую и независящую от ионной силы раствора составляющие, соответственно [16]:

$$\Delta S^o = \Delta S_{nel}^o + \Delta S_{el}^o. \quad (2)$$

В рамках данного представления, используя унифицированные параметры для одних условий (индекс (1)), можно пересчитать температуры плавления НК-комплекса (3) для других (индекс (2)), отличных по ионной силе условий:

$$\frac{1}{T_{пл}^{(2)}} = \frac{1}{T_{пл}^{(1)}} + \frac{\Delta S_{el}^{(2)o} - \Delta S_{el}^{(1)o}}{\Delta H^o}. \quad (3)$$

В литературе представлен ряд моделей, которые прямо или косвенно подтверждают применимость приближения (3) для расчета стабильности комплексов олигонуклеотидов в широком диапазоне ионных сил раствора. Существует четыре основных класса подходов, направленных на количественное описание влияния противоионов на стабильности НК-комплексов: 1) компьютерное моделирование [17–19]; 2) модель полиэлектролитов [20–26]; 3) модель малых лигандов [14; 27–31]; и 4) полуэмпирическое описание [15; 32]. Все эти подходы применимы в случае «делокализованного» взаимодействия противоионов с НК, когда катионы остаются гидратированными и могут мигрировать вблизи поверхности полианиона (например,  $Na^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Mg^{2+}$ ) [33]. В случае «прочного» связывания, когда связывающиеся противоионы дегидратируются и фиксируются, например, за счет формирования координационных связей, вблизи функциональных группировок в НК, рассмотрение системы усложняется [34].

Оценка электростатической составляющей общей энергии взаимодействия катионов с НК с помощью компьютерного моделирования, проводимого методами Монте-Карло или молекулярной динамики, основана на анализе распределения ионов вблизи НК-полианиона. Такой анализ дает результаты, качественно согласующиеся с экспериментом, но требует продолжительных вычислений, что нецелесообразно при определении стабильности конкретных комплексов НК.

В работах [20–26] для описания влияния катионов на свойства НК-комплексов дуплекс рассматривается как отрицательно заряженный линейный полимер, взаимодействующий с атмосферой противоионов. Для определения энергии электростатического взаимодействия предлагается решать уравнение Пуассона – Больцмана (П.Б.):  $\nabla(-\nabla\phi) = 4\pi\rho$ . Однако строгое решение данной задачи невозможно, а численное решение чрезвычайно трудоемко. Предложен ряд подходов, применяя которые можно определить аналитические зависимости общей энергии комплексообразования НК от концентрации и типа противоионов в растворе: модель конденсации противоионов, разработанная Маннигом [20], и упрощенное решение уравнения П.Б. [21].

Модель конденсации противоионов применима для случая делокализованного связывания и позволяет определять электростатическую составляющую энергии формирования дуплекса, которая носит энтропийный характер (4):

$$\Delta S_{el}^o = -R \left[ \left( \left( 1 - z \left( 1 - \frac{1}{\xi} \right) \right)^2 \ln(1 - e^{-\kappa b}) + \left( 1 - \frac{1}{\xi} \right) \ln(41,1 [Me^{z+}] \xi b^3) \right) \right], \quad (4)$$

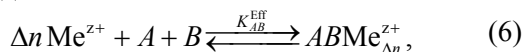
где  $\xi = \frac{q^2}{\epsilon k T b}$  – безразмерный структурный параметр (равен 4,2 для В-формы двойной спирали),  $q$  – заряд протона,  $\epsilon$  – объемная диэлектрическая постоянная раствора,  $k$  – постоянная Больцмана,  $T$  – абсолютная температура (К),  $R$  – универсальная газовая постоянная,  $\kappa$  – Дебаевский параметр экранирования:  $\kappa^2 = 8\pi \cdot 10^{-3} N_A \frac{q^2}{\epsilon k T b} I$  ( $I$  – ионная сила раствора,  $N_A$  – число Авогадро).

Рассматривая ДНК как бесконечный одномерный массив с расстоянием ( $b$ ) между зарядами ( $q$ ) равным 1,7 Å, Маннигом была доказана линейная зависимость обратной температуры плавления полимерной двухцепочечной ДНК от логарифма концентрации катионов ( $C_N$ ) при условии избытка противоионов относительно фосфатных остатков в НК. Такие ограничения отсутствуют в случае упрощенного решения уравнения П.Б., когда НК рассматривается как равномерно заряженный цилиндр. Полученные в рамках этого приближения результа-

ты качественно совпадают с расчетными данными модели конденсации противоположно заряженных ионов, однако различия в количественных оценках энергии комплексообразования НК достигают 20 % [21]. Повышение точности анализа электростатических взаимодействия с участием НК-комплексов стало возможным при использовании самосогласованной модели Пуассона – Больцмана, основанной на разделении эффектов, сопряженных с взаимодействием сильно- и диффузно-связанных противоположно заряженных ионов с НК [25]. Детальный анализ данной модели позволил установить полуэмпирическую зависимость термостабильности комплексов ДНК от концентрации NaCl. Используя уравнение (5), температура плавления ДНК-комплекса при любой концентрации ионов натрия в растворе рассчитаем исходя из величин  $T_{пл}$  и энтальпии образования дуплекса в стандартных условиях (1M Na<sup>+</sup>, нейтральные значения pH).

$$\begin{aligned} \Delta S_{el(2)}^0 - \Delta S_{el(1)}^0(1M[Na^+]) = \\ = -3,22 \cdot 10^{-3}(N-1) \cdot (-70 \ln([Na^+]) + \\ + 12 \ln^2([Na^+]) + \frac{13 \ln^2([Na^+])}{N}). \end{aligned} \quad (5)$$

Таким образом, при детальном рассмотрении взаимодействия катионов с НК видно, что адекватным описанием зависимости термостабильности дуплексов от ионной силы раствора являются модели, соответствующие усложненным вариантам модели взаимодействия малых лигандов с этим биополимером [27]. Данная модель предполагает, что комплексообразование олигонуклеотидов сопряжено с конденсацией дополнительных противоположно заряженных ионов на нуклеотидных компонентах:



где  $A$  и  $B$  – взаимодействующие олигомеры,  $Me^{z+}$  – противоположно заряженный ион,  $\Delta n$  – число противоположно заряженных ионов, дополнительно связывающихся с НК при комплексообразовании.

Учитывая уравнения (3) и (7), эта простая модель описывает наблюдаемую линейную зависимость обратной температуры плавления от логарифма концентрации катионов в растворе при низкой ионной силе раствора (0,01 ÷ 0,3 M), но не способна описать нелинейный характер данной зависимости при более высокой концентрации соли [15]:

$$\Delta S_{el}^0 = R \ln([Na^+]^{\Delta n}) \quad (7)$$

Усовершенствования данной модели до настоящего момента проводились с целью нахождения полуэмпирических зависимостей, позволяющих с экспериментальной приемлемой точностью рассчитывать температуры плавления НК-комплексов в условиях, отличных от стандартных. Так, в работе [15] проведен анализ практически всех имеющихся разработок, касающихся расчета стабильности комплексов олигонуклеотидов при различных концентрациях одновалентных катионов, который позволил авторам предложить свое эмпирическое уравнение для расчета температуры плавления комплексов олигонуклеотидов (8), с высокой точностью описывающее наблюдаемую термостабильность НК-комплексов:

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_{пл}^{(2)}} = \frac{1}{T_{пл}^{(1)}} + (4,29 \cdot f(GC) - \\ - 3,95) \cdot 10^{-5} \cdot \ln \left( \frac{[Na]_{(2)}}{[Na]_{(1)}} \right) + \\ + 9,4 \cdot 10^{-6} \left( \ln^2([Na]_{(2)}) - \ln^2([Na]_{(1)}) \right), \end{aligned} \quad (8)$$

где  $f(GC)$  – доля GC-пар оснований в составе ДНК-комплекса.

Таким образом, представленные в литературе данные либо являются слишком сложными для рутинного использования, либо не позволяют проводить расчет гибридных свойств олигонуклеотидов в широком диапазоне ионной силы раствора. Кроме того, следует отметить, что предложенные полуэмпирические модели не имеют наглядной физической интерпретации, и область их применения ограничена рамками охарактеризованных условий (состав буфера, тип и концентрации катионов).

В данной работе предложена новая модель, которая описывает зависимость стабильности дуплексных структур от ионной силы раствора. В ней предполагается, что эффективность связывания катионов с одной и двухцепочечными состояниями ДНК различна, и результирующее количество противоположно заряженных ионов, связывающееся с НК при комплексообразовании, зависит от концентрации катионов в растворе, т. е. от степени заполнения сайтов связывания противоположно заряженных ионов в каждом из состояний НК-цепей. Показано, что предложенная модель позволяет с высокой точностью описывать зависимость стабильности комплексов, формируемых нативными и модифицированными, «мостиковыми» олигонуклеотидами с ДНК, в ши-

роком диапазоне ионной силы раствора ( $[Na^+] = 0,01 \div 1$  М). Нами создана база данных по термической стабильности дуплексов при различной концентрации противоионов, включающая литературные и полученные нами данные. В результате проведенного анализа в рамках предложенной модели определены количественные характеристики взаимодействия катионов натрия с ДНК, определяющие различия в эффективности конденсации противоионов с сайтами в НК в одно- и двухцепочечном состояниях.

### Материалы и методы

Синтез и выделение нативных и «мостиковых», несущих вставки на основе диэтиленгликоля, олигонуклеотидов проводили на автоматическом ДНК синтезаторе ASM-800 в соответствии с [8]. Гомогенность олигонуклеотидов подтверждали с помощью гелеэлектрофореза в денатурирующих условиях. Концентрацию олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически, как описано в [8].

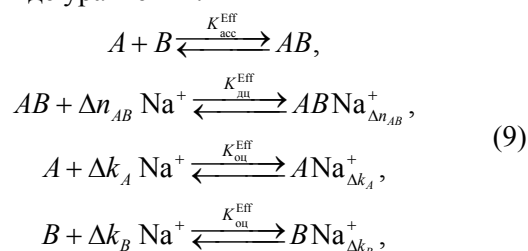
Исследование стабильности комплементарных комплексов ДНК-ДНК проводили методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала на установке Cary 300 Bio, оборудованной терморегулируемым шестисекционным держателем для кювет (Varian, Inc, Австралия). Скорость изменения температуры образцов составляла  $0,5$  °С/мин. Температура образца в каждой кювете была откалибрована с использованием термодатчиков Temperature Probes Series II (Varian, Inc, Австралия). Термодинамические параметры образования ( $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$ ) комплексов олигонуклеотидов определяли с помощью программы Simplex (А. В. Иванов, ИЛФ СО РАН), анализируя профили кривых плавления дуплексов, полученных в многоволновом режиме регистрации (260, 270, 300 нм) [35; 36].

Базу данных, характеризующую зависимость термостабильности ДНК-комплексов, формировали в среде MS Excel и анализировали с помощью встроенных оптимизационных протоколов.

### Результаты

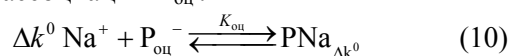
*Теоретическая часть.* Модель взаимодействия малых лигандов с НК (6) наглядно описывает необходимость связывания до-

полнительного числа противоионов ( $\Delta n$ ) с НК при комплексообразовании полиионных цепей олигонуклеотидов, однако предполагает постоянство этого числа вне зависимости от концентрации катионов в системе. В то же время имеются данные, свидетельствующие о том, что взаимодействие катионов с НК описывается равновесной схемой. Мы предположили, что полная схема комплексообразования олигонуклеотидов  $A$  и  $B$  в случае обратимой конденсации противоионов может быть представлена в виде уравнений:

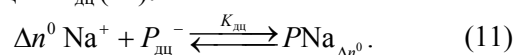


где  $\Delta k_A$ ,  $\Delta k_B$  и  $\Delta n_{AB}$  – количество ионов натрия, связывающихся с олигонуклеотидом  $A$ ,  $B$  и их комплексом, соответственно.

Такое представление определяет, что эффективности взаимодействия катионов с олигонуклеотидами в одно- (оц) и двухцепочечном (дц) состоянии различаются, а заполнение сайтов связывания противоионов носит насыщающий характер. Следовательно, при изменении концентрации соли эффективное экранирование отрицательных зарядов в каждом из НК-компонентов равновесной системы меняется, как и эффективное число дополнительных противоионов, связываемых при образовании дуплекса. Количество сайтов связывания катионов в НК-компоненте должно определяться числом и природой отрицательно заряженных фосфодиэфирных остатков ( $P^-$ ), входящих в его состав. Такое рассмотрение возможно, считая, что взаимодействие между конденсированными на НК катионами не происходит (нет кооперативного или антикооперативного эффекта). В этом случае с каждым оц-сайтом связывания может взаимодействовать  $\Delta k^0$  катионов с константой ассоциации  $K_{\text{оц}}$ :



В дц-состоянии  $\Delta n^0$  катионов заполняют один сайт связывания с константой ассоциации  $K_{\text{дц}}$  (11):



Равновесные константы связывания противоионов с НК,  $K_{\text{оц}}$  и  $K_{\text{дц}}$  принимали независимыми от температуры, в соответствии с допустимостью приближения об энтропийном характере данного типа взаимодействия:

$$K_{\text{оц(дц)}} = \exp\left(\frac{\Delta S_{\text{el-оц(дц)}}^0}{R}\right).$$

Очевидно, что эффективное число катионов, связанных с НК-компонентами, пропорционально количеству сайтов связывания в их составе и зависит от усредненной степени их заполнения при данной ионной силе раствора. Определив количество сайтов связывания равным для оц-состояния НК –  $L_A$  и  $L_B$  и для дц-состояния –  $L_{AB}$ , было показано, что при избытке противоионов в системе эффективное количество катионов, связанных с НК-компонентом ( $A$ ,  $B$  или  $AB$ ), может быть выражено уравнениями:

$$\begin{aligned} \Delta k_{A(B)} &= L_{A(B)} \cdot \Delta k^0 \frac{[P_{\text{оц}} \text{Na}_{\Delta k^0}]}{[P_{\text{оц}}^-]_0} = \\ &= L_{A(B)} \cdot \Delta k^0 \frac{K_{\text{оц}} [\text{Na}^+]^{\Delta k^0}}{1 + K_{\text{оц}} [\text{Na}^+]^{\Delta k^0}}, \end{aligned} \quad (12)$$

$$\begin{aligned} \Delta n_{AB} &= L_{AB} \cdot \Delta n^0 \frac{[P_{\text{дц}} \text{Na}_{\Delta n^0}]}{[P_{\text{дц}}^-]_0} = \\ &= L_{AB} \cdot \Delta n^0 \frac{K_{\text{дц}} [\text{Na}^+]^{\Delta n^0}}{1 + K_{\text{дц}} [\text{Na}^+]^{\Delta n^0}}, \end{aligned} \quad (13)$$

где  $[P_{\text{оц}}^-]_0$  и  $[P_{\text{дц}}^-]_0$  – суммарные концентрации сайтов связывания катионов в НК-компонентах и  $[P_{\text{оц}} \text{Na}_{\Delta k^0}]$ ,  $[P_{\text{дц}} \text{Na}_{\Delta n^0}]$  – концентрации заполненных сайтов связывания катионов в оц- и дц-состояниях НК, соответственно. Эффективное число сайтов связывания катионов в свободном олигонуклеотиде  $L_{A(B)}$  и в дуплексе  $L_{AB} = L_A + L_B$ .

Следует отметить, что любые факторы структуры олигонуклеотидов и их комплексов, влияющие на эффективное количество потенциальных сайтов связывания противоионов в рамках предложенного приближения, могут быть учтены. Мы использовали такую возможность для описания особого состояния фосфатных остатков, находящихся вблизи концов полианионной цепи олигонуклеотидов и их комплексов. Анализ концевых эффектов с использованием теории полиэлектролитов показывает различия в величинах электростатического потенциала на концах и во внутренней части дуплекса [19]. Это может быть обусловлено тем, что пары оснований на конце НК-спирали являются частично расплавленными [37]. Для учета эффектов такого типа в рамках

предложенной модели были введены дополнительные поправки, характеризующие в составе НК-компонентов особые участки связывания противоионов со своим эффективным размером. В этом случае эффективное число сайтов конденсации катионов на НК-компонентах изменяется на величины аддитивных поправок, различающихся для оц- и дц-состояния,  $L_{\text{оц}}^{\text{конц}}$  и  $L_{\text{дц}}^{\text{конц}}$ , соответственно. Аналогичные поправки могут быть введены и для описания эффектов, связанных с введением ненуклеотидных вставок на основе заряженного фосфодиэфира диэтиленгликоля ( $L_{\text{оц}}^{\text{ДЭГ}}$  и  $L_{\text{дц}}^{\text{ДЭГ}}$ ), нарушающих регулярность структуры сахарофосфатного остова НК.

Таким образом, эффективное число сайтов связывания катионов в структуре НК-компонента в зависимости от его состояния может быть представлено в виде выражений:

$$L_{A(B)} = L_{A(B)}^{\text{внутр}} + L_{\text{оц}}^{\text{конц}} + mL_{\text{оц}}^{\text{ДЭГ}}, \quad (14)$$

$$L_{AB} = L_{AB}^{\text{внутр}} + L_{\text{дц}}^{\text{конц}} + mL_{\text{дц}}^{\text{ДЭГ}}, \quad (15)$$

где  $m$  – число ДЭГ-вставок,  $L_{A(B)}^{\text{внутр}}$  и  $L_{AB}^{\text{внутр}}$  – число межнуклеотидных фосфодиэфирных остатков в олигонуклеотиде и в дуплексе, соответственно.

Зависимость температуры плавления НК-комплексов от ионной силы раствора определяется эффективным числом противоионов ( $\Delta n$ ), дополнительно связывающихся с НК при образовании дуплексной структуры при заданной концентрации соли. Из анализа равновесной схемы (9) следует, что число  $\Delta n$  может быть определено как разница между числом катионов, связанных с комплексом и свободными олигонуклеотидами, эффективные величины которых зависят от структуры НК-компонентов ((14), (15)), концентрации катионов и констант ассоциации противоионов с НК (12), (13):

$$\Delta n = \Delta n_{AB} - (\Delta k_A + \Delta k_B). \quad (16)$$

В этом случае энергетическая поправка, определяющая влияние ионной силы раствора на стабильность ДНК-комплексов, имеет энтропийный характер и может быть представлена в виде (7). Таким образом, определив параметры, необходимые для решения уравнений (12), (13), появляется возможность производить перерасчет температуры плавления комплексов в соответствии с (3), (7) и (16), первоначально определяя стабильность комплекса в стан-

дартных условиях с использованием унифицированных термодинамических параметров [4; 10].

*Экспериментальная часть.* На рис. 1 представлены типичные экспериментальные данные, характеризующие как методику экспериментов по определению термостабильности комплексов олигонуклеотидов методом термической денатурации (А), так и демонстрирующие характерную зависимость температуры плавления комплементарных комплексов нативного и «мостикового» олигонуклеотидов от концентрации NaCl (Б). Термодинамические параметры комплексообразования нативных и модифицированных олигомеров определяли из анализа профилей кривых плавления формируемых ими комплексов [36]. На основании энергетических характеристик ( $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$ ), полученных при различных концентрациях соли и рассчитанных с их использованием величин температур плавления, формировали базу данных. Дополнительно в анализ включали представленные в литературе систематические подборки соответствующих величин. В результате была сформирована база данных, характеризующая зависимость стабильности нативных и модифицированных комплексов различной длины и нуклеотидного состава от концентрации NaCl. Параметры полученного массива данных представлены в табл. 1.

В базу вошли данные, полученные при использовании двух типов буферов на основе фосфата или какодилата натрия, однако было доказано, что природа буферного компонента при одинаковой ионной силе раствора не влияет на стабильность дуплексов (данные не приведены).

Представленные в литературе унифицированные термодинамические параметры позволяют рассчитывать стабильность комплексов олигонуклеотидов согласно модели ближайших соседей в «стандартных условиях» (1M NaCl, нейтральные значения pH), поэтому как базовые использовали величины температур плавления комплексов, полученные в этих солевых условиях. Такие величины для каждого из комплексов определяли как  $T_{пл}^{(1)}$  в уравнении (3), что позволяет получить  $T_{пл}^{(2)}$  при низких ионных силах растворов, рассчитав значения  $\Delta S_{cl}^\circ$  по (7) и (16).

Если представленные в литературе данные не содержали величин энтальпии комплексообразования ( $\Delta H^\circ$ ), характеристики вычисляли, используя модель ближайших соседей и опубликованные нами ранее унифицированные параметры [10].

Необходимые для решения уравнений (3), (7) и (16) параметры, соответствующие представленной в данной работе модели взаимодействия противоионов с ДНК (9), определяли, анализируя созданную базу данных с помощью оптимизационных подходов. Методом Ньютона минимизировали разницу между расчетными и экспериментальными величинами температур плавления путем варьирования величин: констант связывания катионов натрия с отдельными сайтами в НК ( $K_{он}$ ,  $K_{дн}$ ); числа противо-

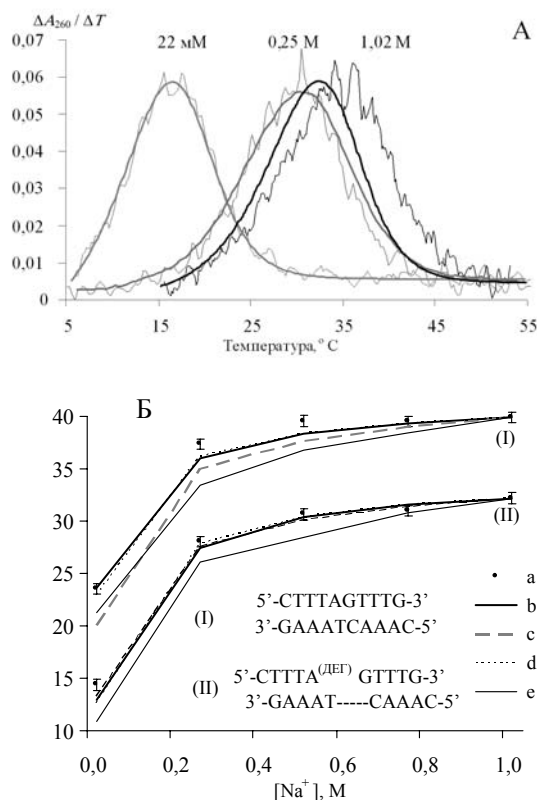


Рис. 1. (А) Типичные дифференциальные кривые плавления комплекса «мостикового» олигонуклеотида  $CTTTG^{(DEF)}ATTTG$  с комплементарной ДНК-матрицей при различных концентрациях NaCl. Тонкие линии – производные экспериментальных кривых плавления; толстые, гладкие кривые получены из расчетных кривых плавления. (Б) Зависимость температуры плавления комплексов нативного (I) и «мостикового» (II) олигонуклеотидов от концентраций катионов натрия (а) и результаты предварительного расчета соответствующих зависимостей по данным моделей, представленных в данной работе – кривая (b); [15] – (c); [25] – (d); [14] – (e). ДЭГ – нуклеотидная вставка на основе фосфодиэфира диэтиленгликоля [10]

ионов, необходимого для заполнения каждого из сайтов в НК ( $\Delta k^\circ$ ,  $\Delta l^\circ$ ); поправок, характеризующих отличия размера концевых участков НК-цепи ( $L_{\text{оц}}^{\text{конц}}$ ,  $L_{\text{дц}}^{\text{конц}}$ ); поправок на размер сайта конденсации противоположно ионов нуклеотидной вставок ( $L_{\text{оц}}^{\text{дЭГ}}$  и  $L_{\text{дц}}^{\text{дЭГ}}$ ).

Первичный анализ созданной базы данных методом оптимизации величин независимых параметров, проведенный в рамках предложенной модели, показал, что данное описание влияния концентрации противоположно ионов на стабильность комплексов НК адекватно: стандартное отклонение предсказанных от наблюдаемых величин  $T_{\text{пл}}$  составляет 0,98 °С; нелинейность зависимости  $T_{\text{пл}}^{-1}$  vs  $\ln[\text{Na}^+]$  прогнозируется. Доказано, что ошибка расчета  $T_{\text{пл}}$  практически не зависит ни от длины, ни от стабильности комплекса, но коррелирует с величиной GC-состава НК-компонентов (долей нуклеотидов G и C в последовательности НК) (рис. 2). При низких значениях  $f(\text{GC}) < 0,5$  расчетные величины  $T_{\text{пл}}$  оказываются в среднем выше экспериментальных, и, напротив, при высоких  $f(\text{GC}) > 0,5$  прогноз достоверно занижает стабильность комплексов. Важно отметить, что стабильности комплексов нативных и «мостиковых» оли-

гомеров прогнозируются с сопоставимой ошибкой.

Выявленный нами эффект GC-состава на зависимость термостабильности НК-комплексов от концентрации соли известен [15; 31]. Мы предположили, что данный факт, оставленный ранее без физической интерпретации, может быть сопряжен, например, с изменением эффективного числа сайтов связывания катионов для GC-богатых НК-компонентов относительно AT-богатых. Данное приближение в рамках предложенной модели можно описать, введя дополнительные поправки ( $d_{\text{оц(дц)}}^{\text{GC}}$ ) для GC-специфической корректировки числа сайтов связывания катионов в оц- и дц НК-компонентах. Тогда, уравнения (14) и (15) для учета числа участков связывания катионов могут быть представлены в виде:

$$L_{A(B)} = L_{A(B)}^{\text{внутр}} (1 + d_{\text{оц}}^{\text{GC}} \cdot f(\text{GC})) + L_{\text{оц}}^{\text{конц}} + mL_{\text{оц}}^{\text{дЭГ}}, \quad (17)$$

$$L_{AB} = L_{AB}^{\text{внутр}} (1 + d_{\text{дц}}^{\text{GC}} \cdot f(\text{GC})) + L_{\text{дц}}^{\text{конц}} + mL_{\text{дц}}^{\text{дЭГ}}, \quad (18)$$

где  $f(\text{GC})$  – GC-состав НК-компонентов,  $d_i^{\text{GC}} = \frac{L_i^{\text{внутр}} (f(\text{GC})=1) - L_i^{\text{внутр}} (f(\text{GC})=0)}{L_i^{\text{внутр}} (f(\text{GC})=0)}$ ,  $i = A, B$  или  $AB$  и  $L_i^{\text{внутр}}$  – эффективное число

Таблица 1

Параметры базы данных, характеризующей зависимость стабильности ДНК-комплексов нативных и «мостиковых» олигонуклеотидов от концентрации NaCl

Количество различных комплексов	139	
Количество наборов данных ( $\Delta H^\circ$ , $\Delta S^\circ$ , $T_{\text{пл}}$ , $[\text{Na}^+]$ , [ДНК]), характеризующих стабильность комплексов олигонуклеотидов в различных условиях	Нативных	579*
	«Мостиковых»	106
Длина комплексов (пар оснований, п. о.)	Нативных	6÷30
	«Мостиковых»	4÷15
Положение нуклеотидной вставки в «мостиковых» олигонуклеотидах	Не менее двух нуклеотидов от концов цепи	
Концентрации олигонуклеотидов (M)	$1,5 \cdot 10^{-4} \div 2 \cdot 10^{-6}$	
Температура плавления комплексов (°C)	Нативных	14÷89
	«Мостиковых»	4÷52
Диапазон изменения GC-состава дуплексов (доли G/C-пар)	Нативные	0,2÷0,8
	«Мостиковые»	0,2÷0,87
Диапазон изменения концентрации $[\text{Na}^+]$ (M)	0,01÷1,024	
Неизменный состав буфера	10 mM фосфат натрия (pH 7,0–7,2), 0,1 mM $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ или 10 mM какодилат натрия (pH 7,0–7,2)	

\* Включая опубликованные: 460 наборов данных в [15], 8 – [31], 4 – [38], 6 – [39].



сайта связывания катионов на один фосфодиэфирный остаток в НК-компоненте, принято, что  $L_i^{P_{\text{внутр}}}(f(\text{GC})=0) \equiv 1$ .

В результате анализа базы данных, выполненного с учетом последних корректировок, были получены величины независимых параметров, позволяющих описать зависимость стабильности нативных и «мостиковых» ДНК-комплексов от концентрации катионов одновалентных металлов, варьируемой в широком диапазоне ( $[\text{Na}^+] = 0,01 \div 1,024 \text{ M}$ ) (табл. 2).

На рис. 3 приведена корреляция полных наборов расчетных и определенных экспериментально величин температур плавления нативных и модифицированных комплексов олигонуклеотидов. Видно (рис. 1, Б и рис. 3), что предложенная нами модель позволяет с высокой точностью проводить расчет стабильности комплексов нативных и модифицированных олигонуклеотидов: средняя ошибка расчета  $T_{\text{пл}}$  составляет 0,7 и 1,0 °С, соответственно, и зависимости ошибки предсказания величин  $T_{\text{пл}}$  от GC-состава НК-компонентов и их длины отсутствуют.

### Обсуждение результатов

Представленные выше данные свидетельствуют, что предложенное нами модельное описание взаимодействия противоионов с олигонуклеотидами и их комплексами позволяет прогнозировать температуру плавления дуплексов, формируемых в равновесной системе. В отличие от представленных в литературе, приведенное в этой работе описание учитывает взаимодействие катионов как с оц-, так и с дц-состоянием НК, переход между которыми и определяет эффективность комплексообразования в системе. Полученное описание имеет наглядную физическую интерпретацию и позволяет проводить прогностический расчет стабильности НК-комплексов в широком диапазоне ионных сил раствора ( $[\text{NaCl}] = 0,01 \div 1,024 \text{ M}$ ).

Различное число катионов, связывающихся с фосфатными остатками в оц- и дц-состоянии, обусловлено отличием в их пространственной организации, определяющим неэквивалентность величин констант ассоциации катионов одновалентных металлов с ДНК. В дц-состоянии константа ассоциации

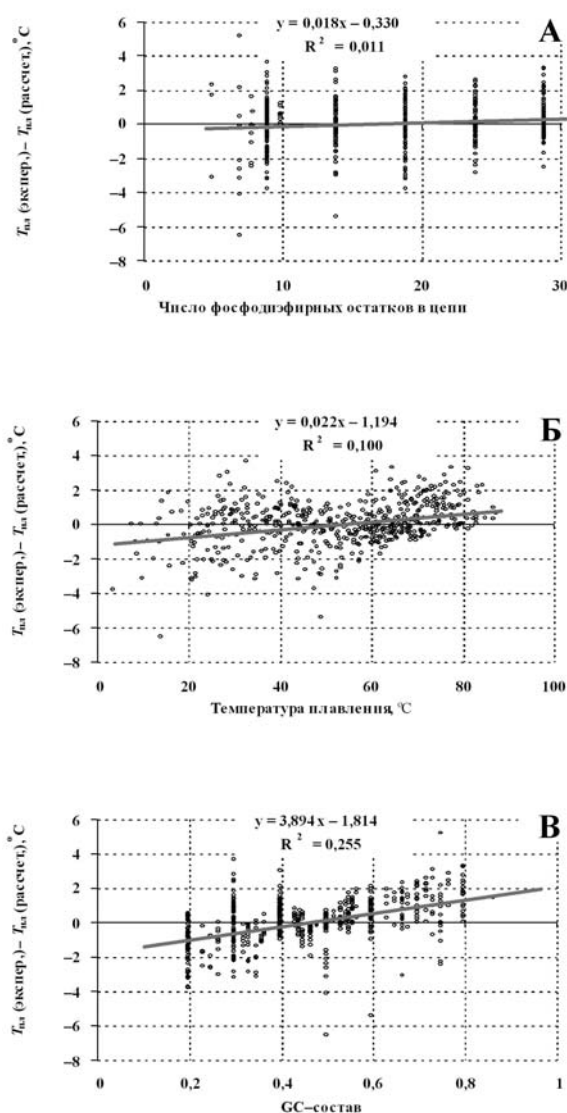


Рис. 2. Зависимость ошибки расчета температуры плавления ДНК комплексов от: (А) длины олигонуклеотидов; (Б) величины экспериментальной  $T_{\text{пл}}$  комплексов; (В) GC-состава комплексов

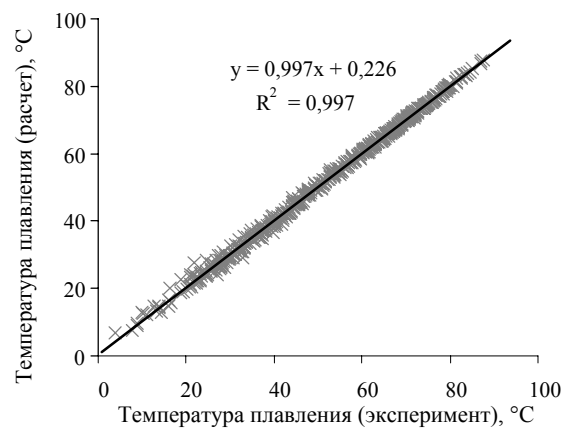


Рис. 3. Корреляция экспериментальных и рассчитанных с помощью предложенной модели (9) величин температур плавления комплексов нативных и «мостиковых» олигонуклеотидов с ДНК

катиона с сайтом НК практически в 2 раза выше, чем в одноцепочечном, что, вероятно, связано с повышенным электростатическим потенциалом вблизи НК-дуплекса из-за сближения в его составе двух отрицательно заряженных олигонуклеотидных цепей. Представленные в литературе данные о величине константы ассоциации катионов натрия с дцДНК хорошо согласуются с полученными нами данными. Определенная в работе [40] методом ЯМР-спектроскопии константа ассоциации  $\text{Na}^+$  с дцДНК составила  $91 \text{ M}^{-1}$ , что только в два раза превышает установленную нами величину ( $41 \text{ M}^{-1}$ ). Нами проведено сравнение констант ассоциации катионов с НК, полученных с использованием теории конденсации противоионов [20]. Маннинг определил константу взаимодействия катионов с ДНК как наблюдаемую величину:

$$K_{\text{набл}} = \Delta n / [\text{Na}^+].$$

Проведенное сопоставление полученных таким образом величин наблюдаемых констант ассоциации катионов с ДНК и определенной нами величиной  $K_{\text{дц}}$  указывает на то, что относительное отклонение не превышает 35 % для всего рассмотренного диапазона концентраций противоионов.

Отличительной особенностью предложенной нами модели является то, что она указывает на реализацию полного экранирования заряда как в оц-, так и дц-состояниях ДНК при высоких ионных силах раствора. Это подтверждается близостью к единице величин числа дополнительно связывающихся катионов с одним фосфодиэфирным остатком в составе АТ-богатой последовательности ДНК. В случае же GC-богатых последовательностей адекватным для описания эффективного числа сайтов связывания катионов в олигомере оказалось снижение относительного вклада межнук-

леотидного фосфата на соответствующем участке более чем на 30 %. Такой эффект может быть связан со спецификой взаимодействия катионов с определенными последовательностями НК [33], так как известно, что катионы связываются с АТ-богатыми последовательностями со стороны малой бороздки спирали, в то время как с GC-богатыми – со стороны большой. Величины концевых поправок достаточно большие (2,9 для двух концевых сайтов в составе одноцепочечной структуры и 5,0 для двух пар концевых сайтов в составе дуплекса), что свидетельствует о значительном вкладе концевых эффектов в стабильность комплексов. Такие эффекты наиболее сильно сказываются на поведении коротких олигомеров при комплексообразовании. Аналогичная значимость концевых эффектов находит отражение при определении термодинамических параметров формирования НК-дуплексов в рамках модели ближайших соседей. Энергетические инкременты, связанные с концевыми эффектами, сопоставимы по величине с энергией формирования динуклеотидного шага и являются выражено энтропийными. В случае модифицированных комплексов поправка на число сайтов связывания катионов, определяемая введением дополнительного фосфодиэфира в составе ненуклеотидной вставки, ниже, чем величина параметра, соответствующего «обычному» межнуклеотидному фосфату. Анализ влияния ионной силы раствора на количество катионов, переходящих из свободного в связанное с ДНК состояние при образовании дуплекса, показал, что увеличение концентрации катионов приводит к значительному снижению числа дополнительно конденсируемых противоионов ( $\Delta n$ ) (рис. 4, А). Такое изменение обусловлено уменьшением разницы между средней сте-

Таблица 2

Величины параметров, характеризующих взаимодействие катионов натрия с ДНК в одно- и двухцепочечном состояниях в зависимости от GC-состава НК-компонентов и наличия в них ненуклеотидной вставки

Состояние ДНК	$K_{\text{оц(дц)}}, \text{M}^{-1}$	$\Delta n^{\circ}, \Delta k^{\circ}$	$L_{\text{оц(дц)}}^{\text{конц}} *$	$d_{\text{оц(дц)}}^{\text{GC}}$	$L_{\text{оц(дц)}}^{\text{ДЭГ}}$
оц	$24,4 \pm 4,2$	$0,92 \pm 0,04$	$2,94 \pm 0,44$	$-0,35 \pm 0,04$	$0,50 \pm 0,33$
дц	$40,9 \pm 6,6$	$0,98 \pm 0,05$	$5,00 \pm 0,77$	$-0,37 \pm 0,04$	$0,49 \pm 0,33$

\* Вклад каждого межнуклеотидного фосфата в нативном НК-компоненте с  $f(\text{GC}) = 0$  в суммарное число сайтов связывания противоионов в его составе принимали равным единице

пению заполнения сайтов связывания в оц- и дц-состояниях в высокосолевых растворах. Максимальное число  $\Delta n$ , согласно проведенным расчетам, наблюдается при относительно низких, близких к физиологическим, концентрациях катионов. Такие эффекты, согласно предложенной модели, являются результатом различной эффективности заполнения сайтов связывания катионов в оц- и дц-НК-компонентах (рис. 4, Б). При низких ионных силах раствора эффективные степени ассоциации катионов с ДНК ( $\Delta k_{A(B)}$ ,  $\Delta n_{AB}$ ) вне зависимости от состояния биополимера низки. Напротив, при высоких концентрациях соли они близки к предельному значению. Именно это, наряду с влиянием GC-состава ДНК, объясняет выявленный характер зависимости числа  $\Delta n$  от концентрации катионов. Важно отметить, что величины  $\Delta n_{AB}$ , характеризующие экранирование заряда в дцДНК и рассчитанные на основании модели конденсации противоионов [20], хорошо согласуются с соответствующими характеристиками, полученными нами для сайта связывания катиона в составе среднестатистического участка НК с пятидесятипроцентным GC-составом, но только при ионных силах выше 0,1 М. В области низких концентраций катионов ( $\sim 0,05$  М) согласуются сопоставляемые эффективности экранирования фосфатов в оц-состоянии ( $\Delta k_{A(B)}$ ).

Наличие выраженных зависимостей степени заполненности сайтов связывания катионов с НК от  $[Na^+]$  является ключевой особенностью представленной модели, которая адекватно описывает не только зависимость  $T_{пл}$  vs  $[Na^+]$  (см. рис. 1, Б), но и позволяет с хорошей точностью оценивать величины эффективного числа противоионов, конденсирующихся при формировании дуплекса. Анализ данных работы [14] показывает, что при формировании дуплекса с каждым фосфатным остатком олигонуклеотидов ( $\Delta n/(L_A + L_B)$ ) дополнительно связывается 0,19 катионов натрия. Используя предложенную нами модель, было показано, что сопоставимые величины  $\Delta n/(L_A + L_B)$  характеризуют комплексообразование АТ-богатых олигонуклеотидов в диапазоне концентраций NaCl от 0,022 до 0,15 М.

Сопоставление предсказательной способности различных подходов к расчету стабильности ДНК-комплексов при различ-

ных концентрациях NaCl проводили с использованием набора данных, представленных в работе [15] и не вошедших в число анализируемых на этапе поиска параметров модели, приведенных в табл. 2. В качестве экспериментальных характеристик данного набора использовали только описанные величины  $T_{пл}$  комплексов, определенные при известных концентрация олигомеров и NaCl. Расчетные величины  $T_{пл}$  получали, определив в рамках модели ближайших соседей термодинамические параметры ком-

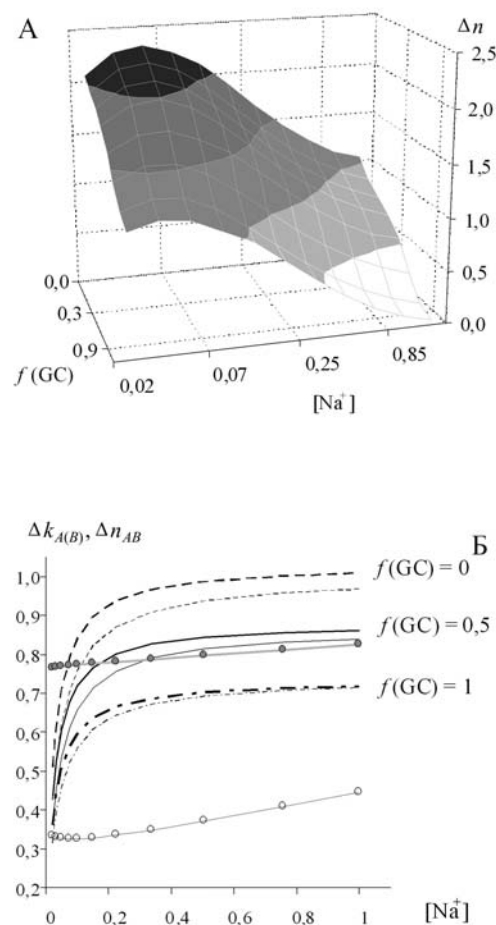


Рис. 4. (А) Зависимость количества дополнительно конденсируемых катионов ионов натрия  $\Delta n$  при комплексообразовании олигонуклеотидов ( $L_{A(B)}^{внутр} = 10$ ) от ионной силы раствора и GC-состава олигонуклеотидов; (Б) влияние концентрации противоионов на: величины числа катионов конденсированных на сайте связывания в НК-компоненте с различным GC-составом в одноцепочечном (тонкие черные линии) или двухцепочечном (толстые черные линии) состояниях; величину числа катионов, связанных с каждым из сайтов в оцДНК (серая линия с пустыми кругами) или в дцДНК (серая линия с заполненными кругами) согласно модели конденсации противоионов [20]

плексообразования в стандартных условиях ( $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$ ). С их использованием, применяя уравнения, соответствующие описанным в литературе или представленным здесь модельным приближениям, рассчитывали величины  $T_{пл}$  комплексов для заданной концентрации NaCl. Важно отметить, что для каждого приближения использовали те исходные количественные параметры и схемы расчетов, которые описаны в оригинальных работах. Для приближения, рассмотренного в данной работе, применяли опубликованные нами ранее унифицированные термодинамические параметры и характеристические величины, представленные в табл. 2.

Результаты сравнения точности прогностического расчета величин  $T_{пл}$  и характеристики тест-набора данных представлены в табл. 3 и в подписи к ней.

Из данных, представленных в табл. 3 и на рис. 1, Б, видно, что использование определенных нами параметров, представленных в этой работе и описанных ранее [10], обеспечивает наибольшую точность предварительного расчета  $T_{пл}$  комплементарных ДНК-комплексов в широком диапазоне  $[Na^+]$  по сравнению с представленными в литературе характеристиками.

Важно отметить, что предложенная здесь модель, описывающая взаимодействие одного типа противоионов с ДНК, может быть адаптирована для случая конкурентного связывания набора катионов, обладающих различным сродством к сайтам связывания в

биополимере. Представленные в литературе модели позволяют лишь косвенно учитывать эффекты добавочных катионов при предсказании термостабильности НК-комплексов. Так, в работе [32] предложено учитывать эффект катионов магния через концентрационный эквивалент катионов натрия. Такая модель определяет эмпирическую зависимость  $T_{пл}$  рассматриваемой выборки НК-комплексов при варьировании буферных условий в заданных пределах, но в то же время, не позволяет с уверенностью прогнозировать стабильность комплексов олигонуклеотидов за пределами указанных экспериментальных условий и оценивать эффекты, связанные с изменением структуры взаимодействующих олигомеров.

С помощью модели конденсации противоионов можно проводить анализ стабильности протяженных НК-комплексов в случае конкурентного взаимодействия двух типов катионов с ДНК, но только на качественном уровне [21]. Использование модели Пуассона – Больцмана, хотя и дает возможность оценить энергетические эффекты, однако, не позволяет установить аналитические зависимости, необходимые для рутинного расчета  $T_{пл}$  комплексов олигонуклеотидов в широком диапазоне концентраций конкурирующих катионов [25].

Предложенная в данной работе модель может быть расширена для описания влияния смеси конкурирующих противоионов ( $C_i^{z+}$ ) на термостабильность НК-комплексов. Для учета этого необходимо определить

Таблица 3

Сравнение точности предварительного расчета температуры плавления ДНК-комплексов, вошедших в тестовую базу данных\*, с помощью различных модельных описаний

Модель для учета зависимости $T_{пл}$ vs $[Na^+]$	Источник для расчета $\Delta H^\circ$ , $\Delta S^\circ$ в 1 М NaCl	Средняя величина ошибки расчета $T_{пл}$ , °C	Стандартное отклонение $T_{пл}$ (расчет.) от $T_{пл}$ (экспер.), °C
[15]	[14]	3,03	4,03
[14]	[14]	3,24	4,28
[25]	[14]	3,39	4,34
Данная работа	[10]	2,58	3,24

\* Тестовая база данных, сформированная в работе [15], состоит из 156 наборов, включающих последовательность взаимодействующих олигонуклеотидов, величины  $T_{пл}$  их комплекса, концентрации олигонуклеотидов и NaCl. Длина комплексов: 6÷30 п.о. GC-состав: 0÷100 %.  $T_{пл}$ : 21÷83 °C.  $[NaCl]$ : 0,011÷1,02 М.  $[Oлигонуклеотидов]$ :  $1,5 \cdot 10^{-3} \div 7 \cdot 10^{-7}$  М.

параметры, описывающие зависимость электростатической составляющей энтропии комплексообразования олигонуклеотидов, согласно уравнению

$$\Delta S_{el}^0 = R \cdot \ln \left( \prod_i [C_i^{z+}]^{\Delta n_{C_i}} \right), \quad (19)$$

где

$$\Delta n_{C_i^{z+}} = \Delta n_{AB}(C_i^{z+}) - (\Delta k_A(C_i^{z+}) + \Delta k_B(C_i^{z+})), \quad (20)$$

$$\Delta k_{A(B)}(C_i^{z+}) = L_{A(B)}(C_i^{z+}) \times \Delta k^0 \frac{K_{on}(C_i^{z+}) \cdot [C_i^{z+}]^{\Delta k_{C_i^{z+}}}}{1 + \sum_i K_{on}(C_i^{z+}) \cdot [C_i^{z+}]^{\Delta k_{C_i^{z+}}}}, \quad (21)$$

$$\Delta n_{AB}(C_i^{z+}) = L_{AB}(C_i^{z+}) \times \Delta n_{C_i^{z+}}^0 \frac{K_{дн}(C_i^{z+}) \cdot [Na]^{\Delta n_{C_i^{z+}}}}{1 + \sum_i K_{дн}(C_i^{z+}) \cdot [C_i^{z+}]^{\Delta n_{C_i^{z+}}}}, \quad (22)$$

при этом величины  $L_A$ ,  $L_B$  и  $L_{AB}$  вычисляются по (17) и (18).

Используя систему уравнений (3) и (17)–(22), возможно определить наблюдаемые величины относительной эффективности взаимодействия различных типов катионов с ДНК. Предварительно полученные результаты подтверждают применимость предложенной модели для описания эффектов, связанных с конкуренцией таких противоионов, как  $Mg^{2+}$  и  $Na^+$ , за связывание с ДНК (данные не приведены).

### Заключение

В данной работе представлено модельное описание зависимости термостабильности ДНК-комплексов нативных и «мостиковых» олигонуклеотидов от концентрации противоионов в растворе. Получены аналитические выражения, позволяющие с высокой точностью поводить предварительный расчет температуры плавления комплементарных комплексов в широком диапазоне концентраций NaCl (0,022–1,02 М). Описание основано на предположении о том, что катионы с различной эффективностью взаимодействуют с одно- и двухцепочечной ДНК, и результирующее число катионов, дополнительно конденсирующихся при образовании дуплекса, определяется текущими, при данной ионной силе раствора, степенями занятости сайтов связывания

противоионов в свободном состоянии олигонуклеотидов и в комплексе.

### Список литературы

1. *Heidenreich O., Sczakiel G.* Oligonucleotides // Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine: 2nd ed. / Ed. by R. A. Meyers. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005. Vol. 9. P. 413–433.
2. *Seeman N. C., Lukeman P. S.* Nucleic Acid Nanostructures: Bottom-up Control of Geometry on the Nanoscale // Rep. Prog. Phys. 2005. Vol. 68. P. 237–270.
3. *Breslauer K. J.* Methods for Obtaining Thermodynamic Data on Oligonucleotide Transition // Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology / Ed. by H.-J. Hinz. Berlin; Heidelberg; N. Y.; Tokyo: Springer-Verlag, 1986. Chapter 15. P. 402–427.
4. *SantaLucia J. Jr., Hicks D.* The Thermodynamics of DNA Structural Motifs // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2004. Vol. 33. P. 415–440.
5. *Naka№ S., Karimata H., Ohmichi T. et al.* The Effect of Molecular Crowding with Nucleotide Length and Cosolute Structure on DNA Duplex Stability // J. Am. Chem. Soc. 2004. Vol. 126. No. 44. P. 14330–14331.
6. *Веденов А. А., Дыхне А. М., Франк-Камеицкий М. Д.* Переход спираль-клубок в ДНК // УФН. 1971. Т. 105, вып. 3. С. 479–519.
7. *McTigue P. M., Peterson R. J., Kahn J. D.* Sequence-Dependent Thermodynamic Parameters for Locked Nucleic Acid (LNA)-DNA Duplex Formation // Biochemistry. 2004. Vol. 43. P. 5388–5405.
8. *Pyshnaya I. A., Pyshnyi D. V., Lomzov A. A. et al.* The Influence of the Non-Nucleotide Insert on the Hybridization Properties of Oligonucleotides // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2004. Vol. 23. No. 6–7. P. 1065–1071.
9. *Pyshnyi D. V., Lomzov A. A., Pyshnaya I. A. et al.* Hybridization of the Bridged Oligonucleotides with DNA: Thermodynamic and Kinetic Studies // J. Biomol. Struct. Dyn. 2006. Vol. 23. No. 5. P. 567–580.
10. *Ломзов А. А., Пышная И. А., Иванова Е. М. и др.* Термодинамические параметры для расчета стабильности комплексов мостиковых олигонуклеотидов // ДАН. 2006. Т. 409, вып. 2. С. 266–270.
11. *Lin Z., Hung K. N., Grollman A. P., Santos C. de los.* Solution Structure of Duplex DNA Containing an Extrahelical Abasic Site

Analog Determined by NMR Spectroscopy and Molecular Dynamics // *Nucleic Acids Res.* 1998. Vol. 26. No. 10. P. 2385–2391.

12. *Gray D. M., Tinoco I. Jr.* A New Approach to the Study of Sequence-Dependent Properties of Polynucleotides // *Biopolymers.* 1970. Vol. 9. P. 223–244.

13. *Mathews D. H., Sabina J., Zuker M. et al.* Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure // *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 288. No. 5. P. 911–940.

14. *SantaLucia J. Jr.* A Unified View of Polymer, Dumbbell, and Oligonucleotide DNA Nearest-Neighbor Thermodynamics // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95. No. 4. P. 1460–1465.

15. *Owczarzy R., You Y., Moreira B. G. et al.* Effects of Sodium Ions on DNA Duplex Oligomers: Improved Predictions of Melting Temperatures // *Biochemistry.* 2004. Vol. 43. No. 12. P. 3537–3554.

16. *Frank-Kamenetskii M. D., Lukashin A. V., Anshelevich V. V.* Application of Polyelectrolyte Theory to the Study of the B-Z Transition in DNA // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1985. Vol. 3. P. 35–42.

17. *Korolev N., Lyubartsev A. P., Rupprecht A. et al.* Competitive Binding of Mg(2+), Ca(2+), Na(+), and K(+) Ions to DNA in Oriented DNA Fibers: Experimental and Monte Carlo Simulation Results // *Biophys. J.* 1999. Vol. 77. No. 5. P. 2736–2749.

18. *Feig M., Pettitt B. M.* Sodium and Chlorine Ions as Part of the DNA Solvation Shell // *Biophys. J.* 1999. Vol. 77. No. 4. P. 1769–1781.

19. *Stein V. M., Bond J. P., Capp M. W. et al.* Importance of Coulombic end Effects on Cation Accumulation Near Oligoelectrolyte B-DNA: a Demonstration Using <sup>23</sup>Na NMR // *Biophys. J.* 1995. Vol. 68. No. 3. P. 1063–1072.

20. *Manning G. S.* The Molecular Theory of Polyelectrolyte Solutions with Applications to the Electrostatic Properties of Polynucleotides // *Q. Rev. Biophys.* 1978. Vol. 11. No. 2. P. 179–246.

21. *Франк-Каменецкий М. Д., Аншелевич В. В., Лукашин А. В.* Полиэлектrolитная модель ДНК // УФН. 1987. Т. 151, вып. 4. С. 595–618.

22. *Korolev N., Lyubartsev A. P., Nordenskiold L.* Application of Polyelectrolyte Theories for Analysis of DNA Melting in the Pres-

ence of Na<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup> Ions // *Biophys. J.* 1998. Vol. 75. No. 6. P. 3041–3056.

23. *Wilson R. W., Rau D. C., Bloomfield V. A.* Comparison of Polyelectrolyte Theories of the Binding of Cations to DNA // *Biophys. J.* 1980. Vol. 30. No. 2. P. 317–325.

24. *Stigter D.* Evaluation of the Counterion Condensation Theory of Polyelectrolytes // *Biophys. J.* 1995. Vol. 69. No. 2. P. 380–388.

25. *Tan Z. J., Chen S. J.* Nucleic Acid Helix Stability: Effects of Salt Concentration, Cation Valence and Size, and Chain Length // *Biophys. J.* 2006. Vol. 90. No. 4. P. 1175–1190.

26. *Rouzina I., Bloomfield V. A.* Competitive Electrostatic Binding of Charged Ligands to Polyelectrolytes: Practical Approach Using the Non-Linear Poisson-Boltzmann Equation // *Biophys. Chem.* 1997. Vol. 64. No. 1–3. P. 139–155.

27. *Франк-Каменецкий М. Д.* Рассмотрение перехода спираль-клубок в гомополимерах методом наиболее вероятного распределения // Молек. Биология. 1968. Т. 2, вып. 3. С. 408–419.

28. *Ландо Д. Ю., Иванова М. А., Ахрем А. А.* Влияние изменения стехиометрии комплекса ДНК-лиганд при тепловой денатурации ДНК на параметры перехода спираль-клубок // Молек. биология. 1980. Т. 14, вып. 6. С. 1281–1288.

29. *Кантор Ч., Шиммель П.* Биофизическая химия. М.: Мир, 1984, Т. 3.

30. *Record M. T. Jr., Anderson C. F., Lohman T.* Thermodynamic Analysis of Ion Effects on the Binding and Conformational Equilibria of Proteins and Nucleic Acids: the Roles of Ion Association or Release, Screening, and Ion Effects on Water Activity // *Q. Rev. Biophys.* 1978. Vol. 11. No. 2. P. 103–178.

31. *Nakano S., Fujimoto M., Hara H. et al.* Nucleic Acid Duplex Stability: Influence of Base Composition on Cation Effects // *Nucleic Acids Res.* 1999. Vol. 27. No. 14. P. 2957–2965.

32. *Ahsen N. von, Wittwer C. T., Schutz E.* Oligonucleotide Melting Temperatures under PCR Conditions: Nearest-Neighbor Corrections for Mg(2+), Deoxynucleotide Triphosphate, and Dimethyl Sulfoxide Concentrations with Comparison to Alternative Empirical Formulas // *Clin. Chem.* 2001. Vol. 47. No. 11. P. 1956–1961.

33. *Anastassopoulou J.* Metal–DNA Interactions // *J. Mol. Struct.* 2003. Vol. 651–653. P. 19–26.

34. Kankia B. I., Buckin V., Bloomfield V. A. Hexamminecobalt(III)-Induced Condensation of Calf Thymus DNA: Circular Dichroism and Hydration Measurements // *Nucleic Acids Res.* 2001. Vol. 29. No. 13. P. 2795–2801.
35. Petersheim M., Turner D. H. Base-Stacking and Base-Pairing Contributions to Helix Stability: Thermodynamics of Double-Helix Formation with CCGG, CCGGp, CCGGAp, ACCGGp, CCGGUp, and ACCGGUp // *Biochemistry.* 1983. Vol. 22. P. 256–263.
36. Lokhov S. G., Pyshnyi D. V. Thermodynamic and spectral properties of DNA miniduplexes with the terminal GA mismatches and 3' or 5' dangling bases // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 420. P. 134–138.
37. Patel D. J., Hilbers C. W. Proton Nuclear Magnetic Resonance Investigations of Fraying in Double-Stranded d-ApTpGpCpApT in H<sub>2</sub>O Solution // *Biochemistry.* 1975. Vol. 14. No. 12. P. 2651–2656.
38. Williams A. P., Longfellow C. E., Freier S. M. *et al.* Laser Temperature-Jump, Spectroscopic, and Thermodynamic Study of Salt Effects on Duplex Formation by dGCATGct // *Biochemistry.* 1989. Vol. 28. P. 4283–4291.
39. Bower M., Summers M. F., Kell B. *et al.* Synthesis and Characterization of Oligodeoxyribonucleotides Containing Terminal Phosphates. NMR, UV Spectroscopic and Thermodynamic Analysis of Duplex Formation of [d(pGGAATTCC)]<sub>2</sub>, [d(GGAATTCCp)]<sub>2</sub> and [d(pGGAATTCCp)]<sub>2</sub> // *Nucleic Acids Res.* 1987. Vol. 15. No. 8. P. 3531–3547.
40. Reuben J., Shporer M., Gabbay E. J. The Alkali Ion-DNA Interaction as Reflected in the Nuclear Relaxation Rates of Na<sup>+</sup> and Rb<sup>+</sup> // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975. Vol. 72. No. 1. P. 245–247.

Материал поступил в редколлегию 12.10.2007

**A. A. Lomzov, D. V. Pyshnyi**

**Calculating Melting Temperature of Native and Modified Oligonucleotide Complexes at Various Cation Concentrations with the Use of Enhanced Counterion Condensation Model**

A new model describing the influence of ionic strength on thermal stability of DNA complexes of oligonucleotides is proposed. This model assumes that binding of cations with DNA polyanions influences solely the entropy of hybridization and has a saturating mode. The efficacy of counterion binding with single- and double-stranded DNA is different, and the number of cations which bind additionally with the oligonucleotide at duplex formation depends on bulk cation concentration. Analytical equations describing the influence of cation concentration on melting temperature of DNA-duplexes as function of the length of oligonucleotide, its GC-composition and presence of the modification (non-nucleotide insert) were obtained. The values of melting temperature ( $T_m$ ) and thermodynamic parameters ( $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$ ) characterizing the hybridization of both native and «bridged» oligonucleotides (bearing non-nucleotide insert on the basis of diethylene glycol phosphodiester) with DNA in various concentrations of NaCl (0,01÷1 M) were obtained using the UV-melting technique. Based on both the data obtained and presented in literature the database (695 data sets) characterizing the influence of ionic strength on the thermal stability of oligonucleotide complexes of various structure is developed. The database analysis allows us to obtain the values of the equilibrium binding constants for condensation of cations on DNA and the number of ions required for saturation of a discrete binding site. The proposed enhanced model of cation condensation utilizing unified thermodynamic increments of dsDNA formation allows us to calculate melting temperatures of DNA-duplexes in the wide range of ionic strength ( $[Na^+] = 0,01\div 1$  M) with high accuracy.

**Keywords:** DNA duplex, oligonucleotide complexes, thermal stability, ionic strength, cation condensation.