

УДК [536.7:544-971.62:577.323]:577.113.4/.7

Н. С. Филиппов^{1,2,3}, **А. А. Ломзов**^{1,2}, **Д. В. Пышный**¹

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

² Новосибирский государственный университет
ул. Пирогова 2, Новосибирск, 630090, Россия

³ Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова СО РАН
пр. Акад. Лаврентьева, 13, Новосибирск, 630090, Россия

E-mail: lomzov@niboch.nsc.ru

ВЛИЯНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДА-СТОППЕРА НА РАЗМЕР И ТЕРМИЧЕСКУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ КОНКАТЕМЕРНЫХ ДНК-КОМПЛЕКСОВ

Многокомпонентные полимерные ассоциаты на основе нуклеиновых кислот успешно используют в качестве доставщиков лекарств и генов в клетки, при манипуляциях с рестрикционными фрагментами ДНК, а также в качестве усилителей сигнала молекулярной гибридизации. Однако особенности формирования таких систем не достаточно изучены. В данной работе проведено экспериментальное исследование влияния компонента, обрывающего рост конкатемерной цепи, на длину и термическую стабильность многокомпонентного комплекса. Показано, что добавление к полимерному комплексу, состоящему из двух типов олигонуклеотидов, олигонуклеотида-стоппера приводит к уменьшению длины конкатемерных комплексов пропорционально концентрации обрывающего рост цепи компонента. Исследование термостабильности таких ДНК-структур показало, что влияние стоппера на температуру плавления имеет концентрационный характер. Предложена модель, которая позволит прогнозировать термостабильность, распределение по длине и длину конкатемерного комплекса, построенного из двух олигонуклеотидов в присутствии стоппера, вклад которого в наблюдаемую интенсивность сигнала максимален.

Ключевые слова: конкатемерные структуры, ДНК, термодинамика, олигонуклеотиды, самоассоциация, стоппер.

Введение

Полимерные комплексы олигомеров нуклеиновых кислот (НК) все сильнее привлекают внимание в связи с их особыми молекулярно-биологическими свойствами. Многокомпонентные структуры на основе НК успешно используются в качестве доставщиков лекарств и генов в клетки [1–3], при манипуляциях с рестрикционными фрагментами дезоксирибонуклеиновых ки-

слот (ДНК) [4; 5], а также в качестве усилителей сигнала молекулярной гибридизации [5]. Такие структуры могут быть сформированы как непосредственно олигонуклеотидами с образованием линейных ассоциатов – конкатемеров [1; 2; 7], разветвленных ассоциатов – дендримеров [6; 8], так и с участием разнообразных молекул-посредников, например, при создании гидрогелей на основе ДНК [9]. Новым перспективным направлением развития является ДНК-нано-

* Работа поддержана Лаврентьевским конкурсом молодежных проектов СО РАН, программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», грантами РФФИ (№ 10-04-01492-а), НШ 7101.2010.4, ГК № П1073 и Междисциплинарными интеграционными проектами (№ 39 и 76).

Авторы выражают благодарность Т. Ю. Бушуевой за синтез олигонуклеотидов.

архитектоника, в основе которой лежит принцип направленной сборки коротких олигонуклеотидов в полимерные комплексы, имеющие заданную пространственную конфигурацию [10; 11].

Размер, заряд, гидрофобные и некоторые другие характеристики полимеров в значительной степени влияют на эффективность их использования. Возможность прогнозирования и направленного регулирования физико-химических свойств поликомпонентных структур на основе НК позволяет применять их более эффективно.

Ранее нами были детально охарактеризованы термодинамические свойства конкатемерных комплексов ДНК, состоящих из двух типов олигонуклеотидов, в зависимости от нуклеотидной последовательности олигомеров [7]. На эффективность образования протяженных комплексов НК можно влиять посредством добавления в равновесную систему конкатемерных структур стопперов – коротких олигонуклеотидов, обрывающих рост полимерной цепи путем комплементарного взаимодействия с одним из концевых одноцепочечных фрагментов конкатемерного комплекса.

Целью данной работы было исследовать влияние стоппера на размер и термическую стабильность конкатемерных комплексов ДНК.

Материалы и методы

Синтез и выделение нативных олигонуклеотидов проводили на автоматическом ДНК-синтезаторе ASM-800 (Biosset, Россия) в соответствии с [12]. Гомогенность олигонуклеотидов подтверждали с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях (20 % ПААГ, 8 М мочевины, 50 мМ трис-борат (pH 8,3), 0,1 мМ Na₂ЭДТА). Концентрацию олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически, используя суммарные величины оптического поглощения моно- и динуклеотидов (на длине волны 260 нм) [13]. УФ-спектры водных растворов олигонуклеотидов записывали на спектрофотометре Shimadzu UV-2100 (Shimadzu, Япония) при 25 °С.

Исследование термической денатурации олигонуклеотидных дуплексов проводили с использованием спектрофотометра Cary 300 Bio Melt (Varian Inc., Австралия), оборудованного терморегулируемым шестисекци-

онным держателем для кварцевых кювет (Varian Inc., Австралия). Показания температурного датчика прибора Cary 300 Bio Melt были откалиброваны с использованием термодатчиков Temperature Probes Series II (Varian Inc., Австралия).

Образцы олигонуклеотидов готовили на основе буферного раствора, содержащего 1 М NaCl, 0,01 М фосфат натрия (pH 7,2), 0,1 мМ Na₂ЭДТА (стандартные условия). Непосредственно перед экспериментом проводили нагрев образцов до 100 °С с последующим охлаждением до комнатной температуры.

Исследования электрофоретической подвижности олигонуклеотидов и их ассоциатов методом задержки в геле в неденатурирующих условиях проводили в 10 % полиакриламидном геле (акриламид : N,N'-метиленабисакриламид = 30 : 1) в буферных условиях 50 мМ трис-борат (pH 8,3), 0,1 мМ Na₂ЭДТА. Напряженность электрического поля составляла около 17 В/см. Температуру геля поддерживали с помощью специализированного держателя и водного термостата-циркулятора LKB Bromma 2219 Multitemp II (LKB Bromma, Швеция). В качестве маркеров длины двухцепочечных ДНК (дцДНК) использовали дуплексы длиной 15, 20, 32 пары оснований, сформированные синтетическими олигонуклеотидами, и коммерческий набор фрагментов дцДНК длиной от 100 до 1 000 пар оснований (СибЭнзим, Россия). Нуклеотидный материал в геле визуализировали: радиоактивно меченую ДНК – экспонированием на рентгеновскую пленку, немеченую – обработкой геля красителем Stains-all (Sigma, США). Изображения сканировали и анализировали с помощью программы «Gel-Pro Analyzer 4.0» (Media Cybernetics, США). Образцы готовили в тех же буферных условиях (50 мМ трис-борат (pH 8,3), 0,1 мМ Na₂ЭДТА). Затем производили нагрев образцов до 100 °С и инкубацию при температуре эксперимента в течение часа. В качестве радиоактивной метки использовали [³²P]-меченый фосфатный остаток, который вводили на 5'-конец олигонуклеотида используя [γ -³²P]-АТФ (ИХБФМ СО РАН) [14].

Результаты

Теоретическая часть. Формирование полимерной структуры при ассоциации двух

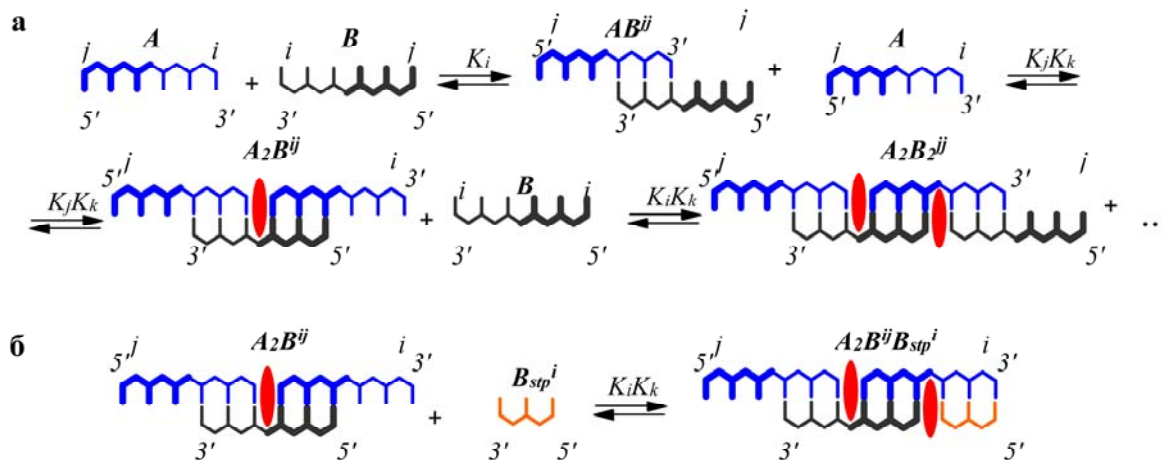


Рис. 1. Схема формирования конкатемерных структур при ассоциации двух различных олигонуклеотидов (а) и в присутствии стоппера (б). Овалом обозначено формирование кооперативного контакта на стыке дуплексных структур

различных олигонуклеотидов может быть описано согласно схеме, представленной на рис. 1, а [7].

В структуре компонентов A и B имеются два участка: i и j . Одноименные участки олигонуклеотидов комплементарны и расположены таким образом, что при формировании ими комплекса ($AB^{ii(jj)}$) образуются дуплексные структуры с двумя одноцепочечными нависаниями $ii(jj)$ (липкими концами). Благодаря наличию одноцепочечных участков в составе комплекса возможно последующее присоединение олигонуклеотидов (или их комплексов) и рост полимерной цепи. При добавлении короткого компонента, обрывающего рост полимерной цепи, к данной равновесной схеме добавляется еще ряд комплексов, содержащих стоппер (B_{stp}^i) и имеющих в своей структуре только один липкий конец (например, рис. 1, б).

В соответствии с представленной термодинамической схемой можно выделить четыре типа конкатемерных структур, формируемых только олигонуклеотидами A и B : $A_n B_n^{ii}$, $A_n B_n^{jj}$, $A_{n+1} B_n^{ij}$, $A_n B_{n+1}^{ij}$; и два типа, образованных с участием стоппера B_{stp} : $[A_n B_{n-1}^{ij} B_{\text{stp}}^i]$ и $[A_n B_n^{ii} B_{\text{stp}}^i]$. Верхний индекс обозначает тип липких концов, присутствующих у данного комплекса, а нижний ($n = 1, 2, \dots, \infty$) – количество молекул данного олигонуклеотида в полимерном комплексе. Концентрация каждого вида конкатемерно-

го комплекса может быть выражена через концентрации олигонуклеотидов A и B , находящихся в свободном состоянии ($[A]$ и $[B]$ соответственно):

$$\begin{aligned}
 [A_n B_n^{ii}] &= K_k^{2n-2} K_i^{n-1} K_j^n [A]^n [B]^n, \\
 [A_n B_n^{jj}] &= K_k^{2n-2} K_i^n K_j^{n-1} [A]^n [B]^n, \\
 [A_{n+1} B_n^{ij}] &= K_k^{2n-1} K_i^n K_j^n [A]^{n+1} [B]^n, \\
 [A_n B_{n+1}^{ij}] &= K_k^{2n-1} K_i^n K_j^n [A]^n [B]^{n+1}, \\
 [A_n B_{n-1}^{ij} B_{\text{stp}}^i] &= K_i K_k [A_n B_{n-1}^{ij}] [B_{\text{stp}}^i] = \\
 &= K_k^{2n-2} K_i^n K_j^{n-1} [A]^n [B]^{n-1} [B_{\text{stp}}^i], \\
 [A_n B_n^{ii} B_{\text{stp}}^i] &= K_i K_k [A_n B_n^{ii}] [B_{\text{stp}}^i] = \\
 &= K_k^{2n-1} K_i^n K_j^n [A]^n [B]^n [B_{\text{stp}}^i],
 \end{aligned}$$

где K_i , K_j , K_k – константы равновесия образования дуплексной структуры i -типа, j -типа и константа равновесия образования кооперативного контакта на стыке дуплексных структур i и j , соответственно. Константы равновесия зависят от температуры и связаны с термодинамическими параметрами образования отдельных структурных элементов комплекса (изменением свободной энергии Гиббса ΔG_{37}^0 , энтальпии ΔH^0 и энтропии ΔS^0) согласно уравнению Вант-Гоффа:

$$K_i(T) = \exp\left(-\frac{\Delta G_i^0(T)}{RT}\right) = \exp\left(-\frac{\Delta H_i^0 - \Delta S_i^0 T}{RT}\right),$$

где $l = i, j, k$; R – универсальная газовая постоянная; T – температура (К).

Используя уравнения материального баланса для олигонуклеотидов A , B и B_{stp} :

$$\left\{ \begin{array}{l} [A]_0 = \sum_{n=1}^{\infty} [A_n B_n^{ii}] \cdot n + \sum_{n=1}^{\infty} [A_n B_n^{jj}] \cdot n + \sum_{n=1}^{\infty} [A_{n+1} B_n^{jj}] \cdot (n+1) + \sum_{n=1}^{\infty} [A_n B_{n+1}^{ij}] \cdot n + \\ + \sum_{n=1}^{\infty} [A_n B_{n-1}^{ij} B_{\text{stp}}^i] \cdot n + \sum_{n=1}^{\infty} [A_n B_n^{ii} B_{\text{stp}}^i] \cdot n + [A], \\ [B]_0 = \sum_{n=1}^{\infty} [A_n B_n^{ii}] \cdot n + \sum_{n=1}^{\infty} [A_n B_n^{jj}] \cdot n + \sum_{n=1}^{\infty} [A_{n+1} B_n^{jj}] \cdot n + \sum_{n=1}^{\infty} [A_n B_{n+1}^{ij}] \cdot (n+1) + \\ + \sum_{n=1}^{\infty} [A_n B_{n-1}^{ij} B_{\text{stp}}^i] \cdot (n-1) + \sum_{n=1}^{\infty} [A_n B_n^{ii} B_{\text{stp}}^i] \cdot n + [B], \\ [B_{\text{stp}}^i]_0 = \sum_{n=1}^{\infty} [A_n B_{n-1}^{ij} B_{\text{stp}}^i] + \sum_{n=1}^{\infty} [A_n B_n^{ii} B_{\text{stp}}^i] + [B_{\text{stp}}^i], \end{array} \right.$$

можно показать, что после вычисления сумм, для нахождения равновесных концентраций $[A]$ и $[B]$, необходимо решить систему двух алгебраических уравнений:

$$\begin{cases} [A]_0 = X_1 + [B_{\text{stp}}^i]_0 Y_1, \\ [B]_0 = X_2 + [B_{\text{stp}}^i]_0 Y_2, \end{cases} \quad (1.1)$$

где

$$\begin{aligned} X_1 &= \frac{[A] + [A][B](K_i + K_j + K_k K_i K_j ([B] + [A](1 - K_k)(2 - K_k^2 K_i K_j [A][B])))}{(1 - K_k^2 K_i K_j [A][B])^2} \\ Y_1 &= \frac{[A]K_i (1 + K_k K_j [B])}{(1 + K_i [A] + K_k K_i K_j [A][B] (1 - K_k)) \cdot (1 - K_k^2 K_i K_j [A][B])} \\ X_2 &= \frac{[B] + [A][B](K_i + K_j + K_k K_i K_j ([A] + [B](1 - K_k)(2 - K_k^2 K_i K_j [A][B])))}{(1 - K_k^2 K_i K_j [A][B])^2} \\ Y_2 &= \frac{[A][B]K_k K_i K_j (1 + K_k K_i [A])}{(1 - K_k^2 K_i K_j [A][B]) \cdot (1 + K_i [A] + K_k K_i K_j [A][B] (1 - K_k))} \end{aligned} \quad (1.2)$$

В данной системе уравнений слагаемые X_1 и X_2 характеризуют образование конкатемерных структур, не содержащих стоппер, а Y_1 и Y_2 – содержащих короткий компонент, обрывающий рост полимерной цепи.

Текущую концентрацию стоппера можно рассчитать, зная концентрации олигонуклеотидов A и B в свободном состоянии и константы взаимодействий в конкатемерном комплексе:

$$[B_{\text{stp}}^i] = \frac{[B_{\text{stp}}^i]_0 (1 - [A][B]K_k^2 K_i K_j)}{1 + [A]K_i + [A][B]K_k K_i K_j (1 - K_k)}$$

Отметим, что в случае отсутствия стоппера ($[B_{\text{stp}}^i]_0 = 0$) система уравнений (1) сво-

дится к полученной нами ранее для случая формирования конкатемерного комплекса без ограничения длины [7].

Количественный анализ экспериментальных кривых термической денатурации полимерных комплексов олигонуклеотидов в присутствии стоппера, полученных путем регистрации изменения оптического поглощения в ультрафиолетовой области спектра (260–280 нм), возможен только в случае построения теоретической зависимости. Аналогично работе [7] в структуре полимерных комплексов можно выделить двухцепочечные и одноцепочечные (концевые) участки (рис. 2).

Эти участки могут быть четырех типов: двухцепочечные (ds) i - и j -типа, и одноцепочечные (ss), также i - и j -типа. Вводя коэффициент молярного поглощения для каждого участка (ϵ_{ds}^i , ϵ_{ds}^j , ϵ_{ss}^i , ϵ_{ss}^j), поглощение конкатемерной структуры ($A(T)$) можно представить в виде суммы поглощений каждого из входящих в нее фрагментов. Тогда полное поглощение может быть представлено в виде суммы произведений поглощений каждого комплекса на его концентрацию:

$$\begin{aligned}
 A(T) = & \sum_{n=1}^{\infty} (\epsilon(A_n B_n^{ii}) \cdot [A_n B_n^{ii}] + \epsilon(A_n B_n^{jj}) \cdot [A_n B_n^{jj}] + \\
 & + \epsilon(A_{n+1} B_n^{ij}) \cdot [A_{n+1} B_n^{ij}] + \epsilon(A_n B_{n+1}^{ji}) \cdot [A_n B_{n+1}^{ji}] + \\
 & + \epsilon(A_n B_{n-1}^{i_{\text{stp}}}) \cdot [A_n B_{n-1}^{i_{\text{stp}}}] + \\
 & + \epsilon(A_n B_n^{ii} B_{\text{stp}}^i) \cdot [A_n B_n^{ii} B_{\text{stp}}^i] + (\epsilon_{ss}^i + \epsilon_{ss}^j) \cdot [A] + \\
 & + (\epsilon_{ss}^i + \epsilon_{ss}^j) \cdot [B] + \epsilon_{\text{stp}}^i \cdot [B_{\text{stp}}^i].
 \end{aligned}$$

Известно, что оптическое поглощение олигонуклеотида, находящегося в определенной форме (одноцепочечной или двухцепочечной, ϵ_{ss}^i , ϵ_{ss}^j , ϵ_{ds}^i , ϵ_{ds}^j), линейно зависит от температуры [15]:

$$\epsilon_p^l(T) = a_p^l + b_p^l \cdot T,$$

где $l = i, j$, $p = ss, ds$.

Для построения зависимости оптического поглощения от термодинамических параметров формирования дуплексных компонент необходимо найти величины концентраций олигонуклеотидов в свободном состоянии ($[A]$ и $[B]$), т. е. решить систему уравнений (1). Она является системой уравнений пятой степени и не имеет аналитического решения. Численное решение данной системы уравнений затруднено, так как проведенный нами анализ показал, что оно имеет чрезвычайно узкую область сходимости. Нами проводится дальнейший анализ данной системы уравнений с целью найти пути численного решения или ее возможных упрощений.

Помимо термической стабильности, чрезвычайно важным свойством конкатемерных комплексов является распределение полимерных форм по длине. Экспериментальное исследование влияния стоппера на распределение конкатемерных комплексов по длинам проводили методом задержки в геле. Для регистрации комплексов проводили радиоактивное мечение только одного из компонентов комплекса. Таким образом, интенсивность сигнала на радиоавтографе

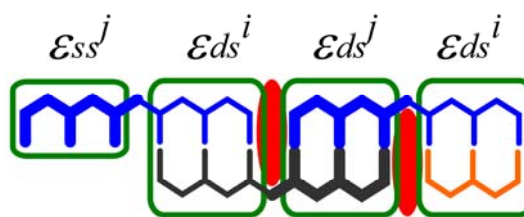


Рис. 2. «Блочная» структура конкатемерного комплекса $A_2 B^{ii} B_{\text{stp}}^i$, характеризующая особенности поглощения света одноцепочечным (ϵ_{ss}^i) и двухцепочечными (ϵ_{ds}^i , ϵ_{ds}^j) участками в его составе

геля пропорциональна количеству молекул этого олигонуклеотида, содержащихся в комплексе. Если в комплексе $[A_n B_m]$ олигонуклеотид A содержит метку, то интенсивность сигнала от такого комплекса будет пропорциональна произведению $[A_n B_m] \cdot n$. Однако в системе может быть несколько комплексов одной длины, которые обладают одинаковой или очень близкой электрофоретической подвижностью. Тогда необходимо проводить суммирование по всем комплексам одинаковой длины. В этом случае интенсивность сигнала будет описываться зависимостью

$$f(N = n + m) = \text{const} \cdot \frac{\sum ([A_n B_m] \cdot n)}{[A]_0}. \quad (2)$$

Нормировочный член const введен для масштабирования величины регистрируемого сигнала. В случае конкатемерного комплекса со стоппером в данной формуле необходимо заменить $[A_n B_m]$ на $[A_n B_m^{ii} B_{\text{stp}}^i]$.

Функция (2) имеет максимум в точке:

$$N_{\text{max}} = -\frac{2}{\ln(K_k^2 K_i K_j [A][B])} + \Delta.$$

Величина Δ может принимать значения от 0 до $\frac{1}{2}$ включительно в зависимости от рассматриваемого комплекса и концентрации стоппера. Значение N_{max} характеризует длину конкатемерного комплекса, вклад которого в наблюдаемую интенсивность сигнала максимален.

Как правило, интерес представляют такие экспериментальные условия, в которых значения $N_{\text{max}} \gg 1$. В этом случае величиной Δ можно пренебречь.

Экспериментальная часть. Для исследования свойств конкатемерных комплексов, формирующихся в присутствии стоппера, нами была сконструирована модельная система, состоящая из олигомеров длиной 24 нуклеотида, формирующих конкатемерный комплекс

M24:
5'-GGAAGTCCAGCCCCATGGATGATG-3',

N24:
5'-GGCTGGACTTCCCATCATCCATGG-3',

и стоппера, содержащего 16 нуклеотидов

S16:
5'-TTTTCATCATCCATGG-3'.

Исследование влияния стоппера на распределение конкатемерных комплексов по длине проводили методом задержки в геле в

неденатурирующих условиях. В процессе движения [32 P]-меченых комплексов олигонуклеотидов в геле, они распределяются согласно своей электрофоретической подвижности, определяемой их линейными размерами. Видно, что при увеличении концентрации терминирующего агента распределение конкатемерных комплексов по длине смещается в сторону низкомолекулярных структур (рис. 3, дорожки 4–9).

При увеличении концентрации стоппера концентрация высокомолекулярных структур ($A_n B_n^i B_{\text{stp}}^i$) снижается, а низкомолекулярных ($AB^i B_{\text{stp}}^i$) увеличивается. Для некоторых форм, например $A_4 B_3^i B_{\text{stp}}^i$, функция распределения в зависимости от концентрации стоппера проходит через максимум. Таким образом, можно подобрать оптимальную концентрацию стоппера, которая будет соответствовать нужному значению N_{max} при заданной температуре.

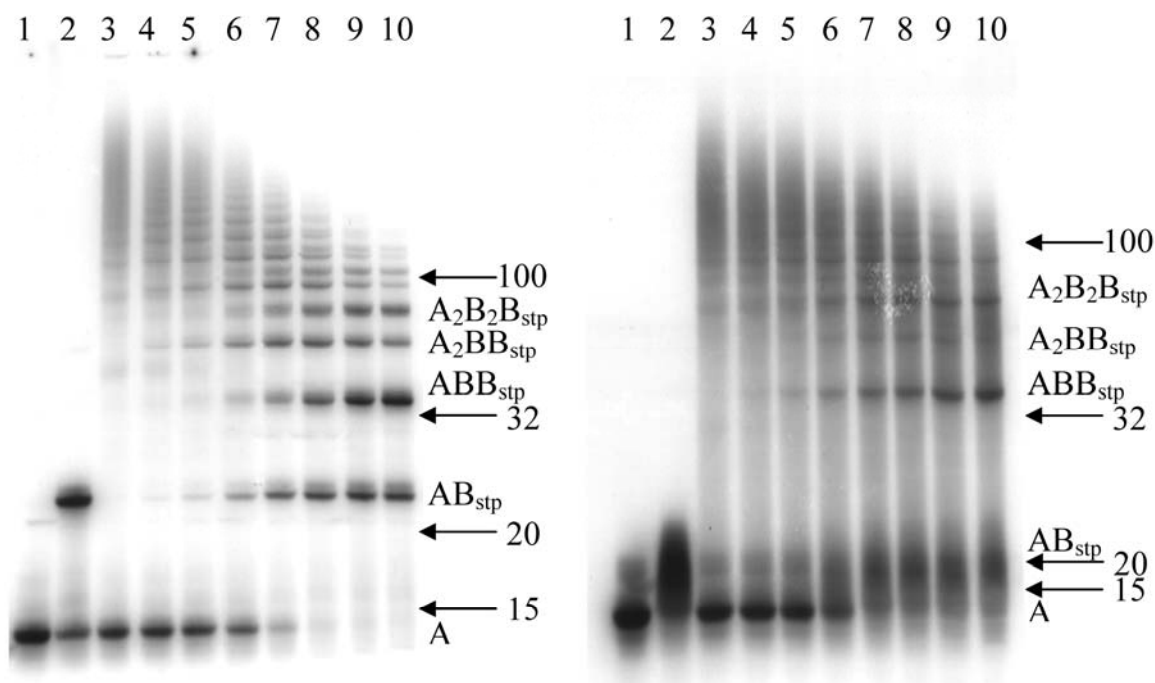


Рис. 3. Радиоавтограф экспериментов по задержке в геле конкатемерных комплексов со стоппером при 5 °С (слева) и 25 °С (справа). Номера дорожек соответствуют олигонуклеотиду **M24** – (1); комплексам: **M24/S16**, взятым в отношении концентраций 1 : 1 – (2); **M24/N24/S16**, взятым в отношении концентраций 1 : 1 : x , где $x = 0, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10$ – (3)–(10). Концентрация компонента **M24** во всех случаях составляла 5 мкМ. Справа от каждого радиоавтографа приведены размеры маркеров длины в парах оснований и структуры комплексов, соответствующих полосам ($A = \mathbf{M24}$, $B = \mathbf{N24}$, $B_{\text{stp}} = \mathbf{S16}$)

Проведено исследование влияния температуры на распределение по длине комплексов олигонуклеотидов. Результаты обработки радиоавтографов гелей приведены на рис. 4. Видно, что происходит уменьшение длин полимерных комплексов с увеличением температуры. Максимумы, соответствующие низкомолекулярным структурам, выше у кривой 2 (15 °С), а высокомолекулярным – у кривой 3 (5 °С). Кривая 1 на рис. 3 выпадает из этого описания из-за высокого уровня фонового сигнала на этой кривой. Это, вероятно, является результатом нестабильности комплексов в условиях электрофореза при данной температуре, что приводит к распаду комплексов и уширению полос, соответствующих отдельным конкатемерным комплексам. Температура плавления такого комплекса, измеренная нами при той же концентрации олигонуклеотидов и в тех же буферных условиях, что использовали при проведении экспериментов по задержке в геле, составила около 32 °С. Однако, помимо этого, необходимо учитывать влияние матрикса геля, который может уменьшать наблюдаемую стабильность комплекса [16].

Исследование влияния стоппера на стабильность конкатемерных структур проводили методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала. Определена термостабильность комплексов олигонуклеотидов **M24/N24** (см. таблицу) в отсутствие и при наличии стоппера **S16** (рис. 5). Из представленных на рис. 5 дифференциальных кривых плавления видно, что при увеличении концентрации стоппера наблюдается разделение перехода на два. Появление низкотемпературного перехода обусловлено влиянием концентрации короткого олигонуклеотида на термостабильность межмолекулярных комплексов [17]: концентрация участков *j* олигонуклеотида **N24** уменьшается при постоянстве количества участков *j* олигомера **M24**, в то время как суммарная концентрация участков *i* всех олигомеров остается неизменной. Разница в амплитуде переходов возникает также в результате изменения концентрации взаимодействующих компонент. Кроме того, положение максимума дифференциальной кривой плавления практически не изменяется при добавлении стоппера (незначительное изменение положения максимума при наибольшей концентрации стоппера проис-

ходит из-за влияния второго перехода), что означает равенство температур плавления комплексов сформированных с участием стоппера и без него.

Термодинамические параметры, определенные методом оптимизации кривых термической денатурации конкатемерных комплексов, не содержащих стоппер, с использованием разработанной модели (1) в приближении $[B_{stp}^i]_0 = 0$, $K_i = K_j$, $K_k = 1$ [7], представлены в таблице.

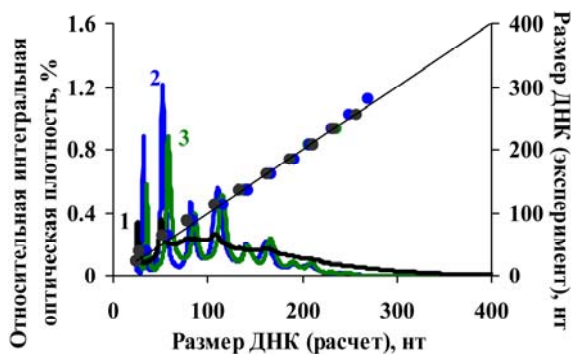


Рис. 4. Зависимость интенсивности относительной интегральной оптической плотности от длины комплекса **M24/N24/S16** (1 : 1 : 10), полученная путем обработки радиоавтографов гелей после проведения электрофоретических анализов конкатемерных структур при температурах 5, 15 и 25 °С (кривые 3, 2 и 1 соответственно), и калибровочные зависимости (по правой оси), характеризующие корреляцию истинной длины дцДНК-фрагментов и их размера, рассчитанного на основании анализа электрофоретической подвижности

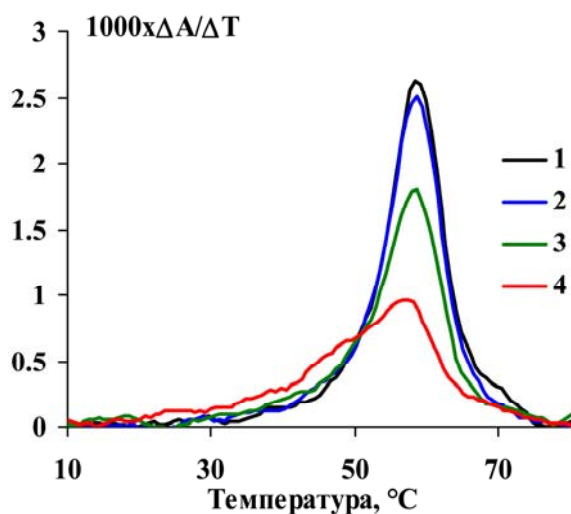


Рис. 5. Кривые термической денатурации комплекса олигонуклеотидов **M24/N24/S16**, взятых в соотношениях: 1 – 1 : 1 : 0; 2 – 1 : 0,833 : 0,166; 3 – 1 : 0,5 : 0,5; 4 – 1 : 0,166 : 0,833. Концентрация компонента **M24** составляла 2,5 мкМ

Экспериментальные и рассчитанные в соответствии с [18] термодинамические параметры формирования комплексов в стандартных условиях

| Нуклеотидная последовательность комплекса | ΔH^0 , ккал моль | ΔS^0 , ккал моль · К | ΔG^0 , ккал моль | $T_{пл}$, °С |
|---|--|---|--|------------------------------------|
| M24: 5'-GGAAGTCCAGCCCCATGGATGATG N24: 5'-GGCTGGACTTCCCATCATCCATGG | -75,5 ± 8 ¹ -53 ± 6 ² -89 ± 9 ³ | -202 ± 20 -152 ± 15 -244 ± 25 | -12,8 ± 1,3 -6,2 ± 0,5 -13,4 ± 1,3 | 58,0 31,8 55,6 |
| 5'-GGAAGTCCAGCC-3' ⁴ 3'-CCCTCAGGTCGG-5' | -91 ± 9 | -247 ± 24 | -14,3 ± 1,4 | 58,6 |
| 5'-CCATGGATGATG-3' ⁵ 3'-GGTACCTACTAC-5' | -87 ± 9 | -241 ± 24 | -12,5 ± 1,3 | 52,4 |

¹ Жирным шрифтом выделены экспериментально полученные величины.

² Данные получены для буферных условий, соответствующих экспериментам по задержке в геле.

³ Среднее значение термодинамических параметров, рассчитанных для двух дуплексных элементов конкатемерного комплекса.

⁴ Комплекс, соответствующий дуплексному элементу конкатемерной структуры *i*.

⁵ Комплекс, соответствующий дуплексному элементу конкатемерной структуры *j*.

Температура плавления в стандартных буферных условиях рассчитана при концентрации каждого из олигонуклеотидов 2,5 мкМ. В буферных условиях экспериментов по задержке в геле – 5 мкМ.

Видно, что экспериментально полученные данные хорошо коррелируют с величинами, рассчитанными в приближении ближайших соседей [18]. Некоторая разница между ними объясняется тем, что термодинамические параметры комплексов **M12*i*/N12*i*** и **M12*j*/N12*j*** несколько различаются, а следовательно, различаются и кривые термической денатурации этих комплексов. При сложении кривых диссоциации результирующая кривая несколько уширяется, что приводит к снижению наблюдаемой энтальпии комплексообразования. Таким образом, можно использовать данную модель при прогностическом расчете термической стабильности конкатемерных комплексов, содержащих в своей структуре компонент, обрывающий рост полимерной цепи. При этом необходимо учитывать концентрации взаимодействующих компонентов.

Заключение

В данной работе исследовано влияние компонента, обрывающего рост конкате-

мерной цепи, на размер полимерного комплекса и его термическую стабильность. С использованием модельной системы, содержащей два двадцатичетырехзвенные олигонуклеотида, показано, что добавление стоппера к двухкомпонентному конкатемерному комплексу приводит к уменьшению его длины пропорционально концентрации короткого компонента. Исследование термической стабильности таких дуплексных ДНК-структур показало, что влияние стоппера на температуру плавления имеет концентрационный характер: снижение концентрации участков *i* в растворе приводит к снижению температуры плавления дуплекса, образованного с его участием. Предложена теоретическая модель, которая позволит прогнозировать термостабильность, распределение по длине и размер конкатемерного комплекса, построенного из двух олигонуклеотидов в присутствии стоппера, вклад которого в наблюдаемую интенсивность сигнала максимален. С использованием данной модели возможен анализ экспериментальных данных, полученных методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала, и определение термодинамических параметров (изменение энтальпии, энтропии и свободной энергии Гиббса) формирования отдельных структурных элементов в составе

конкатемерного комплекса. Полученные результаты являются фундаментом, используя который можно направленно конструировать линейные полимерные комплексы нуклеиновых кислот, обладающие заданным характерным размером, с возможностью его направленного регулирования в сторону уменьшения длины полимера независимо от условий гибридизации и гибридизационных свойств компонент конкатемерного комплекса.

Список литературы

1. Simonova O. N., Vladimirova A. V., Zenkova M. A. et al. Enhanced Cellular Binding of Concatemeric Oligonucleotide Complexes // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2006. Vol. 1758. No 3. P. 413–418.
2. Gusachenko-Simonova O. N., Pishnyi D. V., Vlassov V. V. et al. Modified Concatemeric Oligonucleotide Complexes: New System for Efficient Oligonucleotide Transfer into Mammalian Cells // *Human Gene Therapy*. 2008. Vol. 19. No 5. P. 532–546.
3. Sarkar T., Conwell C. C., Harvey L. C. et al. Condensation of Oligonucleotides Assembled into Nicked and Gapped Duplexes: Potential Structures for Oligonucleotide Delivery // *Nucleic Acids Research*. Vol. 33. No 1. P. 143–151.
4. Mathupala S. P., Sloan A. E. «In-gel» Purified Dtags Direct Synthesis of Highly Efficient SAGE Libraries // *BMC Genomics*. 2002. Vol. 3. No 20.
5. Dolinnaya N. G., Shabarova Z. A. Chemical Ligation as a Method for the Assembly of Double-Stranded Nucleic Acids: Modifications and Local Structure Studies // *Russian Chemical Bulletin*. 1996. Vol. 45 No. 8. P. 1787–1809.
6. Feldkamp U., Saccà B., Niemeyer C. M. Dendritic DNA Building Blocks for Amplified Detection Assays and Biomaterials // *Angeordnete Chemie International Edition*. 2009. Vol. 48. No. 33. P. 5996–6000.
7. Филиппов Н. С., Ломзов А. А., Пышный Д. В. Термодинамическое описание самассоциации олигонуклеотидов в конкатемерных структурах ДНК // *Биофизика*. 2009. Т. 54, вып. 3. С. 402–417.
8. Shchepinov M. S., Mir K. U., Elder J. K. et al. Oligonucleotide Dendrimers: Stable Nano-Structures // *Nucleic Acids Research*. 1999. Vol. 27. No. 15. P. 3035–3041.
9. Campolongo M. J., Tan S. J., Xu J. et al. DNA Nanomedicine: Engineering DNA as a Polymer for Therapeutic and Diagnostic Applications // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010. Vol. 62. No. 6. P. 606–616.
10. Yang D., Campolongo M. J., Nhi Tran T. N. et al. Novel DNA Materials and their Applications // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2010. Vol. 2. No. 6. P. 648–669.
11. Lee J. B., Shai A. S., Campolongo M. J. et al. Three-Dimensional Structure and Thermal Stability Studies of DNA Nanostructures by Energy Transfer Spectroscopy // *Chemphyschem*. 2010. Vol. 11. No. 10. P. 2081–2084.
12. Durand M., Chevrie K., Chassignol M. et al. Circular Dichroism Studies of an Oligodeoxyribonucleotide Containing a Hairpin Loop Made of a Hexaethylene Glycol Chain: Conformation and Stability // *Nucleic Acids Research*. 1990. Vol. 18. No. 21. P. 6353–6359.
13. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: Nucleic Acids / Ed. by G. D. Fasman. CRC Press, 1975.
14. Berkner K. L., Folk W. R. EcoRI Cleavage and Methylation of DNAs Containing Modified Pyrimidines in the Recognition Sequence // *The Journal of Biological Chemistry*. 1977. Vol. 252. No. 10. P. 3185–3193.
15. 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. No. 2. P. 256–263.
16. Fotin A. V., Drobyshev A. L., Proudnikov D. Y. et al. Parallel Thermodynamic Analysis of Duplexes on Oligodeoxyribonucleotide Microchips // *Nucleic Acids Research*. 1998. Vol. 26. No. 6. P. 1515–1521.
17. 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. P. 402–427.

18. Ломзов А. А., Пышная И. А., Иванова Е. М. и др. Термодинамические параметры для расчета стабильности комплексов

мостиковых олигонуклеотидов // Докл. Академии наук. 2006. Т. 409, № 2. С. 266–270.

Материал поступил в редколлегию 19.07.2011

N. S. Filippov, A. A. Lomzov, D. V. Pyshnyi

**INFLUENCE OF OLIGONUCLEOTIDE-STOPPER ON SIZE
AND THERMAL STABILITY OF CONCATEMER DNA COMPLEXES**

Multicomponent polymeric associates based on nucleic acids are well used in drug and gene delivery into cells, in DNA fragments manipulations, in amplifying of the molecular hybridization signal, etc. Nevertheless, the formation of these systems is not well studied. In this paper, influence of a component that terminates concatemer elongation on a length and thermal stability of the multicomponent complex was studied. We have shown that addition of a oligonucleotide-stopper to the polymeric complex consisting of two oligonucleotide species decreases the length of concatemer complexes proportionally to the stopper concentration. Effect of the stopper on melting temperature was shown to be concentration dependent. We have proposed a thermodynamic model, which allows one to predict the thermal stability and the length distribution of the concatemeric complex consisting of two types of oligonucleotides in the presence of the stopper. We have also determined the length of polymeric complexes, which makes the maximum contribution to the intensity of the analyzed signal.

Keywords: concatemer, DNA, oligonucleotide, stopper, thermodynamics, self-association.