

УДК [577.323.4+577.323.24+57.037]:544.032.732

А. А. Ломзов, К. А. Иванова, И. А. Пышная, Е. В. Дмитриенко, Д. В. Пышный

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

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

E-mail: lomzov@niboch.nsc.ru

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ
2,2,2-ТРИФТОРЭТАНОЛА И ЭТАНОЛА НА СТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ,
КИНЕТИЧЕСКИЕ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ФОРМИРОВАНИЯ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ
ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ**

Проведено сравнительное исследование структурной организации, термодинамических и кинетических особенностей формирования комплексов олигодезоксирибонуклеотидов в присутствии 2,2,2-трифторэтанола и этанола в водных растворах (объемная доля спирта от 0 до 50 %). Показано, что при добавлении в раствор 50 % v/v спирта значительных изменений в спектрах кругового дихроизма олигонуклеотидов и их комплексов не происходит, и они сохраняют профиль, характерный для В-формы ДНК. Исследование термостабильности ДНК-дуплексов показало, что увеличение объемной доли этанола в растворе до 50 % приводит к линейному снижению температуры плавления межмолекулярных ДНК-комплексов. В случае введения 2,2,2-трифторэтанола в водный раствор олигонуклеотидов наблюдается нетипичная зависимость термостабильности ДНК-дуплексов от доли фторсодержащего соразтворителя. При увеличении доли этого спирта с 0 до 20 % происходит линейное снижение температуры плавления комплекса. Дальнейшее увеличение объемной доли 2,2,2-трифторэтанола (вплоть до 50 %) не приводит к изменению термостабильности дуплексов. Установлено, что дестабилизирующий эффект обоих соразтворителей обусловлен увеличением константы скорости диссоциации комплекса и имеет, главным образом, энтропийную природу. На примере комплексов олигонуклеотидов длиной 8, 12, 15 и 20 пар оснований показана возможность прогноза термостабильности ДНК-дуплексов с использованием модели, учитывающей изменение числа молекул растворителей, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами при формировании комплекса в водных растворах этанола (до 50 % v/v) или трифторэтанола (до 20 % v/v), с точностью 1,3 и 0,6 градуса. С использованием данной модели установлено, что добавление спиртов в раствор приводит к увеличению числа молекул воды, связывающихся с парой нуклеотидов при формировании межмолекулярного комплекса (в присутствии этанола или трифторэтанола $0,51 \pm 0,09$ или $1,33 \pm 0,12$ соответственно). В то же время спирты взаимодействуют с олигонуклеотидами в одноцепочечном и двухцепочечном состояниях одинаково.

Ключевые слова: олигонуклеотиды, структура, кинетика, термодинамика, соразтворители, 2,2,2-трифторэтанол, этанол.

Введение

Короткие синтетические одноцепочечные фрагменты НК – олигонуклеотиды, получили широкое применение как молеку-

лярные инструменты в фундаментальных исследованиях, так и в практических целях. Их используют в качестве молекулярных зондов в молекулярно-биологических, биохимических и биофизических исследовани-

* Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 8123), РФФИ (проект № 12-04-31776мол-а) и частично интеграционных проектов СО РАН и программы «МКБ».

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

ях, они являются частью сенсорных элементов в системах генодиагностики, а также перспективными терапевтическими агентами. Столь обширная область применения возможна благодаря их способности образовывать двухцепочечные структуры с комплементарными последовательностями нуклеиновых кислот. Эффективность формирования олигонуклеотидами двойных спиралей характеризуют термической стабильностью этих комплексов, которая определяется термодинамическими параметрами их перехода из одноцепочечного состояния в двухцепочечное: изменением энтальпии, энтропии и свободной энергии Гиббса (ΔH^0 , ΔS^0 , $\Delta G^0_T = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0$). На стабильность ДНК-комплексов влияет множество факторов, которые можно разделить на внутренние и внешние. К основным внутренним факторам относят: стэкинг взаимодействие гетероциклических оснований, формирование водородных связей и внутримолекулярное электростатическое взаимодействие цепей нуклеиновых кислот. Внешние факторы можно подразделить на ионные, к которым относят специфическое и неспецифическое взаимодействие ионов с ДНК, и неионные, т. е. изменяющие гидрофобные свойства, водородное связывание и диэлектрическую проницаемость среды.

Хорошо охарактеризовано влияние внутренних (см., например, [1–3]) и ионных (см., например, [4; 5]) факторов на термостабильность дуплексов нуклеиновых кислот. Влияние неионных факторов на термостабильность ДНК-дуплексов детально исследовано на примере этанола и полиэтиленгликолей различного молекулярного веса (см., например, [6; 7]).

Водные растворы 2,2,2-трифторэтанола широко используют в качестве среды, регулирующей стабильность внутримолекулярных образований биомакромолекул белковой природы (см., например, [8]).

В то же время влияние трифторэтанола на физико-химические свойства комплексов нуклеиновых кислот столь широко не исследовано. Показано, что при высоких концентрациях трифторэтанола (> 73 %) наблюдается переход из классической В-формы ДНК в А-форму, более характерную для РНК (см., например, [9]). Также показано увеличение интенсивности эмиссии эксиплексов в комплексах флуоресцентно меченых олигонуклеотидов, исполь-

зующихся для детекции нуклеиновых кислот [10]. Однако комплексного исследования влияния трифторэтанола (при его объемных концентрациях менее 50 %) на структуру и комплексообразующие свойства олигонуклеотидов ранее не проводили.

Цель данной работы – сравнительное исследование влияния 2,2,2-трифторэтанола и этанола в водных растворах на особенности структурной организации комплексов олигодезоксирибонуклеотидов и термодинамические, а также кинетические параметры их формирования.

Материалы и методы

Синтез и выделение нативных олигонуклеотидов проводили на автоматическом ДНК-синтезаторе ASM-800 (Biosset, Россия). Гомогенность олигонуклеотидов подтверждали с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях (20 % ПААГ, 8 М мочевины, 50 мМ трис-борат (рН 8,3), 0,1 мМ Na₂ЭДТА).

В работе были использованы олигодезоксирибонуклеотидные комплексы со следующими нуклеотидными последовательностями: m8/n8 – 5'-GTCTCACG-3'/5'-CGTGAGAC-3', m12/n12- 5'-TCGCGCCAAA CA-3'/5'-TGTTTGGCGCGA-3', m15/n15 – 5'-CAGAGTGATCGAGGC-3'/5'-GCCTCGA TCACTCTG-3', m20/n20 – 5'-СТААСТАА САТСАТСАТАТС-3'/5'-GATATGATGATG TTAGTTAG-3'.

Концентрацию олигонуклеотидов в воде определяли спектрофотометрически, используя величины молярных коэффициентов экстинкции моно- и динуклеотидов (на длине волны 260 нм) [11]. УФ-спектры водных растворов олигонуклеотидов записывали на спектрофотометре Shimadzu UV-2100 (Shimadzu, Япония) при 25 °С.

Исследование вторичной структуры олигонуклеотидов и их комплексов проводили методом кругового дихроизма (КД). Спектры КД записывали, используя спектрополяриметр J-600 (JASCO, Япония), в диапазоне длин волн от 210 до 330 нм, с разрешением по длине волны 0,2 нм, шириной щели 1 нм, шкалой чувствительности 20 мград, временем интегрирования 1 с, скоростью развертки спектрального диапазона 50 нм/мин. Температуру образца регулировали, прокачивая через кювету теплоноситель жидкостного термостата LKB

BROMMA 2219 Multitemp II (Thermostatic Circulation, Швеция). Регистрацию спектров КД проводили в стандартных условиях при суммарной концентрации олигонуклеотидных компонентов $5 \cdot 10^{-6}$ М, используя кювету с длиной оптического пути 1 см.

Исследование термической денатурации олигонуклеотидных дуплексов проводили с использованием спектрофотометра Cary 300 Bio Melt (Varian Inc., Австралия), оборудованного терморегулируемым шестисекционным держателем для кварцевых кювет (Varian Inc., Австралия). Показания температурного датчика прибора Cary 300 Bio Melt были откалиброваны с использованием термопар Temperature Probes Series II (Varian Inc., Австралия). Измерение зависимости оптического поглощения смеси олигонуклеотидов проводили на длинах волн 260 и 270 нм.

Образцы олигонуклеотидов готовили на основе буферного раствора, содержащего 0,1 М NaCl, 0,01 М какодилат натрия (pH 7,2). Непосредственно перед экспериментом проводили нагрев образцов до 100 °С с последующим охлаждением до комнатной температуры. Концентрация каждого из взаимодействующих олигонуклеотидов составляла 2,5 мкМ (если другое не оговорено).

Определение термодинамических параметров образования комплексов проводили методом оптимизации кривых плавления в рамках приближения модели «всё или ничего», как описано в [2]. Величины ΔH^0 и ΔS^0 , полученные методом оптимизации индивидуальных кривых плавления, зарегистрированных на разных длинах волн, усредняли. Температуру плавления ($T_{пл}$) рассчитывали как температуру, при которой половина взаимодействующих олигонуклеотидов находится в одноцепочечном, а вторая – в двухцепочечном состоянии [2]:

$$T_{пл} = \frac{\Delta H^0}{\Delta S^0 + R \cdot \ln\left(\frac{C_T}{4}\right)},$$

где C_T – суммарная концентрация олигонуклеотидов в растворе, R – универсальная газовая постоянная ($1,987 \text{ кал} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$).

Исследование кинетических характеристик комплексообразования проводили методом остановленной струи на установке для изучения быстрых кинетик SX 18MV «stopped-flow» spectrometer (Applied Photo-

physics, Великобритания), оснащенной 150 Вт Хе-Аргс лампой. Температуру образца регулировали, прокачивая через кюветодержатель теплоноситель жидкостного термоста-циркулятора LKB BROMMA 2219 Multitemp II (Thermostatic Circulation, Швеция). После быстрого смешивания ($\sim 1,37$ мс) равных объемов олигонуклеотидов (концентрация каждого из компонентов $2,5 \cdot 10^{-6}$ М) регистрировали зависимость оптического поглощения на длине волны 270 нм от времени. Каждая кинетическая кривая содержала 4 000 точек. Полученные зависимости обрабатывали в рамках кинетической схемы, предполагающей обратимое образование бимолекулярного комплекса из одноцепочечных олигонуклеотидов, с константами прямой и обратной реакций k_+ и k_- , путем минимизации среднеквадратичного отклонения между экспериментальными и расчетными кривыми в Microsoft Excel, как описано в [12]. Каждый эксперимент повторяли 3–5 раз, а полученные значения констант скоростей реакции усредняли.

Исследования проводили в водных растворах, содержащих 0,1 М NaCl, 0,01 М какодилат натрия (pH 7,2). Концентрации алифатических спиртов в воде составляли: этанол – 50 % или 2,2,2-трифторэтанол – 25 %. Низкая концентрация трифторэтанола обусловлена технологической невозможностью проведения экспериментов с большей долей данного соразтворителя на данной установке.

Результаты

Влияние соразтворителей на физико-химические свойства олигонуклеотидов и их комплексов оценивали методом сравнительного анализа свойств модельной системы додекануклеотидов m12/n12 в воде, водных растворах этанола и 2,2,2-трифторэтанола (с объемной долей (v/v) спирта до 50 %).

Исследование пространственной организации нуклеиновых кислот. Методом кругового дихроизма охарактеризована пространственная организация олигонуклеотидов и их комплексов в воде, в водных растворах этанола и трифторэтанола при различных температурах (рис. 1). Из представленных данных видно, что профили спектров КД имеют вид, характерный для В-формы ДНК, как в случае водного раствора, так и в при-

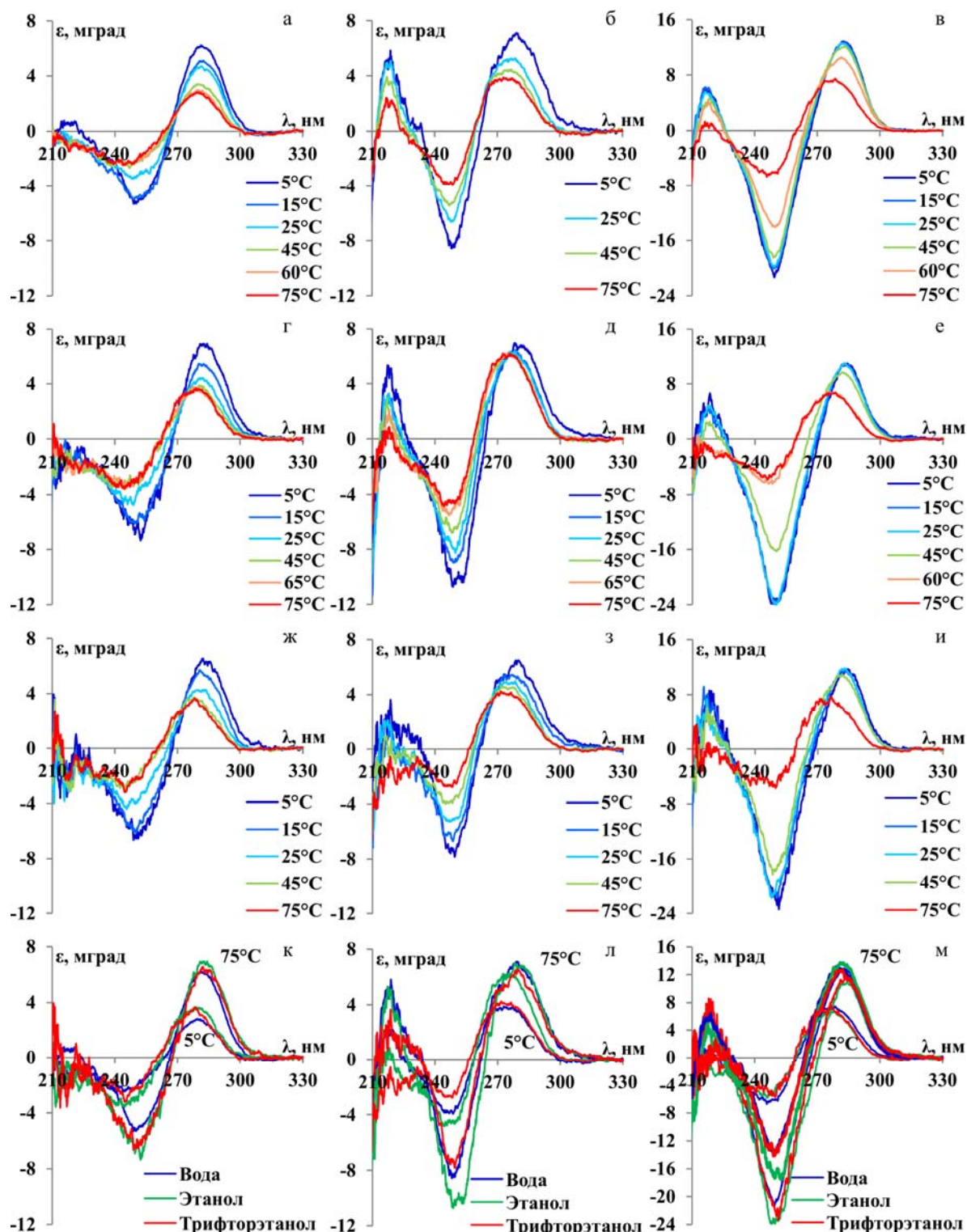


Рис. 1. Температурные серии спектров КД додекануклеотидов и их комплексов в воде: а – m12; б – n12; в – m12/n12; в водном растворе этанола (50% v/v): г – m12; д – n12; е – m12/n12; в водном растворе 2,2,2-трифторэтанола (50% v/v): ж – m12; з – n12; и – m12/n12. Сравнение КД-спектров олигонуклеотидов: к – m12; л – n12 и комплексов; м – m12/n12 (жирными линиями показана сумма эллиптичностей олигонуклеотидов m12 и n12) в различных растворителях при температуре 5 и 75 °С

сутствии спиртов. Об этом свидетельствует наличие положительной полосы с максимумом около 280 нм и коротковолнового отрицательного минимума около 250 нм, а также точки нулевой эллиптичности вблизи 260 нм как для олигонуклеотидов в одноцепочечном состоянии, так и для межмолекулярного комплекса [13].

Исследование влияния температуры на структуру олигонуклеотидов показывает, что при увеличении температуры происходит снижение амплитуд КД-сигнала, что связано с частичным разрушением одноцепочечного стэкинга, реализация которого при более низких температурах обуславливает главным образом удержание гетероциклических оснований в стопке (рис. 1, а, б, г, д, ж, з) [14].

Приведенные на рис. 1, в, е, и температурные серии спектров КД комплекса m12/n12 в различных условиях свидетельствуют о формировании дуплексных структур. При низких температурах амплитуда КД-сигнала значительно превышает значение эллиптичности при высоких температурах, что свидетельствует об упорядочении структуры ДНК при формировании бимолекулярного комплекса.

На рис. 1, к–м приведено сравнение КД-спектров олигонуклеотидов и их комплекса при высоких и низких температурах. Видно, что в водном растворе и в присутствии спирта спектры КД близки между собой как для отдельных олигонуклеотидов (m12, n12, рис. 1, к, л), так и для раствора двух олигонуклеотидов (m12/n12, рис. 1, м тонкие линии). В присутствии органического растворителя наблюдаются некоторые отличия в спектрах олигонуклеотидов в одноцепочечном состоянии m12 или n12 (рис. 1, к, л) при 5 °С. Это, вероятно, связано с упорядочением одноцепочечных структур, сопряженным с увеличением амплитуды сигнала кругового дихроизма. Важно отметить, что значительных конформационных перестроек в структурах олигонуклеотидов (например, перехода в А- или Z-форму) и их комплекса при добавлении 50 % v/v алифатических спиртов в раствор не происходит, так как наличие такого перехода привело бы к резкому изменению профиля спектра кругового дихроизма [13].

Амплитуда спектров КД смеси двух олигонуклеотидов (m12/n12) при низких температурах в различных растворителях (рис. 1, м,

тонкие линии) выше, чем амплитуда суммы спектров, полученных для олигонуклеотидов m12 и n12 по отдельности, при низких температурах (рис. 1, м, жирные линии), что свидетельствует о формировании олигонуклеотидами именно межмолекулярных комплексов.

Исследование термической стабильности. Влияние этанола и 2,2,2-трифторэтанола на термическую стабильность комплекса m12/n12 в водных растворах изучали методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала. Величины термодинамических параметров перехода клубок-спираль приведены в таблице. Видно, что увеличение объемной доли этанола до 50 % приводит к линейному снижению температуры плавления ДНК-комплекса (см. таблицу, рис. 2). В случае 2,2,2-трифторэтанола линейный спад $T_{пл}$ наблюдается только при увеличении его объемной доли до 20 %. Дальнейший рост концентрации фторсодержащего спирта в водном растворе до 50 % приводит к нетипичному поведению температуры плавления ДНК-комплекса: термостабильность ДНК-дуплекса практически не изменяется.

Следует отметить, что основной вклад в дестабилизацию дуплексных структур вносит энтропийный фактор. Из приведенных в таблице данных, видно, что изменения энтальпии с увеличением концентрации со-растворителя практически не происходит. Вариации лежат в пределах 13 %, что меньше экспериментальных величин ошибки, составляющих около 15 %.

Исследование кинетики формирования ДНК-комплексов. Для того чтобы определить, на каком этапе (ассоциации олигонуклеотидов или диссоциации дуплекса) происходит влияние со-растворителя на термическую стабильность ДНК-комплекса, были проведены исследования кинетики его формирования методом остановленной струи при различных температурах. На рис. 3, а представлены характерные экспериментальные и рассчитанные в соответствии с моделью обратимой бимолекулярной реакции [12] кривые формирования комплекса при 10 °С в воде, этаноле (50 %) и 2,2,2-трифторэтаноле (25 %). Видно, что теоретические зависимости хорошо описывают наблюдаемые в эксперименте.

Кроме того, имеется линейная зависимость логарифмов констант скоростей

Термодинамические параметры формирования комплекса m12/n12 в воде
и в присутствии соразтворителей

$v/v, \%$	C_T, M	$\Delta S^0,$ кал/моль/К	$\Delta H^0,$ кал/моль	$\Delta G^0_{37},$ ккал/моль	$T_{пл}, ^\circ C$
H ₂ O					
100	$5 \cdot 10^{-6}$	-250	-91511	-14,0	57,5
Этанол/H ₂ O					
10	$5 \cdot 10^{-6}$	-304	-108239	-14,1	54,3
20	$5 \cdot 10^{-6}$	-259	-92662	-12,4	51,0
25	$5 \cdot 10^{-6}$	-306	-107859	-12,9	50,5
30	$5 \cdot 10^{-6}$	-241	-86201	-11,4	48,2
40	$5 \cdot 10^{-6}$	-294	-102367	-11,2	45,8
50	$5 \cdot 10^{-6}$	-277	-96475	-10,4	43,7
2,2,2-трифторэтанол/H ₂ O					
5	$5 \cdot 10^{-6}$	-265	-96172	-14,0	56,4
15	$5 \cdot 10^{-6}$	-269	-96001	-12,5	51,0
20	$5 \cdot 10^{-6}$	-264	-93134	-11,4	47,3
25	$5 \cdot 10^{-6}$	-244	-86870	-11,1	47,2
30	$5 \cdot 10^{-6}$	-262	-92683	-11,3	47,2
35	$5 \cdot 10^{-6}$	-254	-90054	-11,3	47,6
40	$5 \cdot 10^{-6}$	-244	-87051	-11,4	48,0
45	$5 \cdot 10^{-6}$	-240	-85694	-11,2	47,5
50	$5 \cdot 10^{-6}$	-246	-87753	-11,5	48,3

Примечание. Буферные условия приведены в материалах и методах. Величина экспериментальных ошибок определения энтальпии и энтропии составляет 15 %, температура плавления – 0,5 °С.

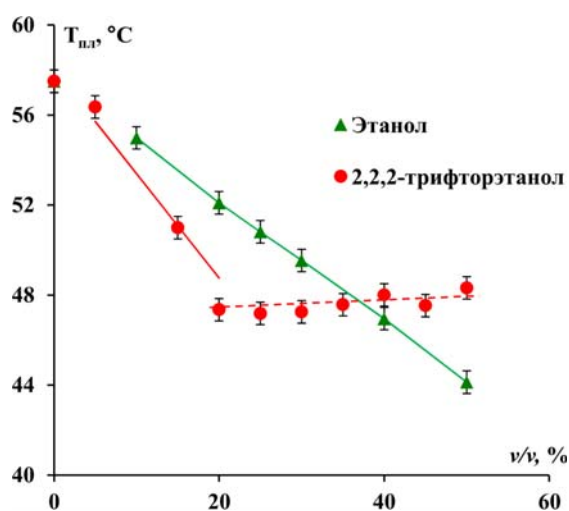


Рис. 2. Зависимость температуры плавления от объемной доли этанола и 2,2,2-трифторэтанола в водном растворе. Сплошными линиями обозначены расчетные значения

реакций от температуры, что, в совокупности с предыдущими фактами дополнительно

подтверждает применимость модели двух состояний для описания комплексообразования олигонуклеотидов.

Из представленных на рис. 3, б данных видно, что основной вклад в снижение термостабильности ДНК-дуплексов при добавлении соразтворителя вносит именно увеличение константы скорости диссоциации межмолекулярного комплекса (в ~ 1 000 раз), в то время как константы скорости ассоциации комплексов изменяются только в ~ 30 раз. Так, например, при 20 °С величины констант скоростей ассоциации комплекса m12/n12 в воде, 50 % водном этаноле и 25 % водном 2,2,2-трифторэтаноле составляют $2 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^7$ и $3 \cdot 10^6 M^{-1}c^{-1}$. Те же значения для константы скоростей диссоциации равны $5,8 \cdot 10^{-8}$, $5,2 \cdot 10^{-5}$, $4,8 \cdot 10^{-6} c^{-1}$.

Более того, зависимости констант скоростей диссоциации комплекса от температуры при наличии и в отсутствие спирта являются практически параллельными. Энергии активации диссоциации комплекса олигонуклеотидов, определенные в соответ-

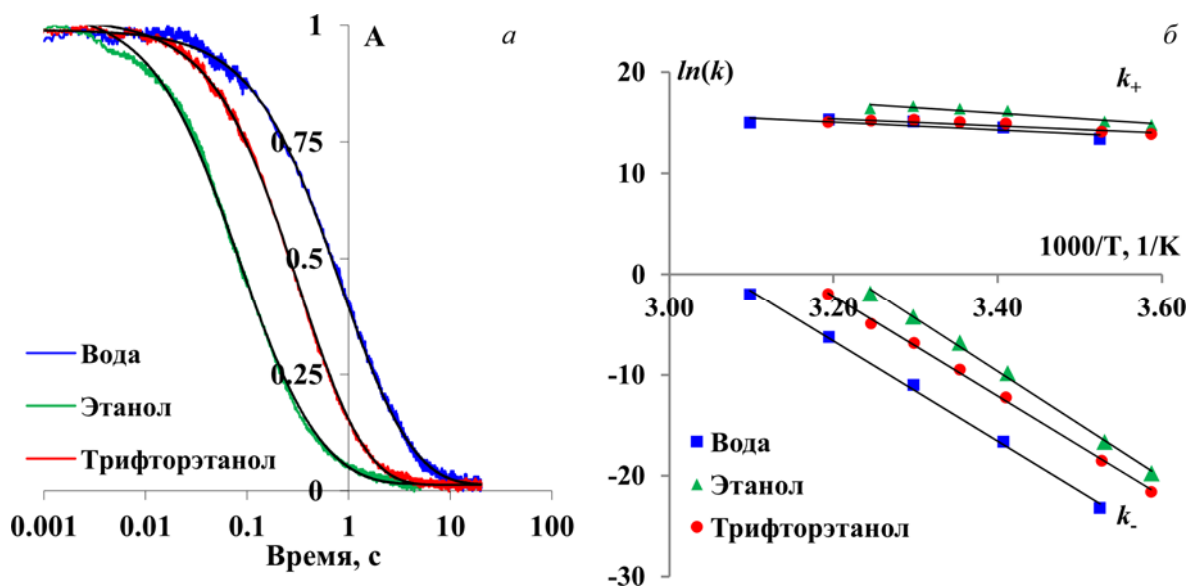
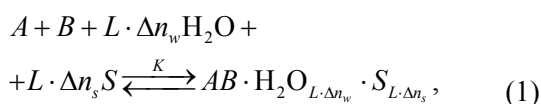


Рис. 3. Характерные нормированные экспериментальные и расчетные кинетические кривые (а, обозначены черным цветом) формирования комплекса при 10 °С в воде, водном этаноле (50 %) и водном 2,2,2-трифторэтаноле (25 %). Зависимость констант скорости прямой и обратной реакций (k_+ и k_-) от температуры (б)

ствии с уравнением Аррениуса, в воде, водных растворах этанола и трифторэтанола, составляют 98,8, 104,9 и 98,5 ккал/моль (т. е. вариации ~ 4 %). Существование параллельных зависимостей в координатах $\ln(\text{константа скорости диссоциации}) - 1/(\text{температура})$ при добавлении спиртов в раствор олигонуклеотидов указывает именно на энтропийный характер влияния соразворителя на термостабильность комплексов нуклеиновых кислот, а не на изменение внутренней энергии комплексообразования. Это может быть связано с диссоциацией / ассоциацией дополнительного числа молекул воды и / или соразворителя при переходе ДНК из одноцепочечного состояния в двухцепочечное. В этом случае эффект влияния растворителя может быть учтен для описания комплексообразующих свойств олигонуклеотидов, если использовать достаточно распространенную модель, которая предполагает обратимое связывание молекул воды (H_2O) и соразворителя (S) при переходе ДНК из одноцепочечных форм (A и B) в двухцепочечную (AB):



где Δn_w и Δn_s – изменение числа молекул воды и соразворителя, дополнительно связывающихся с парой нуклеотидов при формировании дуплексной структуры, L – длина дуплекса (в парах нуклеотидов) (см., например, [15]).

В случае если энтальпия формирования дуплекса не зависит от концентрации добавленного соразворителя, было показано, что связь температуры плавления дуплексов ДНК с активностями воды и соразворителя (a_s и a_w) имеет следующий вид:

$$T_{пл} = \frac{\Delta H^0}{\Delta S^0 + R(\Delta n_w \ln a_w + \Delta n_s \ln a_s) L + R \ln(C_T/4)},$$

где C_T – суммарная концентрация олигонуклеотидов в растворе.

В нулевом приближении активности веществ можно заменить на концентрации (C_w и C_s). В этом случае присутствие соразворителя может быть учтено в виде энтропийной поправки при расчете термической стабильности комплексов олигонуклеотидов:

$$\Delta \Delta S^0 = R(\Delta n_w \ln C_w + \Delta n_s \ln C_s) L.$$

В соответствии с данной моделью были построены теоретические зависимости для

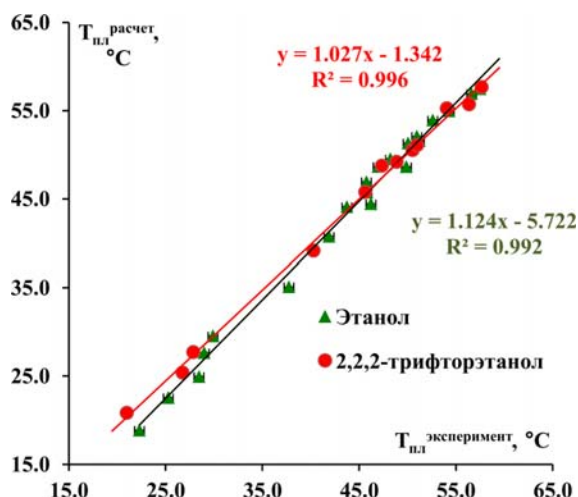


Рис. 4. Корреляция экспериментальных и расчетных температур плавления комплексов олигонуклеотидов различной длины и GC-состава

комплекса m12/n12, описывающие экспериментальные зависимости температуры плавления в водных растворах этанола (в диапазоне концентраций от 0 до 50 % v/v) и трифторэтанола (в диапазоне концентраций от 0 до 20 % v/v) от их доли в растворе. Результаты приведены на рис. 2 в виде непрерывных линий. Видно, что экспериментально полученные значения хорошо коррелируют с расчетными.

Возможность прогностического расчета температуры плавления ДНК-комплексов. Для того чтобы можно было говорить о достоверном прогнозировании термостабильности ДНК-дуплексов в присутствии этанола или 2,2,2-трифторэтанола, необходимо исследовать термостабильность ряда ДНК-комплексов различной длины и GC-состава. В дополнение к изученному дуплексу m12/n12 нами были выбраны три комплекса длиной 8, 15 и 20 пар оснований. Для них были определены термодинамические параметры формирования комплекса (ΔH^0 , ΔS^0 , ΔG_{37}^0) и температура плавления при различной концентрации спиртов в растворе.

В присутствии трифторэтанола у всех комплексов наблюдалась нетипичная зависимость температуры плавления от доли соразтворителя в растворе, аналогичная наблюдавшейся для комплекса m12/n12: линейное снижение термостабильности в диапазоне от 0 до 20 % v/v спирта, а при дальнейшем увеличении его доли в раство-

ре – плато, достигнутое при ~ 20 %. Такая зависимость $T_{пл}$ может быть обусловлена тем, что трифторэтанол, как и некоторые другие спирты, имеющие либо протяженную углеродную цепь, либо атомы галогенов в своем составе, способен образовывать «кластеры» в водной среде, таким образом снижая эффективную концентрацию спирта, способного взаимодействовать с ДНК (см., например, [16; 17]). Они не являются гомогенными по размеру, но существуют в разных спирт-вода клатратных структурах в зависимости от их концентраций. Локальная концентрация трифторэтанола внутри кластера может быть в несколько раз больше, чем в среднем по раствору [18].

Для всех комплексов энтальпии формирования дуплексных структур не зависели от доли соразтворителя, что позволяет применить модель (1) для описания их термической стабильности в зависимости от концентрации соразтворителя. В соответствии с данной моделью были определены величины Δn_w и Δn_s , которые составили $0,51 \pm 0,09$ и $-0,06 \pm 0,02$ в случае этанола и $1,33 \pm 0,12$ и $-0,02 \pm 0,02$ в случае 2,2,2-трифторэтанола. Полученные величины свидетельствуют о том, что добавление алифатических спиртов приводит к ассоциации дополнительного числа молекул воды при формировании ДНК-комплекса. При этом наличие трифторэтанола в качестве соразтворителя вызывает ассоциацию большего числа молекул воды при формировании дуплекса, чем наличие этанола. В то же время количество молекул алифатических спиртов, взаимодействующих с одноцепочечным и двухцепочечным состояниями, остается практически неизменным (величины $\Delta n_w \approx 0$).

На рис. 4 приведена корреляция экспериментальных и рассчитанных с использованием модели (1) температур плавления рассмотренных дуплексов.

Среднее значение ошибки расчета температуры плавления в случае этанола и 2,2,2-трифторэтанола составили 1,3 и 0,6 °C, при среднем снижении $T_{пл}$ на 5,2 и 9,7 °C при добавлении 20 % объемной доли соответствующих спиртов. Таким образом, используя модельное представление, предполагающее изменение числа молекул воды и соразтворителя при формировании межмолекулярного комплекса олигонуклеотидов, можно проводить расчет термостабиль-

ности ДНК/ДНК-комплексов в присутствии этанола и 2,2,2-трифторэтанола.

Заключение

Проведено сравнительное исследование влияния 2,2,2-трифторэтанола и этанола на особенности структурной организации и комплексообразующие свойства олигонуклеотидов с ДНК в водных растворах. Методом кругового дихроизма показано, что добавление 50 % спирта в раствор не приводит к конформационным переходам в структуре олигонуклеотидов и их комплексов: КД-спектры сохраняют вид, характерный для В-формы ДНК. Кроме того, олигонуклеотиды сохраняют способность формировать межмолекулярные комплексы.

Исследование термостабильности ДНК-дуплекса методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала показало, что увеличение объемной доли этанола до 50 % приводит к линейному снижению температуры плавления межмолекулярных комплексов. При добавлении 2,2,2-трифторэтанола в раствор олигонуклеотидов наблюдается нетипичная зависимость термостабильности: линейное снижение температуры плавления комплекса при увеличении доли спирта до 20 %, а при дальнейшем увеличении его концентрации наблюдается выход на плато. Такое поведение, вероятно, связано с возможностью образовывать фторсодержащим спиртом кластеры в водных растворах и снижением его активности в растворе.

Методом остановленной струи установлено, что добавление спирта в раствор приводит к увеличению константы скорости диссоциации комплекса. Анализ температурных зависимостей констант ассоциации и диссоциации комплексов в водном растворе, а также в присутствии этанола и трифторэтанола показал, что дестабилизирующий эффект спиртов на термостабильность ДНК-дуплексов обусловлен главным образом энтропийными факторами, например связыванием дополнительного числа молекул воды и соразтворителя при формировании комплекса.

Исследована термическая стабильность комплексов олигонуклеотидов длиной 8, 12, 15 и 20 пар нуклеотидов. Определены термодинамические параметры их формирования (изменение энтальпии, энтропии и сво-

бодной энергии Гиббса) в зависимости от доли этанола и 2,2,2-трифторэтанола в диапазоне от 0 до 50 % v/v. С использованием модели, предполагающей изменение числа молекул воды и соразтворителя, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами при формировании двойной спирали ДНК, была показана возможность прогнозировать температуру плавления в этаноле (0–50 % v/v) и трифторэтаноле (0–20 % v/v) с точностью 1,3 и 0,6 °С.

Показано, что добавление спиртов в раствор приводит к увеличению числа молекул воды Δn_w , связывающихся с ДНК при формировании межмолекулярного комплекса, в то же время сами спирты взаимодействуют с олигонуклеотидами, находящимися в одноцепочечном и двухцепочечном состояниях, одинаково. В случае добавления этанола и 2,2,2-трифторэтанола величины Δn_w составили $0,51 \pm 0,09$ и $1,33 \pm 0,12$ молекул соответственно.

Список литературы

1. Freier S. M., Sugimoto N., Sinclair A., Alkema D., Neilson T., Kierzek R., Caruthers M. H., Turner D. H. Stability of XGCGCp, GCGCYp and XGCGCYp Helices – an Empirical Estimate of the Energetics of Hydrogen-Bonds in Nucleic-Acids // *Biochemistry*. 1986. Vol. 25. P. 3214–3219.
2. 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.
3. Pullman A., Pullman B. Molecular Electrostatic Potential of the Nucleic-Acids // *Q. Rev. Biophys.* 1981. Vol. 14. P. 289–380.
4. Owczarzy R., You Y., Moreira B. G., Manthey J. A., Huang L. Y., Behlke M. A., Walder J. A. Effects of Sodium Ions on DNA Duplex Oligomers: Improved Predictions of Melting Temperatures // *Biochemistry*. 2004. Vol. 43. P. 3537–3554.
5. Owczarzy R., Moreira B. G., You Y., Behlke M. A., Walder J. A. Predicting Stability of DNA Duplexes in Solutions Containing Magnesium and Monovalent Cations // *Biochemistry*. 2008. Vol. 47. P. 5336–5353.
6. Guckian K. M., Schweitzer B. A., Ren R. X. F., Sheils C. J., Tahmassebi D. C., Kool E. T. Factors Contributing to Aromatic Stacking in Wa-

ter: Evaluation in the Context of DNA // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. Vol. 122. P. 2213–2222.

7. *Koumoto K., Ochiai H., Sugimoto N.* Hydration Is an Important Factor to Regulate Thermodynamic Stability of a DNA Duplex under Molecular Crowding Conditions // *Chem. Let.* 2008. Vol. 37. P. 864–865.

8. *Buck M.* Trifluoroethanol and Colleagues: Cosolvents Come of Age. Recent Studies with Peptides and Proteins // *Q. Rev. Biophys.* 1998. Vol. 31. P. 297–355.

9. *Ivanov V. I., Minchenkova L. E., Burckhardt G., BirchHirschfeld E., Fritzsche H., Zimmer C.* The Detection of B-form/A-form Junction in a Deoxyribonucleotide Duplex // *Biophys. J.* 1996. Vol. 71. P. 3344–3349.

10. *Bichenkova E. V., Gbaj A., Walsh L., Savage H. E., Rogert C., Sardarian A. R., Etchells L. L., Douglas K. T.* Detection of Nucleic Acids in situ: Novel Oligonucleotide Analogues for Target-Assembled DNA-Mounted Exciplexes // *Org. Biomol. Chem.* 2007. Vol. 5. P. 1039–1051.

11. *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: Nucleic Acids* / Ed. by G. D. Fasman. CRC Press, 1975. 464 p.

12. *Pyshnyi D. V., Lomzov A. A., Pyshnaya I. A., Ivanova E. M.* Hybridization of the Bridged Oligonucleotides with DNA: Thermodynamic and Kinetic Studies // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2006. Vol. 23. P. 567–579.

13. *Иванов В. И.* Круговой дихроизм и структура комплементарных нуклеиновых кислот // *Молекулярн. биол.* 1973. Т. 7. С. 104–140.

14. *Johnson W. C. Jr.* Circular Dichroism and Its Empirical Application to Biopolymers // *Methods Biochem. Anal.* 1985. Vol. 31. P. 61–163.

15. *Spink Ch. H., Chaires J. B.* Effect of Hydration, Ion Release, and Excluded Volume on the Melting of Triplex and Duplex DNA // *Biochemistry.* 1999. Vol. 38. P. 496–508.

16. *Gast K., Zirwer D., Muller-Frohne M., Damaschun G.* Trifluoroethanol-Induced Conformational Transitions of Proteins: Insights Gained from the Differences between Alpha-lactalbumin and Ribonuclease A // *Protein Sci.* 1999. Vol. 8. P. 625–634.

17. *Miyoshi D., Nakamura K., Tateishi-Karimata H., Ohmichi T., Sugimoto N.* Hydration of Watson-Crick Base Pairs and Dehydration of Hoogsteen Base Pairs Inducing Structural Polymorphism under Molecular Crowding Conditions // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. Vol. 131. P. 3522–3531.

18. *Reiersen H., Rees A. R.* Trifluoroethanol May form a Solvent Matrix for Assisted Hydrophobic Interactions between Peptide Side Chains // *Protein Eng.* 2000. Vol. 13. No 11. P. 739–743.

Материал поступил в редколлегию 02.11.2012

A. A. Lomzov, K. A. Ivanova, I. A. Pyshnaya, E. V. Dmitrienko, D. V. Pyshnyi

A COMPARATIVE STUDY OF THE INFLUENCE OF AQUAOUS 2,2,2-TRIFLUOROETHANOL AND ETHANOL ON THE STRUCTURAL ORGANIZATION, THE KINETIC AND THERMODYNAMIC PROPERTIES OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES INTERMOLECULAR COMPLEX FORMATION

A comparative study of the structural organization, thermodynamic and kinetic properties of the oligodeoxynucleotides complexes formation in the presence of 2,2,2-trifluoroethanol and ethanol in aqueous solution (volume fraction of alcohol 0 to 50 %) was performed. No significant changes in the circular dichroism spectra of oligonucleotides and their complexes at the adding of 50 % v/v alcohol into a solution, was observed, and they retain the profile typical for B-form DNA. The study of the thermal stability of DNA duplexes showed that the increase in the volume fraction of ethanol in the aqueous solution up to 50 % results in a linear decrease in the melting temperature of the intermolecular DNA complexes. In the case of the 2,2,2-trifluoroethanol we observed atypical dependence of thermal stability of DNA duplexes on the fraction of the fluorine-containing co-solvent. Increasing the alcohol fraction from 0 to 20% v/v led to a linear decrease of the melting point of the complex. A further increase in the volume fraction of alcohol (up to 50 %) did not change the thermal stability of the duplexes. It was shown, that the destabilizing effect of the two co-solvents is due to the increase of the dissociation rate constant of the complex and has mainly entropic nature. On the example of oligonucleotides complexes of 8, 12, 15 and 20 base pairs length the possibility of prediction DNA duplexes thermal stability was shown. A model taking into account the change of a number solvent molecules interacting with nucleic acids at the duplex formation in aqueous ethanol (50 % v/v) or trifluoroethanol (20 % v/v) was applied. An accuracy of melting temperature prediction was 1.3 and 0.6 degrees. Using this model, we found that the addition of alcohols in solution leads to an increase in the number of water molecules that bind to a complementary pair of nucleotides at the formation of intermolecular complex (in the presence of ethanol or trifluoroethanol 0.51 ± 0.09 and 1.33 ± 0.12 , respectively). At the same time, alcohols interacted with single-stranded oligonucleotides and double-stranded in the same way.

Keywords: oligonucleotides, structure, kinetics, thermodynamics, co-solvents, 2,2,2-trifluoroethanol, ethanol.