

УДК 577.3

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

ГИДРАТАЦИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С РАЗЛИЧНЫМ АТ и ГЦ - СОСТАВОМ В КОНДЕНСИРОВАННОМ СОСТОЯНИИ

Е.Г.Березняк., М.А.Семенов, Т.В.Больбух.

*Институт радиофизики и электроники НАН Украины,
ул.Ак.Проскуры, 12, г.Харьков, 310085*

e-mail: berez@ire.kharkov.ua

Поступила в редакцию 5 мая 1998 г.

В предлагаемом обзоре обобщаются результаты исследования влияния воды на структуру и стабильность нуклеиновых кислот (НК) на основе литературных данных и разработанного нами методического подхода к изучению особенностей гидратации большого набора НК с различным нуклеотидным составом в системе НК - вода с переменным содержанием воды. Проведенный анализ показал, что в общую энергию стабилизации спиральных структур нуклеиновых кислот вода вносит вклад до 70-75%, а вклад Н-связей в уотсон-криковских парах не превышает 25%. Эти результаты позволили наряду с влиянием воды выявить воздействие и других факторов на формирование и стабилизацию гидратных структур ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нуклеиновые кислоты, ИК-спектроскопия, пьезограмметрия, микрокалориметрия, теоретические расчеты, энергетика гидратации.

Исследование нуклеиновых кислот (НК) с помощью широкого арсенала традиционных и современных экспериментальных методов и теоретических расчетов позволило в настоящее время установить, что их структурное состояние, гидратно-ионное окружение и стабильность определяются различными типами внутри- и межмолекулярных взаимодействий [1]: водородными связями в парах, стэкинг-взаимодействием в «стопках» пар оснований и между цепочками (так называемый кросс-стэкинг), взаимодействием молекул воды с противоионами и гидратно-активными центрами нуклеиновых кислот, гидрофобными взаимодействиями, а также взаимодействием между «связанными» и «свободными» молекулами воды. В последнее время все большее признание получает гипотеза, согласно которой стабилизация спиральной структуры нуклеиновых кислот в основном обеспечивается их взаимодействием с гидратно-ионным окружением [2-5]. Эта гипотеза основывается на результатах многих экспериментальных и теоретических исследований особенностей гидратации нуклеиновых кислот в различных условиях, в том числе в конденсированном состоянии (система нуклеиновая кислота - вода - ионы) с переменным содержанием воды [2].

В настоящей работе приводятся результаты исследования влияния воды на структуру и стабильность НК, полученные на основе разработанного нами методического подхода к изучению особенностей гидратации нуклеиновых кислот в системе НК - вода с переменным содержанием воды [6]. Подход основан на использовании инфракрасной спектроскопии, микрокалориметрии,

пьезографиметрии и расчетных методов, что позволило получить данные о механизме заполнения гидратно-активных центров в процессе формирования канонических структур НК и их гидратных оболочек, а также найти экспериментальные значения энергии связывания молекул воды с НК при различном содержании воды в системе, т.е. определить энергетический «спектр» связанной воды. Проведенный анализ вкладов различных типов взаимодействий в общую энтальпийную составляющую свободной энергии позволил по-новому взглянуть на влияние стэкинг-взаимодействия на стабилизацию НК и его роль в формировании динамических и вместе с тем устойчивых гидратных структур ДНК. Предварительные результаты сообщались ранее в [6-11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе поставленная задача решалась с использованием ряда методик (ИК-спектроскопия, пьезографиметрия, микрокалориметрия, теоретические расчеты), которые ранее [2] применялись для изучения особенностей формирования гидратных оболочек и двойных спиралей стандартной ДНК из тимуса телят в условиях влажной пленки.

Комплексы натриевых солей poly(rA)-poly(rU) и poly(rG)-poly(rC) получали по методике Томаса [7,8]. Использовали препараты фирм «Serva» (ФРГ) и «Reanal» (Венгрия). В готовом виде применялся двухспиральный комплекс poly(dA)-poly(dT) фирмы «Pharmacia» (США).

В качестве образцов дезоксирибонуклеиновой кислоты были взяты натриевые соли ДНК из тимуса телят, *Micrococcus lysodeikticus* и *Clostridium perfringens* (фирма «Sigma», США), имеющих АТ/ГЦ - состав 0,58/0,42, 0,28/0,72 и 0,69/0,31 соответственно. Количество ионов натрия и калия определяли с помощью пламенного фотометра. В исследуемых образцах по отношению к сухому весу ДНК содержалось 9-10% ионов Na^+ и 1-2% K^+ . Методика приготовления пленок и получение их ИК-спектров описаны ранее [7].

Изотермы гидратации нуклеиновых кислот, представляющие зависимости числа сорбированных молекул на один нуклеотид (n) от относительной влажности (ОВ), были получены с помощью пьезографиметрической установки, описанной в работе [12]. Подробный анализ спектров в областях поглощения внутри- и внекольцевых колебаний азотистых оснований ($1800-1300 \text{ см}^{-1}$) и сахарофосфатной цепи ($1300-900 \text{ см}^{-1}$) проводили путем построения зависимостей от n частот ν и интенсивностей (в относительных единицах R) для достаточно надежно интерпретированных полос поглощения. Интенсивность определяли как $R = D_i/D_0$, где D_i и D_0 - оптические плотности в максимуме полосы поглощения при i -той и нулевой влажностях соответственно. Для контроля состояния воды в образцах нуклеиновых кислот определяли сдвиг максимума полосы поглощения валентных колебаний ОН-групп молекул сорбированной воды при изменении влажности образца.

Калориметрическое определение энтальпии испарения воды с влажных образцов нуклеиновых кислот проводили в изотермическом режиме на микрокалориметре ДСК-101 (фирма «Setaram», Франция). Предварительно увлажненные образцы при 92% ОВ помещали сначала в калориметрическую ячейку, затем - в камеру калориметра с атмосферой сухого гелия. В процессе испарения контролируемого количества воды с образца дискретно измеряли энтальпию дегидратации [13]. Калориметрическое определение энтальпии перехода спираль - клубок нуклеиновых

кислот проводили на микрокалориметре ДАСМ-5 для 0,05-0,1% растворов ДНК и двухспиральных полинуклеотидов в 0,05 М - 0,1М растворах NaCl.

ДВУХСПИРАЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

ИК-спектры, гидратация и структурные переходы

В этом разделе приведены результаты исследования полинуклеотидных комплексов poly(dA)-poly(dT), poly(rA)-poly(rU) и poly(rG)-poly(rC) в пленках при различных значениях ОВ, полученные с помощью ИК-спектроскопии и пьезограмметрии. Для определения интервалов изменения n , в которых происходят структурные переходы, а также степени гидратации и порядка «заполнения» гидратно-активных центров комплексов молекулами воды с определенными значениями энергии рассмотрены зависимости от n частот ν и интенсивностей R основных полос поглощения, надежно отнесенных к внутри- и внекольцевым колебаниям азотистых оснований и сахарофосфатных цепей. Рассмотрим в качестве примера результаты ИК-спектроскопического исследования гидратно-зависимых процессов образования структур комплекса poly(dA)-poly(dT) в широком интервале значений относительной влажности (0-100%).

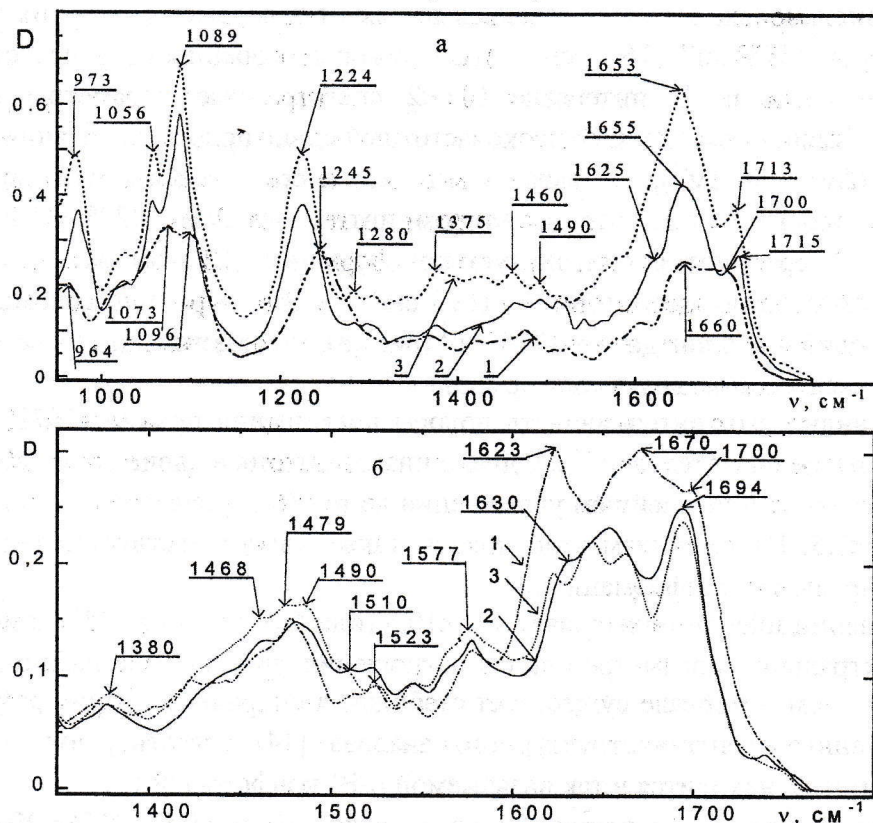


Рис.1. ИК-спектры пленок poly(dA)-poly(dT) в недеитерированном (а) и дейтерированном (б) состояниях при ОВ: 1 - 0%; 2 - 86%; 3 - 92%

На рис.1(а,б) представлены спектры пленок натриевой соли комплекса poly(dA)-poly(dT) при 0%, 86% и 92% ОВ в недеитерированном и дейтерированном состояниях. С увеличением ОВ наблюдаются значительные изменения в спектрах, что связано с формированием структуры комплекса и гидратного окружения. Рассмотрим более подробно зависимости ν и R от n для трех основных подсистем: азотистых оснований, сахарофосфатной цепи и сорбированной воды.

Область поглощения аденина и тимина. На рис.2 представлены типичные зависимости ν и R от n для полос поглощения внутрколецевых колебаний C=N аденина ($\nu = 1622 \text{ см}^{-1}$) (а) и внеколецевого колебания C4O4 тимина ($\nu = 1671 \text{ см}^{-1}$) (б) для случая дейтерированного комплекса poly(dA)-poly(dT).

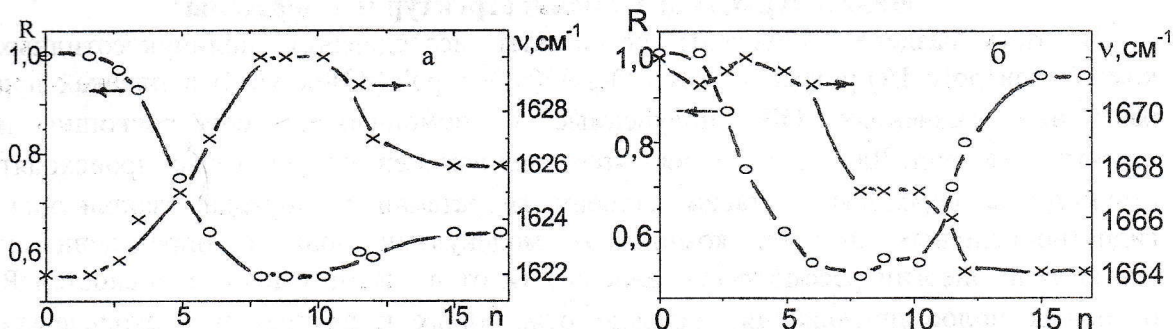


Рис.2. Зависимости частот ν и интенсивностей R от n комплекса poly(dA)-poly(dT) для полос поглощения аденина $\nu = 1622 \text{ см}^{-1}$ (колебание C=N) (а) и тимина $\nu = 1671 \text{ см}^{-1}$ (колебание C4=O4) (б).

На этих зависимостях, а также на зависимостях от n параметров других полос поглощения ($\nu = 1578 \text{ см}^{-1}$, 1699 см^{-1}) обнаружены особенности в нескольких интервалах изменения n . В интервале $0 < n < 2$ спектральные параметры полос практически не изменяются. Резкий высокочастотный сдвиг полосы колебания C=N-групп атомов ($\Delta\nu = 8 \text{ см}^{-1}$), а также уменьшение ее интенсивности на 45% (гипохромизм) говорит о том, что во втором интервале $2 < n < 7$ ($32\% < \text{ОВ} \leq 75\%$) poly(dA)-poly(dT) переходит в спиральную конформацию. В этом же интервале изменения n полоса поглощения при $\nu = 1695 \text{ см}^{-1}$ недейтерированного комплекса претерпевает «голубой» сдвиг до $\nu = 1715 \text{ см}^{-1}$ (рис.1,а), что также свидетельствует о переходе комплекса в спиральную конформацию.

На рис.2,б видно, что интенсивность полосы поглощения при $\nu = 1671 \text{ см}^{-1}$ в этом интервале n уменьшается на 45%. Однако низкочастотный сдвиг до $\nu = 1667 \text{ см}^{-1}$ наблюдается только при дальнейшем увлажнении до $n = 6$ и происходит очень резко в пределах $6 < n < 7,5$. Гипохромизм этой полосы также свидетельствует о переходе комплекса в спиральную конформацию.

При увлажнении пленки в интервале $7 < n < 10,5$ (или ОВ от 70 до 86%) заметных изменений спектральных параметров полос поглощения (рис.2,а,б) не наблюдается. По-видимому, в этом интервале существует стабильная спиральная форма poly(dA)-poly(dT). Из данных рентгеноструктурного анализа [14] известно, что в этом интервале n комплекс находится в так называемой β -V'-конформации.

Дальнейшее увлажнение пленки в интервале $10 < n < 11,5$ ($88\% < \text{ОВ} < 92\%$) приводит к значительному изменению в спектрах поглощения внутри- и внеколецевых колебаний (рис.1). Частота полосы поглощения при 1630 см^{-1} сдвигается в «красную» область до 1626 см^{-1} , а ее относительная интенсивность R увеличивается на 10% (рис.2,а). Полоса поглощения при 1667 см^{-1} (колебание в основном C4O4-групп атомов) снова претерпевает низкочастотный сдвиг до 1664 см^{-1} , а ее интенсивность возрастает на 32% (рис.2,б). Уменьшается также частота полосы поглощения $\nu = 1715 \text{ см}^{-1}$ (до 1713 см^{-1}) при увлажнении недейтерированной пленки в этом же интервале n . Уменьшение частот этих полос и рост их интенсивности, а также низкочастотное смещение полосы поглощения при $\nu = 1715 \text{ см}^{-1}$ до

$\nu = 1643 \text{ см}^{-1}$ (рис.1,б), связанной, по-видимому, с колебанием атома азота в третьем положении тимина, свидетельствует о том, что между А-Т - парами устанавливаются более прочные Н-связи при переходе комплекса в новое структурное состояние в этом интервале n . Уменьшение частоты полосы поглощения, связанной с колебанием атома азота в третьем положении аденина, с 1630 см^{-1} до 1626 см^{-1} (рис.2,а) и уменьшение полуширины полосы поглощения при $\nu = 1697 \text{ см}^{-1}$ внекольцевого колебания C2O2 атомов тимина (рис1,б), по-видимому, связано с усилением Н-связей в водном мостике $\text{C2O}\dots\text{H-O-H}\dots\text{N3}$, что должно привести к более прочному связыванию адениновой и тиминовой цепей в комплексе. Существование таких мостиков подтверждается данными рентгеновской дифракции [15]. Расчет, проведенный в работе [16], показал, что уменьшение расстояния между атомами N3 аденина и кислородом в связи C2O2 тимина сопровождается увеличением энергии взаимодействия между противоположными цепями комплекса.

Таким образом, ИК-спектроскопические данные свидетельствуют о том, что в узком интервале n ($10 < n < 11,5$) двухспиральный комплекс $\beta\text{-B}'$ -формы poly(dA)-poly(dT) перешел в иное структурное состояние, соответствующее, по-видимому, $\alpha\text{-B}'$ -конформации, известной из рентгеноструктурного анализа [19].

Дальнейшее увлажнение пленки вплоть до 100% ОВ не приводит к изменению спектральных параметров полос поглощения. Это говорит о том, что $\alpha\text{-B}'$ -форма poly(dA)-poly(dT) является стабильной по отношению к дальнейшему увлажнению и, очевидно, именно в этой конформации комплекс существует в водном растворе.

Область поглощения сахарофосфатной цепи. На рис.1,а видно, что с ростом ОВ (или n) полосы поглощения антисимметричного ($\nu_{\text{ас}} = 1245 \text{ см}^{-1}$) и симметричного ($\nu_{\text{с}} = 1096 \text{ см}^{-1}$) колебаний фосфатов PO_2^- и дезоксирибозы ($\nu = 964 \text{ см}^{-1}$) существенно образом изменяются по частоте и интенсивности. Отметим также, что полоса поглощения антисимметричного колебания фосфатов $\nu_{\text{ас}} = 1245 \text{ см}^{-1}$ не перекрывается другими полосами и форма ее симметрична во всем интервале ОВ. Поскольку, как хорошо известно, это колебание весьма чувствительно к конформационному состоянию дезоксирибоз в цепях нуклеиновых кислот, можно утверждать, что конформации адениновой и тиминовой сахарофосфатных цепей идентичны.

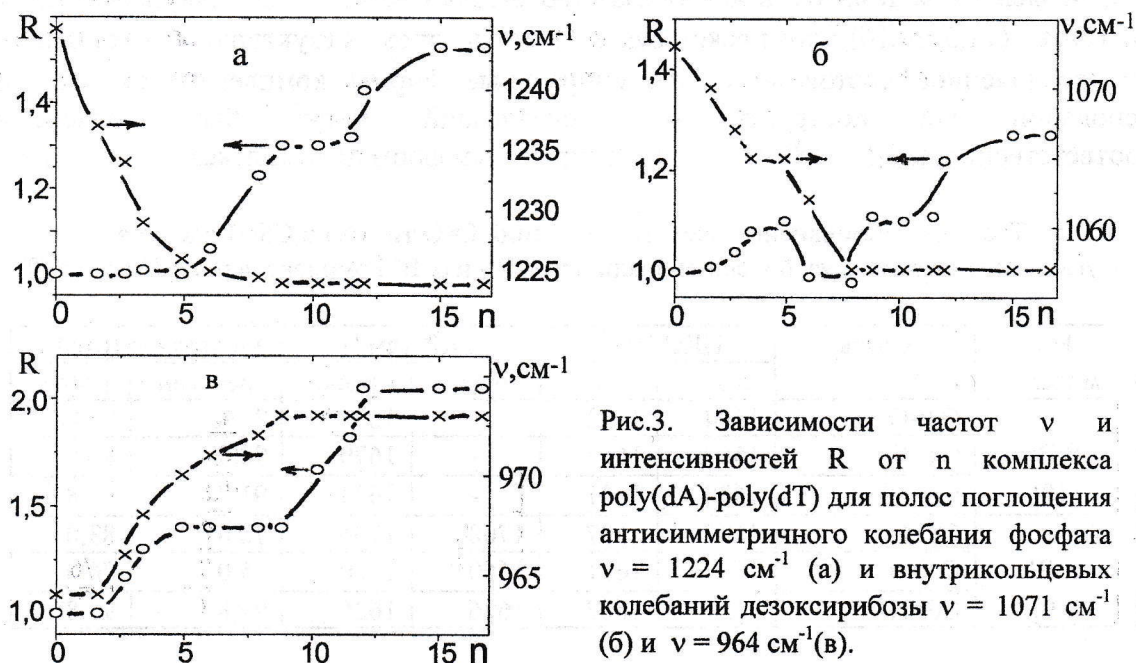


Рис.3. Зависимости частот ν и интенсивностей R от n комплекса poly(dA)-poly(dT) для полос поглощения антисимметричного колебания фосфата $\nu = 1224 \text{ см}^{-1}$ (а) и внутрикольцевых колебаний дезоксирибозы $\nu = 1071 \text{ см}^{-1}$ (б) и $\nu = 964 \text{ см}^{-1}$ (в).

Зависимости ν и R от n для указанных полос поглощения представлены на рис.3,а-в. С ростом n до $n = 7-8$ частота ν_{as} уменьшается с 1245 см^{-1} до 1224 см^{-1} , что свидетельствует о наличии гидратации фосфатных групп комплекса. Интенсивность R в начале интервала изменения n постоянна и возрастает на 30% с середины интервала, что также говорит о гидратации PO_2^- -групп. Как и в случае полос поглощения аденина и тимина, в интервале $7 < n \leq 11$ интенсивность R без частотного сдвига увеличивается на 20%. Это свидетельствует о том, что переход комплекса из одного структурного состояния в другое сопровождается дополнительным связыванием молекул воды фосфатными группами.

Переход в спиральную β -V'-конформацию в интервале $2 < n < 8$ можно видеть на зависимости ν от n полосы поглощения дезоксирибозы при 1073 см^{-1} . В этом интервале изменения n частота полосы уменьшается на $\Delta\nu = 16 \text{ см}^{-1}$, что связано с изменением конформации дезоксирибозы [17] и, по-видимому, с ее гидратацией, поскольку в этом интервале (вследствие поляризации соответствующей связи дезоксирибозного кольца) увеличивается интенсивность R на 10% (рис.3,б). Как и в случае с ν_{as} в интервале $7 < n \leq 11$ параметры ν и R этой полосы не изменяются, и только при $n > 11$ интенсивность R без частотного сдвига увеличивается на 15%, что, по всей видимости, связано с гидратацией дезоксирибозы.

Высокочастотный сдвиг другой полосы дезоксирибозы при $\nu = 964 \text{ см}^{-1}$ в интервале $2 < n < 8$ (рис.3,в), вероятно, также связан с переходом дезоксирибозы в другое конформационное состояние. Характер возрастания R отражает увеличение поляризации соответствующей связи при взаимодействии молекул воды с дезоксирибозой.

По «насыщению» спектральных параметров ν и R (рис.2, рис.3) можно отметить, что степень гидратации второго структурного состояния комплекса (по-видимому, β -V'-конформации) находится в пределах 7-8 молекул воды на нуклеотид. Полная гидратация комплекса в структурном состоянии α -V'-формы наступает при связывании 12-13 молекул воды на нуклеотид.

Таким образом, особенности, обнаруженные на зависимостях спектральных параметров полос поглощения аденина, тимина и сахарофосфатной цепи от n или ОВ, объясняются тем, что в интервалах ОВ 0-32% ($0 < n < 2,5$), 32-76% ($2,5 < n \leq 7,5$) и 88-100% ($11,5 < n < 16$) комплекс существует в трех структурных состояниях: неупорядоченное состояние и две спиральные формы комплекса, которые на основании рентгеноструктурных исследований могут быть отнесены, соответственно, к β -V'-[18] и α -V'-[19] спиральным формам комплекса.

Таблица 1. Резонансные частоты колебаний C=O тимина и C6N1 аденина и углы наклона этих связей к оси спирали для β -V'- и α -V'-комплексов poly(dA)-poly(dT)

РС модель	Связь	ИКС (см^{-1})		СКР (см^{-1})		Угол наклона (град)	
		эсп.	расч.	эсп.	расч.	рентген	расчет
β -V' [18]	C2=O	1694	1693	-	1696	94,8	99,0
	C4=O	1667	1667	-	1670	90,0	86,0
	C6=N1	1630	1631	-	1634	91,8	91,8
α -V' [19]	C2=O	1697	1697	1700	1700	78,0	83,0
	C4=O	1664	1661	1660	1660	75,0	76,0
	C6=N1	1627	1627	1626	1625	97,8	97,8

Для подтверждения такого отнесения в рамках элементарной теории молекулярных экситонов [7,20] нами были рассчитаны резонансные частоты некоторых вне- и внутрикольцевых колебаний для этих спиральных структур комплекса. В табл.1 представлены результаты расчетов резонансных частот и данные ИКС и СКР, а также дано сравнение рассчитанных углов наклона соответствующих связей к оси спирали с данными рентгеноструктурных моделей.

Видно вполне удовлетворительное согласие рассчитанных резонансных частот и экспериментально наблюдаемых в ИКС и СКР. Получено также хорошее согласие рассчитанных углов наклона связей C2=O, C4=O тимина и C6=N1 аденина с соответствующими углами, полученными в рентгеноструктурных моделях. Небольшие различия объясняются тем, что фактически рассчитывался не угол наклона связи, а угол наклона соответствующего данной связи дипольного момента перехода. Таким образом, эти данные свидетельствуют о справедливости нашего отнесения обнаруженных структурных состояний изучаемого комплекса.

ИК-спектры сорбированной воды. Спектры воды, сорбированной на комплексе poly(dA)-poly(dT) сняты в области 3800-2900 cm^{-1} , где находится сложная полоса поглощения ОН-групп. Обнаружено, что максимум этой полосы поглощения с ростом n сдвигается в высокочастотную область с 3370 cm^{-1} до 3410 cm^{-1} , т.е. до максимума аналогичной полосы жидкой воды. На этом основании с использованием соотношения $\Delta\nu \sim \Delta H$ была рассчитана избыточная энергия (ΔH) Н-связи вода - комплекс относительно Н-связи вода - вода. Ошибка определения ΔH составляла не более 10%. Зависимость $\Delta H(n)$ приведена ниже.

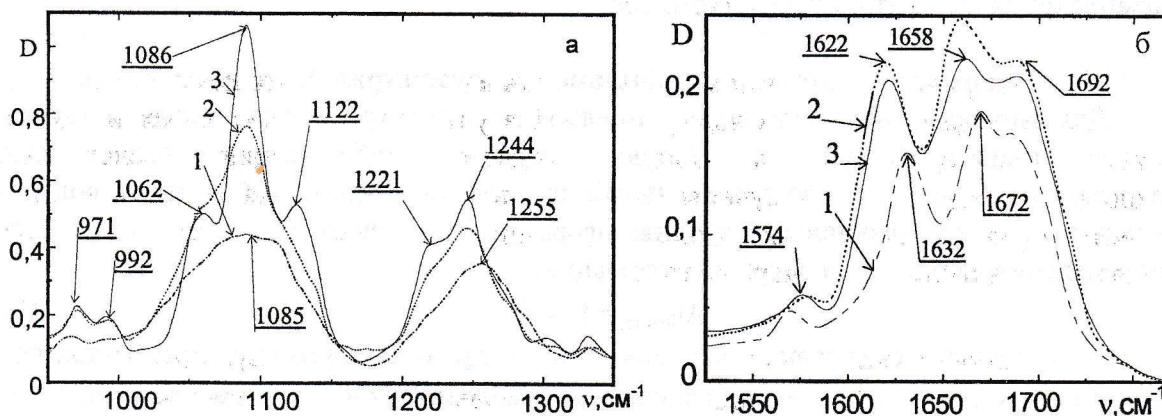


Рис.4. ИК-спектры пленок poly(rA)-poly(rU) в недеутерированном (а) и дейтерированном (б) состояниях при ОВ: 1 - 0%; 2 - 44%; 3 - 80%

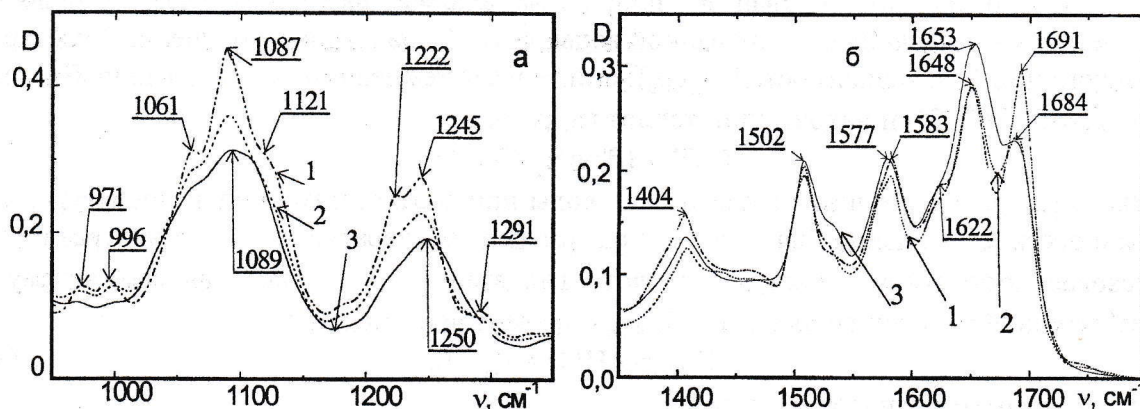


Рис.5. ИК-спектры пленок poly(rG)-poly(rC) в недеутерированном (а) и дейтерированном (б) состояниях при ОВ: 1 - 0%; 2 - 32%; 3 - 76%

На рис.4 и 5 приведены спектры полинуклеотидов poly(rA)-poly(rU) и poly(rG)-poly(rC) при различных ОВ в дейтерированном и недейтерированном состоянии. С увеличением ОВ наблюдаются значительные изменения в спектральных областях поглощения азотистых оснований ($1800-1300 \text{ см}^{-1}$) и сахарофосфатной цепи ($1300-900 \text{ см}^{-1}$). Подробный анализ зависимостей ν и R полос поглощения от n [7,8], как и в случае рассмотренного комплекса poly(dA)-poly(dT), позволил найти интервалы n моногидратного состояния, существования А-формы РНК, а также степени их гидратации. В табл.2 приведены результаты по трем изученным комплексам.

Таблица 2. Интервалы n , соответствующие разным структурным состояниям комплексов полинуклеотидов, и степени гидратации этих комплексов

Вещество	Интервал n моногидратного состояния	Интервал n А-формы РНК	Интервал n В-формы ДНК	Степень гидратации (n)
poly(dA)-poly(dT)	$0 < n \leq 2$	-	$2 < n \leq 12$	12-13
poly(rA)-poly(rU)	$0 < n \leq 3$	$3 < n \leq 12$	-	12-14
poly(rG)-poly(rC)	$0 < n \leq 1,5$	$1,5 < n \leq 8$	-	8

Видно, что связывание 2-3 молекул воды (моногидратный слой) не приводит к структурным перестройкам и только при сорбции воды $n > 3$ полинуклеотиды претерпевают структурные переходы. Отметим также, что степень гидратации комплекса зависит от нуклеотидного состава.

Энергия гидратации и стабильность двухспиральных комплексов

Для определения вклада воды, Н-связей в уотсон-криковских парах и других типов взаимодействий в общую энергию стабилизации исследуемых полинуклеотидов были получены значения энергии связывания молекул воды с комплексами на различных ступенях формирования спиральных структур. Для определения избыточной энергии гидратации:

$$\Delta E_{\text{гидр}} = E_i - E_0, \quad (1)$$

где E_i - энергия связывания i -й молекулы воды с соответствующим гидратно-активным центром, а E_0 - средняя энергия взаимодействия вода - вода в жидкой фазе, равная $40,5 \text{ кДж/моль}$ в пересчете на водородные связи [21] использовались три метода.

Первый из них основан на подробном анализе частотных сдвигов полосы валентного колебания сорбированной воды, другой - на анализе полученных изотерм гидратации (т.е. зависимостей $n(p/p_0)$) в интервале температур $10-40^\circ\text{C}$ (подробно см. в работах [22,23]) и нахождении теплот гидратации Q_e :

$$-Q_e/R = (\partial \ln p/p_0) / \partial (1/T), \quad (2)$$

Здесь p_0 - давление насыщенного пара воды при соответствующей температуре, p - равновесное давление пара воды при разных температурах, R - универсальная газовая постоянная. «Чистую» теплоту гидратации $\Delta H/\partial n$, которая соответствует избыточной энергии гидратации $\Delta E_{\text{гидр}}$, определяли по формуле:

$$\Delta E_{\text{гидр}} = \Delta H/\partial n = Q_e - L, \quad (3)$$

где L - теплота испарения воды.

В третьем методе непосредственно калориметрически определяли энтальпию испарения воды из комплексов при различных влажностях образцов и находили

число испарившихся молекул воды. Из этих данных получали зависимость от n избыточной энтальпии испарения $\Delta H(n)$ молекул воды.

Имеется удовлетворительное согласие найденных значений энергии связывания молекул воды, определенных этими тремя независимыми методами.

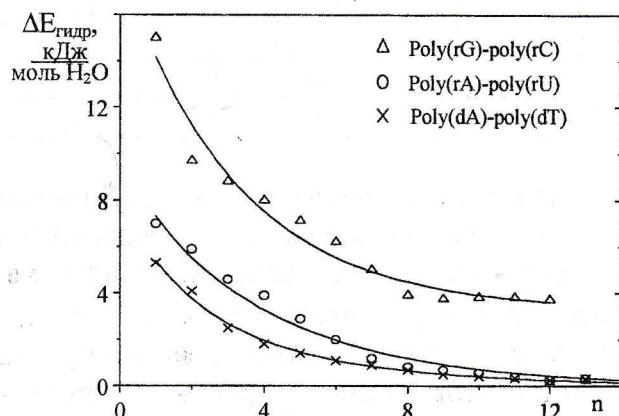


Рис.6. Зависимости избыточной энергии гидратации $\Delta E_{\text{гидр}}$ от n для комплексов poly(rG)-poly(rC), poly(rA)-poly(rU) и poly(dA)-poly(dT).

На рис.6 представлены усредненные зависимости от n избыточных энергий гидратации $\Delta E_{\text{гидр}}$ для всех трех исследованных комплексов. Отметим следующие особенности на этих кривых: (1) все функции $\Delta E_{\text{гидр}}(n)$ являются монотонно убывающими, т.е. по мере сорбции молекул воды их энергии связывания с гидратно-активными центрами уменьшаются; (2) если для первых двух комплексов зависимости $\Delta E_{\text{гидр}}(n)$ во всем интервале изменения n почти совпадают, то для комплекса poly(rG)-poly(rC) $\Delta E_{\text{гидр}}(n)$ проходит значительно выше, т.е. с гидратно-активными центрами этого комплекса молекулы воды образуют более прочные H-связи; (3) избыточная энергия гидратации $\Delta E_{\text{гидр}}$ на заключительной стадии формирования гидратных оболочек у комплексов poly(rA)-poly(rU) и poly(dA)-poly(dT) стремится к нулю, в то время как для комплекса poly(rG)-poly(rC) $\Delta E_{\text{гидр}}$ в этих условиях имеет значительную величину (3,3-3,5 кДж/моль).

На основании данных рис.6 и интервалов значений n , в которых формируется моногидратный слой воды и спиральные структуры полинуклеотидов для каждого комплекса (табл.2), найдена полная энергия гидратации, энергия гидратации моногидратного слоя и энергия гидратации молекул воды А- и В - формирующих слоев (табл.3).

Расчеты выполнены по формуле:

$$\Delta E_{\text{гидр}} = \sum_i^N n_i \Delta E_i, \quad (4)$$

где n_i - число молекул воды в гидратной оболочке с энергией связывания ΔE_i , N - число молекул воды в слое.

Из таблицы видно, что при переходе из неупорядоченного состояния в спиральную конформацию poly(rA)-poly(rU) и poly(dA)-poly(dT) энтальпийные затраты на гидратацию почти одинаковы, в то время как для poly(rG)-poly(rC) соответствующая величина почти в два раза больше. Этим, по-видимому, и объясняется более высокая термостойкость комплекса poly(rG)-poly(rC) по сравнению с комплексами poly(rA)-poly(rU) и poly(dA)-poly(dT).

Таблица 3. Распределение энергий молекул воды по слоям в комплексах poly(rA)-poly(rU), poly(dA)-poly(dT) и poly(rG)-poly(rC)

Тип гидратного слоя	Энергия $\Delta E_{\text{гидр}}$ на пару нуклеотидов, кДж/моль H_2O		
	poly(rA)-poly(rU)	poly(dA)-poly(dT)	poly(rG)-poly(rC)
Моногидратный слой	34,8	19,2	32,8
Гидратная вода А-формы РНК	25,0	-	39,2
Гидратная вода α -В'-формы ДНК	-	26,6	-
Полная энергия гидратации	59,8	45,8	72,0

Для количественной оценки вклада гидратации в общую энергию стабилизации структуры исследуемых комплексов воспользуемся подходом, предложенным нами в [22,25] и основанном на калориметрическом определении энтальпийной составляющей свободной энергии перехода нуклеиновой кислоты $\Delta H_{\text{перех}}$ из спирального в неупорядоченное состояние в процессе тепловой денатурации. Поскольку этот процесс сопровождается разрушением гидратного окружения, стабилизирующего вторичную структуру комплекса, разрывом водородных связей между парами оснований, а также нарушением остальных типов взаимодействий, $\Delta H_{\text{перех}}$ может быть представлена в виде суммы трех составляющих:

$$\Delta H_{\text{перех}} = \Delta E_{\text{гидр}}^{A,B} + \Delta E_{\text{H-св}} + \Delta E_{\text{ост}}, \quad (5)$$

где $\Delta E_{\text{гидр}}^{A,B} = \sum_{i=n_1}^{n_2} n_i \Delta E_i$ - избыточная по отношению к энергии взаимодействия «вода - вода» энергия гидратации комплекса при образовании спиральной А- или В-форм в интервале n от n_1 до n_2 , $\Delta E_{\text{H-св}} = \sum_{j=1}^{2,3} \Delta E_{\text{H-св},j}$ - избыточная энергия водородных связей в парах оснований ($j = 2$ для А-У или А-Т пар и $j = 3$ для G-C пар) относительно энергии водородной связи в системе «вода - вода», $\Delta E_{\text{ост}} = \sum_{k=1}^l \Delta E_k$ - энергия остальных типов взаимодействия.

Таблица 4. Типы энергий взаимодействия в комплексах poly(rA)-poly(rU), poly(dA)-poly(dT) и poly(rG)-poly(rC)

Тип энергии	Энергия на пару нуклеотидов, кДж		
	poly(rA)-poly(rU)	poly(dA)-poly(dT)	poly(rG)-poly(rC)
Энергия перехода спираль-клубок, $\Delta H_{\text{перех}}$ (по данным калориметрии)	34,3 [26]	30,9 [27,9]	53,1 [28]
Энергия гидратации А-формы РНК, $\Delta E_{\text{гидр}}^A$	25	-	39,2
Энергия гидратации В-формы ДНК, $\Delta E_{\text{гидр}}^B$	-	26,6	-
Энергия Н-связей в парах азотистых оснований	9,3	8,3	13,9

В табл.4 приведены калориметрически определенные энергии перехода спираль-клубок $\Delta H_{\text{перех}}$ [26-28] и энергии гидратации А-формы РНК $\Delta E_{\text{гидр}}^A$ и В-формы ДНК $\Delta E_{\text{гидр}}^B$ (данные табл.3). Используя эти данные и энергии Н-связей в парах, ранее определенные нами и другими авторами [1, 22], из уравнения (5) находим, что

суммарная энергия других типов взаимодействий $\Delta E_{\text{ост}}$ близка к нулю. Отметим также, что в общую энергию стабилизации спиральной структуры комплексов вклад молекул воды составляет 70-75%, а вклад Н-связей в уотсон-криковских парах - 25-30%.

ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ РАЗЛИЧНОГО НУКЛЕОТИДНОГО СОСТАВА

В отличие от синтетических двухспиральных комплексов природные дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) отличаются АТ/ГЦ - составом и различной нуклеотидной последовательностью, что определяет полиморфизм их двойных спиралей. Это должно отразиться на особенностях гидратного окружения и энергетике гидратации. В этом разделе статьи приводятся результаты исследования гидратации и влияние ее на стабильность природных ДНК из тимуса телянка, из *Micrococcus lysodeikticus* и из *Clostridium perfringens*. Предварительные результаты сообщались ранее [10,11].

Ик-спектры, гидратация и структурные переходы ДНК

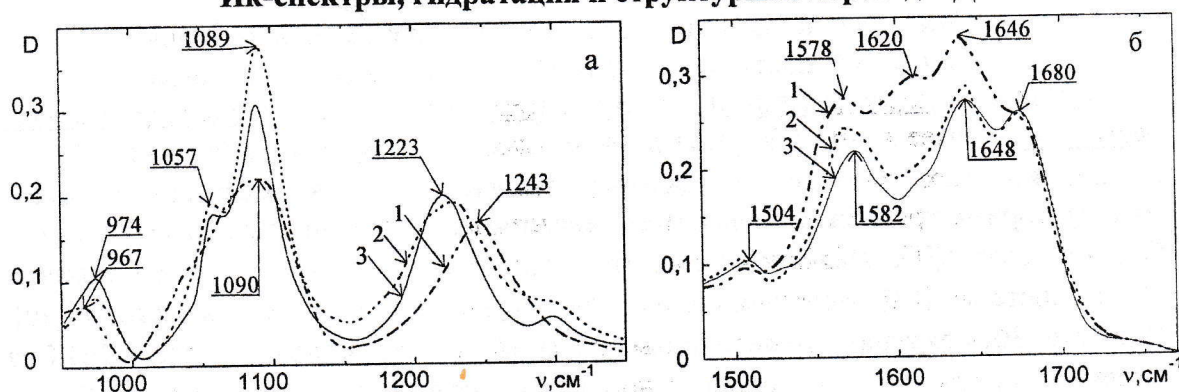


Рис.7. ИК-спектры пленок ДНК из *M. lysodeikticus* в недеирированном (а) и дейтерированном (б) состояниях при ОВ: 1 - 0%; 2 - 80%; 3 - 90%

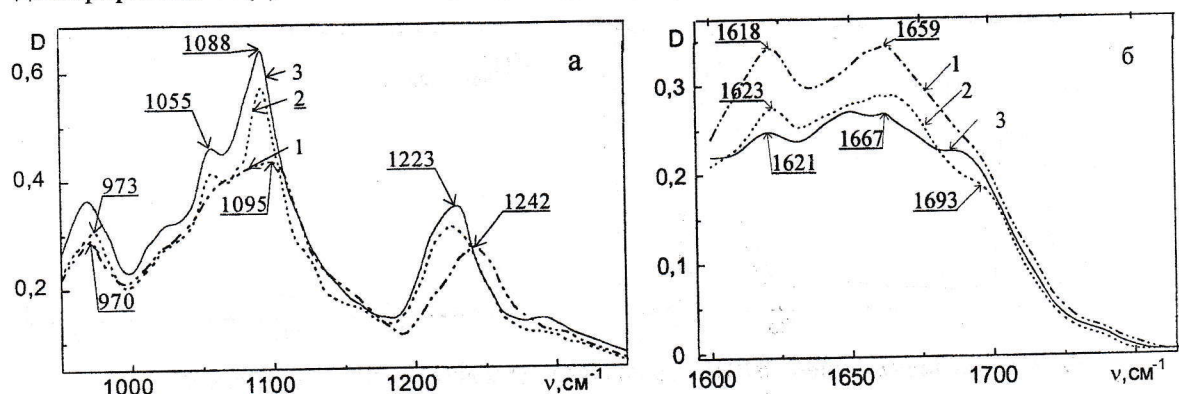


Рис.8. ИК-спектры пленок ДНК из *Cl. perfringens* в недеирированном (а) и дейтерированном (б) состояниях при ОВ: 1 - 15%; 2 - 76%; 3 - 96%

На рис.7(а,б) и 8(а,б) представлены спектры пленок ДНК из *M. lysodeikticus* и из *Cl. perfringens* при трех значениях ОВ в недеирированном и дейтерированном состояниях. Как и в случае полинуклеотидов с ростом ОВ наблюдаются значительные изменения спектральных параметров полос поглощения азотистых оснований ($1800-1300 \text{ см}^{-1}$) и сахарофосфатных цепей ($1300-900 \text{ см}^{-1}$), что связано со структурными изменениями ДНК и ее гидратного окружения в процессе увлажнения пленок. Подробный анализ зависимостей ν и R от n позволил определить области

существования моногидратного состояния, канонических А- и В-форм изученных ДНК и степени их гидратации. Соответствующие данные приведены в табл.5.

Таблица 5. Интервалы n структурного состояния различных типов ДНК и степени их гидратации

ДНК	Интервал n моногидратного состояния	Интервал n А-формы ДНК	Интервал n В-формы ДНК	Степень гидратации (n)
из <i>Cl. perfringens</i>	$0 < n \leq 5$	$5 < n \leq 11$	$11 < n \leq 14$	13-15
из тимуса теленка	$0 < n \leq 5$	$5 < n \leq 13$	$13 < n \leq 20$	20
из <i>M. lysodeikticus</i>	$0 < n \leq 8$	$8 < n \leq 13$	$13 < n \leq 16$	15-17

Из таблицы видно, что интервалы моногидратного состояния ДНК в 2-3 раза больше, чем у полинуклеотидов (см.табл.2), переход ДНК из А- в В-форму независимо от нуклеотидного состава осуществляется при связывании $n > 12$ молекул воды с ДНК.

Энергия гидратации, энтальпия структурных переходов и стабильность ДНК различного нуклеотидного состава

Энтальпия перехода спираль - клубок ДНК в пленках и в концентрированных растворах. Ранее в работе Клумпа и Аккермана [29] и др. исследованиях [27] при низких ионных силах и нейтральных значениях рН в растворах методом микрокалориметрии обнаружена слабая зависимость энтальпии перехода ($\Delta H_{\text{перех}}$) от G-C - состава ДНК. Найдено также, что энтальпия $\Delta H_{\text{перех}}$ зависит от содержания воды в системе ДНК - вода или концентрации нуклеиновой кислоты в растворе [30]. В работе [30] показано, что величины энтальпий перехода спираль - клубок ДНК из различных источников в концентрированном растворе (для тимусной ДНК при ионной силе 0,2 М NaCl) и во влажной пленке (при содержании нуклеиновой кислоты менее 60%) практически не отличаются.

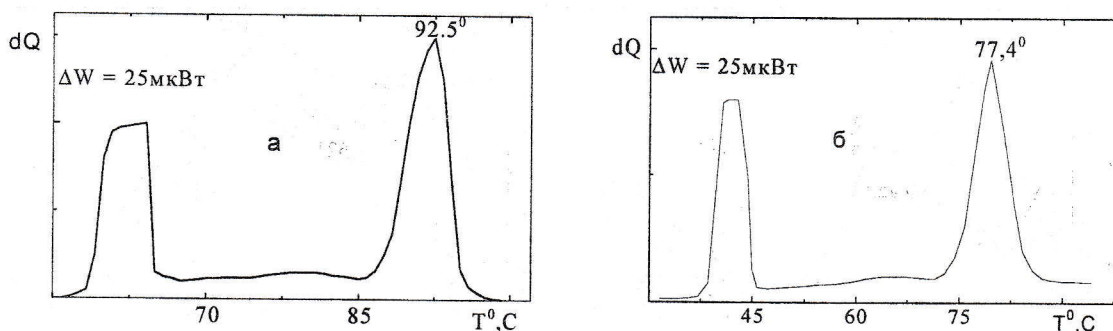


Рис.9. Кривые поглощения ДНК из *M. lysodeikticus* (а) и из *Cl. perfringens* (б) (концентрация - 0,05%, ионная сила - 0,1).

Учитывая эти результаты, мы провели калориметрическое определение энтальпии перехода ДНК из *M. lysodeikticus* и из *Cl. perfringens* в растворе с концентрацией нуклеиновой кислоты 0,05-0,1% в 0,05-0,1М растворах NaCl, т.е. в условиях, приближенных к состоянию ДНК в увлажненных пленках. На рис.9 приведены соответствующие кривые теплопоглощения ДНК из *M. lysodeikticus* и из *Cl. perfringens*. Найдено, что $\Delta H_{\text{перех}}$ для этих типов ДНК равна 11,1 ккал и 8,7 ккал (46,4 и 36,4 кДж) на моль пар оснований, соответственно. Эти величины оказались на 10-20% больше значений $\Delta H_{\text{перех}}$ для этих типов ДНК, приведенных в работе [29].

Учитывая, что в этой работе использовались растворы с ионной силой на порядок меньше, чем в наших исследованиях, указанные различия могут быть легко объяснены стабилизирующим действием ионов на ДНК.

Используя литературные данные [28,30] и наши результаты о значениях $\Delta H_{\text{перех}}$ для двухспиральных комплексов и природных АТ- и GC-обогащенных ДНК в условиях влажной пленки и концентрированных растворов, мы построили зависимость $\Delta H_{\text{перех}}$ от G-C - состава нуклеиновых кислот (рис.10). Эта зависимость (с хорошей точностью) имеет линейный характер, как и в случае растворов ДНК при низкой ионной силе.

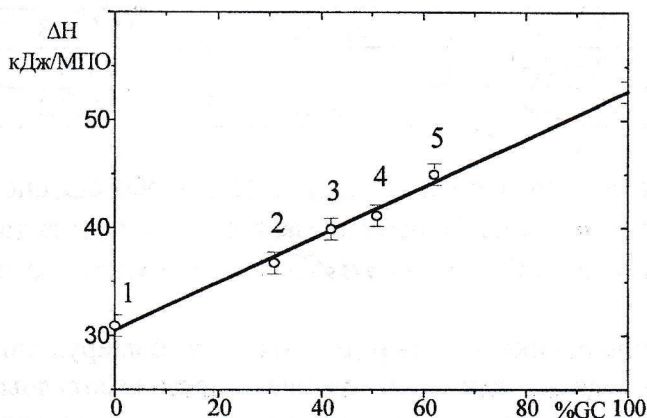


Рис.10. Зависимость энтальпии перехода спираль - клубок нуклеиновых кислот от их GC - состава:

- 1 - poly(dA)-poly(dT)
- 2 - ДНК из *Cl. perfringens*
- 3 - ДНК из тимуса телят
- 4 - ДНК из *E. coli*
- 5 - ДНК из *M. lysodeikticus*

Энергетика гидратации ДНК с различным нуклеотидным составом. Как и в случае полинуклеотидных комплексов, энергию гидратации или избыточную энтальпию связывания молекул воды с исследованными образцами ДНК (из тимуса телят [25], из *M. lysodeikticus* и из *Cl. perfringens*) определяли тремя способами.

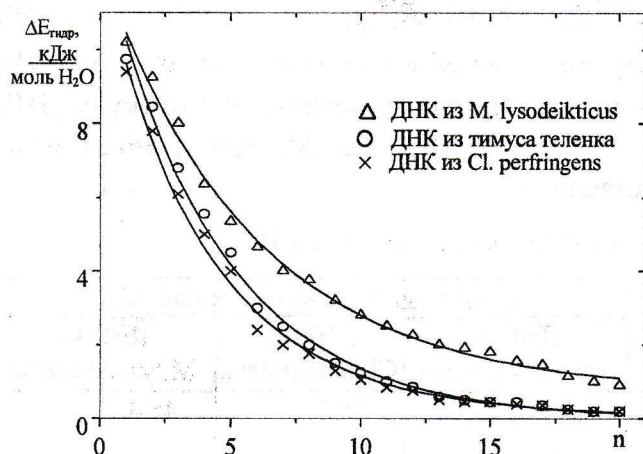


Рис.11. Зависимости избыточной энергии гидратации $\Delta E_{\text{гидр}}$ от n для ДНК из *M. lysodeikticus*, из тимуса телят и из *Cl. perfringens*.

На рис.11 приведены зависимости избыточной энергии гидратации $\Delta E_{\text{гидр}}$ от n для этих трех ДНК, отличающихся нуклеотидным составом. Видно, что $\Delta E_{\text{гидр}}$ в случае ДНК из *M. lysodeikticus*, обогащенной G-C-парами, больше для всех значений n по сравнению с ДНК, обогащенной А-Т-парами (из *Cl. perfringens*), а также ДНК из тимуса телят. При этом $\Delta E_{\text{гидр}}$ не стремится к нулю в полностью заполненной гидратной оболочке В - формы G-C-обогащенной ДНК из *M. lysodeikticus* в отличие от А-Т-обогащенной ДНК. Подобный эффект обнаружен также на полинуклеотидных комплексах.

С учетом табл.5 в табл.6 приведено суммарное распределение энергий гидратации молекул воды по слоям.

Таблица 6. Распределение энергий молекул воды по гидратным слоям в ДНК с различным нуклеотидным составом

Тип гидратного слоя	Энергия $\Delta E_{\text{гидр}}$ на один нуклеотид, кДж/моль H_2O		
	ДНК из тимуса телянка	ДНК из <i>M. lysodeikticus</i>	ДНК из <i>Cl. perfringens</i>
Моногидратный слой	35,0±1,5	51,7±2,4	33,0±1,5
Гидратная вода А-формы ДНК	12,4±2,4	12,7±1,5	11,4±1,8
Гидратная вода В-формы ДНК	2,3±0,9	5,2±5,1	2,0±0,9
Полная энергия гидратации	49,7±4,8	71,0±5,1	46,4±4,2

Видно, что $\Delta E_{\text{гидр}}$ моногидратного слоя и полная $\Delta E_{\text{гидр}}$ у G-C - обогащенной ДНК больше, чем у ДНК из тимуса телянка и из *Cl. perfringens*. Можно отметить так же, что для перехода ДНК (независимо от G-C - состава) из А- в В-форму требуются незначительные затраты энергии.

Стабильность ДНК в пленках. Для оценки вклада различных стабилизирующих типов взаимодействий в ДНК исходили, как и в случае полинуклеотидных комплексов, из того факта, что при тепловом переходе спираль - неупорядоченное состояние в пленке, сопровождающимся дегидратацией, разрушается гидратная оболочка, стабилизирующая спиральную структуру ДНК [31,32], и Н-связи в уотсон-криковских парах. Что касается Н-связей в парах, то, как показано выше, энергия их неодинакова, поэтому в случае ДНК необходимо учитывать нуклеотидный состав. Это можно сделать, переписав второй член в формуле(5) так:

$$\Delta E_{\text{H-св}} = \alpha \Delta E_{\text{H-св}}^{\text{AT}} + (1-\alpha) \Delta E_{\text{H-св}}^{\text{GC}}, \quad (6)$$

где $\Delta E_{\text{H-св}}^{\text{AT}}$ и $\Delta E_{\text{H-св}}^{\text{GC}}$ - избыточные энергии Н-связей в АТ- и GC - парах, α и $(1-\alpha)$ - относительные вклады АТ- и GC - пар азотистых оснований в молекулу ДНК (для ДНК из тимуса телянка $\alpha = 0,58$; для ДНК из *M. lysodeikticus* и из *Cl. perfringens* $\alpha = 0,28$ и $0,69$ соответственно).

Таблица 7. Типы энергий взаимодействия в ДНК

Тип энергии	Энергия на пару нуклеотидов, кДж		
	ДНК из тимуса телянка	ДНК из <i>Cl. perfringens</i>	ДНК из <i>M. lysodeikticus</i>
Энергия перехода спираль - клубок, $\Delta H_{\text{перех}}$ (по данным калориметрии)	40,1 [32]	36,4	46,4
Энергия гидратации В-формы ДНК $\Delta E_{\text{гидр}}$	29,4±2,4	26,8±1,8	35,8±1,5
Энергия Н-связей	10,7	10,0	12,3
Энергия других типов взаимодействия	0,0	-0,4	-1,7

В табл.7 приведены калориметрически определенные значения энтальпии перехода спираль - клубок (рис.10), энергии гидратации В-формы ДНК, состоящие из энергий гидратации А-формы ДНК и В-формы, энергии Н-связей, рассчитанные по формуле (6) на основании данных табл.4, и энергии других типов взаимодействий.

Обращает на себя внимание малое значение энергии других типов взаимодействия (стэкинг-взаимодействия). Возможно, что эти типы взаимодействий, рассмотренные Рейном [1] и другими авторами, не стабилизируют структуру ДНК или входят в третий член уравнения (6) с разными знаками. Из таблицы также видно, что водородные связи в парах, независимо от нуклеотидного состава изучаемых ДНК, вносят вклад до 25% в общую энергию стабилизации спиральной структуры макромолекул. Основным же стабилизирующим фактором структуры ДНК, как и в случае синтетических комплексов, являются молекулы воды гидратных оболочек.

Таким образом, полученные данные об энергетике гидратации полинуклеотидных комплексов и природных ДНК свидетельствуют о реалистичности концепции, согласно которой стабилизация спиральной структуры нуклеиновых кислот обеспечивается в основном их взаимодействием с гидратным окружением.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный нами комплексный подход к изучению особенностей гидратации НК позволил достаточно подробно изучить стадии формирования спиральных структур синтетических полинуклеотидов и природных ДНК различного нуклеотидного состава. Последовательный учет избыточной энергии гидратации при формировании структур НК выявил основные типы взаимодействий в системе НК - вода, стабилизирующие канонические А- и В-формы ДНК. Это прежде всего взаимодействие молекул воды с азотистыми основаниями и сахарофосфатной цепью НК. Суммарная энергия такого взаимодействия (вклад в общую энергию стабилизации спиральной структуры составил около 70%), как оказалось, зависит как от количества молекул воды, формирующих ту или иную структуру, так и от АТ- и GC-состава НК. Последнее нашло подтверждение в рентгеноструктурных исследованиях гидратных дуплексов, в которых установлено, что длины Н-связей в водных мостиках зависят от нуклеотидного состава [8]. Вклад энергий связей в уотсон-криковских парах в общую энергию стабилизации А- и В-формы ДНК независимо от нуклеотидного состава оказался равным 25-30%.

Однако, стэкинг-взаимодействие и другие типы взаимодействий, по нашим оценкам, заметного вклада в общую энергию стабилизации НК не вносят. С другой стороны, стэкинг-взаимодействие, существование которого не вызывает сомнения, появляется от того, что водные мостики, как это следует из рентгеноструктурных данных, сближают азотистые основания, перекрывая электронные облака сопряженных связей, до тех пор, пока силы отталкивания в межплоскостном взаимодействии не уравновесятся суммарными силами Н-связей водных мостиков. В равновесном состоянии эти силы вместе с силами Н-связей в уотсон-криковских парах формируют устойчивую структуру НК и определяют их динамические свойства.

Таким образом, вышеизложенные результаты, полученные нами различными физическими методами, и литературные данные о гидратации, структурных переходах и энергетических свойствах системы НК - переменное количество воды позволяют с определенной уверенностью утверждать, что гидратное окружение играет определяющую роль в формировании стабильных структур НК различного нуклеотидного состава и ответственно за их динамическое поведение.

Авторы выражают благодарность профессору В.Я.Малееву за обсуждение работы и ценные замечания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rein R. Intermolecular Interactions. From Dynamics to Biopolymers (Pullman B., Ed), New York, Brisbane, Toronto, p.414-488(1978)
2. Малеев В.Я., Семенов М.А., Гасан А.И., Кашпур В.А.// Биофизика.1993.Т.38.С.768-790
3. Eisenhaber F., Tumanyan V.U. and Abagyan R.A.//Biopolymers.1990.V.30,p.563-578
4. Теплухин А.В., Журкин В.Б., Джерниган Р., Полтев В.И.// Мол.биология.1996. Т.30.С.121-135
5. Данилов В.И., Желтовский Н.В., Слюсарчук О.Н, Альдерфер Дж.Л.// Биополимеры и клетка.1997.Т.13.№1.С.46-54
6. Semenov M.A., Bolbukh T.V. and Maleev V.Ya.//J.Mol.Struct.1997.408/409,p.213-217
7. Семенов М.А., Больбух Т.В., Малеев В.Я.// Биофизика.1985.Т.30.С.571-577
8. Семенов М.А., Малеев В.Я., Березняк Е.Г., Гасан А.И., Больбух Т.В.// Мол.биология. 1991.Т.25.С.1626-1634
9. Семенов М.А., Матвеев Д.А., Больбух Т.В., Малеев В.Я.// Биофизика.1994.Т.39.С.628-636
- 10.Семенов М.А., Больбух Т.В., Гасан А.И.,Малеев В.Я.//Биофизика.1996.Т.41.С.1007-1015
- 11.Семенов М.А., Гасан А.И., Больбух Т.В., Малеев В.Я.//Биофизика.1997.Т.42.С.591-598
- 12.Bolbukh T.V., Starikov E.B. and Semenov M.A.// Studia Biophysika.1985.V.108,p.199-207
- 13.Gasan A.I., Maleev V.Ya. and Semenov M.A.// Studia Biophysika.1990.V.130,p.171-178
- 14.Arnott S., Chandrasekaran R., Hall I.H. and Pnigjaner L.C.// Nucleic Res.1983.V.11, p.4141-4155
- 15.Skuratovskii I.Ya. Instituto Jun March de Estudios e Investigaciones, Centro de Reuniones Internacionales Sobre Biologia, Madrid, p.91 (1991)
- 16.Chuprina V.P.// Nucl.As.Res.1987.V.15,p.293-305
- 17.Lu K.C., Prohofsky E.W. and Zandt V.// Biopolymers.1977.V.16,p.2491-2505
- 18.Alexeev D.G., Lipanov A.A. and Skuratovskii I.Ya.// Nature.1987.V.325,p.821-823
- 19.Park H., Arnott S., Chandrasekaran R. and Millane R.P.//J.Mol.Biol.1987.V.325,p.513-523
- 20.Semenov M.A. and Bolbukh T.V.// Studia Biophysika.1984.V.102,p.215-220
- 21.Иогансен А.В., Розенберг М.Ш.//Опт.спектрос.1978.Т.44.С.87-92
- 22.Семенов М.А. Дисс.докт.физ.-мат.наук, М. МГУ, 1990
- 23.Bolbukh T.V., Semenov M.A., Starikov E.B. and Maleev V.Ya. Proc.Third European Conference on Spectr.Biol.Mol., Boogna, Italy, p.185-188(1989)
- 24.Saenger W., Hunter W.N. and Kennard O.// Nature.1986.V.324,p.385-388
- 25.Семенов М.А., Малеев В.Я.// Биофизика.1986.Т.31.С.764-767
- 26.Neumann E. and Ackermann Th.// J.Phys.Chem.1969.V.73,p.2170-2172
- 27.Хинц Г.И. Биохимическая термодинамика, под ред.М.Джоунс. М. Мир, 1982. 440 с.
- 28.Зайцев М.А., Филимонов В.В.//Биофизика.1990.Т.35.С.53-57
- 29.Klump H. and Ackermann T.//Biopolymers.1971.V.10,p.513-522
- 30.Андроникашвили А.Л., Мгеладзе Г.Н., Меноселидзе Д.Р. 6-я Всесоюзная конференция по калориметрии. Тбилиси.1973.С.496-500
- 31.Сухоруков Б.И., Семенов М.А., Малеев В.Я., Шабарчина Л.И.// Биофизика.1979. Т.24. С.611-619
- 32.Семенов М.А., Сухоруков Б.И., Малеев В.Я., Шабарчина Л.И.// Биофизика.1979.Т.24. С.210-216