DOI: 10.17725/rensit.2021.13.129

Какие свойства растворов неэлектролитов чувствует молекула ДНК?

Маленков Г.Г.

Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, http://www.phyche.ac.ru/

Москва 119991, Российская Федерация

E-mail: egor38@mail.ru

Поступила 27.04.2021, рецензирована 10.05.2021, принята 17.05.2021

Аннотация: **Еще в 1953 году стало известно, что при пониженной относительной влажности атмосферы (около 70%) пленки ДНК находятся в А-форме, а при более высокой влажности (более 80%) в В-форме. Относительная влажность атмосферы соответствует активности воды. В начале 70-х годов было обнаружено, что ДНК переходит в А-форму при добавлении к воде неэлектролитов, таких как одноатомные спирты, диоксан, тетрагидруфуран. Было логично предположить, что в растворах А форма возникает примерно при тех же значениях активности воды, что и в атмосфере. Так оно и оказалось. Но в водных растворах сильно полярных неэлектролитов – метанола, этиленгликоля переход ДНК в А-форму не происходил даже при очень низких значениях активности воды. Было сделано предположение, что А-форма ДНК может возникать только в средах достаточно низкой полярности. В качестве меры полярности жидкого раствора была использована константа сверхтонкого расщепления (А) в спектре ЭПР нитроксидного спин-зонда, помещенного в этот раствор. Оказалось, что переход ДНК в А-форму происходит при достижении величины А. Полярность же метанола и этиленгликоля была намного выше, чем растворов, в которых происходит В-А переход. В-А переход ДНК происходит также в водных растворах трифторэтанола. Но он происходит при значениях константы сверхтонкого расщепления значительно бóльших, чем в других растворах неэлектролитов. Активность воды в зоне В-А перехода ДНК в растворах трифторэтанола также не соответствует активности воды, рассчитанной для других растворов неэлектролитов, в которых наблюдается В-А переход ДНК.**

Ключевые слова: **активность воды, неэлектролиты, А- и В-формы ДНК, полярность, спетры ЭПР, константы сверхтонкого расщепления**

УДК 577.113

Для цитирования: Маленков Г.Г. Какие свойства растворов неэлектролитов чувствует молекула ДНК? *РЭНСИТ*, 2021, 13(2)129-136. DOI: 10.17725/rensit.2021.13.129.

What properties of non-electrolyte solutions does a DNA molecule feel?

George G. Malenkov

Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry RAS, http://www.phyche.ac.ru/

Moscow 119991, Russian Federation

E-mail: egor38@mail.ru

Received 27 April, 2021, peer-reviewed 10 May, 2021, accepted 17 May, 2021

Abstract: **As early as in 1953 it was reported that at low relative humidity of the atmosphere (about 70 %) DNA films were in A-form, while at higher humidity (more than 80%) they were in B-form. Relative humidity of the atmosphere corresponds to the water activity in the system. It was found in the beginning of the 70th that DNA transfers to the A-form when non-electrolytes, such as monoatomic alcohols, dioxane, tetrahydrofurane were added to water. It was reasonable to suppose that B to A transition of DNA occurs in the non-electrolyte solutions at the same values af water activity as in the moist atmosphere. This prediction was borne out. But in water solutions of very polar non-electrolytes such as methanol and ethylene glycol B to A DNA does not occur even at very low water activity values. It was supposed that A form of DNA can arise only in the medium with sufficiently low polarity. We used hyperfine splitting constant (A) of a nitroxide spin label determined from the EPR spectra as a measure of the liquid solvent polarity. It was found that DNA transition into B form occurs when A reached a certain value. Polarity of methanol and ethylene glycol is much higher than that of the solutions in which B to A DNA transition takes place. This transition also occurs in water solutions of trifluoroethanol. But in these solutions the transition takes place at hyperfine splitting values, which are much greater than in other non-electrolyte solutions. Water activity in the zone of B-A DNA transition in trifluoroethanol solutions does not correspond water activity which was calculated for other nob-electrolyte solutions in which B-A transition is observed.**

Keywords: **water activity, non-electrolytes, A and B forms of DNA, polarity, EPR spectra, hyperfine splitting constants**

UDC 577.113

For citation: Malenkov G.G. What properties of non-electrolyte solutions does a DNA molecule feel? *RENSIT*, 2021, 13(2):129-136. DOI: 10.17725/rensit.2021.13.129.

Содержание

1. **Введение (130)**
2. **Активность воды и B-A переход ДНК в растворах неэлектролитов (131)**
3. **Полярность раствора и B-A переход ДНК (132)**
4. **Энтальпия B-A перехода ДНК (134)**
5. **Заключение (134)**

Литература (135)

1. ВВЕДЕНИЕ

В 1976 году В.И. Иванов на семинаре по изучению жидкостей и растворов, руководимом О.Я. Самойловым, сделал доклад «ДНК как инструмент для изучения гидратации ионов». В этом докладе обсуждалось влияние ионов щелочных металлов на конформацию двуспиральных молекул ДНК, в частности на ширину узкой бороздки [1]. См. также [2,3]. В статье [1] влияние ионов на ДНК исследовалось в водно-метанольных растворах, в которых, в которых ДНК находится в пределах B-семейства конформаций. В водных растворах диоксана, этанола и изопропанола при повышении концентрации неэлектролита происходит переход ДНК в A-конформацию. Еще в 1953 году Франклин и Гослингом было показано, что волокна ДНК переходят в A-форму при понижении относительной влажности атмосферы [4]. Это было подтверждено спектральными методами в работе Пиле и Брамса [5].

Мною при обсуждении экспериментов, результаты которых описаны в [1], было высказано предположение, что переход ДНК в водных растворах неэлектролитов (кроме метанола) в А-форму происходит при достижении значений активности воды приблизительно 0.8, при том же значении активности воды, что в атмосфере [4,5]. Напомним, что активность воды в газовой фазе равна относительной влажности: $a_{H2O} = P_{H2O}/P^0_{H2O}$; P_{H2O} – парциальное давление водяного пара в системе, P^0_{H2O} – давление пара над чистой водой при этой же температуре.

Отличие влажного воздуха от идеального газа при этом не учитывается. Для расчета активности в водном растворе необходимо знать состав пара над этим раствором.

При проведении расчетов величин активности воды в водных растворах неэлектролитов, в которых наблюдается В-А переход ДНК предположение о том, что В-А переход в растворах происходит при тех значениях активности воды, как и в волокнах и пленках ДНК, находящихся во влажной атмосфере, оправдалось. Для дальнейшей проверки этого предположения было произведено более подробное исследование В-А перехода ДНК в системах этанол-вода, изопропанол-вода и в тройных системах изопропанол-этанол-вода, изопропанол-диоксан-вода и изопропанол-тетрагидрофуран-вода [6].

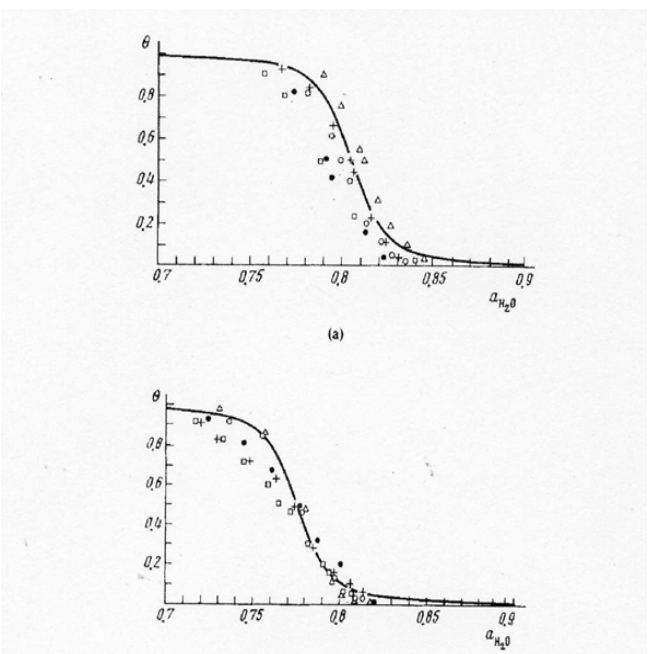
В этой работе описана методика расчета активности воды и источники данных о составе газовой фазы над растворами неэлектролитов, которые необходимы для таких расчетов. В работе [7] более подробно описан В-А переход в тройных системах изопропанол-этанол-вода и диоксан-этанол-вода. Методика расчета активности воды изложена более обстоятельно, чем в [6].

2. АКТИВНОСТЬ ВОДЫ И В-А ПЕРЕХОД ДНК В РАСТВОРАХ НЕЭЛЕКТРОЛИТОВ

На **Рис. 1** показаны зависимости доли А-формы ДНК (θ) от активности воды (a_{H2O}) для систем вода-этанол-изопропанол (*a*) и вода-этанол диоксан (*b*). Сплошная линия рассчитывалась по формуле

$$(1 - 2\theta)/[\theta(1 - \theta)]^{1\backslash 2} = (1 - S)/(\sigma S)^{1/2}.$$

Формула выведена Ивановым и др. [8], σ – фактор кооперативности; S – $\exp(a_{H2O} - a_0/Q)$, где a_0 – a_{H2O} активность воды в точке полуперехода, а Q – подгоночный



b

Рис. 1. *В-А переход ДНК в системах вода-этанол-изопропанол (a) и вода-изопропанол-диоксан (b).*

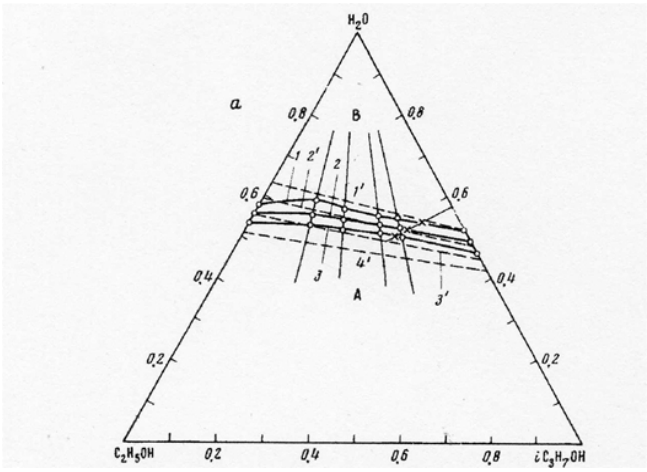


Рис. 2. *Система вода-этанол-изопропанол. Зона B-A перехода ДНК.*

параметр. Значки разной формы – величины θ и a_{H2O} для растворов с разным содержанием компонентов.

На **Рис. 2** данные для системы вода-этанол-изопропанол показаны на треугольной диаграмме. Концентрации в мольных долях. Сплошные линии – равные значения доли A-формы (θ); сверху вниз: θ = 0.35, 0.5 и 0.75. Пунктир – линии равных значений a_{H2O}. Сверху вниз: 0.82, 0.80, 0.78, 0.76.

3. ПОЛЯРНОСТЬ РАСТВОРА И B-A ПЕРЕХОД ДНК

Как уже говорилось, в водно-метанольных растворах ДНК всегда находится в конформациях, принадлежащих к B-семейству, и при крайне низких значениях активности воды [1,9]. ДНК находится в B-форме и в почти безводном этиленгликоле [10,11]. То же можно сказать о волокнах ДНК, содержащих инозитол, находящихся в сухом воздухе [12]. Таким образом, вода является не единственным веществом, которое стабилизирует B-форму ДНК. В системах, содержащих такие вещества, как метанол и этиленгликоль для объяснения B-A перехода ДНК нельзя применять активность воды, как параметр, ответственный за B-A переход ДНК.

Интуитивно ясно, что этанол, изопропанол, диоксан и тетрагидрофуран менее полярные вещества, чем вода, метанол и этиленгликоль. Но как охарактеризовать полярность жидкостей и растворов?

Наиболее простой и физически ясной количественной мерой полярности водосодержащего раствора является поляризуемость, определяемая из формулы Клаузиуса-Мосотти при помощи уравнения, выведенного в работе [13].

$$RT\ln\gamma_{H_2O} = \frac{\mu^2}{d^2}\left(\frac{\varepsilon-1}{2\varepsilon+2} - \frac{\varepsilon^0-1}{2\varepsilon^0+2}\right). \quad (1)$$

Здесь $\gamma_{H2O} = a_{H2O}/x_{H2O}$ – коэффициент активности воды (x –мольная доля), μ и d – дипольный момент и молекулярный диаметр молекулы самого полярного компонента (воды), ε^0 - статическая диэлектрическая проницаемость воды, ε – статическая диэлектрическая проницаемость раствора.

Таким образом, по крайней мере в некоторых случаях, существует простое соотношение между активностью воды и полярностью. Химический потенциал воды $\mu_{H2O} = \mu_0 + RT\ln a_{H20} = \mu_0 + RT\ln\gamma_{H2O} + RT\ln x_{H2O}$, a_{H20} – активность воды, γ_{H2O} – коэффициент активности воды, x_{H2O} – мольная доля воды в системе. Комбинируя с (1), мы можем написать

$$\mu_{H_2O} = \mu_0 + \frac{\mu^2}{d^2}\left(\frac{\varepsilon-1}{2\varepsilon+2} + \frac{\varepsilon^0-1}{2\varepsilon^0+2}\right).$$

Однако, мы не производили расчет полярности наших растворов. Мы использовали эмпирический метод измерения полярности жидкого раствора при помощи константы сверхтонкого расщепления (A) в спектре ЭПР нитроксидного спин-зонда [14]. Величина A зависит от взаимодействия неспаренного электрона группы N-O с окружающей средой. Подробности см. в нашей публикации [15] и, особенно, в [16]. Чем более полярна среда, тем больше константа сверхтонкого расщепления A. В качестве спин-зондов мы использовали 2,2,6,6-тетраметил-1N-оксипиперидинол и 2,2,6,6-тетраметил-1N-оксипиперидин уксусную кислоту.

В этой статье мы будем приводить данные только для первого зонда.

Мы растворяли спин-зонды в растворах неэлетролитов таких составов, в которых согласно нашим исследованиям методом кругового дихроизма 50% ДНК находится в форме A и 50% – в форме B. Спектры ЭПР получились на приборе Varian E-104. Величина A измерялась между центральной и низкопольной компонентами триплетного спектра ЭПР в Гауссах.

Таблица 1

Свойства растворов, в которых половина ДНК переходит из формы B в форму A (θ = 0.5) при 25°C.

Система	X_1	X_2	X_3	a_{H2O}	A,G	ΔA,G
Вода-этанол-изопропанол	0.556	0.444	0	0.786	16.80	1.50
	0.536	0.332	0.132	0.787	16.80	1.50
	0.527	0.264	0.209	0.791	16.76	1.45
	0.526	0.183	0.291	0.801	16.75	1.45
	0.523	0.141	0.336	0.805	16.75	1.45
Вода-этанол-диоксан	0.498	0	0.502	0.811	16.70	1.40
	0.576	0.372	0.052	0.811	16.80	1.50
	0.592	0.329	0.079	0.780	16.80	1.50
	0.529	0.216	0.055	0.774	16.80	1.50
	0.645	0.145	0.209	0.772	17.75	1.45
	0.701	0	0.299	0.770	16.75	1.45

В **Таблице 1** приведены данные для точек полуперехода ДНК из формы A в форму B для систем вода-этанол-изопропанол и вода-этанол диоксан – состав растворов, активность воды и индексы полярности A и ΔA в Гауссах (для 2,2,6,6-тетраметил-1N-окси-пиперидинол). $\Delta A = A - A_0$. A_0 – величина A в отсутствии электрического поля.

Нами был также определен вклад водородных связей в величины ΔA [15,16], но этот вопрос мы не будем рассматривать в данной статье.

Согласно ЭПР-критерию полярность водных растворов метанола выходит за пределы значений полярности, в которых ДНК существует в A-форме. То же можно сказать и о водных растворах этиленгликоля. В безводном метаноле, как и в других одноатомных спиртах, ДНК неустойчива и выпадает в осадок. В почти безводном этиленгликоле двойная спираль ДНК вполне устойчива и, согласно спектрам кругового дихроизма, находится в B-форме. Позже было показано, что в этиленгликоле ДНК денатурирует при более низкой температуре, чем в воде [18,19]. Было бы интересно осуществить B-A переход ДНК в растворах этиленгликоль-менее полярный неэлектролит (например, этанол или изопропанол) и определить соответствующие величины ЭПР-полярностей этих растворов.

По независящим от нас причинам осуществить это не удалось.

4. ЭНТАЛЬПИЯ B-A ПЕРЕХОДА ДНК

Из других термодинамических свойств ДНК в водных растворах неэлектролитов нам удалось определить энтальпию B-A перехода в системе вода-этанол [20,21]. B-A переход ДНК при комнатной температуре в этой системе происходит в интервале 36.4–52.2 мольных % этанола. Тепловой эффект, связанный с изменением концентрации раствора очень велик, и на его фоне измерить небольшое изменение, вызванное самим B-A переходом, практически невозможно. Известно, что катион гуанидиния $C(NH_2)_3^+$ стабилизирует B-форму ДНК при концентрации малополярного неэлектролита, превышающей интервал B-A перехода. Для определения энтальпии B-A перехода ДНК были измерены калориметрическим методом энтальпии взаимодействия растворов хлорида гуанидиния с ДНК в B- и A-конформациях в широком интервале концентраций водно-этанольных растворов при 298.15 K. Потенциометрическим методом при помощи натрий-чувствительного электрода были определены концентрации катионов натрия в этих водно-этанольных растворах ДНК, содержащих ионы гуанидиния. Было установлено, что взаимодействие хлорида гуанидиния с ДНК приводит к полному вытеснению ионов натрия, первоначально связанных с ДНК.

Были измерены также энтальпии растворения хлористого гуанидиния в водно-этанольных растворах в широком интервале концентраций (от чистой воды до 90 мольных % этанола. Для расчета энтальпии B-A перехода использовалась формула

$$\Delta H_Э = \Delta H_1 + \theta \Delta H_2,$$

где $\Delta H_Э$ – экспериментальная величина изменения энтальпии при введении хлористого гуанидиния в водно-этанольный раствор, содержащий ДНК; ΔH_1 – энтальпия замещения ионов натрия ионами гуанидиния в B-форме ДНК в растворе данного состава; ΔH_2 – энтальпия перехода A-формы ДНК в B-форму; θ – доля A-формы ДНК в растворе данного состава.

Оказалось, что величины ΔH_1 и ΔH_2 мало зависят от состава раствора. Мы нашли, что $\Delta H_1 = 0.93 \pm 0.04$, $\Delta H_2 = 2.50 \pm 0.10$ Дж/моль. Таким образом, энтальпия B-A перехода невелика, что согласуется с малой зависимостью B-A равновесия ДНК от температуры [22].

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вскоре после выхода статьи [16] в группе В.И. Иванова начали изучать B-A переход ДНК в водных растворах трифторэтанола CF_3CH_2OH. Оказалось, что в этих растворах ДНК не выпадает в осадок даже при очень высокой концентрации неэлектролита, в отличие от ранее использованных этанола, изопропанола и других веществ с заметно более низкой полярностью, чем полярность воды. Проведенные нами измерения спектров ЭПР спин-зонда показали, что величины A и ΔA в трифторэтаноле почти такие же, как и воде, и значения A и ΔA водных растворов трифторэтанола практически не зависят от концентрации. Экспериментальных данных по составу пара над этими растворами в то время найти не удалось, поэтому рассчитать

активность воды в этой системе мы не могли. Но было ясно, что в растворах трифторэтанола ДНК реагирует не на те их свойства, которые определяют величины А и ΔА.

В начале 2000-х годов мы работали над статьей [23], посвященной памяти Л.Е. Минченковой. В ней обсуждались B-A переходы полинуклеотидов в растворах трифторэтонола в воде. К тому времени в литературе появились данные о составе паровой фазы над этими растворами и можно было рассчитать активности воды в области B-A перехода. Оказалось, что в растворах трифторэтонола B-A переход осуществляется при более высоких значениях активности воды, чем мы его наблюдали в растворах, содержащих этанол, изопропанол, диоксан и тетрагидрофуран. Данные, полученные для B-A перехода высокомолекулярной ДНК в водно-трифторэтанольной смеси в 70-х и в начале 80-х, тоже говорили о том, что этот переход происходит совсем не в том интервале значений активности воды, как в других двойных системах вода-неэлектролит. На какое свойство водных растворов трифторэтанола реагирует ДНК при образовании в них А-формы до сих пор неясно. Их полярность близка к полярности воды, а активность воды в них слишком велика, чтобы в них существовала А-форма ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ivanov VI, Minchenkova LE, Schyolkina AK Poletayev AI. Different conformations of double-stranded nucleic acid in solution as revealed by circular dichroism. *Biopolymers,* 1973, 12(1):89-110.
2. Ivanov VI, Zhurkin VB, Zavriev SK, Lysov YuP, Minchenkova LE, Minyat EE, Frank-Kamenetskii MD, Schyolkina AK. Conformational possibilities of double-helical nucleic acids: theory and experiment. *Int. J. Quantum Chem.*, 1979, 16:189-201.
3. Malenkov GG. Ionic solvation in DNA. Structural aspects. In: *The Chemical Physics of solvation. Part C.* Amsterdam ets. Elsevier 1988. R. Dogonadze et al.,eds., P. 666-682.
4. Franklin RE and. Gosling RG. The structure of sodium thymonucleate fibers: I. The influence of water content. *Acta Crystallogr.*, 1953, 6:673-677.
5. Pilet J and Brahms J. Investigation of DNA structural changes by infrared spectroscopy. *Biopolymers*, 1973, 12(2):387-403.
6. Malenkov G, Minchenkova L, Minyat E, Schyolkina A, and Ivanov V. The nature of the B-A transition of DNA in solution. *FEBS Lett.*, 1975, 51:38-42.
7. Маленков ГГ, Минасян КА. B-A переход ДНК в водных растворах неэлектролитов. *Молекулярная биология*, 1977, 11(3):352-360.
8. Ivanov VI, Zhurkin VB, Minchenkova LE, Minyat EE, Frank-Kamenetskii MD, Schyolkina AK. The B to Ā transition of DNA in solution. *Journal of Molecular Biology*, 1974, 87:817.
9. Girod JC, Johnson WC. *Biochem. Biophys. Acta*, 1975, 150:35.
10. Nelson RG, Johnson WC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1970, 41:211.
11. Green G, Mahler H. Biochemistry Conformational changes of deoxyribonucleic acid and polydeoxynucleotides in water and ethylene glycol. *Biochemistry,* 1971,

10(12):2200-2216.

12. Webb SJ, Bhorjee JS. *Can. J. Biochem.*, 1968, 46:692.
13. Brown AS, Ives DJS. The t-butyl alcohol–water system. *J. Chem. SOC.* (Lond.), 1962, 1608-1619.
14. Griffith P, Dehlinger JSP, Van SP. Shape of the hydrophobic barrier of phospholipid bilayers (Evidence for water penetration in biological membranes). *J. Membrane Biol.,* 1974, 15:159.
15. Malenkov GG, Gagua AV., Timofeev VP. Polarity of the environment as a factor which determines the DNA conformation. Molecular Biology 1978, 12, (4), 699-674
16. Malenkov GG, Gagua AV, Timofeev VP. Influence of intermolecular interactions on the DNA conformation. *Int.J.Quant. Chem.*, 1979, 16(4):854-861.
17. Gagua AV, Malenkov GG, Timofeev VP. Hydrogen bond contribution to the isotropic hyperfine splitting constant of nitroxide free radical. *Chem.Phys.Letters,* 1978, 56(3):470-473.
18. Bonner G, Klibanov AM. Structural stability of DNA in nonaqueous solvents. *Biotechnol. Bioeng.*, 2000, 68:339-344.
19. Hammouda B, Worcester D. The Denaturation Transition of DNA in Mixed Solvents. *Biophys J.*, 2006, 91(6):2237-2242.
20. Маленков ГГ, Минасян КА. Оценка энтальпии B-A перехода ДНК в водно-этанольном растворе. *Биофизика,* 1976, 21(4):578-579.
21. Минасян КА, Воробьев АФ, Маленков ГГ. Определение энтальпии B-A конформационного перехода ДНК в водно-этанольных растворах. *Молекулярная биология*, 1987, 21(5):1329-1338.
22. Ivanov VI, Krylov DYu, Minyat EE, Minchenkova LE. *J.Biomolec. Struct. Dyn.,* 1983, 1:353-450.
23. Tolstorukov Y, Ivanov VI, Malenkov GG, Jernigan RL, Zhurkin VB. Sequence-dependent B-A transition in DNA evaluated with dimeric and trimeric scales. *Biophysical Journal,* 2001, 81(12):3409-3421.

Маленков Георгий Георгиевич

д.х.н., профессор

Институт физической химии и электрохимии им А.Н Фрумкина РАН

Москва 119991, Россия

egor38@mail.ru.