

18. Millar D. P., Robbins R. J., Zewail A. H. Torsion and bending of nucleic acids studied by subnanosecond time-resolved fluorescence depolarization of intercalated dyes // J. Chem. Phys.—1982.—76, N 4.—P. 2080—2094.
19. Hagerman P. J. Investigation of the flexibility of DNA using transient electric birefringence // Biopolymers.—1981.—20, N 7.—P. 1503—1535.
20. Ярмола Е. Г., Зарудная М. И., Лазуркин Ю. С. Зависимость осмотического давления ДНК и эффективного диаметра от ионной силы // Биофизика.—1986.—31, № 2.—С. 338—339.
21. Strigter D. Interactions of highly charged colloidal cylinders with applications to double-stranded DNA // Biopolymers.—1977.—16, N 7.—P. 1435—1448.
22. Brian A. A., Frisch H. L., Lerman L. S. Thermodynamics and equilibrium sedimentation analysis of the close approach of DNA molecules and a molecular ordering transition // Ibid.—1981.—20, N 6.—P. 1305—1328.
23. Shore D., Baldwin R. L. Energetics of DNA twisting. 2. Topoisomer analysis // J. Mol. Biol.—1983.—170, N 4.—P. 983—1007.
24. Horowitz D. S., Wang J. C. The torsional rigidity of DNA and the length dependence of the free energy of DNA supercoiling // Ibid.—1984.—173, N 1.—P. 75—91.
25. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982.—542 p.
26. Wang J. C. The degree of unwinding of the helix by ethidium // J. Mol. Biol.—1974.—89, N 4.—P. 783—801.

Ин-т цитологии и генетики
Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск

Получено 12.01.88

EFFECT OF THE IONIC SOLUTION STRENGTH ON ENERGY OF DNA SUPERCOILING

M. A. Shurlov, A. D. Gruzdev

Institute of Cytology and Genetics,
Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

Summary

Binding isotherms of EtBr to supercoiled and relaxed *pBR322* DNA were used to determine dependence of the free energy of DNA supercoiling $g \sim K\sigma^2$ on NaCl concentration in the solution. It is shown that a decrease of concentration from 0.3 M to 0.01 M NaCl makes the value of K constant more than doubled and promote a significant reduction of the superhelical density $-\sigma$. The free energy of DNA supercoiling decreases approximately by 20 per cent.

УДК 577.323

Н. И. Речкунова, С. Г. Лохов, Ю. А. Горбунов, В. В. Зиновьев,
Я. И. Бурьянов, Э. Г. Малыгин

СТАБИЛЬНОСТЬ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ СУБСТРАТОВ. ЭФФЕКТ ДНК-МЕТИЛАЗЫ *ECODAM**

Исследована стабильность олигонуклеотидных комплексов, содержащих различные дефекты в участке узнавания метилазы *Ecodam*. Одноцепочечный 20-членный олигонуклеотид, содержащий в центре самокомплементарную гексануклеотидную последовательность, образует частично дуплексную структуру только при температуре ниже 5°C. Остальные комплексы плавятся в узком интервале температур 22—31°C в 30 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,8. В присутствии метилазы *Ecodam* наблюдается увеличение температуры плавления комплекса по крайней мере на 5°C.

Введение. Адениновая ДНК-метилаза *Ecodam* узнает симметричную тетра-нуклеотидную последовательность

$$\begin{array}{c} 5' \dots \text{G} \text{---} \text{A} \text{---} \text{T} \text{---} \text{C} \dots \\ \dots \text{C} \text{---} \text{T} \text{---} \text{A} \text{---} \text{G} \dots 5' \end{array}$$

Принятые обозначения: MeS — метильная группировка; префикс d в формулах олигонуклеотидов для краткости опущен.

* Представлена членом редколлегии М. Д. Франк-Каменецким.

и в присутствии S-аденозилметионина переносит метильные группы в обе цепи участка узнавания с образованием N⁶-метиладенина [1, 2].

При исследовании ДНК-метилазы *Ecodam* обнаружена интересная особенность, состоящая в том, что фермент может метилировать денатурированную ДНК, хотя и с замедленной скоростью и в меньшей степени, чем нативную [3, 4]. Нами также была показана возможность метилирования этим ферментом не только денатурированных и одноцепочечных ДНК, но и однонитчатых олигонуклеотидных субстратов при пониженных температурах [5, 6]. Естественно предположить, что

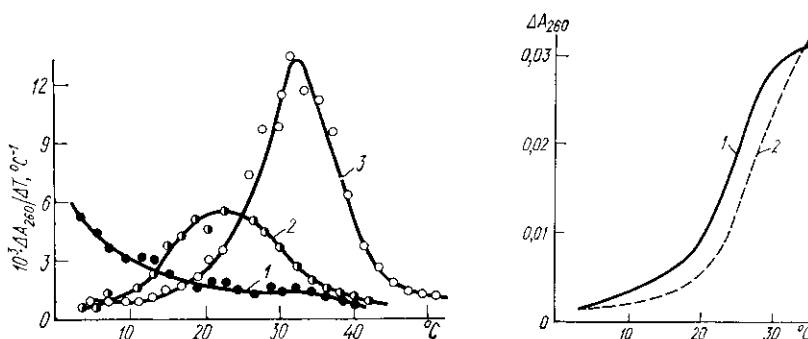


Рис. 1. Дифференциальные кривые плавления олигонуклеотидных комплексов в 30 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,8): олигонуклеотид I (1); эквимолярная смесь олигонуклеотидов I и VI (2) и I, V, VI (3)

Fig. 1. Differential melting curves of oligonucleotide complexes in 30 mM of potassium-phosphate buffer (pH 7.8): oligonucleotide I (1); equimolar mixture of oligonucleotides I, VI (2); equimolar mixture of oligonucleotides I, V, VI (3)

Рис. 2. Кривые плавления олигонуклеотидного комплекса (1 мкМ), состоящего из олигонуклеотидов I, II и IV: 1 — без фермента; 2 — в присутствии 2 мкМ *Ecodam* метилазы

Fig. 2. Melting curves of the oligonucleotide complex (1 μM) containing oligonucleotides I, II and IV: 1 — without enzyme; 2 — in presence of 2 μM *Ecodam* methylase

метилируемые участки в таких субстратах находятся в составе локальных самокомплементарных дуплексных структур. Однако оставалось неясным, может ли метилаза *Ecodam* участвовать в образовании и стабилизации таких структур, как это предполагается для рестриктаз [7].

В настоящей работе приводятся данные по температурам плавления олигонуклеотидных комплексов и влиянию на их стабильность ДНК-метилазы *Ecodam*.

Материалы и методы. Метилаза *Ecodam* выделена по методу [8]. Олигодезоксирибонуклеотиды синтезированы фосфоритриэфирным методом [9] и содержат на 5'-конце свободную гидроксильную группу. Для синтеза олигодезоксирибонуклеотидов, имеющих 3'-концевой S-метилтиофосфат, использовали мононуклеотидные блоки, в которых 3'-тиофосфатный остаток блокирован S-метильной и 2,4-дихлорфенильной группами [10].

Исследование стабильности олигонуклеотидных комплексов проводили в 30 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,8. Температуры плавления олигонуклеотидных комплексов устанавливали, используя эквимолярные количества олигонуклеотидов с общей концентрацией 1 о. е./мл, по ранее описанной методике [11]. Величины температур определяли в точке максимума первой производной кривой плавления комплекса. Дифференцирование производили графическим методом. По кривой плавления находили долю олигонуклеотидов, находящихся в двухцепочечном состоянии, используя метод, предложенный в работе [12].

Результаты и обсуждение. Ранее мы показали, что метилаза *Ecodam*, кроме одноцепочечных ДНК, способна метилировать широкий ряд дефектных олигонуклеотидных субстратов, где отсутствует один или не-

сколько нуклеотидных остатков в одной из цепей последовательности узнавания [6]. При всем разнообразии исследованных дефектов оказалось, что для проявления ферментативной активности необходимо сохранение частичной симметрии двунитчатого субстрата, а именно, присутствие в обеих цепях участка узнавания последовательностей G—A—, содержащих необходимый для метилирования остаток адениловой кислоты. Следует отметить, что при исследовании эндонуклеазы *BamHI* также показана возможность расщепления частично симметричных дефектных олигонуклеотидных субстратов [13]. Эти данные указывают на то, что в продуктивном фермент-субстратном комплексе олигонуклеотиды должны иметь двунитчатую структуру, по крайней мере в участке узнавания. Существование такой структуры зависит от стабильности исходных двухцепочечных олигонуклеотидов и, возможно, частично определяется влиянием фермента.

Для изучения стабильности субстратных комплексов были выбраны основные типы исследованных ранее олигонуклеотидных структур [6] и для них определены температуры плавления (табл. 1) в условиях метилирования. На рис. 1 показаны типичные дифференциальные кривые плавления некоторых комплексов, приведенных в табл. 1.

Для одноцепочечного олигонуклеотида I наблюдается частичное образование двуспиральной структуры только при температуре ниже 5 °С (рис. 1). Образование двухцепочечной структуры для этого олигонуклеотида при низких температурах возможно по центральному симметричному гексануклеотиду ...—G—G—A—T—C—C—..., включающему участок узнавания для метилазы *Ecodam*. Другие самокомплементарные участки, участвующие в самоассоциации, отсутствуют в олигонуклеотиде I, за исключением пары G·C на 5'- и 3'-концах олигонуклеотида.

Добавление к 20-членному олигонуклеотиду I олигонуклеотидов II или III, комплементарных его 3'-концу, приводит к образованию комплексов, плавящихся при 30 и 26 °С соответственно (комплексы 2 и 3, табл. 1). Эти величины заметно выше температуры плавления для комплекса 4, образованного при участии олигонуклеотида IV, комплементарного 5'-концу олигонуклеотида I. Такое различие, наблюдаемое при равном содержании A·T- и G·C-пар в составе комплексов, по-видимому, является следствием зависимости стабильности двойных спиралей нуклеиновых кислот от последовательности оснований в них [14].

При добавлении к олигонуклеотиду I олигонуклеотидов V и VI образуется двухцепочечный комплекс, в котором отсутствует только фосфатный остаток между C и T (комплекс 5). Этот комплекс плавится при температуре 31 °С. В остальных вариантах такого типа, где дефектом является отсутствие целого нуклеотидного остатка (комплексы 6—8), наблюдаемая кривая плавления существенно уширена и средняя температура плавления ниже по сравнению с комплексом 5. По-видимому, указанный дефект прерывает стэкинг-взаимодействия между прилежащими основаниями и снимает кооперативность в плавлении обеих половин комплексов. В этом случае наблюдаемая кривая плавления является суммарной кривой плавления двух типов комплексов.

Указанная особенность в плавлении таких комплексов согласуется с наблюдаемым понижением температуры плавления комплексов 6 и 7, содержащих только один неспаренный нуклеотидный остаток по сравнению с комплексами 2 и 3, у которых половина оснований находится в одноцепочечном состоянии. Так, например, температура плавления комплекса 6 (24 °С) будет определяться величинами температуры плавления комплекса 2 (30 °С) и комплекса 11 (22 °С). Суммарная кривая плавления этих двух комплексов и приводит к понижению температуры плавления комплекса 6 по сравнению с комплексом 2.

В комплексах 3 и 7 присутствует 3'-S-метилтиофосфатный остаток, что приводит к небольшому уменьшению температуры плавления по сравнению с комплексами 2 и 6 соответственно. Слабое влияние 3'-фосфата на температуру плавления отмечалось ранее для комплексов по-

Таблица 1
 Температура плавления олигонуклеотидных комплексов в 30 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,8)
 Melting points of the oligonucleotide complexes in 30 mM potassium phosphate buffer (pH 7,8)

Номер комплекса	Структура комплекса	Температура, °С
1	$\begin{array}{c} \text{C-A-G-T-T-T-A-G-G-A} \overset{\text{I}}{\text{T-C-C-A-T-T-T-C-A-C}} \\ \text{C-A-G-T-T-T-A-G-G-A-T-C-C-A-T-T-T-C-A-C} \end{array}$	<5
2	$\begin{array}{c} \text{C-A-G-T-T-T-A-G-G-A} \overset{\text{I}}{\text{T-C-C-A-T-T-T-C-A-C}} \\ \text{A-G-G-T-A-A-A-G-T-G} \\ \text{II} \end{array}$	30
3	$\begin{array}{c} \text{C-A-G-T-T-T-A-G-G-A} \overset{\text{I}}{\text{T-C-C-A-T-T-T-C-A-C}} \\ \text{A-G-G-T-A-A-A-G-T-G} \\ \text{(MeS)p} \quad \text{III} \end{array}$	26
4	$\begin{array}{c} \text{C-A-G-T-T-T-A-G-G-A} \overset{\text{I}}{\text{T-C-C-A-T-T-T-C-A-C}} \\ \text{G-T-C-A-A-A-T-C-C-T} \\ \text{IV} \end{array}$	23
5	$\begin{array}{c} \text{C-A-G-T-T-T-A-G-G-A} \overset{\text{I}}{\text{T-C-C-A-T-T-T-C-A-C}} \\ \text{G-T-C-A-A-A-T-C-C} \quad \text{T-A-G-G-T-A-A-A-G-T-G} \\ \text{VI} \quad \text{V} \end{array}$	31
6	$\begin{array}{c} \text{C-A-G-T-T-T-A-G-G-A} \overset{\text{I}}{\text{T-C-C-A-T-T-T-C-A-C}} \\ \text{G-T-C-A-A-A-T-C-C} \quad \text{A-G-G-T-A-A-A-G-T-G} \\ \text{VI} \quad \text{II} \end{array}$	24
7	$\begin{array}{c} \text{C-A-G-T-T-T-A-G-G-A} \overset{\text{I}}{\text{T-C-C-A-T-T-T-C-A-C}} \\ \text{G-T-C-A-A-A-T-C-C} \quad \text{A-G-G-T-A-A-A-G-T-G} \\ \text{VI} \quad \text{(MeS)p} \quad \text{III} \end{array}$	22
8	$\begin{array}{c} \text{C-A-G-T-T-T-A-G-G-A} \overset{\text{I}}{\text{T-C-C-A-T-T-T-C-A-C}} \\ \text{G-T-C-A-A-A-T-C-C-T} \quad \text{G-G-T-A-A-A-G-T-G} \\ \text{IV} \quad \text{VII} \end{array}$	24
9	$\begin{array}{c} \text{C-A-G-T-T-T-A-G-G-A} \overset{\text{I}}{\text{T-C-C-A-T-T-T-C-A-C}} \\ \text{G-G-G-T-A-A-A-G-T-G} \\ \text{VIII} \end{array}$	28
10	$\begin{array}{c} \text{C-A-G-T-T-T-A-G-G-A} \overset{\text{I}}{\text{T-C-C-A-T-T-T-C-A-C}} \\ \text{G-G-T-A-A-A-G-T-G} \\ \text{VII} \end{array}$	23
11	$\begin{array}{c} \text{C-A-G-T-T-T-A-G-G-A} \overset{\text{I}}{\text{T-C-C-A-T-T-T-C-A-C}} \\ \text{G-T-C-A-A-A-T-C-C} \\ \text{VI} \end{array}$	22

ли-С с гексаинозиновой кислотой [15]. Замена аденина на гуанин в олигонуклеотиде VIII незначительно уменьшает температуру плавления комплекса 9 по сравнению с олигонуклеотидным комплексом 2, в котором декануклеотид II полностью комплементарен 3'-половине олигонук-

леотида I. Наблюдаемый эффект такой некомплементарной замены согласуется с незначительным влиянием G·T-пары на стабильность соседних оснований и стабильность дуплекса, обнаруженные в работе Парэля и др. [16].

Суммируя изложенные данные, отметим, что за исключением олигонуклеотида I, плавящегося при температуре меньше 5 °С, остальные исследованные субстраты плавятся в сравнительно узком температурном интервале 22—31 °С.

Как видно из табл. 2, при 20 °С большая доля олигонуклеотидов находится в двуспиральном состоянии, тогда как при 37 °С эта доля незначительна. Несмотря на существенное различие доли дуплексной структуры олигонуклеотидов при 20 и 37 °С, эффективность метилирования их метилазой *Ecodam* слабо зависит от температуры, а определяется, в основном, структурой комплекса. Например, в случае комплекса 6 при переходе от 20 к 37 °С доля дуплексной структуры снижается более чем в 20 раз. Однако степень метилирования этого комплекса при температурах 20 и 37 °С практически не отличается. С другой стороны, комплекс 8, имеющий с комплексом 6 одинаковую температуру плавления, существенно отличается от последнего по степени метилирования его метилазой *Ecodam*. Отсутствие одного остатка аденина в случае комплекса 8 приводит практически к полной потере субстратных свойств этого комплекса в реакции метилирования, в то время как отсутствие остатка тимидина в составе комплекса 6 лишь незначительно снижает эффективность метилирования его по сравнению с нативным субстратом.

Одноцепочечный олигонуклеотид I, для которого не наблюдается образования дуплексной структуры при температуре выше 5 °С, обладает хорошими субстратными свойствами при 20 и даже 30 °С [6].

Способность метилазы *Ecodam* метилировать одноцепочечные олигонуклеотиды при пониженных температурах, а также эффективно метилировать олигонуклеотидные комплексы при температуре 37 °С, когда доля двуспиральной структуры незначительна, позволяет предположить, что в присутствии метилазы происходит стабилизация дуплексной структуры субстратов.

Для того чтобы оценить влияние метилазы *Ecodam* на стабильность дуплексной структуры субстратов, мы провели плавление олигонуклеотидного комплекса в присутствии фермента (рис. 2). Как видно из рисунка, в присутствии фермента наблюдается сдвиг кривой плавления примерно на 5 °С в сторону повышения температуры. Точно оценить повышение температуры плавления в присутствии фермента не представляется возможным, так как на кривую плавления налагается быстро возрастающий после 30 °С фон поглощения, обусловленный де-

Таблица 2
Образование дуплексной структуры и метилирование олигонуклеотидных субстратов в зависимости от температуры
The part of the duplex structure and methylation per cent of the oligonucleotide substrates in different temperatures

Номер комплекса	Доля структуры, %			Степень метилирования по отношению к таковому полностью комплементарного дуплекса [6], %		
	Температура, °С					
	20	30	37	20	30	37
5	95	62	15	71	122	128
6	71	17	2,5	41	47	34
7	63	6,6	0,5	34	52	39
8	74	10	1,5	0	3	4
10,11	65	15	4	—	—	—

Примечание. Номера комплексов соответствуют приведенным в табл. 1.

натурацией фермента. Попытка учесть этот фон, вычитая кривую денатурации чистого фермента, может привести к некорректному результату, поскольку сам фермент в присутствии субстрата денатурирует иначе.

Наблюдаемое изменение температуры плавления комплекса является усредненной минимальной величиной температурной стабилизации олигонуклеотидного комплекса, так как здесь не учтена доля комплекса, не связанного с ферментом. Локальный эффект стабилизации, по-видимому, значительно выше, что объясняет сохранение при 37 °С субстратных свойств олигонуклеотидных комплексов, плавящихся при температурах более чем на 10 °С ниже этого значения.

Таким образом, метилаза *Ecodam* способна стабилизировать локальные дуплексные структуры, содержащие участок узнавания фермента. Это свойство, очевидно, является общим для большинства ферментов рестрикции-модификации типа II.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Geier G. E., Modrich P. Recognition sequence of the *dam* methylase of *Escherichia coli* K12 and mode of cleavage of *DpnI* endonuclease // J. Biol. Chem.—1979.—254, N 4.—P. 1408—1413.
2. Lacks S., Greenderg B. Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation // J. Mol. Biol.—1977.—114, N 1.—P. 153—168.
3. Herman G. E., Modrich P. *Escherichia coli dam* methylase. Physical and catalytic properties of the homogeneous enzyme // J. Biol. Chem.—1982.—257, N 5.—P. 2605—2612.
4. Использование ДНК-метилаз в качестве реагента для получения меченных изотопами ДНК / Я. И. Бурьянов, И. Г. Богдарина, В. Ф. Нестеренко, А. А. Баев // Биохимия.—1982.—47, № 4.—С. 695—697.
5. Does the DNA methylase *Ecodam* pair nucleotide sequences to form site-specific duplexes? / Ya. I. Buryanov, V. V. Zinoviev, M. T. Vienozhinskis et al. // FEBS Letts.—1984.—168, N 1.—P. 166—168.
6. Действие ДНК-метилазы *Ecodam* на однонитчатые последовательности и синтетические олигонуклеотиды / В. В. Зиновьев, Ю. А. Горбунов, С. Г. Полов и др. // Молекуляр. биология.—1985.—19, № 4.—С. 947—954.
7. Type II restriction endonucleases cleave single-stranded DNAs in general / K. Nishigaki, Y. Kaneko, H. Wakuda et al. // Nucl. Acids Res.—1985.—13, N 16.—P. 5747—5760.
8. Бурьянов Я. И., Захарченко В. Н., Баев А. А. Выделение, очистка и некоторые свойства адениновой ДНК-метилазы *Ecodam* // Докл. АН СССР.—1981.—259, № 6.—С. 1492—1495.
9. Hirose T., Crea R., Itakura K. Rapid synthesis of triideoxyribonucleotide blocks // Tetrahedron Lett.—1978.—19, N 28.—P. 2449—2452.
10. Relse C. R., Jau L. O-Aryl S-methyl phosphorochlorodithioates: terminal phosphorylating agents in the phosphotriester approach to oligonucleotide synthesis // J. Chem. Soc. Chem. Commun.—1978.—N 23.—P. 1050—1052.
11. Попов С. Г., Шамовский Г. Г. Комплексообразование днוליгодезоксиаденилин-5', 5'-пирофосфатов с полирибоуридиловой кислотой // Молекуляр. биология.—1976.—10, № 3.—С. 576—583.
12. Nelson J. W., Martin F., Tinoko I. DNA and RNA oligomer thermodynamics: the effect of mismatched bases on double-helix stability // Biopolymers.—1981.—20, N 12.—P. 2509—2531.
13. Взаимодействие рестриктазы *BamHI* с синтетическими субстратами, содержащими полный или частичный участки узнавания этого фермента / В. В. Зиновьев, В. А. Колесников, Н. И. Безнедельная и др. // Молекуляр. биология.—1984.—18, № 1.—С. 169—175.
14. Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids / I. Tinoko, P. N. Borer, B. Dengler et al. // Nature. New Biol.—1979.—246, N 150.—P. 40—41.
15. Bresler S. E., Chernayenko V. M., Saminski E. M. Study of the interaction of polynucleotide chains with oligomers by means of chromatography // Biopolymers.—1972.—11, N 8.—P. 1541—1550.
16. Structure, dynamics and energetics of deoxyguanosine thymidine wobble base pair formation in the self-complementary d(CGTGAATTCGCG) duplex in solution / D. J. Parel, A. S. Kozlovski, L. A. Marky et al. // Biochemistry.—1982.—21, N 3.—P. 437—444.

ВНИИ молекуляр. биологии НПО «Вектор»,
пос. Кольцово Новосибир. обл.

Получено 13.01.88

Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск
Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, Пущино