



Структура и функция биополимеров

УДК 577.323.4

В — Z-ПЕРЕХОД В ДНК С НЕРЕГУЛЯРНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ ОСНОВАНИЙ *

**С. М. Миркин, В. И. Лямичев, В. П. Кумарев,
В. Ф. Кобзев, В. В. Носиков, А. В. Вологодский**

Введение. В последние годы стало ясно, что левоспиральная Z-форма ДНК способна образовываться не только в регулярных пурин-пиримидиновых областях типа $d(GC)_n \cdot d(GC)_n$ или $d(AC)_n \cdot d(GT)_n$, но может включать в себя участки с любой последовательностью. Так, было показано, что Z-форма образуется при смешивании однонитевых комплементарных кольцевых ДНК (форма V) [1, 2]. Из-за топологических ограничений такие молекулы не могут образовывать В-формы по всей длине колец, и правая закрутка комплементарных цепей в В-спирали компенсируется левой закруткой в Z-спирали. При этом в Z-форме оказывается около 30 % всей ДНК [1], хотя ее последовательность не содержит заметного количества регулярных пурин-пиримидиновых блоков. Недавно Рич и др. показали [3], что кристаллическая структура гексануклеотида $d(CGATCG)$ соответствует Z-спирали. С другой стороны, не вызывает сомнений влияние последовательности оснований на то, при каких условиях происходит В — Z-переход. Поэтому актуальным является выяснение вопросов о том, какие именно участки в ДНК с определенной последовательностью оснований и при каких условиях будут прежде всего переходить в Z-форму. Ответы на них важны для анализа возможной биологической роли Z-структуры.

Количественный анализ В — Z-перехода в ДНК с произвольной последовательностью оснований возможен лишь на основе последовательного статистико-механического рассмотрения. Модель для описания этого перехода была предложена ранее [4]. Использование этой модели, однако, было невозможным до последнего времени, так как она содержит шесть энергетических параметров, значения большей части которых оставались неизвестными. Часть параметров, характеризующая В — Z-переход в регулярных последовательностях, была найдена в работах [5—7]. Совсем недавно Эллисон и др. предприняли попытку определения параметров перехода для ДНК с нерегулярными последовательностями [8]. К началу нашей работы из шести параметров неопределенными оставались два. Мы поставили задачу найти значения этих двух параметров и проверить адекватность модели В — Z-перестроек в нерегулярных последовательностях ДНК, предложенной в работе [4].

Важнейшим фактором, способствующим образованию Z-формы двойной спирали, является отрицательная сверхспирализация, характерная для кольцевых ДНК. Именно под влиянием сверхспирализации Z-спираль может возникать в условиях, близких к физиологическим [9, 10], когда ее образование в линейных ДНК термодинамически не-

* Представлена членом редколлегии В. И. Ивановым

выгодно. Ниже будет проанализирован В—Z-переход в кольцевых ДНК, хотя статистико-механическая модель, предложенная в [4] и кратко изложенная в настоящей работе, в одинаковой степени применима и к линейным молекулам.

Статистико-механическая модель В—Z-перехода. С точки зрения статистико-механического описания важнейшей особенностью Z-ДНК является тот факт, что каждая пара оснований в Z-форме может находиться в одном из двух энергетически неэквивалентных состояний [4, 11]. Первое (I) характеризуется *син*-конформацией пурина и *анти*-конформацией пиримидина, является энергетически более выгодным и реализуется в регулярных пурин-пиримидиновых последовательностях. Второе состояние (II) отвечает *син*-конформации пиримидина и *анти*-конформации пурина. Хотя это состояние характеризуется более высокой свободной энергией, оно может реализовываться в некоторых последовательностях, так как регулярная структура Z-спирали требует строгого чередования *син*- и *анти*-конформаций нуклеотидов в каждой цепи [3]. Таким образом, свободная энергия перехода пары в Z-форму ΔF должна зависеть не только от сорта пары, но и от ее конформации в Z-спирали (I или II). Дополнительная свободная энергия F_j^{BZ} , как обычно, отвечает границе между двумя структурными формами. В Z-форме может, однако, возникать еще один тип границ, Z—Z-границы, которые отвечают сбою регулярного чередования *син*- и *анти*-конформаций оснований в цепи ДНК (поскольку последовательность и конформация нуклеотидов в одной цепи полностью определяют последовательность и конформацию в другой цепи, ниже мы всюду будем рассматривать одну, произвольно выбранную цепь). Этой границе, которую можно рассматривать как «смену фазы» в Z-форме, отвечает свободная энергия F_j^{ZZ} . Проиллюстрируем вычисление свободной энергии участка, находящегося в Z-форме, на примере. Пусть Z-спираль образована последовательностью GCGGTCC и окружена участками, находящимися в В-форме. Для конформации звеньев, изображенной ниже (обозначения конформаций Z^a и Z^s соответствуют *анти*- и *син*-конформациям нуклеотидов в выбранной цепи ДНК в

Конформация основания в выбранной цепи	В	Z^s	Z^a	Z^s	Z^s	Z^a	Z^s	Z^a	В
Последовательность оснований	А	G	С	G	G	Т	С	С	А
Свободная энергия пары		ΔF_{GC}^I	ΔF_{GC}^I	ΔF_{GC}^I	ΔF_{GC}^I	ΔF_{AT}^I	ΔF_{GC}^{II}	ΔF_{GC}^I	
Свободная энергия границ		F_j^{BZ}		F_j^{ZZ}				F_j^{BZ}	

Z-форме), свободная энергия звеньев Φ , отсчитываемая от В-спирали, имеет вид:

$$\Phi = 5\Delta F_{GC}^I + \Delta F_{AT}^I + \Delta F_{GC}^{II} + 2F_j^{BZ} + F_j^{ZZ}. \quad (1)$$

Более формальное описание этой модели, основанное на матричном представлении статсуммы, а также алгоритм для вычисления цепочки вероятностей нахождения i -го звена молекулы в определенной конформации описаны в работе [4].

Как мы видим, модель содержит шесть параметров, ΔF_{GC}^I , ΔF_{AT}^I , ΔF_{GC}^{II} , ΔF_{AT}^{II} , F_j^{BZ} и F_j^{ZZ} . Такой вариант описания В—Z-равновесия в ДНК с произвольной последовательностью является, безусловно, простейшим, так как он не учитывает возможной зависимости энергии пар в Z-форме от типа ближайших соседей. Аналогичное приближение оказывается очень хорошим для статистико-механического описания перехода спираль—клубок в ДНК [12, 13], но может, вообще говоря, оказаться неудовлетворительным для В—Z-перехода. Поэтому необходимо, кроме определения параметров теории, провести проверку ее применимости на модельных системах.

Поскольку все экспериментальные данные, о которых будет идти речь ниже, касаются В — Z-перехода в кольцевых ДНК, нам нужно включить в выражение для свободной энергии дополнительный член, учитывающий изменение свободной энергии сверхспирализации при В — Z-переходе, который имеет вид [4, 7]

$$\Delta G = 11RTN \left[\left(\sigma + \kappa \frac{m}{N} \right)^2 - \sigma^2 \right], \quad (2)$$

где N — полное число пар оснований в молекуле; σ — плотность сверхвитков; κ — константа, характеризующая изменение угла спирального вращения при В — Z-переходе и равная 1,8 [5, 7]; m — число пар оснований в данном микросостоянии в Z-форме; R — газовая постоянная; T — абсолютная температура. Как отмечено в работе [5], лучшее согласие с экспериментальными данными получается при включении в выражение (2) дополнительного члена, отвечающего изменению свободной энергии сверхспирализации за счет образования В — Z-границ. В этом случае выражение для ΔG приобретает вид [5]

$$\Delta G = 11RTN \left[\left(\sigma + \kappa \frac{m}{N} + \frac{8}{N} \right)^2 - \sigma^2 \right]. \quad (3)$$

Приводимые ниже результаты расчетов основаны на использовании формулы (3). Отметим, что при использовании выражения (2) получается тот же набор параметров, за исключением значения F_j^{BZ} , которое уменьшается в этом случае на 2 ккал/моль.

Для вычисления статистико-механических характеристик В — Z-перехода с учетом энергии сверхспирализации использовали алгоритм, аналогичный описанному в работе [14]. Близкие результаты получаются при расчетах методом последовательных приближений, описанном в [4].

Определение параметров теории. Для количественного анализа экспериментальных данных по В — Z-переходу необходимо точно знать, в каком именно участке последовательности ДНК происходит переход и как зависит степень перехода от значения факторов, влияющих на В — Z-равновесие. В случае кольцевых ДНК параметром, определяющим В — Z-равновесие, является плотность сверхвитков в кольцевой ДНК σ , и для определения зависимости степени перехода от σ наиболее адекватным экспериментальным методом является техника двухмерного электрофореза в геле [10, 15]. При этом, однако, ДНК должна содержать выделенный участок, в котором В — Z-переход происходит существенно раньше всех других конформационных перестроек. Такие участки приходится, как правило, синтезировать искусственно и затем встраивать в кольцевую ДНК генноинженерными методами.

Этот подход был использован в первых работах по определению параметров В — Z-перехода для регулярных вставок $d(GC)_n \cdot d(GC)_n$ и $d(AC)_n \cdot d(GT)_n$ [5 — 7], что позволило определить энергию В — Z-границ F_j^{BZ} и энергию ΔF_{GC}^I (в таких вставках с регулярным чередованием пуринов и пиримидинов в каждой из цепей реализуется лишь I конформация пар в Z-форме). Свободная энергия В — Z-перехода для АТ-пар, ΔF_{AT}^I , могла бы быть найдена из сопоставления данных для вставок $d(GC)_n \times d(GC)_n$ и $d(AC)_n \cdot d(GT)_n$, однако работы [5, 6] были выполнены при различной ионной силе раствора. В то же время имеются многочисленные данные [5, 9, 11, 16], свидетельствующие о зависимости плотности сверхвитков, при которой происходит В — Z-переход в данной вставке, от ионной силы раствора и типа противоионов. Поэтому все эксперименты по определению параметров должны быть выполнены при одних и тех же ионных условиях.

Энергии ΔF_{GC}^{II} и ΔF_{AT}^{II} были определены в работе Эллисона и др. [8], которые использовали для этой цели вставки $d(GC)_n \cdot d(GC)_n$ с одной-двумя пуклеотидными заменами. Эти замены приводили к кластерам из

трех стоящих подряд пуринов (пиримидинов) в центральной части вставок: GGG или GAG. Данная работа была выполнена в тех же ионных условиях, что и исследование Пекка и Уонга [5].

Таким образом, к началу нашей работы для условий [5] были известны четыре параметра: ΔF_{GC}^I , ΔF_{GC}^{II} , ΔF_{AT}^I и F_i^{BZ} . Мы встроили в кольцевые ДНК последовательности, необходимые для нахождения параметров ΔF_{AT}^I и F_i^{ZZ} , и исследовали В—Z-переход в этих вставках, происходящий при увеличении плотности сверхвитков.

Материалы и методы. Штаммы и ДНК. Плазмида *pRr33* получена встраиванием *BamHI-HindIII*-фрагмента спейсерного участка рибосомальных генов крысы [17]

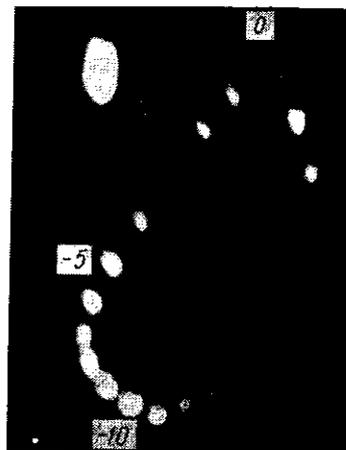


Рис. 1. Определение нуклеотидной последовательности вставки в плазмиде *pVK45* по методу Максама — Гилберта

Fig. 1. The Maxam-Gilbert ladder and the sequence for the inserted region in the case of plasmid *pVK45*

Рис. 2. Двухмерный электрофорез смеси топоизомеров плазмиды *pVK84*. Цифрами показаны порядковые номера топоизомеров τ^* . Число сверхвитков в каждом топоизомере равно $\tau^* - 0,3$

Fig. 2. The two-dimensional gel electrophoresis pattern for plasmid *pVK84*. A specially prepared mixture of topoisomers was first divided from top to bottom in the TBE buffer. In the second direction (from left to right) the electrophoresis was performed in the presence of chloroquine

размером 242 пары нуклеотидов в полилинкер вектора *pUC19* [18]. Этот фрагмент содержит протяженный участок с чередующимися пуриновыми и пиримидиновыми основаниями $d(AC)_{18} \cdot d(CT)_{18}$ [17].

Плазмиды *pVK84*, *pVK64* и *pVK45* были получены встраиванием искусственно синтезированных фрагментов двунитовой ДНК в полилинкер вектора *pUC19* между сайтами *BamHI* и *EcoRI*. Синтез фрагментов осуществляли по методике, описанной в работе [19]. Последовательность вставок после их встраивания в плазмиду определяли по методу Максама — Гилберта [20] (рис. 1):

pVK84 ... CGCGCGTACGTGTGTACGCGTG ...

pVK64 ... CGCGCGTACGCGCACGCGCA ...

pVK45 ... CGCGCGCACGCCGCACGCGCG ...

Приведена последовательность только одной нити в направлении от *BamHI* до *EcoRI*.

Для трансформации использован штамм *E. coli* JM83.

Плазмидную ДНК выделяли щелочным методом [21] с последующим центрифугированием в градиенте плотности CsCl.

Препараты ДНК с широким распределением по топонизомерам получали обработкой ДНК топонизомеразой типа I из асцитной карциномы мыши в присутствии бромистого этидия [22].

Двухмерный электрофорез. Двухмерный электрофорез топонизомеров ДНК в 1,5 %-ном агарозном геле («Sigma», США, тип II) проводили, как описано ранее [23]. При его проведении в первом направлении (вертикальном) использовали буфер

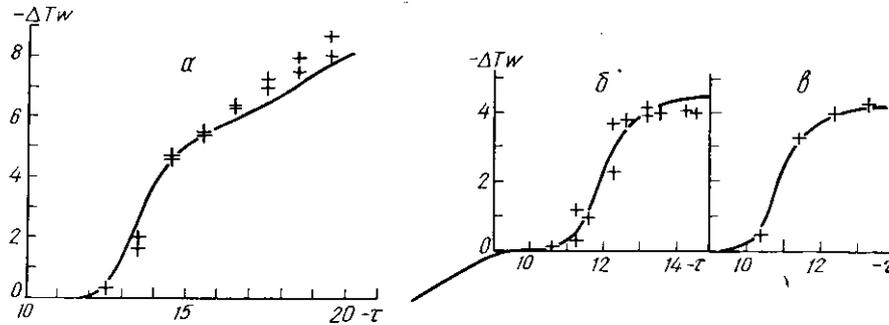


Рис. 3. Зависимость изменения осевой закрутки $-\Delta T_w$, происходящего в результате В-Z-перехода, от числа сверхвитков в ДНК *pRr33* (а), *pVK84* (б), *pVK64* (в). Точки соответствуют экспериментальным данным, кривые отвечают теоретическому расчету. Из принципа наилучшего согласия теории с экспериментом был найден параметр ΔF_{AT}^1 , который определяли независимо по каждой из экспериментальных кривых

Fig. 3. The change of twisting $-\Delta T_w$ as a result of the B-Z transition as a function of the linking difference for *pRr33* (a), *pVK84* (b) and *pVK64* (c) DNA. The points are experimental data, the curves are theoretical calculations. The ΔF_{AT}^1 value was obtained from the best fit of the theory to the experiment for each of DNA

ТВБ (90 мМ трис-борат, рН 8,3, 2,5 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$). Разделение осуществляли при комнатной температуре, напряженности электрического поля 2 В/см в течение 40 ч. Перед проведением электрофореза во втором направлении гель насыщали в течение 4 ч буфером ТАЕ (40 мМ трис-ацетат, рН 7,8, 2 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$), содержащем хлорохин в концентрации 3—4 мкг/мл. Топонизомеры разделяли при комнатной температуре, напряженности электрического поля 2 В/см в течение 20 ч. При электрофорезе как в первом, так и во втором направлениях электродный буфер непрерывно перекачивали между анодной и катодной камерами.

Результаты и обсуждение. Для нахождения параметра ΔF_{AT}^1 мы использовали плазмиды *pRr33*, *pVK84* и *pVK64*, содержащие вставки с регулярным чередованием пуринов и пиримидинов в каждой из цепей $d(\text{AC})_{18}$, $d((\text{CG}_3\text{TACG}(\text{TG})_2\text{TA}(\text{CG})_2\text{TC}))$ и $d((\text{CG})_3\text{TA}(\text{CG})_2\text{CA}(\text{CG})_2\text{CA})$ (приведена последовательность в одной цепи) соответственно. В — Z-переход в этих вставках, происходящий при увеличении отрицательной сверхспирализации, регистрировали методом двухмерного электрофореза. Электрофореграмма для плазмиды *pVK84* приведена на рис. 2, а на рис. 3 показана зависимость уменьшения величины $-\Delta T_w$ в результате В — Z-перехода от плотности сверхвитков для трех использованных плазмид (см. [5]). Отметим, что в векторной плазмиде *pUC19*, не содержащей вставок, в этой области сверхспирализации никаких конформационных переходов не происходило. Параметр ΔF_{AT}^1 определялся подгонкой теоретических кривых перехода к экспериментальным.

При этом значения параметров ΔF_{GC}^1 , F_j^{BZ} , а также зависимость свободной энергии сверхспирализации от числа пар в Z-форме брались в соответствии с работой [5] (таблица и формула (3)). Наилучшие теоретические кривые показаны на рис. 3 вместе с экспериментальными данными. В принципе для определения ΔF_{AT}^1 достаточно данных по В — Z-перехо-

ду в одной из использованных вставок. Мы использовали три вставки для того, чтобы проверить основное предположение теории — независимость величин ΔF от типа соседних пар. Важно подчеркнуть, что если в первой вставке АТ-пары контактировали только с GC-парами, то во второй и третьей более половины АТ-пар входило в виде кластеров по две.

Подобранное по экспериментальным данным значение $\Delta F_{\text{АТ}}^{\text{I}}$ составило 1,15 ккал/моль для всех трех использованных плазмид (рис. 3). Этот результат показывает, что в хорошем приближении значения $\Delta F_{\text{GC}}^{\text{I}}$ и $\Delta F_{\text{АТ}}^{\text{I}}$ не зависят от типа соседних пар.

Значение параметра F_j^{ZZ} , соответствующего энергии «смены фазы» в Z-спирали, определяли из данных по В—Z-переходу вставки $d((\text{CG})_3\text{CACGCCGCA}(\text{CG})_3)$, встроенной в плазмиду $pVK45$. Эта вставка состоит из двух пурин-пиримидиновых блоков по 11 и 10 пар

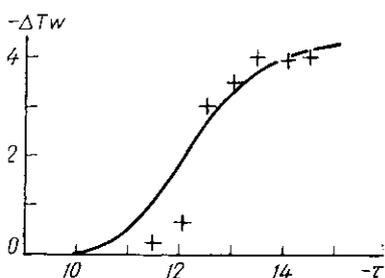


Рис. 4. Зависимость изменения осевой закрутки $-\Delta Tw$, происходящего в результате В—Z-перехода, от числа сверхвитков в ДНК $pVK45$. Точки соответствуют экспериментальным данным, кривая — теоретическому расчету, в котором варьировался параметр F_j^{ZZ}

Fig. 4. The same as in Fig. 3 for DNA $pVK45$. The curve is the best-fit theoretical dependence obtained by varying the F_j^{ZZ} value which corresponds to $F_j^{\text{ZZ}}=4.0$ kcal/mol

соответственно, при соединении которых возникает кластер из двух стоящих рядом цитозинов (гуанинов) в одной цепи. Поэтому при образовании Z-формы этой вставкой неизбежно

Значения параметров В—Z-перехода

The values of parameters of the В—Z transition in the TBE buffer

Параметр	Значение, ккал/моль	Источник
$\Delta F_{\text{GC}}^{\text{I}}$	0,33	[5]
$\Delta F_{\text{АТ}}^{\text{I}}$	1,15	Данная работа
$\Delta F_{\text{GC}}^{\text{II}}$	2,6	[8]
$\Delta F_{\text{АТ}}^{\text{II}}$	3,6	[8]
F_j^{BZ}	5,2	[5]
F_j^{ZZ}	4,0	Данная работа

должна возникать Z—Z-граница, т. е. смена фазы в чередовании *син*- и *анти*-конформаций оснований в Z-спирали. Кривая В—Z-перехода в этой вставке приведена на рис. 4.

На этом же рисунке приведена теоретическая кривая, полученная с одним подгоночным параметром F_j^{ZZ} . Значения параметров $\Delta F_{\text{GC}}^{\text{I}}$ и F_j^{BZ} были такими же, как и в предыдущем расчете, величина $\Delta F_{\text{АТ}}^{\text{I}}$ полагалась равной 1,15 ккал/моль. Наилучшее соответствие с экспериментальными данными получилось для F_j^{ZZ} , равном 4 ккал/моль (рис. 4). Точность определения параметров $\Delta F_{\text{АТ}}^{\text{I}}$ и F_j^{ZZ} составляет 5—10 % их значений.

Полный набор значений параметров В—Z-перехода приведен в таблице. Знание этих параметров позволяет теперь на основе статистико-механической теории [4] рассчитывать вероятность и локализацию Z-формы для ДНК с произвольной последовательностью оснований. Такие данные представляют несомненный интерес для анализа возможной биологической роли Z-ДНК. Расчеты такого рода будут опубликованы в ближайшее время. Здесь можно отметить, что полученные результаты объясняют, почему последовательность $d(\text{AT})_n$ в кольцевых ДНК чаще образует крестообразную структуру под влиянием сверхспирализации, чем Z-спираль [22]: энергия В—Z-перехода $\Delta F_{\text{АТ}}^{\text{I}}$ оказывается слишком высокой.

Авторы выражают благодарность М. Д. Франк-Каменецкому и Ю. С. Лазуркину за полезные обсуждения.

B—Z TRANSITION IN DNA WITH AN ARBITRARY BASE-PAIR SEQUENCE

S. M. Mirkin, V. I. Lyamichev, V. P. Kumarev,
V. F. Kobzev, V. V. Nosikov, A. V. Vologodskii

Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
Institute of Cytology and Genetics,
Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk;
All-Union Institute of Genetics, Moscow

Summary

The energetics of formation of the left-handed Z conformation in DNA with an arbitrary base-pair sequence is considered. A statistical-mechanical model of the B—Z transition includes three states for each base pair. The parameters of the model may be determined from comparison of the theory with experiment on the B—Z transition in synthetic inserts incorporated into supercoiled DNA. Four of six parameters of the model were determined before. To determine the rest two parameters a series of oligonucleotides has been synthesized and inserted into plasmid *pUC19*. The two-dimensional gel electrophoresis technique has been used to determine the superhelix density which induces the B—Z transition in the inserts. As a result a complete set of six energy parameters of the B—Z transition is known. The transition energy for a given base pair is shown to be independent of the neighbouring base pairs.

1. *Natural* DNA sequences can form left-handed helices in low salt solution under conditions of topological constraint / S. Brahm, J. Vergne, J. G. Brahm et al. // *J. Mol. Biol.*—1982.—162, N 2.— P. 473—493.
2. Pohl F. M., Thomae R., Di Capua E. Antibodies to Z-DNA interact with form V DNA // *Nature*.—1982.—300, N 5892.— P. 545—546.
3. Crystal structure of Z-DNA without an alternating purin-pyrimidine sequence / A. H.-J. Wang, R. V. Gessner, G. A. van der Marel et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1985.—82, N 11.— P. 3611—3615.
4. Вологодский А. В. Теоретическое описание В—Z-перехода в ДНК с произвольной последовательностью оснований // *Молекуляр. биология*.—1985.—19, № 4.— С. 1062.
5. Peck L. J., Wang J. C. The energetics of B to Z transition in DNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1983.—80, N 20.— P. 6206—6210.
6. Haniford D. B., Pulleyblank D. E. Facile transition of poly(d(TG)·d(CA)) into a left-handed helix in physiological conditions // *Nature*.—1983.—302, N 5909.— P. 632—634.
7. Frank-Kamenetskii M. D., Vologodskii A. V. Thermodynamics of the B—Z transition in superhelical DNA // *Ibid.*—1984.—307, N 5950.— P. 481—482.
8. Sequence dependent energetics of the B-Z transition in supercoiled DNA containing non-alternating purine-pyrimidine sequences / M. J. Ellison, R. J. Kelleher III, A. H.-J. Wang et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1985.—82, N 24.— P. 8320—8324.
9. Left-handed Z-DNA is induced by supercoiling in physiological ionic conditions / C. K. Singleton, J. Klysik, S. M. Sturdivant, R. M. Wells // *Nature*.—1982.—299, N 5880.— P. 312—316.
10. Wang J. C., Peck L. J., Becherer K. DNA supercoiling and its effects on DNA structure and function // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*—1982.—47, pt 1.— P. 85—91.
11. Rich A., Nordheim A., Wang A. H.-J. The chemistry and biology of left-handed Z-DNA // *Ann. Rev. Biochem.*—1984.—53.— P. 791—846.
12. Allowance for heterogeneous stacking in the helix-coil transition theory / A. V. Vologodskii, B. R. Amirkhyan, Y. L. Lyubchenko, M. D. Frank-Kamenetskii // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*—1984.—2, N 1.— P. 131—148.
13. Wada A., Sugama A. Local stability of DNA and RNA secondary structure and its relation to biological functions // *Progr. Biophys. and Mol. Biol.*—1986.—47.— P. 113—157.
14. Statistical-mechanical treatment of violations of the double helix in supercoiled DNA / V. V. Anshelevich, A. V. Vologodskii, A. V. Lukashin, M. D. Frank-Kamenetskii // *Bio-polymers*.—1979.—18, N 11.— P. 2733—2744.
15. Lee C.-H., Mizusawa H., Kakufuda T. Unwinding of double-stranded DNA helix by dehydration // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1981.—78, N 5.— P. 2838—2842.
16. Nordheim A., Rich A. The sequence (dC—dA)_n·(dG—dT)_n forms left-handed Z-DNA in negatively supercoiled plasmids // *Ibid.*—1983.—80, N 7.— P. 1821—1825.
17. Nucleotide sequence of the tracer regions flanking of the rat rRNA transcribed unit / L. P. Yavachev, O. P. Georgiev, E. A. Braga et al. // *Nucl. Acids Res.*—1981.—14, N 6.— P. 2799—2810.
18. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and *pUC19* vectors // *Gene*.—1985.—33, N 1.— P. 103—119.
19. Автоматический и полуавтоматический синтез полидезоксинуклеотидов динизопропил-фосфамидным методом / В. П. Кумарев, Т. И. Колочева, И. П. Мотовилова и др. // *Биорг. химия*.—1986.—12, № 8.— С. 1132—1134.

20. Maxam A. M., Gilbert W. A new method for sequencing DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1977.— 74, N 2.— P. 560—564.
21. Birnboim H. C., Doly J. A. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids Res.— 1979.— 7, N 6.— P. 1513—1523.
22. Lyamichev V. I., Panyutin I. G., Frank-Kamenetskii M. D. Evidence of cruciform structures in superhelical DNA provided by two-dimensional gel electrophoresis // FEBS Lett.— 1983.— 153, N 2.— P. 298—302.
23. Panyutin I., Lyamichev V., Mirkin S. A structural transition in $d(AT)_n \cdot d(AT)_n$ inserts within superhelical DNA // J. Biomol. Struct. and Dyn.— 1985.— 2, N 6.— P. 1221—1234.

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва
 Ин-т цитологии и генетики
 Сиб. отделения АН СССР, Новосибирск
 ВНИИгенетика, Москва

Получено 22.07.86

УДК 577.32

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ С ДНК ВО ВЛАЖНЫХ ПЛЕНКАХ МЕТОДОМ ИНФРАКРАСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ *

М. А. Семенов, Т. В. Больбух

Введение. Изучение методом инфракрасной (ИК) спектроскопии влажных пленок полинуклеотидов и ДНК позволило получить сведения об их конформационном состоянии, о местах связывания молекул воды и влиянии гидратации на устойчивость спиральных структур [1—4]. Спектральные параметры ИК-полос поглощения (частоты, интенсивности, полуширины) нуклеиновых кислот и воды весьма чувствительны к внутри- и межмолекулярным взаимодействиям. Это обстоятельство позволило использовать метод ИК-спектроскопии для изучения конформации и структуры гидратной оболочки нуклеиновой кислоты в комплексе биомолекула — краситель, что необходимо для понимания механизмов взаимодействия и функционирования гидратной воды нуклеиновых кислот с биологически активными веществами.

В данной работе было проведено исследование комплексообразования бромистого этидия с ДНК в пленках при различных относительных влажностях (ОВ) методом ИК-спектроскопии.

Известно, что бромистый этидий образует с ДНК довольно устойчивый комплекс [5—8]. В настоящее время особенно после рентгеноструктурного изучения с атомным разрешением кристаллов комплексов динуклеозидфосфатов А—У и Г—Ц с бромистым этидием [9, 10] считается, что фенантридиновое кольцо бромистого этидия интеркалирует между плоскостями оснований, изменяя при этом гликозидные углы, конформацию дезоксирибозы, межплоскостные расстояния и другие структурные параметры ДНК [5, 11]. При этом, по-видимому, должно претерпеть изменение водно-ионное окружение, особенно в местах интеркалирования фенантридинового кольца. Иначе говоря, свойства гидратно активных групп азотистых оснований должны существенно измениться. Однако такие сведения почти отсутствуют, что затрудняет построение достаточно реальных моделей гидратного комплекса бромистый этидий — ДНК. Кроме того, до сих пор не выяснен вопрос о существовании в данном комплексе внекольцевых взаимодействий колебательных моментов перехода, которые были обнаружены в спиральных полинуклеотидах [12] и нативной ДНК (нДНК) [13]. По-видимому, эти взаимодействия в местах интеркалирования бромистого этидия должны существенно измениться.

* Представлена членом редколлегии В. И. Даниловым