

14. Lipanov A. A., Chuprina V. P. The structure of poly(dA) : poly(dT) in a condensed state and in solution // Nucl. Acids Res.—1987.—15, N 14.—P. 5833—5844.
15. Edmondson S. P., Johnson W. C. Base tilt of poly(dA)-poly(dT) and polyd(AT)-polyd(AT) in solution determined by linear dichroism // Biopolymers.—1985.—24, N 4.—P. 825—841.
16. Bartenev V. N., Kameneva N. G., Lipanov A. A. A statistical stereochemical model of the flexible furanose ring // Acta crystallogr. B.—1987.—43, N 3.—P. 275—280.
17. Беглов Д. Б., Каменева Н. Г., Липанов А. А. Двухпараметрическая статистическая модель гибкой фуранозы // Материалы 2-го Всесоюз. семинара по применению мат. методов в биологии.—Пушкино, 1987.—С. 62—63.
18. Altona C., Sundaralingam M. Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides // J. Amer. Chem. Soc.—1972.—94, N 23.—P. 8205—8212.
19. Dickerson R. E., Kopka M. L., Pjura P. Biological macromolecules and assemblies / Eds F. Jurnac, A. McPherson.—New York: Wiley, 1985.—Vol. 2.—365 p.
20. Chiral phosphorothioate analogues of B-DNA / W. B. T. Cruse, S. A. Salisbury, T. Brown et al. // J. Mol. Biol.—1986.—192, N 4.—P. 891—905.
21. Helix geometry, hydration and G-A mismatch in a B-DNA decamer / G. G. Prive, U. Heinemann, S. Chandrasegaran et al. // Science.—1987.—238, N 4826.—P. 498—504.
22. Hamilton W. C. Significance tests on the crystallographic R-factor // Acta crystallogr.—1965.—18, N 4.—P. 502—510.
23. Barct J. F., Carbone G. P., Penon P. Infrared dichroism of polynucleotides of repeated sequence. Poly(dA)·poly(dT) and polyd(A-T)·polyd(A-T) // Biopolymers.—1978.—17, N 10.—P. 2319—2339.
24. Семенов М. А., Большух Т. В. Резонансные взаимодействия карбонильных колебаний в спиральных полинуклеотидах.—Харьков, 1982.—27 с.—(Препринт / АН УССР. Ин-т радиофизики и электроники; № 190).
25. Липанов А. А. Пространственная структура комплексов ДНК с ионами щелочных металлов и молекулами воды: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук.—М., 1986.—21 с.
26. EXAFS studies of the calcium salts of natural DNA and poly(dA):poly(dT) / I. Ya. Skuratovskii, S. S. Hasnain, D. G. Alexeev et al. // J. Inorg. Biochem.—1987.—29, N 4.—P. 249—257.
27. Structure of the B-DNA cationic shell as revealed by an X-ray diffraction study of CsDNA / V. N. Bartenev, Yu. I. Golovanov, K. A. Kapitonova et al. // J. Mol. Biol.—1983.—169, N 1.—P. 217—234.
28. Локализация ионов Cs⁺ в структуре А-формы ДНК / А. А. Липанов, Д. Г. Алексеев, В. И. Бартевев и др. // Биофизика.—1986.—31, № 2.—С. 336—338.
29. Arnott S., Selsing E. The structure of polydeoxyguanylic acid·polydeoxycytidylic acid // J. Mol. Biol.—1974.—88, N 2.—P. 551—552.
30. The structure of an oligo(dA)·oligo(dT) tract and its biological implications / H. C. M. Nelson, J. T. Finch, B. F. Luisi, A. Klug // Nature.—1987.—330, N 6145.—P. 221—226.
31. A bifurcated hydrogen-bonded conformation in the d(A·T) base pairs of the DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG) and its complex with distamycin / M. Coll, C. A. Frederick, A. H. J. Wang, A. Rich // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1987.—84, N 23.—P. 8385—8389.

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва

Получено 23.02.88

УДК 577.323

РОЛЬ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫХ ФОСФАТОВ И ВЛИЯНИЕ НЕКОМПЛЕМЕНТАРНЫХ ЗАМЕН В ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ СУБСТРАТАХ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ДНК-МЕТИЛАЗОЙ ECODAM

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

Введение. Адениновая ДНК-метилаза *Ecodam* в присутствии S-аденозилметнопина переносит две метильные группы в участок узнавания 5'—G—A—T—C—T—A—G—5', образуя два остатка N⁶-метиладенина [1, 2]. Фермент был выделен в гомогенном состоянии, что позволило провести изучение некоторых его физических и каталитических характеристик [1, 3]. Метилаза *Ecodam* из клеток *Escherichia coli* B834 является мономерным белком и имеет молекулярную массу 23 000 [3].

Ранее нами было показано, что при взаимодействии с однонитчатыми олигонуклеотидными субстратами фермент участвует в образовании двухцепочечной структуры ДНК по участку GATC, которая и является субстратной формой метилазы *Ecodam* [4, 5]. Кроме того, была обнаружена интересная особенность, состоящая в возможности метилирования ферментом несовершенных олигонуклеотидных комплексов, у которых в одной из цепей участка узнавания отсутствует фосфатный остаток, а также один или несколько нуклеотидных остатков. Для проявления ферментативной активности необходима пара GA в обеих цепях участка узнавания метилазы *Ecodam* [4].

Поскольку в исследованном ряде субстратов в местах разрыва олигонуклеотидных цепей отсутствовали межнуклеотидные фосфатные остатки, их роль во взаимодействии с метилазой *Ecodam* оставалась неясной. В настоящей работе приводятся данные по субстратным свойствам того же ряда олигонуклеотидных комплексов, содержащих остатки 3'-S-метилтиофосфорной кислоты. Кроме того, исследованы свойства олигонуклеотидных субстратов, содержащих некомплементарную пару оснований в участке узнавания метилазы *Ecodam*.

Материалы и методы. Метилаза *Ecodam* выделена по методу [3]. Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы фосфотриэфирным методом [6] и содержали 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 [7]. Условия метилирования, а также концентрации метилазы *Ecodam* и олигонуклеотидных субстратов аналогичны приведенным в работе [4].

Результаты и обсуждение. Для исследования взаимодействия метилазы *Ecodam* с синтетическими субстратами были использованы олигонуклеотидные комплексы, структура которых приведена в таблице (префикс «d» в формулах олигонуклеотидов для краткости опущен; ↑ — разрыв межнуклеотидного фосфата). Субстрат I образован олигонуклеотидами CAGTTTAGGATCCATTTAC (I) и GTGAAATGGATCC-TAAACTG (II), содержащими в центре полную последовательность узнавания GATC для метилазы *Ecodam*. Эти олигонуклеотиды полностью комплементарны друг другу и образуют устойчивый дуплекс. При комплексообразовании олигонуклеотидов GAAATGGAT-p-MeS (III) или GTGAAATGGAT-p-MeS (IV) с олигонуклеотидом I в участке узнавания фермента находится 3'-концевой S-метилтиофосфат (субстраты 2—6). При спаривании олигонуклеотида GTGAAATGGG (V) или GTGAAATGAA (VI) с олигонуклеотидом I получаем некомплементарную замену Ade на Gua (субстраты 7—8) или Gua на Ade (субстрат 9) в участке узнавания метилазы *Ecodam*.

Олигонуклеотиды III—VI комплементарны 3'-части олигонуклеотида I, а олигонуклеотиды GTCAAATCC (VII) и GTCAAATCCT (VIII) — 5'-части олигонуклеотида I. Эквимольная смесь олигонуклеотидов III—VIII в различных комбинациях с 20-членным олигонуклеотидом I позволяет получить комплексы, содержащие различные дефекты в одной из цепей участка узнавания фермента: отсутствие межнуклеотидного фосфата, пропуск одного или нескольких нуклеотидов, наличие в месте разрыва олигонуклеотидной цепи S-метилтиофосфатного остатка, некомплементарная замена аденозина на гуанозин или гуанозина на аденозин.

Температуры плавления дефектных олигонуклеотидных субстратов в 30 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,8, изменяются в сравнительно узком температурном интервале 22—31 °C. Очевидно, что до 20 °C большая часть олигонуклеотидных комплексов находится в двуспиральном состоянии, тогда как при 37 °C их доля незначительна. Следует отметить, что в присутствии метилазы *Ecodam* наблюдается повышение стабильности олигонуклеотидных комплексов. Подробные данные о зависимости температуры плавления олигонуклеотидных комплексов от

Относительные величины степени метилирования ДНК-метилазой *Eco*dam олигонуклеотидных субстратов, содержащих в участке узнавания S-метилтиофосфатный остаток или некомплементарную пару оснований

Номер субстрата	Комбинация олигонуклеотидов	Субстрат	Структура участка узнавания	% от метилирования субстрата I при 37 °C, °C		
				20	30	37
1	I+II	5' C-A-G-T-T-T-A-G-G-A-T-C-C-A-T-T-T-C-A-C G-T-C-A-A-A-T-C-C-T-A-G-G-T-A-A-A-G-T-G	...-G-A-T-C-... ... C-T-A-G-...	73	93	100
2	I+III	5' C-A-G-T-T-T-A-G-G-A-T-C-C-A-T-T-T-C-A-C T-A-G-G-T-A-A-A-G	...-G-A-T-C-... T-A-G-...	85	82	21
3	I+IV	MeS-P 5' C-A-G-T-T-T-A-G-G-A-T-C-C-A-T-T-T-C-A-C A-G-G-T-A-A-A-G-T-G	MeS-P ...-G-A-T-C-... A-G-...	33	66	53
4	I+IV+VII	MeS-P 5' C-A-G-T-T-T-A-G-G-A-T-C-C-A-T-T-T-C-A-C G-T-C-A-A-A-T-C-C A-G-G-T-A-A-A-G-T-G	MeS-P ...-G-A-T-C-... ...-C A-G-...	34	52	39
5	I+III+VII	MeS-P 5' C-A-G-T-T-T-A-G-G-A-T-C-C-A-T-T-T-C-A-C G-T-C-A-A-A-T-C-C ↑ T-A-G-G-T-A-A-A-G	MeS-P ...-G-A-T-C-... ...-C ↑ T-A-G-...	94	134	55
6	I+IV+VIII	MeS-P 5' C-A-G-T-T-T-A-G-G-A-T-C-C-A-T-T-T-C-A-C G-T-C-A-A-A-T-C-C ↑ A-G-G-T-A-A-A-G-T-G	MeS-P ...-G-A-T-C-... ...-C-T ↑ A-G-...	32	53	61
7	I+V+VIII	MeS-P 5' C-A-G-T-T-T-A-G-G-A-T-C-C-A-T-T-T-C-A-C G-T-C-A-A-A-T-C-C ↑ G-G-G-T-A-A-A-G-T-G	MeS-P ...-G-A-T-C-... ...-C-T ↑ G-G-...	0	0	1
8	I+V	5' C-A-G-T-T-T-A-G-G-A-T-C-C-A-T-T-T-C-A-C G-G-G-T-A-A-A-G-T-G	G-G-... ...-G-A-T-C-...	0	2	6
9	I+VI+VIII	5' C-A-G-T-T-T-A-G-G-A-T-C-C-A-T-T-T-C-A-C G-T-C-A-A-A-T-C-C ↑ A-A-G-T-A-A-A-G-T-G	...-G-A-T-C-... ...-C-T ↑ A-A-...	8	10	3

их состава и об эффекте стабилизации комплексов метилазой *Ecodam* будут приведены в отдельном сообщении. Здесь же отметим, что присутствие метилазы *Ecodam* повышает температуру плавления более чем на 5 °С.

В качестве контрольного субстрата, не имеющего дефектов, использовали дуплекс I, степень метилирования которого при 37 °С принята за 100 %.

Несовершенные олигонуклеотидные комплексы, в которых отсутствует остаток цитидиловой, тимидиловой кислот или одновременно оба эти остатка (субстраты 2—4), хорошо метилируются при исследованных температурах. Значительная степень метилирования сохраняется и в том случае, если в месте разрыва олигонуклеотидной цепи присутствует остаток 3'-S-метилтиофосфорной кислоты (субстраты 5 и 6). При этом разрыв сахара-фосфатного остова между остатками А и Т (субстрат 6) приводит к уменьшению в 2—3 раза степени метилирования при температурах 20 и 30 °С по сравнению с комплексом 5, где этот дефект находится между остатками С и Т. Такие же изменения ранее наблюдались для аналогичных комплексов, в которых отсутствует межнуклеотидный фосфат в участке узнавания метилазы *Ecodam* (субстраты 4 и 5, табл. 3 в работе [4]).

Для олигонуклеотидных комплексов 8 и 7, содержащих некомплементарную пару оснований GT, практически не наблюдается метилирования. Некоторое метилирование наблюдается для субстрата 9, содержащего некомплементарную замену Gua на Ade в участке узнавания. Это может быть связано с конкурентным образованием дуплекса из двух цепей олигонуклеотида I по GATC-последовательности, что и приводит к незначительному метилированию этого олигонуклеотидного комплекса, как обсуждалось ранее [4].

Присутствие остатка 3'-S-метилтиофосфорной кислоты практически не влияет на степень метилирования олигонуклеотидных комплексов 3, 4 и 6 по сравнению с аналогичными комплексами, не содержащими такого остатка (субстраты 2, 3 и 5, табл. 3 в работе [4]). Эти олигонуклеотидные субстраты содержат дефект в центре симметричной последовательности узнавания метилазы *Ecodam*. Сдвиг дефекта по нижней цепи влево от центра симметрии (субстраты 2 и 5) приводит к увеличению степени метилирования при температурах 20 и 30 °С. Более высокая степень метилирования наблюдалась также для аналогичных комплексов, где отсутствует межнуклеотидный фосфат (субстраты 1 и 4, табл. 3 в работе [4]). Значительное уменьшение степени метилирования олигонуклеотидных субстратов 2 и 5 при температуре 37 °С связано с различной стабильностью олигонуклеотидных комплексов. Так, например, лучше метилируемый комплекс при 37 °С (субстрат 4, табл. 3 в работе [4]) имеет в отсутствие фермента температуру плавления 31 °С и содержит 11-членный олигонуклеотид, комплементарный 3'-части олигонуклеотида I, тогда как в субстрате 5 используется более короткий 9-членный олигонуклеотид III, вследствие чего температура плавления этого комплекса ниже и равна 24 °С.

Более высокая степень метилирования олигонуклеотидных субстратов 2 и 5, содержащих непрерывную GAT-последовательность в дефектной цепи по сравнению с комплексами 3, 4 и 6, в которых присутствует GA-последовательность, обусловлена различием в метилировании отдельных цепей олигонуклеотидных комплексов [4]. Метилирование аденинового основания в обеих цепях происходит для дефектных субстратов, содержащих непрерывную GAT-последовательность, тогда как в комплексах 3—5 наблюдается метилирование одной верхней цепи, содержащей полную последовательность узнавания GATC. Эта особенность во взаимодействии с субстратами метилазы *Ecodam* объясняет также превышение 100 %-ного уровня метилирования для субстрата 5 при температуре 30 °С, что хорошо соответствует степени метилирования аналогичного субстрата, не содержащего межнуклеотидного фосфата [4].

Полученные результаты по метилированию дефектных олигонуклеотидных субстратов показывают, что присутствие S-метилтиофосфатного остатка в участке узнавания не оказывает существенного влияния на взаимодействие с метилазой *Ecodam*. Данные подтверждают ранее полученные результаты [4] о необходимости сохранения пары GA в обеих цепях участка узнавания для продуктивного фермент-субстратного взаимодействия. В то же время остатки тимидиловой и цитидиловой кислот могут отсутствовать в дефектной цепи, что не изменяет существенно активности метилазы *Ecodam*. Отсутствие метилирования олигонуклеотидных комплексов, содержащих некомплементарную замену Ade на Gua или Gua на Ade, также показывает, что обе пары GA, входящие в участок узнавания, непосредственно участвуют в распознавании субстрата ферментом.

Требование к сохранению в дефектных олигонуклеотидных субстратах элементов симметрии в участке узнавания дает возможность предположить необходимость симметричной структуры и метилазы *Ecodam*.

На уровне первичной структуры не обнаружены элементы симметрии, так как белок не содержит гомологичных повторов аминокислотных последовательностей [8]. Мономерная структура фермента, обнаруженная как в свободном состоянии, так и при исследовании кинетических закономерностей протекания реакции метилирования ДНК [9], не исключает возможности димеризации метилазы *Ecodam* при взаимодействии с участком узнавания. Действительно, исследования, проведенные нами по изучению субъединичной структуры фермента в присутствии олигонуклеотидных субстратов методами малоуглового рентгеновского рассеяния [10], а также гель-фильтрации и центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы [11], подтверждают возможность димеризации метилазы *Ecodam*.

THE SIGNIFICANCE OF INTERNUCLEOTIDE PHOSPHATES AND NONCOMPLEMENTARY SUBSTITUTIONS IN THE OLIGONUCLEOTIDE SUBSTRATES ON THE INTERACTION WITH THE DNA METHYLASE *Ecodam*

V. V. Zinoviev, N. I. Rechkunova, Yu. A. Gorbunov,
Ya. I. Buryanov*, E. G. Malygin

All-Union Research Institute of Molecular Biology,
Koltsovo, Novosibirsk Region

* Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region

Summary

Ecodam methylase is investigated for its interaction with different synthetic oligonucleotide substrates containing some defects in the GATC sequence. The defects are as follows: the absence of one or several nucleotide residues, the presence of 3'-phosphate residue with CH₃-S-group, noncomplementary substitution of Ade by Gua or of Gua for Ade in the recognition site of methylase *Ecodam*. The presence of the 3'-S-methyl thiophosphate residue has no essential effect on the methylation of oligonucleotide complexes as compared to the analogous complexes lacking internucleotide phosphate. The introduction of the noncomplementary base pair in the recognition site results in the loss of substrate properties of such imperfect duplexes.

1. Geier G. E., Modrich P. Recognition sequence of the *dam* methylase of *Escherichia coli* K-12 and mode of cleavage of *DpnI* endonuclease // J. Biol. Chem.—1979.—254, N 4.—P. 1408—1413.
2. Hattman S., Brooks J. E., Masurekar M. Sequence specificity of the *PI* modification methylase (*M. EcoPI*) and the DNA methylase (*M. Ecodam*) controlled by the *Escherichia coli dam* gene // J. Mol. Biol.—1978.—126, N 3.—P. 367—380.
3. Бурьянов Я. И., Захарченко В. Н., Басев А. А. Выделение, очистка и некоторые свойства адениновой ДНК-метилазы *Ecodam* // Докл. АН СССР.—1981.—259, № 6.—С. 1492—1495.

4. Действие ДНК-метилазы *Ecodam* на одностранные последовательности и синтетические олигонуклеотиды / В. В. Зиновьев, Ю. А. Горбунов, С. Г. Попов и др. // Молекуляр. биология.— 1985.— 19, № 4.— С. 947—954.
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 Lett.— 1984.— 168, N 1.— P. 166—168.
6. Hirose T., Crea R., Itakura K. Rapid synthesis of triphosphorylated nucleotide blocks // Tetrahedron Lett.— 1978.— N 28.— P. 2449—2452.
7. Reese C. B., Yau L. O-aryl S-methyl phosphorochloridothioates: terminal phosphorylating agents in the phosphotriester approach to oligonucleotide synthesis // J. Chem. Soc. Chem. Commun.— 1978.— N 23.— P. 1050—1052.
8. Brooks J. E., Blumenthal R. M., Gingeras T. R. The isolation and characterization of the *Escherichia coli* DNA adenine methylase (*dam*) gene // Nucl. Acids Res.— 1983.— 11, N 3.— P. 837—851.
9. 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.
10. Изучение индуцируемых субстратом изменений в состоянии метилазы *Ecodam* методом малоуглового рентгеновского рассеяния / Ф. В. Тузиков, В. В. Зиновьев, Л. Н. Яшина и др. // Молекуляр. биология.— 1986.— 20, № 4.— С. 1002—1007.
11. Димеризация *Ecodam* метилазы, индуцированная олигонуклеотидным субстратом / Н. И. Речкунова, В. В. Зиновьев, Э. Г. Малыгин и др. // Биополимеры и клетка.— 1987.— 3, № 3.— С. 152—154.

ВНИИ молекуляр. биологии,
пос. Кольцово Новосибир. обл.
Ин-т биохимии и физиологии
микроорганизмов АН СССР, Пушкино

Получено 14.07.87

УДК 577.3:547.963.3

МИКРОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРАТАЦИИ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ ПОЛИ (dA) · ПОЛИ (dT) И ПОЛИ (dG) · ПОЛИ (dC) *

Г. М. Мрвлишвили, В. М. Сохадзе,
Г. Ш. Джапаридзе, Д. А. Татишвили, Н. Э. Якобашвили

Введение. Известно, что двойная спираль ДНК в растворах и волокнах может находиться в различных упорядоченных состояниях (А-, В-, Z-формы) в зависимости от нуклеотидной последовательности, типа и концентрации ионов и активности воды [1—6]. Основываясь на данных рентгеноструктурного анализа монокристаллов фрагментов ДНК [7—9], авторы работы [10] пришли к выводу, что основным фактором, приводящим к возникновению двух дискретных структурных форм ДНК (А и В) является особенность стэкинг-взаимодействий соседних пар оснований. В работе [11] подчеркивается, что СС/ГГ-контакты облегчают В—А-переход ДНК в растворах. С другой стороны, утверждается, что молекулы воды могут играть определяющую роль как в стабилизации В-ДНК (имеется в виду обнаруженное рентгеноструктурным анализом упорядоченное расположение молекул воды — квазитетраэдрический водный «хребет» в узком желобке В-ДНК [8, 9] и пентагональная сетка из молекул воды в А-ДНК [12]), так и при переходах в пределах двухтяжесового состояния. Недавно высказано предположение [13], что стабилизация ДНК в А- и В-формах обусловлена особенностями гидратации фосфатных групп: при В—А-переходе, индуцированном уменьшением влажности, оставшихся молекул воды оказывается вполне достаточно для стабилизации А-формы ДНК, так как одна молекула воды может связываться сразу с двумя фосфатами одной цепи. Следовательно, в условиях пониженной влажности стабильность В-формы не может быть достигнута из-за большого расстояния (0,66 нм)

* Представлена членом редколлегии В. И. Ивановым.