



Структура и функция биополимеров

УДК 577.323.4

рН-ЗАВИСИМЫЙ СТРУКТУРНЫЙ ПЕРЕХОД В ГОМОПУРИН-ГОМОПИРИМИДИНОВОМ БЛОКЕ В СВЕРХСПИРАЛЬНОЙ ДНК *

В. И. Лямичев, С. М. Миркин, М. Д. Франк-Каменецкий

Введение. Последние годы значительное внимание было сосредоточено на альтернативных (иных, чем классическая В-форма) структурах ДНК. Среди них наиболее полно изучены крестообразные структуры [1—6] и Z-форма [7, 8]. Оба типа структур образуются в сверхспиральных ДНК и сильно зависят от последовательности ДНК. Кресты образуются в палиндромных участках, тогда как Z-форма обычно образуется в чередующихся пурипиримидиновых последовательностях, содержащих G—C-пары оснований. В настоящее время идет поиск других альтернативных структур. Среди последовательностей, которые могут быть интересны в этом отношении, наибольшее внимание привлекают гомопурипиримидиновые блоки. Необычные физические свойства синтетических полинуклеотидов такого типа проявляются при низких [9, 10] и даже нейтральных рН в случае замены цитозина метилцитозином [11].

Длинные гомопурипиримидиновые последовательности часто фланкируют гены в эукариотической ДНК. Они не случайно распределены по геному, что указывает на их роль в структуре хроматина и/или процессах активации генов. Удивительная особенность этих последовательностей состоит в их гиперчувствительности к эндонуклеазе *S1* [12—27]. Эта *S1*-гиперчувствительность обычно наблюдается в сверхспиральной ДНК, хотя были сообщения о специфическом разрезании гомопурипиримидиновых блоков и в линейных молекулах [12, 26, 27].

Как в случае крестообразных структур и Z-формы, зависящая от сверхспирализации *S1*-чувствительность может указывать на то, что происходит какой-то структурный переход, ослабляющий сверхспиральное напряжение. В литературе обсуждались структуры типа скользящих петель [12, 16, 17, 23], левые спирали [19, 25], тройные и четверные спирали [19, 11]. Однако имеющихся данных было явно недостаточно для того, чтобы сделать определенный вывод о структуре гомопурипиримидиновых блоков в сверхспиральной ДНК. Для выяснения этого вопроса мы предприняли исследование сверхспиральной ДНК, содержащей гомопурипиримидиновую вставку, методом двумерного электрофореза. Этот метод широко применялся при исследовании образования крестов и Z-формы под действием сверхспирального напряжения.

* Представлена членом редколлегии д. ф.-м. н. В. И. Ивановым.

Материалы и методы. Штаммы и образцы ДНК. Штамм *E. coli* K12 с плазмидой *pLK22*, содержащий блок гистоновых генов *h22* морского ежа *P. miliaris* [33], был предоставлен д-ром М. Д. Бирнстилом. В качестве вектора при клонировании использовали плазмиду *pUC19* [34]. Трансформацию проводили, как описано в [35]. Плазмидную ДНК выделяли по методу лизиса кипячением [36] с последующей очисткой полиэтиленгликолем 6000 [37], фенольной депротенинизацией и гель-фильтрацией на сефакриле S300.

Для получения образцов ДНК с широким распределением по топоизомерам ДНК обрабатывали топоизомеразой I из асцитной карциномы Кребс II [38] в присутствии бромистого этидия.

Электрофорез. В области значений pH 5,8—8,0 в качестве электродного буфера использовали натрий-фосфатный буфер с 1 мМ ЭДТА. В области значений pH 4,6—6,0 использовали натрий-цитратный буфер. Концентрация натрия для всех буферов в исследуемом диапазоне pH составляла 100 мМ. Двумерный электрофорез в акриламид-агарозном геле проводили, как в [32]. Напряженность электрического поля составляла 4,5 В/см, время разделения в первом направлении — 20—22 ч. Разделение во втором направлении проводили при комнатной температуре в трис-фосфатном буфере (36 мМ трис, 30 мМ NaH_2PO_4 , pH 8,0, 1 мМ ЭДТА) [39] в присутствии 7 мкг/мл хлорохина [40]. Если не оговорено специально, двумерный электрофорез в 1,5 %-ном агарозном («Sigma», США) геле (16×16 см) проводили при комнатной температуре и интенсивности электрического поля 2 В/см на протяжении 20—22 ч. После разделения в первом направлении гель насыщали 4—5 ч трис-ацетатным буфером (40 мМ трис-ацетат, pH 7,8, 1 мМ ЭДТА), содержащем 2,5—5 мкг/мл хлорохина. Затем проводили разделение во втором направлении при комнатной температуре и напряженности электрического поля 2 В/см. Для поддержания постоянного значения pH буфер непрерывно перекачивали между катодной и анодной камерами аппарата. Значения pH в камерах по завершении электрофореза различались не более чем на 0,2. pH измеряли при помощи pH-метра Пролаб 4А («Oriola Oy», Швеция). Окрашивание и фотографирование гелей проводили, как в [32].

Обработка эндонуклеазой *S1*. Использовали эндонуклеазу фирмы «Sigma». Обработку проводили в течение 30 мин в 100 мМ растворе натрий-ацетата, pH 5,26, содержащем 1 мМ ZnSO_4 , 10 ед/мкл фермента, при 20°C. Реакцию останавливали добавлением 20 мМ ЭДТА и 1 % DS-Na. *S1* удаляли фенольной депротенинизацией с последующей гель-фильтрацией на сефакриле S300. Чтобы локализовать места разрывов, пробу сначала гидролизуют рестриктазой *HindIII*. Затем пробу метили при помощи α - ^{32}P -ТТР и фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I. В результате была помечена гомопуриновая нить.

Пробы анализировали при помощи электрофореза в 10 %-ном акриламидном геле, содержащем 7 М мочевины. Чтобы получить пробу-свидетель, ДНК плазмиды *pEJ4* обрабатывали рестриктазой *HindIII* и метили при помощи α - ^{32}P -ТТР и фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I. Затем пробы обрабатывали рестриктазой *EcoRI* и меченый фрагмент, содержащий исследуемую вставку, элюировали из 5 %-ного акриламидного геля. Затем проба была обработана в соответствии со стандартным протоколом секвенирования Максама — Гилберта для случая гуанинов.

Результаты и обсуждение. Плазмида, несущая гомопурино-гомопиримидиновую вставку. *BamHI-HindIII*-фрагмент длиной примерно 800 н. п. из плазмиды *pLK22* встроили в плазмиду *pUC19*, линеаризованную теми же рестриктазами. Этот фрагмент содержит гомопурино-гомопиримидиновую последовательность, гиперчувствительную к эндонуклеазе *S1* [12]. Этот 800 н. п.-фрагмент был затем вновь выделен и укорочен со стороны *BamHI*-сайта при помощи рестриктазы *BspRI*. Укороченный фрагмент был реклонирован в плазмиду *pUC19* между сайтами полилинкера *SmaI* и *HindIII*. В результате была получена плазмида *pEJ4*. На схеме показана нуклеотидная последовательность снейсерного участка повтора *h22* гистоновых генов морского ежа *P. miliaris* (прописные буквы), клонированного в полилинкере *pUC19*, определенная по методу Максама—Гилберта [41]. Регулярный $(\text{GA})_{16}$ -блок подчеркнут. Граничные участки последовательности *pUC19* обозначены строчными буквами. Участки последовательности 0—98 и 363—509 соответствуют ранее опубликованной последо-

				tgaattcgag	ctcggtaccc	
1	CSAAGAAGGT	TGCAAAATCG	AAATGATGTT	GCACGTGCTA	CTCGTGTCCAC	50
51	CACAACACAA	CGGCTCTTTT	CAGAGCCACC	ACATTTCCAC	GAAAGACCAA	100
101	TGCCTTATTT	TGATCGGTAA	TGATTTGGTGT	AGAGAAACAG	CAAAATATTTC	150
151	ATATTTACTGC	TGCTAATTLA	AGAGAGACAA	AACAAAACAA	GAAGCTAACLA	200
201	CAAGCTTCAA	ACTACTAATA	ACACCAACCG	ATGAAATTTCA	TTGTTTTATCT	250
251	ATTAATGTGC	CAACTCTGCA	AAGGTGGCAC	CTAGGAAAGG	AGATTTACAG	300
301	AAATAAGCAA	CACGTAGAGG	TAAAGAGAGT	TATACCACTC	CTGACATGAA	350
351	ACACACTCAA	TTCAACATAT	TTAGAGGAAG	GGAGAGAGAG	AGAGAGAGAG	400
401	AGAGAGAGAG	AGAGGGGGGG	GGGGAGGGAG	AATTGCCCAA	AACACTGTAA	450
451	ATGTAGCGTT	AATGAACSTT	TCATCTCATC	GACTGCGCGT	GTATAAGGAT	500
501	GATTATAAG	cttggcgta				

вательности [42] за двумя исключениями: Т заменен на А в позиции 92 и в позиции 371 имеется дополнительный Т.

На схеме можно видеть, что гомопурин-гомопиримидиновый участок состоит из двух граничащих блоков регулярных последовательностей (GA)₁₆ (383—414) и G₁₁ (415—425), которые фланкированы двумя

Рис. 1. Картина двумерного разделения топонизомеров ДНК в агарозном геле. Для разделения в первом направлении (сверху вниз) использовали натрий-цитратный буфер. Для разделения во втором направлении (слева направо) был добавлен хлорохин. Интеркалирующий агент снимает напряжение сверхспирализации так, что все альтернативные структуры исчезают. В результате появляется возможность определить порядковый номер каждого топонизомера. А — ДНК *pEI4* при pH 5,6; 2,5 мкг/мл хлорохина; Б — ДНК *pEI4* при pH 5,1; 2,5 мкг/мл хлорохина; В — ДНК *pEI4* при pH 4,7; 10°C; 5,4 мкг/мл хлорохина (скачок происходит в верхней части картины); Г — ДНК *pUC19* при pH 4,8; 2,5 мкг/мл хлорохина (контрольное разделение, из которого следует что в плазмиде *pUC19* отсутствуют какие-либо структурные изменения).

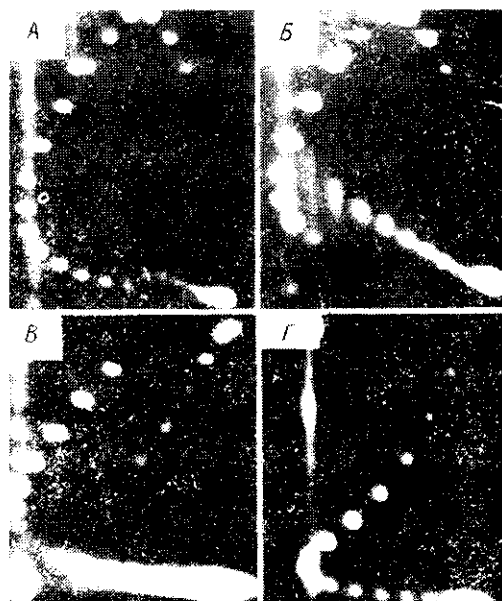


Fig. 1. Two-dimensional agarose gel electrophoresis of the DNA topoisomers. In the first direction (from top to bottom) the sodium citrate buffer (pH 5.6) was used. In the second direction (from left to right) chloroquine was added. The intercalating dye relaxed the negative superhelicity and all alternative structures disappeared. As a result it was possible to calculate the order number of each topoisomer. A — *pEI4* DNA at pH 5.6; 2.5 $\mu\text{g/ml}$ of chloroquine. B — *pEI4* DNA at pH 5.1; 2.5 $\mu\text{g/ml}$ of chloroquine. V — *pEI4* DNA at pH 4.7; 10°C; 5.4 $\mu\text{g/ml}$ of chloroquine (the drop occurs at the top of the pattern). Г — *pUC19* DNA at pH 4.8; 2.5 $\mu\text{g/ml}$ of chloroquine (the control pattern which demonstrates the absence of any drop for the *pUC19*).

нерегулярными блоками из 8 и 9 н.п. В оставшейся части последовательности мы не обнаружили участков, которые могут принимать крестообразную конформацию (инвертированные повторы) или Z-конформацию (чередующиеся пурины и пиримидины). Далее мы изучали плазмиду *pEI4* размером 3160 н.п., содержащую гомопурин-гомопиримидиновую вставку, при помощи двумерного электрофореза.

Структурный переход в ДНК плазмиды *pEI4*, содержащей гомопурин-гомопиримидиновую вставку. Двумерный гель-электрофорез является эффективным методом для обнаружения структурных переходов в ДНК, индуцированных сверхспирализацией ДНК. Он интенсивно используется при изучении В—Z-перехода [28—30, 43], образования крестов [6, 31, 32, 37] и открытых участков [4]. На рис. 1 показано, что двумерный гель-электрофорез выявляет структурный переход в изучаемой нами плазмиде *pEI4*. Однако в отличие от всех переходов, исследованных ранее при помощи

этого метода, переход в *pEI4* сильно зависит от рН. Это четко видно на рис. 2, который суммирует наши экспериментальные данные по зависимости от рН значения $\sigma_{пер}$, т. е. сверхспиральной плотности, соответствующей середине перехода.

На рис. 1, *G* показано отсутствие какого-либо перехода в контрольной плазмиде *pUC19* при рН 4,8, что справедливо и для остальных значений рН. Это означает, что наблюдаемый переход происходит внутри вставки из гистоновых генов морского ежа. Более того, переход затрагивает гомопурин-гомопиримидиновый блок во вставке. Это сле-

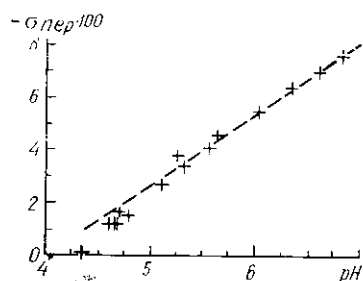


Рис. 2. Зависимость величины $-\sigma_{пер}$ от рН: $-\sigma_{пер}$ — плотность отрицательной сверхспирализации, отвечающая середине перехода. Каждая точка получена на основании картин двумерного разделения, аналогичных показанным на рис. 1.

Fig. 2. The pH dependence of the $-\sigma_{tr}$ value: $-\sigma_{tr}$ is a negative superhelical density of DNA corresponding to the transition midpoint. Each point was obtained from the two-dimensional gel pattern of the type presented in Fig. 1.

дует из данных о том, что после обработки препаратов ДНК эндонуклеазой *S1* из картины двумерного электрофореза исчезают топоизомеры, подвергшиеся структурному переходу (рис. 3). В то же время на рис. 4 показано, что нуклеаза *S1* гидролизует только блок (GA)₁₆.

Для всех значений рН скачок в подвижности, сопровождающий переход, соответствует примерно 3,5 сверхвиткам. Скачок был точно измерен по картине разделения на рис. 1, *B*.

Важно отметить, что мы использовали агарозный гель при рН 5,6 и ниже. При более высоких значениях рН величина $\sigma_{пер}$ настолько возрастает, что мы были вынуждены использовать акриламид-агарозный гель для разделения топоизомеров с высокой сверхспиральной плотностью [32, 37]. Ни тип геля, ни тип буфера не влияют на переход. Однако значение $-\sigma_{пер}$ возрастает при увеличении ионной силы (данные не приведены), поэтому во всех экспериментах, приведенных в этой статье, ионная сила была одной и той же и соответствовала концентрации натрия 100 мМ.

При плотностях отрицательной сверхспирализации больших, чем 0,05 в плаزمиде *pUC19* и *pEI4* может возникать крестообразная структура, так как они содержат палиндромный участок плазмиды *pBR322* [34]. Чтобы избежать какого-либо влияния креста на переход в гомопурин-гомопиримидиновом блоке для рН 5,6 и выше, мы воспользовались тем, что при низкой температуре кинетика образования крестов является крайне медленной [6, 31, 32, 37, 45, 46]. Для этого мы добавили хлорохин ко всем образцам перед нанесением их на гель. Это приводило к снятию сверхспирального напряжения и исчезновению любых необычных структур (крестов, Z-формы и пр.) для всех топоизомеров. Затем проводили электрофорез при 10 °С. В электрическом поле молекулы хлорохина покидают ДНК, так как они положительно заряжены и движутся в направлении, противоположном ДНК. В силу этого сверхспиральное напряжение восстанавливается, и образование необычных структур снова становится возможным. Однако достаточно длинные чередующиеся пуриин-пиримидиновые последовательности отсутствуют в нашей плазмиде, в то время как крестообразные структуры не могут образоваться в этих условиях за время электрофореза [32]. Поэтому наблюдаемый переход является переходом только в гомопурин-гомопиримидиновом блоке, для которого время релаксации оказалось значительно меньшим времени электрофореза.

Теория рН-зависимого перехода, индуцированного сверхспиральным напряжением. Допустим, мы

имеем замкнутую сверхспиральную ДНК длиной N н. п. со сверхспиральной плотностью σ , которая несет гомопурино-гомопиримидиновую вставку m н. п., способную к рН-зависимому структурному переходу. Будем называть гипотетическую структуру, образующуюся во вставке при низких рН и/или сверхспиральной плотности, Н-формой. Переход В—Н осуществляется, когда потеря энергии за счет обра-

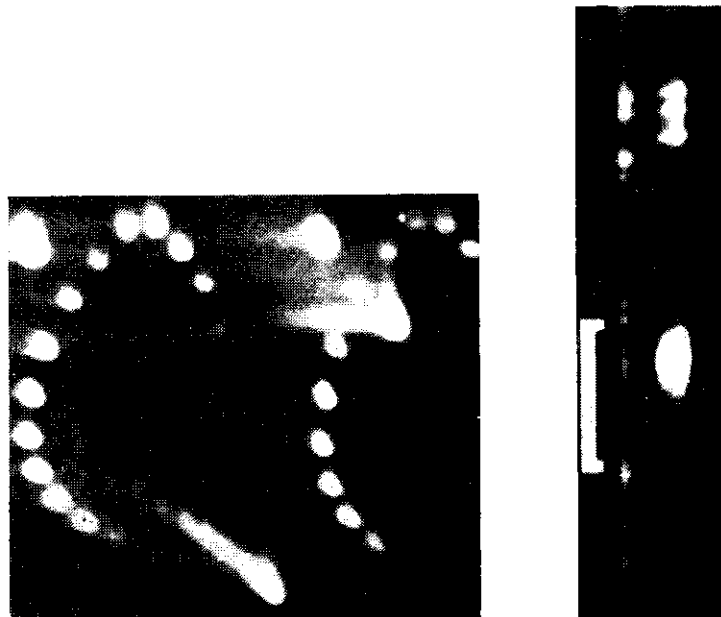


Рис. 3. Двумерное разделение до (левая) и после (правая) обработки эндонуклеазой *SI*.

Fig. 3. Two-dimensional patterns before (left) and after (right) action of *SI* endonuclease.

Рис. 4. Распределение мест нанесения разрывов эндонуклеазой *SI* в гомопуриновой нити (правая дорожка) и репер (левая дорожка), использованный для определения длины (см. Материалы и методы). Скобкой отмечен $(GA)_{16}$ -блок.

Fig. 4. The distribution of the sites of scissions by *SI* endonuclease in the homopurine strand (the rightward lane). The leftward lane presents the reference «ladder». The bracket indicates the $(GA)_{16}$ stretch. (See Materials and Methods).

зования Н-формы равна выигрышу энергии за счет релаксации сверхспирального напряжения:

$$(m/r)(\Delta F_0 - RT \ln(1 + 10^{pK-pH})) + F_n + \Delta G = 0, \quad (1)$$

где r — число пар оснований, соответствующее одному потенциальному месту протонирования; ΔF_0 — свободная энергия элонгации непротонированной Н-формы на r пар оснований; F_n — свободная энергия нуклеации Н-формы внутри В-формы ДНК. Выражение $(m/r)RT \ln(1 + 10^{pK-pH})$ — это стандартное выражение для свободной энергии, высвобождающейся за счет равновесного протонирования m_i/r потенциальных мест протонирования с данным значением pK ; ΔG — уменьшение энергии сверхспирализации в результате В—Н-перехода.

Используя стандартное выражение для энергии сверхспирализации, справедливое для $N \geq 3000$ [47, 48], получаем:

$$\Delta G = 11RTN((\sigma + \kappa m/N)^2 - \sigma^2) \approx 22RTm\kappa\sigma, \quad (2)$$

здесь κ — фактор, зависящий от степени раскрутки двойной спирали, вызванной В—Н-переходом. Для крестов и раскрытых участков $\kappa=1$, для Z-формы $\kappa=1,8$ [8, 48]. Подставляя (2) в (1), получаем:

$$-\sigma_{пер} = (1/22RT\kappa r)(\Delta F_0 - RT \ln(1 + 10^{pK-pH})) + rF_n/m. \quad (3)$$

Считая, что $pH < pK$ получаем:

$$\sigma_{\text{пер}} = 2,3/22\kappa r (pH_0 - pH), \quad (4)$$

где $pH_0 = (-1/2,3RT) (\Delta F_0 - 2,3RT pK + (r \cdot m) F_n)$ является значением pH , при котором В—Н-переход происходит в релаксированной ДНК.

Можно видеть, что в соответствии с данными рис. 2 теория предсказывает линейную зависимость $-\sigma_{\text{пер}}$ от pH (если $pH < pK$). Из наклона зависимости мы получаем с большой точностью:

$$\kappa r = 4. \quad (5)$$

Таким образом, мы наблюдали pH -зависимый структурный переход в плазмиде $pE14$, сопровождающийся снятием сверхспирального напряжения. Этот переход связан с образованием новой структуры ДНК в гомопурин-гомопиримидиновом блоке гистоновых генов морского ежа *P. miliaris*, которая гиперчувствительна к эндонуклеазе *S1*. Мы назвали эту новую структуру Н-формой.

Какова природа Н-формы? Этот вопрос широко обсуждался в литературе [12, 16, 17, 19, 25, 27]. Наши данные дают ключевые характеристики Н-формы, которые, как мы считаем, позволяют ответить на этот вопрос. Прежде всего, график рис. 2 показывает сильную зависимость стабильности Н-формы от pH . Это наблюдение дает возможность отбросить все ранее изученные альтернативные (отличные от В-формы) структуры (кресты, Z-форму, открытые участки). Известно, что равновесие между В- и Z-формами практически не зависит от pH [49]. Недавно мы показали, что при изменении pH с 8 до 4,7 величина $-\sigma_{\text{пер}}$ для крестообразной структуры, образующейся в участке $(AT)_{16}$, и для Z-формы, образующейся в участке $(GC)_{10}$, уменьшается только на 0,005. В случае Н-формы предложенный выше термодинамический анализ, основанный на общих предположениях, приводит к формуле (5), которая устанавливает связь между величиной κ , зависящей только от взаимной закрутки комплементарных нитей ДНК в Н-форме, и числом пар оснований r , приходящихся на одно потенциальное место протонирования в Н-форме. Большим достоинством формулы (5) является то, что в нее не входит число пар оснований всего гомопурин-гомопиримидинового участка, испытывающего В—Н-переход. Это число является неизвестным, так как регулярная последовательность $(GA)_{16}$ граничит с гомопурин-гомопиримидиновыми участками другого типа (схема).

Если предположить, что $r=1$, т. е. каждая пара оснований участка является потенциальным местом протонирования, то из формулы (5) получаем, что $\kappa=4$. Эта ситуация представляется маловероятной, так как отсюда следует, что Н-форма является более сильно закрученной левой формой, чем Z-форма и даже гипотетическая левая «В-форма». Далее естественно предположить, что $r=2$. Это дает реалистическую величину $\kappa=2$ и указывает на то, что протонирование происходит в некоторой регулярно чередующейся последовательности. Таким образом, приходим к заключению, что в наших экспериментах участок превращения в Н-форму ограничен регулярной $(GA)_{16}$ -последовательностью. Этот вывод согласуется с результатами *S1*-картирования, приведенными на рис. 4.

Рассмотрим теперь второй важный факт, а именно полученное экспериментально значение скачка в подвижности, сопровождающего В—Н-переход. Из рис. 1 следует, что этот скачок имеет одну и ту же величину при всех значениях pH и соответствует релаксации напряжения сверхспирализации на величину 3,5 сверхвитка. Принимая во внимание, что В—Н-переход имеет место в участке размером 32 н. п., приходим к заключению, что в Н-форме две комплементарные нити не перекручены. Это, очевидно, находится в противоречии с ранее сделанным предположением, что $\kappa=2$.

Выход, предложенный нами ранее [50], состоит в предположении, что гомопиримидиновая цепь образует шпильку, стабилизированную однократно протонированными С·С⁺-парами. Эти пары образуют стопку, а тимины выпетливаются. Модельные эксперименты показывают, что такого рода структура существует при кислых рН [51—53]. В то же время при нейтральных рН более выгодно неупорядоченное состояние поли(ТС). Наши данные, однако, показывают, что Н-форма существует и при нейтральных рН. Значит, гомопиримидиновая шпилька

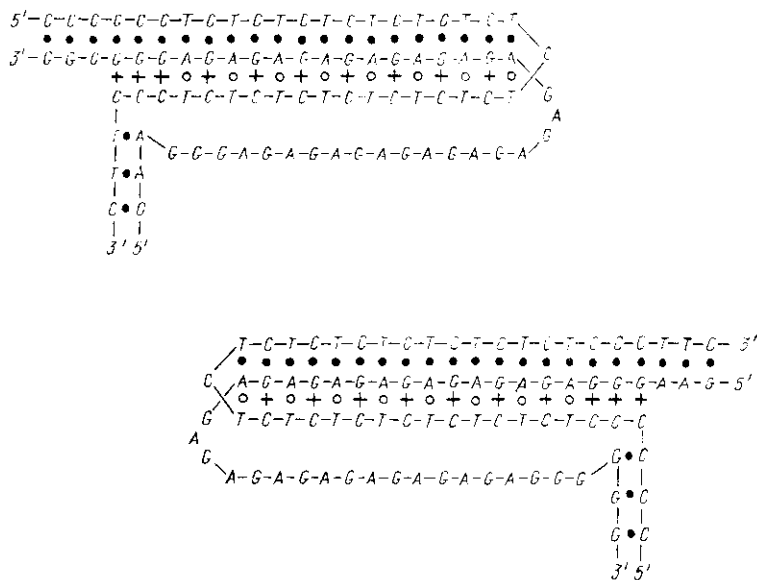


Рис. 5. Предложенная модель Н-формы ДНК.
Fig. 5. The suggested model of the DNA H-form.

ка должна как-то стабилизироваться гомопуриновой цепью. Это обстоятельство никак не отражено в предложенной в [50] модели.

Поэтому мы предлагаем новую модель Н-формы, в которой гомопиримидиновая шпилька взаимодействует с гомопуриновой цепью, образуя трехнитевой комплекс, как это показано на рис. 5. Существование при слабо кислых рН комплекса из двух антипараллельных цепей поли(СТ) и одной цепи поли(АГ) было продемонстрировано в работе [10]. Как предполагают авторы [10], в таком комплексе одна цепь поли(СТ) образует нормальные Уотсон—Криковские пары с поли(АГ), а вторая цепь поли(СТ) располагается в большом желобе двойной спирали, образуя хугстеновские пары с пуринами, причем все цитозины этой второй цепи протонированы. Подчеркнем, что наша модель предполагает существование двух «изомерных» форм, изображенных на рис. 5.

Как и в ранее предложенной структуре Н-формы [50], в структуре на рис. 5 гомопиримидиновая цепь образует шпильку, причем на каждую пару цитозинов приходится один протон. Так же как и ранее, структура топологически эквивалентна раскрытому участку. Таким образом, выполняются соотношения $\kappa=1$, $r=4$.

Вместе с тем ряд особенностей структуры на рис. 5 делает ее весьма вероятным кандидатом на роль Н-формы. Прежде всего в этой структуре только четвертая часть нуклеотидов в гомопурино-гомопиримидиновой области не участвует в межнуклеотидном спаривании и в стэкинге. Именно такая ситуация имеет место в модельных экспериментах [10], причем переход в тройную спираль из двойной в линейных цепях становится выгодным при $\text{pH} < 6$. В условиях сверхспирального напряжения такой переход вполне может стать выгодным и при нейтральных рН. Также существенно, что образование структуры на

рис. 5 сопряжено с возникновением всего двух дополнительных торцов спирали.

Далее, наряду с полученными нами экспериментальными данными, предложенная модель Н-формы объясняет также целый ряд фактов, отмечавшийся другими авторами. Прежде всего это резкая асимметрия расщепления нуклеазой *S1* гомопиримидиновой и гомопуриновой цепей [27, 54—56]. Из нашей модели с очевидностью следует, что гомопиримидиновая цепь должна расщепляться только в центре, тогда как гомопуриновая цепь гораздо более доступна для атаки однонитевой нуклеазы. Если две «изомерные» формы энергетически эквивалентны, то должно наблюдаться бимодальное распределение, что имело место в работе [27]. Отметим, что для объяснения асимметрии расщепления нуклеазой гомопурин-гомопиримидиновых областей в работе [54] уже выдвигалось предположение об образовании тройной спирали. Если две «изомерные» формы не эквивалентны, может реализоваться только одна из них и, как следствие этого, гидролиз только одной половины гомопуриновой цепи, что также наблюдалось некоторыми авторами [55]. Наконец наша модель объясняет обнаруженный в [57] факт защиты в Н-форме атома N7 гуанина от алкилирования диметилсульфатом.

Мы благодарим А. В. Вологодского за ценные критические замечания; В. И. Иванова — за советы и Ю. С. Лазуркина — за содействие в работе.

A PH-DEPENDENT STRUCTURAL TRANSITION IN THE HOMOPURINE-HOMOPYRIMIDINE TRACT IN SUPERHELICAL DNA

V. I. Lyamichev, S. M. Mirkin, M. D. Frank-Kamenetskii

Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

S u m m a r y

The 509-bp-long fragment of sea urchin *P. miliaris* histone gene spacer region was inserted into plasmid pUC19. The fragment contains the 60-bp-long homopurine-homopyrimidine tract that is known to be hypersensitive to the *S1* endonuclease. Two-dimensional gel electrophoresis has permitted revealing a sharp structural transition in the insert with an increase in DNA superhelicity. As in the cases of cruciform and Z-form formation, the observed transition partially relaxes the superhelical stress. In contrast with the other two well documented transitions, the observed transition strongly depends on pH. At pH 7.0 and above the transition occurs at negative superhelicities which exceed the physiological range ($-\sigma > 0.08$) by the absolute value. For pH 6.0 the transition occurs at $-\sigma = 0.055$, whereas for pH 4.3 it takes place at $-\sigma = 0.001$. A comprehensive analysis of the data obtained has made it possible to define the nature of the observed transition. It is concluded that under the action of superhelical stress or/and at the low pH values the homopurine-homopyrimidine tracts form a novel spatial structure of DNA called the H-form.

1. *Hsieh T.-S., Wang J. C.* Thermodynamic properties of superhelical DNAs // *Biochemistry*.— 1975.—14, N 3.— P. 527—535.
2. *Fluctuations* in superhelical DNA / A. V. Vologodskii, A. V. Lukashin, V. V. Anshelevich, M. D. Frank-Kamenetskii // *Nucl. Acids Res.*— 1979.—6, N 3.— P. 967—982.
3. *Lilley D. M. J.* The inverted repeat as a recognizable structural feature in supercoiled DNA molecules // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1980.—77, N 11.— P. 6468—6472.
4. *Panayotatos N., Wells R. D.* Cruciform structures in supercoiled DNA // *Nature*.— 1981.—289, N 5797.— P. 466—470.
5. *Vologodskii A. V., Frank-Kamenetskii M. D.* Theoretical study of cruciform states in superhelical DNAs // *FEBS Letters*.— 1982.—143, N 2.— P. 257—260.
6. *Lyamichev V. I., Panyutin I. G., Frank-Kamenetskii M. D.* Evidence of cruciform structures in superhelical DNA provided by two-dimensional gel electrophoresis // *Ibid.*— 1983.—153, N 2.— P. 298—302.
7. *Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution / A. H.-J. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak et al.* // *Nature*.— 1979.—282, N 5740.— P. 680—686.

8. 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.
9. Johnson D., Morgan A. R. Unique structures formed by pyrimidine-purine DNAs which may be four-stranded // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1978.—75, N 4.—P. 1637—1641.
10. Lee J. S., Johnson D. A., Morgan A. R. Complexes formed by (pyrimidine)_n·(purine)_n DNAs on lowering the pH are three-stranded // Nucl. Acids Res.—1979.—6, N 9.—P. 3073—3091.
11. Poly(pyrimidine)·poly(purine) synthetic DNAs containing 5-methylcytosine form stable triplexes at neutral pH / J. S. Lee, M. L. Woodsworth, L. J. P. Latimer, A. R. Morgan // Ibid.—1984.—12, N 16.—P. 6603—6614.
12. Hentschel C. C. Homocopolymer sequences in the spacer of a sea urchin histone gene repeat are sensitive to *S1* nuclease // Nature.—1982.—295, N 5851.—P. 714—716.
13. Larsen A., Weintraub H. An altered DNA conformation detected by *S1* nuclease occurs at specific regions in active chick globin chromatin // Cell.—1982.—29, N 3.—P. 609—622.
14. Goding C. R., Russell W. C. *S1* sensitive sites in adenovirus DNA // Nucl. Acids Res.—1983.—11, N 1.—P. 21—36.
15. *Escherichia coli* single-strand binding protein stabilizes specific denatured sites in superhelical DNA / G. C. Glikin, G. Gargiulo, L. Rena-Descalzi, A. Worcel // Nature.—1983.—303, N 5920.—P. 770—774.
16. Mace H. A. F., Pelham H. R. B., Travers A. A. Association of an *S1* nuclease-sensitive structure with short direct repeats 5' of *Drosophila* heat shock genes // Ibid.—304, N 5926.—P. 555—557.
17. Shen C. K.-J. Superhelicity induces hypersensitivity of a human polypyrimidine-poly-purine DNA sequence in the human $\alpha 2$ - $\alpha 1$ globin intergenic region to *S1* nuclease digestion-high resolution mapping of the clustered cleavage sites // Nucl. Acids Res.—1983.—11, N 22.—P. 7899—7910.
18. Nickol J. M., Felsenfeld G. DNA conformation at the 5' end of the chicken adult β -globin gene // Cell.—1983.—35, N 2, pt. 1.—P. 467—477.
19. Conformation of promoter DNA: fine mapping of *S1*-hypersensitive sites / E. Schon, T. Evans, J. Welsh, A. Efstratiadis // Ibid.—N 3, pt. 2.—P. 837—848.
20. A chicken repetitive DNA sequence that is highly sensitive to single-strand specific endonucleases / K. Dibvig, C. D. Clark, G. Aliperti, M. J. Schlesinger // Nucl. Acids Res.—1983.—11, N 23.—P. 8495—8508.
21. Weintraub H. A dominant role for DNA secondary structure in forming hypersensitive structures in chromatin // Cell.—1983.—32, N 4.—P. 1191—1203.
22. Endonuclease *S1*-sensitive site in chicken pro- $\alpha 2(1)$ collagen 5' flanking gene region / M. H. Finer, E. J. B. Fodor, H. Boedlker, P. Doty // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1984.—81, N 6.—P. 1659—1663.
23. McKeon C., Schmidt A., de Crombrughe B. A sequence conserved in both the chicken and mouse $\alpha 2(1)$ collagen promoter contains sites sensitive to *S1* nuclease // J. Biol. Chem.—1984.—259, N 10.—P. 6636—6640.
24. Ruiz-Carrillo A. The histone H5 gene is flanked by hypersensitive structures // Nucl. Acids Res.—1984.—12, N 16.—P. 6473—6492.
25. Cantor C. R., Efstratiadis A. Possible structures of homopurine-homopyrimidine *S1*-hypersensitive sites // Ibid.—N 21.—P. 8059—8071.
26. *S1*-hypersensitive sites in eucaryotic promoter regions / T. Evans, E. Schon, G. Gora-Maslak et al. // Ibid.—P. 8043—8058.
27. Htun H., Lund E., Dahlberg J. E. Human U1 genes contain an unusually sensitive nuclease *S1* cleavage sites within the conserved 3' flanking region // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1984.—81, N 24.—P. 7288—7292.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. Courcy A. J., Wang J. C. Cruciform formation in a negatively supercoiled DNA may be kinetically forbidden under physiological conditions // Cell.—1983.—33, N 3.—P. 817—829.
32. Panyutin J., Klishko V., Lyamichev V. Kinetics of cruciform formation and stability of cruciform structure in superhelical DNA // J. Biomol. Struct. Dyn.—1984.—1, N 6.—P. 1311—1324.
33. Integration of eucaryotic genes for 5S RNA and histone proteins into phage lambda receptor / S. G. Clarkson, H. O. Smith, W. Schaffner et al. // Nucl. Acids Res.—1976.—3, N 10.—P. 2617—2632.
34. 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.
35. Cohen S. N., Chang A. C. Y., Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1972.—69, N 8.—P. 2110—2117.

36. Holmes D. S., Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids // Anal. Biochem.—1981.—114, N 2.— P. 193—197.
37. Lyamichev V., Panyutin I., Mirkin S. M. The absence of cruciform structures from pA03 plasmid DNA *in vivo* // J. Biomol. Struct. Dyn.—1984.—2, N 2.— P. 291—301.
38. Природа фермента, релаксирующего суперспиральную ДНК и выделяемого во фракции гистона H1 / И. М. Ундрицов, В. И. Нактинис, А. М. Колчинский, А. Д. Мирзабеков // Докл. АН СССР.—1977.—234, № 6.— С. 1474—1477.
39. Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40 / J. E. Germond, B. Hirt, P. Oudet et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1975.—72, N 5.— P. 1843—1847.
40. Shure M., Pulleyblank D. E., Vinograd J. The problems of eucaryotic and procaryotic DNA packaging and *in vivo* conformation posed by superhelix density heterogeneity // Nucl. Acids Res.—1977.—4, N 5.— P. 1183—1205.
41. Maxam A. M., Gilbert W. A new method for sequencing DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.—74, N 2.— P. 560—564.
42. Functional organization of the histone genes in the sea urchin *Psammechinus*: a progress report / M. Birnstiel, R. Portmann, M. Busslinger et al. // Proc. Alfred Benzon Symp.—1979.—13.— P. 117—132.
43. Haniford D. B., Pulleyblank D. E. The *in vivo* occurrence of Z DNA // J. Biomol. Struct. Dyn.—1983.—1, N 3.— P. 593—609.
44. Lee F. S., Bauer W. R. Temperature dependence of the gel electrophoretic mobility of superhelical DNA // Nucl. Acids Res.—1985.—13, N 5.— P. 1665—1682.
45. Gellert M., O'Dea M. H., Mizuuchi K. Slow cruciform transition in palindromic DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1983.—80, N 18.— P. 5545—5549.
46. Sinden R. R., Pettijohn D. E. Cruciform transitions in DNA // J. Biol. Chem.—1984.—259, N 10.— P. 6593—6600.
47. Horowitz D. S., Wang J. C. Torsional rigidity of DNA and length dependence of the free energy of DNA supercoiling // J. Mol. Biol.—1984.—173, N 1.— P. 75—91.
48. Frank-Kamenetskii M. D., Vologodskii A. V. Thermodynamics of the B-Z transition in superhelical DNA // Nature.—1984.—307, N 5950.— P. 481—482.
49. Chen F.-M. Base protonation facilitates B-Z interconversions of poly(dG-dC)·poly(dG-dC) // Biochemistry.—1984.—23, N 25.— P. 6159—6165.
50. Lyamichev V. I., Mirkin S. M., Frank-Kamenetskii M. D. A pH-dependent structural transition in the homopurine-homopyrimidine tract in superhelical DNA // J. Biomol. Struct. Dyn.—1985.—3, N 2.— P. 327—338.
51. Circular dichroism spectra show that repeating dinucleotide DNAs may form helices in which every other base is looped out / D. M. Gray, M. Vaughan, R. L. Ratliff, F. N. Hayes // Nucl. Acids Res.—1980.—8, N 16.— P. 3695—3707.
52. Gray D. M., Cui T., Ratliff R. L. Circular dichroism measurements show that C·C⁺ base pairs can coexist with A·T base pairs between antiparallel strands of an oligodeoxynucleotide double-helix // Ibid.—1984.—12, N 19.— P. 7565—7580.
53. Photochemical demonstration of stacked C·C⁺ base pairs in a novel DNA secondary structure / D. M. Brown, D. M. Gray, M. H. Patrick, R. L. Ratliff // Biochemistry.—1985.—24, N 7.— P. 1676—1683.
54. An unusually long poly(purine)·poly(pyrimidine) sequence is located upstream from the human thyroglobulin gene / D. Christophe, B. Cabrer, A. Bacolla et al. // Nucl. Acids Res.—1985.—13, N 14.— P. 5127—5144.
55. Margot J. B., Hardison R. C. DNase I and nuclease S1 sensitivity of the rabbit β 1 globin gene in nuclei and in supercoiled plasmids // J. Mol. Biol.—1985.—184, N 2.— P. 195—210.
56. Wang J. N. C., Hogan M. An equilibrium between distorted and undistorted DNA in adult chicken β^A -globin gene // J. Biol. Chem.—1985.—260, N 13.— P. 8194—8202.
57. Pulleyblank D. E., Haniford D. B., Morgan A. R. A structural basis for S1 nuclease sensitivity of a double stranded deoxy-polypyrimidine: deoxy-polypurine DNA // Book of abstracts of fourth conversation in biomolecular stereodynamics / Ed. R. H. Sarma.—Albany: Sunya, 1985.— P. 235.

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва

Получено 4.10.85

УДК 577.323.4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ФАКТОРА КООПЕРАТИВНОСТИ ПРИ ПЛАВЛЕНИИ ДНК ОТ ИОННОЙ СИЛЫ *

С. А. Козьякин, С. М. Миркин, Б. Р. Амирикян

Введение. В работе [1] высказано предположение, что уменьшение фактора кооперативности σ_0 ($\sigma_0 = \exp(-F_s/RT)$, где F_s — свободная энергия инициации расплавленного участка в спиральной области) при

* Представлена членом редколлегии д. ф.-м. н. В. И. Ивановым.