



УДК 547.963.32:547.261

МОДИФИКАЦИЯ ДНК ДИБРОМЭТИЛАЦЕТАТОМ

I. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СО СВОБОДНЫМИ ОСНОВАНИЯМИ И С ОСНОВАНИЯМИ, ДОСТУПНЫМИ ДЛЯ РЕАКЦИИ В СОСТАВЕ МОЛЕКУЛ ДНК

*Личина М. В., Шугалий А. В., Гвоздев Р. И., Тодоров И. Н.**Отделение Института химической физики Академии наук СССР,
Черноголовка, Московская обл.*

Подбор солевого состава (0,14 М натрий-ацетатный буфер) и pH среды (4,9), млярного соотношения дибромэтилацетат/ДНК (~50), условий гидролиза ДНК эритроцитов цыпленка для последующей хроматографии оснований на бумаге осуществлен таким образом, чтобы проводить модификацию аденина и цитозина в денатурированных участках ДНК при фиксированных температурах в интервале перехода спираль — клубок. Остатки цитозина во всех случаях модифицируются быстрее остатков аденина. При этом температурные зависимости констант скорости модификации аденина и цитозина в составе денатурированной и частично денатурированной ДНК различны, что может отражать различную сгруппированность гетероциклических оснований в расплавленных участках. Энергии активации модификации цитозина и аденина в составе денатурированной ДНК составляют 23 и 31 ккал/моль.

Специфическая модификация азотистых оснований находит в последнее время широкое применение в химии нуклеиновых кислот [1]. Определенный интерес представляют этеновые производные аденина и цитозина, отличающиеся от исходных форм не только флуоресцентными свойствами, но и хроматографической подвижностью вследствие замыкания NH_2 -группы и ближайшего атома N^1 цитозина или атома N^3 аденина. Однако реакции взаимодействия аденина и цитозина с дибромэтилацетатом [2] или хлорацетальдегидом [3] для изучения ДНК до сих пор не использованы, за исключением работы [4], в которой установлена существенная роль вторичной структуры ДНК при взаимодействии хлорацетальдегида с остатком аденина. Одной из возможных причин этого может быть неопределенность в интерпретации данных флуоресценции этеноаденина и этеноцитозина в составе ДНК из-за возникающих эффектов гашения [5, 6]. Между тем представляется весьма перспективным использовать этеноаденин и этеноцитозин для изучения ДНК в метастабильных состояниях, вызванных воздействием различных агентов либо возникающих в процессе ее функционирования, а также для картирования участков с нарушенной вторичной структурой, оценок характера сгруппированности в них соседствующих остатков аденина или цитозина и т. д.

Целью настоящей работы являлась разработка условий модификации ДНК в заданном частично денатурированном состоянии и количественное определение остатков этеноаденина и этеноцитозина в составе ДНК.

Спектральные характеристики ϵ_A и ϵ_C . Рассмотрены УФ-спектры этеноаденина и этеноцитозина в 0,1 н. HCl (рис. 1) и 0,1 н. KOH (на ри-

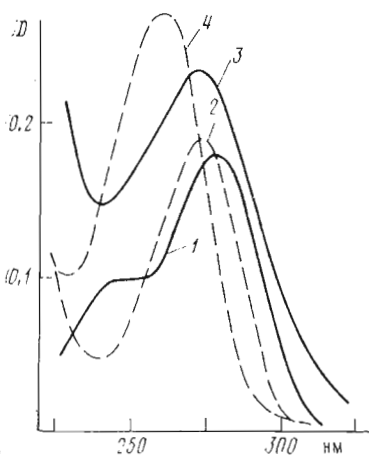


Рис. 1

Рис. 1. Спектры поглощения в 0,1 н. HCl этеновых производных цитозина (1) и аденина (3), полученных модификацией цитозина и аденина дибромэтилацетатом. Для сравнения приведены спектры цитозина (2) и аденина (4). Концентрация модифицированных и исходных оснований составляет 11 мкг/мл

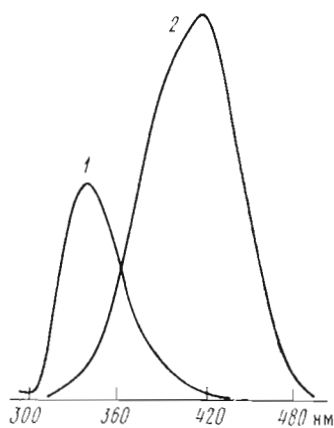


Рис. 2

Рис. 2. Спектры флуоресценции этеноцитозина (1) и этеноаденина (2), измеренные в растворе, содержащем 0,1 М NaCl, 1,2 мМ NaH_2PO_4 , $3 \cdot 10^{-2}$ мМ EDTA, pH 7,15, при концентрациях этеноцитозина 10 и этеноаденина ≈ 1 мкг/мл

сунке не приведены). Показано, что для этеноаденина наблюдается хорошее согласие с литературными данными [3]. В то же время в случае этеноцитозина в 0,1 н. HCl были обнаружены определенные несоответствия. Согласно работе [3], максимумы молярной экстинкции этеноцитозина, полученного модификацией цитозина с помощью хлорацетальдегида, находятся при 213 и 290 нм и существует лишь один минимум при 225 нм, в то время как спектр этеноцитозина на рис. 1 имеет плечо (или слабо выраженный максимум) при ~ 245 нм, положение и интенсивность которого не изменяются при рехроматографии модифицированного основания.

Спектры флуоресценции этеноаденина и этеноцитозина приведены на рис. 2. Их сравнение свидетельствует о том, что в составе ДНК, где присутствует смесь остатков аденина и цитозина, методом флуоресценции можно надежно измерить количество модифицированного аденина (при $\lambda \sim 410$ нм) вплоть до концентрации $\approx 10^{-6}$ М. Квантовый выход остатка этеноцитозина, также модифицирующегося в наших условиях, существенно ниже (рис. 2, 1), что делает затруднительной его флуоресцентную регистрацию. Поэтому мы использовали в дальнейшей работе для регистрации остатков этеноцитозина (во многих случаях и для остатков этеноаденина) метод хроматографии на бумаге, требующий значительных количеств исходного материала, однако позволяющий препаративно отделять модифицированные основания после соответствующего гидролиза ДНК.

Модификация аденина и цитозина в составе денатурированной ДНК. Денатурированную ДНК, полученную нагреванием до 95° исходной нативной ДНК в 0,14 М натрий-ацетатном буфере, pH 4,9, охлаждали до соответствующих значений температур и после добавления дибромэтилацетата отбирали пробы. Определение содержания этеноцитозина и этеноаденина проводили после кислотного гидролиза модифицированной ДНК.

В табл. 1 представлены результаты сравнительного исследования устойчивости этеноцитозина и этеноаденина к гидролизу в различных условиях. Анализ показывает, что этеноцитозин устойчив практически во всех случаях, а для получения этеноаденина пригоден лишь гидролиз ДНК с помощью HCl при 37° в течение 24 ч. В дальнейшем мы использовали гид-

Таблица 1

Устойчивость этеноаденина и этеноцитозина при гидролизе в разных условиях *

| Условия гидролиза | | | εА | εС |
|--------------------------|-------|----------|-------|-----|
| Кислота | t, °C | Время, ч | | |
| 1,6 н. HCl | 40 | 24 | 80-90 | 100 |
| HCl, pH 2 | 37 | 24 | 100 | 100 |
| HCl, pH 2,8 | 100 | 1 | 50-60 | 100 |
| 7,5 н. HClO ₄ | 100 | 50 мин | <1 | 100 |
| 98% HCOOH | 175 | 1 | <1 | 100 |

* Устойчивость выражена в процентном содержании этеновых производных гетероциклических оснований.

Таблица 2

Значения pH раствора в зависимости от времени инкубации дибромэтилацетата в буферных растворах различной молярности (по Na⁺)

| Время, ч | Ионная сила буфера *, М | | | | |
|----------|-------------------------|---------|------|-----------|------|
| | 0,016 (10) | 0,1 (5) | | 0,14 (50) | |
| | Температура, °C | | | | |
| | 75 | 75 | 60 | 50 | 70 |
| 0 | 5,08 | 6,12 | 5,97 | 5,88 | 4,92 |
| 1 | 4,5 | 5,84 | 5,83 | 5,72 | 4,83 |
| 3 | | 5,80 | 5,81 | 5,72 | 4,78 |

* В скобках приведена кратность (моль/моль) дибромэтилацетата по отношению к ДНК. Расчет кратности проводили для концентрации ДНК 200 мкг/мл, обычно используемой в реакции модификации.

ролиз модифицированной ДНК с помощью 7,5 н. HClO₄ при 100° в течение 50 мин, рассчитывая количество этеноаденина как 1 - А (где А - количество непрореагировавшего аденина за время t) и непосредственно определяя этеноцитозин. Этот способ гидролиза дает наиболее воспроизводимые результаты.

На рис. 3 приведены зависимости содержания этеноцитозина и этеноаденина в ДНК от времени модификации при 78°. Реакция модификации в наших условиях имеет псевдопервый порядок. Константы скорости модификации остатков цитозина и аденина (k_c и k_a), вычисленные обычным способом для разных температур, представлены на рис. 4 (кривые 1, 5). Превышение k_c в денатурированной ДНК по сравнению с k_a сохраняется во всех случаях постоянным и составляет 2,8-3,0 раза. Представляет интерес сравнить значения k_a в составе денатурированной ДНК и в poly(A). Смысл такого сравнения состоит в том, чтобы выяснить, влияет ли на k_a такой параметр, как взаимное расположение реагирующих центров. Значения констант скорости для poly(A), предварительно прогретой до 95°, также приведены на рис. 4 (кривая 3). Из сравнения следует, что в составе poly(A), т. е. в условиях максимальной сгруппированности остатков аденина, k_a регулярно превышает в 1,4-1,6 раза соответствующие значения для скорости модификации аденина в составе денатурированной ДНК.

Энергии активации, вычисленные из температурных зависимостей констант скорости модификации, составляют 23 и 31 ккал/моль для модификации цитозина и аденина в составе денатурированной ДНК и

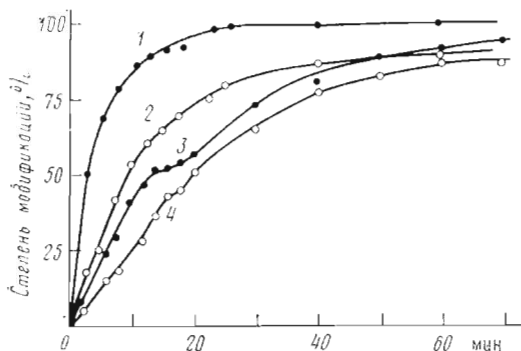


Рис. 3

Рис. 3. Кинетика модификации остатков цитозина (1, 3) и аденина (2, 4) в составе денатурированной (1, 2) и частично денатурированной на 50% (3, 4) ДНК при 78°. За 100% принято исходное содержание аденозина в цитозине в ДНК

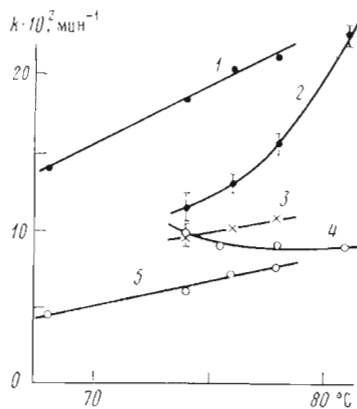


Рис. 4

Рис. 4. Температурные зависимости констант скорости модификации остатков цитозина (1, 2) и аденина (3-5) в составе денатурированной (1, 5), частично денатурированной ДНК (2, 4) и в poly(A) (3)

16,5 ккал/моль для аденина в poly(A). Отметим, что определенная нами величина E_a для модификации дибромэтилацетатом (31 ккал/моль) несколько превышает величину энергии активации (22 ккал/моль) реакции образования этеноаденина при использовании хлорацетальдегида [4].

Модификация аденина и цитозина в расплетенных участках частично денатурированной ДНК. Поскольку при модификации должна поддерживаться заданная степень денатурации ДНК, такие параметры, как pH, ионная сила раствора и температура модификации, однозначно связаны друг с другом, т. е. выбор pH и молярности буферного раствора определяет температуру реакции. При выборе молярности буфера исходили из того, что дибромэтилацетат в процессе инкубации при высоких значениях температуры гидролизует, в результате чего pH раствора сдвигается в кислую область. Поэтому было целесообразно максимально увеличить емкость буфера. Но с другой стороны, значительный подъем температуры модификации (являющейся в то же время температурой плавления ДНК в данных ионных условиях) был также нежелателен из-за возрастающей скорости гидролиза дибромэтилацетата. К сожалению, использование в качестве добавок органических растворителей, например диметилформамида, снижающих температуру плавления ДНК, не привело к желаемым результатам из-за трудности его получения в оптически чистом виде.

Выбор pH был продиктован тем обстоятельством, что, как следует из рис. 5, существует довольно узкая область pH, в которой скорости модификации оснований достаточно высоки, поэтому мы ограничились pH 4,9. Однако при этом значении pH, оптимальном для выбора скорости модификации, наблюдается снижение температуры плавления ДНК (рис. 6). Тем не менее и в этой области pH состояние ДНК в интервале температурного перехода спираль — клубок является термодинамически равновесным, и, выбрав определенную температуру, мы можем получить любую заданную степень денатурации ДНК. При этом неопределенность в оценке степени денатурации будет полностью зависеть от смещения pH в процессе модификации, что, естественно, накладывает более жесткие ограничения на возможность изменения величины pH во время реакции, чем в области нейтральных значений pH.

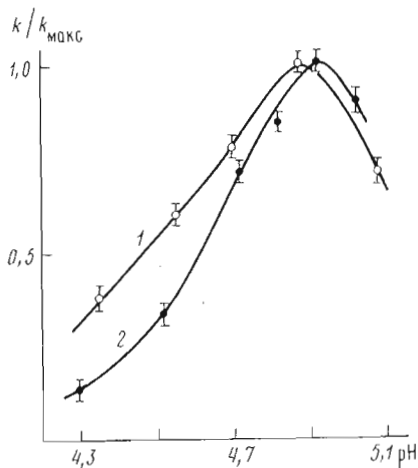


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость относительных значений констант скорости модификации цитозина при 60° (1) и аденина при 76° (2) от pH буфера

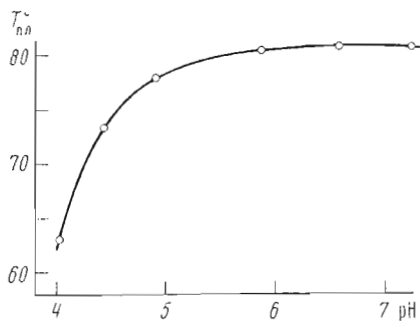


Рис. 6

Рис. 6. Зависимость температуры плавления ДНК $T_{пл}$ от pH в 0,14 М натрий-ацетатном буфере

В табл. 2 приведены значения pH, зарегистрированные в разные моменты времени инкубации различных количеств дибромэтилацетата в буферных растворах различной молярности. К сожалению, 5–10-кратного избытка реагента по отношению к ДНК было недостаточно для завершения реакции при температурах 70–80°, так как по истечении 4 ч оставалось непрореагировавшим 30–50% аденина (контроль по аденину) и увеличение времени реакции не снижало этого количества. Поэтому мы были вынуждены увеличить избыток реагента до 50-кратного, но при этом пришлось увеличить молярность ацетатного буфера до 0,14. Для этих условий снижение pH за 1–1,5 ч не превышает 0,1 (табл. 2), что может привести к снижению температуры плавления ДНК не более чем на 0,5°. Для животной ДНК точность поддержания степени денатурации в середине интервала плавления $\approx 5\%$ удовлетворительна.

Зависимости количества образования этеноцитозина и этеноаденина от времени модификации для температуры 78°, соответствующей 50% денатурации, приведены на рис. 3 (кривые 3, 4). Обе кривые имеют отчетливо выраженные три области (для этеноаденина в меньшей мере): начальную (в течение первых 12–15 мин модификации), область перегиба и пологий участок, начинающийся после 20 мин модификации. Здесь мы остановимся только на начальном участке кривой, два других подробно проанализированы в последующей работе [7].

Как и для модификации остатков цитозина и аденина в составе денатурированной ДНК (рис. 3, 1, 2), в условиях частичной (50%) денатурации, т. е. когда для модификации доступно около половины оснований, кривая образования этеноцитозина опережает кривую для этеноаденина. Однако вычисленные из начальных участков кривых значения k_c и k_a различаются не в 3 раза, как для денатурированной ДНК, а в 1,7 раза. Если модификацию проводить при других температурах в интервале 74–81°, соответствующих степеням денатурации ДНК ≈ 20 –70%, общий характер модификации цитозина и аденина в составе расплетенных участков не изменится, однако соотношение констант скорости модификации существенно меняется. Это отражено на рис. 4 (кривые 2, 4), из которого следует, что при невысоких степенях денатурации ДНК модификация остат-

ков аденина в расплетенных участках проходит с большей скоростью, чем в денатурированной ДНК при тех же температурах. Для цитозина картина обратная: скорость модификации остатков цитозина в составе расплетенных участков при всех степенях денатурации меньше, чем для денатурированной ДНК, и лишь при 75% денатурации (81°) значение k_c возрастает настолько, что приближается к температурной зависимости константы скорости модификации денатурированной ДНК.

Такой характер изменения k_A и k_C при различных степенях денатурации может свидетельствовать о том, что при ~20% денатурации (74°) проявляется высокая сгруппированность остатков аденина в легкоплавких областях, по крайней мере k_A модификации аденина в составе ДНК имеет то же значение, что и для $\text{poly}(A)$. С повышением температуры происходит увеличение процентного содержания расплавленных областей и вследствие постоянного «разбавления» остатков аденина все большим количеством включающихся в эти области остатков цитозина, k_A снижается, приближаясь в пределе к своему значению для модификации аденина в составе денатурированной ДНК. Вообще говоря, влияние сгруппированности остатков аденина на скорость модификации следует уже из того факта, что энергия активации модификации аденина в составе $\text{poly}(A)$ почти вдвое меньше соответствующей величины для денатурированной ДНК. Не исключено, что детальное исследование изменения k_A и k_C в различных модельных соединениях позволит использовать этот параметр для количественных оценок сгруппированности соответствующих оснований в различных участках ДНК.

Представляет интерес прямое определение состава плавящихся областей на разных стадиях денатурации ДНК, поскольку существующие оценки (по крайней мере для животной ДНК) получены в основном расчетным путем из анализа дисперсии денатурационных кривых [8]. Кроме того, использование участка кривых модификации после 20 мин для количественной оценки содержания дефектных (по вторичной структуре) участков ДНК на основе кинетики деспирализации может дать определенные преимущества реакции дибромэтилацетата с ДНК перед кинетическим формальдегидным методом [9] при тех температурах, когда применение последнего встречает трудности.

Экспериментальная часть

Использовали ДНК эритроцитов цыпленка и $\text{poly}(A)$ (Reanal, Венгрия), хроматографическую бумагу FN1 (ГДР). Дибромэтилацетат синтезировали по методу [10].

Модификацию ДНК проводили в 0,14 М натрий-ацетатном буфере, рН 4,9, в присутствии 50-кратного избытка дибромэтилацетата при температурах 70–80°. Раствор ДНК с концентрацией ≈ 200 мкг/мл нагревали в термостате до требуемых температур, затем добавляли дибромэтилацетат, предварительно прогретый до той же температуры. При расчете скоростей модификации за время, равное нулю, принимали момент смешивания ДНК и дибромэтилацетата, реакцию проводили при непрерывном встряхивании смеси.

Пробы по ~1,5 мл, последовательно отобранные из реакционной смеси ДНК с дибромэтилацетатом, охлаждали в ледяной бане и анализировали 24 ч против деионизованной воды с многократной сменой воды. После лиофилизации пробы гидролизуют 7,5 н. HClO_4 при 100° 50 мин.

Хроматография. Весь объем гидролизата, нейтрализованного до 7–8, наносили на бумагу FN1 и хроматографировали в системе: *n*-бутанол — вода — аммиак, 60 : 10 : 0,1 [11].

Положение соответствующих пятен регистрировали с помощью ультрамикскопа, материал пятен экстрагировали 0,1 н. HCl при 37° в течение 12 ч. В ряде случаев для быстрого качественного контроля реакции моди-

фикации применяли хроматографию на пластинках Silufol UV-254 в аналогичной системе, требующую нескольких мкг материала.

Модификацию, гидролиз и хроматографию poly(A) проводили в тех же условиях.

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре J13 (Jobin Ivon, Франция). Оптическая ширина щелей монохроматора возбуждения 10 нм, монохроматора люминесценции — 10 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Leonard N. J., Folman G. L. (1975) *Ann. N. J. Acad. Sci.*, **255**, 43–58.
2. Рудакова И. П., Юркевич А. М., Яковлев В. А. (1974) *Докл. АН СССР*, **218**, 588–590.
3. Kochetkov N. K., Shibaev V. N., Kost A. A. (1971) *Tetrahedron Lett.*, **22**, 1993–1996.
4. Kimura K., Nakanishi M., Yamamoto T., Tsuboi M. (1977) *J. Biochem.*, **81**, 1699–1703.
5. Tolman H. L., Barrio J. R., Leonard N. J. (1974) *Biochemistry*, **13**, 4869–4878.
6. Steiner R. F., Kinnier W., Lunasin A., Delac J. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **294**, 24–37.
7. Личина М. В., Шугалий А. В., Тодоров И. Н., Черный Д. И. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 671–679.
8. Felsenfeld G., Sandeen G. (1962) *J. Mol. Biol.*, **5**, 587–600.
9. Трифионов Э. Н., Шафрановская Н. Н., Франк-Камеицкий М. Д., Лазуркин Ю. С. (1968) *Молекулярн. биология*, **2**, 887–895.
10. McElvain S. M., Fajado-Pinzon B. (1945) *J. Amer. Chem. Soc.*, **67**, 850–854.
11. Ванюшин Б. Ф. (1964) *Современные методы в биохимии*, т. 1, М.

Поступила в редакцию
9.X.1978

DNA MODIFICATION BY DIBROMOETHYLACETATE. I. THE INTERACTION WITH FREE BASES AND THOSE ACCESSIBLE IN DNA

LICHINA M. V., SHUGALIY A. V., GVOZDEV R. I., TODOROV I. N.

*Department of the Institute of Chemical Physics,
Academy of Sciences of the USSR, Chernogolovka*

The reaction conditions (0.14 M sodium acetate buffer, pH 4.9, dibromoethylacetate-DNA molar ratio of ~50), as well as those for hydrolysis of chicken erythrocyte DNA and subsequent paper chromatography were chosen so as to modify adenine and cytosine bases in denaturated regions of DNA at fixed temperature within the helix-coil transition. In all cases cytosine residues were modified more rapidly than adenine ones, whereby temperature dependences of rate constants for adenine and cytosine modification differed for denaturated and partly denaturated DNA. This result might reflect the differences in clusterization of heterocyclic bases in molten regions. The activation energy for cytosine and adenine modification within denaturated DNA was equal to 23 and 31 kcal/mole, respectively.