



УДК 577.113.6:577.323.422.425

ВЛИЯНИЕ N4-МЕТИЛЦИТОЗИНА И 5-МЕТИЛЦИТОЗИНА
НА СТАБИЛЬНОСТЬ СПИРАЛИ ДНКЮргайтис А. П., Буткус В. В.*, Климашаускас С. Й.*,
Янулайтис А. А.**Институт биохимии Академии наук ЛитССР, Вильнюс;
Научно-производственное объединение «Фермент», Вильнюс

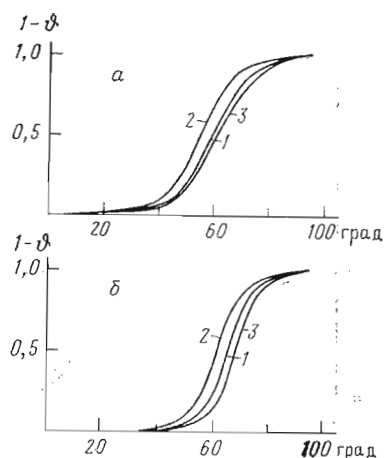
Исследование самокомплементарных дезоксирибооктануклеотидов CGCGCGCG, CGm⁵CGCGCG, CGm⁴CGCGCG, а также додекануклеотидов GGACCCGGGTCC, GGAm⁵CCCGGGTCC и GGAm⁴CCCGGGTCC позволило определить влияние N4- и C5-метилирования цитозина на стабильность спирали ДНК, а также на термодинамические параметры (ΔH , ΔS) перехода спираль — клубок. Из полученных данных следует, что замена цитозина на N4-метилцитозин дестабилизирует двухнитевую структуру и увеличивает вероятность раскрытия метилированной пары оснований; две такие замены по дестабилизирующему влиянию эквивалентны замене G-C-пары на A-T-пару оснований. Установлено, что наличие двух N4-метилцитозинов в октануклеотиде уменьшает свободную энергию образования дуплекса при 37°C на 1.24 ккал/моль. При изучении октануклеотида, содержащего 5-метилцитозин, обнаружен неизвестный ранее эффект: при увеличении концентрации октануклеотида стабилизирующее действие метильной группы исчезает. Предполагается, что обнаруженный эффект проявляется в В-Z-переходе в ДНК.

Известно, что ДНК большинства организмов подвергаются пострепликативному метилированию. Наиболее часто встречается метилирование оснований цитозина с образованием 5-метилцитозина. В ДНК эукариот метилирование в основном сосредоточено в m⁵CpG-последовательностях [1]. Биологическая роль метилирования пока недостаточно изучена, однако имеется большое число экспериментальных данных, указывающих на взаимосвязь между метилированием и такими процессами, как репарация ДНК, экспрессия генов, дифференциация и злокачественное перерождение клеток [2]. Установлено, что метилирование решающим образом влияет на структурные переходы в ДНК. Наличие m⁵C в ДНК заметно облегчает переход из В- в Z-форму, и такой переход становится возможным в физиологических условиях [3]. Не вызывает сомнения, что это должно отразиться на нуклеиново-белковом взаимодействии, а следовательно, и на регуляторных механизмах функционирования ДНК. Так как механизм действия метилированных оснований не выяснен, в настоящее время большое внимание уделяется исследованию физико-химических характеристик метилированной ДНК. Недавно в бактериальной ДНК было обнаружено другое метилированное производное цитозина — N4-метилцитозин (m⁴C) [4], и изучение его роли в клеточных процессах функционирования ДНК только начинается.

Цель настоящего исследования — изучение влияния 5-метилцитозина и N4-метилцитозина на стабильность двухспиральной ДНК, а также определение влияния этих метилированных цитозинов на термодинамические параметры образования дуплексов. Изучение термодинамических параметров образования комплементарных пар представляет интерес также в биологическом аспекте, так как реализация генетической информации, заложенной в ДНК, в большинстве случаев происходит через раскрытие двойной спирали. Работа проводилась на синтетических самокомплементарных олигонуклеотидах CGCGCGCG и GGACCCGGGTCC, а также на их

Сокращения: CGCGCGCG — (8); CGm⁵CGCGCG — (m⁵8); CGm⁴CGCGCG — (m⁴8); GGACCCGGGTCC — (12); GGAm⁵CCCGGGTCC — (m⁵12); GGAm⁴CCCGGGTCC — (m⁴12) (префикс «d» везде для простоты опущен). Если не оговорено отдельно, эти соединения следует понимать как двухнитевые дуплексы.

Рис. 1. Кривые плавления олигонуклеотидов в 1,0 М NaCl; 1 мМ EDTA, 4 мМ какодилате натрия, рН 7,2; $1 - \vartheta$ — доля олигонуклеотида в одноститовом состоянии. а: 1 — неметилированный октануклеотид (8), с 3,1 мкМ, T_m 59,4° С; 2 — октануклеотид (m^48), с 3,0 мкМ, T_m 54,2° С; 3 — октануклеотид (m^58), с 3,0 мкМ, T_m 60,9° С; б: 1 — неметилированный додекануклеотид (12), с 4,2 мкМ, T_m 65,5° С; 2 — додекануклеотид (m^412), с 4,0 мкМ, T_m 61,4° С; 3 — додекануклеотид (m^512), с 3,8 мкМ, T_m 68,3° С



метилированных производных, содержащих по одному остатку m^4C или m^5C в третьем положении октануклеотида и четвертом додекануклеотида, считая с 5'-конца. Синтетические олигонуклеотиды заданной последовательности являются хорошей моделью для изучения близких взаимодействий, которые, как известно [5], определяют структуру и стабильность ДНК.

Изучение перехода спираль — клубок в ДНК является непосредственным методом для определения влияния различных ослабленных мест на стабильность спирали ДНК [6]. На рис. 1а приведены кривые плавления октануклеотида и его метилированных производных (m^58) и (m^48). Замена двух цитозинов дуплекса на m^5C повышает температуру плавления (T_m) на 1,5° С, что согласуется с литературными данными о стабилизирующем влиянии 5-метилцитозина [7, 8]. Наличие N4-метилцитозина в олигонуклеотиде имеет противоположный эффект — приводит к понижению T_m октануклеотидного дуплекса на 5,2° С. Аналогичные результаты были получены и в случае додекануклеотидов (12), (m^512) и (m^412), когда метилированные основания находились в другом окружении (рис. 1б).

Более полную информацию о влиянии модифицированных оснований на стабильность структуры ДНК можно получить из термодинамических параметров (ΔH , ΔS) перехода спираль — клубок [9]. Для определения этих параметров применяли метод, основанный на уравнении Вант-Гоффа. Применение этого метода считается корректным, когда переход удовлетворяет условия взаимопревращения двух состояний: двухнитового и одноститового [9]. Ранее было показано, что для dGCGCGC такая трактовка правильна [10]. Этим методом термодинамические параметры можно определять как по наклону кривой плавления, так и из зависимости $1/T_m K$ от $\lg c$, где c — молярная концентрация нитей олигонуклеотида. Применяли второй вариант, так как этот случай более надежный и расчет ΔH и ΔS не требует введения поправок на остаточный одноститовый стэкинг [10]. Обычно принято рассматривать обратный переход, т. е. образование двойной спирали из одноститовых олигомеров. В нашем случае для самокомплементарных олигомеров константа равновесия перехода

$$K = \frac{\vartheta}{2(1 - \vartheta)^2 c}, \quad (1)$$

где ϑ — доля нитей в двухспиральном состоянии. Подставляя (1) при $T = T_m$, когда $\vartheta = 0,5$, в известную формулу

$$\ln K = \frac{\Delta H}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R}, \quad (2)$$

получим следующую зависимость:

$$\frac{1}{T_m} = \frac{2,3R}{\Delta H} \lg c + \frac{\Delta H}{\Delta S}. \quad (3)$$

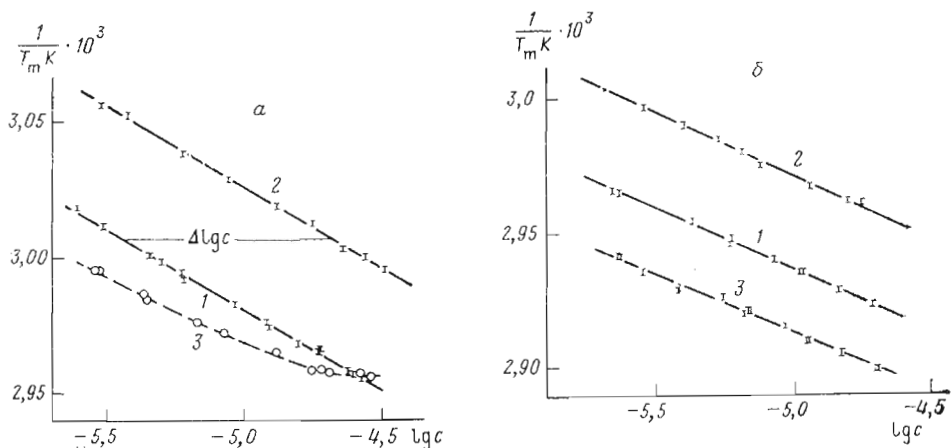


Рис. 2. Зависимость $1/T_mK$ от $\lg c$ олигонуклеотида. а: 1 – октануклеотид (m^8), 2 – октануклеотид (m^8); 3 – октануклеотид (m^8); б: 1 – додекануклеотид (m^{12}), 2 – додекануклеотид (m^{12}), 3 – додекануклеотид (m^{12})

Данные, полученные при изучении такой зависимости, сведены в табл. 1 и 2. Обработка этих данных на микро-ЭВМ привела к зависимостям, графически представленным на рис. 2а, б. Из этих зависимостей были определены термодинамические параметры (табл. 3). В таблице энтропия содержит ΔS для стэкинг-взаимодействия и нуклеации, а энтальпия – только ΔH стэкинг-взаимодействия, так как ΔH нуклеации принимается равной нулю [11]. Найденные величины ΔH и ΔS для неметилированного октануклеотида неплохо согласуются с литературными данными. Так, ΔH , определенная методом калориметрии, на пару оснований составляет $-11,9$ ккал/моль [10]. Величины ΔH , ΔS , определенные методом, аналогичным настоящей работе, равняются $-11,1$ ккал/моль и $-27,9$ кал/(моль·град) [12]. Из результатов табл. 3 следует, что замена цитозина на m^4C и m^5C в олигонуклеотиде влияет как на ΔH , так и на ΔS , но эти метилированные цитозины действуют противоположно. Поскольку $C5$ -метильная группа находится в большом желобке и экспонируется наружу спирали [13], гидрофобность этой группы, по-видимому, проявляется через ΔS . Наличие m^4C , как и m^6A (близкого в структурном отношении к m^4C), уменьшает стабильность спирали ДНК. Хотя N^4 , так же как и $C5$ -метильная группа, экспонирована в большом желобке, она в отличие от последней обладает заметной конформационной подвижностью [14], что, по-видимому, приводит к разупорядоченности гидратной оболочки вокруг m^4C . Возможно, это и объясняет, что ΔS перехода для пары оснований $m^4C \cdot G$ меньше, чем для $m^5C \cdot G$ (табл. 3).

Представляет интерес оценить влияние метильных групп на вероятность раскрытия комплементарных пар в ДНК, например, при $37^\circ C$. Для этого сначала определим вклад этих групп в свободную энергию образования двушпитевого олигонуклеотида из одношпитевого. Этот вклад можно представить как

$$\Delta \Delta G = \Delta G_1 - \Delta G_2,$$

где ΔG_1 и ΔG_2 – свободные энергии для перехода из одношпитевого состояния в двушпитевое для метилированного и неметилированного олигонуклеотидов. Воспользуемся методом, предложенным в работе [11], и применим его в нашем случае метилирования. Константы равновесия для метилированного и неметилированного олигонуклеотида при $T = T_m$:

$$K_1 = \frac{1}{c_1}; \quad K_2 = \frac{1}{c_2}.$$

Можно так подобрать c_1 и c_2 , чтобы их температуры плавления были равны. Тогда

$$K_1 c_1 = K_2 c_2,$$

Результаты плавления октануклеотидов

№ п. п.	с, мкМ	(-lgc) · 10 ²	T _m , °C	$\frac{1}{T_m K} \cdot 10^3$	№ п. п.	с, мкМ	(-lgc) · 10 ²	T _m , °C	$\frac{1}{T_m K} \cdot 10^3$
Данные для (8)									
1	26,8±0,1	457,4±0,2	65,4±0,1	295,5±0,1	10	9,23±0,04	503,5±0,2	62,3±0,1	298,2±0,1
2	26,7±0,1	457,2±0,2	65,4±0,1	295,5±0,1	11	6,00±0,03	522,2±0,2	61,3±0,1	299,1±0,1
3	25,1±0,1	460,1±0,1	65,2±0,1	295,7±0,1	12	5,93±0,03	522,7±0,2	61,0±0,1	299,4±0,1
4	23,6±0,1	462,7±0,2	65,1±0,1	295,8±0,1	13	5,01±0,03	530,1±0,2	60,6±0,1	299,8±0,1
5	18,81±0,07	472,6±0,2	64,2±0,1	296,6±0,1	14	4,55±0,02	534,2±0,2	60,5±0,1	299,9±0,1
6	18,66±0,07	472,8±0,2	64,3±0,1	296,5±0,1	15	4,53±0,02	534,4±0,2	60,5±0,1	299,9±0,1
7	15,60±0,06	480,6±0,2	63,9±0,1	296,8±0,1	16	3,11±0,01	550,9±0,2	59,4±0,1	300,8±0,1
8	12,21±0,05	491,3±0,2	63,2±0,1	297,4±0,1	17	3,11±0,01	550,9±0,2	59,4±0,1	301,0±0,1
9	12,20±0,05	491,4±0,2	63,0±0,1	297,6±0,1	18	2,48±0,01	560,5±0,2	58,3±0,1	301,8±0,1
Данные для (m ² S)									
1	32,6±0,1	448,8±0,2	60,9±0,1	299,5±0,1	6	8,86±0,04	505,3±0,2	57,2±0,1	302,8±0,1
2	27,5±0,2	456,1±0,2	60,3±0,1	300,0±0,1	7	6,00±0,03	522,2±0,2	56,2±0,1	303,8±0,1
3	23,0±0,1	463,8±0,2	60,0±0,1	300,3±0,1	8	3,79±0,02	542,1±0,2	54,7±0,1	305,2±0,1
4	17,56±0,07	475,6±0,2	59,0±0,1	301,2±0,1	9	303,3±0,01	551,9±0,2	54,2±0,1	305,6±0,1
5	13,12±0,05	488,2±0,2	58,3±0,1	301,8±0,1					
Данные для (m ² S)									
1	28,6±0,1	454,3±0,2	65,4±0,1	295,5±0,1	9	12,97±0,05	488,7±0,2	64,2±0,1	296,5±0,1
2	28,1±0,1	453,0±0,2	65,7±0,1	295,2±0,1	10	8,44±0,04	507,3±0,2	63,5±0,1	297,2±0,1
3	26,3±0,1	458,0±0,2	65,2±0,1	295,7±0,1	11	6,60±0,03	517,1±0,1	63,0±0,1	297,6±0,1
4	26,1±0,1	458,3±0,2	65,3±0,1	295,6±0,1	12	4,42±0,02	535,5±0,2	62,1±0,1	298,4±0,1
5	24,3±0,1	461,3±0,2	65,2±0,1	295,7±0,1	13	4,39±0,02	535,9±0,2	61,9±0,1	298,6±0,1
6	20,2±0,1	469,5±0,2	65,2±0,1	295,7±0,1	14	2,94±0,01	553,2±0,2	60,9±0,1	299,5±0,1
7	19,13±0,08	471,8±0,2	65,0±0,1	295,8±0,1	15	2,89±0,01	554,0±0,2	60,9±0,1	299,5±0,1
8	17,65±0,07	475,3±0,2	65,0±0,1	295,8±0,1					

Результаты плавления додекануклеотидов

№ п. л.	с. мкМ	$(-lgc) \cdot 10^2$	$T_m, ^\circ C$	$\frac{1}{T_m K} \cdot 10^3$	№ п. л.	с. мкМ	$(-lgc) \cdot 10^2$	$T_m, ^\circ C$	$\frac{1}{T_m K} \cdot 10^3$
Данные для (12)									
1	19,55±0,08	470,9±0,2	69,1±0,1	292,3±0,1	6	5,93±0,03	522,7±0,2	66,2±0,1	294,8±0,1
2	14,65±0,06	483,4±0,2	68,5±0,1	292,8±0,1	7	5,90±0,03	522,9±0,2	66,4±0,1	294,6±0,1
3	10,79±0,04	496,7±0,2	67,7±0,1	293,5±0,1	8	4,26±0,02	537,1±0,2	65,5±0,1	295,4±0,1
4	10,49±0,04	497,9±0,2	67,6±0,1	293,6±0,1	9	2,30±0,01	563,8±0,2	64,3±0,1	296,5±0,1
5	8,47±0,04	507,2±0,2	67,1±0,1	294,0±0,1	10	2,20±0,01	567,7±0,2	64,1±0,1	296,6±0,1
Данные для (10 ¹²)									
1	17,60±0,07	475,5±0,2	64,7±0,1	296,1±0,1	5	6,45±0,03	519,0±0,2	62,6±0,1	298,0±0,1
2	15,76±0,06	480,2±0,2	64,6±0,1	296,2±0,1	6	5,38±0,03	526,9±0,2	62,0±0,1	298,5±0,1
3	11,50±0,05	493,9±0,2	64,0±0,1	296,7±0,1	7	4,04±0,02	539,4±0,2	61,4±0,1	299,0±0,1
4	7,61±0,04	511,9±0,2	63,1±0,1	297,5±0,1	8	2,83±0,01	554,8±0,2	60,7±0,1	299,7±0,1
Данные для (10 ⁵¹²)									
1	20,2±0,1	469,4±0,2	72,0±0,1	289,9±0,1	9	6,63±0,03	517,9±0,2	69,4±0,1	292,0±0,1
2	20,2±0,1	469,5±0,2	72,0±0,1	289,9±0,1	10	5,54±0,03	525,7±0,2	68,7±0,1	292,6±0,1
3	14,96±0,06	482,5±0,2	71,4±0,1	290,4±0,1	11	3,81±0,02	541,9±0,2	68,3±0,1	293,0±0,1
4	11,32±0,05	494,7±0,2	70,7±0,1	290,9±0,1	12	3,79±0,02	542,1±0,2	68,4±0,1	292,9±0,1
5	11,31±0,05	494,7±0,2	70,7±0,1	290,9±0,1	13	2,82±0,01	555,1±0,2	67,6±0,1	293,6±0,1
6	9,30±0,04	503,2±0,2	70,0±0,1	291,5±0,1	14	2,34±0,01	563,1±0,2	66,9±0,1	294,2±0,1
7	6,94±0,03	513,9±0,2	69,3±0,1	292,1±0,1	15	2,31±0,01	563,7±0,2	66,9±0,1	294,2±0,1
8	6,93±0,03	516,0±0,2	69,3±0,1	292,1±0,1					

Термодинамические параметры (ΔH , ΔS) образования двойной спирали из односторонних олигонуклеотидов

№ п.п.	Олигонуклеотид	ΔH для всего олигонуклеотида	ΔH для пары оснований *	ΔS для всего олигонуклеотида	ΔS на один стэкинг
		ккал/моль		кал/моль·К	
1	(8)	-78,8±2,5	-11,26±0,35	-212,0±7,0	-30,3±1,0
2	(m ⁴ 8)	-76,6±2,6	-10,1±1,4 **	-208,9±6,1	-28,7±7,8 **
3	(m ⁵ 8)	-113			
4	(12)	-100,4±4,0		-272±11	
5	(m ¹ 12)	-97,2±8,1		-265,9±9,6	
6	(m ⁵ 12)	-102,9±5,8		-277,0±19	

* ΔH для стэкинг-взаимодействия.** Для пары m⁴C-G.

$$\frac{\Delta \Delta G}{RT} = \ln K_2 - \ln K_1 = \Delta \ln c,$$

$$\Delta \Delta G = 2,3RT \Delta \lg c.$$

Величина $\Delta \lg c = \lg c_1 - \lg c_2$ определяется так, как показано на рис. 2. Поскольку комплементарный двухспиральный олигонуклеотид содержит два метилированных цитозина, изменение свободной энергии из-за метилирования, приходящееся на одну метилированную комплементарную пару, равняется $\Delta \Delta G/2$. Таким образом, было найдено, что изменение свободной энергии образования комплементарной пары оснований внутри ДНК при метилировании цитозина по N4-положению для октануклеотида и додекануклеотида при 37°С составляет 0,62±0,11 и 0,65±±0,12 ккал/моль, а при метилировании по C5-положению для додекануклеотида — -0,45±0,18 ккал/моль.

Вероятность раскрытия внутренней пары определим из соотношения

$$W = \exp(-\Delta G/RT),$$

где ΔG — свободная энергия раскрытия комплементарной пары оснований внутри ДНК. Для метилированной пары $\Delta G_m = \Delta G + \Delta \Delta G/2$. Увеличение (уменьшение) вероятности раскрытия метилированной внутренней пары (W_m/W) находим из

$$\frac{W_m}{W} = \exp(-\Delta \Delta G/2RT).$$

Было найдено, что для октануклеотида и додекануклеотида вероятность раскрытия m⁴C-G-пары оснований увеличивается примерно в 4 раза, а для додекануклеотида, для m⁵C-G-пары оснований, уменьшается примерно в 2 раза. Вероятность раскрытия неметилированной G-C-пары в аналогичных условиях составляет 10⁻⁵ [15].

Подведем итоги по полученным в работе результатам. m⁴C как в октануклеотиде, так и в додекануклеотиде (рядом с аденином) оказывает примерно одинаковое дестабилизирующее действие. Небольшая разница в сдвигах T_m обусловлена большей длиной додекануклеотида. Это следует и из величин $\Delta \Delta G$, которые для обоих олигонуклеотидов почти совпадают. Сопоставим влияние m⁴C с другими структурными дефектами: неспецифическим спариванием и заменой G-C-пары оснований на A-T-пару. Одно неправильное спаривание, приходящееся на 10 пар оснований, уменьшает T_m на 10–12°С [16]. Эффект замены оценим по эмпирической формуле [17]

$$T_m = 176 - (2,6 - x)(36 - 7,04 \lg [Na]),$$

где x — мольная доля G-C-пар оснований. Одна замена на 8 пар оснований приводит к понижению T_m на 4,5°С. Разность свободных энергий

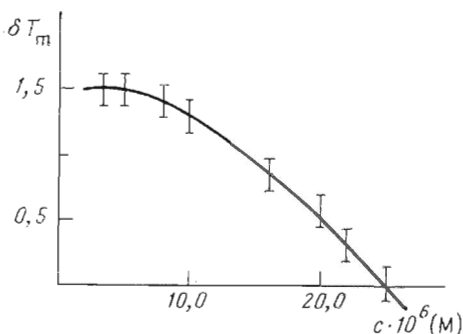


Рис. 3. Уменьшение стабилизирующего действия ($\delta T_m = T_m^m - T_m$) 5-метилцитозина с увеличением концентрации октануклеотида (m^58), T_m^m и T_m — температуры плавления метилированного и неметилованного октануклеотидов

стэкинг-взаимодействия при 37°C для А-Т- и G-С-пар составляет 1,4 ккал/моль [11], а найденная в настоящей работе разность свободных энергий, обусловленная наличием двух остатков $m^4\text{C}$, равна $\Delta\Delta G = 1,3 \pm 0,3$ ккал/моль. Приведенные данные свидетельствуют, что дестабилизирующее влияние двух $m^4\text{C}$ примерно равноценно замене G-С-пары на А-Т-пару. Метилирование цитозина по С5-положению увеличивает стабильность метилированной пары оснований. Аналогичное влияние наблюдалось и в работах [7, 8]. Наряду с этим следует обратить внимание на неизвестный ранее эффект: с увеличением концентрации октануклеотида стабилизирующее влияние $m^3\text{C}$ постепенно исчезает (рис. 3), что приводит к изгибу кривой (рис. 2а, 3) и к явно завышенному значению ΔH для (m^38) (-113 ккал/моль). Как уже отмечалось, замена цитозина на $m^5\text{C}$ заметно облегчает В-З-переход в ДНК. Все больше данных накапливается в пользу биологической роли такого перехода [18]. Однако механизм действия $m^5\text{C}$ не выяснен. Заметим, что условия, при которых проявляется обнаруженный эффект, близки к условиям, когда происходит В-З-переход [19]. К тому же следует добавить, что увеличение концентрации ДНК и температуры способствует В-З-переходу [20]. На основе рентгеноструктурных данных [13] предполагается, что С5-метильная группа влияет на В-З-переход, дестабилизируя В-форму и стабилизируя Z-форму ДНК. Таким образом, обнаруженный в работе эффект, по видимому, свидетельствует о том, что С5-метильная группа дестабилизирует В-форму ДНК при В-З-переходе.

Экспериментальная часть

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов описан нами ранее [21]. Все опыты с олигонуклеотидами проводились в растворе 1,0 М NaCl; 0,1 мМ EDTA; 4 мМ какодилата натрия (рН 7,2). NaCl был категории ос.ч., какодилат натрия — фирмы Fluka. Все растворы готовились на бидистиллированной воде. Кривые плавления снимали на спектрофотометре Beckman DU-8B. Измерения оптической плотности для октануклеотидов проводили при 280 нм, а для додекануклеотидов — при 260 нм. Оптическую плотность измеряли с точностью до $\pm 0,1\%$. Плавление олигонуклеотидов осуществляли в специальных герметических закрытых кварцевых микрокуветах, помещенных в модифицированный нами термостатирующий кюветодержатель. Температура измерялась с точностью $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Экспериментальные данные были обработаны методом наименьших квадратов на микро-ЭВМ «Электроника» ДЗ-28. Молярную концентрацию нитей олигонуклеотидов определяли, измеряя их поглощение при 260 нм. Пользовались следующими молярными коэффициентами: для октануклеотидов (8), (m^48) и (m^58) соответственно $67,3 \cdot 10^3$; $66,1 \cdot 10^3$ и $66,7 \cdot 10^3$ $\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; для додекануклеотидов (12), (m^412) и (m^512) — $94,4 \cdot 10^3$; $93,9 \cdot 10^3$ и $94,2 \cdot 10^3$ $\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

При расчете коэффициентов экстинкции пользовались справочными данными [22] для отдельных нуклеотидов. Учитывали гиперхромный эффект, обусловленный гидролизом однонитового олигомера и переходом из двухспирального состояния в однонитовое. Олигомеры подвергали отжигу, чтобы они действительно имели правильную комплементарную двухспиральную структуру. Проводили контрольные опыты для определения обратимости перехода «двунитовое — однонитовое состояние». Температуры переходов совпадали с указанной точностью эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Razin A., Riggs A. D. // Science. 1980. V. 210. № 4470. P. 604—610.
2. van Lier J. J., Stroucken J. H., Buck H. M. // J. Royal Netherlands Chem. Soc. 1984. V. 103. № 4. P. 123—130.

3. *Behe M., Felsenfeld G.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 4. P. 1619–1623.
4. *Janulaitis A., Klimašauskas S., Petrušytė M., Butkus V.* // FEBS Lett. 1983. V. 161. № 1. P. 131–134.
5. *Кантор Ч., Шиммель П.* // Биофизическая химия. Т. 3. М.: Мир, 1985.
6. *Юргайтис А. П., Лазурич Ю. С., Банников Ю. А.* // Молекулярн. биология. 1979. Т. 13. Вып. 3. С. 531–542.
7. *Szer L., Shugar K.* // J. Mol. Biol. 1966. V. 17. № 1. P. 174–187.
8. *Ehrlich M., Ehrlich N.* // Biochem. et biophys. acta. 1975. V. 395. № 2. P. 109–119.
9. *Хинц Г. И.* // Биохимическая термодинамика / Ред. М. Джоунс. М.: Мир, 1982. С. 140–191.
10. *Albergo D. D., Marky L., Breslauer K. J., Turner D. H.* // Biochemistry. 1981. V. 20. № 6. P. 1409–1412.
11. *Gralla J., Crothers D.* // J. Mol. Biol. 1973. V. 73. № 3. P. 497–511.
12. *Pohl F. M.* // Eur. J. Biochem. 1974. V. 42. № 3. P. 495–504.
13. *Wong A. H., Fujii S., van Boom J. H., Rich A.* // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1983. V. 47. Part 1. P. 33–44.
14. *Cooper D. N.* // Hum. Genet. 1983. V. 64. № 2. P. 315–333.
15. *Gralla J., Crothers D. M.* // J. Mol. Biol. 1973. V. 78. № 2. P. 301–319.
16. *Dodgson J. B., Wells R. D.* // Biochemistry. 1977. V. 16. № 11. P. 2367–2374.
17. *Frank-Kamenetskii M. D.* // Biopolymers. 1971. V. 10. № 12. P. 2623–2624.
18. *Rich A., Northem A., Wang A. H.-J.* // Ann. Rev. Biochem. 1984. V. 53. P. 791–846.
19. *Behe M., Felsenfeld G., Chen Szu S., Charney E.* // Biopolymers. 1985. V. 24. № 2. P. 289–300.
20. *van de Sande J. H., McIntosh L. P., Jovin T. M.* // EMBO J. 1982. V. 1. № 1. P. 777–782.
21. *Пятраускаене Л. Ю., Климашаускас С. Й., Буркус В. В., Янулайтис А. А.* // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 12. С. 1597–1603.
22. *Калинин Ф. Л., Лобов В. П., Жидков В. А.* // Справочник по биохимии. Киев: Наук. думка, 1971.

Поступила в редакцию
29.V.1987

THE EFFECTS OF N⁴-METHYLCYTOSINE AND 5-METHYLCYTOSINE ON THE THERMAL STABILITY OF DNA DOUBLE HELIX

JURGAITIS A. P., BUTKUS V. V.*, KLIMAŠAUSKAS S. J.*, JANULAITIS A. A.*

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Lithuanian SSR, Vilnius:
* *Enterprise for Science and Production «Fermentas», Vilnius*

The thermodynamic parameters (ΔH , ΔS) of the helix-coil transition of self-complementary oligonucleotides d(CGCGCGCG), d(CG5mCGCGCG), d(CG4mCGCGCG), d(GGACCCGGGTCC), d(GGA5mCCCGGGTCC), and d(GGA4mCCCGGGTCC) were determined. The substitution of 4mC for C was found to decrease the melting temperature of the oligonucleotides. The destabilization effect of the two substitutions is equivalent to the change of A-T for G-C pair. The free energy decrease of the helix-coil transition due to the introduction of two 4mC into an octanucleotide was estimated to be 1.24 kcal/mol.