

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.323.5;577.31;577.356;577.113.7

### СПЕЦИФИЧНОСТЬ РАСЩЕПЛЕНИЯ ДНК УЛЬТРАЗВУКОМ

© 2006 г. С. Л. Гроховский\*

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991*

*Центр медицинских исследований Университета Осло, Москва, 119991*

Поступила в редакцию 01.07.2005 г.

Исследован характер расщепления ультразвуком с частотой 22 и 44 кГц фрагментов двухспиральной ДНК с известной последовательностью пар оснований методами гелевого электрофореза. Расщепление сильно зависит от длины фрагмента, pH, ионной силы раствора и от температуры. Показано, что двунитевые разрывы чаще происходят в участках, содержащих последовательность 5'-CpG-3'. Разрыв цепи в этой последовательности происходит преимущественно между цитозином и гуанозином, при этом фосфатная группа остается на 5'-конце остатка гуанозина. Интенсивность расщепления сахарофосфатного остова ДНК зависит от окружающих место разрыва последовательностей. В присутствии Pt-бис-нетропсина – сиквенспецифичного лиганда, изменяющего локальную конформацию ДНК, характер расщепления изменяется.

*Ключевые слова:* ультразвук, расщепление ДНК, последовательность 5'-CpG, конформация ДНК, сиквенспецифичные лиганды.

THE SPECIFIC CLEAVAGE OF DNA WITH ULTRASOUND, by S. L. Grokhovsky\* (Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Science, Moscow, 119991 Russia, \*e-mail: grok@imb.ac.ru; Center of Medical Research, University of Oslo, Moscow, 119991 Russia). Cleavages of double-stranded DNA fragments of known base pair sequence upon ultrasound irradiation at 22 and 44 kHz were studied by gel electrophoresis. The cleavage rate is found to be strongly dependent on the DNA fragment length, pH, temperature and ionic strength of the solution under study. The cleavage of double-stranded DNA occurs predominantly at sites containing alternating 5'-CpG-3' sequences. The breakage of phosphodiester bond takes place between C and G in such a way that phosphate group at the 5'-end of the guanine residue remain intact. The cleavage rate at a given DNA site is found to depend on base pair sequences at adjacent sites. Distinctly different cleavage patterns are observed when free DNA and DNA complexes with cys-diammine-Pt-bridged bis-netropsin were irradiated by ultrasound. The observed effect can be attributed to local DNA conformation changes induced upon complex formation between ligand and DNA.

*Key words:* ultrasound irradiation, DNA cleavage, 5'-CpG sequence, DNA conformation, sequence-specific DNA-binding drugs.

Геномная ДНК в клетках присутствует в виде единичной кольцевой молекулы у прокариот или в виде нескольких линейных молекул в каждой из хромосом эукариот. Длина такой единичной молекулы колеблется от долей миллиметра у простейших организмов до нескольких сантиметров у эукариот. Если, для наглядности, увеличить диаметр такой молекулы до 2 см, то ее длина составила бы несколько сот километров. В клетках молекулы ДНК свернуты и компактизованы с помощью комплексов гистонов у высших организмов или гистоноподобных белков у прокариот. Сочетание макроразмера по длине с молекулярным размером по толщине позволяет применять для исследования свойств двухспиральной ДНК различные физические воздействия. На ранних этапах ис-

следования ДНК широко применялся метод дробления ДНК ультразвуком [1, 2]. При интенсивной ультразвуковой обработке водных растворов двухспиральной ДНК происходят в основном двунитевые разрывы цепей и образуются фрагменты длиной несколько сот п.н. [3, 4]. Тем не менее, в литературе автору не удалось обнаружить данных о сравнении степени расщепления разных последовательностей и о характере образующихся при разрывах концевых остатков ДНК. В данной работе исследована специфичность образования разрывов сахарофосфатного остова при воздействии ультразвука на фрагменты ДНК с известной последовательностью п.н.

Предполагается, что разрывы цепей ДНК под действием акустических колебаний связаны с кавитацией – образованием в водном растворе при прохождении акустической волны полостей (ка-

\* Эл. почта: grok@imb.ac.ru

витационных пузырьков), заполненных паром [5, 6]. В момент схлопывания кавитационных пузырьков в них сильно повышается температура и давление, возможно также образование высоковольтных разрядов из-за образующегося на поверхности пузырька двойного электрического слоя. Кавитация появляется только при достижении некой пороговой частоты звуковых колебаний. Очевидно, что лишь часть энергии ультразвуковых волн, распространяющихся в жидкости, расходуется на образование кавитационных пузырьков. Остальная часть идет на возникновение микропотоков, нагревание жидкости, образование фонтана и распыление жидкости. Энергия схлопывающихся пузырьков расходуется на излучение ударных волн, на локальный нагрев газа и жидкости, на образование свободных радикалов и на ряд других процессов [7]. Показано, что в условиях подавления кавитации не наблюдается деструкции молекул ряда полимеров. Предполагается, что полимерные цепи разрываются, главным образом, под действием экстремально больших сил, возникающих в быстрых потоках жидкости около схлопывающихся кавитационных пузырьков, и под действием ударных волн, образующихся после исчезновения пузырька [8]. Полученные в настоящей работе результаты также свидетельствуют, что главный вклад в образование разрывов ДНК вносят не активные радикалы, а механические силы локальных микропотоков жидкости, при этом разрыв цепей ДНК происходит преимущественно в местах с измененной локальной конфигурацией спирали.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Фрагменты ДНК** получали расщеплением модифицированных плазмид рGEM7(f+) (Promega), содержащих в полилинкере вставки синтетических олигонуклеотидов [9], рестриктазами NcoI и AраI (фрагменты длиной 470 и 475 п.н.) и рестриктазами XbaI и BglII (“Promega”) (фрагмент длиной 439 п.н.) или расщеплением плазмиды рUC9 рестриктазой DdeI (“Promega”) (фрагмент длиной 166 п.н.). Последовательности фрагментов приведены на рисунках. Для введения радиоактивной метки в 3'-конец 166-фрагмента использовали [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dCTP, для остальных фрагментов [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dATP (“ФГУП” Институт реакторных материалов, Заречный, Свердловская обл.), дополнительные немеченные dNTP и фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *Escherichia coli* (“Boehringer Mannheim”, Германия). Выделение фрагментов ДНК проводили в 5%-ном полиакриламидном геле толщиной 1 мм, с последующей элюцией и осаждением [10].

**Облучение растворов фрагментов ДНК ультразвуком.** Для приготовления образцов 5 мкл раствора фрагмента ДНК (примерно 10<sup>4</sup> Бк) в 5 мМ NaOAc, рН 7.0 (или в другом буфере, указанном в подписях к рисункам) смешивались с 5 мкл раствора аналогичного буфера или лиганда в том же буфере в тонкостенных полипропиленовых пробирках на 0.2 мл (“Prekin Elmer”, USA). Конечная концентрация фрагмента составляла 5–10 мкг/мл или ~10 мкМ п.н.

Облучение проводилось на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-2Т (Украина) при частоте 44 или 22 кГц. Пробирки помещали в тefлоновое кольцо с центральным отверстием 15 мм и с радиальными отверстиями для пробирок так, чтобы концы пробирок, в которых находились тестируемые растворы, располагались на 1 см ниже поверхности торца излучателя. Кольцо располагалось в бане с водой и мелко размолотым льдом (если не оговорены другие условия), которая вращалась со скоростью 2 об/мин.

**Разделение фрагментов в неденатурирующем геле.** После облучения к смеси добавляли равный объем 50%-ного глицерина, содержавшего 0.02% бромфенолового синего, и образцы объемом 0.5 мкл наносили на неденатурирующий ПААГ длиной 40 см и толщиной 0.15 мм. Электрофорез проводили в ТВЕ × 1 при 1.3 кВ (~30 Вт) в течение 3 ч (температура геля ~30°C) или при 300 В (~1 Вт) в течение 18 ч при температуре +2°C. После проведения электрофореза гель высушивали на стекле, предварительно обработанном  $\gamma$ -метакрилпропилоксисилоном (LKB, Швеция) и экспонировали либо с рентгеновской пленкой (“Kodak”, USA), либо с люминисцентным экраном с последующим сканированием на приборе “Cyclone Storage Phosphor System” (“Packard BioScience Company”, USA).

**Разделение фрагментов в денатурирующем геле.** После облучения к смеси добавляли 90 мкл раствора 0.15 М NaCl, 50 мМ Трис-HCl (рН 7.5), 10 мМ EDTA, 10 мкг/мл тРНК. Смесь экстрагировали фенолом, ДНК осаждали этанолом, промывали 70%-ным этанолом, высушивали, растворяли в 1 мкл 95%-ного формамида, содержащего 15 мМ EDTA (рН 8.0), 0.05% бромфенолового синего и 0.05% ксиленцианола FF, нагревали 1 мин при 90°C, быстро охлаждали до 0°C и наносили на денатурирующий ПААГ длиной 40 см с градиентной толщиной 0.15–0.45 мм [11]. Электрофорез проводили 55 мин при 100 Вт (2.3 кВ) при температуре 60–70°C. Перед экспонированием гель фиксировали в 10%-ной уксусной кислоте и высушивали на стекле. Дальнейшая обработка проводилась аналогично предыдущей методике.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Зависимость расщепления от длины фрагментов ДНК, частоты ультразвука, рН и ионной силы растворов*

На рис. 1 приведены профили расщепления фрагмента ДНК длиной 470 п.н. в неденатурирующем полиакриламидном геле. Фрагмент содержал вставки кластеров АТ-пар оснований, разделенных кластерами чередующихся GC-пар. Электрофорез проводился при 2°C (рис. 1а). Аналогичная картина профиля расщепления фрагмента наблюдалась и при проведении электрофореза при температуре 30°C (рис. 1б) – в этих условиях проявлялись бы такие двунитевые разрывы ДНК, в которых разрывы каждой из цепей ДНК отстоят друг от друга на несколько п.н. – в процессе электрофореза происходит плавление таких “липких концов”.

Как видно на рисунке, имеются места преимущественного расщепления фрагмента, положение которых соответствует присутствию чередующихся GC-пар оснований. Интенсивное образование двунитевых разрывов наблюдается уже после первых 4 мин обработки. Дальнейшее облучение усиливает картину расщепления, но при этом концевые последовательности фрагмента практически не подвергаются расщеплению. Это связано, вероятно, с тем, что концы фрагмента достаточно “гибки” и не ломаются. Увеличение ионной силы растворов от 5 мМ до 0.5 М при рН 7.0 приводит к некоторому усилению расщепления. Увеличение рН раствора до 11.0 практически прекращает расщепление, в то время как уменьшение до рН 5.0 вызывает его резкое усиление. Это объясняется, вероятно, тем, что при щелочных рН происходит частичное расплетание двойной спирали, и это приводит к увеличению гибкости и компактизации ДНК, в то время как в кислых условиях облегчается атака протона на фосфодиэфирную связь. Повышение температуры облучаемых растворов до 30°C практически полностью ингибирует расщепление (рис. 1в). Как видно из рис. 1в, заметное расщепление фрагмента наблюдается при этой температуре только для кислых значений рН раствора. Эти данные говорят о том, что основной вклад в расщепление цепей ДНК вносят возникающие в момент схлопывания кавитационных пузырьков силы гидродинамического разрыва, интенсивность которых зависит от давления паров воды, уменьшающегося при понижении температуры [8], а не химические процессы, связанные с образованием в процессах кавитации активных радикалов.

Различий в характере расщепления фрагментов при использовании ультразвука с частотами 22 и 44 кГц обнаружено не было.

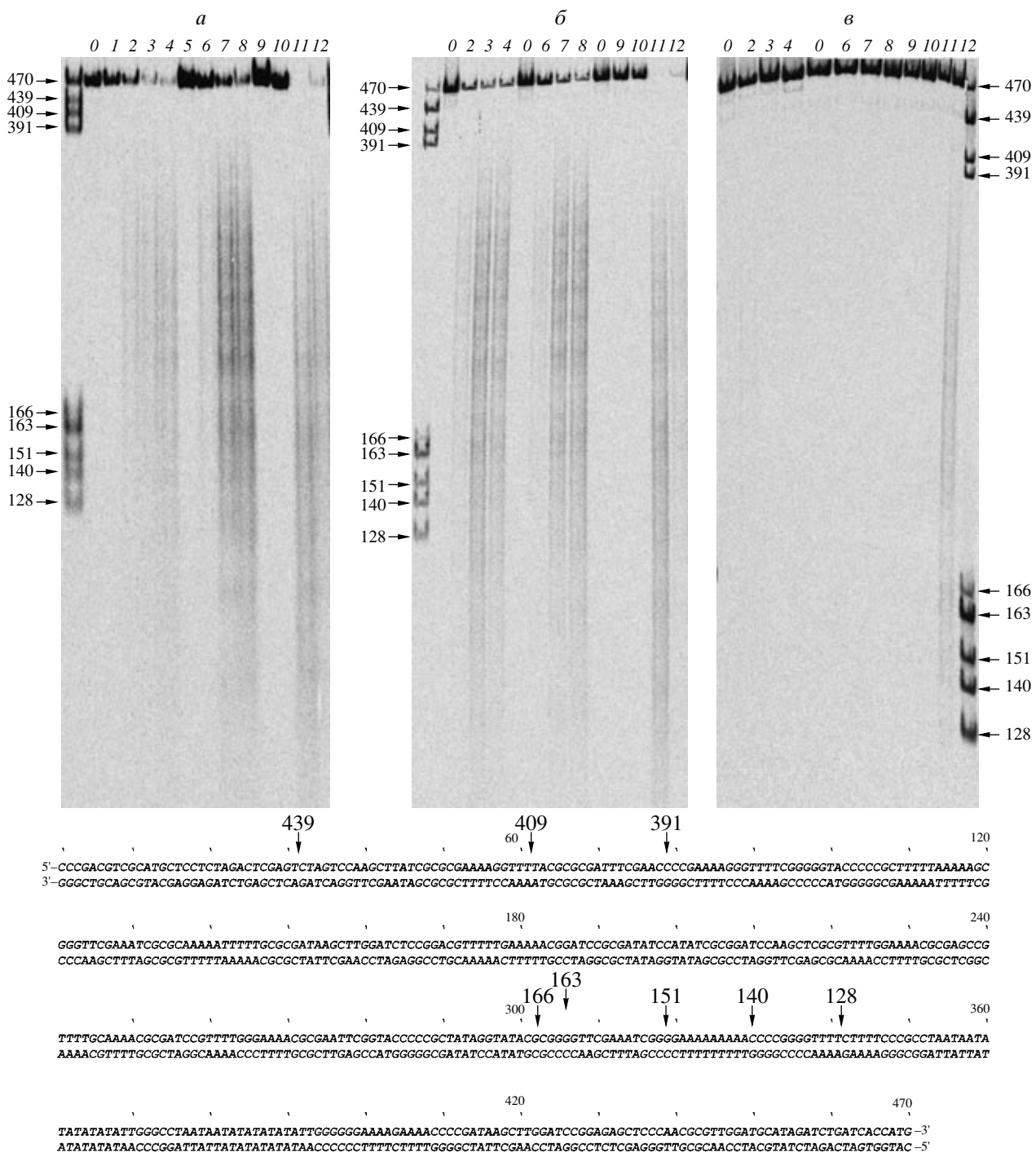
*Зависимость интенсивности разрыва цепи ДНК от последовательности п.н.*

Для определения точных мест локализации разрывов ДНК после облучения ультразвуком фрагменты были разделены в денатурирующем полиакриламидном геле. На рис. 2 приведены профили расщепления фрагментов длиной 475 и 439 п.н., которые содержали метку в верхней и в нижней цепи одной и той же последовательности. Каждый фрагмент содержал радиоактивную метку на одном из своих 3'-концов. В этих условиях на геле видны разрывы, находящиеся только в одной из цепей ДНК. Как видно на рисунке, имеются места, интенсивность разрывов которых сильно превышает фоновый уровень. Предварительный анализ первичной последовательности этих, а также ряда других фрагментов (в этой статье данные по ним не приводятся), показывает, что наиболее легко разрыв цепи ДНК происходит между остатками цитозина и гуанозина в последовательности 5'-СрG-3'. Интенсивность расщепления данной последовательности зависит от окружающих ее соседних п.н. Сильное расщепление наблюдается, когда эту последовательность окружают “смешанные” последовательности, содержащие все четыре нуклеотида и остатки пуринов и пиримидинов в разных цепях. Ослабление расщепления наблюдается, если 5'-СрG-3' последовательность окружают последовательности, в которых пуриновые остатки находятся только в одной из цепей. Превышение фонового уровня расщепления наблюдается и для отличных от цитозина оснований в тех случаях, когда нуклеотид находится на границе перехода “смешанной” последовательности и последовательности, в которой остатки пуринов находятся только в одной из цепей.

*Изменение интенсивности разрывов цепи при связывании лигандов, изменяющих локальную конформацию двойной спирали ДНК*

Полученные картины расщепления фрагментов показывают, что с помощью ультразвука можно проводить анализ локальной конформации спиральных характеристик ДНК. Структура двухспиральной ДНК не является полностью монотонной, а зависит от последовательностей п.н. [12–15]. П.н. ДНК имеют разную геометрию, и их взаимные комбинации приводят к различным искажениям идеальной спиральной структуры, приводящим к изломам или поворотам структуры ДНК, к уширению или сужению ее большого и малого желобов, что имеет большое значение в процессах компактизации ДНК в клетке и в узнавании ее различными белками.

Изменение структуры ДНК происходит и при изменении характеристик окружающей ее вод-



**Рис. 1.** Профили расщепления фрагмента ДНК длиной 470 п.н. на неденатурирующем 5%-ном полиакриламидном геле после обработки ультразвуком с частотой 44 кГц. *а* – Облучение ультразвуком при 0°С и разделение в геле при 2°С. *б* – Облучение ультразвуком при 0°С и разделение в геле при 30°С. *в* – Облучение ультразвуком при 30°С и разделение в геле при 30°С. Внизу приведена последовательность п.н. фрагмента. Стрелками отмечены положения маркеров – меченых фрагментов двухспиральной ДНК известной длины – на геле и на нуклеотидной последовательности. Фрагмент содержал радиоактивную метку на 3'-конце верхней цепи. Дорожки: 0 – фрагмент без обработки; 1–4 – облучение фрагмента в 5 мМ NaOAc (рН 7.0) 2, 4, 8 и 16 мин соответственно; 5–8 – облучение фрагмента в 0.5 М NaOAc (рН 7.0) 2, 4, 8 и 16 мин соответственно; 9, 10 – облучение фрагмента в 0.5 М NaOAc (рН 11.0) 4 и 8 мин соответственно; 11, 12 – облучение фрагмента в 0.5 М NaOAc (рН 5.0) 4 и 8 мин соответственно.

ной среды, а также при связывании с ДНК различных лигандов. Удобной моделью для исследования изменений локальных параметров спирали являются низкомолекулярные сиквенспецифичные лиганды, которые связываются с заданными последовательностями ДНК [16, 17]. Ранее нами разработан метод точной локализации лиганда на ДНК на основе селективного поглощения рентгеновского излучения атомом тяжелого металла [18–20]. На рис. 3 приведена структура Pt-бис-нетропсина и последовательность фрагмента, для которого была определена точная локализация лиганда в малом желобе ДНК [18]. Большие стрелки показывают места расщепления сахарофосфатного остова двух цепей ДНК в местах сильного связывания Pt-бис-нетропсина и соответствуют положению атома платины. Остатки нетропсина, находящиеся в разных ориентациях относительно спирали ДНК, узнают две симметричные консенсусные последовательности 5'-TTTT-3' (подчеркнутые на последовательности места). Схематическая модель такого комплекса Pt-бис-нетропсина с ДНК показана ниже (правый рисунок).

Тем не менее оставалось непонятным присутствие минорных мест расщепления на последовательности, содержащей чередующиеся АТ пары оснований. При последующем исследовании связывания Pt-бис-нетропсина с двухспиральными олигонуклеотидами нами был обнаружен второй тип комплекса этого лиганда с ДНК, в котором два остатка нетропсина молекулы Pt-бис-нетропсина складываются в параллельную шпильку, образующую прочный комплекс с последовательностью из четырех чередующихся АТ-пар оснований [21], как это схематически показано на рис. 3 слева.

Облучение ультразвуком комплекса Pt-бис-нетропсина с этим фрагментом (рис. 3, слева) приводит к тому, что в местах, где молекула лиганда связывается с ДНК в вытянутой конформации, происходит некоторое уменьшение фонового уровня расщепления, а в месте, примыкающем к месту связывания “шпильки”, происходит локальное усиление расщепления (на геле и на последовательности обозначено волнистой стрелкой). Аналогичные места ослабления или усиления расщепления комплексов в зависимости от связывания Pt-бис-нетропсина в вытянутой или в “шпильчатой” конформации на последовательностях, содержащих тимидины в одной цепи или чередующиеся последовательности АТ пар оснований, можно увидеть и на рис. 2 (дорожки 5–7).

#### *О характере образующихся при разрывах концевых групп*

Химическое расщепление ДНК муравьиной кислотой вызывает потерю пуринового основания в месте расщепления [22]. Таким образом, полосы на дорожках А + G (рис. 2 и 3) – это олиго-

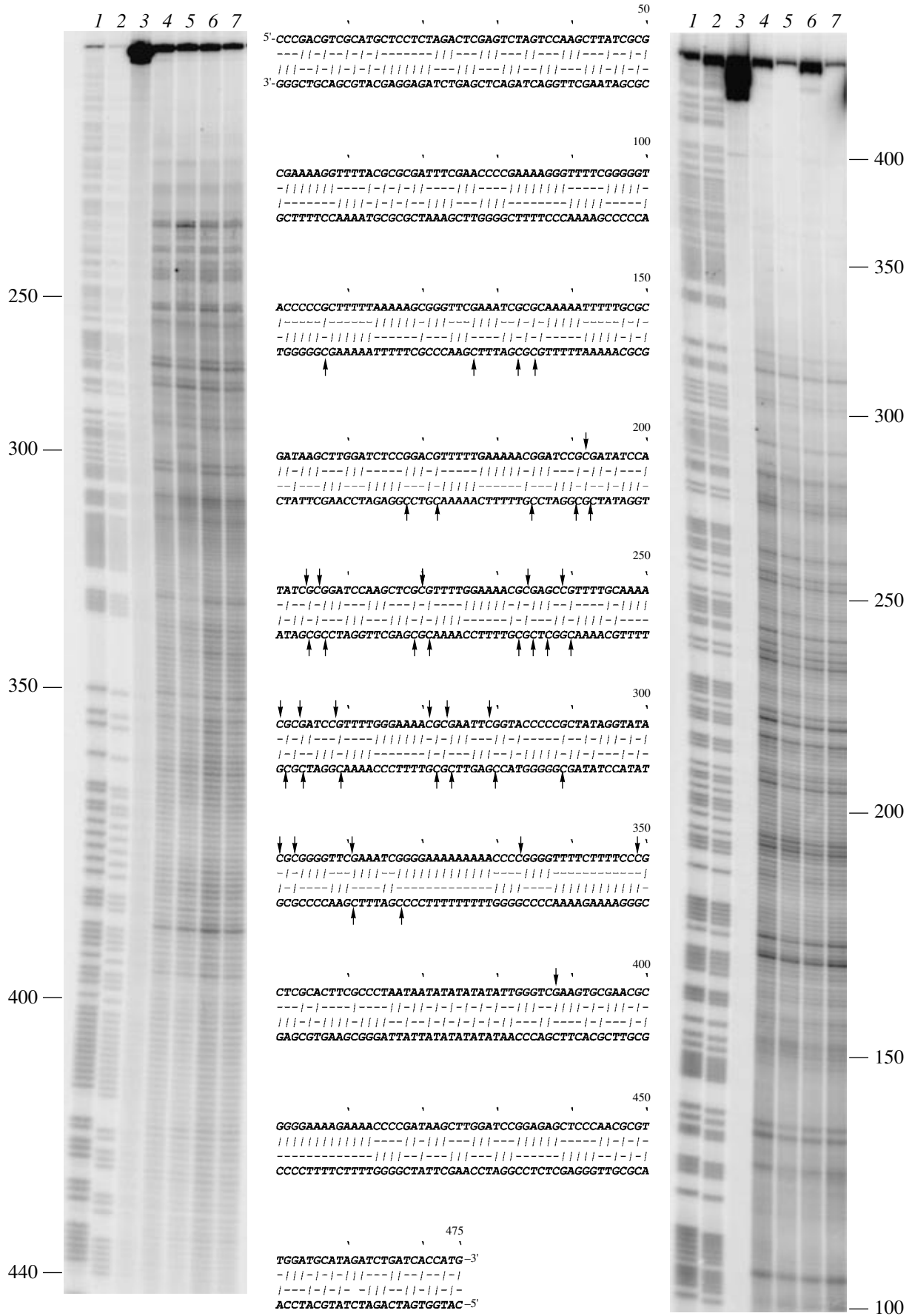
нуклеотиды без концевого пурина. Меченые по 3'-концу фрагменты содержат незаряженную 3'-ОН группу на 3'-конце и несущую два отрицательных заряда фосфатную группу на 5'-конце. Удаление 5'-концевых фосфатных групп фосфатазой [10] приводит к изменению подвижности фрагментов на геле (рис. 2, дорожки 1 и 2). Подвижность фрагментов зависит от их молекулярной массы, суммарного заряда и от плотности геля. Чем длиннее фрагмент, тем меньше влияет удаление двух зарядов на суммарный заряд и тем больше подвижность определяется длиной фрагмента. Так, например, на 6%-ном денатурирующем геле сдвиг на полтора шага наблюдается в районе 20-членного нуклеотида, 1 шаг – 40-членного и 0.5 шага – 90-членного. В 14%-ном денатурирующем геле – 14, 25 и 55, соответственно.

Как видно на рис. 2 и 3, положение полос, образующихся после облучения фрагмента ультразвуком, точно совпадает с положением полос химического расщепления по пуринам. Это говорит о том, что на 5'-концах этих фрагментов находятся фосфатные группы.

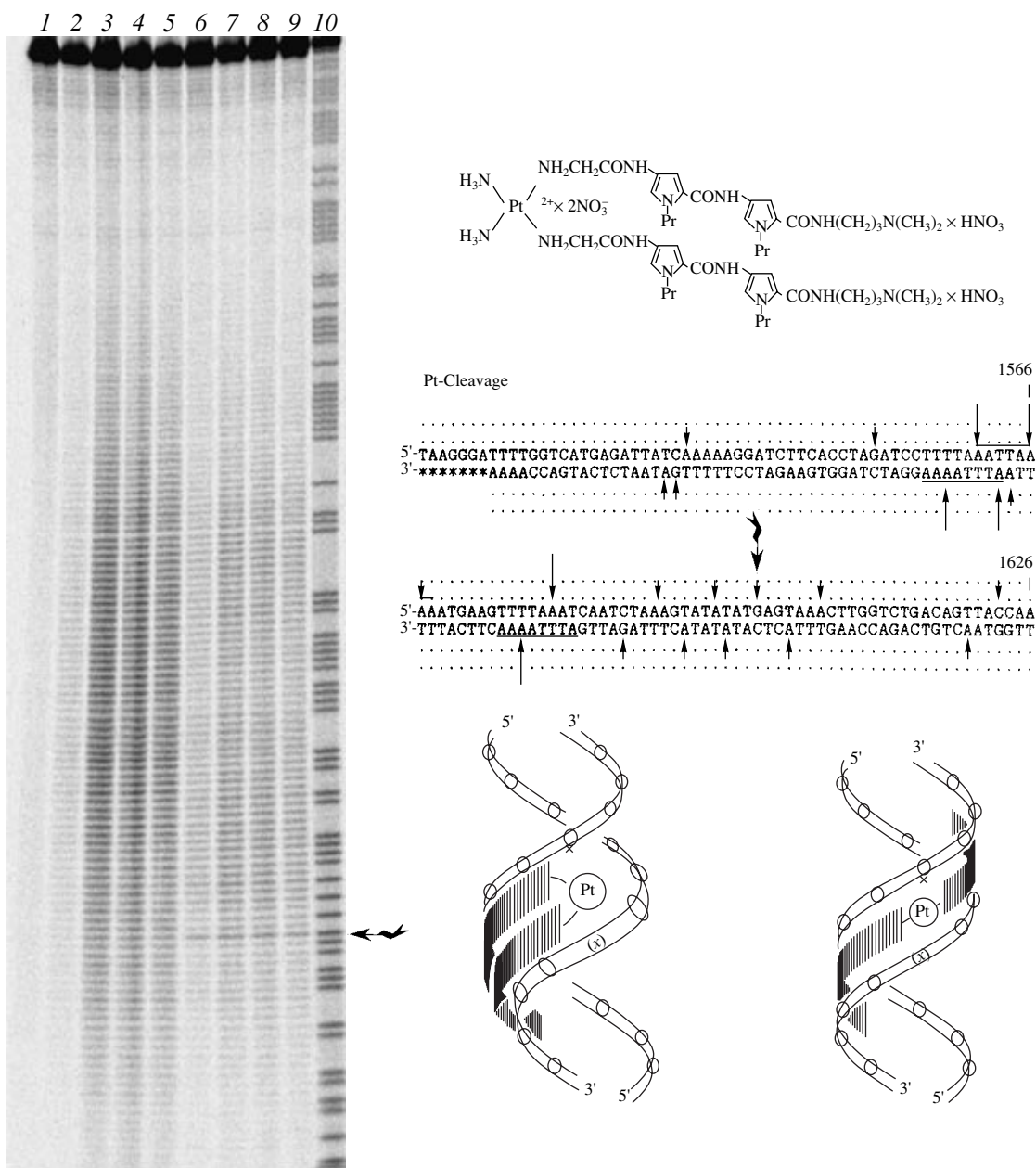
Полученные данные о воздействии ультразвука на фрагменты ДНК позволяют сделать несколько выводов о зависимости прочности на разрыв нити двухспиральной ДНК от ее последовательности и о биологических последствиях таких закономерностей.

Судя по тому, что концы фрагментов короче 30–50 п.н. почти не расщепляются, вызванный ультразвуком кавитационный гидродинамический удар действует на достаточно протяженный участок ДНК длиной около ста пар нуклеотидов. Короткие фрагменты ДНК длиной менее 50 п.н. ультразвуком практически не расщепляются. Аналогичный эффект был описан для целого ряда полимеров [8]. Кроме того показано, что введение в полимерную цепь небольшого числа более лабильных связей резко усиливает деградацию полимера ультразвуком [23]. На основании этого можно предположить, что и места разрывов цепи ДНК отражают зависимость прочности фосфодиэфирных связей сахарофосфатного остова от локальной конформации комбинаций п.н. В обычных условиях ДНК в клетках может испытывать подобные нагрузки во время расхождения хромосом, в процессах репликации, транскрипции и в ряде других процессов, поэтому эта характеристика должна отражаться на последовательности ДНК у разных организмов.

Согласно полученным в работе данным, наиболее легко ДНК разрывается ультразвуком по динуклеотидной последовательности 5'-CpG-3'. Интересно отметить, что этот динуклеотид имеет заметно сниженную частоту встречаемости в геномах многих организмов, за рядом примечательных исключений, например, у *Haemophilus influenzae*.



**Рис. 2.** Профили расщепления фрагментов ДНК длиной 475 и 439 п.н. на 6%-ном денатурирующем полиакриламидном геле после обработки ультразвуком с частотой 44 кГц в течение 20 мин. 1 – Химическое расщепление по пуринам с последующей обработкой продуктов реакции фосфатазой; 2 – химическое расщепление по пуринам; 3 – исходный фрагмент без обработки; 4 – расщепление свободного фрагмента; 5–7 – расщепление фрагмента в присутствии 1 мкм, 0.5 мкм и 0.25 мкм Pt-bis-нетропсина соответственно. В левой части рисунка приведены профили расщепления фрагмента длиной 475 п.н. (радиоактивная метка находится в верхней цепи), а в правой – фрагмента длиной 439 п.н. (радиоактивная метка находится в нижней цепи). В центре приведена нуклеотидная последовательность фрагмента. Для облегчения отнесения полос с геля положение пуринов на обеих цепях последовательности маркировано штрихами. Стрелками отмечены места на последовательности, расщепление по которым сильно превышает фоновый уровень.



**Рис. 3.** Профиль расщепления фрагмента ДНК длиной 166 п.н. на 6%-ном денатурирующем полиакриламидном геле после обработки ультразвуком с частотой 44 кГц. 1 – Исходный фрагмент без обработки; 2–5 – расщепление свободного фрагмента в течение 2, 4, 8 и 16 мин соответственно; 6–9 – расщепление фрагмента в присутствии 0.5 мкм Pt-bis-нетропсина в течение 2, 4, 8 и 16 мин соответственно; 10 – химическое расщепление по пуринам. Справа приведена структура Pt-bis-нетропсина, нуклеотидная последовательность фрагмента и модели комплексов Pt-bis-нетропсина с ДНК. Прямыми стрелками указаны места расщепления при облучении комплекса рентгеновскими лучами [18]. Волнистой стрелкой указано место усиления расщепления под действием ультразвука.

зае и *Neisseria gonorrhoeae*, для которых характерна высокая компетентность, т.е. способность встраивать в геном чужеродную ДНК [24]. Обычно низкую встречаемость последовательности 5'-CpG-3' у позвоночных объясняют классическим сценарием метилирование/дезаминирование/мутация, вызывающим мутационную замену 5'-CpG-3' на 5'-TpG-3'/5'-CpA-3' [25, 26]. Тем не менее, эта гипотеза не объясняет уменьшение содержания 5'-CpG-3' в митохондриях животных и в геномах ряда организмов, в которых отсутствует CpG-метилазная активность. Нормальное содержание последовательности 5'-CpG-3' в геномах насекомых, червей и большинства грибов, возможно, отражает отличия в репликативных аппаратах их клеток или в более компактной упаковке нуклеосом хроматина. Можно предположить, что присутствие островков с высоким содержанием 5'-CpG-3' последовательностей в областях, предшествующих структурным генам и находящихся за ними, является одним из механизмов эволюционной перетасовки генов, а эпигенетические механизмы, связанные с метилированием этих последовательностей, вторичны, и возникли, в частности, благодаря узнаванию ферментом необычной структуры динуклеотида 5'-CpG-3', и, возможно также, более легким, по сравнению с другими последовательностями, "выворачиванием" ферментом цитозинового основания из спирали ДНК в процессе метилирования.

Парадокс в сравнении полученных результатов с литературными данными заключается в том, что согласно квантовомеханическим расчетам, динуклеотид 5'-CpG-3' (как и 5'-GpC-3') в составе В-формы двухспиральной ДНК имеет минимальную свободную энергию по сравнению с остальными динуклеотидами; условия для стекинга в этих двух соседних парах оптимальны, и поэтому связь между ними должна бы быть наиболее устойчивой [27, 28]. С другой стороны, результаты исследования механических свойств единичных молекул ДНК [29] скорее соответствуют модели ДНК как "червеобразной цепи" [30, 31], легко изгибающейся, которую можно даже завязать узлом [32], и, естественно, по такой модели специфические разрывы, вызванные различиями в стекинге соседних п.н., маловероятны. Расхождение полученных экспериментальных данных с модельными построениями можно объяснить тем, что квантово-механические расчеты дают картину на молекулярном уровне и не рассматривают макромолекулярные характеристики структуры цепи ДНК, например, такие, как локальные переходы В-формы ДНК в Z-форму [33, 34], а также кластерные свойства воды [7]. Эксперименты с единичными молекулами ДНК проводятся за времена порядка десятков секунд, и в течение этого периода происходит полная релаксация переходных состояний. Возможно, временные интервалы

воздействий кавитационных гидроакустических ударов на ДНК более соответствуют реальным временам клеточных процессов, протекающих на стыке молекулярных и макромолекулярных уровней.

Автор благодарит О.В. Преображенскую и В.И. Попенко за помощь в проведении экспериментов и обсуждение полученных результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (04-04-49364, 04-03-33144 и 03-04-48903) и Программы Российской академии наук по молекулярной и клеточной биологии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Doty P., McGill B.B., Rice S.A. 1958. The properties of sonic fragments of deoxyribonucleic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **44**, 432–438.
2. Davison P.F., Freifelder D. 1962. Studies on the sonic degradation of deoxyribonucleic acid. *Biophys. J.* **2**, 235–247.
3. Randolph M.L., Setlow J.K. 1972. Mechanism of inactivation of *Haemophilus influenzae* transforming deoxyribonucleic acid by sonic radiation. *Journal of bacteriology*. **111**, 186–191.
4. Mann T.L., Krull U.J. 2004. The application of ultrasound as a rapid method to provide DNA fragments suitable for detection by DNA biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. **20**, 945–955.
5. Miller D.L., Thomas R.M. 1996. The role of cavitation in the induction of cellular DNA damage by ultrasound and lithotripter shock waves in vitro. *Ultrasound in Medicine & Biology*. **22**, 681–687.
6. Fuciarelli A.F., Sisk E.C., Thomas R.M., Miller D.L. 1995. Induction of base damage in DNA solutions by ultrasonic cavitation. *Free Radical in Biology and Medicine*. **18**, 231–238.
7. Маргулис М.А. 1984. *Основы звукохимии*. М.: Химия. 272 с.
8. Suslick K.S., Price G.J. 1999. Applications of ultrasound to materials chemistry. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **29**, 295–326.
9. Grokhovsky S.L., Surovaya A.N., Burckhardt G., Pismensky V.F., Chernov B.K., Zimmer Ch., Gursky G.V. 1998. DNA sequence recognition by bis-linked netropsin and distamycin derivatives. *FEBS Lett.* **439**, 346–350.
10. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. 1984. *Молекулярное клонирование*. М.: Мир.
11. Краев А.С. 1988. Простая система для клонирования фага M13 и сиквенса ДНК с помощью терминаторов. *Молекуляр. биология*. **22**, 1164–1197.
12. Dickerson R.E., Drew H.R. 1981. Structure of a B-DNA dodecamer. II. Influence of base sequence on helix structure. *J. Mol. Biol.* **149**, 761–786.
13. Hyeon-Sook K., Crothers D.M. 1988. Calibration of DNA curvature and a unified description of sequence-directed bending. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**, 1763–1767.
14. Sarai A., Mazur J., Nussinov R., Jernigan R.L. 1988. Origin of DNA helical structure and its sequence dependence. *Biochemistry*. **27**, 8498–8502.



15. Chuprina V.P., Heinemann U., Nurislamov A.A., Zielenkiewicz P., Dickerson R.E., Saender W. 1991. Molecular dynamics simulation of the hydration shell of a B-DNA decamer reveals two main types of minor-groove hydration depending on groove width. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**, 593–597.
16. Заседателев А.С., Жузе А.Л., Циммер К., Гроховский С.Л., Туманян В.Г., Гурский Г.В., Готтих Б.П. 1976. Стереохимическая модель молекулярного механизма узнавания АТ-пар при связывании с ДНК антибиотиков дистамицина А и нетропсина. *Докл. АН СССР*. **231**, 1006–1009.
17. Gursky G.V., Zasedatelev A.S., Zhuze A.L., Khorlin A.A., Grokhovsky S.L., Streltsov S.A., Surovaya A.N., Nikitin S.M., Krylov A.S., Retchinsky V.O., Mikhailov M.V., Beabealashvili R.S., Gottich B.P. 1983. Synthetic sequence-specific ligands. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **47**, 367–378.
18. Grokhovsky S.L., Zubarev V.E. 1991. Sequence-specific cleavage of double-stranded DNA caused by X-ray ionization of the platinum atom in the Pt-bis-netropsin – DNA complex. *Nucleic Acids Res.* **19**, 257–264.
19. Гроховский С.Л., Готтих Б.П., Жузе А.Л. 1992. Лиганды, обладающие сродством к определенным последовательностям пар оснований ДНК. IX. Синтез аналогов нетропсина и дистамицина А, содержащих остаток сарколизина или атом платины(II). *Биоорганическая химия*. **18**, 570–583.
20. Гроховский С.Л., Николаев В.А., Зубарев В.Е., Суровая А.Н., Жузе А.Л., Чернов Б.Л., Сидорова Н.Ю., Заседателев А.С., Гурский Г.В. 1992. Специфическое расщепление ДНК аналогом нетропсина, содержащим хелатирующий ион меди(II) пептид Gly-Gly-His. *Молекулярная биология*. **26**, 1274–1297.
21. Суровая А.Н., Гроховский С.Л., Буркхардт Г., Фритше Х., Циммер К., Гурский Г.В. 2002. Влияние локальной конформации ДНК на связывание бис-нетропсинов с ДНК. *Молекулярная биология*. **36**, 901–911.
22. Belikov S., Wieslander L. 1995. Express protocol for generating G + A sequencing ladders. *Nucleic Acids Res.* **23**, 310.
23. Encina M.V., Lissi E., Sarasua M., Gargallo L., Radic D. 1980. Ultrasonic degradation of polyvinylpyrrolidone: Effect of peroxide linkages. *J. Polym. Sci. Polym. Letter.* **18**, 757–760.
24. Karlin S., Campbell A.M., Mrazek J. 1998. Comparative DNA analysis across diverse genomes. *Annu. Rev. Genet.* **32**, 185–225.
25. Doerfler W. 1983. DNA methylation and gene activity. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 93–124.
26. Tazi J., Bird A. 1990. Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell*. **60**, 909–920.
27. SantaLucia J., Jr. 1998. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 1460–1465.
28. Davey C.S., Pennings S., Reilly C., Meehan R.R., Allan J. 2004. A determining influence for CpG dinucleotides on nucleosome positioning in vitro. *Nucleic Acids Res.* **32**, 4322–4331.
29. Bustamante C., Smith S.B., Liphardt J., Smith D. 2000. Single-molecule studies of DNA mechanics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 279–285.
30. Hagerman P.J. 1988. Flexibility of DNA. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **17**, 265–286.
31. Cloutier T.E., Widom J. 2004. Spontaneous sharp bending of double-stranded DNA. *Mol. Cell*. **14**, 355–362.
32. Arai Y., Yasuda R., Akashi K., Harada Y., Miyata H., Kinoshita K., Jr. 1999. Tying a molecular knot with optical tweezers. *Nature*. **399**, 446–448.
33. Wells R.D., Dere R.L., Hebert M., Napierala M., Son L.S. 2005. Advances in mechanisms of genetic instability related to hereditary neurological diseases. *Nucleic Acids Res.* **33**, 3785–3798.
34. Rich A., Zhang S. 2003. Z-DNA: the long road to biological function. *Nature reviews. Genetics*. **4**, 566–572.