



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 17 \* № 7 \* 1991

УДК 577.413.7

© 1991 г.

*Н. Д. Кобец, Е. Л. Черноловская, Е. М. Иванова,  
В. В. Власов*

## БЕЛКИ ХРОМАТИНА КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫСЫ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОТИМИДИЛАТА

*Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР*

Исследовано взаимодействие алкилирующего производного олигодезоксириботимидилата, комплементарного poly(A)-повторам ДНК, с белковыми компонентами хроматина клеток печени крысы. Обнаружены два белка, специфично реагирующие с этими олигонуклеотидными производными в составе хроматина, одна из которых, по всей видимости, принадлежит к белкам ядерного матрикса. Наборы модифицированных белков, получаемых в результате взаимодействия хроматина с производными  $T_{16}$  и  $A_{16}$ , одинаковы, что позволяет предположить, что реакция алкилирования протекает в составе комплементарного комплекса олигонуклеотидного «адреса» реагента с соответствующим участком расплетенной ДНК хроматина, содержащим poly(A)- и poly(T)-тракты. Обнаружено различие в наборах алкилируемых производным oligo(T) белков в составе хроматина из клеток интактной и регенерирующей печени крысы, что может быть связано со структурными перестройками, сопровождающими процесс активации хроматина при репликации. Полученные результаты позволяют надеяться на перспективность использования данного подхода для изучения структуры хроматина, в частности белкового окружения определенных участков ДНК, открытых для комплементарного взаимодействия с олигонуклеотидом.

Ранее нами было обнаружено специфическое взаимодействие производных олигодезоксириботимидилата с ДНК в составе хроматина, предположительно в тех его участках, где происходит локальное расплетение двусpirальной структуры [1—4]. При образовании специфических комплексов с poly(A)-трактами ДНК в составе хроматина алкилирующее производное oligo(T) взаимодействует не только с ДНК, но и с белками, расположенными вблизи этого участка ДНК.

В настоящей работе представлены результаты анализа белков, подвергающихся алкилированию реакционноспособным производным гексадекадезоксириботимидилата. В качестве реакционноспособной группы использовали остаток 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензиламина, присоединенного к олигонуклеотиду по 5'-концевому [ $^{32}\text{P}$ ]fosфату фосфамидной связью ( $\text{RCI-T}_{16}$ ).

Модифицированные в составе хроматина белки анализировали с помощью гель-электрофореза. Белковые пробы предварительно обрабатывали микрококковой нукleaseй с целью разрушения ковалентно присоединенного к белку олигонуклеотидного фрагмента, который мог изменить подвижность модифицированного белка при электрофорезе. Данные рис. 1 свидетельствуют о том, что в составе хроматина из интактной печени крысы имеются два белка со средними молекулярными массами ~19—20 и 27—28 кДа, алкилируемых 5'-RCI-T<sub>16</sub> (дорожка 1). При использовании 10-кратного по отношению к реагенту избытка немодифицированного T<sub>16</sub> в условиях алкилирования хроматина наблюдается ингибирование алкилирования этих белков (дорожка 3), тогда как избыток олигодезоксирибонуклеотида N<sub>16</sub> с произвольной последовательностью

Префикс «d» в обозначениях дезоксирибонуклеотидов всюду опущен.

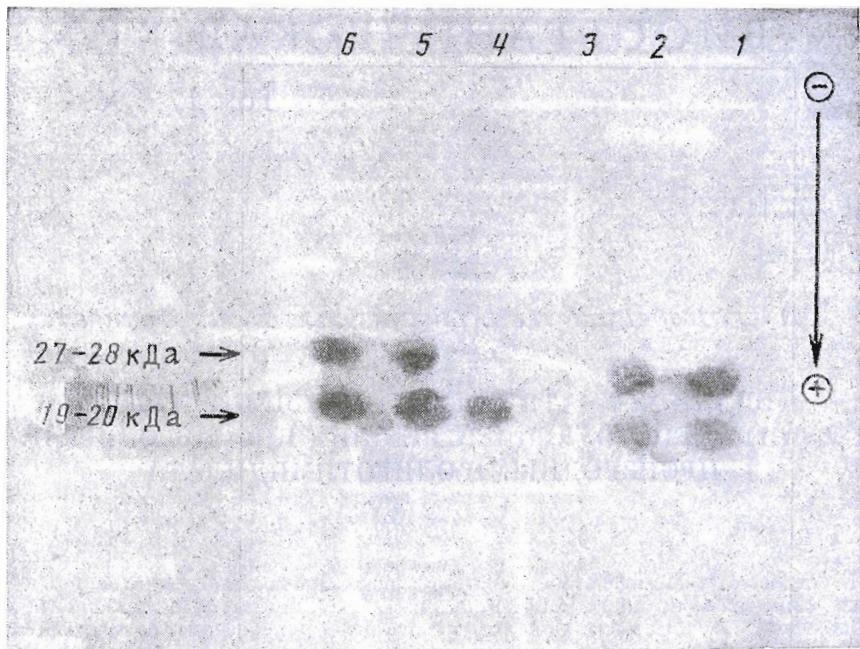


Рис. 1. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 10—15% ПААГ в присутствии SDS белков хроматина, алкилированных RCl-T<sub>16</sub>, в составе хроматина (1), в составе хроматина в присутствии 10-кратного избытка N<sub>16</sub> (2) или избытка T<sub>16</sub> (3); белков, алкилированных в составе ДНП, полученного обработкой хроматина 2 (4), 0,6 (5) и 0,35 М NaCl (6) [2]

CATGCCAAACCTTCCC не влияет на алкилирование данных белков (дорожка 2). Это указывает на специфичность взаимодействия с белками RCl-T<sub>16</sub> именно в составе комплементарного комплекса [poly(A)-участки ДНК хроматина — RCl-T<sub>16</sub>], хотя строго не исключает возможность алкилирования белков, не расположенных в составе хроматина не вблизи poly(A)-трактов расплетенных участков ДНК, а имеющих, например, повышенное сродство к oligo(T)-последовательностям. Данные анализа белковых компонентов, алкилируемых RCl-A<sub>16</sub> в составе хроматина (рис. 2, 2), демонстрируют тот же белковый состав, что и в случае использования RCl-T<sub>16</sub> (дорожка 1), и это, по нашему мнению, свидетельствует в пользу протекания реакции алкилирования белков через образование комплементарного комплекса олигонуклеотидного «адреса» реагента с соответствующим участком расплетенной ДНК хроматина.

Если верно наше предположение о том, что происходит алкилирование белков, доступных реагенту, закрепленному нуклеотидным «адресом» на poly(A)-участке ДНК хроматина, обладающем признаками денатурированности, то наблюдаемое нами отсутствие модификации гистоновых белков отражает тот факт, что доступные для взаимодействия с 5'-RCl-производными T<sub>16</sub> poly(A)-участки ДНК располагаются в дегистонизированных областях хроматина. Это коррелирует с данными о том, что poly(A)-poly(T)-тракты ДНК не образуют нуклеосомной структуры [5].

Интересно, что белок с молекулярной массой ~19—20 кДа модифицируется 5'-RCl-T<sub>16</sub> как в составе интактного хроматина, так и в составе дезоксирибонуклеопротеида, полученного обработкой хроматина 2 М NaCl (ДНП-2) (рис. 1, 4). Такой дезоксирибонуклеопротеид представляет собой структуру, выявляемую на электронно-микроскопических препаратах как сохранившиеся нити или фибриллы ДНК, которые в виде петель закрепляются на белках ядерного матрикса. Таким образом, белок 19—20 кДа может быть представителем группы белков ядерного матрикса. Следует отметить, что имеется ряд литературных данных о наличии де-

Рис. 2. Радиоавтографа электрофоретического разделения белков хроматина, алкилированных RCl-T<sub>16</sub> (1) и 5'-RCl-A<sub>16</sub> (2)

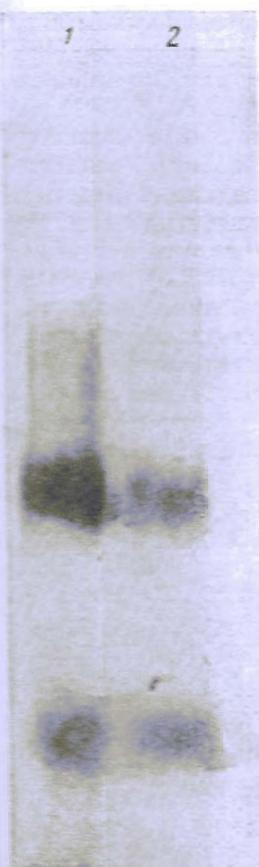


Рис. 2

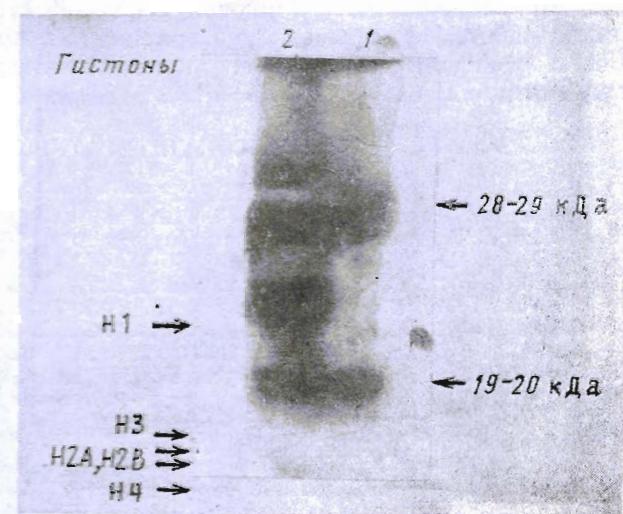


Рис. 3

натурированных участков ДНК, которые потенциально могут быть доступными для комплементарно-адресованной модификации, в местах прикрепления ДНК к ядерному матриксу и об обогащении этих участков ДНК повторяющимися последовательностями [6].

При сравнении наборов алкилированных белков из хроматина интактной и регенерирующей \* печени крысы были обнаружены различия (рис. 3, 1, 2). На радиоавтографе электрофоретического разделения белков хроматина из регенерирующей печени крысы наряду с пятнами, соответствующими белкам ~19–20 и ~29–30 кДа, появляются два новых пятна, соответствующие белкам молекулярных масс ~22–23 и 29–30 кДа. Наблюдаемые различия в наборах модифицированных белков могут быть связаны с изменениями доступности белков для алкилирования при структурных перестройках, сопровождающих процесс активации хроматина в репликации.

Таким образом, полученные результаты указывают на возможность использования метода комплементарно-адресованной модификации для изучения белкового окружения определенных последовательностей ДНК, расположенных в расплетенных участках хроматина, и открывают тем самым новый способ получения информации о структурно-функциональных перестройках хроматина.

#### Экспериментальная часть

Дезоксирибонуклеотиды T<sub>16</sub>, A<sub>16</sub>, N<sub>16</sub> синтезировали по методу, описанному в работе [7]. 5'-<sup>32</sup>P-радиоактивную метку в олигонуклеотиды вводили ферментативно по методу [8]. Ядра из клеток печени крысы вы-

\* Регенерирующая печень — печень, в клетках которой через 22–24 ч после частичной гепатэктомии наблюдается максимум репликации.

деляли по способу [9]. 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензилфосфамиды 5'-гексадекадезоксирибонуклеотидов получали как описано ранее [10]. Интактные ядра и хроматин алкилировали 5'-фосфамидными производными олигонуклеотидов в буфере А (15 мМ трис-HCl (рН 7,3), 0,34 М сахароза, 4 мМ EDTA, 60 мМ KCl, 15 мМ NaCl, 4 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,15 мМ спермин, 0,5 мМ спермидин, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид). Реакционную смесь инкубировали 18–20 ч при 25° С (концентрация реагента 10<sup>-6</sup> М). Белки отделяли от ДНК методом ультрацентрифугирования на центрифуге Beckman L-8M (ротор TST-60) при 36 000 об/мин в течение 18 ч при 16° С в буфере, содержащем 0,01 М трис-HCl (рН 7,3), 1% SDS, 2 М NaCl и 5 М мочевину. Супернатант, содержащий белки, дialisировали против 0,01 М трис-HCl (рН 7,3) с 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторидом, обрабатывали микрококковой нуклеазой (Sigma) в условиях, описанных в работе [11], затем концентрировали с помощью 30% фиколла-400. Белки осаждали холодным ацетоном и анализировали электрофорезом в градиентном ПААГ (10–45%) с 0,1% SDS по методике [12].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Власов В. В., Иванова Е. М., Кобец Н. Д., Мамаев С. В., Шульженко С. Г., Якубов Л. А. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 282. № 1. С. 196–199.
2. Vlassov V. V., Kobetz N. D., Chernolovskaya E. L., Demidova S. G., Borissov R. G., Ivanova E. M. // Mol. Biol. Rep. 1990. V. 14. № 1. P. 11–15.
3. Власов В. В., Кобец Н. Д., Черноловская Е. Л., Иванова Е. М., Субботин В. М., Якубов Л. А. // Биополимеры и клетка. 1989. Т. 5. № 3. С. 49–53.
4. Беллев Н. Д., Власов В. В., Кобец Н. Д., Иванова Е. М., Субботин В. М., Якубов Л. А. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 291. № 1. С. 234–236.
5. Kunkel G. R., Martinson H. G. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 24. P. 6869–6888.
6. Razin S. V., Mantieva V. L., Georgiev G. P. // Nucl. Acids Res. 1978. V. 5. № 12. P. 4737–4751.
7. Заритова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 516–521.
8. Berkner K. L., Folk W. R. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. № 10. P. 3176–3183.
9. Shick V. V., Belyavsky A. V., Bavykin S. G., Mirzabekov A. D. // J. Mol. Biol. 1980. V. 139. № 3. P. 491–517.
10. Мищенко Г. Ф., Самулов В. В., Шубина Т. Н. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 6. С. 886–893.
11. Hewish D. R., Burgoyne L. A. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1973. V. 52. № 2. P. 475–481.
12. Laemmli U. K., Favre M. // J. Mol. Biol. 1973. V. 80. № 4. P. 575–599.

Поступила в редакцию  
14.IX.1990

N. D. KOBEZ, E. L. CHERNOLOVSKAYA, E. M. IVANOVA, V. V. VLASSOV

#### PROTEINS OF THE RAT LIVER CHROMATIN INTERACTING WITH OLIGOTHYMINYLATE DERIVATIVES

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Academy of Sciences of the USSR*

Upon alkylation of the rat liver chromatin with a hexadecadeoxyribothymidylate derivative bearing 4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)benzylamine residue on the 5'-terminal phosphate two nonhiston proteins were modified under conditions of the reagent's forming complementary complexes with poly(A) sequences in DNA. The sequence-specific nature of the reaction is proved by the competition experiments: free oligothymidylate prevented the proteins from alkylation whereas arbitrary oligonucleotide did not. Modification with the reactive oligonucleotide derivatives can be used for the identification of proteins located in the vicinity of the specific open DNA regions in chromatin.