



УДК 577.113.7

© 1993 Е. Л. Черноловская, П. П. Черепанов,
А. В. Горожанкин, М. И. Добриков, В. В. Власов,
Н. Д. Кобец

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФОТОАКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОТИМИДИЛАТА С ХРОМАТИНОМ КЛЕТОК HeLa

Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения РАН

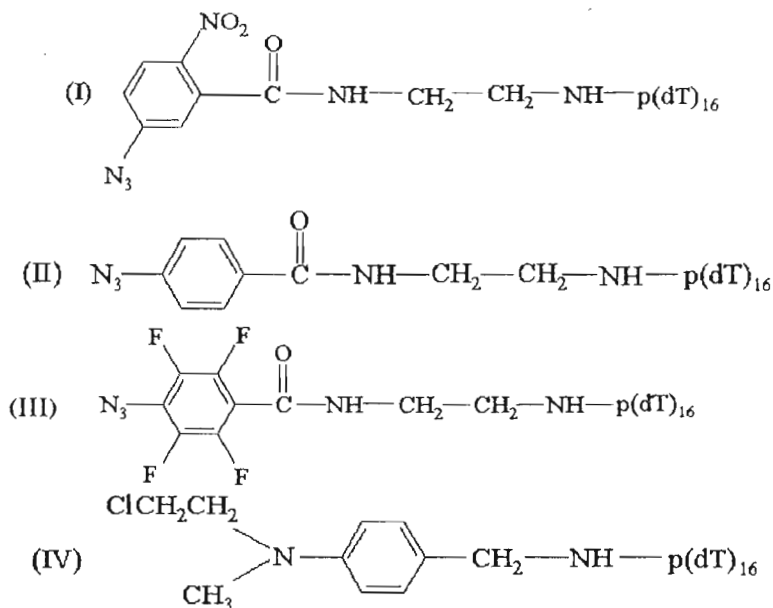
Проведено сравнение эффективности и специфичности модификации ДНК и белков хроматина фотоактивными производными гексадекадезоксириботимидилата, содержащими на 5'-конце *n*-азидобензоиламидную, 2-нитро-5-азидобензоиламидную и *n*-азидоперфторбензоиламидную группы с ранее использовавшимся для этой цели алкилирующим производным гексадекадезоксириботимидилата [RC1p(dT)₁₆]. Обнаружено, что фотоактивные производные олигонуклеотида модифицируют ДНК в составе интактных ядер с более низкой эффективностью, чем его алкилирующее производное. При сравнении модификации белков этими производными выявлены существенные преимущества фотоактивных реагентов: более широкий спектр модифицированных белков, более высокая степень модификации и специфичность модификации. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения этих быстродействующих (по сравнению с алкилирующими производными) реагентов для изучения белкового окружения определенных участков ДНК и его изменения в процессе функционирования.

Исследование белкового окружения определенных последовательностей ДНК в хроматине представляет существенный интерес для понимания процессов, происходящих в ядре.

В предыдущих работах мы обнаружили, что взаимодействие алкилирующего производного гексадекадезоксириботимидилата с расщепленными участками хроматина вызывает специфическую модификацию белков, расположенных вблизи этих участков [1—3]. Набор модифицированных белков различается в зависимости от стадии клеточного цикла. Ранее в ИИБХ были синтезированы и использованы для модификации ДНК-мишени фотоактивные производные олигонуклеотидов, содержащие в качестве реакционноспособных групп остатки 2-нитро-5-азидобензоиламида (I), *n*-азидобензоиламида (II) и *n*-азидотетрафторбензоиламида (III) [4, 5]. Показано, что такие фотоактивные производные олигонуклеотидов образуют стабильные комплексные комплексы с одноцепочечными ДНК-мишенями и эффективно их модифицируют. Можно предположить, что эти производные могут быть использованы для исследования тонкой структуры хроматина. Высокая реакционноспособность арилазидных производных при облучении в условиях, обеспечивающих сохранение нативной структуры хроматина, делает возможным их применение для исследования динамики процессов, происходящих при функционировании клеточного ядра.

Реагент	Степень модификации	
	мкмоль/моль ДНК	пмоль/мг белка
(I)	3,3	10
(II)	1,1	12
(III)	2,5	24
(IV)	20	4

В настоящей работе приведены результаты сравнительного анализа ДНК и белков хроматина, подвергающихся модификации алкилирующими и фотоактивными производными олиготимидилата:



Для синтеза реагентов использовали ^{32}P -меченный по 5'-концу олигонуклеотид. ДНК, обработанную реагентом в составе ядер клеток HeLa, выделяли и анализировали с помощью гель-фильтрации в денатурирующих условиях. Степень модификации ДНК оценивали, учитывая удельную активность реагентов и принимая молярный коэффициент поглощения усредненного нуклеотидного звена ДНК равным $7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [6]. Степени модификации ДНК по олиго(dA)-последовательностям фотоактивными производными (I — III) оказались несколько ниже, чем степени модификации алкилирующим производным олиготимидилата (IV) (таблица). Это согласуется с данными работ [4, 5], в которых показано, что эффективная модификация ДНК-мишени наблюдается только по остаткам гуанина и цитозина, а остатки аденина модифицируются слабее.

Модифицированные в составе хроматина белки анализировали с помощью SDS-электрофореза. Молекулярные массы модифицированных белков оценивали по калибровочной кривой молекулярных масс стандартного набора маркеров. Данные сканирования радиоавтографа (рис. 1) свидетельствуют, что при модификации хроматина фотореагентами (I—III) появляется новый компонент (1), которого не было видно при модификации реагентом (IV). Это говорит о большей

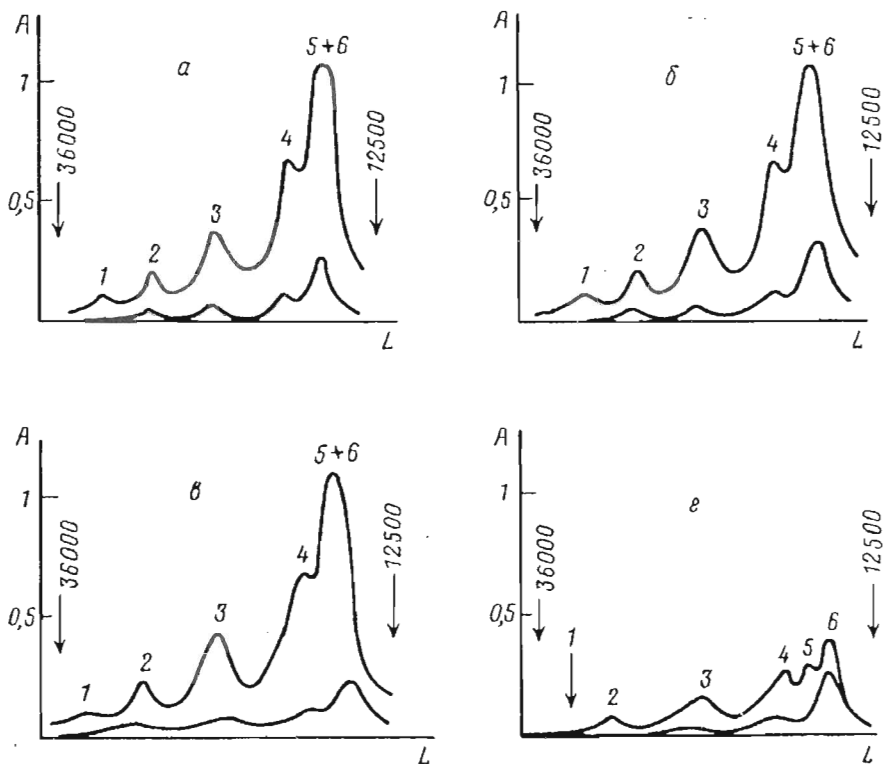


Рис. 1. Денситограммы радиоавтографа геля с белками хроматина, модифицированными реагентами (I) — (IV) (а — г) в отсутствие (верхние кривые) и при добавлении 10-кратного избытка р(dT)₁₆ (нижние кривые). А — нормированное оптическое поглощение, L — подвижность белка. Стрелками указаны положения маркеров мол. масс 36 и 12,5 кДа и компонента 1, выявляемого при фотоаффинной модификации

чувствительности метода при использовании фотореагентов. Для доказательства специфичности модификации использовали добавление в реакционную смесь избытка свободного гексадекадезокситимидилата, 10-кратного по отношению к реагентам (нижние кривые на денситограмме). Сравнительные данные сканирования радиоавтографа геля, полученного при разделении белков, модифицированных в присутствии и в отсутствие ингибитора (нижние и верхние кривые соответственно на рис. 1), говорят о том, что, за исключением модификации алкилирующим реагентом белка, соответствующего пику б на денситограмме, в присутствии избытка свободного олигонуклеотида во всех случаях наблюдается существенное ингибирование модификации, что указывает на ее специфичность. Возможно, частично имеет место неспецифическое связывание алкилирующего реагента с белком пика б.

Относительная степень модификации индивидуальных белков определялась по площадям пиков на денситограмме. Все три фотоактивных реагента модифицируют белки хроматина приблизительно одинаково и существенно эффективнее, чем алкилирующий реагент (рис. 2).

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что фотоактивные реагенты (I—III) обладают рядом преимуществ перед алкилирующим реагентом (IV), такими, как большая эффективность, специфичность и высокая реакционная способность, что позволяет сократить время инкубации высоколабильных препаратов и делает перспективным использование этих реагентов для комплементарно-адресованной модификации белков хроматина.

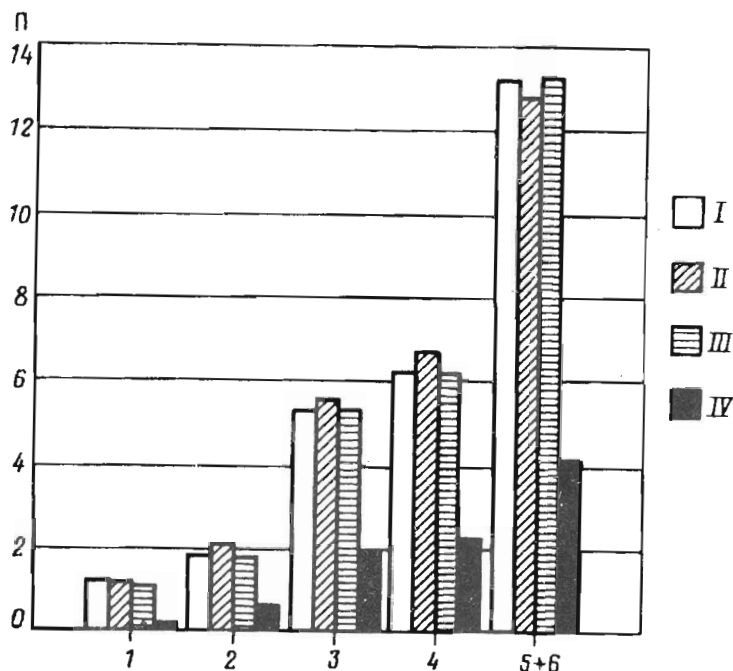


Рис. 2. Относительные степени модификации белков хроматина (пики 1—6 на рис. 1) реагентами (I) — (IV). П — площадь пика на денситограмме

Экспериментальная часть

Дезоксирибонуклеотид $p(dT)_{16}$ любезно предоставлен Т. В. Абрамовой (НИБХ СО РАН). Его метили ^{32}P по 5'-концу по методу [7]. 4-[(N-2-Хлорэтил-N-метил)амино]бензилфосфамид, 2-нитро-5-азидобензоиламид, *n*-азидобензоиламид и *n*-азидотетрафторбензоиламид присоединяли к 5'-концу ^{32}P -меченого $p(dT)_{16}$ как описано ранее [5, 8]. Ядра из клеток HeLa выделяли по [9]. Интактные ядра модифицировали 5'-фосфамидными производными олигонуклеотида в буфере А (15 мМ трис-НСl, рН 7,3, 0,34 М сахараза, 4 мМ EDTA, 60 мМ KCl, 15 мМ NaCl, 4 мМ CaCl₂, 0,15 мМ спермин, 0,5 мМ спермидин, 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид (PMSF)). Реакционную смесь в случае алкилирующего реагента инкубировали 18—20 ч при 25° С (концентрация реагента 10⁻⁶ М). Реакционную смесь с фотоактивными производными инкубировали 30 мин во льду для образования комплементарного комплекса и облучали 5 мин светом ртутной лампы ДРК-120 (303—365 нм, светофильтр УФС-2) мощностью 5 · 10⁻⁴ Вт · см⁻². Условия облучения выбраны по данным работ [5, 10]. Время полуфотоллиза в выбранных условиях для всех фотореагентов составляет 0,3—1 мин. В экспериментах по ингибированию перед добавлением модифицирующего реагента ядра преинкубировали 30 мин во льду с 10-кратным избытком немеченого $p(dT)_{16}$. ДНК выделяли согласно [6] и отделяли от ковалентно не связанного реагента гель-фильтрацией на сефадексе G-100 в буфере 10 мМ трис-НСl (рН 7,5), 7 М мочевины. Для анализа белков ядра лизировали в буфере для подготовки образцов (sample buffer) и белки анализировали электрофорезом в градиентном полиакриламидном геле (10—15%) с 0,1% SDS по [11]. Радиоавтографы сканировали на лазерном сканере Ultrosan фирмы LKB, данные обрабатывали с помощью программы Gelscan.

Авторы выражают благодарность Т. А. Приходько (Новосибирский институт биоорганической химии) за оказанную помощь в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кобец Н. Д., Черноловская Е. Л., Иванова Е. М., Власов В. В. //Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 7. С. 518—521.
2. Vlassov V. V., Kobets N. D., Chernolovskaya E. L., Demidova S. G., Borissov R. G., Ivanova E. M. //Mol. Biol. Rep. 1990. V. 14. P. 11—15.
3. Chernolovskaya E. L., Kobets N. D., Borissov R. G., Abramova T. V., Vlassov V. V. //FEBS Lett. 1992. V. 303. № 2, 3. P. 269—271.
4. Tabatadze D. R., Dobrikov M. I., Levina A. S., Prikhodko T. A., Shishkin G. V., Zarytova V. F. //Synthetic Oligonucleotides: Problems and Frontiers of Practical Application/Nucleic Acids Symposium Series. 1991. № 24. P. 247.
5. Добриков М. И., Зарьтова В. Ф., Комарова Н. И., Левина А. С., Лохов С. А., Приходько Т. А., Шишкин Г. В., Табатадзе Д. Р., Заалишвили М. М. //Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 4. С. 540—549.
6. Schleif R. F., Wensink P. C. //Practical Methods in Molecular Biology. Springer-Verlag, 1981. P. 99—100.
7. Berkner K. L., Folk W. R. //J. Biol. Chem. 1977. V. 252. № 10. P. 3176—3183.
8. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. //Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 6. С. 886—893.
9. Shick V. V., Belyaevsky A. V., Vavukin S. G., Mirzabekov A. D. //J. Mol. Biol. 1980. V. 139. № 3. P. 491—517.
10. Добриков М. У., Приходько Т. А., Сафронов И. В., Шишкин Г. В. //Сиб. хим. журн. 1992. Вып. 2. С. 18—23.
11. Laemmli U. K., Favre M. //J. Mol. Biol. 1973. V. 80. P. 575—599.

Поступила в редакцию
23.XI.1992

После доработки
8.II.1993

*E. L. Chernolovskaya, P. P. Cherepanov, A. V. Gorogjankin,
M. I. Dobrikov, V. V. Vlassov, N. D. Kobets*

INTERACTIONS OF PHOTOACTIVE OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES WITH CHROMATIN FROM HeLa CELLS

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of
Sciences, Novosibirsk*

Photoactive derivatives of d(pT)₁₆, bearing arylazide, nitroarylazide and perfluoroarylazide residues, were used for the complementary addressed modification of DNA and proteins in chromatin. As compared with alkylating derivatives, the photoactive compounds possess higher efficiency and specificity, and shorter incubation times which prevents nucleus from degradation. These reagents can therefore be used for identification of proteins located near to particular DNA regions in chromatin.