



УДК 577.113.7

НАПРАВЛЕННАЯ ПО $d(GT)_n$ -ПОВТОРЯЮЩИМСЯ УЧАСТКАМ ДНК ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ХРОМАТИНА КЛЕТОК ЭУКАРИОТ

© 1998 г. Л. Н. Боженок[#], В. В. Власов, Е. Л. Черноловская, Е. М. Иванова, Н. Д. КобецНовосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 19.01.98 г. Принята к печати 12.05.98 г.

Исследована специфическая химическая модификация ДНК и белков хроматина эукариотических клеток алкилирующим производным $pd(AC)_6$ (комплементарным $d(GT)_n$ -повторам ДНК), содержащим на 5'-конце остаток 4-(*N*-метил-*N*-2-хлорэтиламино)бензиламина. Показано, что эффективность модификации как ДНК, так и белков возрастает в присутствии спермина и спермидина и резко снижается в случае предварительной обработки хроматина нуклеазой S1 в условиях мягкого расщепления одноцепочечных участков ДНК, что свидетельствует в пользу того, что одной из причин наличия расплетенных, доступных для взаимодействия с комплементарным олигонуклеотидом участков в ДНК, содержащей повторяющиеся блоки $d(GT)_n$, является реализация $B \rightarrow Z$ -перехода. Проанализированы белки, подвергающиеся специфическому алкилированию в составе хроматина, по всей видимости, расположенные в зонах локального расплетения ДНК в хроматине, вблизи $d(GT)_n$ -повторов.

Ключевые слова: хроматин; ядерные белки; производные олигонуклеотидов; $B \rightarrow Z$ -переходы; полиамины.

Ранее нами было показано, что ДНК в составе интактного хроматина и клеточных ядер может подвергаться специфической химической модификации с помощью реакционноспособных производных олигонуклеотидов, комплементарных различным повторам ДНК. При этом наблюдалась специфическая модификация как ДНК, так и ядерных белков, расположенных вблизи ДНК-мишеней [1–3]. Наиболее вероятным представляется протекание модификации по расплетенным участкам ДНК, которые могут в ней присутствовать благодаря наличию суперспирализованных доменов, и взаимодействию ее со специфическими белками, способными расплетать двойную спираль. Такие участки могут появляться и в ходе процессов репликации, транскрипции [4, 5].

Динуклеотидный повтор $d(GT)_n$, к которому комплементарен использованный в данной работе олигонуклеотид $pd(AC)_6$, составляет около 0.5% генома эукариот. Относительно короткие участки этого повтора (до 50 п. о.) встречаются в среднем с частотой 1 на 30–100 т. п. о. в эукариотическом геноме [6, 7]. Повтор $d(GT)_n$ обнаружен в участках перехода ДНК из *B*-конформации в *Z*-конформацию [8–10]. Конформационный переход может провоцировать локальное расплетение ДНК на границах *R*- и *Z*-конформаций, а сама ДНК может быть доступна для комплементарного взаимодействия с реакционноспособным производным комплементарного олигонуклеотида.

В ряде работ было показано, что природные полиамины (спермин и спермидин) индуцируют в ДНК конформационный переход $B \rightarrow Z$, стабилизируя левоспиральную *Z*-форму ДНК при физиологических ионных условиях [11–14].

В данной работе исследована аффинная модификация хроматина и интактных ядер эукариотических клеток (клеток человека и клеток печени крысы) алкилирующим производным додекаолигонуклеотида $pd(AC)_6$ по $d(GT)_n$ -повторам ДНК в физиологических условиях и в присутствии спермина и спермидина в высоких концентрациях. Проведен анализ белков хроматина, подвергающихся при этом специфической модификации производным олигонуклеотида.

В использованный олигонуклеотид $pd(AC)_6$ по 5'-концу была введена изотопная метка с помощью полинуклеотидкиназы и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ [15]. В качестве алкилирующей реакционноспособной группы был использован остаток 4-(*N*-метил-*N*-2-хлорэтиламино)бензиламина (RCl), присоединенный к 5'-концу олигонуклеотида фосфамидной связью. Комплексообразование и реакцию алкилирования хроматина и интактных ядер проводили при 25°C и концентрации реагента 10^{-6} М. Увеличение концентрации реагента, как было показано в предварительных экспериментах, не приводило к повышению степени модификации ДНК. Степень модификации ДНК определяли после ее выделения фенольной депротенинизацией из реакционной смеси и отделения от ковалентно не связанного олигонуклеотида гель-фильтрацией в денатурирующих условиях.

[#] Автор для переписки.

Из рис. 1а видно, что алкилирующее производное $(RCI)^*pd(AC)_6$ модифицирует ДНК специфически по выбранной $d(GT)_6$ -мишени: в присутствии 10-кратного избытка свободного олигонуклеотида $pd(AC)_6$ модификация существенно ниже, а присутствие такого же избытка олигонуклеотида произвольно выбранной последовательности $pd(N)_{16}$ ($pd(CATGCAAAACSTTCCS)$) практически не влияет на относительную степень модификации ДНК.

Предварительная обработка хроматина нуклеазой S1 в мягких условиях, позволяющих расщеплять одноцепочечные участки ДНК, также приводит к резкому снижению относительной степени модификации ДНК, что свидетельствует о протекании взаимодействия производного олигонуклеотида $(RCI)^*pd(AC)_6$ по одноцепочечным участкам ДНК. При этом обнаружено, что в присутствии высоких концентраций спермина (рис. 1а, 2) и спермидина (рис. 1а, 3) относительная степень модификации ДНК увеличивается.

Аналогичная картина получена при сравнении относительных степеней модификации суммарного ядерного белка в разных условиях (рис. 1б): увеличение концентрации спермина и спермидина приводит к увеличению относительной степени модификации ядерного белка. Это позволяет в соответствии с литературными данными предположить, что в ДНК повторяющиеся блоки $d(GT)_n$ расплетены и доступны для взаимодействия с комплексным олигонуклеотидом, а возможной причиной расплетения является $B \rightarrow Z$ -переход. Известно, что такие последовательности, как $d(AC)_n$, $d(GT)_n$, способные к $B \rightarrow Z$ -переходу, присутствуют в энхансерных и других регуляторных элементах различных генов [6–8] и могут влиять на экспрессию генов *in vitro* [19]. При определенных условиях, в том числе в присутствии природных полиаминов, $B \rightarrow Z$ -переход может играть важную роль в регуляции экспрессии генов как соответствующий конформационный сигнал к изменению связывания ДНК с регуляторными белками. Известно, что полиамины могут модулировать взаимодействие ген-регуляторных белков и специфических последовательностей ДНК [20].

Нами проанализированы белки хроматина, подвергающиеся специфическому алкилированию производным $(RCI)^*pd(AC)_6$ в составе интактных ядер клеток печени крысы и клеток HeLa. Белки выделяли по стандартной процедуре и анализировали электрофорезом в ПААГ с 0.1% SDS [3]. На рис. 2 приведены данные по модификации белков в составе хроматина. Алкилирование ядер клеток печени крысы (рис. 2) приводит к модификации по крайней мере 7 белков с молекулярными массами 19.5; 21; 25.5; 31; 33; 38 и 43 кДа (дорожка 1). Модификация этих белков ингибируется в

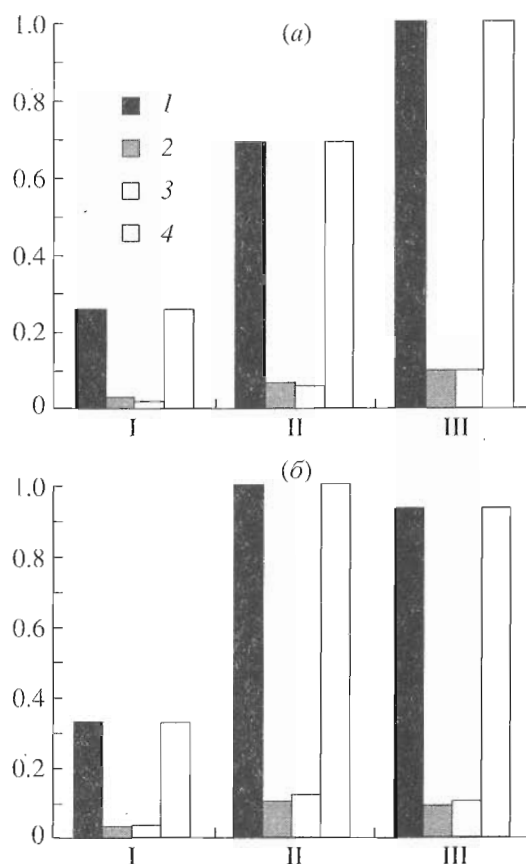


Рис. 1. Относительная степень модификации ДНК (а) и суммарного белка (б) в составе хроматина клеток HeLa $(RCI)^*pd(AC)_6$ в буферах А (15 мМ Трис-НСl, рН 7.3, 0.34 М сахараза, 4 мМ EDTA, 60 мМ KCl, 15 мМ NaCl, 4 мМ CaCl₂, 0.15 мМ спермин, 0.5 мМ спермидин, 0.1 мМ фенилметилсульфонилфторид) (I), К1 (1 мМ какодilat натрия, 50 мМ NaCl, 0.5 мМ спермин) (II) и К2 (1 мМ какодilat натрия, 50 мМ NaCl, 2.8 мМ спермидин) (III). Модификацию осуществляли без добавления свободных олигонуклеотидов (1), в присутствии 10-кратного избытка свободного олигонуклеотида $pd(AC)_6$ (2), после предварительной обработки ядер нуклеазой S1 (3) и в присутствии 10-кратного избытка свободного олигонуклеотида $pd(N)_{16}$ (4).

присутствии 10-кратного избытка свободного олигонуклеотида $pd(AC)_6$ (рис. 2, 2). Предварительная обработка хроматина нуклеазой S1 в мягких условиях практически полностью ингибирует модификацию (рис. 2, 3), что свидетельствует о том, что модификации подвергаются белки, окружающие расплетенные участки ДНК. Олигонуклеотид с произвольно выбранной последовательностью $pd(N)_{16}$ не влияет на модификацию данных белков (рис. 2, 4). Интересно отметить, что белок с молекулярной массой 19.5 кДа подвергается модификации и в составе дезоксирибонуклеопротеида, полученного из хроматина обработкой 2М NaCl (ДНП-2) (рис. 2, 5), который представляет собой структуру, выявляемую на электронно-микроскопических препаратах в виде петель ДНК, за-

* р – ³²Н-меченый фосфат.

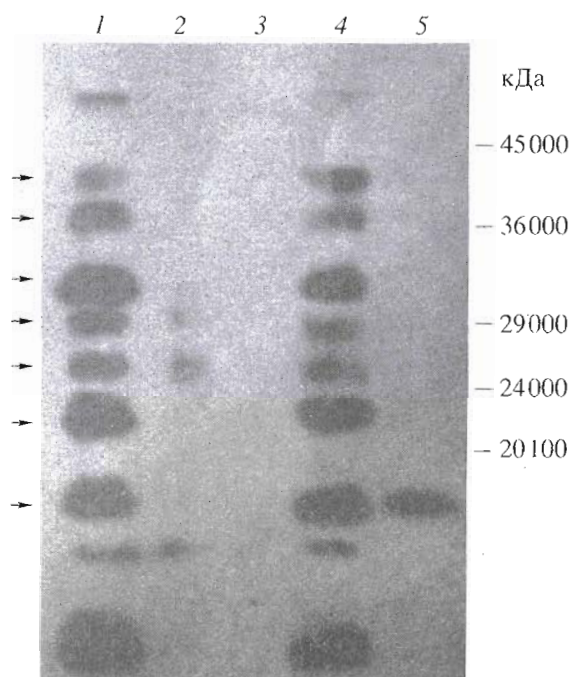


Рис. 2. Анализ электрофорезом в ПААГ в присутствии 0.1% SDS модифицированных $(RCl)^*pd(AC)_6$ в составе хроматина клеток печени крысы белков. Модификация осуществлена в составе интактного хроматина (1), в присутствии 10-кратного избытка $pd(AC)_6$ (2), после предварительной обработки ядер нуклеазой S1 (3), в присутствии 10-кратного избытка $pd(N)_{16}$ (4). 5 – Модификация в составе ДНП-2, полученного обработкой ядер 2M NaCl [2].

крепленных на белках ядерного матрикса. Это позволяет предположить, что белок 19.5 кДа может быть представителем группы белков ядерного матрикса. Следует отметить, что имеется ряд литературных данных о наличии в ядре денатурированных участков ДНК, которые потенциально могут быть доступны для специфической модификации ДНК, в местах ее прикрепления к ядерному матриксу. Эти участки обогащены повторяющимися последовательностями [22, 23].

Алкилирование ядер клеток HeLa производным $(RCl)^*pd(AC)_6$ приводит к модификации более десятка белков с молекулярными массами 19.5; 21; 25.5; 31; 33; 43 и 67 кДа (рис. 3, 1) в сравнении с хроматином клеток печени крысы (различие в одном белке). Модификация этих белков ингибируется в присутствии 10-кратного избытка свободного олигонуклеотида $pd(AC)_6$ (рис. 3, 2). Предварительная обработка ядер нуклеазой S1 в условиях расщепления односпиральных участков ДНК также приводит к существенному ингибированию модификации этих белков (рис. 3, 3), что позволяет думать, что эти белки расположены в зонах локального расплетения в хроматине нитей ДНК, содержащих $d(GT)_n$ -повторы.

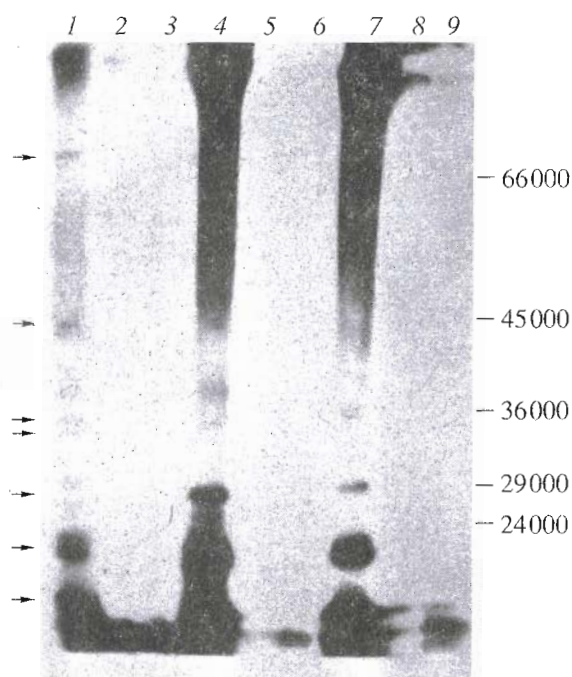


Рис. 3. Анализ электрофорезом в ПААГ в присутствии 0.1% SDS модифицированных $(RCl)^*pd(AC)_6$ в составе хроматина клеток HeLa белков. Модификация проведена в буфере А (дорожки 1–3), K1 (4–6) и K2 (7–9) в составе интактного хроматина (1, 4, 7), в присутствии 10-кратного избытка $pd(AC)_6$ (2, 5, 8) и после предварительной обработки ядер нуклеазой S1 (3, 6, 9). Состав буферов см. подпись к рис. 1.

Интересно отметить, что присутствие в реакционной смеси природных аминов спермина и спермидина в высоких концентрациях приводит к существенно более высокой относительной степени модификации ряда белков $(RCl)^*pd(AC)_6$ (см. рис. 3, дорожки 4, 7). Появляется также несколько новых белков, что, по нашему мнению, может быть связано с высокой динамичностью структуры хроматина и появлением расплетенных участков в $d(GT)_n$ -повторах ДНК в хроматине благодаря стимуляции полиаминами $B \rightarrow Z$ -перехода [11–14].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигонуклеотиды и алкилирующее производное $pd(AC)_6$ синтезировали по методикам, описанным в [24, 25]. Олигонуклеотид метили по 5'-концу с помощью полинуклеотидкиназы и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ по методу [15]. Ядра и хроматин из клеток печени крысы выделяли по методике [26], ядра из клеток HeLa, как описано в работе [27]. Интактные ядра модифицировали 5'-алкилирующим производным олигонуклеотида (10^{-6} M) в буфере А (15 mM Трис-НСl, рН 7.3, 0.34 M сахароза, 4 mM EDTA, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 0.15 mM спермин, 0.5 mM спермидин, 0.1 mM фе-

нилметилсульфонилфторид) при 25°C в течение 18–20 ч. ДНК и белки выделяли как описано в работе [3]. Степени модификации ДНК и суммарного белка определяли после полного отделения полимера от ковалентно не присоединенного олигонуклеотида гель-фильтрацией в денатурирующих условиях [3]. S1-нуклеазную обработку ядер проводили в буфере (50 mM Na-ацетат, pH 4.6; 50 mM NaCl, 1 mM ZnCl₂) в течение 30 мин при 37°C и концентрации фермента 150 ед. акт./мл. По окончании инкубации ядра осадили и тщательно промывали с последующим пересажением в буфере А. Для анализа белков ядра лизировали в буфере для подготовки образцов и белки анализировали электрофорезом в градиентном полиакриламидном геле с 0.1% SDS по методике работы [28].

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 96-04-48615).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Власов В.В., Кобец Н.Д., Черноловская Е.Л., Иванова Е.М., Субботин В.М., Якубов Л.А. // Биополимеры и клетка. 1989. Т. 5. С. 49–53.
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. P. 269–271.
4. Collins J.M. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 269–271.
5. Carnevali F., Filiciny P. // Chromosoma. 1981. V. 82. P. 377–383.
6. Hamada H., Kakunaga T. // Nature (London). 1982. V. 298. P. 396–398.
7. Hamada H., Petrino M.G., Kakunaga T., Seidman M., Stollar B.D. // Mol. Cell. Biology. 1984. V. 4. P. 2610–2621.
8. Nordheim A., Pardue M.L., Lafer E.M., Moller A., Stollar B.D., Rich A. // Nature (London). 1981. V. 294. P. 417–422.
9. Haniford D.B., Pulleyblank D.E. // Nature (London). 1983. V. 302. P. 632–634.
10. Arndt-Jovin D.J., Robert-Nicout M., Zarling D.A., Gridler C., Weimer E., Jovin T.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 4344–4348.
11. Behe M., Felsenfeld G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 1619–1623.
12. Chen H.H., Behn M., Rau D.C. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. P. 2381–2395.
13. Thomas T.J., Messner R.P. // J. Mol. Biol. 1988. V. 201. P. 463–467.
14. Thomas T.J., Gunnia U.B., Thomas T. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 6137–6141.
15. Berkner K.L., Folk W.R. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 3176–3183.
16. Miesfield R., Krystal M., Arnheim N. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. P. 5931–5947.
17. Larson A., Weintraub H. // Cell. 1982. V. 29. P. 609–622.
18. Nordheim A., Rich A. // Nature (London). 1983. V. 303. P. 674–679.
19. Hamada H., Seidman M., Howard B.H., Gorman C.M. // Mol. Cell. Biol. 1984. V. 4. P. 2622–2630.
20. Thomas T., Kiang D.T. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 4705–4720.
21. Cook P.R., Brazell I.A. // J. Cell Sci. 1975. V. 19. P. 261–279.
22. Razin S.V., Mantieva V.L., Georgiev G.P. // Nucl. Acids Res. 1978. V. 5. P. 4737–4751.
23. Jackson D.A., Cook P.R., Patel S.B. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. P. 6709–6726.
24. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Романенко В.П. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 516–521.
25. Мишенина Г.Ф., Самуков В.В., Шубина Т.Н. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. С. 886–893.
26. Shick V.V., Belyavsky V.B., Bavykin S.G., Mirzabekov A.D. // J. Mol. Biol. 1980. V. 139. P. 491–517.
27. Price R., Penman S. // J. Mol. Biol. 1972. V. 70. P. 435–450.
28. Laemmli U.K. // Nature (London). 1970. V. 227. P. 680–682.

Sequence-specific Chemical Modification of Eukaryotic Cell Chromatin at d(GT)_n Repeats of DNA

L. N. Bozhenok[#], V. V. Vlasov, E. L. Chernolovskaya, E. M. Ivanova, and N. D. Kobets

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

DNA and proteins of chromatin from eukaryotic cells were specifically modified by an alkylating derivative of pd(AC)₆ (complementary to d(GT) repeats of DNA) containing a 4-(N-methyl-N-2-chloroethylamino)benzylamine residue on its 5'-end. It was shown that the efficiency of modification of both DNA and proteins increases in the presence of spermine and spermidine and sharply decreases after preliminary treatment of chromatin by nuclease S1 under conditions of mild cleavage of single-stranded DNA regions. It was suggested that one of the reasons for the presence of unwound d(GT)_n stretches in chromatin DNA accessible for interaction with the complementary oligonucleotide is the B → Z transition. Proteins specifically alkylated within the chromatin, which most likely are located in the regions of local unwinding of DNA, near the repeats, were analyzed.

Key words: chromatin, nuclear proteins, oligonucleotide derivatives, B → Z transitions, polyamines

[#] To whom correspondence should be addressed.