

STABILITY OF SECONDARY STRUCTURE OF THE OLIGONUCLEOTIDE
SUBSTRATES. THE EFFECT OF *ECODAM* DNA-METHYLASE

*N. I. Rechkunova, S. G. Lokhov, Yu. A. Gorbunov, V. V. Zinoviev,
Ya. I. Buryanov, E. G. Malygin*

All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo, Novosibirsk Region
Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region
Institute of Bioorganic Chemistry,
Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

S u m m a r y

Oligonucleotide complexes containing various defects in *Ecodam* methylase recognition site have been investigated for their stability. Partial duplex structure of the single-stranded 20-base long oligonucleotide containing a self-complementary hexanucleotide sequence is observed only below 5°C. Other complexes are melting within the narrow temperature range of 22-31°C in 30 mM of potassium-phosphate buffer, pH 7.8. Presence of *Ecodam* methylase results in an increase of complex melting point at least by 5°C.

УДК 547.963.32

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

**АФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ХРОМАТИНА АЛКИЛИРУЮЩИМ
ПРОИЗВОДНЫМ ГЕКСАДЕКАДЕЗОКСИРИБОТИМИДИЛАТА**

Показана специфическая модификация поли(dA)-трактов ДНК в составе хроматина и интактных ядер из эукариотических клеток производным гексадекадезоксириботимидилата, несущего на 5'-конце остаток 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензиламина. Исследована зависимость доступности ДНК в составе хроматина для аффинной модификации от структурно-функциональных особенностей препаратов хроматина.

Введение. Ранее нами была показана возможность комплементарно адресованной модификации хроматина и метафазных хромосом по поли(dA)-участкам ДНК с помощью алкилирующих производных олигодезоксирибонуклеотидов [1, 2]. Наиболее вероятным представляется взаимодействие производных олигонуклеотидов с одноцепочечными участками ДНК в составе хроматина, которые, как свидетельствуют литературные данные, постоянно присутствуют в ДНК сложноорганизованных ядерных структур [3, 4] и могут появляться в процессе функционирования клетки, в ходе репликации, транскрипции, могут быть результатом взаимодействия со специфическими белками, способными расплетать двойную спираль или результатом наличия в ДНК суперспирализованных доменов.

Целью настоящей работы было выяснение влияния структурно-функциональных характеристик хроматина на доступность ДНК для комплементарно адресованной модификации по поли(dA)-трактам.

Материалы и методы. Дезоксирибонуклеотиды (pdT)₁₆ и (pdN)^{*}₁₆ синтезировали по методу, описанному в работе [5]. ³²P-радиоактивную метку в олигонуклеотиды по 5'-концу вводили ферментативно по методу [6]. Ядра из клеток печени крысы выделяли по [8], из эритроцитов цыплят — по [9].

«Растворимый» хроматин получали после центрифугирования при 15000 g в течение 10 мин «суспензионной» фракции хроматина, образованной при механическом разрушении ядер в 0,001 М трис-НСl-буфере, рН 8,0.

Интактные ядра алкилировали 5'-фосфамидным производным олиго(dT) в буфере А (15 мМ трис-НСl, рН 7,3, 0,34 М сахараза, 4 мМ ЭДТА, 60 мМ КCl, 15 мМ NaCl,

* d(pCpApTpGpCpApApApCpCpTpTpCpCpC).

4 mM CaCl₂, 0,15 mM спермин, 0,5 mM спермидин, 0,1 mM ФМСФ), «растворимый» хроматин — в буфере Б (0,01 M трис-HCl, pH 7,6, 0,14 M NaCl). Реакционную смесь инкубировали при 25 °С в течение 18—20 ч (концентрация реагента ~ 10⁻⁹ M).

По окончании инкубации выделяли модифицированную ДНК методом фенольной депротеинизации при pH 8,3 в присутствии 0,5%-ного DS-Na и удаляли следы РНК с помощью РНКазной обработки, как описано в [2], либо выделяли ДНК и белки ультрацентрифугированием на L8M, ротор TST60, в течение 18 ч при 36000 об/мин в 0,2%-ном DS-Na, 7 M мочевины, 2 M NaCl.

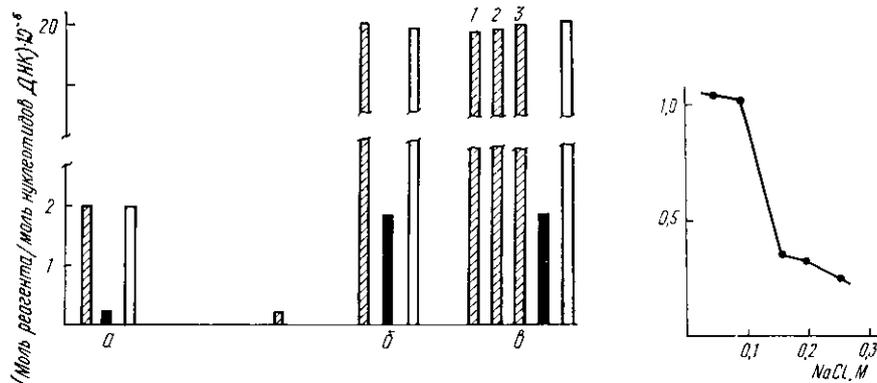


Рис. 1. Относительная степень модификации ДНК в составе хроматина из клеток эукариот алкилирующим производным (pdT)₁₆: а — «растворимый» хроматин; б — «сuspензионный» хроматин; в — интактные ядра клеток нормальной (1), регенерирующей (2) печени крыс и эритроцитов цыплят (3). Светлые и темные столбики — в присутствии 10-кратных избытков (pdN)₁₆ и свободного (pdT)₁₆ соответственно; заштрихованный одиночный — изолированная ДНК

Fig. 1. Relative extent of DNA modification in the composition of chromatin from eucaryotic cells by alkylating derivative (pdT)₁₆: а — «dissolved» chromatin; б — «suspension» chromatin; в — intact nuclei of cells from the normal (1), regenerating (2) liver of rats and erythrocytes of chickens (3). Light and dark columns — in the presence of 10-fold excess of (pdN)₁₆ and free (pdT)₁₆, respectively; cross-hatched ones — isolated DNA

Рис. 2. Зависимость степени модификации ДНК от концентрации NaCl

Fig. 2. Dependence of chromatin DNA modification extent on the NaCl concentration

Для определения степени модификации ДНК отделяли от непрореагировавшего производного олигонуклеотида гель-фильтрацией на сефадексе G-100 в денатурирующих условиях (7 M мочевины). Гель-электрофорез модифицированной ДНК проводили в 1%-ном агарозном геле при напряжении ~ 200 В в буферном растворе (0,05 M трис-HCl, pH 8,4, 0,05 M борат калия, 1 mM ЭДТА). Агарозный гель вымачивали 2 ч в буфере, содержащем 7 M мочевины, 0,05 M трис-HCl, 0,05 M борат калия, 1 mM ЭДТА, pH 8,4. По окончании электрофореза гель окрашивали бромистым этидием, фотографировали, в течение нескольких часов отмывали в большом количестве воды от мочевины, высушивали и радиоавтографировали.

Солевую экстракцию белков хроматина проводили, встряхивая суспензию ядер в буфере А, содержащем вместо 15 mM NaCl 0,35; 0,6 и 2 M NaCl, в течение 2 ч при 4 °С. Ядра осаждали центрифугированием (2000 об/мин, 5 мин) на настольной центрифуге (тип 310 В, Польша), отмывали от соли двукратным переосаждением в буфере А.

Результаты и обсуждение. Комплексообразование и реакцию алкилирования RCl-производным олигодезоксириботимидилата с «сuspензионной» фракцией хроматина и интактными ядрами проводили при 4 mM CaCl₂, необходимом для поддержания высших уровней организации хроматина. На рис. 1 представлены данные по определению относительных степеней модификации ДНК RClCl₂NH(pdT)₁₆ в составе интактных ядер и «сuspензионного» хроматина, полученного механическим разрушением ядерной мембраны. Видно, что наличие целостной ядерной мембраны не препятствует проникновению олигонуклеотида, и сте-

пень модификации ДНК в обоих препаратах примерно одинакова — $(2 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$ молей ковалентно присоединенного олигонуклеотида на моль нуклеотидов ДНК.

Регенерирующая печень крысы является классическим объектом изучения клеточных процессов в условиях интенсивной репликации. Согласно [10], через 22—24 ч после частичной гепатэктомии в клетках наблюдается максимум репликации. Ядра из интактной и регенерирующей печени крыс обрабатывали алкилирующим производным олиго(dT)-ДНК в обоих случаях оказалась одинаково доступной для комплементарно адресованной модификации. Данные представлены на рис. 1. Возможно, этот результат свидетельствует о том, что появление репликационных вилок не увеличивает в значительной степени доли доступных поли(dA)-трактов для комплементарно адресованного реагента. Аналогичный результат получен при сравнении степени модификации ДНК по поли(dA)-трактам ядер из несинхронизированных и синхронизированных в S-фазе с помощью двойного тимидинового блока клеток мышинных фибробластов.

Полностью репрессированный как в транскрипции, так и в репликации хроматин из эритроцитов цыпленка модифицируется по поли(dA)-трактам ДНК с такой же эффективностью, что и хроматин из регенерирующей печени крысы. Это свидетельствует, по нашему мнению, о том, что активация процессов транскрипции и репликации не увеличивает доступности поли(dA)-участков ДНК для комплементарно адресованной модификации (рис. 1).

Известно, что «растворимая» фракция хроматина в буфере, не содержащем двухвалентных ионов, представлена в основном развернутыми нуклеосомными цепями в отличие от «суспензионного» хроматина и интактных ядер. Степень модификации ДНК в составе «растворимой» фракции хроматина на порядок ниже, чем степень модификации ДНК в составе «суспензионного» хроматина и интактных ядер. Это, скорее всего, связано с наличием в составе «суспензионного» хроматина и, естественно, в составе ядер петлеобразных структур, образованных ДНП-фибриллами, закрепленными на ядерном матриксе, что приводит к повышению уровня суперспирализации ДНК.

Изолированная ДНК практически не модифицируется RCl-производным олиго(dT). Это, по нашему мнению, свидетельствует о том, что доступность поли(dA)-участков ДНК для комплементарно адресованной модификации есть результат специфического взаимодействия с определенными белками хроматина, результат специфической структурной организации хроматина.

Для доказательства специфичности алкилирования ДНК использовали опыты по снижению доли ковалентно присоединенного реагента в присутствии нерадиоактивного олигодезоксириботимидилата.

Относительная степень модификации ДНК в присутствии 10-кратного молярного избытка олигодезоксириботимидилата по отношению к RCl-производному олигодезоксириботимидилата в 10 раз ниже, чем степень модификации ДНК в отсутствие свободного олиготимидилата, в то время как олигодезоксирибонуклеотид примерно той же длины, но другой последовательности — $(pdN)_{16}$ — не ингибирует ковалентного присоединения $RCICH_2NH(pdT)_{16}$ к ДНК. Эти результаты подтверждают специфичность алкилирования ДНК хроматина по поли(dA)-трактам с помощью используемого реагента $RCICH_2NH(pdT)_{16}$ (данные представлены на рис. 1).

Известно, что среди белков, входящих в состав хроматина, есть ферменты, способные изменять степень суперспирализации — ДНК-топоизомеразы. Оптимальные условия протекания реакции релаксации с участием топоизомеразы I предполагают высокие концентрации одновалентных ионов. Максимальная активность этой группы ферментов наблюдается при концентрации NaCl 0,15—0,2 М [11].

При исследовании зависимости относительной степени модификации ДНК в составе интактных ядер от ионной силы раствора была об-

наружена интересная закономерность: в интервале концентрации NaCl 0,15—0,2 М, т. е. когда наблюдается максимальная активность эндонуклеазной топоизомеразы I, относительная степень модификации ДНК существенно ниже, чем при концентрации NaCl 0—0,1 М (рис. 2).

Возможно, это связано с разным уровнем суперспирализации ДНК в разных ионных условиях и именно суперспирализованные домены ДНК, содержащие поли(dA)-тракты, являются наиболее уязвимыми местами для комплементарно адресованной модификации.

Для исследования влияния изменения структуры хроматина за счет удаления из него определенных групп белков на степень доступности ДНК для комплементарно адресованной модификации RCl(pdT)₁₆ были проведены эксперименты с дезоксирибонуклеопротеидами ДНП-0,35, ДНП-0,6, ДНП-2, полученными из хроматина обработкой соответственно 0,35; 0,6 и 2 М NaCl.

Известно, что при обработке хроматина 0,35 М NaCl удается отделить от него фракцию негистоновых белков, содержащих HMG-белки (high mobility group), наиболее изученные из всех негистоновых белков [12]. Удаление этой группы белков из хроматина практически не влияет на величину относительной степени модификации поли(dA)-участков ДНК адресованным реагентом (таблица).

Обработка хроматина 0,6 М NaCl приводит к удалению наряду с рядом негистоновых белков гистона H1 (ДНП-0,6) [13]. При этом степень модификации ДНК несколько увеличивается, возможно, за счет того, что удаление белка H1, связывающегося с линкерными участками ДНК хроматина, освобождает их как потенциально более доступных для комплементарно адресованной модификации RCl-производным олиго(dT). Интересно отметить, что в экспериментах по аффинной модификации ДНК в составе «растворимого» хроматина из клеток плаценты человека ДНК в составе ДНП-0,6, полученного обработкой «растворимого» хроматина 0,6 М NaCl, примерно в 2 раза более доступна для алкилирования олиго(dT) по сравнению с исходным хроматином [14].

При обработке хроматина 2 М NaCl, когда вместе с основной массой негистоновых белков удаляются от ДНК и все гистоны, поли(dA)-участки ДНК становятся менее доступными для комплементарно адресованной модификации RCl(pdT)₁₆. ДНП-2, полученные при такой обработке хроматина, представляют собой структуру, выявляемую на электронно-микроскопических препаратах как сохранившиеся нити или фибриллы ДНК, закрепляющиеся в виде петель на ядерном матриксе. Результаты, полученные нами, по всей видимости, свидетельствуют об определенном вкладе специфических хроматиновых белков, сохраняющихся в структуре хроматина при обработке его 0,6 М NaCl, но пол-

Доступность поли(dA)-трактов ДНК для комплементарно адресованной модификации алкилирующим производным (pdT)₁₆ в составе интактного хроматина и ДНП, лишенных групп белков

Reactivity of poly(dA)sequences in DNA, chromatin and partially protein-depleted chromatin toward alkylating derivative of (pdT)₁₆

Ковалентное присоединение реагента	В присутствии		
	—	(pdT) ₁₆	(pdN) ₁₆
ДНК в составе интактных ядер из печени крысы	2,0±0,2	0,2±0,05	1,9±0,2
ДНП-0,35	1,8±0,2	—	—
ДНП-0,6	2,5±0,1	—	—
ДНП-2	1,1±0,1	—	—

Примечание. Величины приведены в молях реагента на моль нуклеотидов ДНК·10³.

ностью исчезающих при обработке 2 М NaCl, в существование доступных для комплементарно адресованной модификации поли(dA)-трактов ДНК, скорее всего, в существование расплетенных одноцепочечных участков ДНК, обогащенных поли(dA)-повторами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Специфическая химическая модификация 5'-алкилирующим производным олиго(dT) ДНК хроматина плаценты человека / В. В. Власов, Е. М. Иванова, Н. Д. Кобец и др. // Докл. АН СССР.—1985.—282, № 1.—С. 196—199.
2. Комплементарно-адресованная модификация ДНК в составе метафазных хромосом и хроматина / Н. Д. Беляев, В. В. Власов, Н. Д. Кобец и др. // Там же.—1986.—291, № 1.—С. 234—236.
3. Collins J. M. Deoxyribonucleic acid structure in human diploid fibroblasts stimulated to proliferate // J. Biol. Chem.—1977.—252, N 1.—P. 141—146.
4. Carnevali F., Filicini P. Chromatine structure // Chromosoma.—1981.—82, N 2.—P. 377—383.
5. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. Синтез олигонуклеотидов в хлороформе триэфирным методом // Биоорг. химия.—1983.—9, № 4.—С. 516—521.
6. Berkner K. L., Folk W. R. Polynucleotide kinase exchange reaction // J. Biol. Chem.—1977.—252, N 10.—P. 3176—3183.
7. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В. Селективная модификация монозамещенных фосфатных групп в 5-моно- и полифосфатных нуклеозидах и олигонуклеотидах // Биоорг. химия.—1979.—5, № 6.—С. 886—893.
8. Primary organization of the nucleosome core particles / V. V. Shick, A. V. Belyavsky, S. G. Bavykin, A. D. Mirzabekov // J. Mol. Biol.—1980.—139, N 3.—P. 491—517.
9. William F. Marzluff, Ru Chin C. Huang. Transcription of RNA in isolated nuclei // Transcription and Translation / Ed. B. Hames.—Oxford, 1984.—P. 89.
10. Дашкович В. С. Исследование состояния ДНК в клетках злокачественной опухоли в эмбриональной ткани // Изв. Сиб. отд-ния АН СССР.—1963.—6, № 1.—С. 136—140.
11. Терещенко О. Д., Хайдарова Н. В. ДНК-топоизомеразы эукариот: свойства и возможные функции // Успехи соврем. биологии.—1983.—96, № 1(4)—С. 28—41.
12. Levy W. B., Connor W., Dixon G. H. A subset of trout testis nucleosomes enriched in transcribed DNA sequences contains HMG proteins as major structural components // J. Biol. Chem.—1979.—254, N 3.—P. 609—620.
13. Получение и свойства хромосомных дезоксирибонуклеопротеидных комплексов / Г. П. Георгиев, Ю. В. Ильин, А. С. Тихоненко и др. // Молекуляр. биология.—1967.—1, № 6.—С. 815—829.
14. Nucleotide and oligonucleotide derivatives as enzymes and nucleic acids targeted irreversible inhibitors / V. V. Vlassov, A. A. Godovikov, N. D. Kobets et al. // Adv. Enzyme Regul.—1985.—24.—P. 301—320.

Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР,
Новосибирск

Получено 10.12.87

AFFINITY MODIFICATION OF CHROMATIN WITH AN ALKYLATING HEXADECADEOXYRIBOTHYMIDYLATE DERIVATIVE

V. V. Vlassov, N. D. Kobetz, E. L. Chernolovskaya, E. M. Ivanova,
V. M. Subbotin, L. A. Yakubov

Institute of Bioorganic Chemistry, Novosibirsk

Summary

Alkylating derivative of hexadecadeoxyribothymidylate bearing 4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino) benzylamine residue on its 5'-terminal phosphate was used for affinity modification of complementary poly(A) sequences in chromatin DNA. The DNA reactivity was not influenced by transcription and replication processes. DNA in suspension chromatin fraction and in intact nuclei was more readily alkylated as compared to that from the soluble chromatin fraction. This effect was attributed to higher superhelicity of DNA in intact nuclear DNA-protein structures. Protein-free isolated DNA was by several orders of magnitude less reactive than the chromatin DNA. Reaction of alkylating oligonucleotide derivatives with DNA is the sequence specific process, since it is suppressed by excess of an arbitrary hexadecanucleotide.