



УДК 577.113.4 : 577.214.625

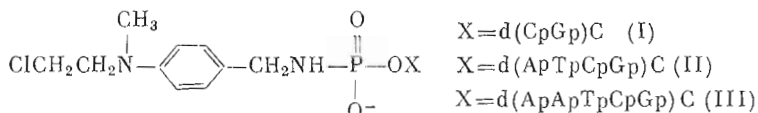
АДРЕСОВАННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПРОМОТОРНОГО УЧАСТКА ДНК В КОМПЛЕКСЕ С РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ АЛКИЛИРУЮЩИМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

*Буторин А. С., Власов В. В., Грачев М. А.,
Зайчиков Е. Ф., Коневец Д. А., Бутявин И. В.,
Царев И. Г.*

*Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР*

Комплементарно адресованная модификация нуклеиновых кислот производными олигонуклеотидов — один из развивающихся методов биоорганической химии (обзор см. [1]). С помощью реакционноспособных производных олигонуклеотидов удается направленно модифицировать определенные участки однонитевых нуклеиновых кислот [1—4]. Чрезвычайно важным представляется разработать методы направленной химической модификации двуцепочечных ДНК, однако решение этой задачи затрудняется неспособностью двуцепочечных нуклеиновых кислот взаимодействовать с олигонуклеотидами. Путь преодоления этого затруднения может заключаться в использовании белков, расплетающих ДНК в определенных участках их структуры. Одним из таких белков является РНК-полимераза *E. coli*, которая при взаимодействии с промотором расплетает участок ДНК, прилегающий к точке инициации, на протяжении около 10 пар оснований [5]. В работе [6] было установлено, что комплементарные расплетаемому участку дезоксирибоолигонуклеотиды, имеющие рибонуклеотид на 3'-конце, связываются в тройной комплекс РНК-полимераза · промотор · олигонуклеотид и могут служить затравками для транскрипции. Целью настоящего исследования была проверка возможности комплементарно адресованной модификации промотора алкилирующими производными таких олигонуклеотидов.

В работе были использованы синтезированные по методу, описанному в работе [7], алкилирующие 5'-производные олигонуклеотидов:



В качестве объекта модификации использовалась плаزمида pSlk-A2, содержащая промотор A2 бактериофага T7 [8]. Для проведения модификации плазмиду ($2,5 \cdot 10^{-7}$ М) инкубировали с РНК-полимеразой *E. coli* ($5 \cdot 10^{-7}$ М) 2 мин при 37° С в 25 мМ НЕРПС*, рН 7,8; 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂. Затем вводили в смесь алкилирующее производное одного из олигонуклеотидов в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М, инкубировали 3 ч при 37° С, добавляли рифампицин и через 10 мин [α -³²P]УТР (2000 Ки/ммоль). Затем смесь подвергали фенольной депротеинизации, ДНК осаждали этанолом и анализировали гель-электрофорезом. Из результатов электрофоретического анализа плазмиды, обработанной алкилирующим производным (III) (рис. 1), видно, что радиоактивный материал связывается с ДНК. Наиболее эффективная модификация наблюдалась в случае гексануклеотидного производного ($5 \cdot 10^{-3}$ моль реагента на 1 моль плазмиды).

* 4-(2-Гидроксиэтил)-1-пиперазинпропансульфоновая кислота.

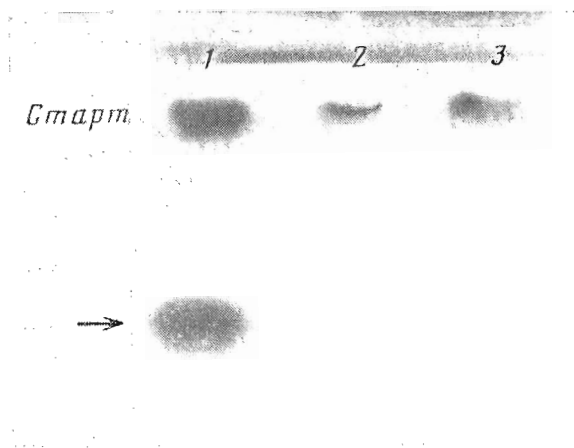


Рис. 1. Модификация плазмиды рSK-A2 алкилирующим производным гексануклеотида (III) в комплексе с РНК-полимеразой *E. coli*. 1 — полная система рSK-A2 + РНК-полимераза + (III) + $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$; 2 — то же, что и 1, но без РНК-полимеразы; 3 — то же, что и 1, но без алкилирующего реагента. Стрелкой указано расположение плазмиды на электрофореграмме по окрашиванию бромистым этидием. Электрофорез проводили в 1% агарозе, в буфере — 50 мМ трис-борат (рН 8,3) — 1 мМ EDTA

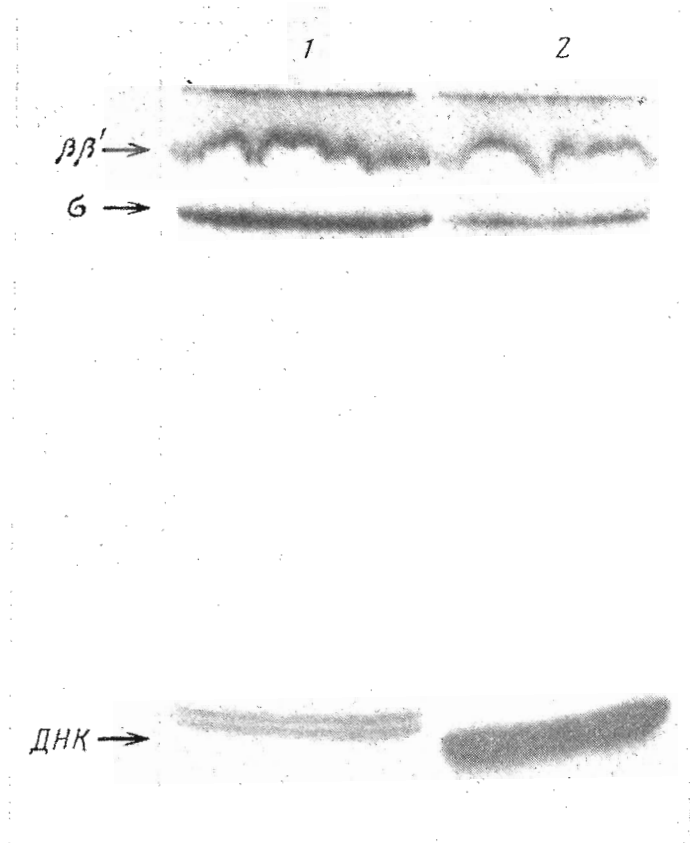


Рис. 2. Модификация 110-нуклеотидного *EcoRI*-рестрикционного фрагмента ДНК плазмиды рSK-A2 алкилирующими производными олигонуклеотидов (II) — (а) и (I) — (б) в комплексе с РНК-полимеразой и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$. Стрелками указано расположение β , β' -(1) и σ -(2) субъединиц РНК-полимеразы (окрашивание кумасси R-250) и рестрикционного фрагмента ДНК (3) (окрашивание бромистым этидием). Электрофорез проводили по Лэммли [9] с использованием 12% разделяющего и 4% концентрирующего ПААГ

Анализ продуктов гидролиза модифицированной плазмиды рестриктазой *EcoR1* показал, что радиоактивная метка включается только в малый рестрикционный фрагмент размером 110 пар оснований, в котором и локализован А2-промотор фага Т7 [8] (данные не приводятся).

Для того чтобы показать, что ковалентное присоединение олигонуклеотида-затравки проходит специфически только к промотору А-2, мы синтезировали алкилирующее производное (III) из высокоочищенного [5'-³²P]олигонуклеотида и проделали эксперимент по такой же схеме, опуская стадию элонгации. В этом случае ковалентное присоединение реагента к любому участку плазмиды выявляется по радиоактивности. И на сей раз включение ³²P-метки в плазмидную ДНК наблюдалось только в присутствии РНК-полимеразы. Несмотря на то что плаزمида PSK содержит еще два сильных промотора [8], радиоактивность была обнаружена только в малом 110-членном *EcoR1*-рестрикционном фрагменте.

Такие же результаты были получены в аналогично проведенных экспериментах по модификации рестрикционного 110-нуклеотидного фрагмента ДНК рSK-A2, содержащего промотор А2, с использованием нердиоактивного реагента и [α -³²P]УТР. На рис. 2 приведены результаты электрофоретического анализа реакционной смеси после инкубации. Чтобы определить, идет ли реакция с ферментом, фенольную депротенинизацию не проводили. Видно, что включение метки происходит как в субъединицы РНК-полимеразы, так и в ДНК. Природа второй полосы в продуктах модификации фрагмента производным пентануклеотида (II) осталась невыясненной.

Таким образом, в настоящей работе впервые продемонстрирована возможность адресованной модификации двунитевой ДНК, расплетаемой при участии специфического белка. Стимулируемая РНК-полимеразой модификация промоторных участков ДНК, очевидно, может быть использована для направленного воздействия на определенные гены. Полученные результаты представляют также интерес для понимания функциональной топографии промоторного комплекса.

Авторы приносят благодарность акад. Д. Г. Кнорре за интерес к работе и ее поддержку.

ЛИТЕРАТУРА

1. Knorre D. G., Vlassov V. V. // Prog. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol. 1985. V. 32. P. 292—322.
2. Грачев М. А., Ошевский С. И. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 272. № 5. С. 1259—1262.
3. Vlassov V. V., Gaydamakov S. A., Gorn V. V., Grachev S. A. // FEBS Lett. 1985. V. 182. № 2. P. 415—418.
4. Vlassov V. V., Zarytova V. F., Kutiavin I. V., Mamaev S. V., Podymnugin M. A. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 10. P. 4065—4072.
5. Siebenlist U., Simpson R. B., Gilbert W. // Cell. 1980. V. 20. № 1. P. 269—281.
6. Grachev M. A., Zaychikov E. F., Ivanova E. M., Komarova N. I., Kutiavin I. V., Sidelnikova N. P. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 22. P. 8509—8524.
7. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 475—482.
8. Серпинский О. И., Каргинова Е. А., Микрюков Н. М., Кравченко В. В., Зайчиков Е. Ф., Максимова Т. Г., Оникиенко А. И., Плетнев А. Г., Митина Ю. Л. // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. № 6. С. 840—846.
9. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—682.

Поступило в редакцию
6.XI.1986

ADDRESSED MODIFICATION OF A DNA PROMOTER REGION IN THE COMPLEX
WITH RNA POLYMERASE BY ALKYLATING OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES

BOUTORIN A. S., VLASSOV V. V., GRACHEV M. A., ZAYCHIKOV E. F.,
KONEVETZ D. A., KUTIAVIN I. V., TSAREV I. G.

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

Addressed chemical modification of double-stranded DNA unwound with the specific protein has been demonstrated. 4(N-2-chloroethyl-N-methylamino)benzyl-5'-phosphoamides of oligonucleotides-d(CG)rC, d(ATCG)rC, d(AATCG)rC, which can serve as primers in the RNA polymerase-catalyzed transcription, alkylated A2 promoter region of pSK-A2 plasmid in its «open» complex with *E. coli* RNA polymerase.