



ЛИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.32.04

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ G-C-ПАР, ВАЖНЫХ ДЛЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С БЕЛКАМИ, В РЕГУЛЯТОРНЫХ УЧАСТКАХ ДНК. ЛОКАЛИЗАЦИЯ НЕКОТОРЫХ СУЩЕСТВЕННЫХ G-C-ПАР В ПРОМОТОРЕ *lac* UV5

Свердлов Е. Д., Пак В. Н.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Для определения оснований, существенных для специфического взаимодействия регуляторных участков ДНК с белками, в настоящее время используют два основных подхода. Один из них состоит в исследовании влияния мутаций с известной локализацией на функциональную активность ДНК (см., например, [1, 2]). При этом одна природная пара оснований заменяется другой без нарушений вторичной структуры и распределения зарядов в ДНК. Это является достоинством подхода. Его недостаток — случайный в целом подбор мутаций и большая трудоемкость. Другой подход включает неполную статистическую химическую модификацию фрагментов ДНК и определение положения модифицированных оснований на фрагментах ДНК, теряющих полностью или частично способность к комплексообразованию с белком [2]. Единственным методом, используемым для этой цели, является неполное метилирование диметилсульфатом, в результате которого образуются в основном $N_{(7)}$ -метилгуаниновые и $N_{(3)}$ -метиладениновые звенья. Они несут в гетероциклическом ядре положительный заряд и гидрофобную метильную группу, экспонированную в большую или малую бороздки ДНК. Вследствие этого при модификации функционально незначимого основания регуляторный участок может менять характер взаимодействия с белком, и оно может быть ошибочно идентифицировано как функционально значимое. Это принципиальный недостаток метилирования. Его достоинством является возможность быстрого скрининга модифицированных оснований по их влиянию на способность к комплексообразованию.

Мы попытались разработать метод, сочетающий достоинства двух вышеописанных подходов и лишенный их недостатков. Для этого необходимы следующие предпосылки:

- 1) возможность неполной статистической замены одной природной пары на другую во фрагменте ДНК, содержащем регуляторный участок;
- 2) возможность разделения измененных фрагментов ДНК на две фракции, одна из которых сохраняет исходную способность к комплексообразованию с соответствующим белком, а другая частично или полностью ее теряет вследствие той или иной модификации;
- 3) возможность анализа распределения измененных пар оснований вдоль цепей ДНК в обеих группах фрагментов.

При этом во фракции фрагментов ДНК с частично утраченной способностью к комплексообразованию относительное содержание измененных пар оснований (п.о.) будет увеличено в тех положениях, которые важны для проявления функциональной активности данного фрагмента. Наоборот, во фрагментах, сохранивших способность к комплексообразованию, в этих же положениях следует ожидать уменьшения относитель-

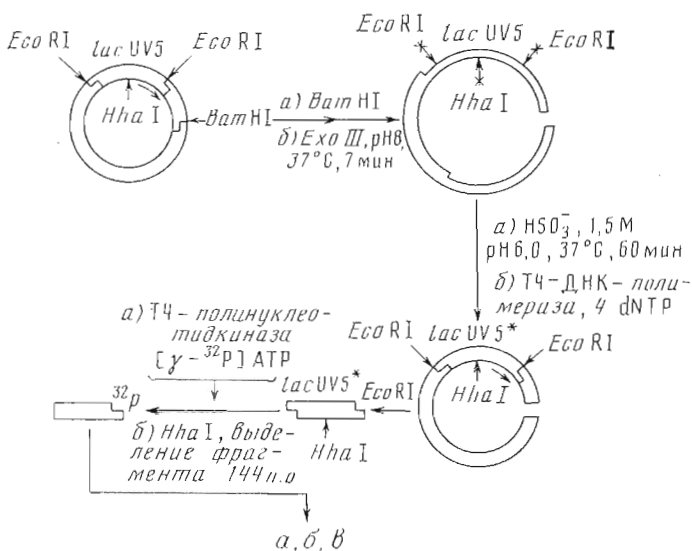


Рис. 1. Схема определения функционально-значимых G·C-пар в промоторе *lacUV5*. На последней стрелке: а — образование комплекса с РНК-полимеразой; б — фильтрация через нитроцеллюлозные фильтры; в — анализ фрагментов на фильтре и в фильтрате после расщепления N-урацилгликозидазой и пиперидином (см. текст)

ного содержания измененных п.о. Именно такой тип оценки функциональной значимости оснований используется при метилировании [2].

Метод разработан для определения функционально значимых G·C-пар и представляет в сущности мутагенез *in vitro*. Схема метода приведена на рис. 1. Мы проверили его применимость путем определения некоторых функционально значимых G·C-пар в промоторе *lacUV5 E. coli*.

Плазмида рSK203 содержит промотор *lacUV5*, встроенный по *EcoRI*-сайту рBR322 в составе фрагмента *lac*-оперона длиной 203 п.о. Этот фрагмент может быть отщеплен рестрикционной эндонуклеазой *EcoRI**. После расщепления рSK203 эндонуклеазой *BamHI* проводится частичный контролируемый гидролиз плазмиды экзонуклеазой III *E. coli* в условиях, при которых промоторный фрагмент становится одноцепочечным. Обработанная таким образом ДНК содержит в центре двухцепочечную область и 5'-концевые одноцепочечные участки. Далее ДНК подвергается неполной модификации бисульфитом натрия [3] при pH 6. В результате в одноцепочечных участках ДНК происходит превращение части цитидиновых звеньев в уридиновые. Модифицированная ДНК превращается в полностью двухцепочечную молекулу репарацией ДНК-полимеразой фага T4 в присутствии четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Полученная ДНК представляет собой набор молекул со статистическим распределением замен G·C-пар на A·U-пары. Фрагмент, содержащий *lacUV5*-промотор, получают из модифицированной ДНК с помощью эндонуклеазы *EcoRI*. Уридиновые звенья сосредоточены только в одной из его цепей, ориентированной своим 5'-концевым звеном в сторону *BamHI*-сайта плазмиды рSK203. Таким образом, выполняется первое из сформулированных выше условий.

Частично модифицированные фрагменты ДНК со случайным распределением замен дифосфорилируют и затем метят ^{32}P по коцевым звеньям. В данной работе метку вводили по 5'-концевым звеньям с помощью полинуклеотидкиназы и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Обработка выделенного фрагмента рестрикционной эндонуклеазой *HhaI* и разделение субфрагментов позволяют получить промоторный фрагмент, меченный только по одной цепи (на рис. 2 расположена снизу). Комплексы, образующиеся при взаимо-

* Плазмида рSK203, сконструированная во ВНИИ МБ (Новосибирск), любезно предоставлена В. В. Кравченко.

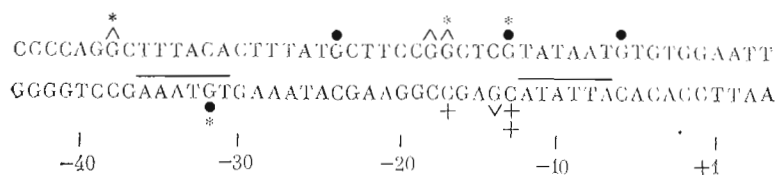


Рис. 2. Локализация функционально-значимых G·C-пар в последовательности *lacUV5*-промотора. Звездочками обозначены G·C-пары, идентифицированные как функционально-значимые предварительным метилированием [2]. Черными точками отмечены нуклеотидные остатки, метилирование которых блокируется при комплексообразовании с РНК-полимеразой. Знаком \wedge обозначены G, метилирование которых ускоряется при комплексообразовании. Знаки + и † указывают G·C-пары, замены которых на A·U-пары уменьшают способность ДНК к комплексообразованию (см. таблицу). +1 — точка инициации транскрипции. Подчеркнуты область -35-нуклеотида и бока Прибнова

действию таких модифицированных меченных ^{32}P промоторов с РНК-полимеразой, обладают в зависимости от положения замены различной прочностью. Благодаря этому после взаимодействия с РНК-полимеразой набор ^{32}P -меченных фрагментов может быть разделен на две фракции фильтрованием через нитроцеллюлозные фильтры. Модифицированные фрагменты, образующие прочные комплексы с РНК-полимеразой, удерживаются на фильтрах. Менее прочные комплексы в определенных условиях (высокая ионная сила, присутствие гепарина) диссоциируют, и фрагменты ДНК из них обнаруживаются преимущественно в фильтрате. Так обеспечивается возможность фракционирования фрагментов ДНК по функциональному признаку.

Наконец, для локализации A·U-пар во фрагментах, удержанных на фильтре и оказавшихся в фильтрате, используется расщепление ^{32}P -меченных по концевым звеньям фрагментов с помощью N-урацилгликозиды [4], которая специфически удаляет урацильные основания из ДНК. Такая ДНК содержит на месте уридиновых звеньев остатки дезоксирибозы и может быть расщеплена по этим положениям действием аминов, например пиперидина [5], с образованием набора 5'-концевых меченных ^{32}P нуклеотидов. Положение уридиновых остатков на ДНК определяется сопоставлением подвижности при электрофорезе в полиакриламидном геле (ПААГ) образовавшихся ^{32}P -меченных 5'-концевых олигонуклеотидов с подвижностью продуктов расщепления этого же фрагмента методом Максама—Гилберта.

Способность фрагментов взаимодействовать с РНК-полимеразой зависит от ионной силы. При промывке фильтров со связанными комплексами буферами, содержащими 0,1 М KCl, распределение радиоактивности между различными олигонуклеотидами во фрагментах ДНК, задержанных на фильтре и оказавшихся в фильтрате, не отличалось от того, которое наблюдалось в контрольном образце, не подвергнутому связыванию с РНК-полимеразой и фильтрации. Повышение ионной силы используемого для промывки буфера до 0,2 М приводило к тому, что во фрагментах ДНК фильтрата полоса, соответствующая C(-13) промотора, оказывалась заметно более интенсивной, чем соответствующая полоса в контроле и у фрагментов, задержанных на фильтре (таблица).

Увеличение ионной силы до 0,3 М вызывало дальнейшее усиление относительной интенсивности этой полосы во фракции фильтрата, но, кроме нее, заметно возрастала относительная интенсивность полосы, соответствующей C(-17). Отсюда можно сделать вывод, что G·C(-13) и G·C(-17) п.о. участвуют во взаимодействиях с РНК-полимеразой, причем первая из них более важна, чем вторая. При предварительном метилировании *lacUV5*-промотора обнаружено, что метилирование G(-13), G(-17) и G(-38) в не матричной цепи промотора ослабляет взаимодействие последнего с РНК-полимеразой [2]. Два из этих положений совпадают с идентифицированными нами G·C-парами (-38), которая модифицируется при метилировании, не идентифицируется нами как функционально значимая. Причины этого расхождения будут детально обсуждены в полном сообщении.

Нуклеотид	[KCl], М			Инициация транскрипции, 0,6 М KCl
	0,1	0,2	0,3	
C(-13)	-	+	++	+++
C(-17)	-	-	+	++

Примечание. Приводятся изменения относительных интенсивностей полос, образующихся в результате модификации и расщепления ДНК в фильтрах по сравнению с контролем. «—» — отсутствие изменений, «+», «++» и «+++» — заметное, явно выраженное и сильное повышение интенсивности данной полосы соответственно.

Учитывая, что способность к комплексообразованию и инициации синтеза РНК может определяться различными взаимодействиями, мы исследовали комплексы модифицированных фрагментов на способность к инициации транскрипции. Для этого к ним добавляли четыре рибонуклеозидтрифосфата и после фильтрации фильтры промывали буфером, содержащим 0,6 М KCl. Исследование фрагментов ДНК в фильтрате показало сильное увеличение интенсивности C(-13) и C(-17) с преобладанием первой. Следовательно, фрагменты с уменьшенной способностью к комплексообразованию характеризуются и уменьшенной способностью к инициации синтеза РНК.

Таким образом, предлагаемый метод позволяет идентифицировать существенные для взаимодействия с РНК-полимеразой G·C-пары в промоторах. Очевидно, он может быть также использован и для исследования других регуляторных участков ДНК.

Следует отметить, что при модификации бисульфитом в малой степени затрагивается и адениновое ядро. Благодаря этому можно констатировать также важность A·T(-7) и A·T(-25) п.о. Одна из этих пар находится в боксе Прибылова, однако она не идентифицируется в опытах с метилированием. Другая также не идентифицируется при метилировании, но обнаруживается при этом в области контакта РНК-полимеразы с T [2].

Экспериментальная часть

³²P-меченный фрагмент (3 пмоль, 500 000 имп/мин) инкубировали 2–5 мин при 37° С с 80 пмоль РНК-полимеразы в 120 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис-HCl (рН 7,9), 10 мМ MgCl₂, 100 мМ KCl, 0,1 мМ EDTA, 0,1 мМ дитиотреит и 50 мкг/мл альбумина. К смеси добавляли 2 мкл раствора гепарина (2 мкг) и продолжали инкубацию 15 мин. Смесь фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры BA 85 как описано в работе [6]. Фильтры промывали исходным буфером без альбумина с различными концентрациями KCl, указанными в таблице. В опытах с предварительной инициацией транскрипции после инкубации с гепарином к смеси добавляли четыре рибонуклеозидтрифосфата так, чтобы их конечная концентрация была 0,1 мМ. Смесь инкубировали 30 с, фильтровали и фильтры промывали исходным буфером, содержащим 0,6 М KCl. Фрагменты ДНК элюировали с фильтров, согласно [6], добавляли 3 мкл раствора tРНК (5 мг/мл) и осаждали этанолом. Фрагменты из фильтрата осаждали также этанолом. Осажденные фрагменты ДНК растворяли в 100 мкл буфера, содержащего 70 мМ NEPES-KOH (рН 7,8), 10 мМ EDTA, 10 мМ дитиотреит, добавляли 5 мкл (2,5·10⁻⁴ ед.) N-урацилглицозидазы и инкубировали 30 мин при 37° С. ДНК нересаждали спиртом, к осадку добавляли 100 мкл 10% пиперидина и дальнейшую подготовку образцов для гель-электрофореза проводили соответственно [5]. Гель-электрофорез проводили в 10% ПААГ [5]. В качестве контролей использовали тот же субфрагмент, расщепленный по методу Максама — Гилберта по пуринам [7] и в условиях G>A [5], а также N-урацилглицозидазой. Сравнивали относительную интенсивность полос в различных дорожках (см. таблицу).

1. Rosenberg M., Court D. Ann. Rev. Genet., 1979, v. 13, p. 319-353.
2. Siebenlist U., Simpson R. B., Gilbert W. Cell, 1980, v. 20, № 2, p. 269-281.
3. Hayatsu H., Wataya Y., Kai K. J. Amer. Chem. Soc., 1970, v. 92, № 3, p. 724-726.
4. Lindahl T., Ljungquist S., Siebert W., Nyberg B., Sperens B. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 10, p. 3286-3294.
5. Mazam A., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560-564.
6. Taylor W. E., Burgess R. R. Gene, 1979, v. 6, № 4, p. 331-365.
7. Ovchinnikov Yu. A., Guryev S. O., Krayev A. S., Monastyrskaya G. S., Skryabin K. G., Sverdlov E. D., Zakharyev V. M., Bayev A. A. Gene, 1979, v. 6, № 3, p. 235-249.

Поступило в редакцию
3.III.1982

**A METHOD FOR IDENTIFICATION OF G·C PAIRS SIGNIFICANT FOR
INTERACTIONS OF PROTEINS WITH DNA REGULATORY REGIONS.
DETERMINATION OF SOME SIGNIFICANT G·C PAIRS IN THE *lacUV5* PROMOTER**

SVERDLOV E. D., PAK V. N.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

A method has been proposed to identify the G·C pairs of significance for interaction of specific proteins with the DNA regulatory regions. It involves: a) in vitro creation of the G·C→A·U transitions (about one transition per fragment) in DNA fragment labeled with ^{32}P at one end of one strand and containing the region, b) separation on cellulose nitrate filters of the fragments, forming tight complexes with the protein, from those for which the transition hindered the complex formation, c) splitting the fragments obtained from the filtrate at the transition points with N-uracylglycosidase and analysis of the resulting [^{32}P]oligonucleoides using polyacrylamide gel electrophoresis. The comparison of the relative band intensities for the fragments from filtrate and those retained on filters, or control fragments (the binding stage was omitted) gives the positions of significant G·C pairs. The method has been used to determine the significant G·C pairs (with C in the template strand) of the *lacUV5* promoter. G·C (-13) and G·C (-17) seem to be of importance for RNA polymerase binding and for initiation of RNA synthesis. In several cases the bands originating from splitting the fragment at the A residues were observed in the patterns, whereby A·T (-7) and A·T (-25) were identified as significant.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 19.03.82	Подписано к печати 11.05.82	Т-07460	Формат бумаги 70×108 ¹ / ₁₆ .
Высокая печать	Усл. печ. л. 14,0	Усл. кр.-отт. 12,1 тыс.	Уч.-изд. л. 16,3
		Тираж 851 экз. Зак. 1457	Бум. л. 5,0

Издательство «Наука», 103717 ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука», 121099 Москва, Шубинский пер., 10