

УДК 577.113.6 + 577.212.2

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ ДНК-МАТРИЦ С ПИРОФОСФАТНЫМИ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫМИ СВЯЗЯМИ

О.Н. Королева, В.Л. Друца*

(кафедра химии природных соединений, e-mail: koroleva@genebee.msu.su)

Химико-энзиматическим методом получены фрагменты ДНК, содержащие в заданной позиции пирофосфатную межнуклеотидную группировку. Изучено влияние указанной модификации на характер транскрипции соответствующих модифицированных матриц РНК-полимеразой *Escherichia coli*. В экспериментах по транскрипции *in vitro* показано, что такая группировка не блокирует процесса элонгации, однако эффективность считывания матрицы ниже, чем в случае природного аналога, что, возможно, связано с кратковременной задержкой фермента в области модификации.

Экспрессия генов часто регулируется на уровне элонгации цепи РНК (одного из этапов процесса транскрипции), осуществляемой РНК-полимеразой [1]. В частности, для РНК-полимеразы *E. coli* накоплено значительное количество экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что фермент может замедлять продвижение вдоль ДНК-матрицы или останавливаться вблизи некоторых структурных элементов, например, палиндромных участков [2–6]. Для изучения механизма таких явлений важно иметь системы с искусственными стоп-сигналами. Очень перспективными с этой точки зрения представляются ДНК-матрицы, содержащие модифицированные звенья. Несмотря на то, что в последнее время в литературе описано множество различных модификаций [7], существует очень мало данных о влиянии большинства из них на процесс элонгации.

Известно, что РНК-полимераза способна без остановки прочитывать участки матричной цепи, содержащие остатки урацила, О-6-метилгуанина, 8-оксогуанина [8], в то время как апуриновые звенья, одноцепочечные разрывы, остатки дигидроурацила, циклобутанпиримидиновые димеры и моноаддукт псоралена вызывают кратковременную задержку фермента [9–11]. Эффективными стоп-сигналами являются псораленовые поперечные сшивки и 5-пропинилцитозин [11, 12]. Практически нет данных о влиянии на элонгацию модификаций по фосфодиэфирной связи.

Ранее нами были получены фрагменты ДНК, имеющие в строго заданных позициях ди-, три- и

тетрафосфатные межнуклеотидные связи [13, 14]. Такие соединения в дальнейшем нашли широкое применение в области исследования ряда белков нуклеинового обмена [15, 16]. В частности, было показано, что трифосфатные межнуклеотидные группировки служат стоп-сигналом для большинства широко известных ДНК-полимераз, в то время как матрицы с дифосфатными (пирофосфатными) межнуклеотидными группировками способны считываться этими ферментами, хотя и с меньшей эффективностью [16].

В настоящей работе с использованием специально сконструированных ДНК-матриц изучено влияние пирофосфатной межнуклеотидной группировки на характер синтеза РНК, осуществляемого РНК-полимеразой *E. coli*.

Экспериментальная часть

В работе использовали: трис, ЭДТА, водорастворимый карбидиимид [1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид] (“Merck”, Германия), гАТФ, гGTP, гСТР, гУТР (“Boehringer”, Германия), [γ - 32 P]АТФ и [α - 32 P]УТР (“Amersham”, Англия и “Изотоп”, Обнинск). Динуклеотид гUpC любезно предоставлен докт. хим. наук С.М. Женодаровой (НИИ биофизики РАН, Пущино-на-Оке).

Были использованы также препараты ферментов: Т4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78, 10 ед. акт./мкл.), ДНК-лигаза фага Т4 (КФ 2.7.7.7, 15 ед. акт./мкл) производства фирмы “Fermentas”, Литва; РНК-полимераза *E. coli*, холофермент (1–2 мкг/мкл, 8 ед. акт./мкл) производства фирмы “Sigma”, США.

*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ. Использованные сокращения: ПААГ – полиакриламидный гель.

Пирофосфатаза из каллуса табака (1 ед. акт./мкл) выделена, как описано в работе [17]. За единицу активности фермента принимали количество микромолей АТР, превращенного в АМР за 1 мин при 37°C.

Синтез олигонуклеотидов TCGAAATCGAAG ("12A"), TCGAAATCGAAGp ("12Ap"), AATCTTTCGA ("10"), TTTCGACTTCGA ("12T") описан ранее [18].

5'-Фосфорилирование олигонуклеотидов с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и АТР, а также введение 5'-[³²P]-метки осуществляли по стандартным методам [19].

Индукцируемое водорастворимым карбодимидом лигирование олигонуклеотидов "12Ap" или "12A" с декануклеотидом "p10" (0,2 о.е., 2×10^{-4} М каждого) осуществляли в 10 мкл буфера, содержащего 0,05 М 2-морфолиноэтансульфонат (рН 6,1), 0,02 М карбодимид, при 0°, в течение 48 ч, как описано ранее [18].

Для получения 34-звенных матриц реакцию энзиматического лигирования олигонуклеотидов "22(P)" или "22(PP)" (100 пмоль) с 2-кратным мольным избытком "p12T" проводили ДНК-лигазой фага Т4, как описано ранее [18]. Продукты лигирования выделяли электрофорезом в 15%-м ПААГ, содержащем 8 М мочевины.

Обработку 5'-[³²P]-меченых олигонуклеотидов "p22(PP)" и "p22(P)" пирофосфатазой из каллуса табака осуществляли в 10 мкл буфера, содержащего

0,05М ацетат натрия (рН 5,5), 0,01 М меркаптоэтанол, 1 пмоль олигонуклеотида, 1 ед. акт. фермента, при 50° в течение 12 ч. Реакционные смеси анализировали электрофорезом в 20%-м ПААГ.

Стимулируемую праймером транскрипцию проводили в 10 мкл буфера, содержащего 40 мМ трис-НСl (рН 8,0), 10 мМ MgCl₂, 100 мМ KCl, 0,1 мМ ЭДТА, четыре рибонуклеозидтрифосфата (2,5 мкМ), α-[³²P]-УТР (5 мкКи), ДНК-матрицу ["22(PP)", "22(P)", "34(PP)" или "34(P)", 40 нМ], РНК-полимеразу (200 нМ, 8 ед. акт.) и праймер гUpC (100 мкМ), при 37°, варьируя время инкубации (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 мин). Реакцию останавливали добавлением 8 мкл 90% формамида, содержащего 50 мМ ЭДТА и красители-маркеры ксиленианол и бромфеноловый синий.

Электрофорез в 15 и 20%-м денатурирующем ПААГ проводили в пластинах (25×25×0,04 см) в трис-боратном буфере (рН 8,3), содержащем 8 М мочевины, при напряжении 1 кВ.

Результаты и их обсуждение

В качестве матриц для изучения катализируемой РНК-полимеразой *E. coli* элонгации были использованы олигонуклеотиды "22(PP)" и "34(PP)", содержащие в строго определенной позиции пирофосфатную межнуклеотидную связь (рис. 1). Матрица "22(PP)" и ее природный аналог "22(P)", необходимый для проведения контрольных экспериментов, были получены

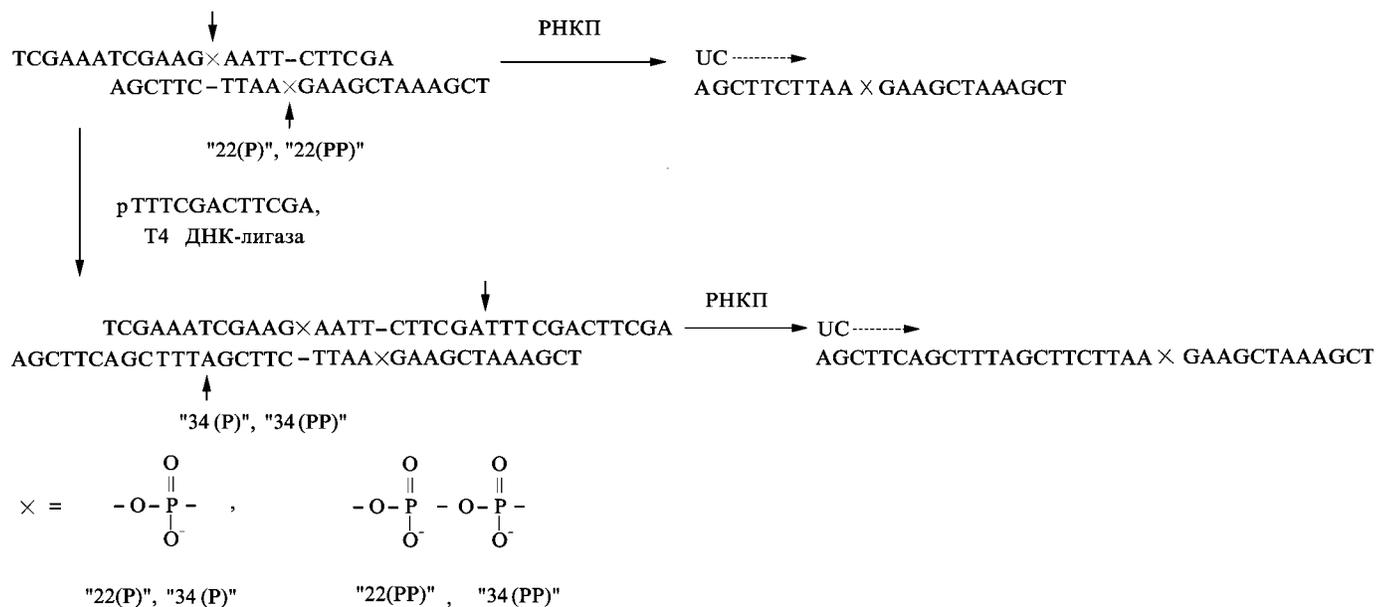


Рис. 1. Схема конструирования 22- и 34-звенных ДНК-матриц, использованных в транскрипции. Знаком "х" указано положение модифицируемой межнуклеотидной связи. Вертикальными стрелками указаны места стыковки олигонуклеотидов, лигируемых под действием карбодимидом или ДНК-лигазы. Пунктирными горизонтальными стрелками указано направление стимулируемой праймером гUpC транскрипции под действием РНК-полимеразы (РНКП)

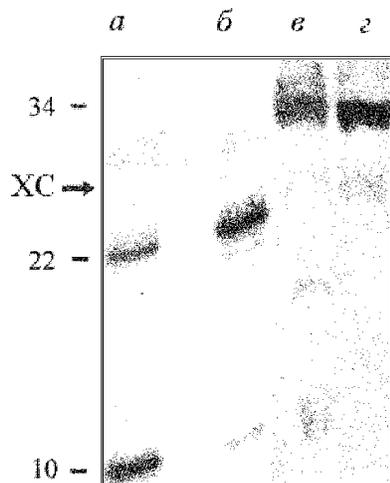


Рис. 2. Электрофоретический анализ в 20% ПААГ реакционных смесей при конструировании матриц “22(P)” (а), “22(PP)” (б), “34(P)” (в), “34(PP)” (г). Цифры слева – указывают положение олигонуклеотидов соответствующей длины. ХС – положение красителя-маркера ксиленицианола

химическим “сшиванием” (лигированием) частично самокомплементарных 12- и 10-звенных олигонуклеотидов водорастворимым карбодиимидом по ранее разработанным методикам [18]. Синтез 34-звенных матриц осуществлялся путем энзиматического лигирования соответствующих 22-звенных фрагментов с олигонуклеотидом “p12T”. Продукты реакций выделяли электрофорезом в 15%-м ПААГ (рис. 2). Первичную структуру полученных олигонуклеотидов подтверждали секвенированием по Максаму–Гилберту [20].

Для доказательства наличия пирофосфатной связи в соединении “22(PP)” нами была использована пирофосфатаза из каллуса табака. Согласно литературным данным этот фермент способен гидролизовать P¹,P³-дизамещенную трифосфатную группировку на 5'-конце мРНК [21], монозамещенные рибонуклеозид-5'-ди- и трифосфаты (ADP, ATP, ppGpp) [17]. Кроме того, в нашей лаборатории было показано [22], что субстратами фермента (хотя и с меньшей эффективностью) могут служить P¹-, P²-дизамещенные пирофосфаты дезокси ряда, в которых заместителями могут быть моно- или олигонуклеотидные фрагменты. Однако оптимальные условия гидролиза подобных соединений пока еще не найдены. Поэтому в настоящей работе при анализе соединения “22(PP)” были использованы предложенные ранее методики [16, 21] с незначительными изменениями. В частности, реакцию гидролиза проводили в условиях, способствующих денатурации двутяжевых комплексов (при повышенной температуре, 50°), с существенным увеличением времени инкубации (12–16 ч). Как показано на

рис. 3, 5'-[³²P]-меченое соединение “22(PP)” расщепляется с образованием 5'-[³²P]-меченого 12-звенного олигонуклеотида с эффективностью около 40%, в то время как “22(P)” остается интактным. После выделения из реакционной смеси оставшегося нерасщепленным “22(PP)” и повторной обработки пирофосфатазой наблюдается аналогичная картина расщепления. Неполное расщепление “22(PP)” может объясняться, с одной стороны, тем, что часть олигонуклеотида в этих условиях находится в составе дуплекса, который является плохим субстратом фермента, а с другой – относительно низкой активностью использованного препарата фермента, который, по-видимому, быстро инактивируется при повышенных температурах.

Для исследования матричных свойств модифицированных ДНК-дуплексов с пирофосфатными межнуклеотидными звеньями были проведены эксперименты по транскрипции, индуцируемой динуклеотидным праймером *in vitro*, на матрицах “22(PP)” и “34(PP)”. В контрольных экспериментах использовали соответствующие природные матрицы-аналоги “22(P)” и “34(P)”. Следует отметить, что РНК-полимераза в отсутствие сигналов транскрипции (промоторов) способна начинать транскрипцию только с конца матриц. Были выбраны условия “замедленной” транскрипции, при которых инициаторный динуклеотидный праймер гUpC, комплементарный 3'-концевым участкам матриц, присутствует в высокой концентрации (0,1 мМ), а концентрация трифосфатов понижена (0,025 мМ) [23]. Типичные результаты

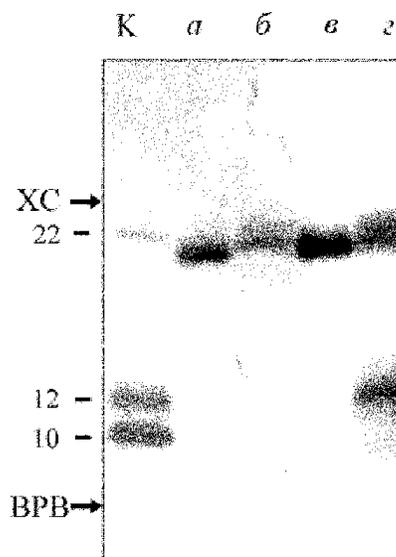


Рис. 3. Электрофоретический анализ в 20%-м ПААГ продуктов обработки олигонуклеотидов “22(P)” (б) и “22(PP)” (в) пирофосфатазой из каллуса табака. Колонки а и в – соответствующие исходные соединения. Колонка “К” – смесь олигонуклеотидов – маркеров длины

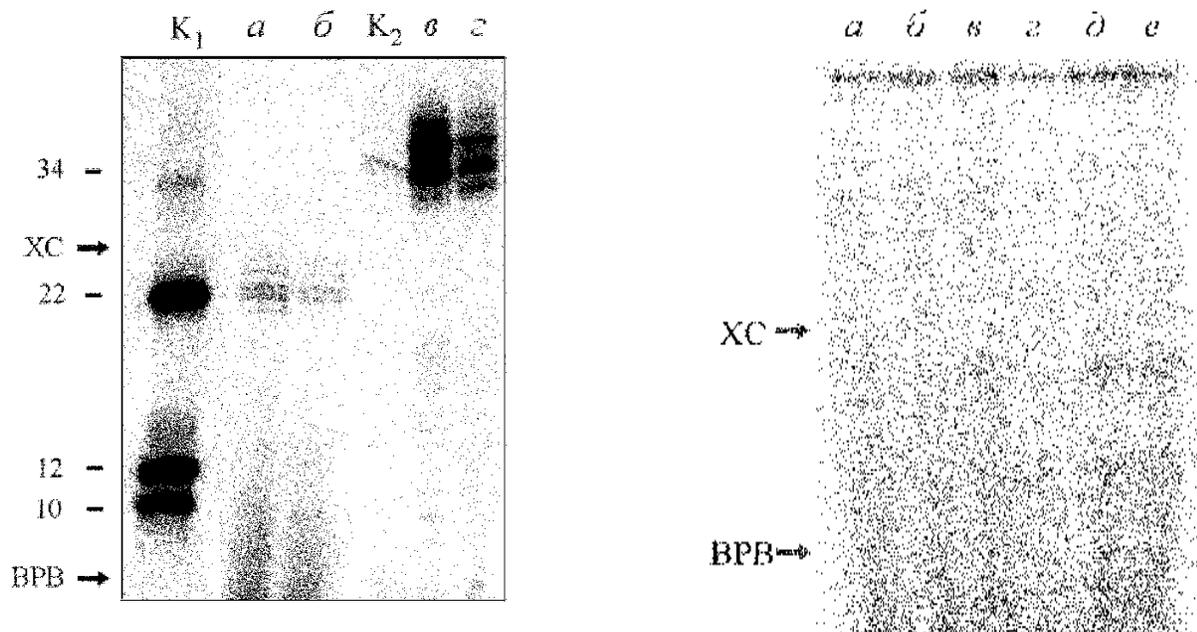


Рис. 4. Электрофоретический анализ в 20%-м ПААГ продуктов транскрипции матриц “22(P)” (а), “22(PP)” (б), “34(P)” (в), “22(PP)” (г) под действием РНК-полимеразы в присутствии гUpC и смеси четырех гNTP после 15 мин инкубации. Колонки K₁ и K₂ – олигонуклеотиды-маркеры длины. Остальные обозначения указаны в подписи к рис.2

приведены на рис. 4 (а–г). Размер полученных транскриптов во всех случаях свидетельствует о полном копировании матриц. Наблюдаемая гетерогенность продуктов связана с присоединением нескольких (в основном одного–двух) “нематричных” звеньев с 3'-конца, что характерно для РНК-полимеразы *E. coli* [9]. При этом не наблюдалось формирования укороченных продуктов, которые соответствовали бы остановке РНК-полимеразы вблизи пирофосфатных связей: 10-звенных в случае “22(PP)” и 22-звенных в случае “34(PP)”.

Во всех случаях копирование модифицированных матриц происходило с меньшей эффективностью, чем в случае немодифицированных. Из кинетики накопления 22-звенных транскриптов (рис. 5) видно, что наибольшие различия для двух матриц наблюдаются в начальный период инкубации, в то время как на более поздних стадиях, по-видимому, происходит “насыщение” матриц РНК-продуктом с образованием гибридного РНК-ДНК-дуплекса, который не участвует повторно в реакции копирования.

Полученные результаты дают основание предполагать, что РНК-полимераза на некоторое время задерживается вблизи пирофосфатных звеньев без диссоциации промежуточного комплекса, а затем продолжает транскрипцию до конца матрицы. Однако такая остановка не может быть зафиксирована в условиях проведения эксперимента. По данным литературы период полужизни

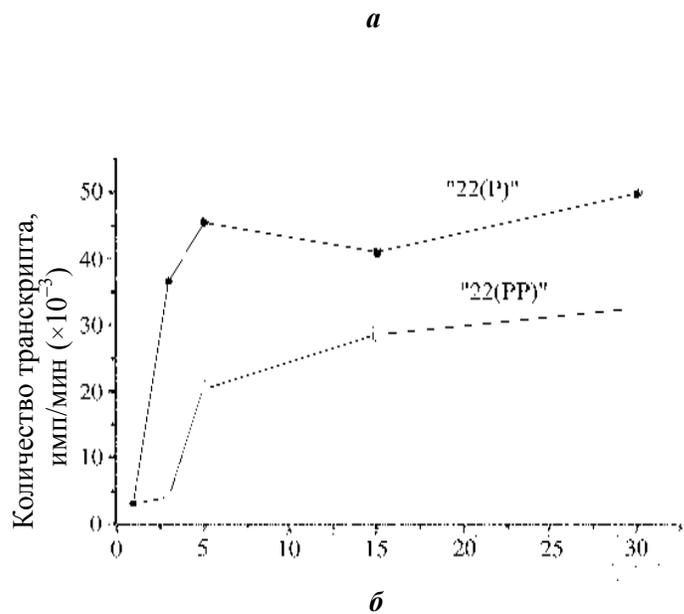


Рис. 5. Стимулируемая праймером гUpC транскрипция матриц “22(P)” (а–в) и “22(PP)” (г–е): а – электрофоретический анализ реакционных смесей после 1, 3, 5 мин инкубации матриц “22(P)” (а–в) и “22(PP)” (г–е) с РНК-полимеразой в присутствии гUpC и смеси гNTP; б – зависимость накопления полноразмерного продукта транскрипции матриц “22(P)” и “22(PP)” от времени инкубации с РНК-полимеразой

остановленных вблизи модификаций комплексов может варьировать в диапазоне от нескольких секунд до нескольких десятков минут [4, 11].

Эти результаты аналогичны данным, полученным нами ранее для некоторых ДНК-полимераз [16]. Согласно этим данным, пирофосфатная группировка не препятствует процессу репликации, но при этом модифицированная матрица менее эффективна, чем ее природный аналог.

Таким образом, в настоящей работе показано, что РНК-полимераза *E. coli* способна транскрибировать ДНК-дуплексы с пирофосфатными межнуклеотидными

группировками, что позволяет использовать такие модифицированные матрицы как аналоги природных в экспериментах по транскрипции.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 01-04-48616).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nudler E. // J. Mol. Biol. 1999. **288**. P. 1.
2. Uptain S., Kane C., Chamberlin M. // Ann. Rev. Biochem. 1997. **66**. P. 117.
3. Artsimovitch I., Landick R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. **97**. P. 7090.
4. Yang M.-T., Gardner J.F. // Nucl. Acids Res. 1991. **19**. P. 1671.
5. Айвазашвили В.А., Бибилашвили Р.Ш., Вартикян Р.М., Кутаме-ладзе Т.А. // Молекул. биол. 1981. **15**. С. 915.
6. Mote J., Reines D. // J. Biol. Chem. 1998. **273**. P. 16843.
7. Lyer R.P., Roland A., Zhou W., Ghosh K. // Curr. Opin. Mol. Theor. 1999. **1**. P. 344.
8. Zhou W., Doetsch P.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. **90**. P. 6601.
9. Liu J., Doetsch P.W. // Biochem. 1996. **35**. P. 14999.
10. Viswanathan A., Doetsch P.W. // J. Biol. Chem. 1998. **273**. P. 21276.
11. Liu J., Doetsch P.W. // Nucl. Acids Res. 1998. **26**. P. 1707.
12. Shi Y., Gamper H., Van Houten B., Hearst J.E. // J. Mol. Biol. 1988. **199**. P. 277.
13. Пурмаль А.А., Друца В.Л., Шабарова З.А. // Биоорг. хим. 1984. **10**. С. 394.
14. Пурмаль А.А., Друца В.Л., Шабарова З.А. // Биоорг. хим. 1988. **14**. С. 1183.
15. Пурмаль А.А., Виноградова М.Н., Елов А.А., Громова Е.С., Друца В.Л., Метелев В.Г., Холодков О.А., Бурьянов Я.И., Шабарова З.А., Прокофьев М.А. // ДАН СССР. 1984. **276**. С. 992.
16. Друца В.Л., Беднарек П.З., Королева О.Н. // Биоорг. хим. 1994. **20**. С. 1206.
17. Shinshi H., Miwa M., Kato K., Nogushi M., Matsushima T., Sugima T. // Biochemistry. 1976. **15**. P. 2185.
18. Королева О.Н., Потанов В.К., Грязнов С.М., Орецкая Т.С., Метелев В.Г., Шабарова З.А. // Молек. биол. 1986. **20**. С. 489.
19. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. // Молекулярное клонирование. М., 1984.
20. Maxam A.M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. **65**. P. 499.
21. Shimamoto K., Kodama Y., Hashimoto J., Miura K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. **74**. P. 2734.
22. Пурмаль А.А. Дис. ... канд. хим. наук. М., 1984.
23. Королева О.Н., Друца В.Л., Шабарова З.А. // Биополимеры и клетка. 1985. **1**. С. 307.

Поступила в редакцию 24.12.02

AN INVESTIGATION OF TRANSCRIPTION OF THE DNA MATRICES CONTAINING PYROPHOSPHATE INTERNUCLEOTIDE MOIETIES

O.N. Koroleva, V.L. Druza

(Division of Chemistry of Natural Compounds)

DNA fragments, containing pyrophosphate internucleotide groups, were prepared by chemical-enzymatic approach. The effects of this modification on transcription with RNA polymerase of *Escherichia coli* were studied. By *in vitro* transcription experiments it has been shown, that RNA polymerase could bypass pyrophosphate group, although the transcription of modified DNA fragments was less efficient than that of natural ones, indicating a possibility of a brief pausing of the enzyme at the modification site.