

ВЛИЯНИЕ ПЕРВИЧНОЙ И ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ДНК НА СВЯЗЫВАНИЕ С КОМПЛЕКСОМ «ТЕТРАГИДРОКОРТИЗОЛ – АПО А-I»: РОЛЬ ОБРАЗОВАВШИХСЯ АДДУКТОВ В ТРАНСКРИПЦИИ И КОПИРОВАНИИ

Ольга Ивановна ГИМАУТДИНОВА, Виталина Витальевна БАЗАЛУК,
Павел Александрович КУЗНЕЦОВ, Надежда Ивановна КЛЕЙМЕНОВА

НИИ биохимии СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Олигонуклеотиды вида CGG, содержащие T_n-последовательность на 3'-конце, в наибольшей степени связываются с антителами к апополипротеину AI (апо AI), пришитыми ковалентно к Сефарозе 4В, насыщенной апо А-I в присутствии тетрагидрокортизола (ТГК). Было показано, что минимальный по длине олигонуклеотид, прочно удерживающий комплекс «ТГК – апо AI» и в результате не подверженный ферментативному гидролизу нуклеазой S1 и ДНКазой I, представляет собой GG(CGG)₃T₃ ± 1N. Показано, что комплекс «ТГК – апо AI» дозависимо активирует реакции *in vitro* копирования и транскрипции ДНК на внутренних одонитевых участках, образующихся под влиянием этого комплекса.

Ключевые слова: структура ДНК, олигонуклеотиды, апополипротеин AI, тетрагидрокортизол, транскрипция и копирование ДНК.

Ранее было показано «расплетающее» действие комплекса «тетрагидрокортизол – апополипротеин AI» («ТГК – апо А-I») на олигонуклеотидные дуплексы CC(GCC)_n · GG(CGG)_n (n = 3, 5), имитирующие сайты связывания указанного комплекса на ДНК. Появление одонитевых участков в сайтах вида GCC/GGC активировало транскрипцию и копирование изолированной ДНК [1, 2]. В данной работе изучали влияние строения 5'-An- и 3'-Tn-концов синтетических олигонуклеотидов GCC/GGC на взаимодействие с комплексом «стероидный гормон – апо А-I» и роль подобных аддуктов в транскрипции и копировании ДНК эукариот.

Материал и методы

Олигодезоксирибонуклеотиды
TGCCTGGAGCTGCTTGATGC (20N),
ATCTTTAACTGATGAACCTTCT (21N) синте-

зированы в ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирск). AnCC(GCC)_n и комплементарные им GG(CGG)_nTn, где n = 0, 3, 5, синтезированы Д.В. Пышным (НИИ химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск). Олигонуклеотиды метили по 5'-концу γ[³²P]АТР («Изотоп», Санкт-Петербург, 1 Ки/ммоль) с помощью полинуклеотидкиназы бактериофага Т4 («Сибэнзим», Новосибирск) и осаждали 2%-ным перхлоратом лития в ацетоне. Апо А-I выделяли из липопротеинов высокой плотности, полученных из плазмы крови крыс [3]. ДНК из печени крыс и ДНК из крови человека (здоровые добровольцы) выделяли по методике [4]. Синтез аффинного сорбента, Се-

фарозы 4В с иммобилизованными антителами к апо А-I, проводили по методу, описанному в работе [1]. Аффинную хроматографию на полученном сорбенте, насыщенном апо А-I в присутствии ТГК или кортизола, проводили с водными растворами олигонуклеотидов при концентрациях 0,1–1,0 ОЕ₂₆₀/мл. Олигонуклеотиды, связавшиеся с сорбентом, элюировали 0,5–1 М NaCl в буфере 0,05 М Трис-НСl, pH 7,5, затем обессоливали на колонке с Сефадексом Г-10 и концентрировали против ПЭГ-20000. Олигонуклеотиды из солевых элюатов метили ³²P. Относительное содержание ³²P-олигонуклеотидов оценивали по результатам электрофореза в денатурирующем 15%-ном полиакриламидном геле (ПААГ). Связывание олигонуклеотидов или их комплементарных дуплексов с комплексом «стероид – апо А-I» проводили аналогично связыванию с ДНК [1], добавляя вместо ДНК олигонуклеотид (или дуплекс) в молярных соотношениях 1:0,2, 1:1, 1:4 к комплексу.

Копирование ДНК человека, катализируемое фрагментом Кленова в присутствии комплекса «ТГК – апо А-I», осуществляли следующим образом. Комплекс апо А-I (700, 1400, 2800 нг) с ТГК (18, 36, 72 нг) в соотношении 1:2 (моль/моль) инкубировали с 2 мкг нативной ДНК в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем в реакционную смесь добавляли 6-звенные праймеры со статистически случайной последовательностью (НИИ химической биологии и фундаментальной медицины) в концентрации 0,004 ОЕ₂₆₀/мкл; dGTP, dTTP, dCTP в концентрации 33 мкМ;

Гимаутдинова О.И. – д.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии, e-mail: gimolga@soramn.ru
Базалук В.В. – младш.н.с. лаборатории молекулярной биологии, e-mail: v_bazaluk@mail.ru
Кузнецов П.А. – к.б.н., н.с. лаборатории молекулярной биологии, e-mail: pawelkuzn@mail.ru
Клейменова Н.И. – младш.н.с. лаборатории молекулярной биологии, e-mail: gimolga@soramn.ru

$d[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ (50 мкКи), и 0,3 е. а. фрагмента Кленова в 0,15 М буфере Трис-НСl pH 7,5, содержащем 9 мМ MgCl_2 , 3 мМ 2-меркаптоэтанол. Реакцию проводили 30 мин при 37 °С, затем вносили немеченый АТР до конечной концентрации 33 мкМ и инкубировали еще 30 мин. По окончании реакции к смеси добавляли равный объем формамида («Merck», Германия) и выдерживали на водяной бане при 100 °С в течение 5 мин. Фрагменты ДНК разделяли с помощью электрофореза в ПААГ и экспонировали с рентгеновской пленкой. Радиоавтографы сканировали на приборе «Кора» (Новосибирск) в проходящем видимом свете. Результаты денситометрии выражали безразмерной величиной среднего коэффициента поглощения света ($k_{\text{полг.}} = I_{\text{полг.}} / I_0$), пропорционального радиоактивности ^{32}P -зонда ($I_{\text{полг.}}$ – световой поток, поглощенный фотографическим почернением на рентгеновской пленке; I_0 – световой поток, падающий на пленку).

Ферментативный гидролиз олигонуклеотидов проводили нуклеазой S1 *Aspergillus oryzae* по [5]. Гидролиз олигонуклеотидов и их дуплексов ДНК-азой I из поджелудочной железы быка проводили согласно [4], инкубируя смеси 30–120 мин при комнатной температуре.

Для транскрипции ДНК крысы использовали РНК-полимеразы, содержащиеся в экстракте белков из ядер печени крыс [6], транскрипцию в присутствии комплекса «стероидный гормон – апо А-І» проводили, как описано в [2].

Фрагменты РНК разделяли с помощью электрофореза в 5–20%-х ПААГ, используя маркеры электрофоретической подвижности нуклеиновых кислот ксиленианол (ХС) и бромфеноловый синий (ВР) [4]. ПААГ экспонировали с рентгеновской пленкой. Пленки сканировали, используя программу «BandScan».

Таблица

Олигонуклеотиды – модели сайтов связывания ДНК с комплексом «ТГК – апо А-І»

| | |
|---|---|
| Г1 – 5'-CC(GCC) ₃ | Г2 – 5'-GG(CGG) ₃ |
| Г1А6 – 5'-A ₆ CC(GCC) ₃ | Г2Т6 – 5'-GG(CGG) ₃ T ₆ |
| Г1А3 – 5'-A ₃ CC(GCC) ₃ | Г2Т3 – 5'-GG(CGG) ₃ T ₃ |
| ОН1 – 5'-CC(GCC) ₅ | |
| ОН2 – 5'-pATCTTTAACTGATGAACTTCT | |
| ОН3 – 5'-pTGCCTGGAGCTGCTTGATGC | |

Результаты и обсуждение

В эксперименте были использованы два вида GC-содержащих олигонуклеотидов: с A_n и комплементарными им T_n-последовательностями на 5'- и 3'-концах соответственно (табл.). Известно, что последовательность (GCC)₃ является регуляторной для гена белка апо АІ человека, а также встречается в промоторах других генов эукариот [2]. Возможно, (GCC)_n-последовательности служат консенсусными участками для взаимодействия комплексов «стероидный гормон – апо А-І» с регуляторными элементами многих генов.

В нашей работе показано, что апо А-І способен связываться с олигонуклеотидами в составе комплекса и с ТГК, и с кортизолом. На рис. 1 представлены данные по сродству олигонуклеотидов к комплексу «ТГК – апо А-І» (рис. 1, а, б) и к комплексу «кортизол – апо А-І» (рис. 1, в), полученные аффинной хроматографией на колонке с Сефарозой 4В с пришитыми поликлональными антителами к апо АІ. Комплексы «стероидный гормон – апо АІ» (ТГК или кортизол) связываются со всеми синтетическими олигонуклеотидами разного состава и длины (табл.), используемыми в экспери-

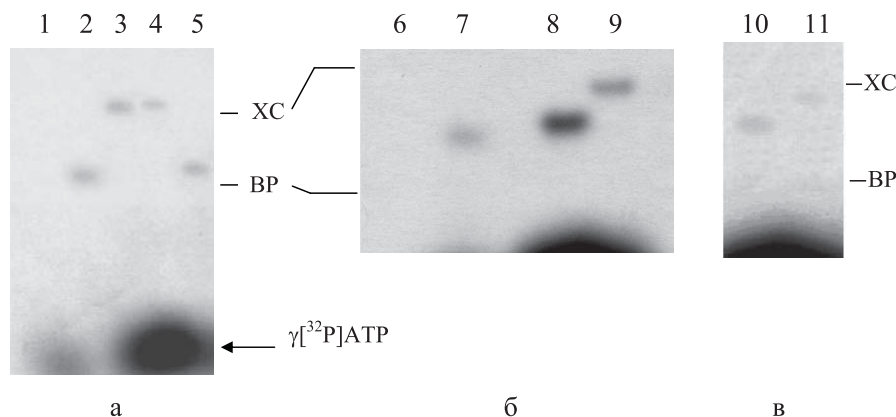


Рис. 1. Радиоавтографы 15 % ПААГ после разделения электрофорезом P^{32} -олигонуклеотидов, элюированных с сорбента Сефароза-анти-апо А-І: апо А-І – стероидный гормон (ТГК или кортизол); * – метка введена до хроматографии. В каждом опыте на колонку наносили одинаковое количество молей олигонуклеотидов. а и б – сродство олигонуклеотидов к комплексу «ТГК – апо А-І», в – сродство олигонуклеотидов к комплексу «кортизол – апо А-І». Дорожки: 1 – T₁₉; 2 – *ОН1 (5'-CC(GCC)₅); 3 – ОН2 (5'-pTGCCTGGAGCTGCTTGATGC); 4 – ОН3 (5'-pATCTTTAACTGATGAACTTCT); 5 – ОН1 (5'-CC(GCC)₅); 6 – *T₁₉; 7 – Г2 (5'-GG(CGG)₃); 8 – Г2Т3 (5'-GG(CGG)₃T₃); 9 – Г2Т6 (5'-GG(CGG)₃T₆); 10 – Г2Т3; 11 – Г2Т6.

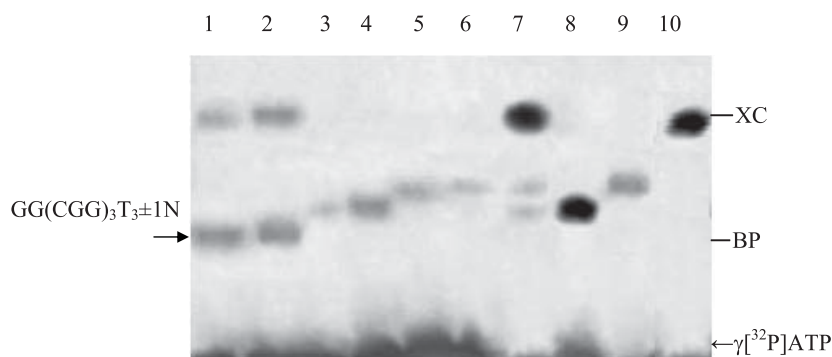


Рис. 2. Радиоавтограф 15 % ПААГ после разделения электрофорезом олигонуклеотидов Г1А6, Г2Т6 и их дуплекса Г1А6 · Г2Т6, инкубированных с комплексом «стероидный гормон (ТГК или кортизол) – апо А-І», нуклеазами S1 и ДНКазой I. Дорожки: 1 – Г1А6 · Г2Т6 (5'-A₆CC(GCC)₃ · 5'-GG(CG G)₃T₆) + [«ТГК – апо А-І»] + ДНКазы I, при молярном соотношении дуплекс:комплекс 1:0,5; 2 – Г1А6 · Г2Т6 (5'-A₆CC(GCC)₃ · 5'-GG(CG G)₃T₆) + [«ТГК – апо А-І»] + ДНКазы I (1:2); 3 – Г1А6 (5'-A₆CC(GCC)₃) + [«ТГК – апо А-І»] + нуклеаза S1, при молярном соотношении олигонуклеотид: комплекс 1:0,5; 4 – Г1А6 (5'-A₆CC(GCC)₃) + [«ТГК – апо А-І»] + S1 (1:2); 5 – Г2Т6 (5'-GG(CG G)₃T₆) + [«ТГК – апо А-І»] + S1 (1:0,5); 6 – Г2Т6 (5'-GG(CG G)₃T₆) + [«ТГК – апо А-І»] + S1 (1:2); 7 – Г1А6 · Г2Т6 (5'-A₆CC(GCC)₃ · 5'-GG(CG G)₃T₆) + [«ТГК – апо А-І»] (1:0,5); 8 – Г1А6 (5'-A₆CC(GCC)₃); 9 – Г2Т6 (5'-GG(CG G)₃T₆); 10 – Г1А6 · Г2Т6 (5'-A₆CC(GCC)₃ · 5'-GG(CG G)₃T₆) + [«кортизол – апо А-І»] (1:0,5).

менте, кроме Т₁₉ (рис. 1, а, б, дорожки 1 и 6). Наибольшим сродством к комплексу «ТГК – апо А-І» обладают олигонуклеотиды, содержащие Т_n на 3'-конце (Г2Т3 и Г2Т6), т. к. на радиоавтографе обнаруживалось наиболее заметное их присутствие (рис. 1, б, дорожки 8, 9). Также обнаружено связывание Т_n-содержащих олигонуклеотидов (Г2Т3 и Г2Т6) с апо А-І в комплексе с другим стероидным гормоном – кортизолом, но в меньшей степени (рис. 1, в, дорожки 8–10 и 9–11).

Как видно из рис. 2, в результате обработки дуплекса Г1А6 · Г2Т6 комплексом «ТГК – апо А-І» (дорожка 7) происходит «расплетание» дуплекса Г1А6 · Г2Т6, т. к. образуются олигонуклеотиды, имеющие одинаковую с исходными олигонуклеотидами Г1А6 (дорожка 8) и Г2Т6 (дорожка 9) подвижность. В то же время инкубация данного дуплекса с комплексом «кортизол – апо А-І» (дорожка 10) не приводит к такому результату. Из рис. 2 также следует, что олигонуклеотид Г1А6 гидролизуетсЯ легче, чем Г2Т6 (соответственно дорожки 3 и 5). Вероятно, это связано со стабилизацией самокомплементарных gC-структур Т_n-последовательностью, находящейся на 3'-конце. Нуклеотидная последовательность, связывающая комплекс «ТГК – апо А-І», становится недоступной действию нуклеазы S1 и ДНКазы I и представляет собой последовательность GG(CG G)₃T₃ ± 1N (рис. 2, дорожки 1 и 2). Данный результат дублируется при инкубации олигонуклеотидов с нуклеазой S1.

В предыдущих работах [1, 7] показано, что реакция копирования ДНК крысы активировалась как тетрагидрокортизолом, так и его комплексом с апо А-І. При молярном соотношении ДНК и комплекса «ТГК – апо А-І», равном 1:50, синтезируется на 22–27 % больше копий ДНК, чем в отсутствие последнего. К подобному результа-

ту приводят как фрагмент Кленова, так и ДНК-полимеразы из экстракта ядер клеток печени. Дальнейшее повышение концентрации комплекса приводило к подавлению копирования ДНК. В данной работе проводили аналогичные эксперименты по копированию ДНК человека. На рис. 3 представлены результаты сканирования радиоавтографов продуктов копирования ДНК человека фрагментом Кленова в присутствии комплекса «ТГК – апо А-І». Достоверно (n = 8, p < 0,05) отличаются от контроля (ДНК без комплекса, 1-й столбец) значения при соотношении 8 и 32 комплекса на 1000 пар нуклеотидов ДНК (соответственно 2-й и 4-й столбцы). Но при соотношении 16 комплексов на 1000 пар нуклеотидов ДНК (3-й столбец) возникает ингибирование копирования ДНК избытком комплекса, который начинает

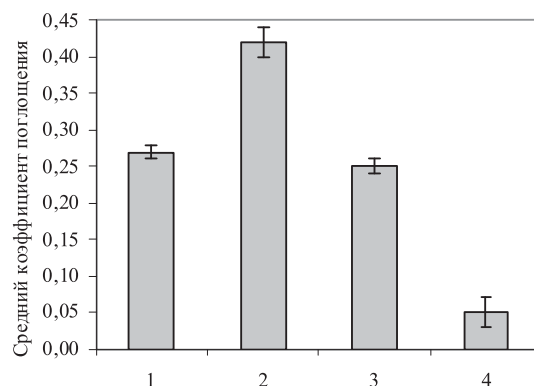


Рис. 3. Копирование ДНК с помощью фрагмента Кленова в присутствии комплекса «ТГК – апо А-І» (среднее ± стандартное отклонение). Обозначения столбцов: 1 – ДНК в отсутствие комплекса, 2, 3, и 4 – соответственно 8, 16 и 32 комплекса на 1000 пар нуклеотидов ДНК.

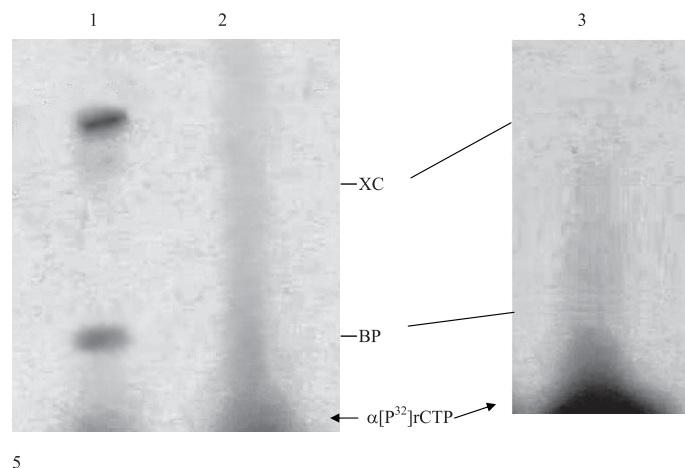


Рис. 4. Транскрипция ДНК крысы, катализируемая РНК-полимеразами белкового экстракта из ядер клеток печени крысы. Радиоавтограф 15 % ПААГ после разделения электрофорезом ^{32}P -транскриптов суммарной РНК, образовавшейся в присутствии и в отсутствие комплекса «стероидный гормон – апоА-I» (гормон: ТГК или кортизол).
 1. ДНК + ядерный белковый экстракт + [ТГК – апо-А-I], ДНК:комплекс – 1:10 моль/моль;
 2. ДНК + ядерный белковый экстракт, контроль;
 3. ДНК + ядерный белковый экстракт + [кортизол – апо-А-I], ДНК:комплекс – 1:10 моль/моль.

конкурировать с ДНК-полимеразой за места связывания. Таким образом, активация копирования происходит при малых концентрациях комплекса, 0–8 на 1000 пар нуклеотидов ДНК, дальнейшее увеличение его содержания приводит к ингибированию синтеза ДНК (3-й столбец) вплоть до почти полного подавления (4-й столбец). Поэтому мы можем говорить о регулировании процесса копирования ДНК комплексом «ТГК – апо А-I», по крайней мере, *in vitro*.

На **рис. 4** представлены результаты влияния комплексов «стероидный гормон (ТГК или кортизол) – апо А-I» на транскрипцию ДНК. В условиях реакции транскрипции ДНК (**рис. 4**, дорожка 2) преинкубировали с комплексами «ТГК – апо А-I» (дорожка 1) или «кортизол – апо А-I» (дорожка 3) при молярном соотношении ДНК:комплекс, равном 1:10. Как следует из **рис. 4**, «комплекс ТГК – апо А-I» активирует транскрипцию ДНК, т. к. увеличивается относительное содержание новосинтезированных ^{32}P -транскриптов на 18–20 % с повышением концентрации комплекса «ТГК – апо А-I» по сравнению с контролем, что определено при сканировании радиоавтографов с использованием «BandScan». Кроме того, наблюдается образование транскриптов определенной длины (~70–53 N для верхнего пятна и ~12–15 N для нижнего пятна) (**рис. 4**, дорожка 1), в то время как в контроле в отсутствие комплекса «ТГК – апо А-I» образуются транскрипты различной длины (дорожка 2), т. е. совершенно меняется картина транскрипции. Комплекс «кортизол – апо А-I» не оказывает подобного влияния на транскрипцию ДНК (дорожка 3).

Заключение

Установленный ранее молекулярный механизм воздействия комплексов «стероидный гормон (ТГК,

дегидроэпиандростерон, дегидроэпиандростерон-сульфат, андростерон) – апо А-I» на природную ДНК, заключающийся в локальном изменении ее вторичной структуры, подтвержден в данной работе и на синтетических олигонуклеотидных дуплексах вида $A_n(\text{GCC})_3 \cdot (\text{CGG})_3T_n$. Дуплексы распадаются под влиянием комплекса «ТГК – апо А-I» на одноцепочечные олигонуклеотиды $5'-A_6\text{CC}(\text{GCC})_3$ и $5'-\text{GG}(\text{CGG})_3T_6$.

Дуплексы $A_n\text{CCGCCGCCGCC} \cdot \text{GGCGGCGGCGGT}_n$ ($n = 0, 3$ и 6) становятся чувствительными к нуклеазе S1 при взаимодействии с комплексом «тетрагидрокортизол – апо А-I», комплекс «кортизол – апо А-I» такого действия не оказывает. Олигонуклеотиды $\text{GG}(\text{CGG})_3T_n$ ($n = 3$ и 6) избирательно связываются с комплексом «тетрагидрокортизол – апо А-I» как в свободном состоянии, так и в составе комплементарного дуплекса, становясь недоступными действию нуклеазы S1 и ДНКазы I. Минимально достаточная для связывания комплекса «тетрагидрокортизол – апо А-I» нуклеотидная последовательность, недоступная действию нуклеаз, представляет собой $5'-\text{GG}(\text{CGG})_3T_3 \pm 1\text{N}$.

Показана способность апо А-I выполнять регуляторные функции в комплексе с восстановленной формой стероидного гормона – тетрагидрокортизолом, дозозависимо активируя транскрипцию ДНК крысы и копирование ДНК человека *in vitro*. Апо А-I, по-видимому, является переносчиком стероидного гормона в ядро и в комплексе с тетрагидрокортизолом служит коактиватором процесса репликации, а также, подобно транскрипционным факторам, влияет на экспрессию генов, т. к. изменяет вторичную структуру ДНК в сайтах связывания. Возможно, в этом механизме принимают участие и другие белки в процессах регенерации органов и тканей *in vivo*.

Список литературы

1. Панин Л.Е., Гимаутдинова О.И., Кузнецов П.А. и др. Структура сайтов взаимодействия ДНК эукариот с комплексами «стероидный гормон – аполипопротеин А-I» // Молекуляр. биология. 2007. 41. 647–653.
2. Panin L.E., Gimautdinova O.I., Kuznetsov P.A. et al. Structure of the interaction sites of eukaryotic DNA with «steroid hormone – apolipoprotein A-I» complexes // Molekulyar. biologiya. 2007. 41. 647–653.
3. Panin L.E., Gimautdinova O.I. The role of steroid hormone metabolites in complexes with apolipoprotein A-I in regeneration processes // III Int. Symp. «Problems of Biochemistry, Radiation and Space Biology». М.; Dubna, 2007. 190.
4. Панин Л.Е., Гимаутдинова О.И., Кузнецов П.А. и др. Влияние комплекса «тетрагидрокортизол – аполипопротеин А-I» на вторичную структуру эукариотической ДНК и ее взаимодействие с РНК-полимеразой // Биохимия. 2002. 67. 953–958.
5. complex on the secondary structure of eukaryotic DNA and its interaction with RNA polymerase // Biokhimia. 2002. 67. 953–958.
6. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis J. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Edition. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 583.
7. Vogt V.M. Purification and further properties of single-strand-specific nuclease from *Aspergillus oryzae* // Eur. J. Biochem. 1973. 33. 192–200.
8. Dignam J.D., Lebovitz R.M., Roeder R.G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei // Nucleic Acids Res. 1983. 11. 1475–1489.
9. Гимаутдинова О.И., Панин Л.Е., Базалук В.В., Кузнецов П.А. Влияние комплекса «стероид – аполипопротеин А-I» на копирование ДНК // Бюл. СО РАМН. 2007. (5). 41–44.
10. Gimautdinova O.I., Panin L.E., Bazaluk V.V., Kuznetsov P.A. The influence of «steroid – apolipoprotein A-I» complexes on DNA copy // Bul. SO RAMN. 2007. (5). 41–44.

THE PRIMARY AND SECONDARY DNA STRUCTURE INFLUENCE ON BINDING WITH «THE TETRAHYDROCORTISOL – APO A-I» COMPLEX: THE PLACE OF SUCH ADDUCTS IN THE TRANSCRIPTION AND COPYING

Olga Ivanovna GIMAUTDINOVA, Vitalina Vitaljevna BAZALUK, Pavel Aleksandrovich KUZNETSOV, Nadezhda Ivanovna KLEIMENOVA

Scientific Research Institute of Biochemistry of SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakova st., 2

Oligonucleotides CGG type with T_n -sequence at 3'-end are binding best to the apo A-I-antibodies covalently linked to the Sepharose 4B when those are imbued apo A-I in tetrahydrocortisol presence. It has been shown that $GG(CGG)_3T_{3\pm 1}N$ is a minimal length oligonucleotide with reliable binding and thus resistant against enzyme hydrolysis by S1 nuclease and DNAase I. It has been demonstrated that THC – apo A-I triggers *in vitro* DNA copy and transcription of inner single-stranded areas in a measured manner, proportional to a dose single-stranded areas emergence is influenced by the THC – apo A-I complex.

Key words: DNA structure, oligonucleotides, apolipoprotein A-I, tetrahydrocortisol, DNA transcription and copying.

Gimautdinova O.I. – doctor of biological sciences, head of laboratory of the molecular biology, e-mail: gimolga@soramn.ru

Bazaluk V.V. – associate research assistant, laboratory of the molecular biology, e-mail: v_bazaluk@mail.ru

Kuznetsov P.A. – candidate of biological sciences, research assistant, laboratory of the molecular biology, e-mail: pawelkuzn@mail.ru

Kleimenova N.I. – associate research assistant, laboratory of the molecular biology, e-mail: gimolga@soramn.ru