

## EXCISION DE LA REGION DU DNA LIEE A LA RNA POLYMERASE IN VITRO

A.SENTENAC, A.RUET et P.FROMAGEOT

*Service de Biochimie, Département de Biologie, Centre d'Etudes Nucléaires, Saclay, 91-Gif-sur-Yvette, France*

Reçu le 30 août 1968

After synthesis of short, nascent oligonucleotide in the presence of  $(^{32}P)$ DNA, GTP, CTP, UTP and 3'dATP, one can excise with deoxyribonuclease a ternary complex of RNA polymerase, protected DNA and oligonucleotide, while the enzyme simply bound to the template is removed by increasing the ionic strength. This ternary complex is retained on nitrocellulose membranes. On polyacrylamide gel electrophoresis it migrates faster than RNA polymerase alone. The protected portion of the DNA is constituted of about 75 nucleotides. It might represent the sites for RNA initiation.

## 1. Introduction

Novak [1] a indiqué que la RNA polymérase protège une partie du DNA de l'action de la désoxyribonuclease pancréatique. Cependant, l'intérêt de l'isolement de cette partie du DNA est limitée par la fixation non spécifique de l'enzyme sur la matrice [2]. Il a été montré que l'enzyme qui n'est pas engagé dans la synthèse du RNA est détaché du DNA par des concentrations élevées en sel [3-5]. Or la formation d'un court oligoribonucléotide par substitution totale de 3'dATP à l'ATP suffit pour stabiliser l'association RNA polymérase - DNA [6]. La synthèse d'un oligonucléotide naissant n'impliquant qu'un déplacement très petit de l'enzyme, le DNA protégé, en présence de sel, contre l'action de la désoxyribonuclease devrait correspondre en grande partie aux sites d'initiation.

Dans le présent travail, on montre que, après avoir mis en présence du DNA, de la RNA polymérase, GTP, UTP, CTP et 3'dATP, puis augmenté la concentration en sel à 0,67 M, on peut exciser avec la désoxyribonuclease et isoler un complexe constitué de RNA polymérase, d'un fragment de DNA et d'oligoribonucléotide naissant. La RNA polymérase simplement fixée à la matrice est détachée par l'augmentation de la force ionique. On a ainsi en principe le moyen d'isoler la région du DNA qui comporte les sites d'initiation des oligonucléotides initiés par GTP. Ce complexe ternaire est retenu sur une membrane de nitrocellulose. Il migre à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide plus rapidement que la RNA polymérase seule. La portion de DNA qui lui est associée est constituée d'environ 75 nucléotides.

## 2. Matériel et méthodes

La RNA polymérase a été isolée de *E. coli* par la méthode de Chamberlin et Berg [7]. Le  $(^{32}P)$ DNA et le  $(^{32}P)$ tRNA ont été préparés à partir de *E. coli* cultivé sur milieu Tris-casamino acids-glucose [8] contenant du phosphate radioactif. Le  $(^{32}P)$ DNA a été extrait selon Saito et Miura [9] et le  $(^{32}P)$ tRNA par traitement au phénol et chromatographie sur colonne de sérum albumine méthylée [10]. Le  $(\gamma^{32}P)$ GTP a été préparé par photophosphorylation du GDP [11]. La désoxyribonuclease pancréatique est un produit de Mann Research Laboratories. L'  $(UP)_8$  U et le  $(Ap)_5$  A sont des dons du Dr. Grunberg-Manago. La méthode de filtration directe sur filtre Millipore et les conditions de mesure de l'initiation des chaînes de RNA ont été décrites [12]. L'électrophorèse de la RNA polymérase et du complexe ternaire excisé est effectuée dans un gel comportant 5% de polyacrylamide à pH 8,3 pendant 1 h.

## 3. Résultats et discussion

## 3.1. Action de la désoxyribonuclease pancréatique sur l'association RNA polymérase - DNA-oligonucléotide

La rétention des oligonucléotides marqués par le  $(\gamma^{32}P)$ GTP, sur les filtres Millipore [6] constitue le test de l'intégrité du complexe ternaire. La courbe 1 (fig. 1) montre que la rétention de ces oligonucléotides n'est pas modifiée à la suite de la dégradation du DNA par la désoxyribonuclease. Lorsqu'on traite l'association RNA polymérase - DNA par la désoxyribonuclease avant de donner à l'enzyme la possibilité de

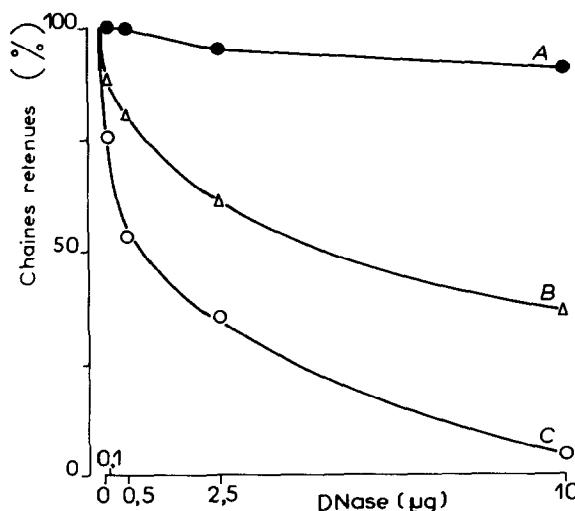


Fig. 1. Rétention des oligonucléotides naissants sur filtres Millipore en présence de désoxyribonucléase. A – Après synthèse préalable d'oligonucléotides naissants en présence de DNA de thymus, de sels, de CTP, UTP et ( $\gamma^{32}P$ )GTP (600 ipm/pmoles) 20  $\mu$ M, et de 3'dATP 2  $\mu$ M, pendant 45 min à 24°C, la DNase est ajoutée et l'incubation prolongée de 10 min. Les échantillons (0,5 ml) sont filtrés directement sur Millipore type HA. En l'absence de DNase, on retient 3 pmoles de ( $\gamma^{32}P$ )GTP sur le filtre. B – Fixation de RNA polymérase sur le DNA (2 min à 0°C), suivie de l'addition de DNase (10 min). L'incubation est poursuivie 45 min en présence des nucléotides. Sans DNase, 2,6 pmoles de ( $\gamma^{32}P$ )GTP sont retenus sur le filtre. C – Hydrolyse préalable du DNA par la DNase (10 min à 24°C), puis addition de RNA polymérase et des nucléotides. Sans DNase, on retient 3,5 pmoles de ( $\gamma^{32}P$ )GTP.

synthétiser des oligonucléotides, on perd progressivement des sites d'initiation (courbe 2). La courbe 3 est un contrôle de l'efficacité de la dégradation du DNA par la désoxyribonucléase.

### 3.2. Protection du DNA par la RNA polymérase

On mesure la quantité de ( $^{32}P$ )DNA retenu en présence de RNA polymérase par filtration directe sur filtre Millipore [12] après traitement par la désoxyribonucléase. La courbe 2 de la figure 2 montre que le degré de protection du DNA est fonction de la quantité de RNA polymérase introduite. Cette protection est accrue lorsque la RNA polymérase a synthétisé un oligonucléotide (courbe 1). Le NH<sub>4</sub>Cl 0,67 M ajouté après l'action de la désoxyribonucléase rend filtrable la majorité du ( $^{32}P$ )DNA retenu en l'absence de sel

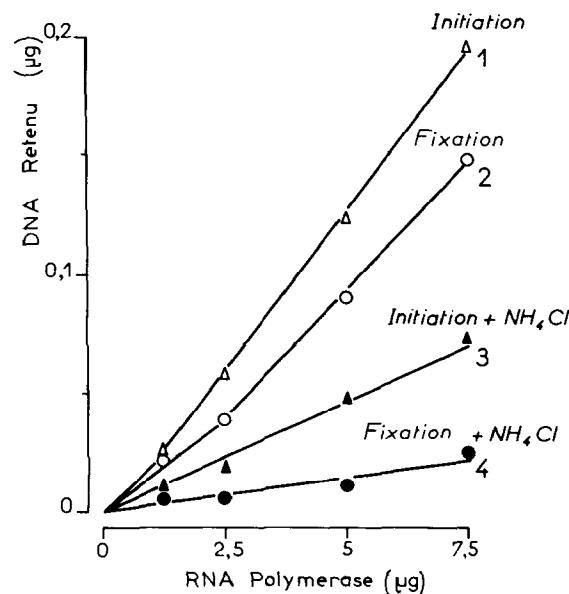


Fig. 2. Rétention d'un complexe RNA polymérase – ( $^{32}P$ )DNA sur filtre Millipore en présence de désoxyribonucléase. 1) Synthèse d'oligonucléotides: 4  $\mu$ g de ( $^{32}P$ )DNA (106.000 ipm), CTP, UTP, GTP (100  $\mu$ M), 3'dATP (2  $\mu$ M) sont incubés 30 min à 37°C avec des quantités variables de RNA polymérase, puis la DNase (30  $\mu$ g/ml) est ajoutée et l'incubation poursuivie 15 min. Les échantillons sont filtrés directement sur Millipores. 2) Fixation de RNA polymérase sur le DNA en absence de nucléotides (30 min à 37°C), puis addition de DNase. 3) Comme 1); 5 min après l'addition de DNase, on ajoute du NH<sub>4</sub>Cl (concentration finale 0,67 M) et on incube 10 min à 37°C. 4) Comme 2) avec addition de NH<sub>4</sub>Cl.

(courbe 4). Après stabilisation par synthèse d'oligonucléotide, de l'association RNA polymérase-DNA, l'accroissement de la force ionique permet de retrouver sur le filtre une proportion accrue de ( $^{32}P$ )DNA ayant échappé à l'action de la désoxyribonucléase (courbe 3).

Dans les expériences de la courbe 1 (figure 2), on constate que 1  $\mu$ g de la RNA polymérase protège 25 ng de DNA contre la désoxyribonucléase. L'activité spécifique de notre préparation de RNA polymérase étant de 1 pmole de RNA initié par  $\mu$ g d'enzyme avec le DNA du phage T<sub>7</sub>, on calcule que chaque molécule de RNA polymérase protège en moyenne 75 nucléotides. Cette estimation est trop forte si en mesurant la formation de chaînes de RNA, on ne dénombre pas toutes les molécules de RNA polymérase capables de

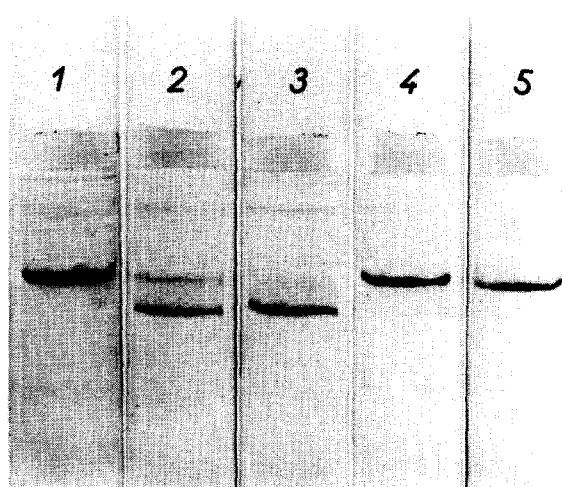


Fig. 3. Electrophorèse du complexe RNA polymérase - DNA excisé par la désoxyribonucléase. 1) RNA polymérase seule (6 µg); 2) RNA polymérase + DNA de thymus (15 µg) (5 min à 34°C) puis 5 µg de DNase (5 min à 34°C); 3) RNA polymérase + DNA + nucléotides (3'dATP à la place de l'ATP) et sels (5 min à 34°C) puis DNase (5 min à 34°C); 4) DNA + DNase (5 min à 34°C) puis RNA polymérase; 5) Expérience no. 3 sans DNA.

se fixer au DNA. On ignore d'autre part si ces nucléotides participent à un simple ou à un double brin de DNA. Quoi qu'il en soit, la protection d'un tel segment de DNA par la RNA polymérase est compatible avec le diamètre de l'enzyme lié, estimé à 120 Å par Slayter et Hall [13].

### 3.3. Isolement par électrophorèse du complexe ternaire excisé par la désoxyribonucléase

L'électrophorèse de la RNA polymérase sur gel à 5% de polyacrylamide met en évidence une bande principale de protéines (figure 3, cliché 1). En découpant le gel, on trouve dans cette fraction 25% de l'activité enzymatique déposée sur l'électrophorèse. La bande principale observée correspond donc à la RNA polymérase. Le mélange DNA - RNA polymérase ne quitte pas le gel supérieur, et on n'observe plus de RNA polymérase ni de DNA libres. Lorsque le mélange DNA - RNA polymérase est traité par la désoxyribonucléase, on voit apparaître dans le gel à 5% de polyacrylamide une bande protéique de faible intensité au niveau de la RNA polymérase témoin, et surtout une bande protéi-

que de migration plus rapide que la précédente (figure 3, cliché 2). Si l'on permet à la RNA polymérase associée au DNA de synthétiser des oligonucléotides avant le traitement par la désoxyribonucléase, on observe aussi la formation d'une bande protéique de migration rapide (figure 3, cliché 3). En utilisant du (<sup>32</sup>P)DNA et en découpant le gel après l'électrophorèse, on constate que la bande protéique de migration rapide est marquée par <sup>32</sup>P. On concluera que cette bande correspond au complexe entre la RNA polymérase et le segment de DNA qu'elle protège contre l'action de la désoxyribonucléase. Les clichés 4 et 5 constituent des contrôles.

Bremer, Yegian and Konrad [14] ont montré que la RNA polymérase est inactivée par le RNA de transfert, probablement à la suite de la formation d'un complexe irréversible. L'électrophorèse sur gel confirme cette suggestion. On trouve en effet, en mélangeant la RNA polymérase et du (<sup>32</sup>P)tRNA, une bande de migration rapide, au niveau de laquelle se retrouve exclusivement la radioactivité. Le (<sup>32</sup>P)tRNA seul, dans les mêmes conditions, sort du gel en migrant vers l'anode. Le complexe RNA polymérase - tRNA migre comme, ou à peine plus vite que le complexe entre la RNA polymérase et le segment de DNA protégé contre la désoxyribonucléase. L'analogie entre les migrations électrophorétiques de ces deux types de complexes, comme entre les nombres de nucléotides qu'ils contiennent, suggère que l'accroissement de la migration électrophorétique de la RNA polymérase provient des charges apportées par les acides nucléiques. Il est intéressant de constater que ni le (Ap)<sub>5</sub>A ni le (Up)<sub>8</sub>U ne sont capables de modifier de façon décelable la vitesse de migration de la RNA polymérase bien que (Up)<sub>8</sub>U serve faiblement de matrice pour la synthèse de poly A [15].

### Références

- [1] R.L. Novak, Biochim. Biophys. Acta 149 (1967) 593.
- [2] D. Pettitjohn et T. Kamiya, J. Mol. Biol. 29 (1967) 275.
- [3] P. Chambon, M. Ramuz et J. Doly, Biochem. Biophys. Res. Commun. 21 (1965) 156.
- [4] J.P. Richardson, J. Mol. Biol. 21 (1966) 83.
- [5] D.D. Anthony, E. Zeszotek et D.A. Goldthwait, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 56 (1966) 1026.
- [6] A. Scutenac, A. Ruet et P. Fromageot, Europ. J. Biochem., sous presse.

- [7] M.Chamberlin et P.Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 48 (1962) 81.
- [8] A.W.Kozinski et W.Szybalski, Virology 9 (1959) 260.
- [9] H.Saito and K.Miura, Biochim. Biophys. Acta 72 (1963) 619.
- [10] J.D.Mandell et A.D.Hershey, Anal. Biochem. 1 (1960) 66.
- [11] M.Avron, Anal. Biochem. 2 (1961) 535.
- [12] A.Sentenac, E.J.Simon and P.Fromageot, Biochim. Biophys. Acta 161 (1968) 299.
- [13] H.S.Slayter et C.E.Hall, J. Mol. Biol. 21 (1966) 113.
- [14] H.Bremer, C.Yegian and M.Konrad, J. Mol. Biol. 16 (1966) 94.
- [15] B.F.C.Clark et T.M.Jaouni, J. Biol. Chem. 240 (1965) 3379.