



УДК 576.316.343

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ РОЗЕТКОПОДОБНЫХ НУКЛЕОПРОТЕИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI*

Е. В. Киселева, Е. В. Лихошвай, Н. Б. Христолюбова,
Н. В. Воробьева, Н. А. Сердюкова, А. Г. Ромащенко

Введение. Реализация генетических процессов, таких, как транскрипция, репликация, рекомбинация у про- и эукариот, находится в прямой зависимости от конформационного состояния молекул ДНК [1, 2]. Современные электронно-микроскопические методы открывают широкие возможности для изучения особенностей пространственной организации и укладки ДНК в геноме различных организмов. При этом большое значение приобретают условия выделения генетического материала из клеток и методы приготовления электронно-микроскопических препаратов, от которых зависит возможность выявления дополнительных уровней компактизации ДНК. Проведенные к настоящему времени исследования структуры бактериального нуклеоида дали возможность выявить в его составе два уровня организации ДНК: наличие крупных петель (доменов) размером 30 мкм и нуклеосомоподобных частиц, которые аналогичны уровням укладки ДНК в составе эукариотической хромосомы [3].

Использование мягких условий выделения генетического материала из клеток *E. coli* позволило нам обнаружить в обогащенной внехромосомными элементами фракции наряду с линейными и кольцевыми молекулами многочисленные розеткоподобные структуры диаметром около 1 мкм [4], которые по морфологии и размерам близки к розеткам, описанным в работах по анализу структуры ДНК фагов, вирусов [5, 6], а также митохондрий [7] и хромосом эукариот [8].

В настоящей работе для анализа природы факторов, участвующих в формировании обнаруженных у бактерий розеткоподобных комплексов, изучали действие различных ферментов на их структуру.

Материалы и методы. Исследуемую фракцию, содержащую многочисленные внехромосомные элементы и фрагменты бактериальной хромосомы, получали методом ступенчатого центрифугирования лизата сферопластов *E. coli* после их разрушения слабым осмотическим шоком под действием 0,02 М трис-НСl, рН 8,1 [4].

Обработку образцов ДНКазой («Sigma», США; 0,01—1 мг/мл) проводили в присутствии 0,02 М MgSO₄ и 0,02 М трис-НСl, рН 8,1, в течение 10 и 30 мин при 0 °С [9]. Реакцию останавливали добавлением 0,02 М ЭДТА. Обработку фосфолипазой С («Sigma», США; 1 мг/мл) вели по модифицированному методу [10] в присутствии 0,02 М дитиотрептола, поливинилсульфата (0,2 мг/мл), 0,001 М ЭДТА и 0,02 М трис-НСl, рН 8,1, в течение 15 и 30 мин при 37 °С. Обработку предварительно прогретой в течение 15 мин при 100 °С панкреатической РНКазой («Sigma», США; 0,01—1 мг/мл) осуществляли в растворе, содержащем 0,02 М ЭДТА и 0,02 М трис-НСl, рН 8,1, в течение 15 и 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали охлаждением реакционной смеси до 0 °С [11]. Обработку предварительно выдержанной 15 мин при 60 °С проназой («Sigma», США;

0,1—2 мг/мл) проводили в присутствии 0,2 %-ного DS-Na, 0,02 М ЭДТА и 0,02 М трис-HCl, pH 8,1, в течение 15 мин и 1 ч при 37 °С [12]. Для контроля исследуемую фракцию инкубировали в течение 15 и 30 мин при 37 °С в среде, содержащей 0,02 М ЭДТА и 0,02 М трис-HCl, pH 8,1.

Приготовленные по методу [13] электронно-микроскопические препараты контрастировали уранилацетатом или оттеняли платиной — палладием и просматривали в микроскопе JEM-100С (Япония). Измерение длины молекул проводили с помощью курвиметра на увеличенных фотографиях.

Результаты и обсуждение. Наиболее типичные розетки (рис. 1, а) представляют собой релаксированные формы молекул ДНК, содержащие центральную электронно-плотную глобулу (30—60 нм в диаметре) и радиально расходящиеся от нее петли. Средняя контурная длина петли составляет $1,06 \pm 0,41$ мкм, а число петель достигает в среднем $15,3 \pm 6,7$. Кроме отдельно лежащих розеток, встречаются крупные их скопления (от 2 до 10 и более), связанные между собой петлями ДНК. Проведенный анализ показал, что к внехромосомным элементам *E. coli* можно отнести отдельные и связанные розетки, не содержащие свободных концов ДНК. При этом контурная длина ДНК в некоторых розетках совпадает с длиной плазмид, описанных для данного штамма бактерий [14]. Крупные скопления связанных розеток являются, вероятно, фрагментами бактериальной хромосомы. О присутствии розеткоподобного уровня укладки ДНК в составе бактериальной хромосомы сообщалось нами ранее [15], косвенные данные об этом имеются и у других авторов [16, 17].

Показано также, что материал бактериального нуклеоида можно выделить в виде компактных глобул диаметром около 100 нм [18], сходных с хромомерами эукариот [8]. Нами было установлено, что эти глобулы превращаются в розеткоподобные структуры ДНК при увеличении времени инкубации или гомогенизации материала [15]. Можно предположить, что петли розеток в составе хромомероподобных глобул упаковываются с помощью нуклеосомоподобных структур, однако вы stability их в составе розеток нам не удалось, вероятно, из-за высокой нестабильности этих структур в хроматине бактерий [19].

Контрольные эксперименты показали, что морфология розеток сохраняется после 15 и 30 мин инкубации материала в буферном растворе, содержащем ЭДТА, однако в их составе появляется небольшое количество петель с контурной длиной ДНК 2—3 мкм.

При обработке образцов ДНКазой (0,05 мг/мл) в течение 15 мин регистрируется образование разрывов в петлях розеток (рис. 1, б). При концентрации фермента 1 мг/мл и времени инкубации 30 мин на препаратах наблюдаются только мелкие фрагменты ДНК размером около 0,1 мкм. В то же время центральные глобулы розеток практически не изменяются и сохраняют свои размеры, что свидетельствует о наличии в их составе компонентов, устойчивых к действию фермента.

Под действием фосфолипазы в структуре розеток появляются крупные петли с контурной длиной ДНК до 3—5 мкм и уменьшается число петель. Одновременно регистрируется увеличение размеров центральных глобул (рис. 1, в), что происходит, вероятно, за счет связывания и накопления фермента в этих участках и допускает возможность присутствия липидов в центральной области розеток. Известно, что нуклеоид бактерий содержит до 1 % липидов, которые, очевидно, обеспечивают прикрепление нуклеопротеидных комплексов к плазматической мембране бактерий при репликации.

Обработка образцов РНКазой (0,01 мг/мл) вызывает увеличение диаметра розеток за счет появления в их составе крупных петель длиной 3—5 мкм. Повышение концентрации фермента до 0,05 мг/мл приводит к разрыхлению центральных электронно-плотных глобул (рис. 1, г) и дальнейшему увеличению контурной длины петель в розетках. При концентрации РНКазы 0,1 мг/мл вместо розеток на препаратах наблюдаются одиночные и связанные клубки диаметром до 10 мкм,

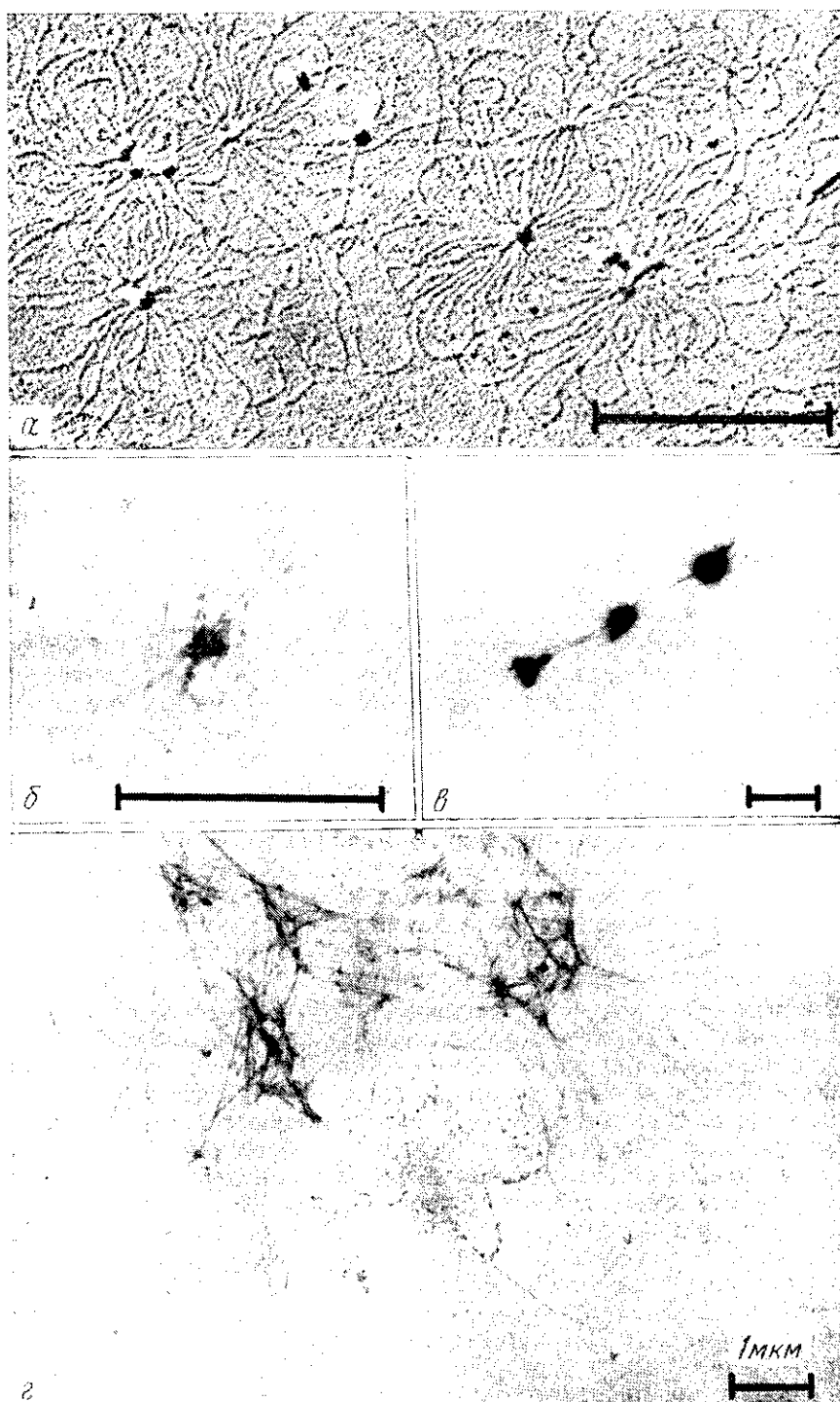


Рис. 1. Розеткоподобное строение нуклеопротеидных комплексов, выделенных из лизата бактериальных клеток (а), и изменение их морфологии под действием ДНКазы (б), фосфолипазы (в) и РНКазы (г)

Fig. 1. Rosette-like structure of nucleoprotein complexes isolated from bacterial cell lysate (a) and the change in their morphology under the influence of DNase (b), phospholipase (c) and RNAase (d)

состоящие из перепутанных нитей ДНК. Сходные изменения были описаны при анализе действия РНКазы на розетки в составе ДНК митохондрий [7], хотя они не наблюдались при изучении метафазных хромосом и интерфазного хроматина эукариот [8, 20].

В структурной организации различных генетических элементов ведущую роль играют белки [21]. Наши данные показали, что депротенизация вызывает наиболее существенные изменения в структуре розеток. Инкубация материала с проназой (0,1 мг/мл) приводит к уменьшению диаметра центральных глобул до 10—15 нм и увеличению контурной длины петель розеток до 5—10 мкм (рис. 2, а). С повышением концентрации проназы и увеличением времени инкубации материала центральные глобулы в розетках исчезают полностью. На препаратах появляются перекрученные клубки нитей ДНК (рис. 2, б), а также протяженные, организованные в виде спиралей кольцевые и петлевые молекулы ДНК (рис. 2, в). При концентрации проназы 2 мг/мл на препаратах появляется большое количество полностью расправленных кольцевых и петлевых молекул ДНК с контурной длиной от 17—20 до 300 мкм и более (рис. 2, г).

Уложенные по спирали молекулы ДНК были описаны ранее при депротенизации складчатой структуры бактериальной хромосомы, содержащей петли длиной 30 мкм [17]. Это позволяет предположить, что в основе образования как крупной складчатой структуры бактериальной хромосомы, так и наблюдаемых нами розеток (диаметром 1 мкм) лежат сходные механизмы упаковки молекул ДНК.

Таким образом, полученные данные показали, что в организации розеткоподобной укладки ДНК *E. coli* участвуют рибонуклеопротеиды и, возможно, липиды. В настоящее время в стабилизации высших наднуклеосомных уровней укладки ДНК в хромосомах про- и эукариот большая роль отводится низкомолекулярным прочно связанным с ДНК белкам [22] и долгоживущим низкомолекулярным РНК [23], выделенным из клеток различных организмов.

Обнаруженные нами розетки по морфологии и размерам сходны со структурами, описанными при анализе ДНК митохондрий [7], минихромосом [24], метафазных хромосом и интерфазного хроматина эукариот [8, 20], а также вирусов и фагов [5, 6], на основании чего можно заключить, что они отражают универсальный принцип упаковки ДНК в составе различных генетических элементов.

Рассматривая вопрос о механизме образования розеток следует отметить, что стабилизация различных уровней упаковки ДНК в составе генетических элементов может обеспечиваться не только взаимодействием ДНК с другими видами макромолекул (РНК, белками, липидами), но и силами внутримолекулярного взаимодействия комплементарных участков ДНК. Присутствие в исследуемой нами фракции большого количества складчатых форм ДНК, содержащих регулярно расположенные петли, позволяет предположить возможность существования внутренней периодичности в молекулярной структуре ДНК. И хотя прямых доказательств этому еще не получено, в пользу такого предположения могут свидетельствовать результаты обработки хроматина бактерий микрококковой нуклеазой [25], показавшие его распад на короткие фрагменты ДНК размером около 2400 нуклеотидных пар (0,8 мкм), что близко к контурной длине петель в составе розеток. При этом участки, чувствительные к нуклеазе, располагаются, очевидно, в основании петель розеток и обогащены АТ-последовательностями, поскольку известно, что фермент предпочитает именно эти области ДНК [26].

Имеются данные, что локальное изменение конформации ДНК в местах изгибов может служить сигналом при связывании белков с ДНК [27]. Эти факты в совокупности с тем, что петли розеток по контурной длине ДНК близки к среднему размеру гена у прокариот, позволяют предположить, что центральные области розеток содержат регулятор-

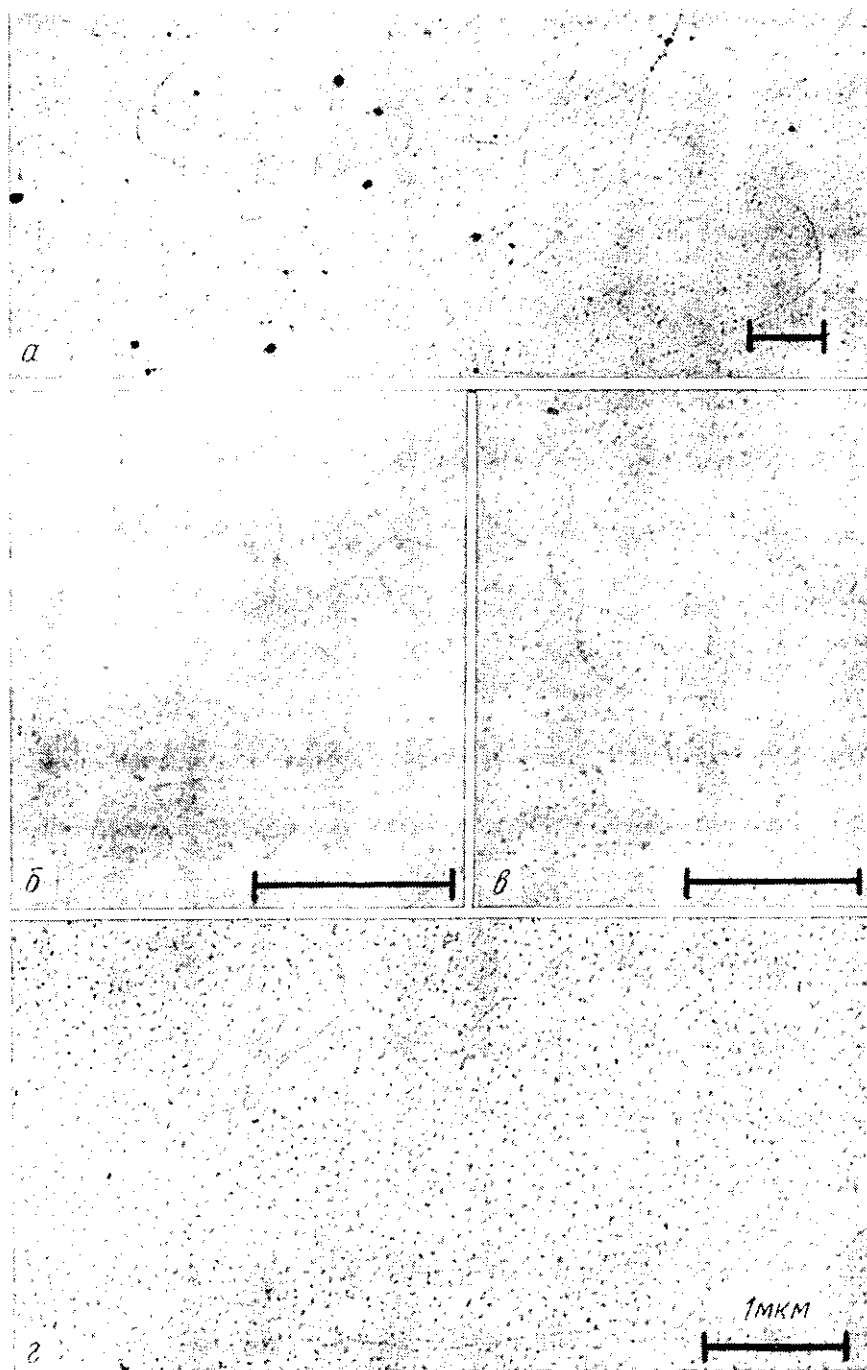


Рис. 2. Последовательные этапы изменения розеткоподобных структур под действием проназы: *a* — уменьшение диаметра центральной глобулы и увеличение контурной длины петель в составе розеток; *б, в* — складчатые и спиралевидные формы ДНК при разворачивании розеток; *г* — кольцевая молекула ДНК, образовавшаяся в результате полного расплавления петель розетки

Fig. 2. Successive stages of the change of rosette-like structures under the influence of pronase: *a* — diminution of the central globule diameter and increase of the contour length of loops in rosettes; *б, в* — folding and coiled forms of DNA during unfolding of rosettes; *г* — circular DNA molecule formed as a result of the complete unfolding of rosette loops

ные участки ДНК, а петли представляют транскрибируемые части генома. В таком случае складывание ДНК в виде розеток может представлять не только эффективный способ упаковки генетического материала, но и иметь связь с регуляцией важнейших генетических процессов.

ELECTRON-MICROSCOPIC STUDY OF THE STRUCTURE OF ROSETTE-LIKE NUCLEOPROTEID COMPLEXES ISOLATED FROM *ESCHERICHIA COLI* CELLS

*E. V. Kiseleva, E. V. Likhoshvay, N. B. Khristolyubova,
N. V. Vorobyova, N. A. Serdyukova, A. G. Romashchenko*

Institute of Cytology and Genetics,
Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

Summary

The structure of rosette-like DNA complexes is described in the material isolated by means of a mild technique from the bacterial cell lysate. DNase treatment is shown to lead to ruptures in the rosettes' loops. Phospholipase and RNase destroy the bonds between loops in the central region of rosettes, due to which the contour length of the loops increases considerably. Pronase induces a diminution of the diameter of central electron-dense globules, that leads to a gradual unfolding of rosettes to form the circular and loop-like structures. This evidences for participation of ribonucleoproteins and, possibly, lipids in the formation of rosette-like DNA packing which may be connected with the functional organization of the prokaryotic genome.

1. Wang J. C. DNA supercoiling and its effects on the structure of DNA // J. Cell Sci.—1984.— Suppl. 1.— P. 21—29.
2. Marilley M., Buongiorno-Nardelli M. Relationship between the organization of DNA loop domain and replicons in the eucaryotic genom // Protein involved DNA replication.— New York; London: Plenum press, 1984.— P. 163—168.
3. Харченко Е. П. Уровни организации прокариотического нуклеотида и эукариотической хромосомы // Журн. эволюц. биохимии и физиологии.— 1980.— 16, № 1.— С. 8—18.
4. Внехромосомные элементы *E. coli* во фракции, содержащей нуклеопротеидные комплексы обратной транскриптазы с эндогенной матрицей / А. Г. Ромашченко, Н. В. Воробьева, О. А. Грабкина и др. // Докл. АН СССР.— 1984.— 277, № 5.— С. 1264—1266.
5. Caro L. G. The molecular weight of lambda DNA // Virology.— 1965.— 25, N 2.— P. 226—236.
6. Structure and composition of the adenovirus. Type 2 core / D. G. Brown, M. Westphal, B. G. Burlingham et al. // J. Virol.— 1975.— 16, N 2.— P. 366—367.
7. Van Tuyle G. C., McPherson M. L. A compact form of rat liver mitochondrial DNA stabilized by bound proteins // J. Biol. Chem.— 1979.— 254, N 13.— P. 6044—6053.
8. Зацепина Д. В., Поляков В. Ю., Ченцов Ю. С. Электронно-микроскопическое изучение хромономы и хромомеров в митотических и интерфазных хромосомах // Цитология.— 1983.— 25, № 2.— С. 123—129.
9. Worcel A., Burgi E. On the structure of the folded chromosome of *E. coli* // J. Mol. Biol.— 1972.— 71, N 2.— P. 127—147.
10. DNA-polymerase with characteristics of reverse transcriptase purified from human milk / J. A. Kantor, Y. H. Lec, J. G. Chirikjan, W. F. Feller // Science.— 1979.— 204, N 4391.— P. 511—513.
11. Clewell D. B., Helinski D. R. Supercoiled circular DNA-protein complex in *E. coli* purification and induced conversion to an open circular DNA form // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1969.— 62, N 4.— P. 1159—1166.
12. Pettijohn D. E., Hecht R. RNA molecules found to the folded bacterial genome stabilize DNA folds and segregate domains of supercoiling // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.— 1973.— 38.— P. 31—41.
13. Kleinschmidt A. K. Monolayer technique in electron microscopy of nucleic acids molecules // Meth. Enzymol.— 1968.— 12 B.— P. 361—377.
14. Перебитюк А. П., Боронин А. М., Скрябин Г. К. Внехромосомные ДНК в штамме *E. coli* MRE-600 // Докл. АН СССР.— 1978.— 240, № 4.— С. 990—992.
15. Электронно-микроскопический анализ уровней структурной организации хромосомы *Escherichia coli* / Е. В. Киселева, Е. В. Лихошвай, Н. А. Сердюкова, Н. Б. Христолюбова // Там же.— 1986.— 289, № 5.— С. 1235—1237.
16. Leon P., Macaya G. Properties of DNA rosettes and their relevance to chromosome structure // Chromosoma.— 1983.— 88, N 3.— P. 307—314.
17. Sloof P., Maagdelijn A., Boswinkel E. Folding of procaryotic DNA isolation and characterization of nucleoides from *Bacillus licheniformis* // J. Mol. Biol.— 1983.— 163, N 2.— P. 277—297.
18. Materman E. C., Van Gool A. P. Compact *E. coli* nucleoides in a highly supercoiled conformation // J. Bacteriol.— 1978.— 135, N 2.— P. 703—706.

19. Broylest S. S., Pettijohn D. E. Interaction of the *Escherichia coli* HU protein with DNA. Evidence for formation of nucleosome-like structures with altered DNA helical pitch // J. Mol. Biol.—1986.—187, N 1.—P. 47—60.
20. Rosette-like structures from nuclei with diffuse (nucleomeric or nucleosomic) chromatin / A. N. Prusov, V. Yu. Polyakov, O. V. Zatsepina et al. // Cell Biol. Int. Rep.—1983.—7, N 10.—P. 849—858.
21. Comings D. E., Okada T. A. Nuclear proteins. The fibrillar nature of the nuclear matrix // Exp. Cell Res.—1976.—103, N 2.—P. 341—360.
22. Прочно связанные с ДНК белки в составе нуклеоида *E. coli* / А. И. Газиев, Л. А. Фоменко, Д. Т. Закржевская, В. А. Сигаева // Биохимия.—1985.—50, № 5.—С. 814—819.
23. Мазин А. Л. Классификация низкомолекулярных РНК млекопитающих // Молекуляр. биология.—1983.—17, № 4.—С. 784—792.
24. Ultrastructural features of minute chromosomes in a methotrexate-resistant mouse 3T3 cell line / B. A. Hamkalo, P. J. Farnham, R. Johnston, R. T. Schimke // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82, N 2.—P. 1126—1130.
25. Isolation properties and nucleolytic degradation of chromatin from *Escherichia coli* / K. Sjaastad, P. Fadnes, P. G. Kruger et al. // J. Gen. Microbiol.—1982.—128, N 12.—P. 3037—3050.
26. Horz W., Alterburger W. Sequence specific cleavage of DNA by micrococcal nuclease // Nucl. Acids Res.—1981.—9, N 1.—P. 2558—2643.
27. Jonathan W. DNA banding and kinking // Nature.—1984.—309, N 5966.—P. 312—313.

Ин-т цитологии и генетики
Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск

Получено 11.05.86

УДК 577.355

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СИНТЕЗИРУЕМОГО IN VITRO КАЗЕИНА С ИСКУССТВЕННЫМИ ФОСФОЛИПИДНЫМИ ВЕЗИКУЛАМИ

Д. И. Балков, А. Э. Рачков, Л. И. Колчинская,
Н. Ф. Стародуб, А. В. Ельская, В. К. Лишко

Введение. Биогенез мембранных и секретируемых белков характеризуется рядом особенностей, в том числе синтезом на мембраносвязанных полисомах и наличием в незрелых полипептидах N-концевой «сигнальной» («лидерной») последовательности. Встраивание и секреция их осуществляется, по-видимому, ко-трансляционно [1—6]. Этот процесс включает связывание с эндоплазматическим ретикуломом рибосом, синтезирующих секреторный или мембранный полипептид, транслокацию его через липидный бислой и процессинг путем удаления сигнального пептида [4—7]. Существует мнение, что для связывания комплекса рибосома — растущий полипептид с мембраной и транслокации синтезирующегося белка необходимо наличие особого мембранного рецептора [8, 9]. Другие исследователи полагают, что ведущая роль в этом процессе принадлежит липидному бислою мембраны [10—12]. Для изучения трансмембранного переноса белков весьма плодотворным является использование моделей на основе реконструированных систем биосинтеза белка, содержащих липосомы с заданными характеристиками (внутренний объем, липидный состав и т. д.).

В настоящей работе рассматривается вопрос о возможности включения в липосомы эукариотических белков в процессе их синтеза в бесклеточной бесклеточной системе из зародышей пшеницы. Для этого использовали поли(А)⁺РНК из лактирующей молочной железы, кодирующую преимущественно секреторный белок казеин, и поли(А)⁺РНК из лизата ретикулоцитов, кодирующую несекреторный белок глобин.

Материалы и методы. Тотальную РНК из молочной железы коров получали по модифицированному методу [13]; РНК из ретикулоцитов кролика — согласно [14]. Поли(А)⁺РНК выделяли из суммарных препаратов РНК по методу, описанному ра-