

Вивчення хрестоподібної структури суперспіральної ДНК плазміди *pUC8* за допомогою атомно-силової мікроскопії та комп'ютерного моделювання

О. П. Лиманський

Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечнікова АМН України
Вул. Пушкінська, 14, Харків, 61057, Україна

Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН
Вул. Пушкінська, 83, Харків, 61023, Україна

Університет штату Аризона, Відділення мікробіології
Темпе, AZ 85287-2701, USA

Вперше візуалізовано хрестоподібну структуру суперспіральної ДНК плазміди pUC8, іммобілізованої на аміномодифікованій слюді у буферному розчині, після висушування зразка методом атомно-силової мікроскопії (АСМ). На основі АСМ зображення ДНК, отриманого у повітрі, встановлено, що хрест утворюють інвертовані повтори довжиною 15 нуклеотидів. Шляхом комп'ютерного моделювання доведено, що хрестоподібну структуру утворено шпильками довжиною 11 нуклеотидів та петлями розміром 4 нуклеотиди. Визначено вільну енергію шпильки (-17,8 ккал/моль).

Вступ. Суперспіральні ДНК мають суттєве значення для найважливіших генетичних процесів — рекомбінації, транскрипції, регуляції експресії генів тощо. Закручування молекули ДНК у плектонічну суперспіраль супроводжується утворенням ділянок з близькими контактами між її віддаленими фрагментами. Вважається, що утворення таких контактів є необхідною умовою для рекомбінації ДНК та далекодіючої взаємодії під час регуляції процесів транскрипції [1—3].

Хрестоподібна структура — одна з альтернативних форм, що утворюється в суперспіральних ДНК, може бути безпосередньо візуалізована за допомогою скануючої зондової мікроскопії [4].

Скануюча зондова мікроскопія, яка включає атомно-силову мікроскопію (АСМ) та скануючу тунельну мікроскопію, є відносно новим інструментом, що має винятково великі потенціальні можливості для структурної біології. Мікроскоп мо-

же працювати як у повітрі, так і в рідині. Для стабільних площинних зразків теоретично можна отримати атомарну роздільну здатність структури.

Однак істотним обмеженням практичного використання АСМ для вивчення структури біомолекул до недавнього часу було приготування зразка. Макромолекули, з одного боку, повинні бути відносно стабільно зв'язаними з поверхнею субстрату для запобігання їхнього зсуву, спричиненого зондом під час сканування. З іншого боку, для вивчення динаміки білково-нуклеїнового впізнання, наприклад, взаємодії нуклеїнових кислот з полімеразами, молекули ДНК і РНК мають бути доступними для ферменту, тобто мати певну динамічну рухливість.

До недавнього часу для дослідження неканонічних структур ДНК, до яких відносять і хрести, використовували дві групи експериментальних методів. Першу групу складають методи, засновані на внесенні розривів у ДНК, що відбуваються за допомогою ендонуклеаз, які специфічно гідролі-

зують ДНК. У хрестоподібних структурах розриви локалізуються в однопітккових петлях шпильок хрестів [5]. До другої групи відносять методи, засновані на використанні двовимірного електрофорезу в гелі [6]. При утворенні хреста під впливом негативної надспіралізації електрофоретична рухливість топоізомерів, які набули хрестоподібної структури, зменшується. Ця зміна рухливості молекул суперспіральних ДНК під час конформаційного переходу і є основою методу двовимірного електрофорезу.

Останнім часом завдяки використанню методу скануючої зондової мікроскопії [7—9] досягнуто істотного прогресу в дослідженні структури біополімерів та їхніх комплексів, про що, зокрема, свідчить щорічна кількість публікацій та посилян у базі даних Medline, яка безперервно зростає.

У даній роботі для прямої візуалізації хрестоподібної структури в суперспіральній ДНК використано атомно-силову мікроскопію та метод нанесення ДНК на слюду (субстрат для АСМ), в основі якого лежить проста процедура модифікації слюди, що дозволяє отримати стабільні АСМ-зображення молекул ДНК як у повітрі після висушування зразка, так і у водних розчинах за різних іонних умов. Визначено характерні лінійні розміри хреста, а також проведено моделювання термодинамічно найстабільніших хрестоподібних структур ДНК плазмід *pUC8*.

Матеріали і методи. В роботі використано суперспіральну ДНК плазмід *pUC8* довжиною 2665 пар нуклеотидів. Краплю розчину ДНК у концентрації 0,01 мкг/мл у ТЕ буфері (10 мМ трис-НСІ, рН 7,6, 1 мМ ЕДТА) об'ємом 7 мкл наносили на смугу модифікованої слюди розміром $\sim 1 \text{ см}^2$, промивали деіонізованою водою та обдували потоком аргону. Процедуру функціоналізації свіжосколотої слюди аміногрупами в парах 3-амінопропілтриетоксисилану (АПТЕС) детально описано раніше [8]. АПТЕС, який було отримано від фірми «Aldrich» та «United Chemical Technologies, Inc.» (США), очищали за допомогою вакуумної перегонки в парах аргону. Свіжосколоту слюду вміщували в скляний ексікатор в атмосферу АПТЕС на 1 год (АПІ-слюда) за кімнатних умов. Модифіковану слюду зберігали в ексікаторі в атмосфері аргону. Для виготовлення буферних розчинів та зразків ДНК використовували ультраочищену воду з питомим опором $\sim 17 \text{ мОм} \cdot \text{см}$ (ModuPure Plus, Continental Water System Corp., San Antonio, TX).

Для отримання зображень молекул ДНК використовували атомно-силовий мікроскоп Nanoscope III MultiMode System (Digital Instruments, Santa

Barbara, США) з D-сканером. АСМ-зображення у повітрі записували в режимі «tapping mode/height» за допомогою звичайних незагострених зондів фірми «КТЕК International» (Росія) з резонансною частотою 300—360 кГц. Для позбавлення низькочастотних коливань застосовували гумові пружини, на яких було підвішено масивну підставку з мікроскопом.

Для передбачення хрестоподібної структури ДНК використовували пакет прикладних програм для аналізу структури біополімерів GeneVee [10] і програму Oligo [11]. Пошук паліндромних ділянок з урахуванням їхніх термодинамічних характеристик здійснювали за допомогою програми Oligo. Послідовність ДНК плазмід *pUC8* взято з бази даних EMBL (Accession number L09138, випуск 64).

Результати і обговорення. Істотною перевагою АСМ у порівнянні з електронною мікроскопією нуклеїнових кислот є вища роздільна здатність, а також можливість проведення досліджень у водних розчинах. Паліндроми, або інвертовані повтори в ДНК, можуть існувати в двох різних конформаційних станах — у вигляді лінійної двоспіральної форми ДНК або як хрестоподібна структура, що складається з двох симетричних шпильок. Теоретичні [12, 13] та експериментальні роботи [14, 15] свідчать, що хрестоподібні структури можуть існувати в негативно суперспіралізованих ДНК на відміну від релаксованих молекул, а процес утворення хрестів залежить від багатьох факторів, у першу чергу від температури та густини надвитків.

Зображення суперспіральної ДНК *pUC8*, отримані за допомогою «tapping mode» АСМ у повітрі, наведено на рис. 1. Хрест виглядає як різко окреслені виступи на нитці ДНК з довжиною плеч, яку можна оцінити безпосередньо з АСМ-зображення. Використання аміномодифікованої АПІ-слюди дозволило отримати стабільні зображення не лише лінійної, але й суперспіральної ДНК у широкому діапазоні іонних умов. Молекули ДНК на слюді АПІ мають невитягнуті, згладжені контури, їхні фрагменти рівномірно іммобілізовані на поверхні субстрату.

Відомо, що ДНК плазмід *pUC8* містить кілька паліндромів, які можуть утворювати хрестоподібні структури у водних розчинах. За допомогою програми Oligo нами показано, що термодинамічно вигіднішим є хрест, структуру якого наведено на рис. 2, а. Вільна енергія ΔG шпильки, яка утворює хрест, складає $-17,8 \text{ ккал/моль}$.

У результаті пошуку самокомплементарних фрагментів у послідовності ДНК *pUC8* за допомогою програми Rna2 пакету програм GeneVee також підтверджено, що шпильку утворюють 11 пар нук-

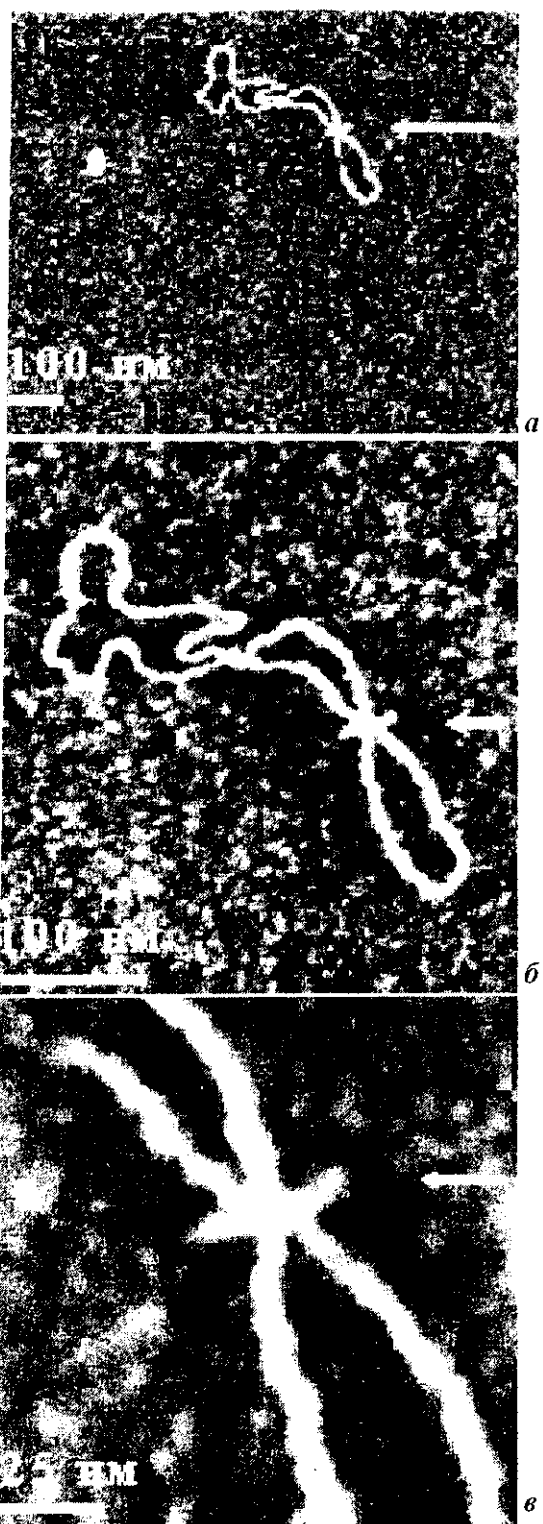


Рис. 1. Зображення суперспіральної ДНК плазмиди *pUC8* у трійці, отримане за допомогою атомно-силового мікроскопа: а - розмір кадра 858×858 нм; б - 372×372 нм; в - 134×134 нм. Стрілками показано хрестоподібну структуру

леотидів, а петля має довжину 4 нуклеотиди. Модель ДНК *pUC8* з утвореною хрестоподібною структурою наведено на рис. 2, б.

Хрестоподібні структури виявлено у багатьох суперспіральних ДНК, які виділено з клітин. Так, наприклад, у роботі [16] показано, що самокомплементарна альтернована пурин-піримідинова послідовність $d(AT)_n-d(AT)_n$ всередині суперспіральної плазмиди набуває стабільної конформації хреста *in vitro* та *in vivo*. Однак, як показали автори роботи [17], у ДНК плазмиди *pAO3*, яка являє собою четверту частину плазмиди *ColE1* та містить її головний паліндром, хрестоподібна структура в клітинах *Escherichia coli* відсутня. Таким чином, автори дійшли висновку, що перехід від двониткової структури до хреста здійснюється у процесі виділення ДНК.

З рис. 1, в, можна оцінити лінійні розміри хреста. Оскільки довжина плеч хрестоподібної структури складає приблизно 4,5 діаметра ДНК, тобто ~ 9 нм, то, отже, розмір однієї шпильки дорівнює 4,5 нм. Відомо, що на крок подвійної спіралі В-форми ДНК, тобто 3,6 нм, припадає 10,5 пари нуклеотидів [3]. Таким чином, аналіз наших експериментальних результатів показує, що в утворенні шпильки беруть участь 11–12 пар нуклеотидів.

Для порівняння зазначимо, що паліндромні ділянки, в яких за допомогою методів двовимірної електрофорезу та обробки нуклеазами були зареєстровані хрестоподібні структури у ДНК фага $\phi X174$, плазмід *pBR322*, *ColE1*, *pAO3*, складають 9–13 пар нуклеотидів у спіральних ділянках кожної з шпильок хреста, а їхні петлі містять 3–5 нуклеотидів [1, 17].

Аміномодифікована слюда, отримана за допомогою обробки в парах АПТЕС свіжосколотої слюди, є надзвичайно зручною матрицею для одержання якісних зображень як суперспіральної, так і лінійної форм ДНК у повітрі. Методика виготовлення зразків ДНК на АП-слюді забезпечує ефективну іммобілізацію молекул суперспіральної ДНК на субстраті. Аміногрупи АПТЕС ковалентно зв'язуються з гідроксильними групами поверхні свіжосколотої слюди. Іммобілізація молекул ДНК на АП-слюді здійснюється, головним чином, через нековалентну взаємодію між позитивно зарядженими аміногрупами АП-слюди з негативно зарядженими фосфатними групами ДНК. Для виготовлення одного зразка ДНК для АСМ необхідно 3–4 хв. Виготовлені таким чином зразки ДНК можуть зберігатися протягом декількох місяців без помітного погіршення АСМ зображення при повторному скануванні.

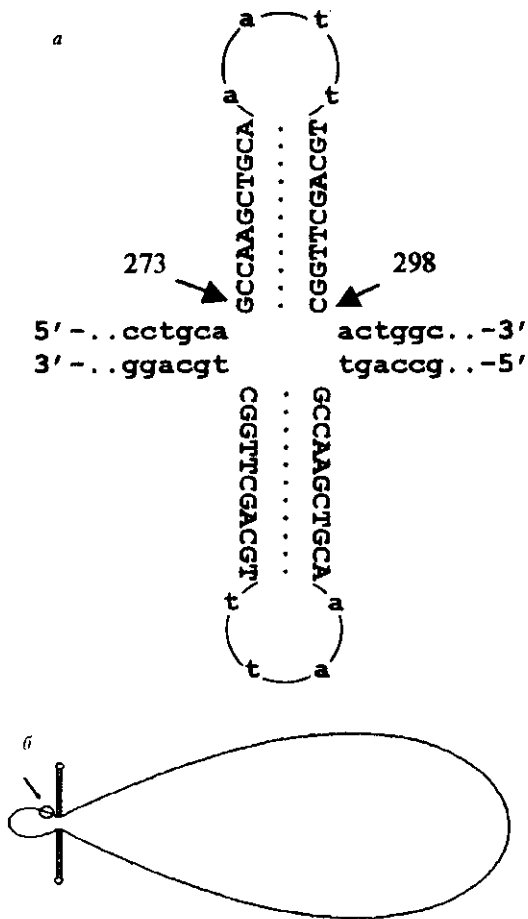


Рис. 2. Хрестоподібна структура суперспіральної ДНК плазмиди *pUC8*, отримана за допомогою пакету прикладних програм GeneView (наведено фрагмент послідовності ДНК *pUC8* (позиції 273—298), який набуває хрестоподібної структури) (а) та хрест, який утворюють інвертовані повтори ДНК плазмиди *pUC8* (коло відповідає позиції 270 послідовності ДНК *pUC8*) (б)

В той же час у водних розчинах ми не отримали стабільних та відтворюваних зображень суперспіральної ДНК на АП-слюді. Поверхня АП-слюди у водних розчинах протягом експерименту швидко (через 5—10 хв) «проростає» — вкривається глобулами, що збільшуються. Це можна пояснити тим, що міжмолекулярні зв'язки АПТЕС у водному розчині легко гідролізуються, а швидкість гідролізу різко зростає з підвищенням температури [18].

Зазначимо, що раніше АСМ з успіхом було використано для структурного дослідження лінійних ДНК та комплексів відкритих кільцевих молекул ДНК з багатьма білками [19—21]. Зараз, як

випливає з проведеного нами дослідження, АСМ можна використовувати як для вивчення суперспіральної ДНК, так і її комплексів з ключовими білками, що регулюють процеси транскрипції, реплікації, рекомбінації, експресії генів. Це відкриває нові можливості і вражаючі перспективи для сучасної структурної молекулярної біології.

Висновки. Продемонстровано, що атомно-силово мікроскопія у поєднанні з простою методикою аміномодифікації слюди в парах аміносиану є зручним, інформативним методом прямого дослідження структурних особливостей суперспіралізованих нуклеїнових кислот. Вперше візуалізовано хрестоподібну структуру ДНК плазмиди *pUC8* і показано, що розмір її шпильки складає 11 пар нуклеотидів, а петля містить 4 нуклеотида. За допомогою комп'ютерного аналізу визначено нуклеотидну послідовність, що утворює хрест, а також вільну енергію його шпильок.

Автор висловлює подяку проф. Ю. Любченку (Університет штату Аризона, США) за люб'язно наданий зразок суперспіральної ДНК плазмиди *pUC8*.

Роботу підтримано грантом GM54991 від Національного інституту здоров'я (NIH, США).

A. P. Limansky

Study of cruciform structure in supercoiled *pUC8* plasmid DNA by atomic force microscopy and computer modelling

Summary

The cruciform structure in supercoiled *pUC8* plasmid DNA immobilized on aminomodified mica in buffer solution after sample drying was imaged by atomic force microscopy (AFM). The cruciform structure was formed by 15 nucleotides inverted repeats as shown from AFM images of DNA. The computer modelling has revealed the cruciform structure to be formed by 11 nucleotides hairpins and 4 bases loops. Free energy of the hairpin was determined to be -17.8 kcal/mol.

A. П. Лиманский

Изучение крестообразной структуры суперспиральной ДНК плазмиды *pUC8* с помощью атомно-силовой микроскопии и компьютерного моделирования

Резюме

Впервые визуализирована крестообразная структура в суперспиральной ДНК плазмиды *pUC8*, иммобилизованной на аминомодифицированной слюде в буферном растворе, после высушивания образца, методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). На основании АСМ изображения ДНК, полученного в воздухе, установлено, что крест образуют инвертированные повторы длиной 15 нуклеотидов. С использованием компьютерного моделирования доказано, что крестообразная структура образована шпильками длиной 11 нуклеотидов и петлями размером 4 нуклеотида. Определена свободная энергия шпильки ($-17,8$ ккал/моль).

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Lilley D. Hairpin-loop formation by inverted repeats in supercoiled DNA molecules // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1980.—77, N 11.—P. 6468—6472.
2. Вологодський А. В. Образование неканонических структур в сверхспиральной ДНК. Взаимное влияние различных переходов // *Молекуляр. биология.*—1988.—22, № 3.—С. 687—692.
3. Пташине М. Переключение генов. Регуляция генной активности и фаг λ .—М.: Мир, 1988.—158 с.
4. Shlyakhtenko L., Hsieh P., Grigoriev M., Potaman V., Sinden R., Lyubchenko Y. A cruciform structural transition provides a molecular switch for chromosome structure and dynamics // *J. Mol. Biol.*—2000.—296, N 5.—P. 1169—1173.
5. Bartok K., Denhardt D. Site of cleavage of superhelical ϕ X174 replicative form DNA by single strand-specific *Neurospora crassa* endonuclease // *J. Biol. Chem.*—1976.—251, N 2.—P. 530—535.
6. Panyutin I., Klishko V., Lyamichev V. Kinetics of cruciform formation and stability of cruciform structure in superhelical DNA // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*—1984.—1, N 4.—P. 1311—1324.
7. Binnig G., Quate C., Gerber C. Atomic force microscope // *Phys. Rev. Lett.*—1986.—56, N 9.—P. 930—933.
8. Lyubchenko Y., Jacobs B., Lindsay S. Atomic force microscopy of reovirus dsRNA: a routine technique for length measurement // *Nucl. Acids Res.*—1992.—20, N 15.—P. 3983—3986.
9. Shlyakhtenko L., Gall A., Weimer J., Hawn D., Lyubchenko Y. Atomic force microscopy imaging of DNA covalently immobilized on a functionalized mica substrate // *Biophys. J.*—1999.—77, N 1.—P. 568—576.
10. Бродский Л. И., Драчев А. Л., Леонтович А. М. Новый метод множественного выравнивания последовательности биополимеров (Программа H-Align пакета GeneBee) // *Биополимеры и клетка.*—1991.—7, № 1.—С. 14—22.
11. Rychlik W., Spencer W. J., Rhoads R. E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro* // *Nucl. Acids Res.*—1990.—18, N 21.—P. 6409—6417.
12. Vologodskii A., Frank-Kamenetskii M. Theoretical study of cruciform states in superhelical DNAs // *FEBS Lett.*—1982.—143, N 2.—P. 257—260.
13. Vologodskii A., Frank-Kamenetskii M. The relaxation time for a cruciform structure in superhelical DNA // *FEBS Lett.*—1983.—160, N 2.—P. 173—176.
14. Panyutin I., Lyamichev V., Lyubchenko Y. A sharp structural transition in *pAO3* plasmid DNA caused by increased superhelix density // *FEBS Lett.*—1982.—148, N 2.—P. 297—301.
15. Sinden R., Pettijohn D. Cruciform transitions in DNA // *J. Biol. Chem.*—1984.—259, N 10.—P. 6593—6600.
16. Haniford D. B., Pulleyblank D. E. Transition of a cloned $d(AT)_n$ - $d(AT)_n$ tract to a cruciform *in vivo* // *Nucl. Acids Res.*—1985.—13, N 12.—P. 4343—4363.
17. Lyamichev V., Panyutin I., Mirkin S. The absence of cruciform structures from *pAO3* plasmid DNA *in vivo* // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*—1984.—2, N 2.—P. 291—301.
18. Plueddemann E. P. Silane coupling agents.—New York; London: Plenum press, 1991.—438 p.
19. Lyubchenko Y., Gall A., Shlyakhtenko L., Harrington R., Jacobs B., Oden P., Lindsay S. Atomic force microscopy imaging of double stranded DNA and RNA // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*—1992.—10, N 3.—P. 589—606.
20. Golan R., Pietrasanta L., Hsieh W., Hansma H. DNA toroids: stages in condensation // *Biochemistry.*—1999.—38, N 42.—P. 14069—14076.
21. Hansma H. Varieties of imaging with scanning probe microscopes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1999.—96, N 26.—P. 14678—14680.

УДК 577.213/217:57.086.2
Надійшла до редакції 09.01.01