

S-Форма ДНК — надсуперспіральна макромолекула з міжнуклеотидною відстанню ~ 2 Å уздовж осі дуплексу

О. Ю. Лиманська^{1, 2}, Л. О. Лиманська¹, О. П. Лиманський^{1, 3}

¹ Інститут мікробіології і імунології ім. Мечникова АМН України
Вул. Пушкінська, 14, Харків, 61057, Україна

² Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН
Вул. Пушкінська, 83, Харків, 61023

³ Лабораторія плазматичної мембрани і ядерного сигнального механізму, Інститут біодосліджень
Кіотський університет, Кіото, 606-8502, Японія

E-mail: o.lymunskiy@mail.ru

За допомогою атомно-силової мікроскопії візуалізовано суперспіральну ДНК рGEMEX довжиною 3993 пари нуклеотидів, іммобілізовану на різних субстратах (свіжосколотій слюді, стандартній амінослюді і модифікованій амінослюді — з підвищеною та зниженою поверхневою щільністю аміногруп у порівнянні зі стандартною). На модифікованій амінослюді з підвищеною щільністю заряду візуалізовано молекули ДНК з надзвичайно високим рівнем суперспіралізації. Вимірювання контурної довжини поодиноких надсуперспіральних молекул ДНК дозволило визначити відстань між парами нуклеотидів уздовж осі подвійної спіралі, яка варіювала від $H = 1,94$ до $2,19$ Å для різних молекул. Такі стиснуті подібно до пружини суперспіральні молекули ДНК зі зменшеною міжнуклеотидною відстанню порівняно з відомими формами ДНК віднесено до нової форми ДНК — S-ДНК.

Ключові слова: суперспіральна ДНК, атомно-силови мікроскопія, амінослюда, надсуперспіральна ДНК, S-ДНК.

Вступ. Структурні та фізико-хімічні параметри різних родин і форм молекул ДНК — А-, В-, С-, D-, Z-, H-ДНК — є загальновідомими даними, встановленими на основі фізичних, біофізичних, біохімічних і молекулярно-генетичних методів [1—3]. Одними з основних критеріїв, що дозволяють диференціювати найвивченіші і найпоширеніші А- і В-форми ДНК, є конформація дезоксирибози (С3'-ендо — для А-форми ДНК і С2'-ендо — для В-форми), а також відстань між парами нуклеотидів уздовж осі дуплексу. Вважають, що відстань між парами нуклеотидів уздовж осі подвійної спіралі залежить від різних факторів (вологість, іонні

умови та ін.) і варіює від 0,34—0,30 нм для В-форми ДНК до 0,33—0,25 нм для А-форми [2].

Починаючи з 90-х років минулого століття, бурхливий розвиток нанобіології, пов'язаний з виникненням сканувальної зондової мікроскопії, дав новий поштовх дослідженню структурних особливостей молекул ДНК [4, 5]. За допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ) стали можливими як візуалізація поодиноких молекул ДНК, так і вимірювання сили внутрішньомолекулярних зв'язків ниток ДНК і сили міжмолекулярної взаємодії у комплексі ДНК—білок (шляхом визначення сили розриву в режимі силових вимірювань) [6, 7]. Однак при візуалізації суперспіральних ДНК (ссДНК) і нуклеосом не вдалося досягти найвищого

© О. Ю. ЛИМАНСЬКА, Л. О. ЛИМАНСЬКА, О. П. ЛИМАНСЬКИЙ,
2005

рівня компактизації, характерного як для ДНК у ядрах еукаріотних клітин, так і ДНК бактеріальних клітин. Це пов'язано з тим фактом, що в переважній більшості досліджень з візуалізації ссДНК *in vitro* за допомогою АСМ ступінь нейтралізації зарядів фосфатних груп ДНК визначали в доволі вузькому діапазоні, змінюючи іонну силу розчину [8—10].

Хоча відомо, що основним фактором, який спричинює компактизацію ДНК, є ступінь нейтралізації заряду негативно заряджених фосфатних груп ДНК, зміна іонної сили розчину при варіюванні концентрації NaCl або полікатиону на поверхні слюди, що використовують для іммобілізації ДНК, призводила до незначної суперспіралізації ДНК (значення суперспіральної щільності змінювалося в інтервалі $0,03 < |\sigma| < 0,08$) [11, 12].

У цій роботі ми вперше демонструємо зображення поодиноких молекул ссДНК *in vitro*, рівень суперспіралізації яких значно перевищує такий як раніше експериментально визначений [9—13], так і передбачений теоретично [14—17]. За допомогою вимірювання контурної довжини суперспіральних молекул ДНК із АСМ зображень визначено відстань між парами нуклеотидів уздовж осі подвійної спіралі надсуперспіральних молекул. Такі суперспіральні молекули ДНК, що характеризуються значенням міжнуклеотидної відстані $H = 1,94—2,19$ Å, віднесені нами до нової форми ДНК — так званої S-ДНК (S — від англійського «spring» — пружина). Дійсно, суперспіральні молекули ДНК на поверхні слюди подібні до пружини — вони можуть як стискатися зі зменшенням міжнуклеотидної відстані, так і розтягуватися (в даній роботі нами також отримано зображення витягнутих молекул ссДНК з міжнуклеотидною відстанню 4,5—5,5 Å).

Матеріали і методи. У роботі використано ссДНК *pGEMEX1* довжиною 3993 п. н. («Promega», США). Свіжосколоту слюду, стандартну і модифіковану амінослюду зі зниженою та підвищеною поверхневою щільністю аміногруп порівняно зі стандартною амінослюдою застосовували як субстрат. Для нанесення ДНК на свіжосколоту слюду використовували 10 мМ HEPES-буфер, який містить 2,5 мМ MgCl₂. На смугу стандартної або модифікованої амінослюди площею 1 см² наносили краплю розчину ДНК в концентрації 0,1—1 мкг/мл у TE-буфері (10 мМ трис-HCl, pH 7,9, 1 мМ ЕДТА) об'ємом 10 мкл, промивали після 2-хв

експозиції деіонізованою водою, обдували потоком аргону та витримували зразок під тиском 100 мм рт. ст. протягом 20 хв. Процедуру отримання стандартної амінослюди здійснювали згідно з [18] за допомогою модифікації свіжосколотої слюди аміногрупами у парах перегнаного 3-амінопропілтриетоксисилану (АПТЕС) («Aldrich», США). Дистиляцію АПТЕС здійснювали за зменшеного тиску в атмосфері аргону. Для аміномодифікації свіжосколотої слюди вміщували в скляний ексікатор з розчинами АПТЕС та N,N-дізопропілетиламіну на 1 год. Модифіковану слюду зберігали в ексікаторі в атмосфері аргону протягом одного місяця.

Буферні розчини і зразки ДНК готували з використанням ультрачистої води з питомим опором — 17 МОм·см та установки Milli Q («Millipore», США). Модифіковану амінослюду отримано за допомогою невеликих змін технології одержання стандартної амінослюди. Амінослюду зі зменшеною поверхневою щільністю аміногруп, як і стандартну амінослюду, отримували обробкою свіжосколотої слюди в парах непереганеного АПТЕС.

У роботі використано АСМ Nanoscope IV Multi-Mode System (Veeco Instruments Inc., США) з E-сканером. АСМ зображення ДНК записано за допомогою вібруючого варіанта АСМ у повітрі в режимі «висота» з використанням OMCL-AC160TS кантиліверів (Olympus Optical Co., Японія) з резонансною частотою 340—360 кГц і константою твердості 42 Н/м. Зображення отримано у форматі 512 × 512 пікселів, згладжено та проаналізовано за допомогою програмного забезпечення Nanoscope (версія 5.12r3) (Veeco Instruments Inc., США).

Об'єм окремих молекул ДНК розраховували на основі реально виміряних параметрів молекул із АСМ зображення — висоти, довжини і ширини, без поправки на уширення діаметра ДНК. Для точнішого вимірювання об'єму молекул використовували побудову, як правило, поздовжніх і поперечних перерізів молекул за допомогою вбудованої опції програмного забезпечення Nanoscope.

Результати і обговорення. У даній роботі відстанню між основами (R) ми називаємо відстань між площинами основ, а відстанню між нуклеотидами вздовж осі спіралі (H), або райзом (від англійського слова rise), — проекцію відстані між основами на вісь подвійної спіралі ДНК. Для В-форми ДНК площини основ майже перпендикулярні осі дуплексу, тому значення міжнуклеотидної відстані та відстані між основами дуже близькі

Таблиця 1
Деякі характеристики трьох форм ДНК

Параметр	A-ДНК	B-ДНК	S-ДНК
Міжнуклеотидна відстань уздовж осі спіралі, Å	2,56—3,29	3,03—3,37	1,94—2,19
Кут нахилу основи, град	20,2—10	16,4—5,9	30,5—27
Відстань між основами, Å	2,72—3,34	3,16—3,39	2,25—2,45

за значенням (табл. 1). Значення R знайдено із співвідношення

$$H = R \cdot \cos \alpha,$$

де α — кут, що утворюють перпендикуляр до площини основи та вісь подвійної спіралі. Наведені у табл. 1 значення міжнуклеотидної відстані R , відстані між парами нуклеотидів H для A-, B- [2] і S-ДНК демонструють суттєві відмінності в структурній організації зазначених форм ДНК.

Поверхня слюди, стандартного субстрату для іммобілізації біомолекул при АСМ дослідженнях, негативно заряджена у буферних розчинах за нейтральних значень рН та невисокої іонної сили [19]. Тому для іммобілізації на поверхні слюди за даних умов негативно заряджених молекул ДНК використовують декілька підходів, що дозволяють змінити сумарний поверхневий заряд слюди з негативного на позитивний. Найпростіше це можна зробити, якщо нанести краплю розчину ДНК, що містить іони Mg^{2+} або Ni^{2+} , на поверхню свіжосколотої слюди [20]. Альтернативні методи припускають модифікацію поверхні слюди різними полікатионами — полілізином, сперміном, спермидином [9, 11, 12]. Але всі ці підходи мають істотний недолік — іммобілізацію ДНК на слюду можна проводити в дуже вузькому інтервалі значень рН та іонної сили, що виключає можливість значної зміни поверхневої щільності заряду слюди.

Розроблену нами раніше методику аміномодифікації АСМ зондів у парах АПТЕС [21] було модифіковано і використано для отримання амінослюди із заданими властивостями. В результаті модифікації стандартної процедури отримання амінослюди (поверхня якої має позитивний заряд у широкому інтервалі значень рН та іонної сили розчину) в даній роботі застосовано амінослюду як з підвищеним значенням поверхневої щільності заряду, так і зі зниженим порівняно з щільністю

заряду стандартної амінослюди. Далі під модифікованою амінослюдою ми будемо розуміти амінослюду з підвищеною поверхневою щільністю заряду, якщо не вказано інше.

Наведені на рис. 1 АСМ зображення ссДНК *pGEMEX* показують величезний вплив поверхневих властивостей амінослюди на конформацію молекул. Молекули ДНК, іммобілізовані на стандартній амінослюді (рис. 1, а), перебувають у наближеній до плектономічної конформації, у той час як підвищення поверхневої щільності заряду веде до вражаючої компактизації молекул ДНК (рис. 1, б). Дуже важливим для оцінки властивостей поверхні модифікованої слюди видається той факт, що зображення і кількість молекул ДНК на модифікованій амінослюді після її зберігання протягом двох тижнів (рис. 1, б) подібні до таких на свіжовиготовленій стандартній амінослюді (рис. 1, а). Це означає, що, по-перше, кількість активних (тобто протонованих) аміногруп на поверхні модифікованої амінослюди значно перевищує таку на поверхні стандартної амінослюди і, по-друге, їхня стійкість до окислення значно вище стійкості аміногруп стандартної амінослюди.

Раніше нами показано, що кількість активних аміногруп на поверхні стандартної амінослюди істотно зменшується після двох тижнів зберігання, а період напівжиття стандартної амінослюди було оцінено саме в два тижні. Таким чином, модифікована амінослюда за своєю стабільністю і поверхневою щільністю аміногруп суттєво перевищує стандартну амінослюду. Саме завдяки цим відмінностям іммобілізація ссДНК на модифіковану амінослюду дозволила нам отримати зображення поодиноких молекул ДНК з таким надзвичайно високим рівнем суперспіралізації, який раніше не було виявлено ні експериментально, ні навіть передбачено теоретично. Наведені кадри доволі великого розміру (2×2 мкм) демонструють, що поверхня амінослюди містить лише молекули ДНК, вона вільна від забруднень і домішкових наночасток, які супроводжують деякі АСМ дослідження.

Для характеристики топології ссДНК (молекул, вісь яких може бути закручена у вигляді спіралі, на відміну від лінійних молекул ДНК) прийнято використовувати декілька параметрів — кількість вузлів (супервигків), довжину суперспіральної осі, суперспіральну щільність. Останню можна визначити як відношення кількості супер-

витків до кількості витків подвійної спіралі, що знаходиться у релаксованому стані [22]. Зображення молекул ДНК, отримані з вищою роздільною здатністю і показані на рис. 2, засвідчують величезні відмінності в топології молекул ДНК, іммобілізованих на свіжосколотій слюді із буфера, який містить 2,5 мМ $MgCl_2$ (рис. 2, а), стандартній амінослюді (рис. 2, б) та модифікованій амінослюді (рис. 2, в). На рис. 2, а, представлено зображення плектономічних ссДНК, які характеризуються невисоким значенням суперспіральної щільності (сім суперспіральних витків, або вузлів, $\sigma = -0,018$). Раніше аналогічні зображення отримано для плазмідних ДНК на субстратах, оброблених полікатионами полілізином і сперміном [11, 12]. Суперспіральні молекули ДНК *pGEMEX* на стандартній амінослюді (б) компактніші, однак їхня контурна довжина, виміряна із АСМ зображення, лише незначно менша ($L = 1216$ нм) порівняно з такою плектономічних молекул ДНК на слюді з катіонами Mg^{2+} ($L = 1243$ нм, рис. 2, а). Для молекул ДНК, зображених на рис. 2, а, кількість вузлів становить 7–8, довжина суперспіральної осі — $l = 466$ нм.

Молекула ссДНК на рис. 2, в, іммобілізована на модифікованій амінослюді, різко відрізняється за своїми параметрами від молекул ДНК, зображених на рис. 2, а, б: кількість вузлів зросла до 11, довжина суперспіральної осі зменшилася до 382 нм, а розрахована із АСМ зображення контурна довжина складала 873 нм.

Вимірювання контурної довжини одичної нативної молекули ДНК з субнанометровою роздільною здатністю, що є відмінною особливістю АСМ, дозволяє, знаючи кількість пар нуклеотидів в даній молекулі, визначити відстань між нуклеотидами вздовж осі подвійної спіралі ДНК. Якщо для ДНК *pGEMEX* (рис. 2, а) міжнуклеотидна відстань $H = 3,11$ Å, то для надсуперспіральної ДНК (рис. 2, в) розраховане значення H складало 2,19 Å. Значення $H = 3,11$ Å узгоджується з раніше наведеними фактами незначного зменшення контурної довжини ДНК, висушеної на слюді, у припущенні В-форми ДНК [23]. Однак величина $H = 2,19$ Å вказує на те, що суперспіральні молекули ДНК, іммобілізовані на амінослюді з підвищеною щільністю заряду, зазнають значних внутрішньомолекулярних перетворень, які ведуть не лише до збільшення рівня суперспіралізації, але й до істотного зменшення міжнуклеотидної відстані.

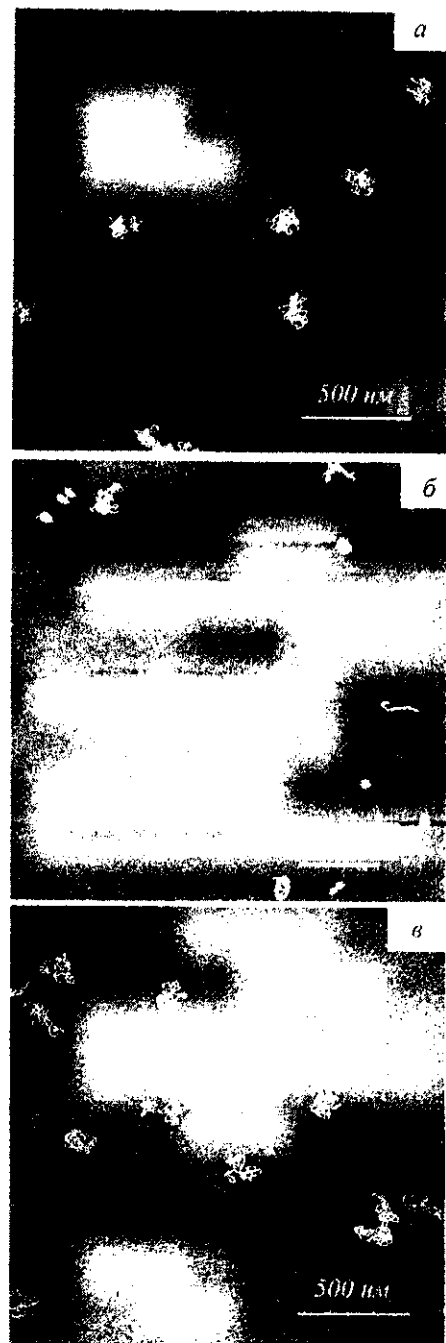


Рис. 1. Зображення суперспіральної ДНК (ссДНК) *pGEMEX* (3993 п. н.), отримане за допомогою АСМ після нанесення розчину ДНК у ТЕ-буфері на поверхню стандартної (а) і модифікованої (б) амінослюді з вищою поверхневою щільністю аміногруп (тобто підвищеною щільністю заряду) порівняно зі стандартною. Представлено ссДНК з різним рівнем компактності: від плектономічних (а, в) до суперспіральних молекул (б) з різною довжиною суперспіральної осі. Розмір кадру: а, в — 2×2 мкм; б — $2,7 \times 2,7$ мкм; а, б — свіжовиготовлена слюда; в — модифікована (після 2 тижнів зберігання). Стрілка вказує на ссДНК, АСМ зображення якої з більшою роздільною здатністю наведено на рис. 3, б

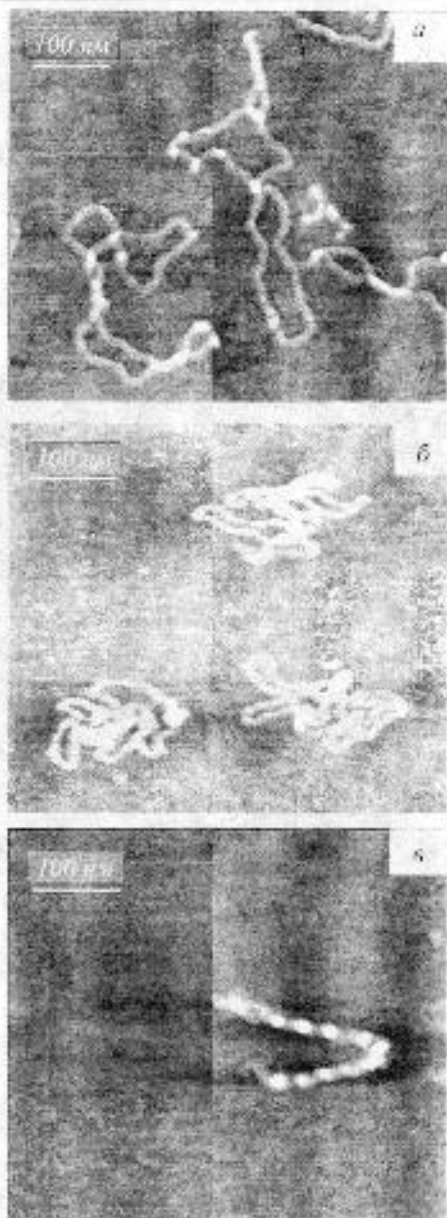


Рис. 2. АСМ зображення поодиноких суперспіральних молекул ДНК *pGEMEX*, іммобілізованих на різних субстратах: свіжосколотій слюді (а), отримане після нанесення краплі розчину ДНК у 10 мМ НЕРЕС-буфері, який містить 2,5 мМ $MgCl_2$; стандартній амінослюді (б) та модифікованій амінослюді (в). Розмір кадру: а — 583 × 583 нм; б, в — 500 × 500 нм. Контурна довжина ДНК *pGEMEX* становить 1243 нм (а); 1216 нм (б); 873 нм (в); довжина суперспіральної осі молекул ДНК — 466 нм (а) і 382 нм (в)

На рис. 3 наведено інші АСМ зображення поодиноких надсуперспіральних молекул ДНК *pGEMEX* на модифікованій амінослюді. Розраховані значення міжнуклеотидної відстані складають $H = 1,94$ і $2,11$ Å для надсуперспіральних молекул ДНК на рис. 3, а і б відповідно.

Як один із параметрів, що дозволяє відрізнити поодинокую молекулу від димеру та інших висококомпактизованих структур, утворених декількома молекулами, ми вибрали об'єм молекули ДНК, розрахований безпосередньо із АСМ зображення відповідної молекули. Його значення незначно різняться від теоретично розрахованого виключеного об'єму молекули ($V_{\text{викл}} = 3900$ нм³) та дозволяє надійно виокремити поодинокі молекули ДНК серед агрегатів. Для точнішого обчислення об'єму ми використали значення висоти молекули, виміряне не в одному місці (яке значно варіює для надсуперспіралізованих ДНК: за характерної висоти однієї нитки подвійної спіралі $h = 0,3$ – $0,4$ нм висота у вузлах, утворених двома нитками ДНК, що перетинаються, може досягати $h_{\text{max}} = 1,3$ – $1,8$ нм), а по лінії поздовжнього перерізу молекули площиною, перпендикулярною площині слюди.

Фрагмент перерізу по висоті надсуперспіралізованої молекули ДНК, а також відповідне АСМ зображення і лінія, через яку проведено січну площину, показано на рис. 4. Сумарну площу перерізу для даної молекули визначено як суму площин трьох перерізів по висоті (два інших перерізи не показано). І хоча в такому вимірюванні площі перерізу іммобілізованої суперспіральної молекули ДНК присутня систематична похибка, пов'язана з тим, що січну площину проводили лише при максимальному значенні висоти вздовж поздовжньої осі молекули, обчислені відповідним чином значення об'єму для вищенаведених ссДНК узгоджуються з теоретичним значенням виключеного об'єму ДНК *pGEMEX* з достатньо високою точністю. Із наведених в табл. 2 характеристик молекул ссДНК можна бачити, що значення об'єму для надсуперспіралізованих молекул ДНК (№ 3–5 в табл. 2, рис. 2, в і рис. 3) збігається з таким для одичної суперспіральної молекули (№ 1 в табл. 2, рис. 2, а) в межах похибки вимірювання.

Теоретичне значення діаметра подвійної спіралі ДНК (2 нм) значно відрізняється від експериментально вимірюваних значень висоти (0,3–0,4 нм) і ширини молекули (7–10 нм), що обумовлено низкою причин. Вважають, що в разі вимірювання ширини нитки ДНК ефект уширення діаметра ДНК спричинений значним радіусом заокруглення зонда (5–10 нм) і недостатньою фіксацією молекул ДНК на платівці. Однак збіг значень теоретично розрахованого виключеного об'єму ДНК *pGEMEX* та значень об'єму молекули ДНК,

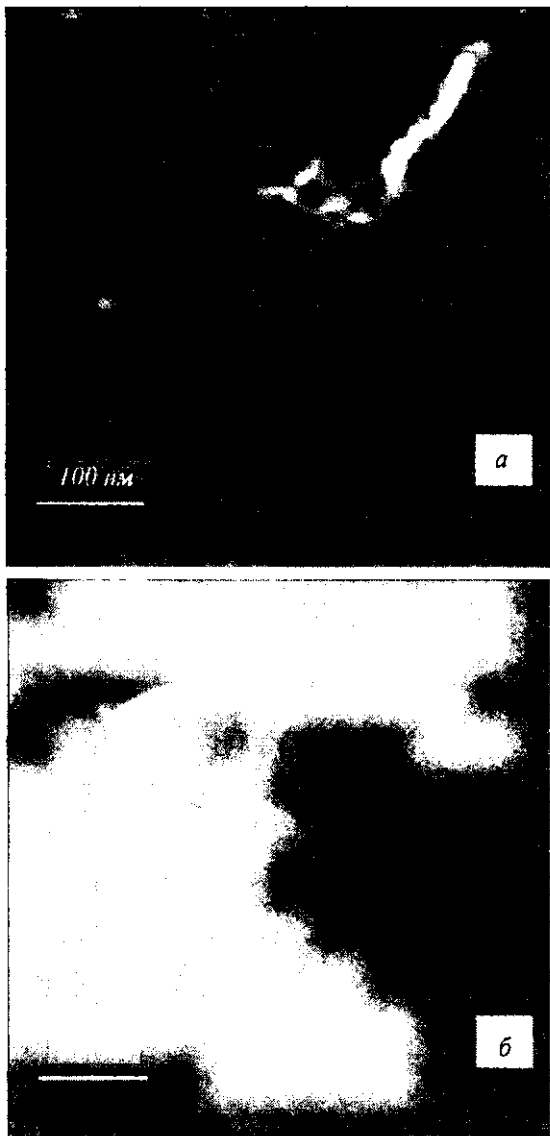


Рис. 3. АСМ зображення суперспіральных молекул ДНК *pGF-MEX* на модифікованій амінослюді: *a* — контурна довжина молекули ДНК становить $L = 776$ нм, що відповідає відстані між парами нуклеотидів уздовж осі подвійної спіралі $H = 1,94$ Å; *b* — контурна довжина молекули ДНК $L = 852$ нм; міжнуклеотидна відстань уздовж осі дуплексу $H = 2,11$ Å. Розмір кадру для обох зображень 500×500 нм

визначених із АСМ зображень (табл. 2), показує, що розширення діаметра ДНК при іммобілізації на слюді зумовлене не технічними похибками вимірювання. Ефект розширення молекул ДНК визначений зміною під впливом поверхневих властивостей слюди їхньої конформації, що супроводжується значним зменшенням їхньої висоти, але в той же час збереженням об'єму. Ми хотіли б особливо звернути увагу на цю обставину, оскільки у переважній більшості робіт з АСМ візуалізації

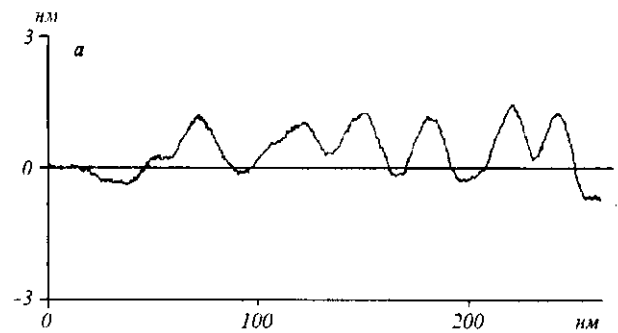







Рис. 4. Поздовжній переріз (*a*) та АСМ зображення (*b*) відповідної суперспіральної молекули ДНК *pGEMEX*. Січну площину проведено перпендикулярно площині рисунка через наведену лінію. Об'єм молекули розраховано як добуток ширини молекули на суму площ трьох поздовжніх перерізів. Шість піків на перерізі відповідають шести вузлам, які чітко видно на рис. 4, *b*

ДНК [4, 23] суттєве значення ширини молекул ДНК пояснювали саме похибкою вимірювання атомно-силового мікроскопа, а також недостатньою фіксацією біомолекул. Таким чином, запропоноване нами пояснення ефекту «розширення діаметра» ДНК при АСМ вимірюваннях усуває існуюче протиріччя між високим субнанометровим розділенням АСМ по *Z*-координаті та похибкою латерального вимірювання діаметра ДНК.

Раніше встановлено, що міжнуклеотидна відстань для дволанцюгової ДНК пов'язана лінійною залежністю з кутом нахилу основ до осі спіралі [2]. На рис. 5 наведено графік, апроксимований до значення міжнуклеотидної відстані $H = 1,9$ Å. Визначений із графіка модуль кута нахилу основ в *S*-ДНК γ знаходиться в інтервалі $27^\circ < \gamma < 30,5^\circ$, що відповідає діапазону міжнуклеотидної відстані *S*-ДНК $1,94 \text{ Å} < H < 2,19 \text{ Å}$.

Таблиця 2
Параметри суперспіральних молекул ДНК *pGEMEX*, визначені із АСМ зображення

№	Молекула	Висота (h), нм	Параметр (b), нм	Контурна довжина суперспіральної молекули (L), нм	Довжина суперспіральності (L _с), нм	Контурна довжина розслабленої молекули (L _р), нм	Відношення між розслабленою довжиною до контуру (L _р /L), %	Об'єм (V), нм ³
1**		0,80	0,35	1243	466	1243	3,11	3510
2***		0,99	0,35	1216	—	1216	3,05	3530
3		2,00	0,35	390	370	873	2,19	3830
4		1,80	0,27	577	282	776	1,94	3830
5		1,33	0,35	642	390	852	2,11	3800

*Двониткова ДНК; **зображення ДНК отримано на слюді в буфері, що містить MgCl₂; ***зображення ДНК отримано на стандартній амінослюді.

Хоча при переході від А- до В-форми ДНК зі збільшенням міжнуклеотидної відстані γ змінює знак з позитивного на негативний, стосовно кута нахилу γ для S-ДНК ми не маємо достатньо даних про його знак.

З урахуванням відомих експериментальних даних про еластичність молекул ДНК [24, 25] нами отримано зображення розтягнутих ссДНК *pGEMEX*, наведених на рис. 6. Раніше відпрацьовано методику отримання розтягнутих молекул ДНК фага λ при розташуванні краплі розчину ДНК на поверхні амінослюди зі зменшеною поверхневою щільністю заряду [26]. Розтягнені молекули ДНК формуються у процесі приготування зразка для АСМ та промивання слюди ультрачистою водою після експозиції з розчином ДНК. Збільшення контурної довжини розтягнутих ссДНК *pGEMEX* від 1243 нм (рис. 2, а) до 1943 нм (рис. 6, а) та 2140 нм (рис. 6, б) означає, що розтягування

ссДНК у 1,56 і 1,72 разу веде до зростання міжнуклеотидної відстані до $H = 4,87$ і $5,36$ Å відповідно. Отримані дані для розтягнутих молекул ДНК *pGEMEX* добре узгоджуються з раніше опублікованими результатами дослідження розтягнутих ДНК різними методами, у тому числі і за допомогою методу оптичного пінцета [23]. Наприклад, у роботі Мазур та ін. [25] продемонстровано, що ДНК можна розтягти, подовжуючи її в 1,7 разу. Це відповідає зростанню міжнуклеотидної відстані до $H = 5,8$ Å.

На рис. 7 представлено побудовані нами моделі фрагмента молекули ДНК довжиною 15 п. н., що перебуває в А- (а) та S-формі (б) відповідно. Зазначені моделі неповністю відображають особливості молекул ДНК, оскільки кут нахилу ($\gamma = 0$) основ як для моделі S-ДНК, так і А-ДНК не відповідає розрахованим значенням (табл. 1). Незважаючи на це, слід відзначити, що модель S-

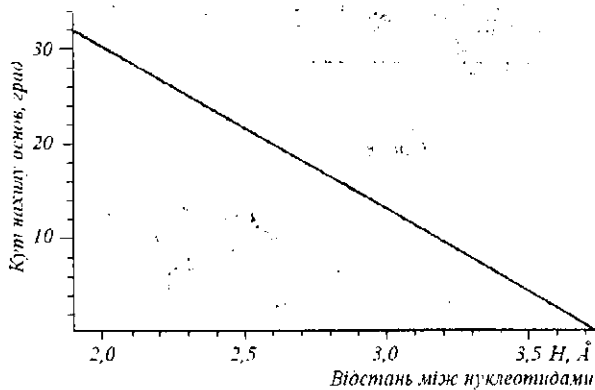


Рис. 5. Залежність кута нахилу основ від відстані між парами нуклеотидів уздовж осі подвійної спіралі. Кут нахилу основи визначено як кут між нормаллю до площини основи та віссю дуплексу

ДНК наочно демонструє відсутність стеричних перешкод для функціональних груп нуклеотидів та показує принципову можливість існування ДНК у такій стиснутій конформації.

Розглянемо можливий механізм надсуперспіралізації ссДНК. При переході від візуалізації ДНК на свіжосколотій слюді до її візуалізації на стандартній амінослюді (рис. 2, а) можна бачити, що молекули ДНК *pGEMEX* більш компактизовані, менш розтягнені, а поодинокі молекули розташовані на меншій площі. Це можна пояснити сильнішим екрануванням негативно заряджених фосфатних груп ДНК аміногрупами слюди, що веде до зменшення електростатичного відштовхування сусідніх фрагментів ДНК.

У даній роботі ми не досліджували адгезивних властивостей використаних субстратів. Відзначимо лише, що поверхневі властивості слюди можуть бути охарактеризовані із силового графіка (залежності сили розриву від відстані між зондом і субстратом), отриманого за допомогою АСМ у режимі силових вимірювань. Раніше нами показано, що стандартна амінослюда, одержана внаслідок модифікації у парах АПТЕС, у водних розчинах за нейтральних значень рН характеризується сумарним позитивним зарядом і величиною сили адгезії $F \sim 0,8-4,2$ нН [27]. Однак на стандартній амінослюді візуалізовані лише плектономічні ссДНК. І тільки на модифікованій амінослюді, яка характеризується вищою поверхневою щільністю заряду (за нашими попередніми результатами, щільність аміногруп на модифікованій амінослюді в 2-3 рази вище порівняно із щільністю на стандартній амінослюді), стала можливою візуалізація поодиноких надсуперспіральних молекул ДНК. У даному разі молекули біополімеру з високим значенням щільності заряду (ДНК) поміщено на субстрат, який характеризується високою поверхневою щільністю позитивного заряду. При цьому через вищу

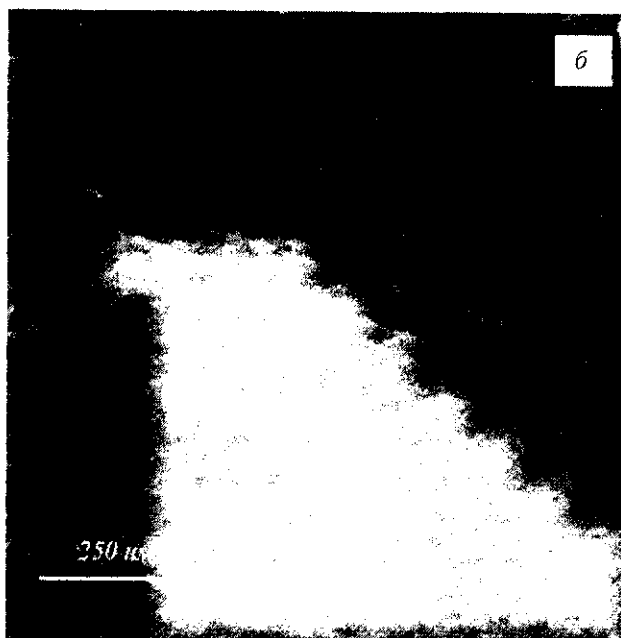
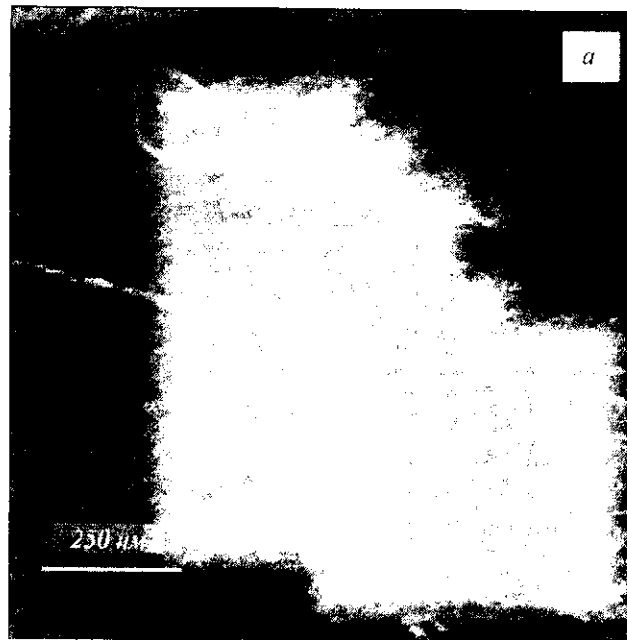


Рис. 6. АСМ зображення розтягнених суперспіральних молекул ДНК *pGEMEX*, іммобілізованих на амінослюді зі зменшеною щільністю аміногруп: а — контурна довжина ДНК $L = 1943$ нм, що відповідає відстані між нуклеотидами вздовж осі подвійної спіралі $H = 4,87$ Å (розмір кадру $1,13 \times 1,13$ мкм); б — контурна довжина ДНК $L = 2140$ нм, $H = 5,36$ Å (розмір кадру $1,07 \times 1,07$ мкм)

ких надсуперспіральних молекул ДНК. У даному разі молекули біополімеру з високим значенням щільності заряду (ДНК) поміщено на субстрат, який характеризується високою поверхневою щільністю позитивного заряду. При цьому через вищу

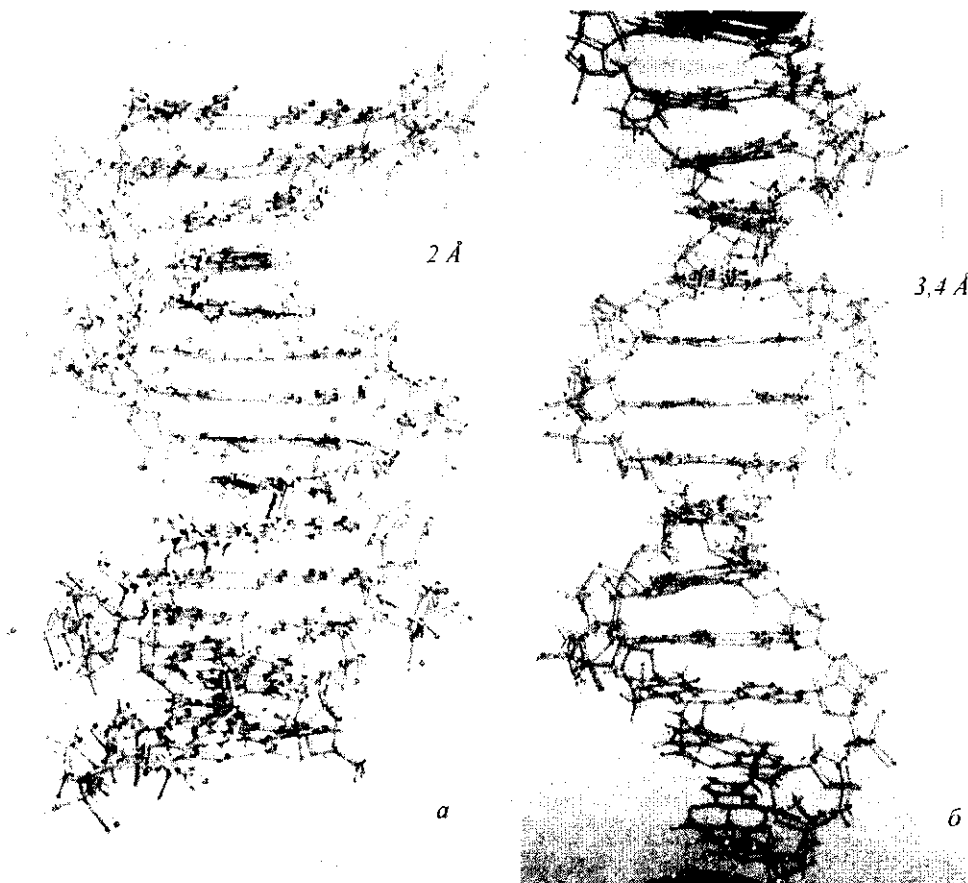


Рис. 7. Модель фрагмента ДНК довжиною 15 п. н. в S- (а) і А- (б) формах. Послідовність «+»-нитки: 5'-aag gtc ttc ggt cgt-3'. Довжина лінії відповідає відстані між нуклеотидами вздовж осі спіралі ДНК та дорівнює 2 і 3,4 Å для рис. 7, а і б відповідно. Спіральний повтор для обох форм ДНК дорівнює 11 пар нуклеотидів на виток

щільність позитивно заряджених аміногруп на поверхні модифікованої амінослюди відбувається екранування більшої кількості негативних фосфатних груп ДНК. Крім того, на нашу думку, існує ще один (внутрішньомолекулярний) механізм компактизації ДНК, який може робити істотний внесок за умов нейтралізації заряду фосфатних груп. У роботі [28] теоретичними розрахунками показано, що нуклеотиди вздовж ланцюга ДНК, які утворюють сайти для інтеркаляції лігандів, неоднаково заряджені. Так, наприклад, ТА-сайт є найбільш електронегативним через те, що 2'-дезоксирибо-5'-монофосфат, приєднаний до аденіну (який має найбільший позитивний заряд серед азотистих основ), є найбільш електронегативним. Це означає, що надсуперспіралізація ДНК може бути обумовлена внутрішньомолекулярним електростатичним притяганням між різнорідно зарядженими нуклеотидами ДНК в умовах підвищеного екранування заряду фосфатних груп ДНК.

Результати даної роботи є експериментальним підтвердженням пророчих слів проф. М. Франк-Каменецького про те, що ступінь суперспіралізації

ДНК у клітині може бути значно вищою, ніж це уявлялося раніше [29].

Роботу виконано за часткової підтримки Японського товариства розвитку науки (Токіо). Автори висловлюють шире подяку д-ру А. Сиволобу (Київський Національний університет імені Тараса Шевченка) за критичні зауваження і дискусії при підготовці статті до друку.

O. Yu. Limanskaya, L. A. Limanskaya, A. P. Limanskii

S-DNA is oversupercoiled macromolecule with ~ 2 Å rise per nucleotide pair

Summary

The supercoiled pGEMEX DNA with length of 3993 nucleotides was immobilized on different substrates (freshly cleaved mica, standard aminomica, modified aminomica with increased and decreased aminogroups surface density comparing with standard aminomica) and studied by the atomic force microscopy. The DNA molecules with extremely high level of supercoiling were visualized on the modified aminomica with increased surface charge density. The rise per nucleotide pair was determined by measurement of a contour length of single oversupercoiled DNA molecules. The rise value per nucleotide pair varied from $H=1.94$ Å up to $H=2.19$ Å for different molecules. These spring-like compressed supercoiled DNA

molecules with decreased rise in comparison with well known DNA forms were referred to the new DNA form, called S-DNA.

Key words: supercoiled DNA, atomic force microscopy, aminomica, oversupercoiled DNA, S-DNA.

О. Ю. Лиманская, Л. А. Лиманская, А. П. Лиманский

S-Форма ДНК — сверхспирализованная макромолекула с межнуклеотидным расстоянием $\sim 2 \text{ \AA}$ вдоль оси дуплекса

Резюме

С использованием атомно-силовой микроскопии визуализирована суперспирализованная ДНК rGEMEX длиной 3993 пары нуклеотидов, иммобилизованная на различных субстратах (свежесколотой слюде, стандартной аминослюде и модифицированной аминослюде — с повышенной и пониженной поверхностной плотностью аминогрупп по сравнению со стандартной). На модифицированной аминослюде, характеризующейся повышенной поверхностной плотностью заряда, визуализированы молекулы ДНК с чрезвычайно высоким уровнем суперспирализации. Измерение контурной длины единичных суперспирализованных молекул ДНК позволило определить расстояние между нуклеотидами вдоль оси двойной спирали, варьирующее от $H = 1,94$ до $2,19 \text{ \AA}$ для разных молекул. Такие сжатые подобно пружине суперспиральные молекулы ДНК с уменьшенным межнуклеотидным расстоянием по сравнению с известными формами ДНК были отнесены к новой форме ДНК — S-ДНК.

Ключевые слова: суперспиральная ДНК, атомно-силовая микроскопия, аминослюда, сверхспиральная ДНК, S-ДНК.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Иванов В. И. Двойная спираль ДНК // Молекуляр. биология.—1983.—17, № 3.—С. 616—621.
2. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.—М.: Мир, 1987.—584 с.
3. Wang J. C. Helical repeat of DNA in solution // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76.—P. 200—203.
4. Lyubchenko Y., Jacobs B., Lindsay S. Atomic force microscopy of reovirus dsRNA: a routine technique for length measurement // Nucl. Acids Res.—1992.—20.—P. 3983—3986.
5. 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.—P. 589—606.
6. Hinterdorfer P., Baumgartner W., Gruber H., Schilcher K., Schindler H. Detection and localization of individual antibody—antigen recognition events by atomic force microscopy // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1996.—93.—P. 3477—3481.
7. Moy V., Florin E.-L., Gaub H. Intermolecular forces and energies between ligands and receptors // Science.—1994.—266.—P. 257—259.
8. Lyubchenko Y., Shlyakhtenko L. Visualization of supercoiled DNA with atomic force microscopy *in situ* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1997.—94.—P. 496—501.
9. Cherny D., Jovin T. Electron and scanning force microscopy studies of alterations in supercoiled DNA tertiary structure // J. Mol. Biol.—2001.—313.—P. 295—307.
10. Boles T., White, Cozzarelli N. Structure of plectonemically supercoiled DNA // J. Mol. Biol.—1990.—213.—P. 931—951.
11. Tanigawa M., Okada T. Atomic force microscopy of supercoiled DNA structure on mica // Anal. Chim. Acta.—1998.—365.—P. 19—25.
12. Bussiek M., Mucke N., Langowski J. Polylysine-coated mica can be used to observe systematic changes in the supercoiled DNA conformation by scanning force microscopy in solution // Nucl. Acids Res.—2003.—31.—P. 1—10.
13. Кузнецов И. А., Королев Н. И., Филиппов С. М., Хамизов Р. X. Компактизация ДНК, вызываемая протонированием. Кондуктометрическое титрование изоионных растворов и ионообменные свойства иммобилизованной ДНК // Молекуляр. биология.—1983.—17, № 1.—С. 153—161.
14. Vologodskii A., Levene D., Klenin K., Frank-Kamenetskii M., Cozzarelli N. Conformation and thermodynamics of supercoiled DNA // J. Mol. Biol.—1992.—227.—P. 1224—1243.
15. Fujimoto B., Schurr J. Monte Carlo simulations of supercoiled DNAs confined to a plane // Biophys. J.—2002.—82.—P. 944—962.
16. Velichko Y., Yoshikawa K., Khokhlov A. Effect of twisting on the behavior of a double-stranded polymer chain: a Monte-Carlo simulation // J. Chem. Phys.—1999.—111.—P. 9424—9433.
17. Rybenkov V., Vologodskii A., Cozzarelli N. The effect of ionic conditions on DNA helical repeat, effective diameter and free energy of supercoiling // Nucl. Acids Res.—1997.—25.—P. 1412—1418.
18. Limansky A., Shlyakhtenko L., Schaus S., Henderson E., Lyubchenko Y. Aminomodified probes for atomic force microscopy // Probe microsc.—2002.—2.—P. 227—234.
19. Butt H. Measuring electrostatic, van der Waals, and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope // Biophys. J.—1991.—60.—P. 1438—1444.
20. Hansma H., Golan R., Hsieh W., Daubendiek S., Kool E. Polymerase activities and RNA structures in the atomic force microscope // J. Struct. Biol.—1999.—127.—P. 240—247.
21. Лиманский А. П. Исследование аминомодифицированных зондов для атомно-силовой микроскопии биомолекул // Біополімери і клітина.—2002.—18, № 1.—С. 62—70.
22. Вологодский А. В. Топология и физические свойства кольцевых ДНК.—М.: Наука, 1988.—192 с.
23. Rivetti C., Codeluppi S., Dieci G., Bustamante C. Visualizing RNA extrusion and DNA wrapping in transcription elongation complexes of bacteria and eukaryotic RNA polymerases // J. Mol. Biol.—2003.—326.—P. 1413—1426.
24. Leuba S., Karymov M., Tomschik M., Ramjit R., Smith P., Zlatanova J. Assembly of single chromatin fibers depends on the tension in the DNA molecule: magnetic tweezers study // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—2003.—100.—P. 495—500.
25. Мазур Дж., Джерниган Р. Л., Саран А. Конформационные эффекты при растяжении ДНК // Молекуляр. биология.—2003.—37, № 2.—С. 277—287.
26. Лиманський О. П., Лиманська О. Ю. Вивчення геномної ДНК мікроорганізмів методом атомно-силової микроскопії // Цитология и генетика.—2002.—36, № 4. С. 30—36.
27. Лиманский А. П. Атомно-силовая микроскопия: от визуализации молекул ДНК и белков до измерения силы межмолекулярных взаимодействий // Успехи соврем. биологии.—2003.—123, № 6.—С. 531—542.
28. Newlin D., Miller K., Pilch D. Interactions of molecules with nucleic acids. VII. Intercalation and TA specificity of daunomycin in DNA // Biopolymers.—1984.—23.—P. 139—158.
29. Frank-Kamenetskii M. DNA supercoiling and unusual structures DNA topology and biological effects/DNA topology and its biological effects / Eds N. Cozzarelli, J. Wang.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1990.—P. 186—215.

УДК 577.2:577.32

Надійшла до редакції 16.03.05