

СУПЕРСПИРАЛЬНАЯ ДНК ПОЛИТЕННЫХ ХРОСОМОВ *CHIRONOMUS THUMMI*

М. А. Шурдов, А. Д. Груздев

Введение. Экспериментальные данные последних лет свидетельствуют о том, что молекулы ДНК в ядрах клеток эукариот, так же как у прокариот, находятся в суперспирализованном состоянии [1, 2]. Есть основания полагать, что транскрипционная активность генов существенно зависит от степени суперспиральности их ДНК [3, 4]. Одним из путей выяснения этой зависимости является измерение суперспиральности ДНК локусов политенных хромосом во время формирования или регрессии в них пухов. Однако существующие сейчас методы не применимы для измерений *in situ*. Предлагаемый в настоящей статье вариант микрофлюориметрического метода вполне адекватен поставленной задаче. Его чувствительность, ограниченная в основном шумами регистрирующей аппаратуры, может быть достаточно высокой. Поскольку при применении метода не требуется информации о количестве ДНК в измеряемом объеме, он может быть также использован в макро- или полумикровариантах, в том числе при определении суперспиральности ДНК после электрофореза непосредственно в гелях. Ниже излагается его применение для определения степени суперспиральности ДНК политенных хромосом хирономуса.

Материалы и методы. В работе использовали личинок лабораторной линии *Ch. thummi*. Из ядер изолированных слюнных желез личинок четвертого возраста политенные хромосомы выделяли микроиглами в физиологическом растворе под бинокулярным микроскопом [5]. Состав раствора: 10 мМ трис-НСl, рН 7,3, 125 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂. Несколько наборов хромосом напизывали на кончик стеклянной иглы, быстро погружали в 1 %-ный раствор низкотемпературной агарозы («Sigma», США) при температуре 36—37 °С и возвращали в физиологический раствор. В результате проведенных манипуляций на кончике иглы образуется микрокапля застывшей агарозы, содержащая политенные хромосомы. Для их депротенизации использовали растворы ступенчато повышающейся (через каждые 0,2 М) ионной силы от 0,35 до 1,95 М NaCl, содержащие 50 мМ трис-НСl, рН 7,3. Через 20 мин 1,95 М раствор NaCl заменяли на исходный в обратном порядке. Микроэлектрофоретический анализ показал, что для удаления гистонов достаточно пятиминутного пребывания хромосом в 1,95 М растворе NaCl.

В работе использовали также ДНК, выделенную из личинок *Ch. thummi* фенольным методом [6]. Средняя молекулярная масса этой ДНК, оцененная электрофоретически, превышала $4 \cdot 10^6$.

Измерения интенсивности флюоресценции проводили на микрофлюориметре собственной конструкции, который отличался от описанного ранее [7] использованием инвертированного микроскопа.

Для определения степени суперспиральности (σ) суперспирализованную ДНК (сДНК) депротенизированных политенных хромосом окрашивали различными концентрациями (С) бромистого этидия (БЭ). Для каждого препарата измеряли интенсивность флюоресценции БЭ, связанного с сДНК, до (I_c) и после (I_n) мягкой обработки препарата ДНКазой I или рестриктазой *EcoRI*. Условия обработки и измерения подбирали таким образом, чтобы исключить убыль нуклеотидного материала, поэтому единственным результатом нуклеазной обработки могла быть релаксация супервитков хромосомной ДНК.

При малых концентрациях красителя ($I_c/I_n > 1$), поскольку отрицательно суперспирализованная ДНК обладает большим сродством к БЭ, чем линейная или релаксированная форма [8, 9]. По мере увеличения посадки красителя на сДНК число отрицательных супервитков падает до нуля, а затем начинается образование положительных супервитков. У этой формы ($I_c/I_n < 1$). Вполне очевидно, что при ($I_c/I_n = 1$) константа связывания (K) и число мест посадки (v_0) красителя на суперспирализованной и линейной молекулах ДНК совпадают. Зная плотность посадки красителя в этих условиях, нетрудно вычислить степень ее суперспиральности [1]: $-\sigma_0 = 1,44 v_0$.

Обычно значение ν_0 определяется по известной концентрации красителя с помощью процедуры Скэтчарда [10]. Для цитологических препаратов, где концентрация ДНК неизвестна, необходимо использовать иной способ. В данном случае мы воспользовались тем обстоятельством, что плотность посадки БЭ на линейной молекуле ДНК

однозначно определяет анизотропию флуоресценции $\mu = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$, которую легко измерить у цитологических образцов. (Здесь I_{\parallel} и I_{\perp} — суть интенсивности флуорес-

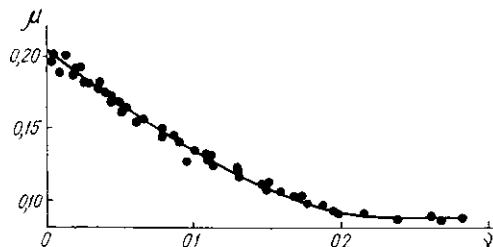


Рис. 1. Зависимость анизотропии флуоресценции комплекса БЭ — ДНК от плотности посадки красителя ν , равной числу связанных молекул БЭ на нуклеотид ДНК

Fig. 1. Dependence of fluorescence anisotropy of the EtBr-DNA complexes on EtBr binding density ν , ν is the number of drug molecules bound per nucleotide

ценции, поляризованные параллельно и перпендикулярно поляризации возбуждающего пучка соответственно). Зависимости $\mu(C)$ и $\nu(C)$, полученные для линейных молекул ДНК хирономуса обычным способом, позволили построить требуемую градуировочную кривую $\mu(\nu)$, приведенную на рис. 1.

Результаты и обсуждение. Зависимость $\ln(I_c/I_n)$ от плотности посадки ν красителя БЭ на сДНК депротенизированных политепных хромосом представлена на рис. 2. Видно, что в точке $(I_c/I_n) = 1$ в физиологическом солевом растворе соответствует значение $\nu_0 = 0,065$ и $-\sigma_0 = 0,094$, тогда как в растворе $0,5 \text{ M NaCl}$ — $\nu_0 = 0,075$ и $-\sigma_0 = 0,108$. Увеличение числа титруемых супервитков при повышении ионной силы раствора соответствует имеющимся представлениям о свойствах кольцевых молекул ДНК [1].

Полученный результат позволяет оценить число супервитков, приходящееся на один нуклеосомный повтор ДНК. Считая его длину $196 \div 200$ нуклеотидных пар (н. п.), имеем $1,84 \div 1,88$ витка, что несколько выше $1,75$ витка ДНК в коровой частице, но меньше двух витков в полной нуклеосоме (хроматосоме) [11, 12]. Поэтому можно ожидать, что линкерная ДНК в нативном хроматине суперспирализована слабо, хотя величину и знак σ предсказать невозможно.

При анализе формы кривых рис. 2 обращает на себя внимание наличие максимума при малых плотностях посадки красителя и плато — при больших плотностях. Если наличие плато объясняется тривиальным эффектом насыщения ДНК красителем, то появление максимума, как мы полагаем, свидетельствует о переходе части ДНК в форму (или формы), «поглощающие» часть супервитков.

Действительно, для слабо суперспирализованной ДНК плазмиды *pBR322* зависимость $\ln(I_c/I_n)$ от плотности посадки ν (в области малых ν) выражается линейной функцией (рис. 3). Такая же зависимость получена ранее иным способом для ДНК плазмиды *PM2* [8]. Теоретическое объяснение этого факта сводится к тому, что начальный участок изотермы связывания красителя линеен, т. е. $I \sim Kc$. Для линейной или релаксированной молекулы ДНК K_n действительно константа связывания, тогда как для сДНК

$$K_c = K_n \exp(a(\nu_0 - \nu)). \quad (1)$$

Отсюда очевидно, что при фиксированной концентрации красителя

$$\ln(I_c/I_n) = \ln(K_c/K_n) = a(\nu_0 - \nu). \quad (2)$$

Как видно из рис. 2, для сильно суперспирализованной ДНК политепных хромосом эта зависимость не является линейной. Именно

поэтому мы предположили появление качественно новых форм ДНК в области низкой плотности посадки красителя. Критическая плотность супервитков, оцениваемая по положению максимума на рис. 2, в физиологическом солевом растворе равна $\sigma_k = -1,44(v_0 - v_k) = -0,058$. Полученное значение хорошо согласуется со значением $\sigma_k = -0,063$, начиная с которого в ДНК вируса SV40 регистрируется появление Z-формы [13].

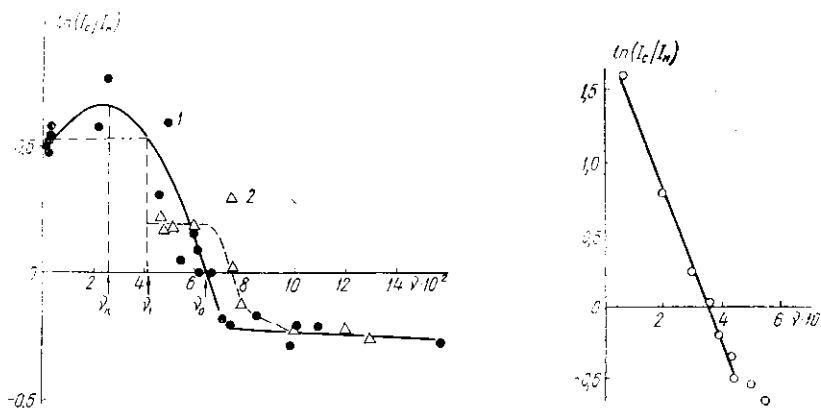


Рис. 2. Зависимость натурального логарифма отношения интенсивностей флуоресценции комплекса сДНК — БЭ и комплекса релаксированная ДНК — БЭ от плотности посадки красителя на сДНК: 1 — физиологический солевой раствор; 2 — раствор 0,5 M NaCl

Fig. 2. Dependence of the natural logarithm of the ratio of the fluorescence intensities of the supercoiled DNA-EtBr complex and the nicked DNA-EtBr complex on density of the EtBr binding to the *Chironomus thummi* supercoiled DNA

Рис. 3. Зависимость натурального логарифма отношения интенсивностей флуоресценции комплекса БЭ — ДНК в суперспирализованной и релаксированной форме от плотности посадки красителя на сДНК плазмиды pBR322

Fig. 3. Dependence of natural logarithm of the ratio of the fluorescence intensities of the supercoiled DNA-EtBr complex and the nicked DNA-EtBr complex on density of the EtBr binding to the superhelical pBR322 DNA

При увеличении числа сверхвитков в ДНК политепных хромосом, т. е. при уменьшении плотности посадки красителя ниже v_k , плотность суперспиральности основной формы ДНК не только не возрастает, а даже падает (по модулю) до $|\sigma| = 1,44(v_0 - v_1) = 0,033$. Следовательно, появившаяся новая форма ДНК способна не только компенсировать избыток числа супервитков над их критическим уровнем, но и захватить часть имевшихся ранее. Подобной кооперативностью, как известно, обладают переходы из В-формы в крестообразную и Z-формы [14, 15].

Нетрудно оценить долю ДНК политепных хромосом, перешедшую в неканоническую форму. Так, переход n пар оснований из В-формы в крестообразную приводит к их раскрытию, т. е. полностью снимает $\Delta\tau = n/\gamma_0$ отрицательных супервитков (здесь γ_0 — среднее число пар оснований, приходящееся на виток двойной спирали в линейной ДНК). Отсюда доля пар оснований, участвующих в переходе, равна

$$(n/N) = \frac{\Delta\tau\gamma_0}{N} = \Delta\sigma. \quad (3)$$

Если же следствием всех переходов является Z-форма, то спиральная закрутка ДНК меняется на $\Delta\tau = n(1/\gamma_0 - 1/\gamma_z)$ витков. Учитывая, что для левоспиральной Z-формы $\gamma_z = -12$, получаем $(n/N) = \Delta\sigma/1,8$.

С другой стороны, из кривой $\ln(I_c/I_n)$ на рис. 2 видно, что переходы осуществляются в диапазоне плотностей супервитков, равном $\Delta\sigma = 1,44 v_1 = 0,06$. Отсюда для крестов $(n/N) = 0,06$ (или 6%), а для В-Z-переходов $(n/N) \approx 0,03$ (или 3%).

Очевидно, что в действительности реализуются оба пути, а также другие переходы, ведущие к сбросу напряжений сДНК [16]. Часть из них происходит, по-видимому, довольно синхронно после достижения критической плотности σ_k . Синхронность переходов свидетельствует, по нашему мнению, в пользу того, что все домены ДНК политенной хромосомы суперспирализованы примерно одинаково. В противном случае для обеспечения синхронности переходов необходимо дополнительное предположение о более легких конформационных переходах в доменах с меньшей $|\sigma|$ по сравнению с высоко суперспирализованными доменами. Напомним, что измеренная в эксперименте суперспиральность сДНК близка к суперспиральности нуклеосомной ДНК. Тогда, учитывая примерно равномерное расположение гистонов по геному [17], также приходим к выводу о примерной гомогенности доменов.

Тем не менее в заключение коснемся вопроса роли гетерогенности доменов по степени суперспиральности их ДНК при измерении средней плотности $\bar{\sigma}$. Иными словами, попытаемся оценить, насколько измеренная величина $\bar{\sigma}_0$ отличается от средневзвешенного значения плотности

$$\bar{\sigma} = \int_{\sigma_{\min}}^{\sigma_{\max}} \sigma f(\sigma) d\sigma, \quad (4)$$

где $f(\sigma)$ — нормированная функция распределения доменов по степени суперспиральности. В эксперименте разные части распределения получают разные весовые множители, пропорциональные их вкладу в интенсивность флуоресценции. Выражение (2), справедливое для однородной фракции, можно переписать в виде:

$$(I_c/I_n) \sim \exp(a(1,44\nu - \sigma_i)). \quad (5)$$

Суммируя интенсивности всех фракций с учетом их встречаемости в образце при $\nu = \nu_0$ имеем:

$$(I_c/I_n) = \int_{\sigma_{\min}}^{\sigma_{\max}} f(\sigma) \exp(a(\sigma_0 - \sigma)) d\sigma = 1. \quad (6)$$

Разлагая экспоненту в ряд и отбрасывая все члены, начиная с кубического, получаем $\bar{\sigma} - \sigma_0 = 0,35a \langle \Delta\sigma^2 \rangle$.

Таким образом, экспериментально измеренное значение плотности сверхвитков всегда несколько завышено по модулю относительно средневзвешенного.

Авторы выражают благодарность С. С. Богачеву за предоставление и характеристику ДНК хирономуса; Ф. П. Свинарчуку за микрофоретический анализ белков политенных хромосом; Н. Г. Холодильову за предоставление препарата *EcoRI*, а также И. И. Кикнадзе за обсуждение результатов работы.

SUPERHELICAL DNA OF POLYTENE CHROMOSOMES *CHIRONOMUS THUMMI*

M. A. Shurlov, A. D. Gruzdev

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

Summary

The fluorescent micromethod of measurement of DNA superhelical density σ in solutions gels or chromosomes is proposed. EtBr intercalation is used to equalize the EtBr-binding properties of the supercoiled and nicked DNA molecules. The number of 1.84–1.88 left turns of DNA molecule per nucleosome is estimated from the measured value — $\sigma = 0.094$ for the nucleoids of *Chironomus thummi* polytene chromosomes. Experimental data indicate that about 3–6% of DNA in the nucleoids adopts non-canonical forms when — $\sigma \geq 0.06$.

1. *Bauer W. R.* Structure and reactions of closed duplex DNA // *Annu. Rev. Biophys. and Bioeng.*—1978.—7.—P. 287—313.
2. *Филиппович И. В., Сорокина Н. И.* Суперспиральная ДНК клеточного ядра // *Успехи соврем. биологии.*—1983.—95, № 2.—С. 163—180.
3. *Fisher M. L.* DNA supercoiling and gene expression // *Nature.*—1984.—307, N 5953.—P. 686—687.
4. *Грагеров А. И., Миркин С. М.* Влияние сверхспирализации ДНК на основные генетические процессы у прокариот // *Молекуляр. биология.*—1980.—14, № 1.—С. 8—34.
5. *Груздев А. Д., Белая А. Н.* Влияние концентрации водородных ионов, тоничности и ионной силы на размеры полигенных хромосом // *Цитология.*—1968.—10, № 3.—С. 297—305.
6. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—477 с.
7. *Gruzdev A. D., Kishchenko G. P.* Fluorescence polarization of study of stretched polytene chromosomes stained with acridine orange // *Biophys. Struct. and Mech.*—1978.—4, N 2.—P. 97—110.
8. *Hsieh T.-S., Wang J. C.* Thermodynamic properties of superhelical DNAs // *Biochemistry.*—1975.—14, N 3.—P. 527—535.
9. *Bauer W., Vinograd J.* Interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. 2. The energy of superhelix formation in SV40 DNA // *J. Mol. Biol.*—1970.—47, N 4.—P. 419—435.
10. *Scatchard G.* The attractions of proteins for small molecules and ions // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*—1949.—51.—P. 660—672.
11. *Structure of the nucleosome core particle of chromatin* / J. T. Finch, L. C. Lutter, D. Rhodes et al. // *Nature.*—1977.—269, N 5623.—P. 29—36.
12. *Periodicity of deoxyribonuclease I digestion of chromatin* / A. Prunell, R. D. Kornberg, L. C. Lutter et al. // *Science.*—1979.—204, N 4395.—P. 855—858.
13. *Nordheim A., Rich A.* Negatively supercoiled simian virus 40 DNA contains Z-DNA segment within transcriptional enhancer sequences // *Nature.*—1983.—303, N 5919.—P. 674—679.
14. *Lyamichev U. I., Panyutin I. G., Frank-Kamenetskii M. D.* Evidence of cruciform structures in superhelical DNA provided by two-dimensional gel electrophoresis // *FEBS Lett.*—1983—153, N 2.—P. 298—302.
15. *Frank-Kamenetskii M. D., Vologodskii A. V.* Thermodynamics of the B-Z transition in superhelical DNA // *Nature.*—1984.—307, N 5950.—P. 481—482.
16. *Nicol J. M., Felsenfeld G.* DNA conformation at the 5' end of the chicken adult β -globin gene // *Cell.*—1982—35, N 2.—P. 467—477.
17. *Gorovskiy M. A., Woodward J.* Histone content of chromosomal loci active and inactive in RNA synthesis // *J. Cell. Biol.*—1967.—33, N 3.—P. 723—728.

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

Получено 08.08.86

УДК 577.217.5:577.18.02

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ МАТРИЧНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИ(U) И ПОЛИ(dT) В БЕСКЛЕТОЧНЫХ БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩИХ СИСТЕМАХ ИЗ *ESCHERICHIA COLI* И ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ

А. П. Потапов, К. А. Солдаткин, А. П. Солдаткина, А. В. Ельская

Введение. Для объяснения молекулярного механизма кодонзависимого отбора аминоксил-тРНК на рибосоме и транслокации была предложена гипотеза о стереоспецифической стабилизации кодон-антикодонных комплексов при трансляции [1, 2]. Центральным положением гипотезы является допущение о прямом взаимодействии некоторого участка рибосомы X с кодон-антикодонным дуплексом. Предполагается, что формирование тройного комплекса X·(кодон—антикодон) — необходимое условие точной селекции аминоксил-тРНК в А-центре рибосомы и затем правильной транслокации этой тРНК (в форме пептидил-тРНК) из А- в Р-центр. Специфичность сборки тройного комплекса определяется постулируемой гипотезой стереоспецифичностью X к комплементарным кодон-антикодонным парам, олознаваемым по пространственной структуре их сахаро-фосфатных остовов [1, 2].