

Компактизація суперспіральної ДНК на модифікованій амінослюді

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, Україна

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

За допомогою атомно-силової мікроскопії візуалізовано етапи компактизації поодиноких молекул суперспіральної ДНК рGEMEX, іммобілізованих на модифікованій амінослюді. При підвищенні рівня компактизації ДНК довжина суперспіральної осі першого порядку молекул зменшується від ~ 580 до ~ 370 нм з наступним утворенням осі суперспіралі другого і третього порядків довжиною ~ 260 і ~ 140 нм (~ 10 % від контурної довжини релаксованої молекули) відповідно. Компактизація поодиноких молекул завершується утворенням мінітороїдів діаметром ~ 50 нм та молекул сферичної конформації. Запропоновано модель можливих конформаційних переходів суперспіральної ДНК in vitro за відсутності білків. Показано, що компактизація суперспіральних молекул ДНК до рівня мінітороїдів і сфероїдів обумовлена високою поверхневою щільністю заряду амінослюди, на якій іммобілізовано молекули ДНК.

Ключові слова: суперспіральна ДНК, атомно-силова мікроскопія, амінослюда, компактизація ДНК, тороїд.

Вступ. Геномна ДНК величезної довжини (від міліметра до метра) компактизована за допомогою білків у високоупорядковані структури в бактеріях та ядрах еукаріотів, об'єм яких складає лише від декількох одиниць до сотень кубічних мікрометрів [1]. Об'єм ДНК для мікроорганізмів з секвенованим геномом може бути легко обчислено множенням діаметра ДНК (2 нм) на довжину молекули у припущенні В-форми ДНК (тобто за відстані між нуклеотидами вздовж осі подвійної спіралі $H = 3,40 \text{ \AA}$). За відсутності білків випадковим чином компактизована молекула ДНК займає значно більший об'єм, ніж у ядрі або в бактеріальній клітині. Згідно з сучасними поглядами, така компактизація ДНК еукаріотів обумовлена її взаємо-

дією з ядерними білками, насамперед з гістонами, та наступним утворенням нуклеосом, хроматинових волокон і хромосом [2—4]. Інші білки, які зв'язуються з послідовністю ДНК специфічно, — це представники групи білків HMG, що модулюють зв'язування гістонів з ДНК. Крім того, ідентифіковано білки SMC (конденсини і когезини), що є членами родини АТРаз, відіграють центральну роль у конденсації хромосом та спричиняють безпосередню конденсацію ДНК [5].

Для дослідження геномної архітектури в ядрі еукаріотів використовують різні модельні системи. Зокрема, атомно-силовою мікроскопією (АСМ) визначено, що нуклеоїд *Escherichia coli* є структурою, яка змінюється протягом клітинного росту: у стаціонарній фазі він компактизованіший, ніж у лог фазі. Однак для обох фаз фундаментальною струк-

турою нуклеоїду є волокно діаметром ~ 80 нм [1]. У *log* фазі нуклеоїду також візуалізовано більш тонке волокно діаметром 40 нм та високоупорядковану петлю.

Часто використовують і іншу модельну систему — нуклеосому, яка є основною повторюваною одиницею хроматину. У цьому разі для лінійної ДНК у комплексі з гістоновим октамером, утвореним двома молекулами кожного з білків H2A, H2B, H3 і H4, візуалізовано структури типу «кульки на нитці» [6]. Компактизації і конденсації ДНК з утворенням тороїдів і волокон (джгутів) можна досягти і за інших умов, окрім комплексоутворення з білками. Наприклад, показано, що різні полікатіони (полілізин, спермін, спермідин, протамін) спричиняють конденсацію ДНК та утворення тороїдів [7—9].

Більше того, у роботі [10] продемонстровано, що для конденсації ДНК присутність білків або полікатіонів не є обов'язковою умовою, а конденсації ДНК можна досягнути іммобілізацією молекул ДНК на позитивно зарядженій поверхні. Встановлено [10, 11], що ступінь конденсації молекул ДНК можна контролювати за допомогою зміни валентності силанів, які використовують для модифікації слюди, а також змінюючи концентрацію NaCl. Однак внаслідок варіювання концентрації NaCl у вузькому інтервалі (10—100 мМ) висококомпактизовані структури ДНК не було візуалізовано. Цікаво відзначити, що в роботах [12, 13] за умов конденсації лінійних молекул ДНК формувалися агрегати, утворені не поодинокими, а декількома молекулами ДНК.

У цьому повідомленні вперше продемонстровано зображення поодиноких молекул суперспіральної ДНК, ступінь компактизації яких значно перевищує раніше досягнуті рівні конденсації. Використання нового субстрату для іммобілізації ДНК — модифікованої амінослюди з підвищеною поверхневою щільністю заряду та гідрофобністю у порівнянні зі стандартною амінослюдою — дозволило нам візуалізувати різні стадії компактизації поодиноких кільцевих молекул ДНК як із зменшенням довжини суперспіральної осі молекул у два і чотири рази з утворенням осі суперспіралі другого і третього порядків відповідно, так і компактизацію поодиноких молекул суперспіральних ДНК в міні-тороїди, сфероїди та джгугти.

Матеріали і методи. Підготовка зразків ДНК для полімеразної ланцюгової реакції та АСМ.

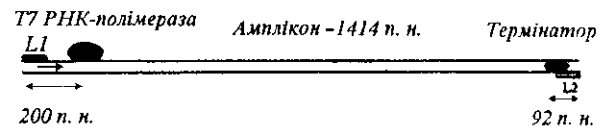


Рис. 1. Схематичне зображення матриці ДНК, використаної для ПЛР. Праймери, показані прямокутниками, фланкують фрагмент ДНК *pGEMEX* довжиною 1414 п. н., який містить промотор і термінатор транскрипції T7 РНК-полімерази. Великим темним овалом позначено T7 РНК-полімеразу, малим — область термінації транскрипції для T7 РНК-полімерази

Використовували лінійну і суперспіральну ДНК *pGEMEX1* («Promega», США). Для проведення ПЛР лінійну ДНК отримували за допомогою обробки суперспіральної ДНК *pGEMEX* довжиною 3993 пари нуклеотидів (п. н.) рестриктазою *ScaI* («New England Biolabs», Велика Британія). Сконструйовані нами праймери L1 і L2 обмежували фрагмент ДНК, який містить промотор і область термінації транскрипції T7 РНК-полімерази. Схематичне зображення ампліфікованого фрагмента ДНК довжиною 1414 п. н. наведено на рис. 1. Праймери L1 та L2, послідовності яких з відповідними позиціями на ДНК *pGEMEX* наведено нижче, отримано від «Sigma» (Японія):

5'-cgc tta caa ttt cca ttc gcc att c-3' — прямий праймер L1 (3748—3772);

5'-ctg att ctg tgg ata acc gta tta ccg-3' — зворотний праймер L2 (1168—1142).

ПЛР з гарячим стартом проводили в об'ємі 50 мкл реакційної суміші на ампліфікаторі GeneAmp 9700 («Perkin Elmer», США) за наступних температурних і часових параметрів: початкова інкубація — 95 °С, 2 хв, денатурація — 95 °С, 1 хв, відпал — 69—73 °С, 1 хв, синтез — 74 °С, 1 хв, кількість циклів — 35. Температуру відпалу визначали теоретично за допомогою програми Oligo. Для мінімізації ампліфікації неспецифічних фрагментів проводили декілька постановок ПЛР за різних температур відпалу — 69, 71 і 73 °С.

Для візуалізації ампліконів 15 мкл ПЛР-продукту розділяли електрофорезом в 2 %-му агарозному гелі з наступним забарвленням бромистим етидієм.

Ампліфікований фрагмент ДНК очищували за допомогою такої процедури. Після проведення електрофорезу вирізали смугу гелю, яка містить амплікон, з використанням довгохвильового УФ джерела випромінювання низької інтенсивності («BioRad», США). Для подальшого очищення амплікона від нуклеотидів, праймерів, ДНК-по-

лімерази та бромистого етидію використовували набір QIAquick PCR purification kit («QIAGEN», Японія) згідно з рекомендаціями виробника, а також екстракцію фенолом/хлороформом з наступним переосадженням етанолом.

Для проведення ПЛР використовували термо-стабільну ДНК-полімеразу високої точності двох видів — Pyrobest ДНК-полімеразу («TaKaRa Co.», Японія) та Invitrogen Platinum ДНК-полімеразу («Invitrogen», Японія).

Свіжосколоту слюди, стандартну і модифіковану амінослюду (з підвищеною порівняно зі стандартною амінослюдою поверхневою щільністю аміногруп) застосовували як субстрат. Для нанесення ДНК на свіжосколоту слюди використовували 10 мМ NEPEB буфер, який містить 2,5 мМ $MgCl_2$. На смугу стандартної амінослюди або модифікованої амінослюди розміром 1 см² наносили краплю розчину ДНК з концентрацією 0,1 мкг/мл у ТЕ буфері (10 мМ трис-НСІ, рН 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 [14] за допомогою модифікації свіжосколотої слюди аміногрупами у парях перегнаного 3-амінопропіл-триетоксисилану (АПТЕС) («Aldrich», США). Дистиляцію АПТЕС здійснювали за зменшеного тиску в атмосфері аргону. Для аміномодифікації свіжосколоту слюди витримували у скляному ексікаторі з розчинами АПТЕС та N,N-діізопропілетиламіну упродовж 1 год. Модифіковану амінослюду виготовлено за допомогою невеликих змін технології отримання стандартної амінослюди.

Атомно-силова мікроскопія. У роботі використано АСМ Nanoscope IV MultiMode System («Veeco Instruments Inc.», США) з Е-сканером. АСМ зображення ДНК записано за допомогою вібруючого варіанта АСМ у повітрі в режимі «висота» із застосуванням OMCL-AC160TS кантиліверів («Olympus Optical Co.», Японія) з резонансною частотою 340–360 кГц та 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 індивідуальних молекул ДНК розраховували на основі реально обмірюваних параметрів

молекул із АСМ зображення. Для обчислення об'єму молекул використовували побудову подовжніх перерізів молекул за допомогою опції програмного забезпечення Nanoscope.

Результати і обговорення. Показано [15], що довжина осі суперспіральної (сс) ДНК залишається постійною при збільшенні суперспіральної щільності і становить ~ 35 % контурної довжини релаксованої молекули. Ця умова виконується для молекул ДНК *pGEMEX*, іммобілізованих на свіжосколотій слюді, якій притаманна відносно невисока поверхнева щільність заряду. Іммобілізація ссДНК на модифікованій амінослюді з підвищеною поверхневою щільністю заряду порівняно не лише зі свіжосколотою, а й зі стандартною амінослюдою веде до істотної компактизації ДНК. Такі поодинокі молекули ссДНК, що утворюють вісь суперспіралі другого порядку, представлено на рис. 2, а. Довжина суперспіральної осі цих висококомпактизованих молекул у порівнянні з плектономічними ДНК зменшилася до значення, що становить ~ 1/4 контурної довжини молекули ($l = 260$ нм).

Ще один з варіантів висококомпактизованих молекул ссДНК, які утворюються на поверхні модифікованої слюди, — сфероїд — показано стрілкою на рис. 2, а, а переріз сфероїду, з якого визначали параметри молекули, — на рис. 2, в.

Розраховавши об'єм конденсованої структури, можна визначити кількість компактизованих молекул ссДНК, що беруть участь у формуванні структури. Розрахований з даних площі перерізу та діаметра об'єм сфероїду (V), наведеного на рис. 2, а, становить 3140 нм³. Оскільки теоретично розрахований виключений об'єм ($V_{\text{викл}}$) ДНК *pGEMEX* у припущенні її В-форми складає 3900 нм³, наведені результати свідчать, що сфероїд сформований поодинокими молекулами ссДНК.

У результаті подальшої компактизації утворюються молекули із ще вдвічі меншою довжиною суперспіральної осі (довжина осі третього порядку $l = 140$ нм, позиція D2, таблиця), а також молекули у сферичній конформації (сфероїди) (позиція E2 і F2, таблиця).

Компактизація на модифікованій амінослюді відбувається не лише для поодиноких молекул ДНК. На рис. 2, б, наведено зображення димеру ($V = 7080$ нм³) — компактизованої структури, утвореної двома ссДНК, довжина суперспіральної осі якого становить, як і довжина суперспіральної осі поодинокі молекули, $l = 260$ нм.

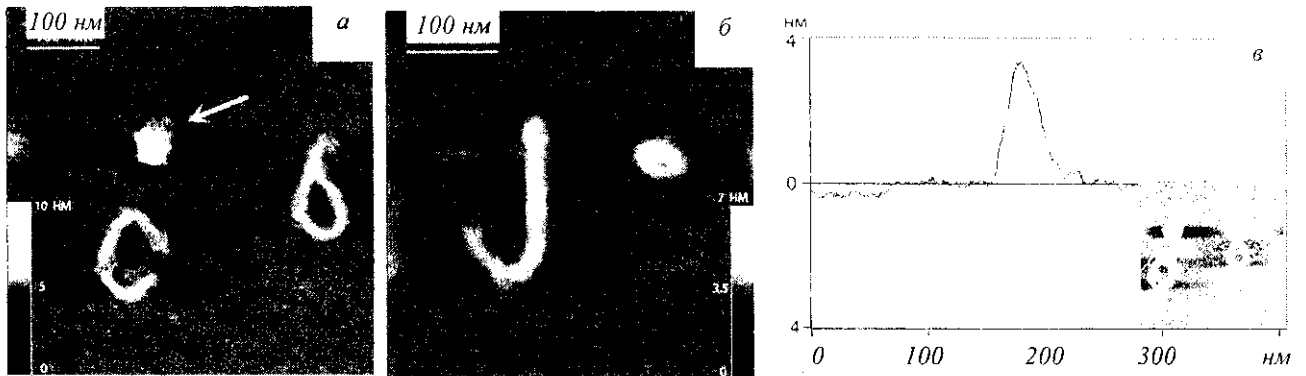


Рис. 2. АСМ-зображення: *a* — поодиноких надсуперспіральних молекул (надсс) ДНК *pGEMEX* на модифікованій аminosлюді (довжина суперспіральної осі кожної з молекул ДНК становить $l = 260\text{--}270$ нм, тобто близько чверті контурної довжини релаксованої молекули; стрілкою показано молекулу ДНК, компактизовану до рівня сфероїду; наведено шкалу градації сірого, що відповідає діапазону Z координати від 0 до 10 нм, яка дозволяє оцінити висоту іммобілізованої молекули); *b* — надссДНК, що утворили димер (довжина суперспіральної осі $l = 260$ нм, об'єм дорівнює подвоєному об'єму поодинокій ссДНК); *c* — переріз молекули ДНК у сферичній конформації, що дозволяє визначити висоту молекули (максимальна висота сфероїду $h_{\max} = 3.65$ нм; на вставці показано лінію, уздовж якої зроблено переріз); Розмір кадрів для *a*–*c* — 500×500 нм; шкала градації сірого відповідає діапазону Z координати від 0 до 7 нм)

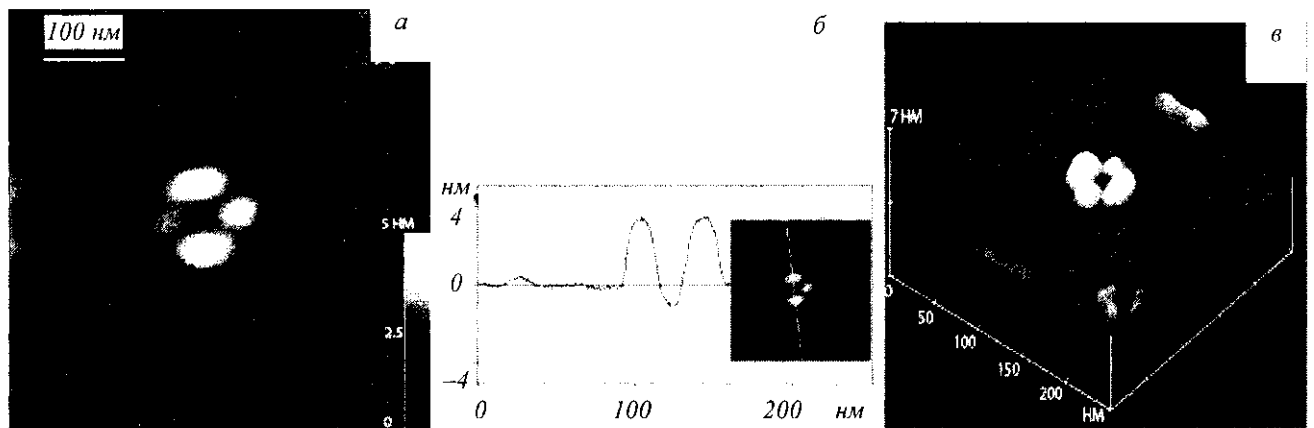



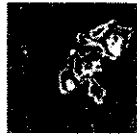


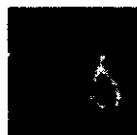



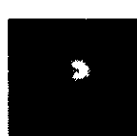
Рис. 3. АСМ зображення (*a*), переріз (*b*) та тривимірне зображення (*c*) поодинокій надссДНК *pGEMEX*, що утворила мінітороїд (*a* — розмір кадру 250×250 нм; *b* — висота двох фрагментів тороїду, через які проведено переріз, дорівнює 1,74 нм; для *a*, *c* — зовнішній діаметр мінітороїду складає 50–60 нм, внутрішній — 15–25 нм)

Іншою візуалізованою нами структурою, зовні схожою на сфероїд на АСМ зображенні з невисокою роздільною здатністю, є мінітороїд. На рис. 3 показано мінітороїд, утворений поодинокією ссДНК, перерізи та тривимірне зображення молекули. Значення об'єму цієї молекули становить 3980 нм^3 , що відповідає об'єму поодинокієї молекули ДНК *pGEMEX*. З перерізів можна бачити, що три з чотирьох сегментів тороїду мають однакову висоту ($h = 1,74$ нм), а четвертий — майже вдвічі меншу ($h = 0,84$ нм). Це означає, що в четвертому сегменті кількість обертів джгута ссДНК менша, ніж у інших трьох сегментів, тобто мінітороїд являє

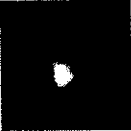
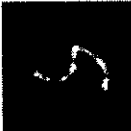


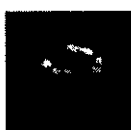
собою своєрідне мінікільце з розрізом у верхній частині, довжина якого дорівнює чверті довжини кола.

Раніше в роботах [7, 10, 13, 16] показано, що в утворенні тороїдів беруть участь декілька лінійних або кільцевих молекул ДНК. Нами візуалізовано і тороїди, сформовані двома надсуперспіральними (надсс) ДНК. Параметри переважної більшості візуалізованих компактизованих ссДНК представлено у таблиці. Позиції С1 і D1 відповідають тороїду, утвореному двома молекулами ДНК, оскільки об'єм цих структур дорівнює подвійному об'єму поодинокієї ссДНК *pGEMEX*. В усіх

Параметри суперспіральных молекул ДНК рGEMEX, визначені із АСМ зображень

№ на рис. 4	Молекула	Висота (h_{max}), нм	Висота (h_{mid}), нм	Контурна довжина надсуперспіральної молекули (L), нм	Довжина суперспіральної осі (L_s), нм	Контурна довжина релаксованої молекули (L_{rel}), нм	Відстань нуклеотидів вздовж спіралі (d)
A3 ^h		0,80	0,35*	1243	466 ^h	1243	3,11
A2 ^r		0,99	0,35*	1216	—	1216	3,05
E1		2,00	0,87	269	269 ^h	1076	2,69
B2		1,35	0,28*	260	260 ^h	1040	2,60
C2		1,36	0,30*	270	270 ^h	1080	2,70
D3		1,74	0,84	260	260	1040	2,60
B1		1,40	0,35*	548	548	1096	2,70
C1		2,00	0,45*	—	401	—	—
E2		2,60	1,85	—	—	—	—

Закінчення таблиці

№ на рис. 4	Молекула	Висота (h_{max}), нм	Висота (h_{min}), нм	Контурна довжина надспіральної молекули (L), нм	Довжина суперспіральної осі (L_s), нм	Контурна довжина релаксованої молекули (L_{rel}), нм	Відстань між нуклеотидами вздовж осі спіралі (H), Å	Об'єм (V), нм ³
F2		3,45	0,30*	—	—	—	—	3140
C3		1,69	0,78	285	285 ^б	—	—	3280
D2		3,00	1,25	140	140	—	—	5180
B3		0,95	0,35*	580	580 ^а	—	—	4440
D1		2,10	0,30*	267	267	—	—	6570

*Двониткова ДНК, ^адовжина суперспіральної осі першого порядку; ^бдовжина суперспіральної осі другого порядку; ^взображення ДНК отримано на слюді в буфері, що містить $MgCl_2$; ^гзображення ДНК отримано на стандартній амінослюді.

інших позиціях таблиці, крім димерного джгута у позиції E1, наведено характеристики АСМ зображень поодиноких молекул ДНК.

На основі аналізу отриманих АСМ зображень нами запропоновано схему поетапної компактизації як для поодиноких молекул ДНК, так і для димерів (рис. 4). Позиції B1, C1, D1, E1, виділені прямокутником, відповідають димерам ссДНК, що визначено на основі обчислення об'ємів вищезгаданих молекул, всі інші позиції — поодиноким молекулам. Найменш компактизовані молекули наведено у позиціях A1—A3, найкомпактизованіші — у позиціях E1—E3. Позиція A3 відповідає зображенню ссДНК *pGEMEX*, іммобілізованого на свіжосколотій слюді з іонами Mg^{2+} . Ця молекула має 7—8 суперспіральних витків (вузлів або самоперехрещень), а значення суперспіральної щільності (σ) складає $-0,024$. Молекули ссДНК *pGEMEX*, іммо-

білізовані на стандартній амінослюді (позиції A1, A2) з високим значенням поверхневої щільності заряду у порівнянні зі свіжосколотою слюдою, мають інший вигляд. Вони схожі на плектономічні молекули ДНК, але є компактизованішими, тобто локалізовані на меншій площі.

При переході до модифікованої амінослюди (всі інші зображення отримано саме на ній), яка характеризується значно більшою поверхневою щільністю заряду порівняно зі стандартною амінослюдою, спостерігається кілька варіантів компактизації ссДНК. На першому етапі зростає кількість вузлів і утворюються надссДНК (B3), довжина суперспіральної осі яких дорівнює приблизно половині контурної довжини релаксованої молекули, тобто утворюються своєрідні джгути. На другому етапі ця джгутоподібна молекула складається навпіл — довжина суперспіральної осі зменшується ще в два

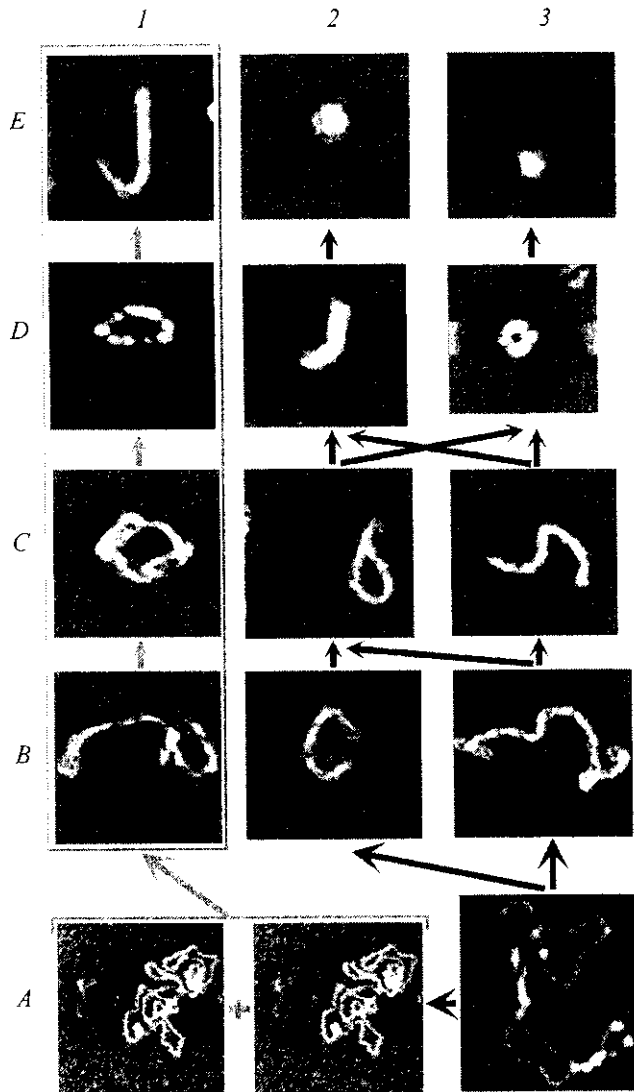


Рис. 4. Модель компактизації молекул суперспіральної ДНК, запропонована на основі отриманих АСМ зображень надссДНК *pGEMEX*: *A1, A2* — стандартна амінослюда; *A3* — свіжосколота слюда, інші АСМ зображення отримано на модифікованій амінослюді (стрілки вказують напрямки етапів компактизації ДНК; прямокутником позначено чотири димери; при підвищенні поверхневої щільності заряду або кількості протонуваних аміногруп, тобто при переході від свіжосколотої і стандартної амінослюди до модифікованої амінослюди, утворюються різні варіанти компактизованих молекул ДНК); *B3* — надссДНК, яка утворює вісь суперспіралі 1-го порядку (контурна довжина компактизованої молекули складає половину від такої релаксованої молекули); *B2, C2, C3* — надссДНК, які утворюють вісь суперспіралі 2-го порядку (контурна довжина компактизованої молекули становить чверть від такої релаксованої молекули); *D2* — надссДНК, яка утворює вісь суперспіралі 3-го порядку (контурна довжина дорівнює восьмій частині довжини релаксованої молекули); *E2, E3* — сфероїди; *D3* — мінітороїд, утворений поодиноким молекулою ДНК; *B1, C1, D1* — конденсовані структури, сформовані двома молекулами ДНК

рази і становить приблизно чверть від контурної довжини релаксованої молекули (*C3, B2, C2*). На цьому етапі можливе як подальше формування джгутів (*C3*), так і утворення тороїдів (*C2*). На третьому етапі утворюються коротші джгути з ще вдвічі меншою довжиною суперспіральної осі $l \sim 140$ нм (*D2*). Крім того, можливе формування мінітороїду (*D3*) як із тороїду (*C2*), так і з джгутоподібної молекули (*C3*). На четвертому етапі подальша компактизація тороїдів та джгутів веде до виникнення напівсфероїдів (*E2*) та сфероїдів.

АСМ зображення цих висококомпактизованих молекул ДНК з високою роздільною здатністю наведено на рис. 5. Цікаво відзначити, що такі мінітороїди виникають як групами (рис. 5, *a*), так і поодинокими структурами (рис. 2, *a*). Це свідчить про те, що 1) на поверхні модифікованої амінослюди протонувани аміногрупи іммобілізовані неоднорідно; 2) сфероїди та напівсфероїди утворюються на ділянках модифікованої амінослюди з максимальною щільністю активних аміногруп.

Інший варіант компактизації ссДНК — компактизація не поодиноких молекул, а димерів. Молекули, АСМ зображення яких показано у позиціях *B1, C1, D1, E1*, утворюють димери, визначені нами на основі обчислення їхніх об'ємів. Спочатку дві плектономічні молекули (*A1, A2*) утворюють джгутоподібні структури (*B1*). У подальшому можливе формування тороїду (*C1, D1*) або джгута (*E1*), довжина суперспіральної осі якого складає чверть контурної довжини релаксованої молекули. Позиція *D2* також відповідає тороїду, утвореному двома молекулами надссДНК.

Розглянемо механізм компактизації надссДНК. При іммобілізації молекул ДНК *pGEMEX* на поверхні свіжосколотої слюди з буфера, що містить іони Mg^{2+} , на АСМ зображенні видно плектономічні молекули ДНК з низьким значенням суперспіральної щільності (позиція *A1* у таблиці). У численних роботах на модельних системах, включаючи нуклеосоми, присвячених дослідженню механізму компактизації ДНК різними білками (гістонові білки, конденсин), також не візуалізовано надссДНК та висококомпактизованих молекул ДНК [2, 4, 5]. Основна причина цього, на наш погляд, полягає в тому, що у більшості робіт як АСМ субстрат використано слюду з невисоким значенням поверхневої щільності заряду, в основному, з використанням іонів Mg^{2+} . А іони Mg^{2+} , подібно до іонів Ca^{2+} , можуть перешкоджати компактизації

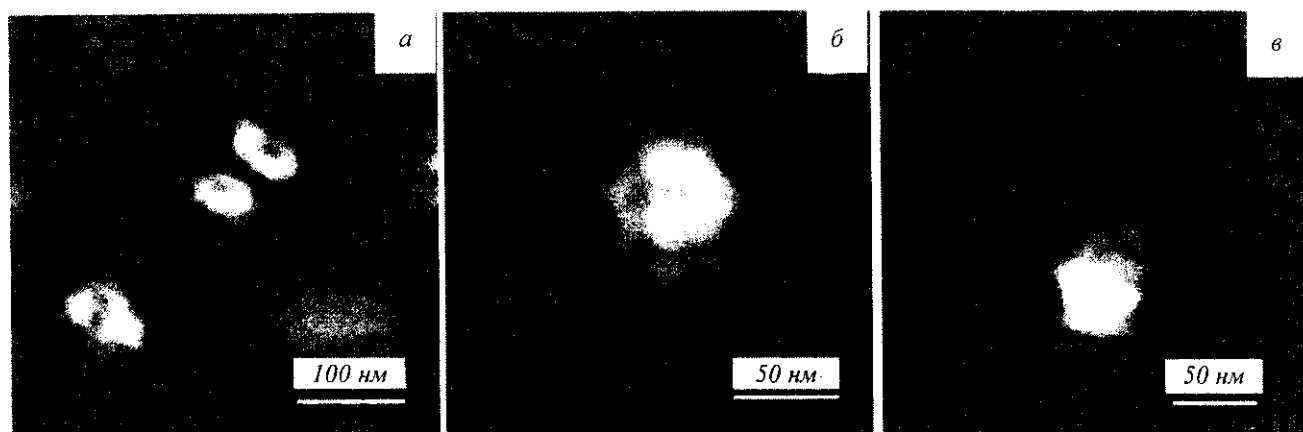


Рис. 5. АСМ зображення компактизованих молекул суперспіральної ДНК *pGEMEX*: *a* — три мінітороїди, утворені поодинокими молекулами ДНК (розмір кадру 400×400 нм); *b* — напівсфероїд (висота його у максимумі $h_{\max} = 2,6$ нм (висота некомпактизованої нитки ДНК $h_{\min} = 0,3$ нм, що відповідає дволанцюговій ДНК; розмір кадру 250×250 нм); *c* — сфероїд (висота $h_{\max} = 3,45$ нм; розмір кадру 250×250 нм)

ссДНК. Так, у роботі [17] показано, що іони Ca^{2+} заважають компактизації ДНК у комплексі з гістоновим білком НМGB1.

Моделюючи процеси надсуперспіралізації та компактизації ДНК за допомогою кільцевої поліпропіленової трубки, можна стикнутися зі ще одним уявним протиріччям. На перший погляд, як при збільшенні кількості суперспіральних витків, так і при утворенні суперспіральної осі другого та третього порядків (тобто при своєрідному складанні джгута вдвічі і вчетверо) загальне напруження та жорсткість вигинання такої компактизованої молекули повинні зростати. Втім, за незначного зменшення механічної напруги у джгуті при зберіганні максимальної кількості надвитків (вузлів) джгут переходить до тороїдальної конформації. З іншого боку, у роботі [18] показано, що конформаційна гнучкість ссДНК значно зростає при взаємодії з гістоновими білками в процесі утворення тетра-, нуклео- та хроматосом. Автори пояснюють зростання конформаційної гнучкості ДНК збільшенням радіуса суперспіралі ДНК, що, в свою чергу, може бути необхідним для функціонування нуклеосомної ДНК у складі хроматину.

Для розуміння механізму компактизації ссДНК на поверхні модифікованої амінослюди важливим є питання стосовно конформації ДНК на поверхні зарядженої слюди. Щоб відповісти на нього, ми візуалізували фрагменти лінійної ДНК *pGEMEX* довжиною 1414 п. н. (див. рис. 1), які отримано за допомогою лінеаризації ссДНК *pGEMEX* та ампліфіковано в результаті ПЛР. АСМ

зображення ампліконів, іммобілізованих на стандартній і модифікованій амінослюді, наведено на рис. 6. Безпосередньо з АСМ зображення вимірювали контурну довжину ампліконів двома різними способами — за допомогою опції програмного забезпечення Nanoscope, а також з використанням курвіметра через вимірювання довжини контура ампліконів на зображенні збільшеного масштабу. Обидва методи дали результати, що збігаються з точністю до 2,5 %.

На рис. 7 представлено графік розподілу контурної довжини амплікона, іммобілізованого на стандартній амінослюді. Контурна довжина цього амплікона $L = 435 \pm 15$ нм, що відповідає відстані між нуклеотидами вздовж осі спіралі $H = 3,10$ Å. Ці значення знаходяться в межах міжнуклеотидної відстані, характерної як для В-форми ДНК ($3,03 \text{ Å} < H < 3,37 \text{ Å}$), так і для А-форми ДНК ($2,56 \text{ Å} < H < 3,29 \text{ Å}$) [19]. У той же час контурна довжина цього ж амплікона, іммобілізованого на модифікованій амінослюді, дорівнювала 296 ± 14 нм, що відповідає відстані між нуклеотидами вздовж осі дуплексу $H = 2,09$ Å. Молекули ДНК із значно меншим значенням H (~ 2 Å) віднесено нами до нової форми ДНК — S-ДНК («S» — від англійського «spring» — пружина).

Таким чином, істотним фактором компактизації надссДНК може бути внутрішньомолекулярна перебудова самих молекул за рахунок екранування негативно заряджених фосфатних груп ДНК позитивно зарядженими групами модифікованої амінослюди [20], що веде до зменшення відстані між

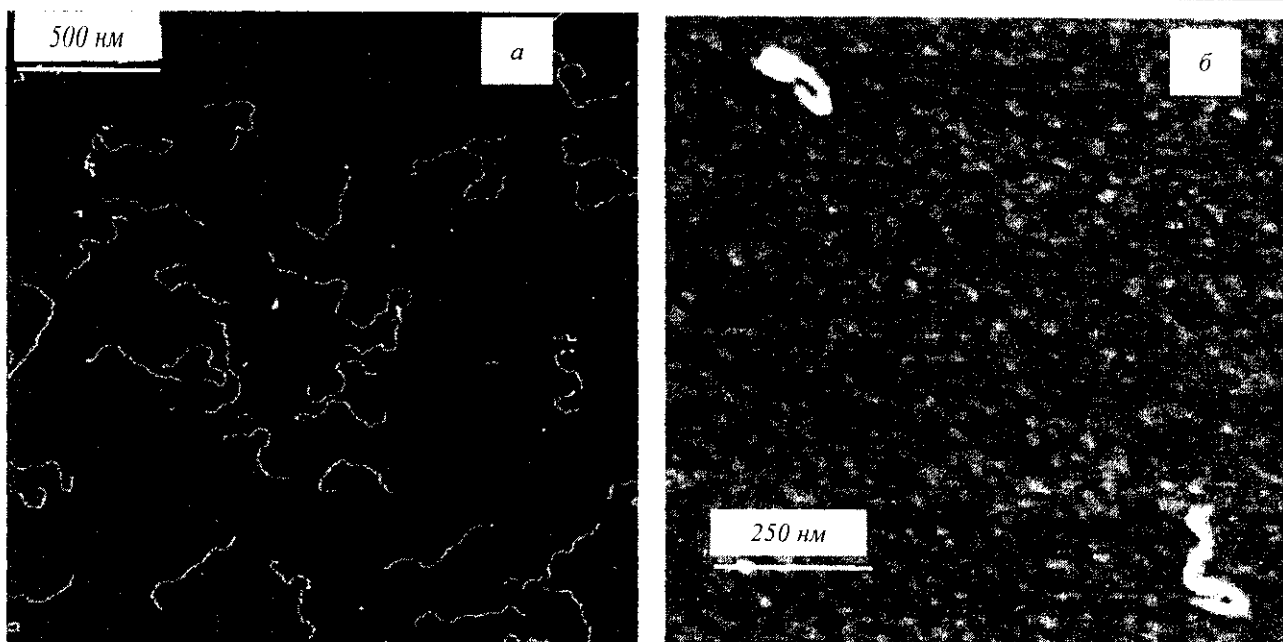


Рис. 6. Зображення ампліфікованого фрагмента ДНК *pGEMEX*, отримане за допомогою атомно-силової мікроскопії: *a* — свіжосколота слюда (розмір кадру $2,2 \times 2,2$ мкм; очікувана контурна довжина амплікона $L = 485$ нм у припущенні В-форми ДНК; контурна довжина амплікона, обчислена з АСМ зображення, $L = 435 \pm 15$ нм, що відповідає відстані між нуклеотидами вздовж осі подвійної спіралі $H = 3,07$ Å); *б* — модифікована амінослюда з підвищеною поверхневою щільністю заряду (протонованих аміногруп) (розмір кадру 1×1 мкм; контурна довжина амплікона, обчислена з АСМ зображення, $L = 296 \pm 14$ нм, що відповідає відстані між нуклеотидами вздовж осі дуплексу $H = 2,09$ Å)

нуклеотидами вздовж осі дуплексу. Отримані нами результати показують, що компактизація поодиноких молекул ДНК є можливою *in vitro* за відсутності білків, а необхідною умовою цього є висока поверхнева щільність позитивного заряду субстрату, на якому іммобілізовано суперспіральну ДНК. До речі, в попередніх дослідженнях методом рентгенівської фотоелектронної спектроскопії [21] показано, що лише 50 % аміногруп на поверхні стандартної амінослюди є активними (протонованими).

Цікаво відзначити, що свіжосколота слюда, яка має невеликий сумарний негативний заряд поверхні, значно впливає на властивості аміногруп АПТЕС, використаного для її модифікації. Якщо у водному розчині константа іонізації АПТЕС $pK \sim 10$ [22], то на поверхні слюди вона зменшується на ~ 3 од. рН і становить приблизно 7 [23, 24].

З іншого боку, під впливом поверхневих властивостей слюди може зменшуватися не тільки pK АПТЕС, а й pK нуклеотидів. Це означає, що азотисті основи за даних умов (тобто за умов іммобілізації ДНК на модифікованій амінослюді) можуть бути протонованими. На рис. 8 представлено АСМ зображення поодинокі ссДНК *pGEMEX*,

іммобілізованої на модифікованій амінослюді. Нами візуалізовано декілька таких незвичних молекул, фрагменти яких утворюють своєрідну сітку. Однією з причин появи наведеної структури може бути формування внутрішньомолекулярних триплексів, або Н-ДНК.

Відомо, що Н-ДНК утворюється для фрагментів пуринових/піримідинових послідовностей ДНК саме за рН ~ 4 у водному розчині, тобто за умови зниження рН на три одиниці від фізіологічного значення відбувається структурний перехід від В-ДНК до Н-ДНК [25]. А якраз на три одиниці рН зсуваються у бік кислих рН значення констант іонізації молекул, іммобілізованих на слюді. Аналогічну сітку молекул плазмідних ДНК, іммобілізованих на свіжосколотій слюді, візуалізовано у роботі [26] тільки для певного значення концентрації іонів Mg^{2+} . Ці результати свідчать, що ссДНК утворюють сітку лише у вузькому інтервалі величин як поверхневої щільності заряду слюди, так і концентрації ДНК.

Таким чином, використання модифікованої амінослюди з високим значенням поверхневої щільності заряду призводить до надзвичайної компактизації поодиноких суперспіральних молекул

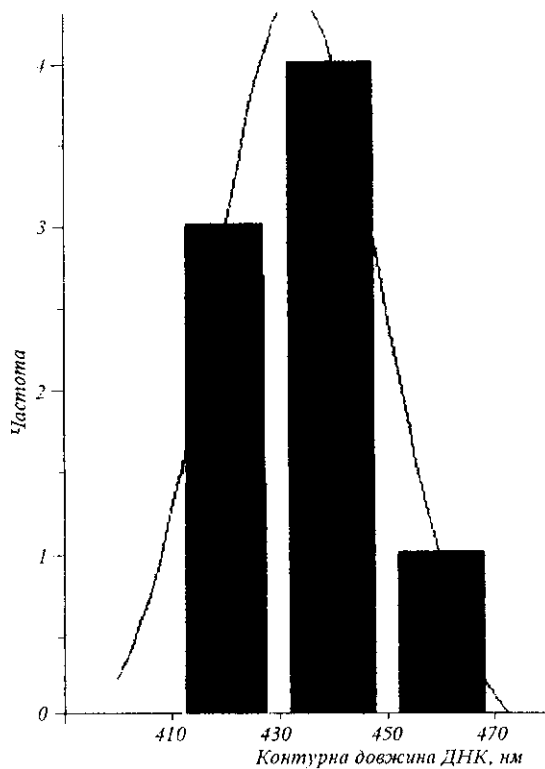


Рис. 7. Контурна довжина ампліконів після проведення ПЛР та наступного очищення, виміряна із АСМ зображення ДНК на свіжосколотій слюді. Лінія відображає Гаусів розподіл

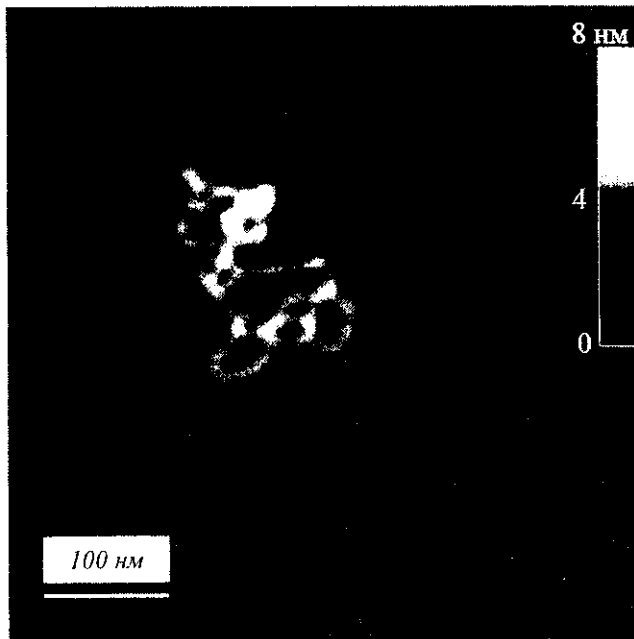


Рис. 8. АСМ зображення поодинокі молекули ссДНК рGEMEX на модифікованій амінослюді. Сегменти молекули утворюють своєрідну сітку. Розмір кадру 502×502 нм. Наведено шкалу градації сірого, яка відповідає діапазону Z координати 0—8 нм

ДНК. Внаслідок екранування негативних зарядів фосфатних груп ДНК позитивними зарядами протонуваних аміногруп модифікованої амінослюди в молекулах ДНК можуть відбуватися такі процеси: 1) зменшення відстані між нуклеотидами вздовж осі дуплексу та утворення S-ДНК; 2) формування внутрішньомолекулярних триплексів, або Н-ДНК. На основі аналізу вищенаведених результатів ми припустили, що за допомогою ссДНК, іммобілізованої на модифікованій амінослюді, можна моделювати процеси, що відбуваються з природними молекулами ДНК *in vivo*, оскільки в ядрі ДНК перебуває в середовищі з високою щільністю заряджених залишків різних молекул, у першу чергу, білків [27—30].

Роботу виконано за часткової підтримки Японського товариства сприяння науці (Токіо). Автори висловлюють щире подяку д-ру А. Сиволобу (Київський Національний університет імені Тараса Шевченка) за плідні дискусії та критичні зауваження при підготовці статті до друку.

O. Y. Limanskaya, L. O. Limanskaya, O. P. Lymunskii

Compaction of supercoiled DNA on modified aminomica

Summary

Stages of compaction of single molecules of supercoiled DNA pGEMEX, immobilized on modified aminomica, were visualized using atomic force microscopy. At the increase of the level of its compaction the length of molecule superhelix axis of the first order is decreased from ~ 580 nm down to ~ 370 nm with further formation of the superhelix axis of the second and third order with the length of ~ 260 nm and ~ 140 nm which makes $\sim 20\%$ and $\sim 10\%$ of outline length of the relaxed molecule respectively. Compaction of single molecules is completed with the formation of minitoroids, whose diameter is ~ 50 nm, and spheric conformation molecules. The model of possible conformational transitions of supercoiled DNA *in vitro* in the absence of proteins has been suggested. Compaction of supercoiled DNA molecules up to minitoroid level was shown to be caused by high surface charge density of aminomica on which DNA molecules were immobilized.

Key words: supercoiled DNA, atomic force microscopy, aminomica, DNA compactization, minitoroid, spheroid.

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

Компактизация суперспиральной ДНК на модифицированной аминослюде

Резюме

С помощью атомно-силовой микроскопии визуализированы этапы компактизации единичных молекул суперспиральной ДНК pGEMEX, иммобилизованных на модифицированной аминослюде. При повышении уровня компактизации ДНК длина суперспиральной оси первого порядка молекул уменьшается от ~ 580 до ~ 370 нм с последующим образованием оси суперспирали второго и третьего порядков длиной ~ 260 и ~ 140 нм

(~ 10 % от контурной длины релаксированной молекулы) соответственно. Компактизация единичных молекул завершается образованием минитороидов диаметром ~ 50 нм и молекул сферической конформации. Предложена модель возможных конформационных переходов суперспиральной ДНК *in vitro* в отсутствие белков. Показано, что компактизация суперспиральных молекул ДНК до уровня минитороидов и сфероидов обусловлена высокой поверхностной плотностью заряда аминокислоты, на которой иммобилизованы молекулы ДНК.

Ключевые слова: суперспиральная ДНК, атомно-силовая микроскопия, аминокислота, компактизация ДНК, тороид.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Kim J., Yoshimura S., Hizume K., Ohniwa R., Ishihama A., Takeyasu K. Fundamental structural units of the *Escherichia coli* nucleoid revealed by atomic force microscopy // Nucl. Acids Res.—2004.—32.—P. 1982—1992.
- Hizume K., Yoshimura S., Maruyama H., Kim J., Wada H., Takeyasu K. Chromatin reconstitution: development of a salt-dialysis method monitored by nanotechnology // Arch. Histol. Cytol.—2002.—65.—P. 405—413.
- Gonzalez-Huici V., Salas M., Hermoso J. Genome wide, supercoiling-dependent *in vivo* binding of a viral protein involved in DNA replication and transcriptional control // Nucl. Acids Res.—2004.—32.—P. 2306—2314.
- Yoshimura S., Hizume K., Murakami A., Sutani T., Takeyasu K., Yanagida M. Condensin architecture and interaction with DNA: regulatory non-SMC subunits bind to the head of SMC heterodimer // Curr. Biol.—2002.—12.—P. 508—513.
- Kemura K., Rybenkov V., Crison N., Hirano T., Cozzarelli N. 13S condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: implications for chromosome condensation // Cell.—1999.—98.—P. 239—248.
- Sato M., Ura K., Hohmura K., Tokumasu F., Yoshimura S., Hanaoka F., Takeyasu K. Atomic force microscopy sees nucleosome positioning and histone H1-induced compaction in reconstituted chromatin // FEBS Lett.—1999.—452.—P. 267—271.
- Golan R., Pietrasanta L., Hsieh W., Hansma H. DNA toroids: stages in condensation // Biochemistry.—1999.—38.—P. 14069—14076.
- Allen M., Bradbury E., Balhorn R. AFM analysis of DNA-protamine complexes bound to mica // Nucl. Acids Res.—1997.—25.—P. 2221—2226.
- Dunlap D., Maggi A., Soria M., Monaco L. Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery // Nucl. Acids Res.—1997.—25.—P. 3095—3101.
- Fang Y., Hoh J. Surface-directed DNA condensation in the absence of soluble multivalent cations // Nucl. Acids Res.—1998.—26.—P. 588—593.
- 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.
- Hud N., Downing K. Cryoelectron microscopy of λ phage DNA condensates in vitreous ice: the fine structure of DNA toroids // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—2001.—98.—P. 14925—14930.
- Lin C., Wang C., Feng X., Liu M., Bai C. The observation of the local ordering characteristics of spermidine-condensed DNA: atomic force microscopy and polarizing microscopy studies // Nucl. Acids Res.—1998.—26.—P. 3228—3234.
- Limansky A., Shlyakhtenko L., Schaus S., Henderson E., Lyubchenko Y. Aminomodified probes for atomic force microscopy // Probe microscopy.—2002.—2.—P. 227—234.
- Boles T., White J., Cozzarelli N. Structure of plectonemically supercoiled DNA // J. Mol. Biol.—1990.—213.—P. 931—951.
- Hansma H., Golan R., Hsieh W., Lollo C., Mullen-Ley P., Kwok D. DNA condensation for gene therapy as monitored by atomic force microscopy // Nucl. Acids Res.—1998.—26.—P. 2481—2487.
- Полянчик А., Чихиржина Е., Андрущенко В., Костылева Е., Wieser H., Воробьев В. Влияние ионов Ca^{2+} на компактизацию ДНК в комплексе с негистоновым хромосомным белком HMGBl // Молекуляр. биология.—2004.—38, № 4.—С. 701—712.
- Sivolob A., Prunell A. Nucleosome conformational flexibility and implications for chromatin dynamics // Phil. Trans. R. Soc. Lond. A.—2004.—362.—P. 1519—1547.
- Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.—М.: Мир, 1987.—584 с.
- Лиманский А. Атомно-силовая микроскопия: от визуализации молекул ДНК и белков до измерения силы межмолекулярных взаимодействий // Успехи соврем. биологии.—2003.—123, № 6.—С. 531—542.
- 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.—P. 568—576.
- Лиманский А. П. Исследование аминомодифицированной слюды как субстрата для атомно-силовой микроскопии нуклеиновых кислот // Біополімери і клітина.—2001.—17, № 4.—С. 292—297.
- Vezenov D., Noy A., Rozsnyai L., Lieber C. Force titrations and ionization state sensitive imaging of functional groups in aqueous solutions by chemical force microscopy // J. Amer. Chem. Soc.—1997.—119.—P. 2006—2015.
- Zhang H., He H., Wang J., Mu T., Liu Z. Force titration of amino group-terminated self-assembled monolayers using chemical force microscopy // Appl. Phys.—1998.—A66.—P. S269—S271.
- Lyamichev V., Mirkin S., Frank-Kameneskii M. Structure of $(dG)_n \cdot (dC)_n$ under superhelical stress and acid pH // J. Biomol. Struct. and Dynam.—1987.—5.—P. 275—282.
- Wu A., Li Z., Yu L., Wang H., Wang E. Plasmid DNA network on a mica substrate investigated by atomic force microscopy // Analyt. Sci.—2001.—17.—P. 583—584.

УДК 577.2:577.32

Надійшла до редакції 29.03.05