

Візуалізація комплексу ДНК з T7 РНК-полімеразою за допомогою атомно-силової мікроскопії

О. П. Лиманський

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

Лабораторія плазматичної мембрани та ядерного сигналіngu, Інститут біодосліджень
Кіотський університет, Кіото, 606-8502, Японія

o.lymunskiy@mail.ru

За допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ) візуалізовано комплекси РНК-полімерази (РНКП) бактеріофага T7 з ДНК-матрицею (яка містить промотор та термінатор транскрипції T7 РНКП) при проведенні транскрипції. На рівні пар поодиноких молекул отримано зображення як неспецифічних (сформованих молекулою T7 РНКП з кінцевими фрагментами ДНК-матриці), так і специфічних (утворених T7 РНКП з промотором та областю термінації транскрипції) комплексів. Обговорюється вплив параметрів транскрипції на комплексоутворення.

Ключові слова: атомно-силова мікроскопія, АСМ, транскрипція, T7 РНК-полімераза, термінатор, промотор, взаємодія білок—ДНК.

Вступ. Транскрипція — це процес, протягом якого РНК-полімераза (РНКП) утворює низку комплексів при скануванні ДНК-матриці. Спочатку формується нестабільний комплекс ініціації, внаслідок чого синтезуються короткі продукти перед очищенням промотору, а потім утворюється стабільний елонгаційний комплекс, який складається з РНКП, ДНК-матриці та РНК-транскрипта, який зростає [1]. За допомогою біохімічного аналізу та вивчення кінетики взаємодії мутантних РНКП з матрицею ДНК показано, що при переході від комплексу ініціації до комплексу елонгації утворюються як мінімум три типи перехідних комплексів. Перший складається з близько 3—5 нуклеотидів (н.), другий — з ~6—8 н., третій — з ~9—14 н. [2, 3].

РНК-полімерази можна розділити на два кла-

си: мультисубодиничні (бактерії, еукаріоти) та односубодиничні (деякі бактеріофаги, мітохондрії, хлоропласти). І хоча вони не характеризуються структурною гомологією та подібністю послідовностей, для РНКП обох класів основні етапи транскрипції відбуваються ідентично [4].

Транскрипція контролюється полімеразою протягом елонгації безпосередньо до паузи або термінації. По досягненні специфічних позицій на ДНК-матриці стабільний елонгаційний комплекс дисоціює у процесі термінації транскрипції. Зроблено припущення, що дисоціація не викликається термінацією негайно, їй передує інактивація елонгаційного комплексу [5]. Для T7 РНК-полімерази, найвивченішої полімерази серед класу РНКП, який складається з поодиноких субодиниць, знайдено два типи сигналів термінації або паузи. Сигнали І класу містять U-багатий елемент безпосередньо

нижче послідовності, що утворює GC-багату шпильку. Термінація на сайтах I класу залежить від можливості утворення молекулою РНК вторинної структури і відбувається навіть за умови видалення нематричного ланцюга ДНК [3]. Інший термінатор T7 РНКП належить до класу II та складається з консервативної послідовності довжиною 8 н. Як правило, пауза або термінація відбуваються на сайті, локалізованому нижче на 7–8 н. від зазначеного елемента. Проте деталі як ініціації транскрипції, так і її термінації доволі важко прояснити, використовуючи традиційні методи для розчинів, оскільки, по-перше, ініціація включає декілька швидкоплинних проміжних етапів між зв'язуванням промотору та елонгацією. По-друге, у кожний конкретний момент часу лише невелика частина молекул РНКП серед популяції РНКП, що активно беруть участь у транскрипції, зчеплена з ініціацією [6].

Більшість біохімічних досліджень ініціації транскрипції виконуються за таких експериментальних умов, які дозволяють вивчати лише фіксоване положення ферменту, коли РНКП зупиняється на відомій позиції ДНК-матриці через відсутність комплементарного нуклеотиду. Спроби синхронізувати ініціацію транскрипції для фракції молекул РНКП виявилися невдалими, оскільки синхронізація швидко руйнувалася через імовірносний характер переходів між проміжними етапами.

Відносно недавно було розвинено інший підхід до вивчення ініціації транскрипції, заснований на дослідженні зв'язування з промотором, ініціації та елонгації для поодинокі молекули РНКП у реальному часі. Цей метод ґрунтується на використанні молекули ДНК, яка обома кінцями з'єднана з двома кульками, що знаходяться в оптичних пастках. У той же час молекула ДНК перебувала поблизу поверхні, на якій локалізовані поодинокі іммобілізовані молекули T7 РНКП. Керуючи оптичною пасткою через осциляції кульки, до якої за один кінець була приєднана молекула ДНК, у роботі [6] спостерігали асоціацію та дисоціацію комплексу між T7 РНКП і промоторною ДНК з константою $K = 2,9 \text{ с}^{-1}$, перехід до елонгації з $K = 0,36 \text{ с}^{-1}$, синтез із швидкістю 43 нуклеотиди за 1 с та вихід РНК-транскрипта довжиною ~ 1200 н. Авторами показано, що перехід від ініціації до елонгації є значно тривалішим порівняно з часом існування бінарного комплексу T7 РНКП—промотор ДНК.

Для аналізу комплексів РНКП—ДНК, які утворюються при транскрипції, також з успіхом використано атомно-силову мікроскопію (АСМ) [7]. АСМ-візуалізація з високою роздільною здатністю білково-нуклеїнових комплексів дозволяє безпосередньо вивчати біологічні структури за умов, наближених до фізіологічних, а також за відсутності кристалізації. На відміну від традиційних мікроскопічних методів, які надають усереднену інформацію для масиву молекул, за допомогою АСМ можна отримувати дані щодо структури та функціонування поодиноких молекул. Крім того, значною перевагою АСМ у порівнянні з класичною електронною мікроскопією є відсутність відтінювання або фарбування при підготовці зразка. Для вивчення топографії поверхні біомакромолекул за допомогою АСМ необхідно лише, щоб молекули були адсорбовані на плоскому субстраті. Тому чималу кількість робіт присвячено АСМ-візуалізації комплексів білків, у тому числі і РНК-полімераз, з ДНК [7, 8].

У даній роботі оптимізовано умови проведення транскрипції *in vitro* для наступної АСМ-візуалізації комплексу, що утворює односубодична T7 РНК-полімераза з лінійною ДНК, яка містить промотор та область термінації транскрипції T7 РНКП. Візуалізовано як неспецифічні (утворені молекулою T7 РНКП з кінцевими фрагментами ДНК-матриці), так і високоспецифічні комплекси (насамперед з промотором), що формує T7 РНКП з поодинокими молекулами ДНК-матриці.

Матеріали і методи. Транскрипція. Як матрицю для транскрипції використано амплікон довжиною 1414 пар нуклеотидів (п. н.) з промотором A1 (один із 17 відомих промоторів, що містить геном бактеріофага T7) та областю термінації транскрипції T7 РНК-полімерази (рис. 1). ДНК-матрицю отримано за допомогою рестрикції ендонуклеазою *ScaI* («New England Biolabs», Велика Британія) суперспіральної ДНК *pGEMEX* («Promega», США) довжиною 3993 п. н. з наступною ампліфікацією та очищенням амплікона. Реакцію транскрипції проведено за наведеними нижче протоколами за допомогою наборів для транскрипції та T7 РНК-полімерази («Promega»), MegaScript T7 («Ambion», США) та набору від «New England Biolabs» за різних температурних і часових параметрів.

При цьому використано три буфери для транскрипції — буфер А («Promega»), буфер Б («Ambion») і буфер В [8]. Буфер А містив 40 мМ

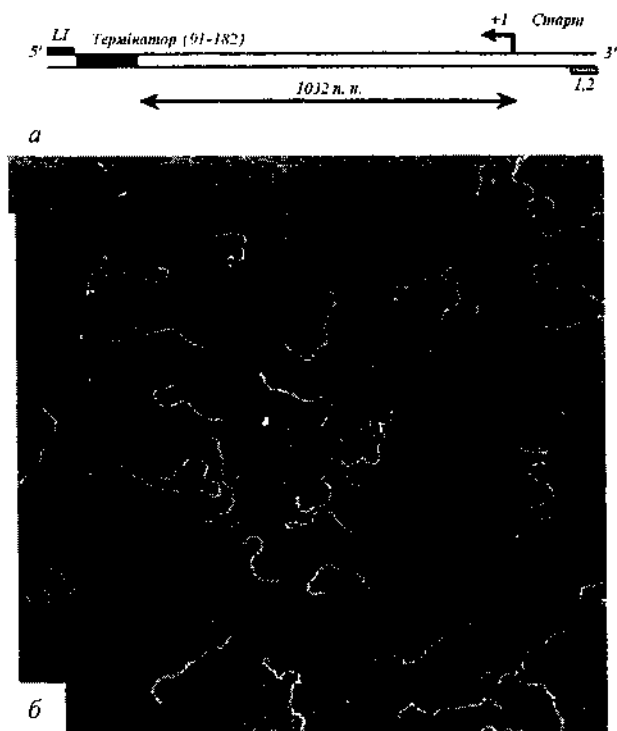


Рис. 1. Схематичне зображення матриці лінійної ДНК, використаної для проведення транскрипції (а) та її АСМ-зображення (б). Праймери L1 та L2, показані прямокутниками, фланкують фрагмент ДНК *pGEMEX* довжиною 1414 п. н., який містить промотор і термінатор транскрипції Т7 РНК-полімерази. Для візуалізації ДНК *pGEMEX* іммобілізували на свіжосколоту слюду у NEPERES буфері, який містив 2,5 мМ $MgCl_2$. Розмір кадру 2,23 мкм \times 2,23 мкм

трис-НСІ, рН 7,9, 6 мМ $MgCl_2$, 10 мМ NaCl, 10 мМ дитіотреїтол, 2 мМ спермідин, 0,05 % твін 20, 40 од. РНазину, 20 од. РНК-полімерази у загальному об'ємі 20 мкл. Реакцію транскрипції ініціювали додаванням нуклеотидів СТР, ГТР, УТР та АТР до кінцевої концентрації 200 мкМ.

Буфер В містив реакційну суміш для транскрипції, 40 од. РНазину, 20 од. РНК-полімерази, 20 мкМ СТР, ГТР, УТР та АТР у загальному об'ємі 20 мкл. Після 20–65 хв інкубації за температури 31 °С реакцію зупиняли нагріванням протягом 15 хв за температури 70 °С.

Буфер В вміщував 20 мМ трис-НСІ, рН 7,9, 5 мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl, 1 мМ дитіотреїтол, 40 од. РНазину, 20 од. РНК-полімерази у загальному об'ємі 20 мкл. Реакцію транскрипції ініціювали додаванням нуклеотидів СТР, ГТР, УТР та АТР до кінцевої концентрації 100 мкМ. Після 65 хв інкубації за температури 31 °С реакцію було зупинено швидким охолодженням до 0 °С.



Рис. 2. Аналіз РНК-транскриптів після проведення транскрипції з Т7 РНК-полімеразою на матриці фрагмента лінійної ДНК *pGEMEX* довжиною 1414 п. н. (доріжка 1) за денатурувальних умов у 1,2 %-му агарозному гелі з формальдегідом та контрольній плазміді *pTR1-Xef* довжиною 1890 п. н. (доріжка 2). Очікувана довжина транскриптів дорівнює 1032–1122 п. Реакцію проводили у буфері А («Promega») за температури 37 °С протягом 1 год згідно з рекомендаціями виробника

Для видалення матриці ДНК і деградації ДНК, що може контамінувати препарат РНК, після проведення транскрипції до реакційної суміші додавали 1 мкл ДНКази I, вільної від РНКаз («Ambion»), та інкубували протягом 15 хв за температури 37 °С. ДНКазу інактивували інкубуванням реакційної суміші за температури 70 °С протягом 10 хв. Ефективність транскрипції контролювали електрофорезом у 1,2 %-му агарозному гелі, що містив 1,8 % формальдегіду (рис. 2). Транскрипцію проводили в спеціальній кімнаті, призначеній для роботи з РНК, з використанням ультрачистої води, до якої додавали DEPC для пригнічення РНКаз. Потім для проведення електрофорезу за денатурувальних умов до реакційної суміші додавали рівний об'єм буфера для нанесення проби, який містив 90 % формаміду, 0,01 % ксиленціанолу, 0,01 % бромфенолового синього, 10 мМ ЕДТА та 0,01 % SDS. Для оцінки розміру РНК-транскриптів, які утворювалися після транскрипції на матриці ДНК

pGEMEX, використовували контрольну ДНК-матрицю *pTRI-Xef* з набору для проведення транскрипції MegaScript T7 («Ambion»). При проведенні транскрипції згідно з умовами виробника утворювалися лише повнорозмірні РНК-транскрипти довжиною 1890 н., для оцінки розміру яких, у свою чергу, використовували РНК-маркери G 319A («Promega»).

Атомно-силова мікроскопія. У роботі використано атомно-силовий мікроскоп Nanoscope IV MultiMode System («Veeco Instruments Inc.», США) з Е-сканером. АСМ-зображення ДНК записували за допомогою вібруючого варіанта АСМ на повітрі у режимі «висота» з використанням OMCL-AC160TS кантилеверів («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.»).

Підготовка зразків ДНК для ПЛР та комплексів Т7 РНКП—ДНК для АСМ. Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) сконструйовано праймери L1 та L2, що обмежували фрагмент ДНК *pGEMEX*, який містив промотор та область термінації транскрипції Т7 РНК-полімерази. Праймери L1 та L2, послідовності яких з відповідними позиціями на циркулярній ДНК *pGEMEX* наведено нижче, отримано від фірми «Sigma» (Японія):

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

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

ПЛР з гарячим стартом проведено в об'ємі реакційної суміші 50 мкл 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 — 71 °С, 1 хв; синтез—74 °С, 1 хв; кількість циклів — 35. Температуру відпалу визначали теоретично за допомогою програми Oligo.

Амплікони візуалізовано розділенням 15 мкл ПЛР-продукту за допомогою електрофорезу в 2 %-му агарозному гелі з наступним фарбуванням бромистим етидієм.

Для очищення ампліфікованого фрагмента ДНК використано наступну процедуру. Після проведення електрофорезу вирізали смугу гелю, що містить амплікон, опромінюючи гель довгохвильовим УФ-джерелом випромінювання низької інтен-

сивності («BioRad», США). Для подальшого очищення амплікона від нуклеотидів, праймерів, ДНК-полімерази та бромистого етидію застосовували набір QIAquick PCR purification kit («QIAGEN», Японія) відповідно до рекомендацій виробника, а також екстракцію фенол/хлороформом з наступним переосадженням етанолом.

ПЛР здійснено з використанням термостабільної ДНК-полімерази високої точності двох видів — Pyrobest ДНК-полімерази («TaKaRa Co.», Японія) та Invitrogen Platinum ДНК-полімерази («Invitrogen», Японія).

Для нанесення комплексів Т7 РНКП—ДНК на свіжосколоту слюду використано 10 мМ HEPES буфер, який містив 2,5 мМ MgCl₂, або буфер, для транскрипції, оскільки він також містив катіони магнію. На смугу слюди розміром 1 см² наносили краплю розчину об'ємом 10 мкл комплексу з молярним співвідношенням концентрацій Т7 РНКП і ДНК, яке варіювало в діапазоні 1—100, у ТЕ-буфері (10 мМ трис-НСІ, рН 7,9, 1 мМ ЕДТА), промивали після 2-хв експозиції ультрачистою водою, вільною від РНКаз, обдували потоком азоту та відразу візуалізували.

Концентрацію Т7 РНК-полімерази у вихідному розчині визначали спектральним аналізом за допомогою контрольного набору реагентів для визначення концентрації бичачого сироваткового альбуміну (БСА) (BSA Protein Assay Reagent, «Pierce», США). З побудованого калібрувального графіка залежності оптичної щільності від відомої концентрації БСА для трьох значень концентрації БСА було визначено концентрацію проміжного розчину Т7 РНК-полімерази, виходячи з виміряного значення поглинання. Концентрація вихідного розчину Т7 РНК-полімерази («Promega») дорівнювала $6,6 \cdot 10^6$ М; концентрація лінійної ДНК *pGEMEX*, використаної як матриця для транскрипції, — 200—800 пМ (амплікона) при АСМ-візуалізації. Для її визначення за допомогою спектрофотометрії вимірювали оптичну щільність і, отже, концентрацію вихідного розчину очищеного ПЛР-продукту. Комплекси готували, додаючи розчин Т7 РНК-полімерази до рівного за об'ємом розчину ДНК-матриці, який отримували методом послідовних розведень вихідного розчину амплікона.

Для візуалізації комплексу Т7 РНК-полімераза—ДНК співвідношення молярних концентрацій полімерази та ДНК варіювали в межах від 1 до 100. Відповідні розчини Т7 РНК-полімерази одер-

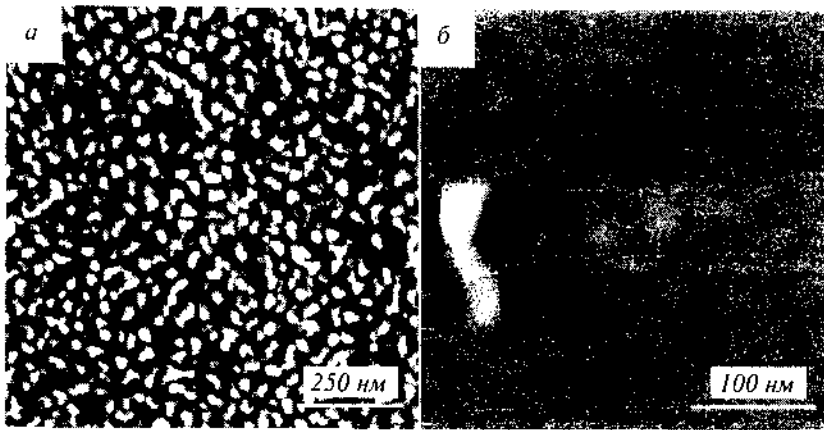


Рис. 3. АСМ-зображення РНК-транскриптів після проведення транскрипції з Т7 РНК-полімеразою на матриці лінійної ДНК *pGEMEX* довжиною 1414 п. н. та обробки ДНКазою I (очікувана довжина транскриптів дорівнює 1032–1122 н. Розмір кадру: а — 1×1 мкм; б — 315×315 нм)

жували методом послідовних розведень вихідного розчину.

Результати і обговорення. Для дослідження структури комплексів Т7 РНК-полімераза—ДНК за допомогою АСМ було використано іммобілізацію біомолекул на свіжосколоту слюду з додаванням іонів магнію. Контролем слугували АСМ-зображення молекул ДНК-матриці, адсорбованих на слюді (рис. 1, б), які мали невитягнуту форму і згладжені контури, їхні фрагменти рівномірно іммобілізувалися на поверхні субстрату.

Ефективність транскрипції контролювали за допомогою реакції з контрольною ДНК-матрицею — плазмідом *pTRI-Xef*, що містила промотор транскрипції Т7 РНКП, з набору MegaScript Т7 («Ambion»). РНК-транскрипти, які утворилися внаслідок транскрипції на плазміді *pTRI-Xef* та мали очікувану довжину 1890 н. (що було визначено після електрофорезу з РНК-маркерами («Promega»)), використовували, в свою чергу, як маркери молекулярної маси. Той факт, що в результаті транскрипції на матриці ДНК *pGEMEX* синтезуються РНК-транскрипти очікуваної довжини, підтверджує наявність відповідних смуг на електрофореграмі після електрофорезу за денатурувальних умов продуктів транскрипції з Т7 РНК-полімеразою (рис. 2).

Наявність на електрофореграмі двох смуг свідчить, на думку автора, про синтез РНК-транскриптів довжиною 1122 та 1032 н. (смуга вищої інтенсивності), що відповідають продуктам транскрипції з областю термінації та без області термінації транскрипції. Незважаючи на несинхронізованість реакційної системи, можна бачити, що після транскрипції утворюються лише повнорозмірні РНК-транскрипти та коротші транскрипти після зупинки на сайті термінації. Транскрипцію

можна розглядати як сканування високоточною РНК-полімеразою ДНК-матриці зі швидкістю ~ 40 н. за 1 с [5]. У процесі транскрипції можуть утворюватися і короткі РНК-транскрипти різної довжини, але їхня кількість є незначною порівняно з повнорозмірними РНК-транскриптами. Отже, чутливість візуалізації результатів транскрипції за допомогою електрофорезу є недостатньою для детекції цих коротких РНК-транскриптів. Підсумовуючи, варто зазначити, що ситуація з короткими РНК-транскриптами є подібною до синтезу в процесі ПЛР не тільки амплікона очікуваної довжини (ампліфікація якого відбувається у геометричній прогресії), а й ПЛР-продуктів більшого розміру, однак порівняно з ампліконом у значно меншій концентрації (які синтезуються в арифметичній прогресії), що через недостатню чутливість системи детекції не візуалізуються на електрофореграмі після електрофорезу.

У цій роботі головну увагу зосереджено на візуалізації комплексів Т7 РНКП—ДНК. Проте виявлено і РНК-транскрипти, що утворилися після проведення транскрипції (рис. 3). РНК-транскрипти були схожими на конденсовані структури, як і в інших дослідженнях з АСМ-візуалізації РНК, оскільки, на думку автора, для візуалізації витягнутих неконденсованих молекул РНК необхідно змінити поверхневі властивості субстрату (слюди).

Після додавання Т7 РНКП до транскрипційної суміші з ДНК-матрицею у процесі транскрипції формуються елонгаційні комплекси, які характеризуються типовими вигинами для комплексів ДНК—білок [8, 9]. На рис. 4 та 5 наведено АСМ-зображення фрагмента лінаризованої ДНК *pGEMEX* після транскрипції з Т7 РНК-полімеразою за різних температурних і часових умов та значного надлишку молекул Т7 РНК-полімерази.

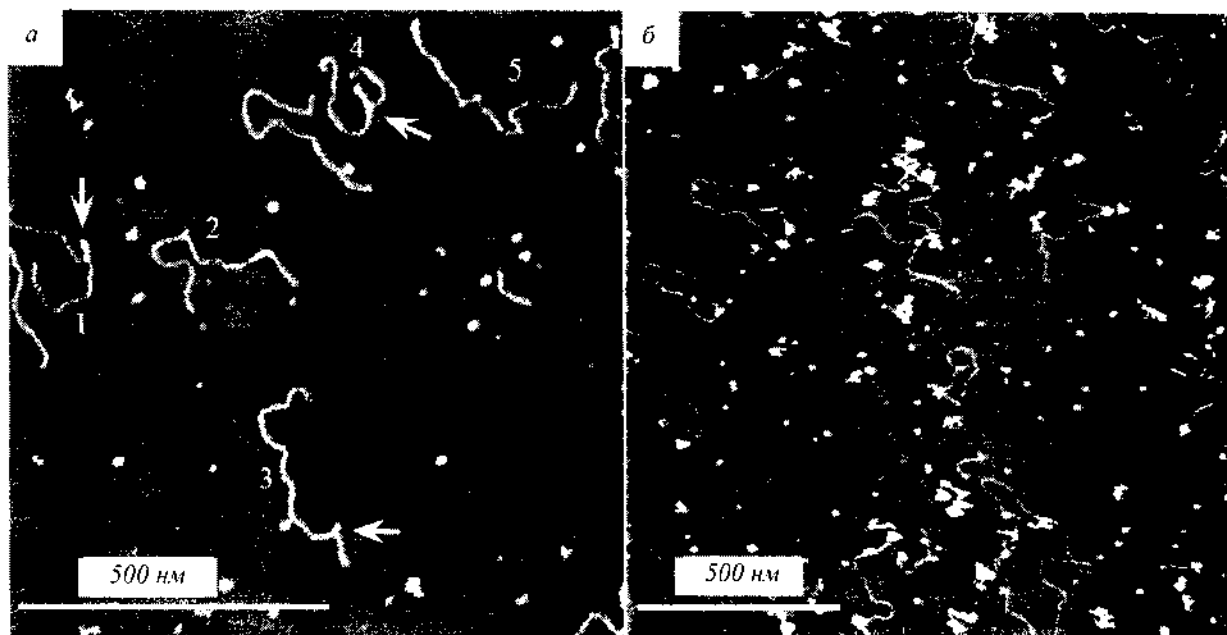


Рис. 4. АСМ-зображення фрагмента лінійної ДНК *pGEMEX* (1414 п. н.), використаної як матриця для транскрипції, та молекул Т7 РНК-полімерази (які виглядають, як білі крапки) після транскрипції протягом 60 хв у буфері А для транскрипції за кімнатної температури (аналогічно до умов [8]) (а) та протягом 65 хв за $T = 31^\circ\text{C}$ у буфері В для транскрипції (б); а — білими стрілками вказано закручені фрагменти ДНК-матриці, які виникли внаслідок комплексоутворення з молекулами Т7 РНКП, чорними — молекули Т7 РНКП, що утворили комплекси всередині ДНК-матриці; б — чорними стрілками показано молекули Т7 РНКП, які утворили комплекс з кінцями ДНК-матриці. Розмір кадру: а — 1×1 мкм; б — $1,48 \times 1,48$ мкм. Співвідношення молекул Т7 РНК-полімерази та ДНК становить 20

Звертає на себе увагу те, що молекулам ДНК у комплексі з Т7 РНКП притаманні наявність вигинів та утворення транскрипційних петель після транскрипції за кімнатної температури (рис. 4, а, рис. 5). У той же час за відсутності молекул Т7 РНКП вигини та петлі в лінійних молекулах ДНК *pGEMEX* на АСМ-зображеннях не проявляються (рис. 4, б [10]). Взагалі формування вигинів молекули ДНК, з одного боку, викликано комплексоутворенням з білками, а, з іншого, — вигини проявляються при візуалізації комплексів ДНК—білок, адсорбованих на поверхні слюди. Коротко цей ефект можна пояснити зміною щільності поверхневого заряду молекули ДНК при взаємодії з білком. Адсорбція молекул ДНК на поверхню рівномірно зарядженої слюди відбувається, в основному, за рахунок електростатичної взаємодії рівномірно негативно заряджених сайтів ДНК з позитивно зарядженими поверхневими групами слюди. В результаті такої взаємодії двох рівномірно заряджених поверхонь (ДНК і субстрату) молекули ДНК рівномірно іммобілізуються на поверхні субстрату. Це означає, що існує певне (емпіричним чином встановлене) співвідношення між поверхневими властивостями ДНК та поверхневими властивостями

ми субстрату, на якому іммобілізовані молекули ДНК.

Усе викладене вище дає підставу зробити висновок, що молекули ДНК характеризуються конформацією без вигинів тільки на слюді, яка має певне значення поверхневої щільності заряду. При зміні поверхневих властивостей субстрату молекули ДНК можуть бути витягнутими або стиснутими в процесі адсорбції на слюду. Вірним є і зворотнє: локальна зміна поверхневого заряду ДНК (як це має місце в процесі взаємодії з білком) негайно призведе до виникнення вигинів при іммобілізації на той же самий субстрат. У результаті електростатичної взаємодії ДНК з білком локальна поверхнева щільність негативного заряду фосфатних груп ДНК знижується і, отже, зменшуються сили відштовхування сусідніх фосфатних груп, які стабілізують структуру ДНК (поряд із стекінг-взаємодією пар основ) [11, 12]. Наслідком такої локальної зміни поверхневих властивостей ДНК в області зв'язування з білком є збільшення конформаційної рухливості ДНК при іммобілізації на слюду, що й спричинює виникнення візуалізованих на АСМ-зображеннях вигинів у сайтах взаємодії ДНК—білок.

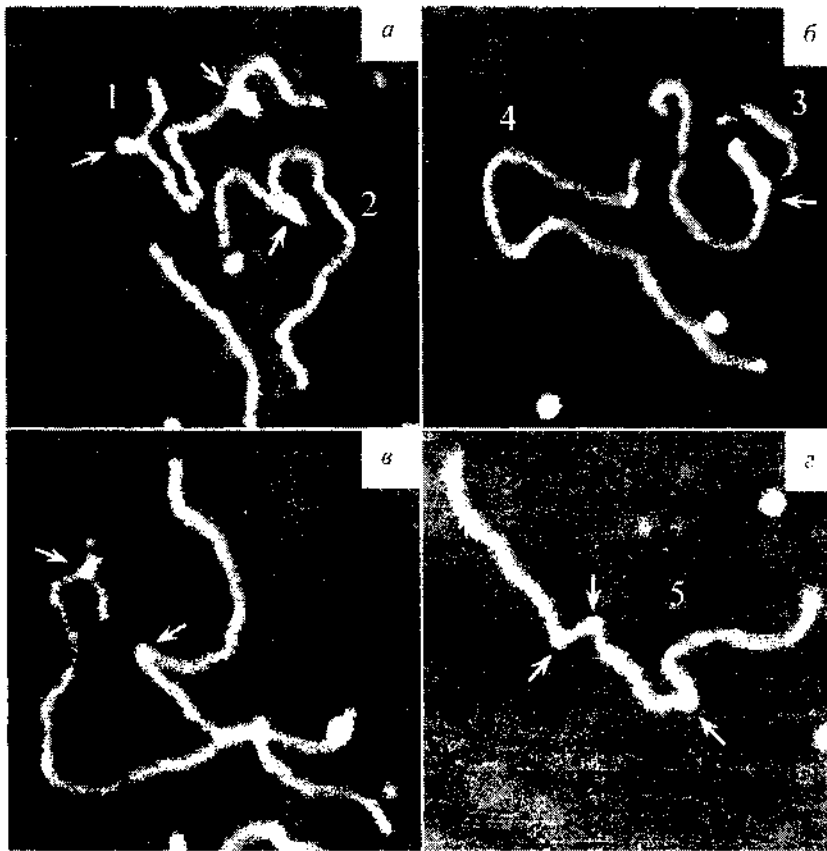


Рис. 5. АСМ-зображення з високою роздільною здатністю комплексів Т7 РНК-полімерази та ДНК-матриці. Молекули Т7 РНК-полімерази виглядають, як сфери діаметром близько 8 нм. Білі стрілки вказують на комплекси, утворені молекулою Т7 РНК-полімерази та ДНК, а чорні — на РНК-транскрипти. Транскрипцію проводили у буфері А за кімнатної температури протягом 60 хв (аналогічно до умов роботи [8]), після чого реакційну суміш негайно використовували для АСМ-візуалізації. Розмір кадру: а — 348×348 нм; б — 306×306 нм; в — 298×298 нм; г — 299×299 нм. Контурна довжина молекул становить: а — 445—450 нм; б — 454—457 нм

ДНК-матрицю для транскрипції сконструйовано таким чином, що вона містила промотор та область термінації транскрипції Т7 РНКП, які асиметрично локалізовані на кінцях амплікона довжиною 1414 п. н. Так, промотор транскрипції знаходиться у позиції 1212—1231 п. н. (тобто на відстані 200 п. н. від 3'-кінця матричного ланцюга ДНК), а внутрішній термінатор транскрипції Т7 РНКП — у позиції 91—182 п. н. (на відстані 90 п. н. від 5'-кінця матричного ланцюга ДНК). Оскільки в доступній літературі не було знайдено даних стосовно зазначеної області термінації, клонованої у векторі *pGEMEX*, постало питання виявлення сигналів термінації для Т7 РНКП, проаналізувавши послідовність термінатора транскрипції. За допомогою пакета прикладних програм GeneVee [13] виявлено шпилькову структуру з довжиною стебла (з одним неспареним нуклеотидом) 13 п. н., петлею розміром 3 н. та вільною енергією утворення шпильки $\Delta G = -16,4$ ккал/моль.

З АСМ-зображення, наведеного на рис. 4, а, можна бачити, що молекули ДНК з номерами від 1 до 4 утворили комплекси тільки з однією моле-

кулою Т7 РНКП, а з молекулою 5 зв'язалися три молекули полімерази. У той же час комплекси ДНК—Т7 РНКП для молекул 1, 3, 4 якісно відрізняються від таких для молекул 2 та 5, зв'язування з якими супроводжується формуванням характерних вигинів. Білими стрілками для молекул 1, 3, 4 показано фрагменти, які можна інтерпретувати як РНК-транскрипти (зазначимо, що в роботі [8] при досконалому аналізі наведених у статті АСМ-зображень подібного розміру кадру не знайдено жодного комплексу ДНК—РНКП, що містив би РНК-транскрипт, який зростає).

Важливою особливістю АСМ є те, що з АСМ-зображень за допомогою програмного забезпечення можна безпосередньо вимірювати контурну довжину молекул ДНК з достатньо високою роздільною здатністю. До речі, одним із перших застосувань АСМ було саме вимірювання контурної довжини ДНК [14].

Раніше у роботі [10] виміряно контурну довжину ДНК-матриці розміром 1414 п. н. після ампліфікації, яку в цій роботі використано для проведення транскрипції; значення її складало

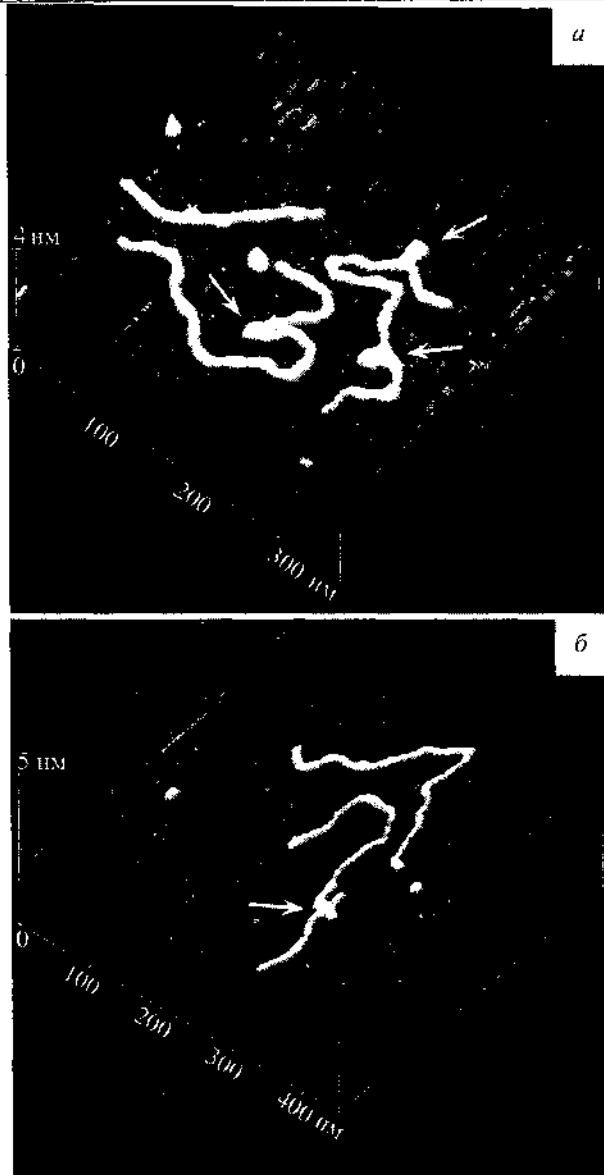


Рис. 6. АСМ-зображення з високою роздільною здатністю Т7 РНК-полімерази та ДНК-матриці після проведення транскрипції протягом 4 хв за $T = 37^\circ\text{C}$. Розмір кадру: а — 280×280 нм; б — 280×280 нм. Стрілка вказує на комплекс, утворений молекулою Т7 РНК-полімерази та ДНК. Після проведення транскрипції до 7 мкл реакційної суміші додавали 7 мкл буфера А та наносили на склоду

435 ± 15 нм. Контурна довжина молекул ДНК, які утворили комплекс з Т7 РНКП, також знаходиться в межах цього статистично достовірного значення — $445\text{—}457$ нм (рис. 5).

Розглянемо також детальніше візуалізовані нами комплекси, утворені Т7 РНК-полімеразою на обох кінцях амплікона. Для варіанта транскрипції за $T = 37^\circ\text{C}$ протягом 4 хв знайдено лише один тип комплексу (рис. 6) — молекула Т7 РНКП приєд-

нана до одного з кінців ДНК-матриці. Виміряна висота цього комплексу (рис. 6, б, показано стрілкою) безпосередньо з АСМ-зображення за допомогою побудови поперечного та подовжного перерізів (результатів не наведено) склала $\sim 0,5$ нм, що відповідає висоті поодинокі молекули Т7 РНКП. У той же час після проведення транскрипції за $T = 31^\circ\text{C}$ протягом 65 хв було візуалізовано два типи комплексів, локалізованих на обох кінцях ДНК-матриці (рис. 7), — комплекси Т7 РНКП і з промотором, і з термінатором. Висота іншого комплексу Т7 РНКП—ДНК, показаного чорною стрілкою на рис. 7, а, б, дорівнювала $0,93\text{—}1$ нм.

Варто зазначити, що при взаємодії молекули ДНК з Т7 РНКП утворюються специфічні та неспецифічні комплекси. Специфічне зв'язування (взаємодія з промотором) є відносно нечутливим до зміни іонної сили розчину, але воно залежить від конформації фрагмента ДНК. Неспецифічні комплекси ДНК—Т7 РНКП формуються за рахунок електростатичної взаємодії позитивно заряджених залишків полімерази з негативно зарядженими фосфатними групами ДНК. Неспецифічне зв'язування є надзвичайно чутливим до зміни іонної сили реакційної суміші, але є нечутливим до ступеня суперспіралізації ДНК. З аналізу властивостей неспецифічних і специфічних комплексів ДНК—РНКП у роботі [15] зроблено висновок, що головними складовими частинами механізму регуляції транскрипції бактеріофага Т7 є ефективність і швидкість утворення відкритого комплексу РНКП з промотором, а не зв'язування з різними промоторами, які входять до складу геному бактеріофага.

Структуру комплексу, утвореного Т7 РНК-полімеразою при транскрипції, інтенсивно вивчали у попередніх дослідженнях. Так, у роботі [16] за допомогою рентгенструктурного аналізу деталізовано кристалічну структуру елонгаційного комплексу Т7 РНК-полімерази з роздільною здатністю $2,9 \text{ \AA}$. Показано, що гібрид РНК—ДНК довжиною 8 п. н. вбудовується в активний центр ферменту, що спричинює значні перебудови амінокінцевого домену. Така перебудова включає альтернативне згортання близько 130 залишків та значну переорієнтацію (з поворотом на 130°) субдомену серцевини, внаслідок чого утворюється структура, яка забезпечує функціонування стабільного елонгаційного комплексу.

Хоча чимало даних опубліковано стосовно структури Т7 РНКП у комплексах ініціації та

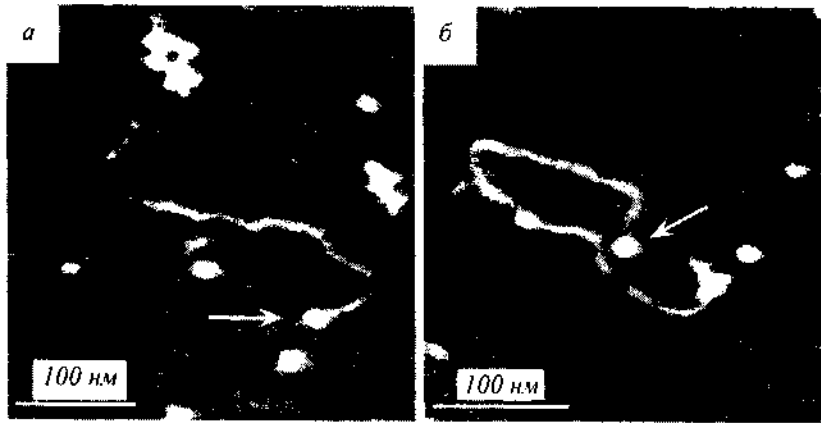


Рис. 7. АСМ-зображення комплексів ДНК—Т7 РНК-полімераза з високою роздільною здатністю, що утворилися після проведення транскрипції протягом 65 хв за $T = 31^\circ\text{C}$ у буфері В для транскрипції. Співвідношення молекул Т7 РНК-полімерази та ДНК становить 10. Білі стрілки вказують на комплекс Т7 РНК-полімерази з промотором, а чорні — на комплекс в області термінації транскрипції. Реакцію зупиняли швидким охолодженням до 0°C . Для АСМ-візуалізації транскрипційну суміш розводили у 10 разів НЕРЕС буфером. Розмір кадру: а — 338×338 нм; б — 297×297 нм

елонгації, результати вивчення цих комплексів за допомогою біохімічних методів неповністю збігаються з кристалографічною інформацією. Кінетичним аналізом ініціації та елонгації транскрипції для поодиноких молекул Т7 РНКП [4] виявлено, що етап ініціації триває протягом 4 с, а для синтезу РНК-транскрипта довжиною 1200 н. необхідно близько 30 с. Тому в нашому випадку часу при проведенні транскрипції протягом 4 хв цілком достатньо для синтезу РНК-транскриптів на ДНК-матриці довжиною 1414 п. н., яку використано в даній роботі. Однак при проведенні транскрипції протягом 4 хв (у буфері А) було візуалізовано лише комплекси, яким притаманне зв'язування з одним кінцем ДНК-матриці, подібні до варіанта, зображеного на рис. 6, б. У той же час при збільшенні часу транскрипції до 65 хв нами детектовано комплекси Т7 РНКП з обома термінальними фрагментами ДНК-матриці (рис. 7). На думку автора, комплекси, показані чорними стрілками на рис. 7, відповідають комплексу, утвореному Т7 РНКП з ДНК-матрицею в області термінації транскрипції. Можливо, що після елонгації на термінаці «зупиняються» одна за одною декілька молекул Т7 РНКП з відповідними РНК-транскриптами. На це вказує доволі великий розмір комплексу, а також присутність молекули Т7 РНКП всередині ДНК-матриці за наявності комплексів на обох термінальних сайтах ДНК-матриці.

Як правило, для стабілізації комплексу при термінації транскрипції реакцію проводять за середньої іонної сили (I) 75—80 мМ Na^+ та концентрації NTP 80—200 мкМ. У даній роботі транскрипцію здійснено саме за таких умов — $I = 80$ мМ Na^+ (для буферів А та В; для буфера Б виробник не розкриває складу реакційної суміші). Механізм

термінації РНКП фага Т7 є значно менш вивченим і зрозумілим порівняно з механізмом термінації клітинної РНКП *Escherichia coli*, оскільки, як вважають, більшість елонгаційних комплексів Т7 РНКП є занадто нестабільними і вони швидко дисоціюють навіть за умови зупинки РНКП за межами області термінації. Припускають також, що в разі зменшення іонної сили термінаційний комплекс при досягненні термінатора швидко дисоціює (протягом 5—15 с). Це є загальною особливістю внутрішніх термінаторів [17]. Крім того, цей комплекс дуже швидко дисоціює навіть за середніх значень іонної сили, у той час як для РНКП *E. coli* більшість елонгаційних комплексів, у тому числі й комплекси, що зупиняються на позиціях термінації транскрипції, є стабільними і можуть бути візуалізовані [8].

Візуалізацію досить великої кількості комплексів Т7 РНКП з кінцевими фрагментами ДНК-матриці можна пояснити, на думку автора, декількома обставинами. По-перше, саме на кінцях ДНК-матриці локалізовані промотор та область термінації транскрипції. Оскільки константа зв'язування для молекули Т7 РНКП з високоспецифічним сайтом промотору значно перевищує таку неспецифічного зв'язування (з будь-яким сайтом всередині ДНК-матриці) [15], то в умовах дисоціації комплексів Т7 РНКП—ДНК комплекс промотор—Т7 РНКП є найстабільнішим з утворюваних у процесах ініціації та термінації транскрипції. По-друге, час дисоціації комплексу Т7 РНКП—промотор значно більший за час переходу до комплексу елонгації; тому існує вища ймовірність візуалізації комплексу з промотором за інших рівних умов. По-третє, пауза та зупинка ферменту відбуваються в області термінації, що також статистично підвищує вірогід-

ність візуалізації комплексів з кінцевими фрагментами ДНК-матриці.

Ключовим результатом цього дослідження є безпосередня візуалізація комплексів, утворених Т7 РНКП з кінцевими фрагментами ДНК-матриці, а також з промотором та областю термінації транскрипції. Одержані дані дозволяють припустити, що процес сканування РНК-полімеразою починається з кінця ДНК-матриці, поряд з яким локалізовано промотор. Візуалізація декількох молекул Т7 РНКП у комплексі з ДНК-матрицею підтверджує результати роботи [18], у якій знайдено можливість об'єднання молекул РНКП у процесі елонгації транскрипції.

Вивчення комплексів, утворюваних РНКП при транскрипції, може бути важливим для розуміння резистентності РНКП до антибактеріальних препаратів, що широко дискутується в літературі. Зокрема, з точки зору майбутніх АСМ-досліджень, має сенс вивчення елонгаційних комплексів клінічних ізолятів *Mycobacterium tuberculosis*, РНКП яких є понад ніж у 1000 разів чутливішою до протитуберкульозного антибіотика рифампіцину порівняно з РНКП *E. coli* [19].

Одержані в роботі результати дозволяють сподіватися, що АСМ буде залишатися потужним та ефективним методом візуалізації макромолекулярних комплексів та вивчення міжмолекулярних взаємодій у комплексах ДНК—білок, особливо при проведенні досліджень не висушених зразків, а безпосередньо у буферному розчині за фізіологічних умов, сприяючи покращенню розуміння складних механізмів регуляції транскрипції.

Роботу частково підтримано грантом від Японського товариства сприяння науці, а також грантом від Академії медичних наук України.

Автор висловлює подяку О. Ю. Лиманській (Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН) за конструктивні дискусії та критичні зауваження при підготовці статті.

A. P. Limanskii

Visualization of DNA-T7 RNA polymerase complex by atomic force microscopy

Summary

Complexes of bacteriophage T7 RNA polymerase (RNAP) with DNA template, containing promoter and terminator of T7 RNAP, at transcription elongation were visualized by atomic force microscopy (AFM). Images for both nonspecific (formed by T7 RNAP molecule with end fragments of DNA template) and specific

(complexes of T7 RNAP with promoter and transcription termination area) were obtained for pairs of single molecules. The influence of transcription parameters on the complex formation is discussed.

Keywords: atomic force microscopy, AFM, transcription, T7 RNA polymerase, terminator, promoter, protein-DNA interaction.

A. P. Limanskii

Визуализация комплекса ДНК с Т7 РНК-полимеразой с помощью атомно-силовой микроскопии

Резюме

С использованием атомно-силовой микроскопии (АСМ) визуализированы комплексы РНК-полимеразы (РНКП) бактериофага Т7 с ДНК-матрицей (содержащей промотор и терминатор транскрипции Т7 РНКП) при проведении транскрипции. На уровне пар единичных молекул получены изображения как неспецифических (образованных молекулой Т7 РНКП с концевыми фрагментами ДНК-матрицы), так и специфических (сформированных Т7 РНКП с промотором и областью терминации транскрипции) комплексов. Обсуждается влияние параметров транскрипции на комплексообразование.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, АСМ, транскрипция, Т7 РНК-полимераза, терминатор, промотор, взаимодействие белок—ДНК.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ma K., Temiakov D., Jiang M., Anikin M., McAllister W. T. Major conformational changes occur during the transition from an initiation complex to an elongation complex by T7 RNA polymerase // *J. Biol. Chem.*—2002.—277.—P. 43206—43215.
2. Mentessana P. E., Chin-Bow S. T., Sousa R., McAllister W. T. Characterization of halted T7 RNA polymerase elongation complexes reveals multiple factors that contribute to stability // *J. Mol. Biol.*—2000.—302.—P. 1049—1062.
3. Mukherjee S., Sousa R. Discontinuous movement and conformational change during pausing and termination by T7 RNA polymerase // *EMBO J.*—2003.—22.—P. 6483—6493.
4. McAllister W. Transcription by T7 RNA polymerase // *Nucl. Acids Mol. Biol.*—1997.—11.—P. 15—25.
5. Skinner G., Baumann C., Quinn D., Molloy J., Hoggett J. Promoter binding, initiation, and elongation by bacteriophage T7 RNA polymerase // *J. Biol. Chem.*—2004.—279.—P. 3239—3244.
6. Scong G., Kobatake E., Miura K., Nakazawa A., Aizawa M. Direct atomic force microscopy visualization of integration host factor-induced DNA bending structure of the promoter regulatory region on the *Pseudomonas* TOL plasmid // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—2002.—291.—P. 361—366.
7. Guthold M., Bezanilla M., Erie D., Jenkins B., Hansma H., Bustamante C. Following the assembly of RNA polymerase-DNA complexes in aqueous solutions with the scanning force microscopy // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1994.—91.—P. 12927—12930.
8. Rivetti C., Codeluppi S., Dieci G., Bustamante C. Visualizing RNA extrusion and DNA wrapping in transcription elongation complexes of bacterial and eukaryotic RNA polymerases // *J. Mol. Biol.*—2003.—326.—P. 1413—1426.
9. Rees W., Keller R., Vesenka J., Yang C., Bustamante C. Evidence of DNA bending in transcription complexes imaged

- by scanning force microscopy // *Science*.—1993.—260.—P. 1646—1649.
10. Лиманский А. П. Визуализация ампликонов после проведения полимеразной цепной реакции // *Биофизика*.—2005.—50, № 6.—С. 1019—1024.
 11. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот: Пер. с англ.—М.: Мир, 1987.—584 с.
 12. Podesta A., Indrieri M., Brogioli D., Manning G., Milani P., Guerra R., Finzi L., Dunlap D. Positively charged surfaces increase the flexibility of DNA // *Biophys. J.*—2005.—89.—P. 2558—2563.
 13. Бродский Л. И., Драчев А. Л., Татузов Р. Л., Чумаков К. М. Пакет прикладных программ для анализа последовательностей биополимеров: GeneVec // *Биополимеры и клетка*.—1991.—7, № 1.—С. 10—14.
 14. Lyubchenko Y., Jacobs B., Lindsay S. Atomic force microscopy of reovirus dsRNA: a routine technique for length measurement // *Nucleic Acids Res.*—1992.—20.—P. 3983—3986.
 15. Smeekens S., Romano L. Promoter and nonspecific DNA binding by the T7 RNA polymerase // *Nucl. Acids Res.*—1986.—14.—P. 2812—2827.
 16. Tahirov T., Temiakov D., Anikin M., Patlan V., McAllister W., Vassilyev D., Yokoyama S. Structure of a T7 RNA polymerase elongation complex at 2.9 Å resolution // *Nature*.—2002.—420.—P. 43—50.
 17. Kashlev M., Komissarova N. Transcription termination: primary intermediates and secondary adducts // *J. Biol. Chem.*—2002.—277.—P. 14501—14508.
 18. Epstein V., Nudler E. Cooperation between RNA polymerase molecules in transcription elongation // *Science*.—2003.—300.—P. 801—805.
 19. Zenkin N., Kulbachinskiy A., Bass I., Nikiforov V. Different rifampin sensitivities of *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* RNA polymerases are not explained by the difference in the beta-subunit rifampin regions I and II // *Antimicrob. Agents Chemother.*—2005.—49.—P. 1587—1590.

УДК 577.2:577.32

Надійшла до редакції 26.05.06