

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.2: 577.32

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ЭЛОНГАЦИОННЫХ КОМПЛЕКСОВ Т7 РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2008 г. О. Ю. Лиманская^{1,3}, А. П. Лиманский^{1,2} *

¹Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова Академии медицинских наук Украины
Харьков, 61057, Украина

²Laboratory of Plasma Membrane and Nuclear Signaling, Graduate School of Biostudies
Kyoto University, Kyoto, 606-8502, Japan

³Национальный научный центр “Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины”
Харьков, 61023, Украина

Поступила в редакцию 23.08.2007 г.

Принята к печати 26.12.2007 г.

С помощью атомно-силовой микроскопии визуализированы комплексы, которые образует РНК-полимераза (РНКП) бактериофага Т7 с ДНК-матрицей при проведении транскрипции. В качестве матрицы для транскрипции использовали фрагмент линейаризованной ДНК рGEMEX длиной 1414 п.н., содержащий промотор и область терминирования транскрипции бактериофага Т7, локализованные асимметрично на противоположных концах ДНК-матрицы. На уровне единичных молекул получены изображения стабильных комплексов, образованных Т7 РНКП с концевыми фрагментами ДНК-матрицы. В условиях подавления неспецифического связывания визуализированы единичные молекулы ДНК-матрицы, с которыми образовали комплексы две-три молекулы Т7 РНКП, соответствующие этапам инициации, элонгации и терминирования транскрипции, а также комплексы, содержащие РНК-транскрипты. Наши результаты предполагают, что комплексообразование Т7 РНКП первоначально происходит с тем концевым фрагментом ДНК-матрицы, рядом с которым локализован промотор, для исключения возможности пропуска сайта промотора ферментом.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, АСМ, транскрипция, РНК-полимераза Т7, РНК-транскрипт.

VISUALIZATION OF ELONGATION COMPLEXES FOR T7 RNA POLYMERASE BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY, by O. Yu. Limanskaya^{1, 3}, A. P. Limanskiy^{1, 2*} (¹Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov, 61057 Ukraine; ²Laboratory of Plasma Membrane and Nuclear Signaling, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto, 606-8502 Japan; ³National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkov, 61023 Ukraine; *e-mail: o.lymunskiy@mail.ru). Complexes of bacteriophage T7 RNA polymerase (RNAP) with a DNA template for transcription elongation were visualized by atomic force microscopy (AFM). Fragment of pGEMEX linear DNA with length of 1414 bp carrying promoter and terminator of bacteriophage T7 was DNA template for transcription. Promoter and terminator are located unsymmetrically on the ends of DNA template. Images of stable complexes of T7 RNAP with terminal fragments of DNA template were obtained for single molecules. Complexes of a single DNA template molecule with 2–3 T7 RNAP molecules corresponding to stages of initiation, elongation and termination of transcription were visualized under the elimination of non-specific DNA-protein binding. Also complexes of DNA, RNAP and RNA transcripts were imaged. Our results suggest that the initial stage is the formation of complex between T7 RNAP and terminal fragment of DNA template. Because promoter is localized near DNA terminus, it makes impossible an omission of the promoter site.

Key words: atomic force microscopy, transcription, T7 RNA polymerase, RNA transcript.

Принятые сокращения: АСМ – атомно-силовая микроскопия; Т7 РНКП–Т7 РНК-полимераза; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

* Эл. почта: o.lymunskiy@mail.ru

Транскрипцию, являющуюся чрезвычайно важной стадией экспрессии генов, и ее регуляцию, рассматривают как последовательность трех этапов – инициации, элонгации и терминации. Получение новых данных о структуре элонгационных комплексов стало возможным с развитием микроскопической техники высокого разрешения.

Электронная микроскопия, а также атомно-силовая микроскопия (АСМ) позволили получить важную информацию о пространственной связи между ДНК, РНК и РНКП при транскрипционной элонгации, а именно о глобальной топологии открытого промотора и элонгационного комплекса. На основании экспериментальных исследований транскрипции эукариот и прокариот для комплекса элонгации предложена модель, при которой ДНК наматывается на фермент [1, 2]. В элонгационном комплексе наматывание ДНК на РНКП и образование гибрида РНК-ДНК вызывают раскрытие двойной спирали ДНК и образование транскрипционной петли. Однако не выяснено, каким образом РНК-полимераза синтезирует длинные фрагменты ДНК. Особенно много предположений высказано о движении РНКП вдоль ДНК *in vivo*, а именно: вращается ли РНКП вокруг ДНК или фермент находится в таком ротационно напряженном состоянии, что ДНК должна вращаться вокруг спиральной оси так, чтобы нить ДНК проходила через белок. Также интригующей проблемой остается визуализация растущих молекул РНК в процессе элонгации.

Отметим, что АСМ-визуализация с высокой разрешающей способностью белково-нуклеиновых комплексов позволяет непосредственно изучать биологические структуры в условиях, приближенных к физиологическим (в частности, в отсутствие кристаллизации). В отличие от традиционных микроскопических методов, которые предоставляют усредненную информацию для массива молекул, с помощью АСМ возможно получать данные о структуре и функционировании единичных молекул. Чтобы изучить топографию поверхности биомолекул с помощью АСМ, необходимо только, чтобы молекулы были адсорбированы на плоском субстрате. Поэтому АСМ-визуализации комплексов белков, в том числе и РНК-полимераз, с ДНК посвящено немало работ [1, 3].

Важной особенностью элонгационных комплексов, образующихся при транскрипции (ДНК-РНК-полимераза-РНК-транскрипт), является то, что после окончания транскрипции элонгационный комплекс быстро диссоциирует. При этом скорость диссоциации для бактериальной Т7 РНК-полимеразы значительно выше по сравнению с эукариотическими полимеразми. Указанный факт существенно усложняет визуализацию как целого элонгационного комплекса, так и отдельных РНК-транскриптов. Поэтому для АСМ-визуализации элонгационного комплекса часто используют ДНК-матрицы, после-

довательность нуклеотидов которых синтезируют таким образом, что транскрипция останавливается в определенных позициях [1]. В данной работе применен другой подход для предотвращения быстрой диссоциации элонгационного комплекса, а именно: мы использовали ДНК-матрицу, содержащую на расстоянии 1122 п.н. от сайта инициации транскрипции область терминации транскрипции Т7 РНК-полимеразы. Эффективность терминации транскрипции можно регулировать, она зависит от концентрации компонентов реакционной смеси, ионной силы и рН буфера для транскрипции и может достигать 70-80%.

В данной работе оптимизированы условия проведения транскрипции *in vitro* для последующей АСМ-визуализации комплекса, который образует одно-субъединичная РНК-полимераза бактериофага Т7 с линейной ДНК, содержащей промотор и область терминации транскрипции Т7 РНКП. На эффективность транскрипции влияет несколько факторов – температурные и временные параметры реакции, концентрация компонентов, ионная сила раствора. Нами визуализированы комплексы Т7 РНКП-ДНК после проведения транскрипции при разных температурных и временных параметрах, а также с использованием нескольких буферов для транскрипции, отличающихся составом и концентрацией компонентов.

Получены изображения как терминальных (образованных молекулой Т7 РНКП с концевыми фрагментами ДНК-матрицы), так и специфичных комплексов (прежде всего с промотором), которые образует Т7 РНКП с единичными молекулами ДНК-матрицы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Проведение транскрипции. В качестве матрицы для транскрипции использовали ампликон длиной 1414 п.н., содержащий промотор А1 (один из 17 известных промоторов, который содержит геном бактериофага Т7) и область терминации транскрипции Т7 РНК-полимеразы. ДНК-матрица получена с помощью рестрикции эндонуклеазой ScaI (New England Biolabs, Англия) суперспиральной ДНК pGEMEX (“Promega”, США) длиной 3993 п.н. с последующей амплификацией и очисткой ампликона. Реакцию транскрипции проводили согласно нижеприведенным протоколам с использованием наборов для транскрипции с помощью Т7 РНК-полимеразы (“Promega”, США), MegaScript Т7 (“Ambion”, США) и набора от New England Biolabs (Англия) при разных температурных и временных параметрах.

ДНК-матрица для транскрипции сконструирована таким образом, что она содержала промотор и область терминации транскрипции Т7 РНКП, которые асимметрично локализованы на концах ампликона длиной 1414 п.н. Так, промотор транскрипции

находится в позиции 1212–1231 п.н. (т.е. на расстоянии 200 п.н. от 3'-конца матричной нити ДНК), а внутренний терминатор транскрипции T7 РНКП – в позиции 91–182 п.н. (т.е. на расстоянии 90 п.н. от 5'-конца матричной цепи ДНК).

Использованы три буфера для транскрипции – буфер А (“Promega”, США), буфер Б (“Ambion”, США) и буфер В [1]. Буфер А содержал 40 мМ Трис-НСl (рН 7.9), 6 мМ MgCl₂, 10 мМ NaCl, 10 мМ дитиотритол, 2 мМ спермидин, 0.05% твин 20, 40 ед. РНазина, 20 ед. РНК-полимеразы в общем объеме 20 мкл. Реакцию транскрипции инициировали добавлением нуклеотидов до конечной концентрации 200 мкМ СТР, GTP, UTP и АТР.

Буфер Б содержал реакционную смесь для транскрипции (“Ambion”, США), 40 ед. РНазина, 20 ед. РНК-полимеразы, 20 мкМ СТР, GTP, UTP и АТР в общем объеме 20 мкл. После 20–65 мин инкубации при температуре 31°C реакцию останавливали нагреванием в течение 15 мин при температуре 70°C.

Буфер В содержал 20 мМ Трис-НСl (рН 7.9), 5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 1 мМ дитиотритол, 40 ед. РНазина, 20 ед. РНК-полимеразы в общем объеме 20 мкл. Реакцию транскрипции инициировали добавлением нуклеотидов до конечной концентрации 100 мкМ СТР, GTP, UTP и АТР. После 65 мин инкубации при температуре 31°C реакцию останавливали быстрым охлаждением до 0°C.

Для удаления матрицы ДНК и деградации ДНК, которая может контаминировать препарат РНК, после проведения транскрипции к реакционной смеси добавляли 1 мкл ДНКазы I, свободной от РНКаз (“Ambion”, США), и инкубировали в течение 15 мин при температуре 37°C. Реакционную смесь для инактивации ДНКазы инкубировали при температуре 70°C в течение 10 мин. Чтобы проконтролировать эффективность транскрипции, проводили электрофорез в 1.2%-ном агарозном геле, содержащем 1.8% формальдегида. Транскрипцию проводили в специальной комнате, предназначенной для работы с РНК, с использованием ультрачистой воды, обработанной диэтилдикарбонатом для ингибирования РНКаз.

О том, что в результате транскрипции синтезируются РНК-транскрипты ожидаемой длины, свидетельствовало наличие соответствующей полосы на электрофореграмме после проведения электрофореза в денатурирующих условиях продуктов транскрипции с T7 РНК-полимеразой.

При проведении электрофореза в денатурирующих условиях к реакционной смеси добавляли равный объем буфера для нанесения пробы, который содержал 90% формамида, 0.01% ксиленианола, 0.01% бромфенолового синего, 10 мМ EDTA и 0.01% SDS. Чтобы оценить размер РНК-транскриптов, образующихся после проведения транскрипции на матрице ДНК рGEMEX, использовали контрольную ДНК-матрицу рTRI-Xef из набора для проведе-

ния транскрипции MegaScript T7 (“Ambion”, США). При проведении транскрипции согласно условиям производителя образовывались только полноразмерные РНК-транскрипты длиной 1890 н., для оценки размера которых, в свою очередь, использовали РНК-маркеры G 319A (“Promega”, США).

Атомно-силовая микроскопия. В работе использовали атомно-силовой микроскоп Nanoscope IV MultiMode System (“Veeco Instruments Inc.”, США) с Е-сканером. АСМ-изображения ДНК записывали с помощью вибрирующего варианта АСМ в воздухе в режиме “высота” с использованием OMCL-AC160TS кантиллеров (“Olympus Optical Co.”, Япония) с резонансной частотой 340–360 кГц и константой жесткости 42 Н/м. Изображения получены в формате 512 × 512 пикселей, сглажены и проанализированы с помощью программного обеспечения Nanoscope (версия 5.12r3) (“Veeco Instruments Inc.”, США).

Визуализация комплексов T7 РНК-полимераза-ДНК. Использована иммобилизация биомолекул на свежесколотую слюду из буфера, содержащего ионы магния. В качестве контроля служили АСМ-изображения адсорбированных на слюде молекул ДНК-матрицы – они имели невытянутую форму, сглаженные контуры, их фрагменты равномерно иммобилизованы на поверхности субстрата.

Подготовка образцов ДНК для ПЦР и комплексов T7 РНКП-ДНК для АСМ. Нами сконструированы для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) праймеры L1 и L2, ограничивающие фрагмент ДНК рGEMEX, который содержал промотор и область терминации транскрипции T7 РНК-полимеразы. Праймеры L1 и L2, последовательности которых с соответствующими позициями на кольцевой ДНК рGEMEX приведены ниже, получены от фирмы “Sigma” (Япония):

5'-cgc tta caa ttt cca ttc gcc att c-3' прямой праймер L1 (3748–3772)

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

ПЦР с горячим стартом проводили в объеме реакционной смеси 50 мкл на амплификаторе GeneAmp 9700 (“Perkin Elmer”, США) при следующих температурных и временных параметрах: начальная инкубация – 95°C, 2 мин; денатурация – 95°C, 1 мин; отжиг – 71°C, 1 мин; синтез – 74°C, 1 мин; количество циклов – 35. Температуру отжига определяли теоретически с помощью программы Oligo [4].

Визуализация ампликонов: 15 мкл ПЦР-продукта разделяли с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием.

Очистка амплифицированного фрагмента ДНК: после проведения электрофореза вырезали полоску геля, содержащую ампликон, облучая гель длинноволновым УФ-источником излучения низкой интенсивности (“BioRad”, США). Далее ампликон очища-

ли от нуклеотидов, праймеров, ДНК-полимеразы и бромистого этидия с использованием набора QIAquick PCR purification kit (“QIAgen”, Япония) согласно рекомендациям производителя, а также проводили экстракцию фенол/хлороформом с последующим переосаждением этанолом.

При проведении ПЦР использовали термостабильную ДНК-полимеразу высокой точности двух видов – Pyrobest ДНК-полимеразу (“TaKaRa Co.”, Япония) и Invitrogen Platinum ДНК-полимеразу (“Invitrogen”, Япония).

Чтобы нанести комплекс Т7 РНКП-ДНК на свежесколотую слюду, использовали 10 мМ HEPES буфер, который содержал 2.5 мМ $MgCl_2$, или буфер, в котором проводили транскрипцию, поскольку он также содержал катионы магния. На полоску слюды размером 1 см² наносили каплю раствора объемом 10 мкл комплекса с молярным соотношением концентраций Т7 РНКП и ДНК, изменяющимся от 1–100, в ТЕ-буфере (10 мМ Трис-НСl рН 7.9, 1 мМ EDTA), промывали после двухминутной экспозиции ультрачистой водой, свободной от РНКаз, обдували потоком азота и сразу проводили визуализацию.

Концентрацию Т7 РНК-полимеразы в исходном растворе определяли с помощью спектрофотометрии. Концентрация исходного раствора Т7 РНКП (Promega) составляла 6.6×10^{-6} М, а концентрация использованной в качестве матрицы для транскрипции линейной ДНК рGEMEX – 200–800 пМ (ампликона) при АСМ-визуализации. Концентрацию исходного раствора очищенного ПЦР-продукта измеряли спектрофотометрически. Комплексы готовили добавлением раствора Т7 РНК-полимеразы к равному по объему раствору ДНК-матрицы, который получали методом последовательных разведений исходного раствора ампликона. При визуализации комплекса Т7 РНК-полимераза–ДНК соотношение молярных концентраций полимеразы и ДНК изменяли от 1 до 100. Соответствующие растворы Т7 РНК-полимеразы готовили методом последовательных разведений исходного раствора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

АСМ-изображения молекул ДНК-матрицы или ампликона, иммобилизованных на свежесколотой слюде в HEPES-буфере, а также комплекса ДНК–Т7 РНКП без проведения транскрипции использованы в качестве контроля. В отсутствие молекул Т7 РНКП изгибы и петли в линейных молекулах ДНК рGEMEX на АСМ-изображениях не проявляются. Важной особенностью АСМ является то, что на АСМ-изображениях с помощью программного обеспечения можно непосредственно измерять контурную длину молекул ДНК с достаточно высокой точностью. Кстати, одним из первых применений АСМ было именно измерение контурной длины ДНК [5]. С помощью построенных графиков Гаус-

сова распределения контурной длины ампликонов, измеренной непосредственно на АСМ-изображениях, нами определена контурная длина ДНК-матрицы при различных условиях. Так, для молекул ДНК, иммобилизованных на слюде из буфера А, содержащего дикатионы магния и трехвалентные катионы спермидина, контурная длина составила 480 ± 20 нм. Это значение хорошо согласуется с теоретически рассчитанной контурной длиной исследуемой ДНК-матрицы (длиной 1414 нм), которая в предположении В-формы равняется 480 нм ($L = 1414$ п.н. $\times 0.34$ нм).

После добавления Т7 РНКП к транскрипционной смеси с ДНК-матрицей в процессе транскрипции формируются элонгационные комплексы, которые характеризуются типичными изгибами для комплексов ДНК–белок [1, 6, 7]. На АСМ-изображениях, приведенных на рис. 1а и 1б, видно, что молекулы ДНК с номерами 2 и 3 образовали комплексы только с одной молекулой Т7 РНКП, а с молекулой 1 и представленными на рис. 1в и 2 связались три молекулы полимеразы. У ДНК-матрицы, образовавшей комплекс с одной молекулой Т7 РНКП в буфере А для транскрипции (без проведения транскрипции), контурная длина составляла 456 ± 13 нм. В случае ДНК-матрицы, в комплексеобразовании с которой участвовали две молекулы Т7 РНКП, зафиксировано дальнейшее уменьшение контурной длины – 448 ± 30 нм.

Уменьшение контурной длины ДНК, образовавшей комплекс с Т7 РНКП, может быть объяснено наматыванием молекулы ДНК на молекулу РНК-полимеразы. Соответствующая модель предложена Студитским и соавт. [8]. Наматывание ДНК на молекулу РНКП должно приводить к уменьшению контурной длины ДНК, что и показано для *E. coli* РНКП в работе [1]. В этой работе с помощью АСМ визуализировали элонгационные комплексы РНКП с ДНК-матрицей с использованием методики остановки транскрипции на определенных сайтах и пришли к выводу, что молекула ДНК действительно наматывается на молекулу РНКП.

В то же время комплексы ДНК–Т7 РНКП для молекул на рис. 1а–в качественно отличаются от комплексов для молекулы на рис. 1г, связывание с которой сопровождается формированием характерных изгибов. Черными стрелками для молекул на рис. 1а–1в показаны фрагменты, которые можно интерпретировать как РНК-транскрипты (отметим, что при тщательном анализе приведенных в статье [1] АСМ-изображений подобного размера кадра нами не найдено ни одного комплекса ДНК–РНКП, который содержал бы растущий РНК-транскрипт). Впрочем, тщательный анализ АСМ-изображения молекулы 3 на рис. 1в с более высоким разрешением, построение поперечных сечений фрагментов молекул (рис. 2), а также их реконструированные трехмерные изображения (рис. 3) позволяют

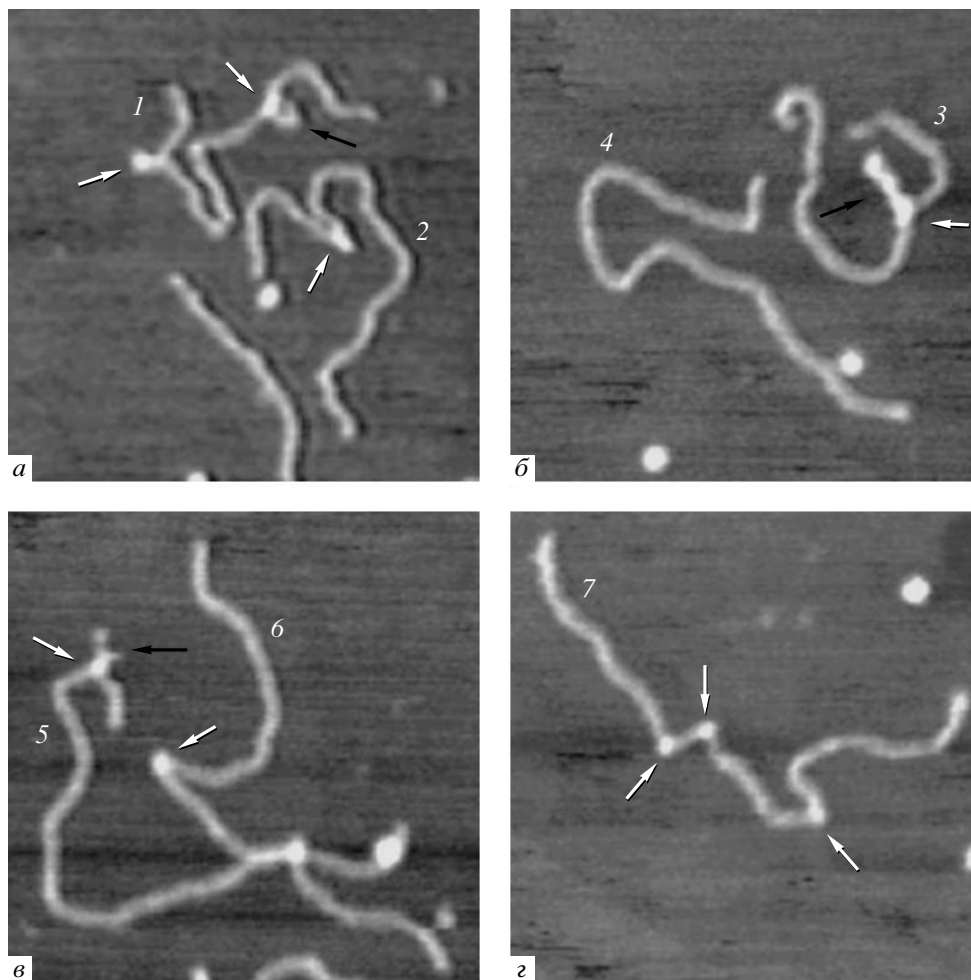


Рис. 1. АСМ-изображение с высоким разрешением комплексов T7 РНКП и ДНК. Молекулы T7 РНКП выглядят как сферы диаметром около 8 нм. Белые стрелки показывают на комплексы, образованные молекулами T7 РНКП и ДНК, черные – на РНК-транскрипт (а, в) и закрученный фрагмент ДНК-матрицы (б). Транскрипцию проводили в буфере А при комнатной температуре в течение 60 мин, после чего реакционную смесь немедленно использовали для АСМ-визуализации. Размер кадра: а – 348 нм × 348 нм; б – 306 нм × 306 нм; в – 298 нм × 298 нм; г – 299 нм × 299 нм. Контурная длина молекул составляет: а – 445–450 нм, б – 454–457 нм.

предположить, что указанный фрагмент молекулы 3 на рис. 1в может относиться к ДНК-матрице.

Отметим, что высота молекулы ДНК, адсорбированной на поверхности слюды, измеренная с помощью АСМ, равна 0.3–0.5 нм. На АСМ-изображении молекулы T7 РНКП, молекулярная масса которых составляет 98.8 кДа, выглядят как сферы диаметром около 8 нм. Высота комплекса ДНК–T7 РНКП составляет от 0.6 нм (рис. 2а, б) до 1 нм (рис. 2в, г). Длина молекулы 3 с закрученным фрагментом (который показан черной стрелкой на рис. 1б) составляет 457 нм, что указывает на то, что визуализированный фрагмент является частью ДНК-матрицы, а не РНК-транскриптом. Кроме того, высота узлов, образовавшихся при закручивании двухнитевой ДНК, равна 0.8 нм (рис. 2г), что также совпадает с высотой уз-

лов закрученной ДНК, иммобилизованной на слюде [9].

Важно, что при взаимодействии молекулы ДНК с T7 РНКП образуются специфичные и неспецифичные комплексы. Специфичное связывание (взаимодействие с промотором) является относительно нечувствительным к изменению ионной силы раствора, но оно зависит от конформации фрагмента ДНК. Неспецифичные комплексы ДНК–T7 РНКП формируются за счет электростатического взаимодействия положительно заряженных остатков полимеразы с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК. Неспецифичное связывание является чрезвычайно чувствительным к изменению ионной силы реакционной смеси, но нечувствительным к степени суперспирализации ДНК. На основании анализа свойств неспецифичных и специфичных комплексов ДНК–РНКП в работе [10] сделан вывод,

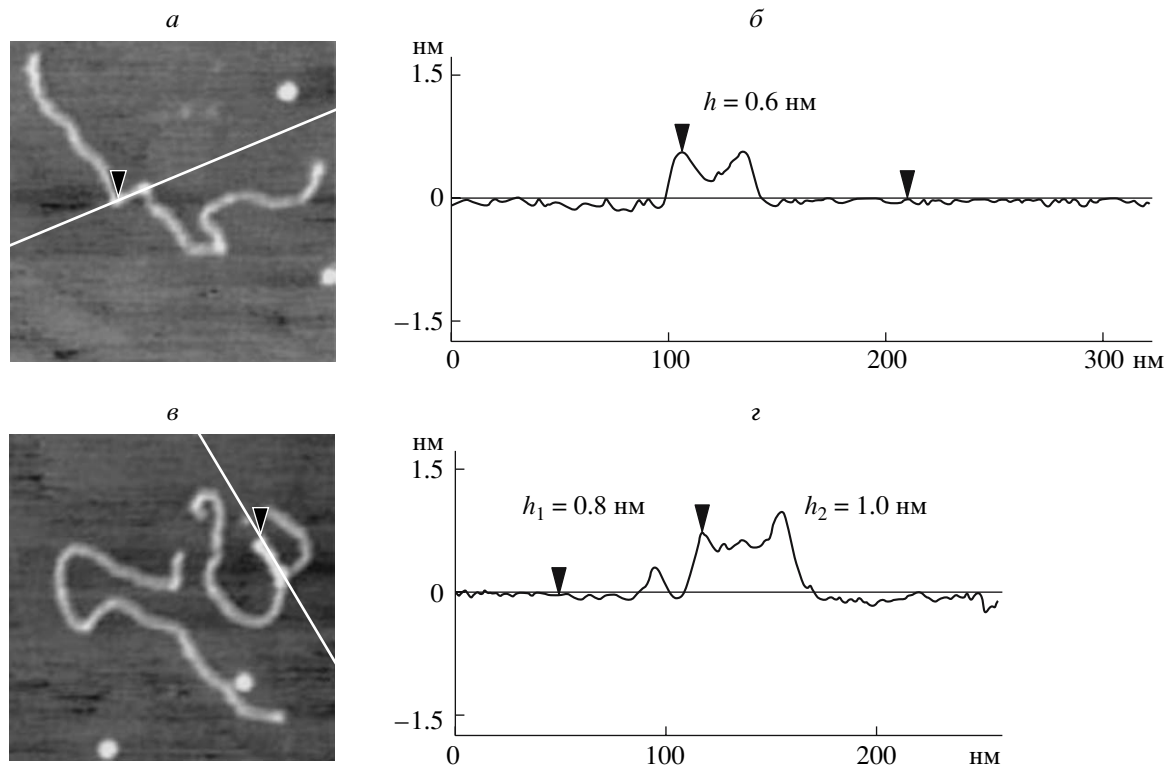


Рис. 2. АСМ-изображения комплексов ДНК рGEMEX с T7 РНК-полимеразой (а, в) и соответствующие продольные сечения (б, г). Показана линия, вдоль которой проведена секущая плоскость (а, в) перпендикулярно плоскости рисунка. Пики на сечениях соответствуют максимальной высоте комплексов или молекул. б – Высота h обоих комплексов ДНК рGEMEX-T7 РНК-полимераза равна 0.6 нм; г – h_1 соответствует высоте комплекса ДНК рGEMEX-T7 РНК-полимераз, h_2 – максимальной высоте закрученного фрагмента ДНК рGEMEX.

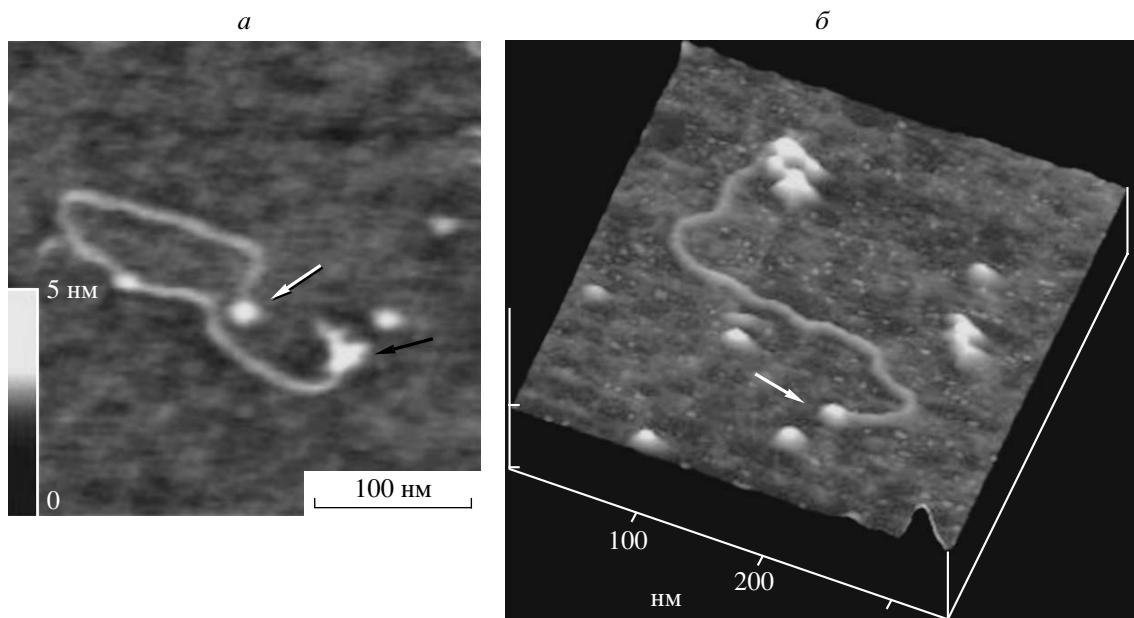


Рис. 3. АСМ-изображение (размер кадра составляет 297 нм × 297 нм) (а) и трехмерное изображение (б) комплексов, образованных молекулами T7 РНК-полимеразы с концевыми фрагментами ДНК-матрицы. Белая стрелка указывает на комплекс инициации, черная – на комплекс в области терминации транскрипции. Приведена шкала градаций серого цвета, которая соответствует диапазону высоты от 0 до 5 нм. Транскрипцию проводили в течение 65 мин при $T = 31^\circ\text{C}$ в буфере В.

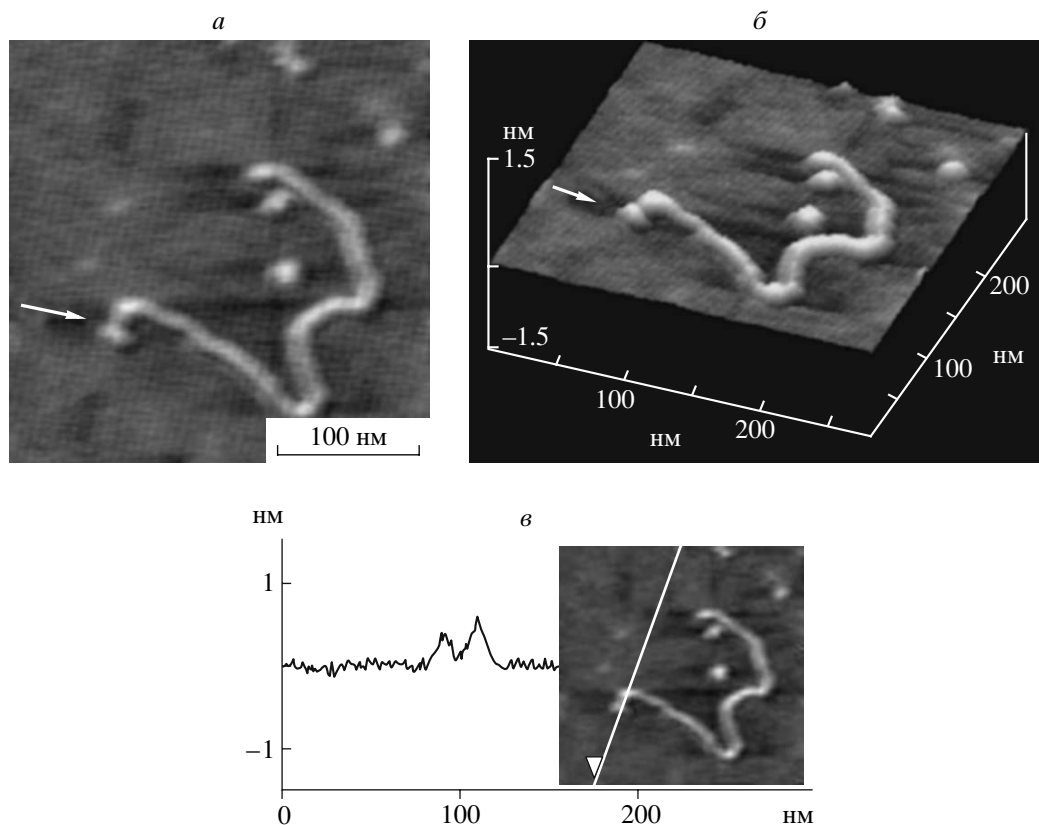


Рис. 4. Изображение единичной линейной ДНК длиной 1414 п.н., образовавшей комплекс с T7 РНК-полимеразой (показан стрелкой) после проведения транскрипции в буфере А в течение 4 мин при $T = 37^\circ\text{C}$. Молекулы T7 РНК-полимеразы выглядят как сферы диаметром около 8 нм. *а* – АСМ-изображение. Размер кадра – 280 нм \times 280 нм. *б* – Трехмерное изображение; *в* – сечение комплекса T7 РНК-полимеразы с ДНК, по которому определена высота молекул ДНК и РНК-полимеразы. На вставке показана линия, вдоль которой проведена секущая плоскость перпендикулярно плоскости рисунка. Высота молекулы T7 РНКП в комплексе T7 РНКП–ДНК составляет 0.6 нм, молекулы ДНК – 0.4 нм.

что основными составными частями механизма регуляции транскрипции бактериофага T7 являются эффективность и скорость образования открытого комплекса РНКП с промотором, а не связывание с разными промоторами, которые входят в состав генома бактериофага.

В данной работе мы использовали промотор, который локализован в позиции 1212–1231 п.н. ДНК-матрицы, т.е. на расстоянии около 200 н. от конца ампликона, что соответствует расстоянию ~ 70 нм ($200 \text{ н.} \times 0.34 \text{ нм}$). Отметим, что возможности АСМ позволяют надежно визуализировать комплекс, образованный на таком расстоянии от конца ампликона. В то же время среди довольно большого массива проанализированных комплексов ДНК–T7 РНКП (свыше 200) визуализированы комплексы, образованные полимеразой именно с концевыми фрагментами ДНК (около 30 комплексов). Типичные АСМ-и трехмерные изображения таких комплексов приведены на рис. 3 и 4.

Рассмотрим более детально визуализированные нами комплексы, образованные T7 РНК-полимеразой на обоих концах ампликона. В случае тран-

скрипции при $T = 37^\circ\text{C}$ в течение 4 мин обнаружен лишь один тип комплекса (рис. 4) – молекула T7 РНКП присоединена к одному из концов ДНК-матрицы. Измеренная высота этого комплекса (рис. 4*а*, показан стрелкой) непосредственно по АСМ-изображению с помощью построения сечений (рис. 4*в*) равна ~ 0.5 нм, что соответствует высоте единичной молекулы T7 РНКП. В то же время после проведения транскрипции при $T = 31^\circ\text{C}$ в течение 65 мин визуализированы два типа комплексов, локализованных на обоих концах ДНК-матрицы (рис. 3): комплекс T7 РНКП с промотором и комплекс с терминатором. Высота другого комплекса T7 РНКП–ДНК, показанного черной стрелкой на рис. 3*а, б*, равна 0.93–1.00 нм.

Известно, что снижение температуры инкубации при проведении транскрипции с $T = 37^\circ\text{C}$ до $T = 30^\circ\text{C}$ ведет к увеличению части полноразмерных РНК-транскриптов. В то же время довольно высокая концентрация NaCl ($>30 \text{ мМ}$) может приводить к уменьшению количества РНК-транскриптов ввиду возможной преципитации ДНК-матрицы [11]. Отме-

тим, что ионная сила (I) используемых буферов для транскрипции составляла 70–80 мМ Na^+ .

Процесс транскрипции можно рассматривать как своеобразное сканирование ДНК-матрицы РНК-полимеразой. Направление сканирования задается последовательностью промотора в матричной нити ДНК [12]. Но для поиска промотора и исключения возможности пропуска сайта промотора такой высокоточной “машиной”, какой является РНКП, по нашему мнению, этот молекулярный мотор начинает сканирование с одного из концевых фрагментов ДНК. Именно этим обстоятельством мы объясняем довольно большое число визуализированных концевых комплексов, или комплексов, которые предшествуют образованию комплексов инициации транскрипции. Наши предположения согласуются с экспериментальными результатами по АСМ-визуализации диффузии РНКП во время поиска промотора [13] и моделью перемещения белка вдоль ДНК (быстрого переноса белка между разными фрагментами ДНК с помощью механизмов одномерной диффузии и слабого неспецифического связывания) [14].

На 5'-конце матричной нити ампликона локализована область терминации транскрипции на расстоянии ~90 п.н. от конца ампликона. По достижении терминатора элонгационный комплекс (ДНК-РНКП-РНК-транскрипт) останавливается и диссоциирует. Однако нами визуализировано несколько молекул ДНК, образовавших комплекс с Т7 РНКП на обоих концах матрицы (рис. 3). Причем на рис. 3а видны три молекулы Т7 РНКП, связанные с ДНК: одна образовала комплекс инициации (показан белой стрелкой), вторая – комплекс в области терминации транскрипции (показан черной стрелкой), а третья молекула находится в середине ДНК-матрицы. Наличие нескольких молекул Т7 РНКП, образовавших комплекс с единичной молекулой ДНК, подтверждает, что после начала транскрипции одной молекулой Т7 РНКП другая молекула фермента может связаться с концевым фрагментом ДНК-матрицы, локализованным рядом с промотором Т7 РНКП, для проведения последующей преинициации и элонгации транскрипции.

В области терминации транскрипции несколько молекул Т7 РНКП могут быть связаны с ДНК-матрицей (показано черной стрелкой на рис. 3а, б). На трехмерном изображении (рис. 3б) кроме концевых комплексов Т7 РНКП-ДНК видны еще пять молекул полимеразы, которые не образовали комплекс с ДНК-матрицей. Поскольку реакцию транскрипции проводили при избытке Т7 РНКП и при довольно высоком значении ионной силы ($I = 70\text{--}80$ мМ Na^+), что ведет к элиминации неспецифического связывания полимеразы с ДНК, и в данных условиях образовался только один комплекс Т7 РНКП-ДНК, то визуализированный концевой комплекс (показан белой стрелкой на рис. 3а, б) является специфичным.

Аналогичные комплексы Т7 РНКП с ДНК также визуализированы в работе [15]. Но, на наш взгляд, они были ошибочно интерпретированы как неспецифичные.

Наличие нескольких молекул Т7 РНКП, образовавших комплекс с ДНК-матрицей в процессе инициации и элонгации транскрипции (рис. 3а), показывает, что не одна, а несколько молекул РНКП иницируют транскрипцию с одного промотора. Эти данные согласуются с результатами работы [16], в которой показана возможность объединения молекул РНКП в процессе элонгации транскрипции. Известно, что в бактериях и эукариотических клетках транскрипция осуществляется с высокой скоростью, несмотря на наличие многочисленных блоков транскрипции. Установлено, что большинство внутренних и внешних блоков транскрипции (сигналы паузы и остановки) исчезают, если более чем одна молекула РНКП иницирует транскрипцию с одного и того же промотора. Наоборот, при проведении именно единичного цикла транскрипции наличие внутренних терминаторов существенно влияет на скорость элонгации и выход полноразмерных транскриптов.

Посредством кинетического анализа инициации и элонгации транскрипции для единичных молекул Т7 РНКП [17] обнаружено, что этап инициации длится 4 с, и, следовательно, для синтеза РНК-транскрипта длиной 1200 н. необходимо около 30 с. Поэтому в нашем случае времени при проведении транскрипции в течение 4 мин вполне достаточно для синтеза РНК-транскриптов на ДНК-матрице длиной 1414 п.н., использованной в данной работе. Однако при проведении транскрипции в течение 4 мин (в буфере А) визуализированы комплексы, которым присуще связывание лишь с одним концом ДНК-матрицы, подобные варианту, изображенному на рис. 4. В то же время при увеличении времени транскрипции до 65 мин нами детектированы комплексы Т7 РНКП с обоими концевыми фрагментами ДНК-матрицы (рис. 3). По нашему мнению, комплекс, показанный черной стрелкой на рис. 3, соответствует комплексу, образованному Т7 РНКП с ДНК-матрицей в области терминации транскрипции. Возможно, что после элонгации на терминаторе “останавливаются” одна за другой несколько молекул Т7 РНКП с соответствующими РНК-транскриптами. На это указывает довольно большой размер комплекса, а также присутствие молекулы Т7 РНКП внутри ДНК-матрицы при наличии комплексов на обоих терминальных сайтах ДНК-матрицы. Возможность АСМ-визуализации комплексов в области терминации транскрипции (при $T = 31^\circ\text{C}$) обусловлена, по нашему мнению, понижением скорости диссоциации элонгационных комплексов по достижении терминатора при уменьшении температуры проведения транскрипции (по сравнению с $T = 37^\circ\text{C}$).

Среди довольно большого массива проанализированных комплексов ДНК-T7 РНКП (свыше 200) визуализированы комплексы, образованные полимеразой именно с терминальными (т.е. концевыми) фрагментами ДНК (около 30 комплексов). Визуализацию достаточно большого количества комплексов T7 РНКП с концевыми фрагментами ДНК-матрицы можно объяснить, по нашему мнению, несколькими обстоятельствами. Во-первых, именно на концах ДНК-матрицы локализованы промотор и область терминации транскрипции. Поскольку константа связывания для молекулы T7 РНКП с высокоспецифичным сайтом промотора значительно превышает константу неспецифичного связывания (с любым сайтом внутри ДНК-матрицы) [10], то в условиях диссоциации комплексов T7 РНКП-ДНК комплекс промотор-T7 РНКП является наиболее стабильным из образованных в процессах инициации и терминации транскрипции. Во-вторых, время диссоциации комплекса T7 РНКП-промотор значительно превышает время перехода к комплексу элонгации; поэтому существует большая вероятность визуализации комплекса с промотором при прочих равных условиях. В-третьих, пауза и остановка фермента происходят в области терминации, что также статистически повышает вероятность визуализации комплексов с концевыми фрагментами ДНК-матрицы. В то же время визуализация элонгационных комплексов в области терминации транскрипции только для варианта проведения транскрипции при $T = 31^\circ\text{C}$ (рис. 3) свидетельствует о том, что в данных условиях происходит уменьшение скорости диссоциации элонгационного комплекса при достижении терминатора за счет понижения температуры проведения транскрипции.

При визуализации непосредственно РНК-транскриптов ДНК-матрицу и праймеры удаляли с помощью инкубации реакционной смеси с ДНКазой I после проведения транскрипции. По полученным АСМ-изображениям с высоким разрешением определено, что РНК-транскрипты, иммобилизованные на слюде, образуют жгутоподобные конденсированные структуры длиной 122 ± 10 нм с соотношением длины и ширины 4.5–5.0. Поскольку это значение значительно меньше ожидаемой длины транскриптов, равняющейся 336 нм ($1122 \text{ н.} \times 0.3 \text{ нм} = 336 \text{ нм}$), можно сделать вывод, что однонитевые молекулы РНК образуют мультицепочечные конденсированные структуры. Ранее с помощью АСМ также показано, что молекулы РНК, которые транскрибируются с линейной ДНК-матрицы, образуют подобные конденсированные структуры, а их длина в два раза меньше по сравнению с длиной ДНК-матрицы [18].

Анализ полученных результатов по визуализации РНК-транскриптов, а также суперспиральных молекул ДНК, иммобилизованных на слюде с разной гидрофобностью и поверхностной плотностью заряда [9, 19], показывает, что гидрофобность и по-

верхностная плотность катионов слюды, которую используют для иммобилизации РНК-транскриптов, являются слишком высокими для того, чтобы визуализировать линейные однонитевые молекулы РНК, а не образованные ими конденсированные структуры. Поэтому для визуализации единичных молекул РНК необходимо оптимизировать поверхностную плотность катионов слюды таким образом, чтобы при иммобилизации на ней молекул РНК формировались шпильчатые структуры или вытянутые молекулы в отличие от визуализированных конденсированных структур.

Таким образом, в работе с помощью атомно-силовой микроскопии визуализированы комплексы, которые образует T7 РНК-полимераза с ДНК-матрицей при элонгации транскрипции. Показано, что на одной молекуле ДНК-матрицы (которая содержит промотор и внутренний терминатор транскрипции T7 РНКП) в условиях элиминации неспецифичного связывания молекулы T7 РНКП образуют одновременно как комплексы с концевыми фрагментами ампликона, так и комплексы в области терминации и в процессе элонгации транскрипции. В случае АСМ-визуализации элонгационных комплексов и комплексов терминации транскрипции оптимальным условием является проведение транскрипции при комнатной температуре или при 31°C . Дальнейшие эксперименты с использованием возможностей атомно-силовой микроскопии (визуализация непосредственно в буферном растворе, измерение силы межмолекулярного взаимодействия на уровне пар единичных молекул) позволят получить, по нашему мнению, более детальную информацию, касающуюся элонгационных комплексов транскрипции.

Авторы выражают благодарность проф. А.В. Сиволобу (Киевский национальный университет им. Т. Шевченко) за критические замечания при подготовке статьи.

Работа выполнена при частичной поддержке Международного центра науки и технологий (Япония), а также гранта АМН 72/2007 Академии медицинских наук Украины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rivetti C., Codeluppi S., Dieci G., Bustamante C. 2003. Visualizing RNA extrusion and DNA wrapping in transcription elongation complexes of bacterial and eukaryotic RNA polymerases. *J. Mol. Biol.* **326**, 1413–1426.
2. Walter W., Studitsky V. 2004. Construction, analysis, and transcription of model nucleosomal templates. *Methods.* **33**, 18–24.
3. Guthold M., Bezanilla M., Erie D., Jenkins B., Hansma H., Bustamante C. 1994. Following the assembly of RNA polymerase-DNA complexes in aqueous solutions with the scanning force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 12927–12930.

4. Rychlik W., Spencer W.J., Rhoads R.E. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6409–6417.
5. Lyubchenko Y., Jacobs B., Lindsay S. 1992. Atomic force microscopy of reovirus dsRNA: a routine technique for length measurement. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3983–3986.
6. Rees W., Keller R., Vesenka J., Yang C., Bustamante C. 1993. Evidence of DNA bending in transcription complexes imaged by scanning force microscopy. *Science.* **260**, 1646–1649.
7. Kosikov K., Gorin A., Lue X., Olson W., Manning G. 2002. Bending of DNA by asymmetric charge neutralization: all-atom energy simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 4838–4847.
8. Studitsky V., Walter W., Kireeva M., Kashlev M., Filisfeld G. 2004. Chromatin remodeling by RNA polymerases. *Trends Biochem. Biosci.* **29**, 127–135.
9. Лиманская Л.А., Лиманский А.П. 2006. S-форма ДНК – суперспиральная ДНК с 1.94–2.19 Å расстоянием между парами оснований вдоль оси дуплекса. *Молекуляр. биология.* **40**, 122–136.
10. Smeeckens S., Romano L. 1986. Promoter and nonspecific DNA binding by the T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Research.* **14**, 2812–2827.
11. Komissarova N., Becker J., Solter S., Kireeva M., Kashlev M. 2002. Shortening of RNA: DNA hybrid in the elongation complex of RNA polymerase is a prerequisite for transcription termination. *Mol. Cell.* **10**, 1151–1162.
12. Milligan J., Groebe D., Witherell G., Uhlenbeck O. 1987. Oligonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA template. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8783–8798.
13. Guthold M., Zhu X., Rivetti C. 1999. Direct observation of one-dimensional diffusion and transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Biophys. J.* **77**, 2284–2294.
14. Berg O., Winter R., Von Hippel P. 1981. Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 1. Models and theory. *Biochemistry.* **20**, 6929–6948.
15. Crampton N., Thomson N., Kirkham J., Gibson C., Bonass W. 2006. Imaging RNA polymerase-amelogenin gene complexes with single molecule resolution using atomic force microscopy. *Eur. J. Oral. Sci.* **114**, 133–138.
16. Epstein V., Nudler E. 2003. Cooperation between RNA polymerase molecules in transcription elongation. *Science.* **300**, 801–805.
17. McAllister W. 1997. Transcription by T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Mol. Biol.* **11**, 1–25.
18. Hansma H., Pietrasanta L., Golan R., Sitko J., Viani M., Paloczi G., Smith B., Hansma P. 2000. Recent highlights from atomic force microscopy. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **18**, 271–275.
19. Лиманская Л.А., Лиманский А.П. 2006. Компактизация единичных молекул суперспиральной ДНК, адсорбированных на аминокислоте. *Биоорганич. химия.* **32**, 494–510.