

ИЗУЧЕНИЕ ЭЛОНГАЦИОННЫХ КОМПЛЕКСОВ T7 РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ

© 2012 г. О.Ю. Лиманская* ***, А.П. Лиманский* **

*ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова НАМН Украины,
61057, Харьков, ул. Пушкинская, 14, Украина;

E-mail: o.lymynskiy@mail.ru

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

***Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины»,
61023, Харьков, ул. Пушкинская, 83, Украина

Поступила в редакцию 04.12.07 г.

После последней доработки 01.06.11 г.

Комплексы, образуемые РНК-полимеразой бактериофага T7 с ДНК-матрицей при проведении транскрипции, визуализированы посредством атомно-силовой микроскопии при различных температурных и временных параметрах, в различных буферных системах. Получены изображения комплексов, образованных T7 РНК-полимеразой с концевыми фрагментами ДНК-матрицы для единичных молекул. Визуализированы единичные молекулы ДНК-матрицы, с которыми образовали комплексы несколько молекул T7 РНК-полимеразы, соответствующие этапам инициации, элонгации и терминации транскрипции. РНК-транскрипты, иммобилизованные на аминослюде, образуют жгутоподобные конденсированные структуры. Обсуждаются особенности образования специфических и неспецифических комплексов для системы ДНК-РНК-полимераза при инициации и элонгации транскрипции.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, транскрипция, T7 РНК-полимераза, РНК-транскрипт.

Транскрипцию генетической информации, кодируемой ДНК, рассматривают как последовательность трех этапов – инициации, элонгации и терминации. В прокариотах и эукариотах РНК синтезируется с помощью ДНК-зависимых РНК-полимераз. РНК-полимераза (РНКП), представляющая собой сложную молекулярную машину, отвечает за связывание с промотором, плавление ДНК, инициацию транскрипции, элонгацию нити РНК и терминацию транскрипции. В процессе транскрипции РНКП образует ряд комплексов при сканировании ДНК-матрицы. Сначала образуется нестабильный комплекс инициации, вследствие чего синтезируются короткие продукты перед очисткой промотора, а потом образуется стабильный элонгационный комплекс, который состоит из РНКП, ДНК-матрицы и растущего РНК-транскрипта [1]. С помощью биохимического анализа и изучения кинетики взаимодействия мутантных РНКП с матрицей ДНК показано, что при переходе от комплекса инициации к комплексу

элонгации образуются как минимум три типа переходных комплексов. Первый комплекс охватывает около трех–пяти нуклеотидов (н.), второй – ~6–8 н., третий – ~9–14 н. [2,3].

РНК-полимеразы могут быть разделены на два класса: мультисубъединичные (бактерии, эукариоты) и односубъединичные (некоторые бактериофаги, митохондрии, хлоропласты). И хотя они не характеризуются структурной гомологией и подобием последовательностей, для РНКП обоих классов основные этапы транскрипции происходят идентично [4]. Односубъединичные РНКП узнают промоторы без вспомогательных молекул, в то время как мультисубъединичным РНКП для связывания с промотором необходимы дополнительные белки.

Транскрипция контролируется полимеразой на протяжении элонгации непосредственно до паузы или терминации. По достижении специфических позиций на ДНК-матрице стабильный элонгационный комплекс диссоциирует в процессе терминации транскрипции. Было предположено, что диссоциация не вызывается немедленно терминацией, а ей предшествует инактивация элонгационного комплекса [5]. Для T7

Сокращения: РНКП – РНК-полимераза, АСМ – атомно-силовая микроскопия, ПЦР – полимеразная цепная реакция.

РНК-полимеразы, наиболее изученной полимеразы среди класса РНКП, состоящих из единичных субъединиц, было найдено два типа сигналов терминации или паузы. Сигналы I класса состоят из U-богатого элемента непосредственно ниже последовательности, образующей GC-богатую шпильку. Терминация на сайтах I класса зависит от возможности образования молекулой РНК вторичной структуры и происходит даже при условии удаления нематричной цепи ДНК [3]. Другой терминатор T7 РНКП, относящийся к классу II, состоит из консервативной последовательности длиной 8 нуклеотидов. Как правило, пауза или терминация происходят на сайте, который локализован ниже на семь–восемь нуклеотидов от указанного элемента. Однако детали как инициации транскрипции, так и ее терминации довольно трудно прояснить, используя традиционные методы для растворов, поскольку, во-первых, инициация состоит из нескольких кратковременных промежуточных этапов между связыванием промотора и элонгацией. Во-вторых, в каждый конкретный момент времени только небольшая часть молекул РНКП из набора молекул РНКП, активно участвующих в транскрипции, сцеплена с инициацией [6]. В большинстве биохимических исследований инициации транскрипции используют такие экспериментальные условия, которые позволяют изучать только фиксированное положение фермента, при котором РНКП останавливается на известной позиции ДНК-матрицы ввиду отсутствия комплементарного нуклеотида. Попытки с целью синхронизации инициации транскрипции для фракции молекул РНКП оказались неудачными, поскольку синхронизация быстро исчезала ввиду того, что переходы между промежуточными этапами носили вероятностный характер.

Относительно недавно был развит другой подход к изучению инициации транскрипции, основанный на исследовании связывания с промотором, инициации и элонгации для единичной молекулы РНКП в реальном времени. В этом методе использовали молекулу ДНК, соединенную обоими концами с двумя шариками, которые находились в оптических ловушках. В то же время молекула ДНК находилась вблизи поверхности, на которой были иммобилизованы молекулы T7 РНКП. Управляя оптической ловушкой посредством осцилляции шарика, к которому за один конец была присоединена молекула ДНК, в работе [6] наблюдали ассоциацию и диссоциацию комплекса T7 РНКП с промотором ДНК с константой $K = 2,9 \text{ с}^{-1}$, переход к элонгации с $K = 0,36 \text{ с}^{-1}$, синтез со

скоростью 43 нуклеотида в секунду и выход РНК-транскрипта длиной ~ 1200 н. Авторами было показано, что переход от инициации к элонгации является более длительным по сравнению со временем существования бинарного комплекса T7 РНКП–промотор ДНК.

Многочисленные исследования с помощью рентгеноструктурного анализа, ДНК-футпринтинга, флуоресцентной резонансной спектроскопии существенно улучшили наши представления относительно элонгационного комплекса РНКП с ДНК и РНК-транскриптом [7,8]. Известно, что растущий РНК-транскрипт выдвигается при элонгации через выходной канал РНКП, а контакты между РНК-транскриптом и РНКП осуществляются для 14–16 нуклеотидов от 3'-конца. Получение новых данных, касающихся структуры промотора, элонгационного комплекса, стало возможным с развитием микроскопической техники высокого разрешения.

Рентгеноструктурный анализ, электронная микроскопия, сканирующая зондовая микроскопия (в частности, 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. Исходя из экспериментальных исследований транскрипции эукариот и прокариот, для комплекса элонгации была предложена модель наматывания ДНК [9,10]. В элонгационном комплексе наматывание ДНК на РНКП и образование гибрида РНК–ДНК вызывают раскрытие двойной спирали ДНК и образование транскрипционной петли. Однако остается немало нерешенных проблем, касающихся того, каким образом РНК-полимераза транскрибирует длинные фрагменты ДНК. Особенно много предположений было 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, что нить ДНК проходит 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, а также в отсутствие кристаллизации, в отличие от рентгеноструктурного анализа. Кроме того, в отличие от традиционных микроскопических методов, которые предоставляют усредненную информа-

цию для массива молекул, с помощью АСМ возможно получать данные о структуре и функционировании единичных молекул. Дополнительным преимуществом АСМ по сравнению с классической электронной микроскопией является отсутствие процедуры контрастирования образца. Для изучения топографии поверхности биомолекул с помощью АСМ необходимо только, чтобы молекулы были адсорбированы на подложке. Поэтому немало работ было посвящено АСМ-визуализации комплексов белков, в том числе и РНК-полимераз, с молекулами ДНК [9,11,12].

В данной работе оптимизированы условия проведения транскрипции *in vitro* для последующей АСМ-визуализации комплекса, который образует односубъединичная РНК-полимераза бактериофага T7 с линейной ДНК, содержащей промотор и область терминации транскрипции T7 РНКП. Визуализированы как специфичные (образованные молекулой T7 РНКП с концевыми фрагментами ДНК-матрицы), так и высокоспецифичные комплексы (прежде всего с промотором), которые образует T7 РНКП с единичными молекулами ДНК-матрицы. Кроме того, представлены результаты непосредственной визуализации РНК-транскриптов, образовавшихся после элонгации транскрипции: РНК-транскрипты на поверхности слюды (субстрата для АСМ) образуют жгутоподобные конденсированные структуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведение транскрипции. В качестве матрицы для транскрипции использовали ампликон длиной 1414 пар нуклеотидов (п.н.), содержащий промотор A1 (один из 17-ти известных промоторов, который содержит геном бактериофага T7) и область терминации транскрипции T7 РНК-полимеразы (рис. 1). ДНК-матрица была получена посредством ферментативной обработки эндонуклеазой рестрикции *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 T7 РНК-полимеразы (Promega, США), MegaScript T7 (Ambion, США) и набора от New England Biolabs (Англия) при разных температурных и временных параметрах.

При этом использовали три буфера для транскрипции – буфер А (Promega, США), буфер Б (Ambion, США) и буфер В [9]. Буфер А содержал 40 мМ трис-НСl (рН 7,9), 6 мМ

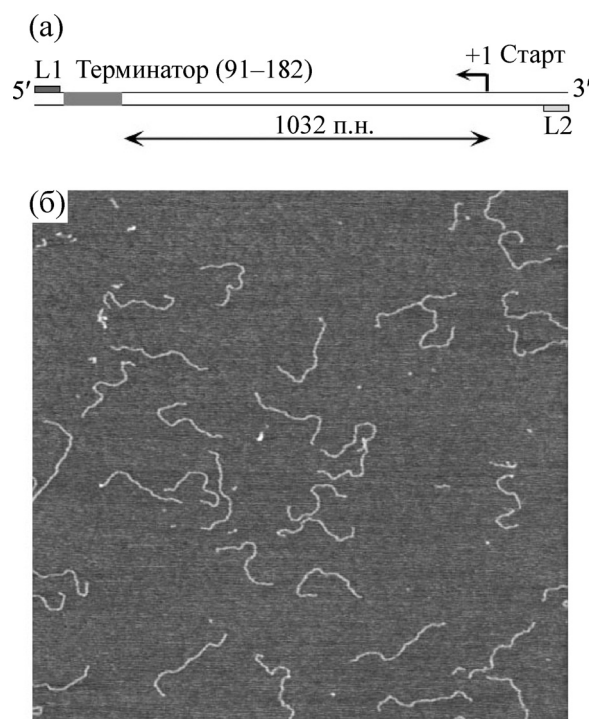


Рис. 1. Схематическое представление матрицы линейной ДНК, которую использовали для проведения транскрипции (а) и ее АСМ-изображение (б). Праймеры L1 и L2, показанные прямоугольниками, фланкируют фрагмент ДНК pGEMEX длиной 1414 п.н., который содержит промотор и терминатор транскрипции T7 РНК-полимеразы. Для визуализации ДНК pGEMEX была иммобилизована на свежесколотой слюде в NEPEP-буфере, содержащем 2,5 мМ MgCl₂. Размер кадра – 2,23 × 2,23 мкм.

MgCl₂, 10 мМ NaCl, 10 мМ дитиотриглицерина, 2 мМ спермидина, 0,05% твина 20, 40 ед. РНазина, 20 ед. РНК-полимеразы в общем объеме 20 мкл. Реакцию транскрипции инициировали добавлением нуклеотидов (СТР, ГТР, УТР и АТР) до конечной концентрации 200 мкМ.

Буфер Б содержал реакционную смесь для транскрипции (Ambion, США), 40 ед. РНазина, 20 ед. РНК-полимеразы, 20 мкМ СТР, ГТР, УТР и АТР в общем объеме 20 мкл. После 20–65 мин инкубации при температуре 31°C реакция была остановлена 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 дитиотриглицерина, 40 ед. РНазина, 20 ед. РНК-полимеразы в общем объеме 20 мкл. Реакцию транскрипции инициировали добавлением нуклеотидов до конечной концентрации 100 мкМ СТР, ГТР, УТР и АТР. После 65 мин инкубации при температуре 31°C реакция была остановлена быстрым охлаждением до 0°C.

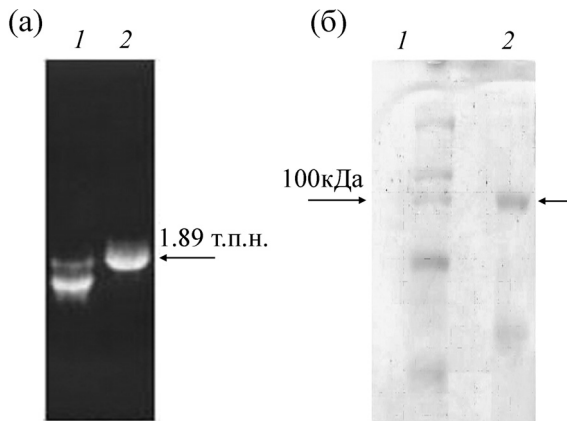


Рис. 2. (а) – Анализ РНК-транскриптов после проведения транскрипции с Т7 РНК-полимеразой на матрице фрагмента линейной ДНК рGEMEX длиной 1414 п.н. в 1,8% агарозном геле с формальдегидом и контрольной плазмиде рTRI-Xef длиной 1890 п.н. Ожидаемая длина транскриптов – 1122 н. (б) – Анализ Т7 РНКП с помощью электрофореза в 12,5 % ПААГ-ДСН. 1 – маркер молекулярной массы; 2 – Т7 РНКП (Ambion, США). Стрелкой показана полоса, которая соответствует основной фракции белка с молекулярной массой ~ 99 кДа. Гель окрашен Кумасси синим.

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. Для инактивации ДНКазы реакционную смесь инкубировали при температуре 70°C в течение 10 мин. Для контроля эффективности транскрипции проводили электрофорез в 1,2% агарозном геле, содержащем 1,8% формальдегида (рис. 2а). Транскрипцию проводили в специальной комнате, предназначенной для работы с РНК, с использованием ультрачистой воды, к которой добавляли DEPC для ингибирования РНКаз. Для проведения 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 ЭДТА и 0,01% додецилсульфата натрия. Для оценки размера РНК-транскриптов, образующихся после проведения транскрипции на матрице ДНК рGEMEX, использовали контрольную ДНК-матрицу рTRI-Xef из набора для проведения 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).

Препараты Т7 РНКП контролировали с помощью проведения электрофореза в 12,5 % ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (рис. 2б) и использовали без дополнительной очистки. Для ферментов Т7 РНКП (Promega) и Т7 РНКП (New England Biolabs) было характерно наличие одной полосы на электрофореграмме, в то время как для Т7 РНКП (Ambion) были найдены две полосы. Поэтому в работе преимущественно использовали Т7 РНКП (Promega).

Атомно-силовая микроскопия. В работе использовали атомно-силовой микроскоп Nanoscope IV MultiMode System (Veeco Instruments Inc., США) с E-сканером, который обеспечивает максимальный диапазон сканирования до 12 мкм. АСМ-изображения ДНК были записаны с помощью вибрирующего варианта АСМ в воздухе в режиме «высота» с использованием OMCL-AC160TS кантилеверов (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).

Подготовка образцов ДНК для ПЦР и комплексов Т7 РНКП–ДНК для АСМ. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) нами были сконструированы праймеры L1 и L2, ограничивающие фрагмент ДНК рGEMEX, который содержал промотор и область терминации транскрипции Т7 РНК-полимеразы. Праймеры L1 и L2, последовательности которых с соответствующими позициями на кольцевой ДНК рGEMEX приведены ниже, получены от 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 [13].

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

Для очистки амплифицированного фрагмента ДНК использовали следующую процедуру. После проведения электрофореза вырезали полосу геля, содержащую ампликон, облучая гель длинноволновым УФ-источником излучения низкой интенсивности (BioRad, США). Для дальнейшей очистки ампликона от нуклеотидов, праймеров, ДНК-полимеразы и бромистого этидия использовали набор QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Япония) согласно рекомендациям производителя, а также экстракцию фенол/хлороформом с последующим осаждением этанолом.

Для проведения ПЦР использовали термостабильную ДНК-полимеразу высокой точности двух видов – Pyrobest ДНК-полимеразу (TaKaRa Co., Япония) и Invitrogen Platinum ДНК-полимеразу (Invitrogen, Япония).

Для иммобилизации комплексов T7 РНКП–ДНК на свежесколотую слюду использовали 10 mM NEPER-буфер, который содержал 2,5 mM MgCl₂, или буфер, в котором проводили транскрипцию, поскольку он также содержал катионы магния, необходимые для связывания отрицательно заряженных молекул ДНК с отрицательно заряженной поверхностью свежесколотой слюды. На полосу слюды размером 1 см² наносили каплю раствора комплекса объемом 10 мкл с молярным соотношением концентраций T7 РНКП и ДНК, варьирующим в диапазоне 1–100, в TE-буфере (10 mM трис-HCl pH 7,9, 1 mM ЭДТА), промывали после 2-минутной экспозиции ультрачистой водой, свободной от РНКаз, обдували потоком азота и сразу проводили визуализацию.

Концентрацию T7 РНК-полимеразы в исходном растворе определяли спектрофотометрическим методом с использованием контрольного набора реагентов для определения концентрации бычьего сывороточного альбумина (BSA Protein Assay Reagent, Pierce, США). Из построенного калибровочного графика зависимости оптической плотности от известной концентрации альбумина для трех значений концентрации альбумина была определена концентрация промежуточного раствора T7 РНК-полимеразы, исходя из измеренного значения поглощения. Концентрация исходного раствора T7 РНК-полимеразы (Promega) составляла 6,6·10⁻⁶ M, а концентрация линейной ДНК pGE-MEX, которую использовали в качестве матрицы для транскрипции, – 200–800 пМ (ампликона) при АСМ-визуализации. Для ее определения проводили измерения оптической плотности и, следовательно, концентрации исходного раствора очищенного ПЦР-продукта. Комплексы готовили добавлением раствора T7

РНК-полимеразы к равному по объему раствору ДНК-матрицы, который готовили методом последовательных разведений исходного раствора ампликона. Для визуализации комплекса T7 РНК-полимераза–ДНК соотношение молярных концентраций полимеразы и ДНК варьировали от 1 до 100. Соответствующие растворы T7 РНК-полимеразы готовили методом последовательных разведений исходного раствора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На эффективность транскрипции влияет несколько факторов – температурные и временные параметры реакции, концентрация компонентов, ионная сила раствора. Поэтому в данной работе визуализированы комплексы T7 РНКП–ДНК после проведения транскрипции при разных температурных и временных параметрах, а также с использованием нескольких буферов для транскрипции, отличающихся составом и концентрацией компонентов.

Известно, что снижение температуры инкубации при проведении транскрипции с $T = 37^{\circ}\text{C}$ до $T = 30^{\circ}\text{C}$ ведет к увеличению количества полноразмерных РНК-транскриптов. В то же время довольно высокая концентрация NaCl (>30 mM) может приводить к снижению числа РНК-транскриптов ввиду возможной преципитации ДНК-матрицы [14]. Отметим, что ионная сила (I) используемых буферных растворов для транскрипции была равна 70–80 mM Na⁺.

Для исследования структуры комплексов T7 РНК-полимераза–ДНК посредством АСМ использовали иммобилизацию биомолекул на свежесколотую слюду с добавлением ионов магния. О том, что в результате транскрипции синтезируются РНК-транскрипты ожидаемой длины, свидетельствует наличие соответствующей полосы на электрофореграмме после проведения электрофореза в денатурирующих условиях продуктов транскрипции с T7 РНК-полимеразой (рис. 2). Контрольными были АСМ-изображения молекул ДНК-матрицы, адсорбированных на слюде (рис. 1б, рис. 3а), которые имели невытянутую форму, сглаженные контуры, их фрагменты равномерно иммобилизованы на поверхности субстрата. Наличие на электрофореграмме двух полос свидетельствует, по нашему мнению, о синтезе РНК-транскриптов длиной 1122 н. и 1032 н. (полоса более высокой интенсивности), соответствующих продуктам транскрипции с областью терминации и без области терминации транскрипции. Несмотря на то, что реакционная система не была синхронизированной, видно, что после транскрипции образуются только полноразмерные РНК-

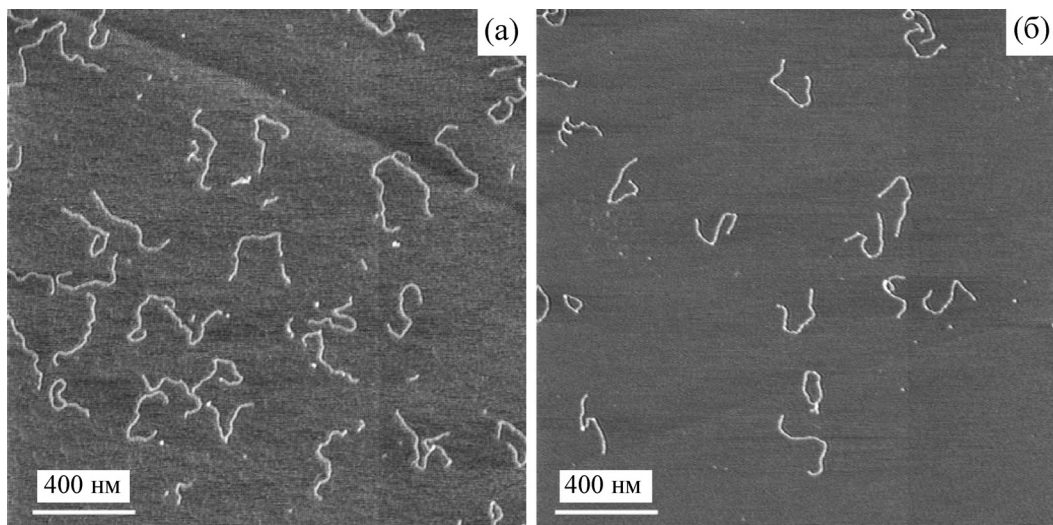


Рис. 3. АСМ-изображение: (а) – молекул линейной ДНК рGEMEX длиной 1414 п.н. (после проведения ПЦР с ДНК-полимеразой Invitrogen Platinum), которую использовали в качестве матрицы для транскрипции, иммобилизованных на свежесколотой слюде в HEPES-буфере, содержащем 2,5 мМ MgCl₂; (б) – комплекса T7 РНКП–ДНК в буфере А для транскрипции (без проведения транскрипции). Размер кадра: (а) – 2,08 × 2,08 мкм; (б) – 2 × 2 мкм.

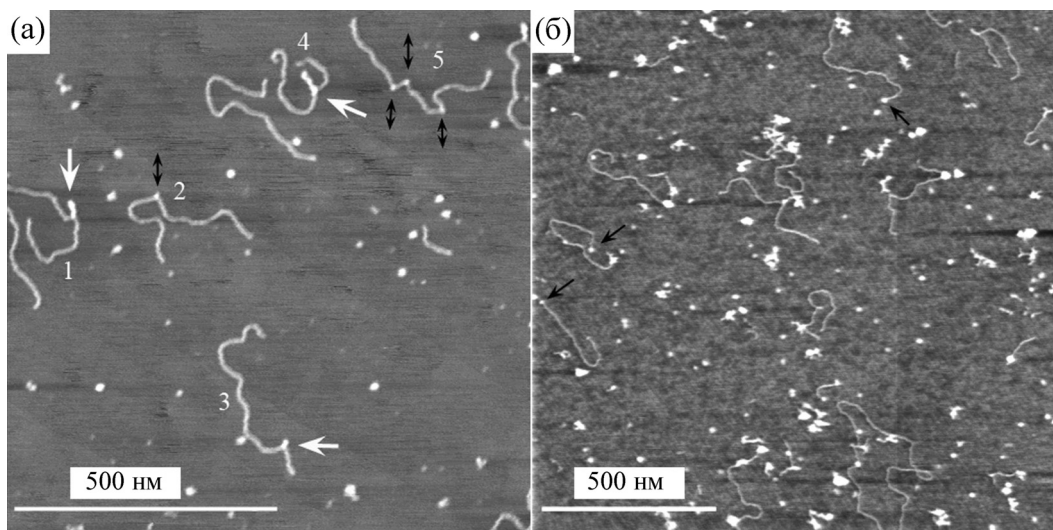


Рис. 4. АСМ-изображение фрагмента линейной ДНК рGEMEX длиной 1414 п.н., использованной в качестве матрицы для транскрипции, и T7 РНК-полимеразы (которые выглядят как белые точки) после транскрипции в течение 60 мин в буфере А для транскрипции при комнатной температуре (аналогично условиям работы [8]) (а) и в течение 65 мин при $T = 31^{\circ}\text{C}$ в буфере В для транскрипции (б). (а) – Белыми стрелками показаны закрученные фрагменты ДНК-матрицы, которые возникли в результате комплексообразования с молекулами T7 РНКП, а черными – молекулы T7 РНКП, образовавшие комплексы в середине ДНК-матрицы. (б) – Черными стрелками показаны молекулы T7 РНКП, которые образовали комплекс с концами ДНК-матрицы. Размер кадра: (а) – 1 × 1 мкм; (б) – 1,48 × 1,48 мкм. Соотношение молекул T7 РНК-полимеразы и ДНК составляет 20.

транскрипты и более короткие транскрипты после остановки на сайте терминатии.

После добавления T7 РНКП к транскрипционной смеси с ДНК-матрицей в процессе транскрипции формируются элонгационные комплексы, которые характеризуются типичны-

ми изгибами для комплексов ДНК–белок [9,15,16]. На рис. 4 и рис. 5 приведены АСМ-изображения фрагмента линейаризованной ДНК рGEMEX после транскрипции с T7 РНК-полимеразой при разных температурных и временных условиях при значительном избытке мо-

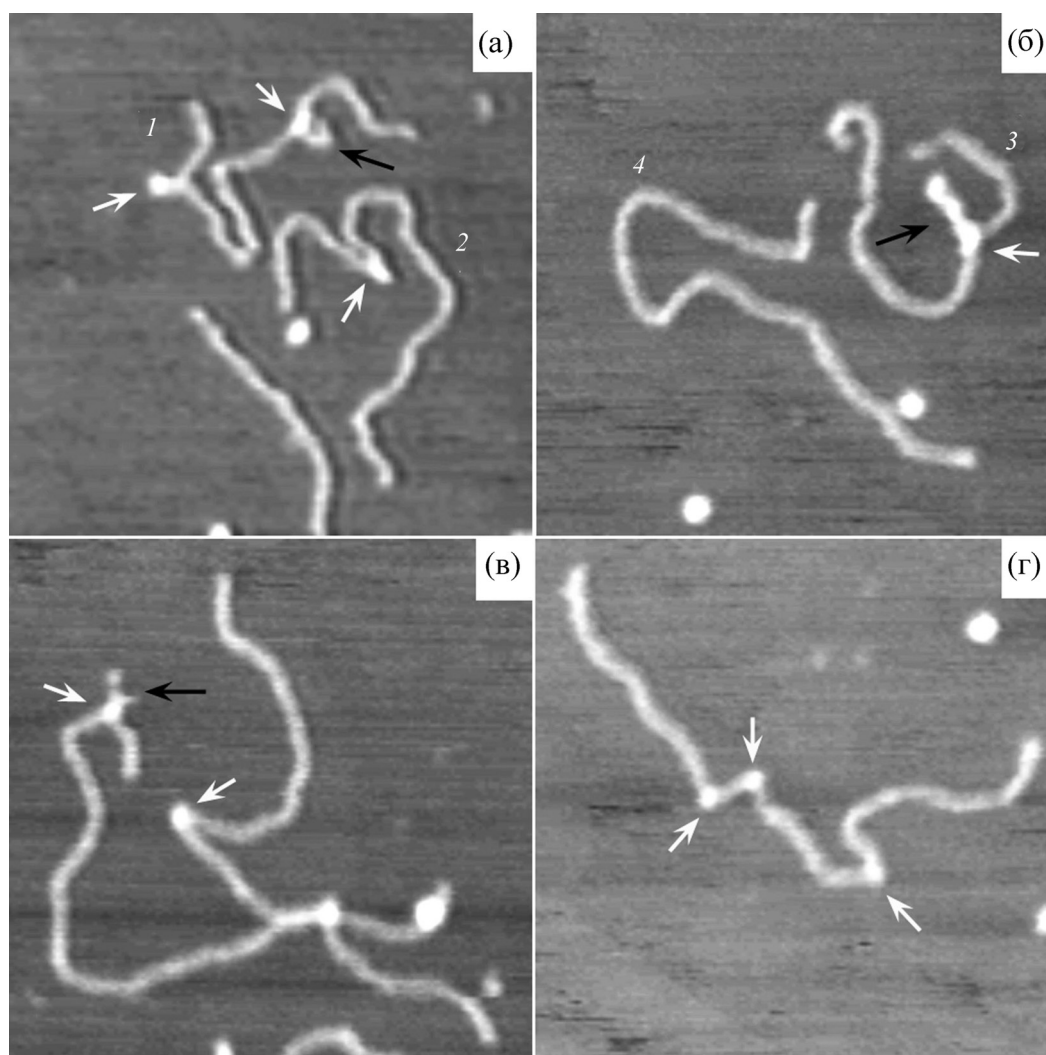


Рис. 5. АСМ-изображение с высоким разрешением комплексов T7 РНКП и ДНК. Молекулы T7 РНКП выглядят как сферы диаметром около 8 нм. Белые стрелки показывают на комплексы, образованные молекулами T7 РНКП и ДНК, а черные – на РНК-транскрипт (а, в) и закрученный фрагмент ДНК-матрицы (б). Транскрипцию проводили в буфере А при комнатной температуре в течение 60 мин, после чего реакционную смесь немедленно использовали для АСМ-визуализации. Размер кадра: (а) – 348 × 348 нм; (б) – 306 × 306 нм; (в) – 298 × 298 нм; (г) – 299 × 299 нм. Контурная длина молекул составляет: (а) – 445–450 нм, (б) – 454–457 нм.

лекул T7 РНК-полимеразы. Обращает на себя внимание то, что молекулам ДНК в комплексе с T7 РНКП свойственны наличие отмеченных изгибов, которые широко обсуждаются в литературе, и образование своеобразных петель после проведения транскрипции при комнатной температуре (рис. 4а, рис. 5а). В то же время в отсутствие молекул T7 РНКП изгибы и петли в линейных молекулах ДНК рGEMEX на АСМ-изображениях не проявляются (рис. 1а).

Вообще, формирование изгибов молекулы ДНК, с одной стороны, вызвано комплексобразованием с белками, а с другой – изгибы проявляются при визуализации комплексов ДНК–белок, адсорбированных на поверхности

слюды. Этот эффект можно объяснить изменением плотности поверхностного заряда молекулы ДНК при взаимодействии с белком. Адсорбция молекул ДНК на поверхность равномерно заряженной слюды происходит в основном за счет электростатического взаимодействия равномерно отрицательно заряженных сайтов ДНК с положительно заряженными поверхностными группами слюды. В результате такого взаимодействия двух равномерно заряженных поверхностей (ДНК и субстрата) молекулы ДНК равномерно иммобилизуются на поверхности субстрата. Это означает, что существует определенное (эмпирически установленное) соотношение между поверхностными свойствами

ДНК и поверхностными свойствами субстрата, на котором иммобилизованы молекулы ДНК.

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 полимеразами. Указанный факт существенно усложняет визуализацию как целого элонгационного комплекса, так и отдельных РНК-транскриптов. Поэтому для АСМ-визуализации элонгационного комплекса часто используют ДНК-матрицы, последовательность нуклеотидов которых синтезируют таким образом, что транскрипция останавливается в определенных позициях [9].

В данной работе был применен другой подход для предотвращения быстрой диссоциации элонгационного комплекса, а именно: мы использовали ДНК-матрицу, содержащую на расстоянии 1122 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%. ДНК-матрица для транскрипции сконструирована таким образом, что она содержит 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 Т7 РНКП – в позиции 91–182 п.н. (т.е. на расстоянии 90 п.н. от 5'-конца матричной цепи ДНК) (рис. 1). Поскольку в доступной литературе не было найдено данных относительно указанной области терминации, которая клонирована в векторе рGEMEX, встал вопрос обнаружения сигналов терминации для Т7 РНКП, посредством анализа последовательности терминатора транскрипции. С помощью пакета прикладных программ GeneVee [17] была выявлена шпильчатая структура с длиной стебля (с одним неспаренным нуклеотидом) 13 п.н., петлей размером 3 н. и свободной энергией образования шпильки $\Delta G = -16,4$ ккал/моль.

В качестве дополнительного контроля мы использовали АСМ-изображение молекул ДНК-матрицы, или ампликона, иммобилизованных на свежесколотой слюде в НЕРЕС-буфере, а также АСМ-изображение комплекса ДНК–Т7 РНКП без проведения транскрипции (рис. 3б).

Важной особенностью АСМ является то, что из АСМ-изображений с помощью программного обеспечения можно непосредственно измерять контурную длину молекул ДНК с достаточно высоким разрешением. К слову, одним из первых применений АСМ было именно измерение контурной длины ДНК [18]. Из построенного графика гауссова распределения контурной длины ампликонов [19], измеренной непосредственно из АСМ-изображения, нами была определена контурная длина ДНК-матрицы. Полученное значение контурной длины исследуемых ампликонов – 435 ± 15 нм – меньше теоретического значения длины молекул ДНК в В-форме приблизительно на 10%. Для ДНК-матрицы, образовавшей комплекс с Т7 РНКП в буфере А для транскрипции (без проведения транскрипции, рис. 3б), контурная длина, которую определили таким же образом из гауссова распределения, составляла 386 ± 13 нм. Такое существенное уменьшение контурной длины ДНК может быть объяснено несколькими причинами. Во-первых, наличие в составе транскрипционного буфера наряду с ионами магния ионов спермидина существенно изменяет поверхностные свойства слюды, на которой иммобилизованы молекулы ДНК, по сравнению с иммобилизацией из НЕРЕС-буфера. Возрастание плотности катионов на поверхности слюды может приводить к переходу молекул ДНК из канонической В-формы в сжатую S-форму ДНК. Отметим, что ранее нами было показано, что линейные и суперспиральные молекулы S-ДНК образуются на поверхности слюды с высокой поверхностной плотностью заряда и характеризуются значительным уменьшением контурной длины за счет уменьшения расстояния между нуклеотидами вдоль оси спирали [20]. Во-вторых, уменьшение контурной длины ДНК, образовавшей комплекс с Т7 РНКП, может быть объяснено наматыванием молекулы ДНК на молекулу РНК-полимеразы. Соответствующая модель была предложена в работе [21]. Аналогичные результаты по компактизации ДНК были получены для *E. coli* РНКП в работе [9], авторы которой 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.

Из АСМ-изображения, приведенного на рис. 4а, видно, что молекулы ДНК с номерами от 1 до 4 образовали комплексы только с одной молекулой Т7 РНКП, а с молекулой 5 связались три молекулы полимеразы. В то же время ком-

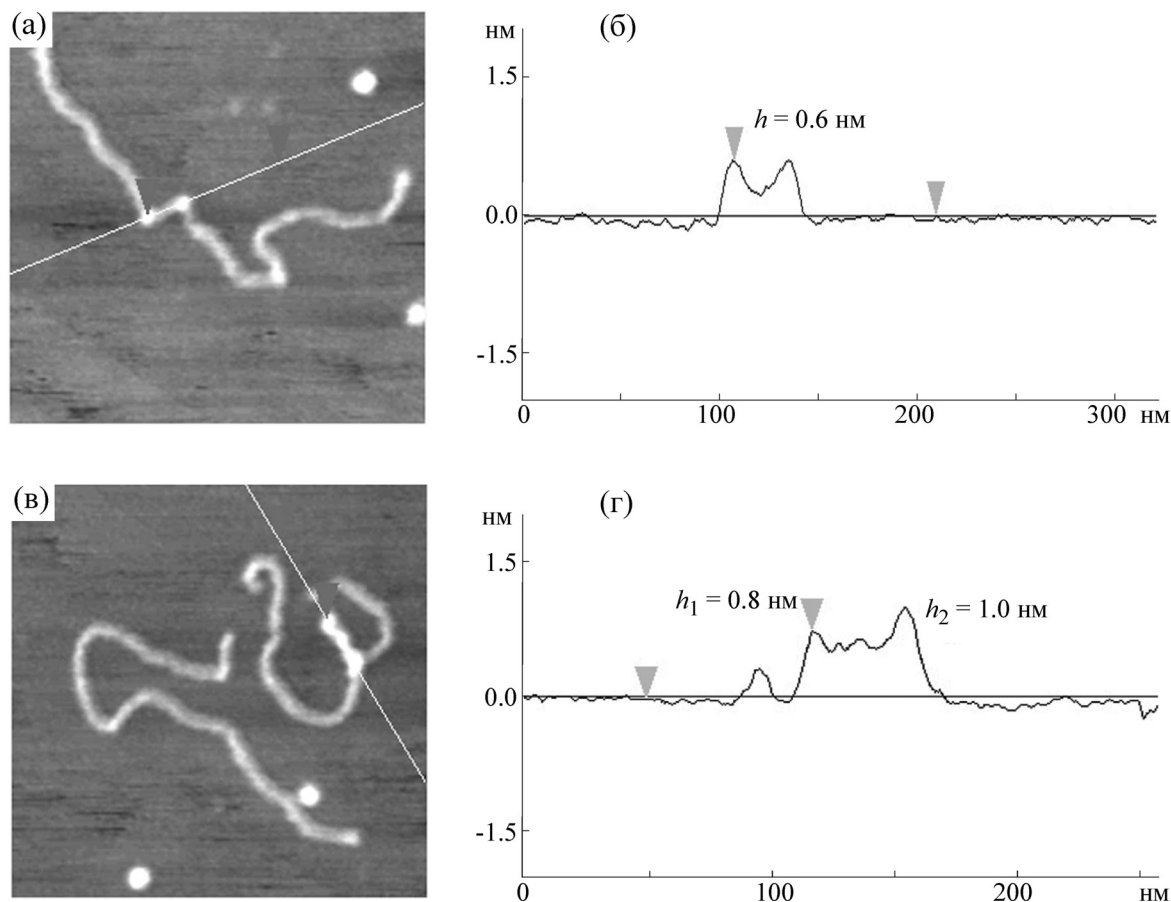


Рис. 6. АСМ-изображения комплексов ДНК рGEMEX с T7 РНК-полимеразой (а, в) и соответствующие продольные сечения (б, г). Показана линия, вдоль которой проведена секущая плоскость (а, в) перпендикулярно плоскости рисунка. Пики на сечениях соответствуют максимальной высоте комплексов или молекул. (б) – Высота h обоих комплексов ДНК рGEMEX–T7 РНК-полимераза равна 0,6 нм; (г) – h_1 соответствует высоте комплекса ДНК рGEMEX–T7 РНК-полимераза; h_2 – максимальная высота закрученного фрагмента ДНК рGEMEX.

плексы ДНК–T7 РНКП для молекул 1, 3, 4 качественно отличаются от комплексов для молекул 2 и 5, связывание с которыми сопровождается формированием характерных изгибов. Белыми стрелками для молекул 1, 3, 4 показаны фрагменты, которые можно интерпретировать как РНК-транскрипты (отметим, что в работе [9] при тщательном анализе приведенных в статье АСМ-изображений подобного размера кадра не найдено ни одного комплекса ДНК–РНКП, который бы содержал растущий РНК-транскрипт). Впрочем, тщательный анализ АСМ-изображений этих (и других) молекул с более высоким разрешением (рис. 5), построение поперечных сечений фрагментов молекул (рис. 6), а также их реконструированные трехмерные изображения (рис. 7б) позволяют предположить, что указанные фрагменты молекул относятся к ДНК-матрице.

Обратим еще раз внимание на то, что измеренная нами после амплификации контурная длина ДНК-матрицы была равна 435 ± 15 нм. Определенная контурная длина молекул ДНК, образовавших комплекс с T7 РНКП, также находится в пределах этого статистически достоверного определенного значения – 445–457 нм (рис. 5). Отметим, что высота молекулы ДНК, иммобилизованной 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, диаметр которых равен 8 нм. Высота комплекса ДНК–T7 РНКП составляет от 0,6 нм (рис. 6а,б) до 1 нм (рис. 6в,г). Длина молекулы 3 с закрученным фрагментом (который показан черной стрелкой на рис. 5б) составляет 457 нм, что указывает на то, что визуализированный фрагмент является частью ДНК-матрицы, а не РНК-транскриптом. Кроме того, высота узлов,

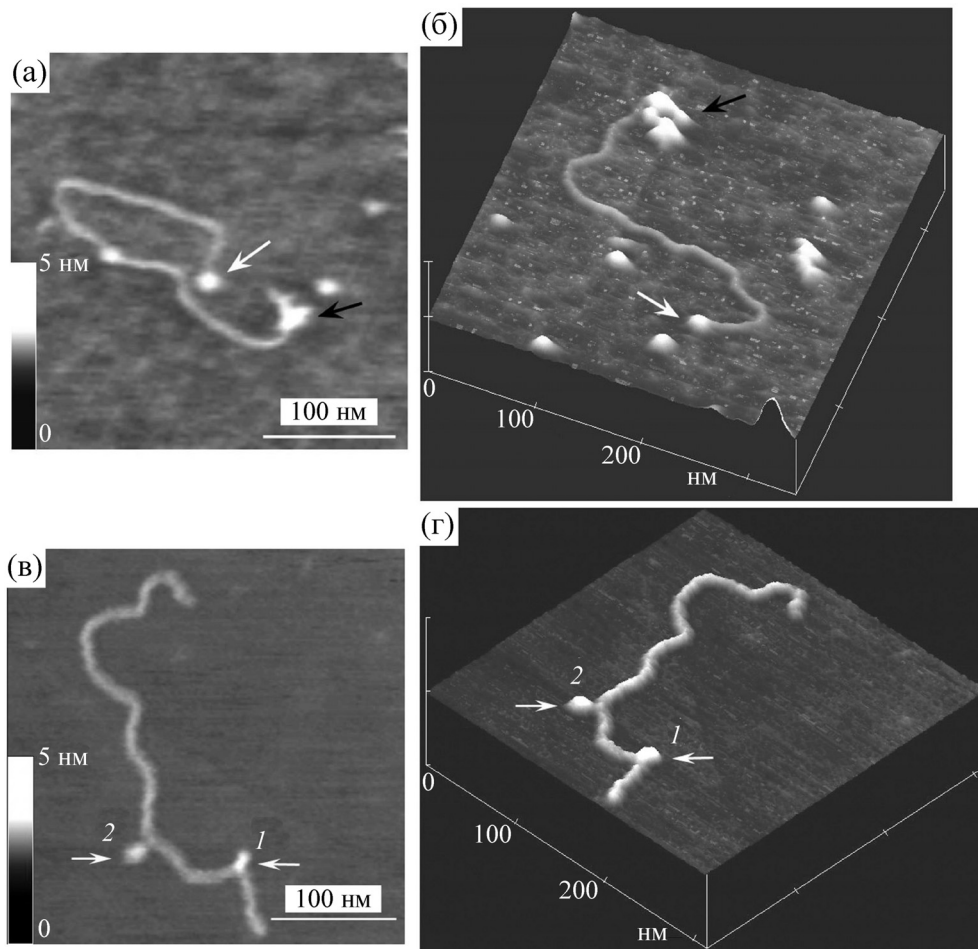


Рис. 7. АСМ-изображение (а, в) и трехмерное изображение (б, г) комплексов, образованных молекулами Т7 РНК-полимеразы с фрагментами ДНК-матрицы. (а) – Белая стрелка указывает на комплекс инициации транскрипции (размер кадра – 297×297 нм), а черная (б) – на комплекс в области терминации транскрипции. (в) – Белые стрелки указывают на комплекс Т7 РНКП–ДНК в области промотора (1) и на комплекс Т7 РНКП–ДНК, в котором фрагмент молекулы ДНК навит на молекулу РНКП (2). Размер кадра – 314×314 нм. Приведена шкала градаций серого цвета, которая соответствует диапазону высоты от 0 до 5 нм. Транскрипцию проводили в течение 65 мин при $T = 31^\circ\text{C}$ (а); (в) – транскрипцию не проводили.

образовавшихся при закручивании двухнитевой ДНК, равна 0,8 нм (рис. бг), что также совпадает с высотой узлов закрученной ДНК, иммобилизованной на слюде [20].

Стоит отметить, что при взаимодействии молекулы ДНК с Т7 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–Т7 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. Из анализа свойств неспецифичных и специфичных комплексов ДНК–РНКП в работе [22] сделан вывод, что основными частями механизма регуляции транскрипции бактериофага Т7 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

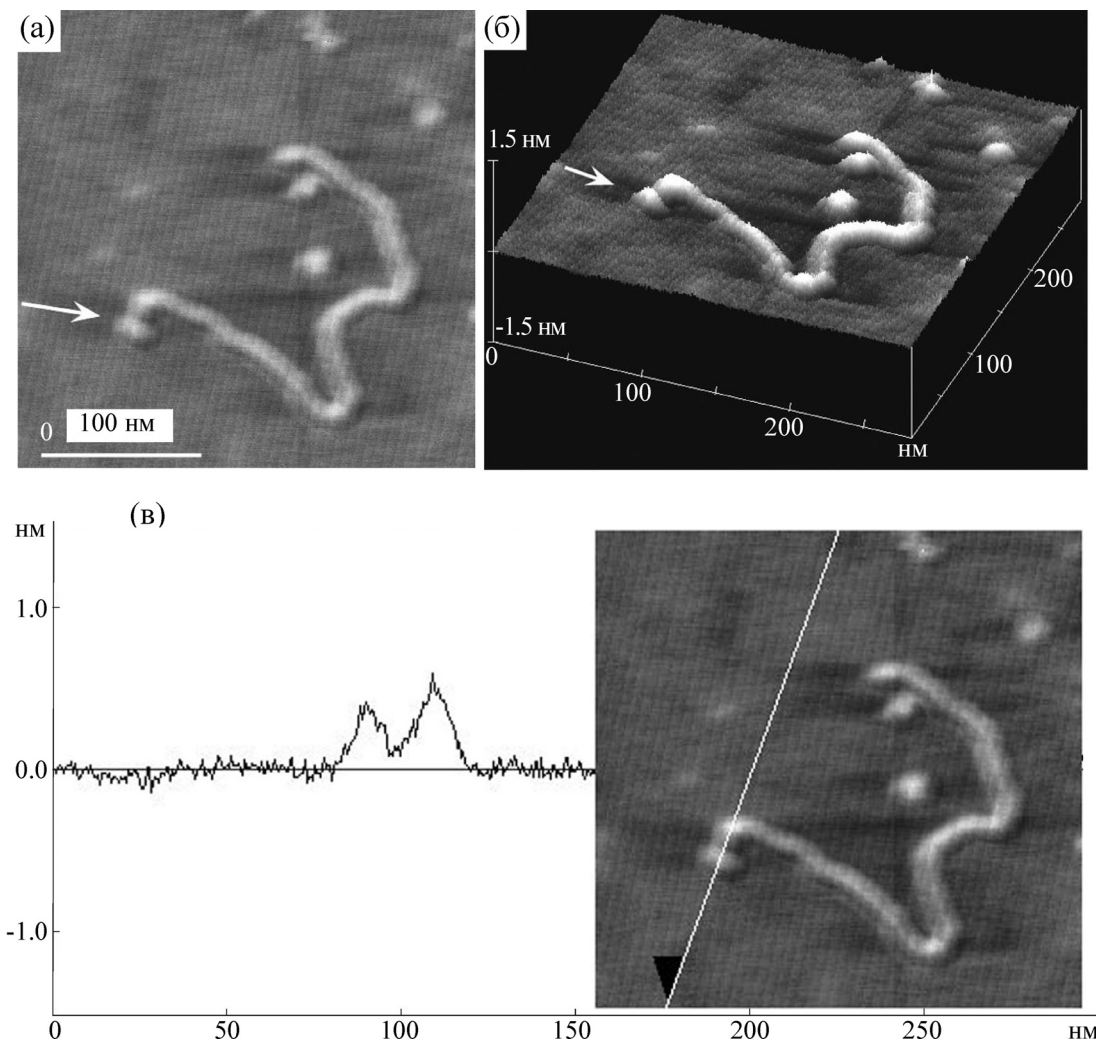


Рис. 8. Изображение единичной линейной ДНК длиной 1414 п.н., образовавшей комплекс с Т7 РНК-полимеразой (показан стрелкой) после проведения транскрипции в буфере А в течение 4 мин при $T = 37^{\circ}\text{C}$. Молекулы Т7 РНК-полимеразы выглядят как сферы диаметром около 8 нм. (а) – АСМ-изображение. Размер кадра – 280×280 нм. (б) – Трехмерное изображение. (в) – Сечение комплекса Т7 РНК-полимеразы с ДНК, из которого определена высота молекул ДНК и РНК-полимеразы. На вставке показана линия, вдоль которой проведена секущая плоскость перпендикулярно плоскости рисунка. Высота молекулы Т7 РНКП (H_1) в комплексе Т7 РНКП–ДНК составляет 0,3 нм, а молекулы ДНК (H_2) – 0,5 нм.

время среди довольно большого массива проанализированных комплексов ДНК–Т7 РНКП (свыше 200) были визуализированы комплексы, образованные полимеразой именно с концевыми фрагментами ДНК (около 30 комплексов). Типичные АСМ- и трехмерные изображения таких комплексов приведены на рис. 7 и рис. 8.

Рассмотрим также более детально визуализированные нами комплексы, образованные Т7 РНК-полимеразой на обоих концах ампликона. Для варианта транскрипции при $T = 37^{\circ}\text{C}$ в течение 4 мин обнаружен лишь один тип комплекса (рис. 8) – молекула Т7 РНКП присоединена к одному из концов ДНК-матрицы. Измеренная высота этого комплекса (рис. 8а, по-

казан стрелкой) непосредственно из АСМ-изображения с помощью построения сечений (рис. 8в) была равна $\sim 0,5$ нм, что соответствует высоте единичной молекулы Т7 РНКП. В то же время после проведения транскрипции при $T = 31^{\circ}\text{C}$ в течение 65 мин были визуализированы два типа комплексов, локализованных на обоих концах ДНК-матрицы (рис. 7), – комплексы Т7 РНКП и с промотором, и с терминатором. Высота другого комплекса Т7 РНКП–ДНК, показанного черной стрелкой на рис. 7а и рис. 7б, была равна 0,93–1,0 нм.

Важно, что процесс транскрипции можно рассматривать как своеобразное сканирование ДНК-матрицы РНК-полимеразой. Направление

сканирования задается последовательностью промотора в матричной нити ДНК [23]. 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 [24] и моделью перемещения белка вдоль ДНК (быстрого переноса белка между разными фрагментами ДНК с помощью механизмов одномерной диффузии и слабого неспецифического связывания) [25].

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 Т7 РНКП на обоих концах матрицы (рис. 7). При этом на рис. 7а 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. 7а и рис. 7б). На трехмерном изображении (рис. 7б) 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 ($I = 70-80$ мМ Na^+), что ведет к элиминации неспецифического связывания полимеразы с ДНК, и в данных условиях образовался только один комплекс Т7 РНКП-ДНК, то визуализирован-

ный концевой комплекс (показан белой стрелкой на рис. 7а и рис. 7б) является специфичным. Аналогичные комплексы Т7 РНКП с ДНК были также визуализированы в работе [26]. 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. 7а, 9а), показывает, что не одна, а несколько молекул РНКП иницируют транскрипцию с одного промотора. Эти данные согласуются с результатами работы [27], 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. В работе [27] продемонстрировано, 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 [4] 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., которую использовали в данной работе. Однако при проведении транскрипции в течение 4 мин (в буфере А) были визуализированы комплексы, которым присуще связывание лишь с одним концом ДНК-матрицы, подобные варианту, изображенному на рис. 8. В то же время при увеличении времени транскрипции до 65 мин нами детектированы комплексы Т7 РНКП с обоими концевыми фрагментами ДНК-матрицы (рис. 7). По нашему мнению, комплексы, показанные черными стрелками на рис. 7 и рис. 9, соответствуют 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 молекул Т7 РНКП внутри ДНК-матрицы

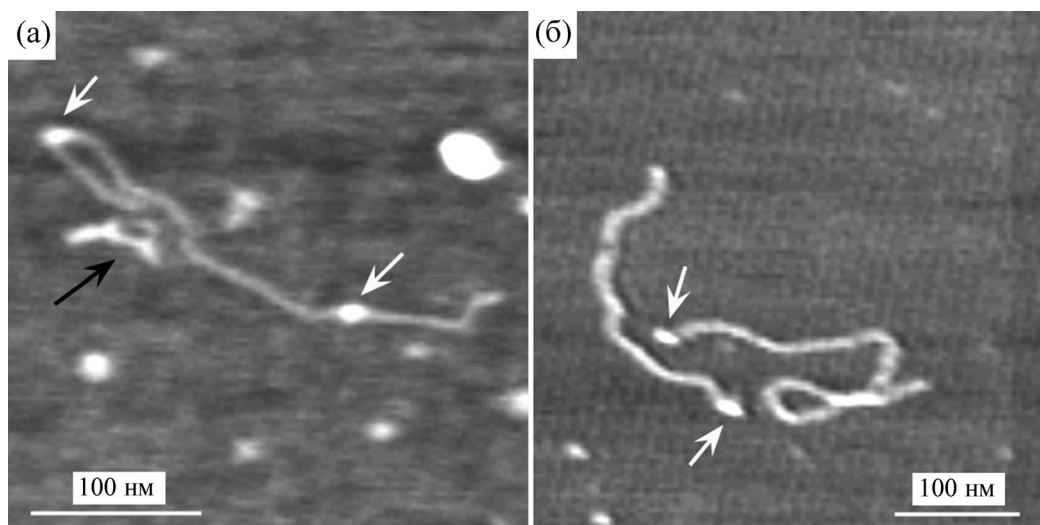


Рис. 9. АСМ-изображение комплексов T7 РНК-полимеразы с ДНК-матрицей. (а) – Белая стрелка указывает на молекулу РНКП, образовавшую комплекс с единичной молекулой ДНК в процессе транскрипции, а черная стрелка – на комплекс РНКП с терминатором транскрипции. Размер кадра – 323×323 нм. (б) – Белые стрелки указывают на комплексы единичных молекул T7 РНКП с концевыми фрагментами единичных молекул ДНК-матрицы. Размер кадра – 418×418 нм. Транскрипцию проводили в течение 65 мин при $T = 31^\circ\text{C}$.

при наличии комплексов на обоих терминальных сайтах ДНК-матрицы.

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 терминирования транскрипции. Поскольку константа связывания для молекулы T7 РНКП с высокоспецифичным сайтом промотора значительно превышает константу неспецифического связывания (с любым сайтом внутри ДНК-матрицы) [22], то в условиях диссоциации комплексов T7 РНКП–ДНК комплекс промотор–T7 РНКП является наиболее стабильным из образованных в процессах инициации и терминирования 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 терминирования, что также статистически повышает вероятность визуализации комплексов с концевыми фрагментами ДНК-матрицы.

Для визуализации непосредственно РНК-транскриптов ДНК-матрицу и праймеры удаляли с помощью инкубации реакционной смеси с ДНКазой I после проведения транскрипции. Полученные АСМ-изображения РНК-транскриптов представлены на рис. 10. Можно ви-

деть, что молекулы ДНК полностью удалены, что совпадает с результатами электрофореза (на электрофореграмме на рис. 2 можно видеть только полосу РНК-транскриптов), а белые точки соответствуют молекулам РНК-полимеразы, в комплексе с которыми и находятся РНК-транскрипты. Из АСМ-изображения с высоким разрешением было 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 (рис. 10б). Ранее с помощью АСМ [28] также было продемонстрировано, 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.

Отмеченные морфологические особенности молекул РНК, визуализированных с помощью АСМ, объясняются, по нашему мнению, значительным влиянием поверхностных свойств слюды, на которой иммобилизованы РНК-транскрипты. В свою очередь, поверхностные свойства субстрата определяются гидрофобностью и плотностью катионов, локализованных на поверхности слюды. Дело в том, что для визуализации молекул РНК используют ту же

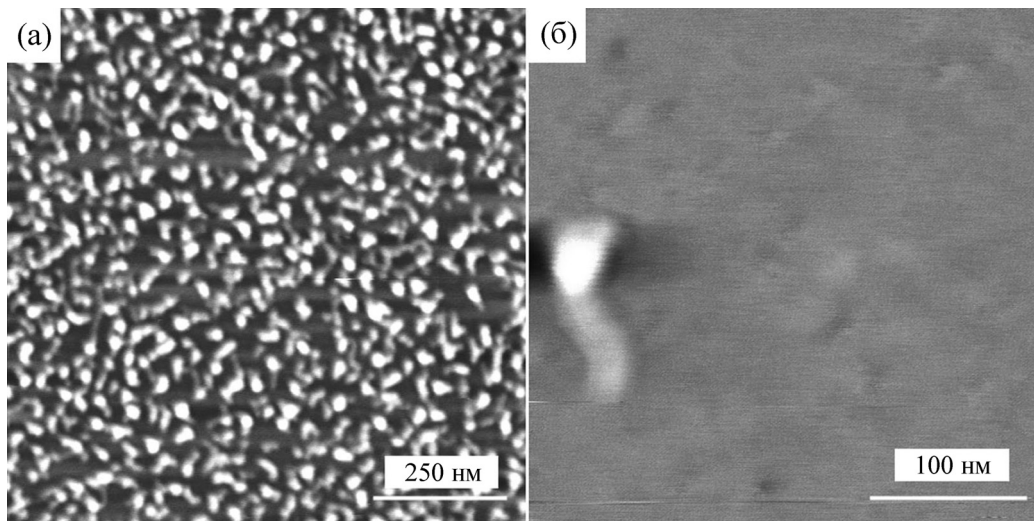


Рис. 10. АСМ-изображение РНК-транскриптов после проведения транскрипции с T7 РНК-полимеразой на матрице линейной ДНК рGEMEX длиной 1414 п.н. и обработки ДНКазой I. Ожидаемая длина транскриптов составляет 1100 н. Размер кадра: (а) – 1×1 мкм; (б) – 315×315 нм.

слюду, что и для визуализации молекул ДНК, т.е. слюду с такой гидрофобностью и поверхностной плотностью катионов, при которой линейные и суперспиральные двухнитевые молекулы ДНК не образуют конденсированные структуры при иммобилизации на поверхности слюды, а характеризуются равномерным распределением фрагментов ДНК. Ранее мы показали, что даже незначительное изменение гидрофобности и плотности катионов поверхности слюды приводит к значительному изменению морфологии иммобилизованных молекул ДНК [23,27]. Например, уменьшение гидрофобности ведет к существенному вытягиванию суперспиральных молекул ДНК, которое характеризуется увеличением спирального райза, т.е. расстояния между нуклеотидами вдоль оси дуплекса, от 0,34 нм (характерного для В-формы ДНК) до 0,48–0,53 нм. В то же время при увеличении гидрофобности и плотности катионов на поверхности слюды молекулы суперспиральной ДНК компактизируются – переходят в S-ДНК, или сжатые молекулы ДНК с расстоянием между нуклеотидами вдоль оси спирали 0,2 нм. Все сказанное дает возможность сделать вывод, что изменение гидрофобности и поверхностной плотности катионов слюды ведет к разительной компактизации или вытягиванию молекул линейной и суперспиральной ДНК.

Сравнительный анализ полученных результатов по визуализации конденсированных молекул РНК-транскриптов и единичных суперспиральных молекул ДНК, иммобилизованных на аминокислоте с разной гидрофобностью и поверхностной плотностью заряда [20,29], по-

казывает, что гидрофобность и поверхностная плотность катионов аминокислоты, 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 уменьшить поверхностную плотность катионов аминокислоты таким образом, чтобы при иммобилизации на ней молекул РНК формировались шпильчатые структуры или плектонемичные молекулы в отличие от визуализированных конденсированных структур.

Таким образом, в работе посредством атомно-силовой микроскопии визуализированы РНК-транскрипты и комплексы, которые образует T7 РНК-полимераза с концевыми фрагментами ДНК-матрицы 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 как комплексы с концевыми фрагментами ампликона, так и специфичные комплексы в области терминации и в процессе элонгации транскрипции.

Изучение комплексов, которые образует РНКП в процессе транскрипции, может быть важным для понимания широко обсуждаемой в литературе резистентности РНКП к антибактериальным препаратам. Ингибирование бактериальной РНКП является общепринятой стратегией антитуберкулезной терапии, поскольку РНКП является мишенью для некото-

рых антибиотиков. Анализ кристаллической структуры комплексов РНКП *T. aquaticus* с противотуберкулезными препаратами рифампицином и сорангицином позволил установить, что связывание данных антибиотиков вблизи активного центра РНКП вызывает блокирование элонгации РНК-транскриптов [30]. Резистентность к рифампицину, который может уничтожить нереплицирующиеся микобактерии туберкулеза, включает замену остатков внутри сайта связывания рифампицина на РНКП, что непосредственно уменьшает связывание рифампицина с молекулой РНКП. Поэтому, с точки зрения будущих АСМ-исследований, важным представляется изучение элонгационных комплексов клинических изолятов микобактерий туберкулеза, РНКП которых является более чем в 1000 раз чувствительной к стандартному противотуберкулезному антибиотику первого ряда рифампицину по сравнению с РНКП *E. coli* [31]. Дальнейшие исследования с использованием возможностей сканирующей зондовой микроскопии (визуализация *in vitro*, измерение силы межмолекулярных взаимодействий для пар единичных молекул) позволят получить, по мнению авторов, дополнительную информацию о механизмах межмолекулярного взаимодействия противотуберкулезных антибиотиков рифампицина, сорангицина, стрептолидигина, миксопиронина с бактериальной РНК-полимеразой, которая является молекулярной мишенью для них [30].

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

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Международного центра науки и технологий (Япония) и Национальной академии медицинских наук Украины (грант АМН 72/2007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. Ma, D. Temiakov, M. Jiang, et al., J. Biol. Chem. **277**, 43206 (2002).
2. P. E. Montesana, S. T. Chin-Bow, R. Sousa, and W. T. McAllister, J. Mol. Biol. **302**, 1049 (2000).
3. S. Mukherjee and R. Sousa, EMBO J. **22**, 6483 (2003).
4. W. McAllister, Nucl. Acids Mol. Biol. **11**, 15 (1997).
5. G. Skinner, C. Baumann, D. Quinn, et al., J. Biol. Chem. **279**, 3239 (2004).
6. G. Scong, E. Kobatake, K. Miura, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **291**, 361 (2002).
7. T. Tahirov, D. Temiakov, M. Anikin, et al., Nature **420**, 43 (2002).
8. D. Temiakov, M. Anikin, and W. T. McAllister, J. Biol. Chem. **277**, 47035 (2002).
9. C. Rivetti, S. Codeluppi, G. Dieci, and C. Bustamante, J. Mol. Biol. **326**, 1413 (2003).
10. W. Walter and V. Studitsky, Methods **33**, 18 (2004).
11. M. Guthold, M. Bezanilla, D. Erie, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 12927 (1994).
12. Y. Ebenstein, N. Gassman, S. Kim, and S. Weiss, J. Mol. Recognit. **22**, 397 (2009).
13. W. Rychlik, W. J. Spencer, and R. E. Rhoads, Nucl. Acids Res. **18**, 6409 (1990).
14. N. Komissarova, J. Becker, S. Solter, et al., Mol. Cell. **10**, 1151 (2002).
15. W. Rees, R. Keller, J. Vesenska, et al., Science **260**, 1646 (1993).
16. K. Kosikov, A. Gorin, X. Lue, et al., J. Am. Chem. Soc. **124**, 4838 (2002).
17. Л. И. Бродский, А. Л. Драчев, Р. Л. Татузов и К. М. Чумаков, Биополимеры и клетка **7**, 10 (1991).
18. Y. Lyubchenko, B. Jacobs, and S. Lindsay, Nucl. Acids Res. **20**, 3983 (1992).
19. А. П. Лиманский, Биофизика **50** (6), 1019 (2005).
20. Л. А. Лиманская и А. М. Лиманский, Молекулярная биология **40**, 122 (2006).
21. V. Studitsky, W. Walter, M. Kireeva, et al., Trends Biochem. Biosci. **29**, 127 (2004).
22. S. Smeekens and L. Romano, Nucl. Acids Res. **14**, 2812 (1986).
23. J. Milligan, D. Groebe, G. Witherell, and O. Uhlenbeck, Nucl. Acids Res. **15**, 8783 (1987).
24. M. Guthold, X. Zhu, and C. Rivetti, Biophys. J. **77**, 2284 (1999).
25. O. Berg, R. Winter, and P. Von Hippel, Biochemistry **20**, 6929 (1981).
26. N. Crampton, N. Thomson, J. Kirkham, et al., Eur. J. Oral. Sci. **114**, 133 (2006).
27. V. Epstein and E. Nudler, Science **300**, 801 (2003).
28. H. Hansma, L. Pietrasanta, R. Golan, et al., J. Biomol. Struct. & Dyn. **18**, 271 (2000).
29. Л. А. Лиманская и А. П. Лиманский, Биоорганическая химия **32**, 494 (2006).
30. M. X. Ho, B. P. Hudson, K. Das, et al., Curr. Opin. Struct. Biol. **19**, 715 (2009).
31. N. Zenkin, A. Kulbachinskiy, I. Bass, and V. Nikiforov, Antimicrob. Agents Chemother. **49**, 1587 (2005).

Study of Elongation Complexes for T7 RNA Polymerase

О. Limanskaya* * and A. Limanskii* ****

**Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of National Academy of Medical Sciences,
ul. Pushkinskaya 14, Kharkov, 61057 Ukraine*

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

****National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine»,
ul. Pushkinskaya 83, Kharkov, 61023 Ukraine*

Complexes of bacteriophage T7 RNA polymerase with a DNA template for transcription elongation were visualized by atomic force microscopy. Images for complexes of T7 RNA polymerase with terminal fragments of DNA template were obtained for single molecules. Complexes of a single DNA template molecule with several T7 RNA polymerase molecules corresponding to stages of initiation, elongation and termination of transcription were visualized under the elimination of unspecific DNA-protein binding. Immobilized on the amino mica RNA transcripts form rod-like condensed structures. Details of specific and unspecific complex formation for the T7 RNA polymerase–DNA system during initiation and transcription elongation are discussed.

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