

ВІЗУАЛІЗАЦІЯ КОМПЛЕКСІВ РНК-ПОЛІМЕРАЗИ БАКТЕРІОФАГА T7 ІЗ ДНК-МАТРИЦЕЮ У ПРОЦЕСІ ЕЛОНГАЦІЇ ТРАНСКРИПЦІЇ*

О. П. ЛИМАНСЬКИЙ

Інститут мікробіології та імунології ім. Мечникова АМН України, Харків;
e-mail: o.lymunskiy@mail.ru

За допомогою атомно-силової мікроскопії візуалізовано комплекси, утворені у процесі транскрипції РНК-полімеразою бактеріофага T7 (T7 РНКП) з ДНК-матрицею, яка містить промотор та внутрішній термінатор. На рівні одиничних молекул одержано зображення стабільних специфічних комплексів, утворених T7 РНКП з термінальним фрагментом ДНК-матриці, локалізованим на відстані близько 200 пар нуклеотидів від промотору. У процесі елімінації неспецифічного зв'язування візуалізовано одиничні молекули ДНК-матриці в комплексі з 2–3 молекулами T7 РНКП. Візуалізовані комплекси ДНК – T7 РНКП, в яких міститься 3 молекули білка на одній молекулі ДНК-матриці, відповідають етапам ініціації, елонгації та термінації транскрипції. Обговорюються особливості утворення специфічних та неспецифічних комплексів ДНК – РНК під час ініціації та елонгації транскрипції.

Ключові слова: транскрипція, T7 РНК-полімераза, промотор, атомно-силова мікроскопія.

Транскрипція є надзвичайно важливим етапом експресії генів та її регуляції. Синтез РНК-транскриптів, комплементарних матричному ланцюгу ДНК-матриці, здійснюється ДНК-залежною РНК-полімеразою (РНКП), яку найдетальніше вивчено в бактеріофага T7 [1–3] та бактерії *Escherichia coli* [4–6]. Обидва ці ферменти мають спільні структурні мотиви і однакові біохімічні параметри. Однак молекула РНКП бактеріофага T7 містить одну субодиницю, в той час як бактерії – декілька.

Після інфікування клітин *E. coli* фаг T7 упродовж життєвого циклу синтезує як мінімум 38 білків. Ранні гени (гени I класу), продукти яких виявлено відразу після інфікування клітин, транскрибуються РНКП *E. coli*. Гени II та III класів транскрибуються T7 РНКП пізніше. Порівняно із промоторами РНКП *E. coli*, відповідальними за транскрипцію генів I класу, геном фага T7 містить 17 промоторів T7 РНКП: 5 промоторів III класу (всі мають однаково послідовність із 23 нуклеотидів), 10 промоторів II класу та 2 так звані промотори реплікації – ϕ OL і ϕ OR. Послідовності промоторів ϕ OL та II класу, на відміну від 23 нуклеотидної послідовності промоторів III класу,

містять від одного до декількох нуклеотидів [7].

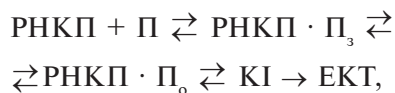
Транскрипцію розглядають як послідовність трьох етапів – ініціації, елонгації та термінації. На початку ініціації РНКП впізнає промотор, після чого відбувається плавлення фрагмента ДНК з утворенням одноланцюгової петлі. Односубодиничні РНКП впізнають промотори без участі допоміжних молекул, у той час як мультисубодиничним для зв'язування із промотором необхідні певні білки.

Стадія елонгації транскрипції включає перехід від комплексу із промотором та синтез РНК-транскрипта, який подовжується. Швидкість процесу для T7 РНКП становить близько 50–200 нуклеотидів/с [3, 8]. Додавання кожного нуклеотиду до транскрипта супроводжується вибором між елонгацією, тимчасовою зупинкою або паузою (проміжним конформаційним станом, за якого елонгація неможлива), припиненням транскрипції (проміжний конформаційний стан, перехід з якого до активного комплексу неможливий) та термінацією (вивільнення РНК-транскрипта і дисоціація РНКП з ДНК-матриці). Зазвичай РНК-полімераза впродовж елонгації рухається уздовж ДНК-матриці із кроком в один нук-

* Роботу частково виконано в Київському університеті (Laboratory of Plasma Membrane and Nuclear Signaling, Graduate School of Biostudies).

леотид, але можливий і її зворотний рух на один або декілька нуклеотидів, що зумовлює блокування транскрипції. Транскрипційний цикл завершується термінацією, після чого поновлюється новий цикл синтезу транскрипта. РНК-полімераза приєднує нуклеотиди до 3'-кінця РНК-транскрипта і має здатність видаляти некомплементарні включені до нього нуклеотиди. Комплекси, утворені під час елонгації транскрипції, досить стабільні, що робить їх зручним об'єктом для вивчення на рівні одиничних молекул.

Ініціація – це перший етап транскрипції, на якому відбувається пошук молекулою РНКП промотора і зв'язування з ним, унаслідок чого утворюється так званий закритий комплекс. Спочатку відбувається асоціація ферменту із дволанцюговою молекулою ДНК. Потім з використанням вільної енергії зв'язування такий комплекс перетворюється на відкритий з розкриттям 10–15 пар нуклеотидів (п.н.) навколо сайту старту транскрипції. Після утворення цього комплексу ініціації (КІ) спостерігається або приєднання нуклеотиду, або вивільнення короткого РНК-транскрипта (так звана абортівна ініціація). Якщо довжина останнього досягає близько 12 нуклеотидів, починається фаза елонгації транскрипції. Зазначені реакції можна узагальнити за спрощеною схемою:



де П – промотор, РНКП · П₃ та РНКП · П₀ – закритий і відкритий комплекси відповідно, КІ – абортівний комплекс ініціації (розмір РНК-транскриптів менше 12 п. н.), ЕКТ – елонгаційний комплекс транскрипції. Проте кількість комплексів, як правило, більша ніж у наведеному рівнянні [9].

На першому етапі транскрипції РНКП має точно та ефективно виявити промотор, незважаючи на велику кількість непромоторних фрагментів ДНК. Було припущено, що ефективність впізнавання полімеразою промотору полегшується через слабке неспецифічне зв'язування її з ДНК та швидке переміщення між різними фрагментами останньої [7]. Це, ймовірно, включає одновимірну дифузію ферменту вздовж ДНК, дисоціацію та реасоціацію, а також безпосереднє перенесення між фрагментами нуклеїнової кислоти. Запропонований механізм пошуку промотору важко виявити для масиву молекул, оскільки перехідні комплекси вздовж молекул ДНК утворюються несинхронно. Саме тому для

безпосередньої детекції та вивчення цих комплексів було розроблено різні варіанти аналізу на рівні одиничних молекул [10–13]. Останнім часом для цього найчастіше використовують флуоресцентну мікроскопію та атомно-силову мікроскопію (АСМ) як для візуалізації комплексів, що утворюються під час транскрипції, так і вивчення кінетики переходу від одного його типу до іншого.

Згідно із сучасними уявленнями і завдяки широкому розвитку наноманіпулювання макромолекулами (за допомогою методів оптичного або магнітного пінцета, АСМ в режимі силових вимірювань) ДНК-полімераза (ДНКП) та РНКП прийнято розглядати як потужні молекулярні мотори [8, 9]. Було показано, що для витягування молекули ДНК-матриці під час транскрипції РНКП розвиває силу до 30–40·10⁻¹² Н [14].

У цій роботі ми використовували АСМ з метою візуалізації сформованих у процесі транскрипції комплексів на ДНК-матриці, що містять промотор і область термінації транскрипції Т7 РНКП. Хоча сайти промотору та термінації транскрипції локалізуються на ДНК-матриці на відстані близько 90 і 200 п. н. від 3'- та 5'-кінця відповідно, нами візуалізовано стабільні комплекси, які утворюють одиничні молекули Т7 РНКП з термінальними сайтами матриці.

Матеріали і методи

Проведення транскрипції. Як матрицю в цьому процесі використовували амплікон (довжина 1414 п.н.), що містив промотор (1211–1230) та область термінації транскрипції Т7 РНКП (91–182). Нумерацію наведено для матричного ланцюга ДНК. ДНК-матрицю одержували методом рестрикції ендонуклеазою ScaI («New England Biolabs», Велика Британія) суперспіральної ДНК рGEMEX («Promega», США) довжиною 3993 п.н. із наступною ампліфікацією та очищенням амплікона (рис. 1, А). Транскрипцію здійснювали відповідно до нижченаведених протоколів при різних температурних та часових параметрах за участю Т7 РНКП («Promega», США), MegaScript Т7 («Ambion», США) та набору для транскрипції фірми «New England Biolabs» (Велика Британія).

В експериментах для транскрипції використовували 3 буфери: буфер А («Promega», США), буфер Б («Ambion», США) та буфер В, склад якого наведено у статті [15]. Буфер А (об'єм 20 мкл) мав такий склад: 40 мМ Tris-HCl (рН 7,9), 6 мМ MgCl₂, 10 мМ NaCl, 10 мМ дитіотреїтолу, 2 мМ спермидину, 0,05% твіну

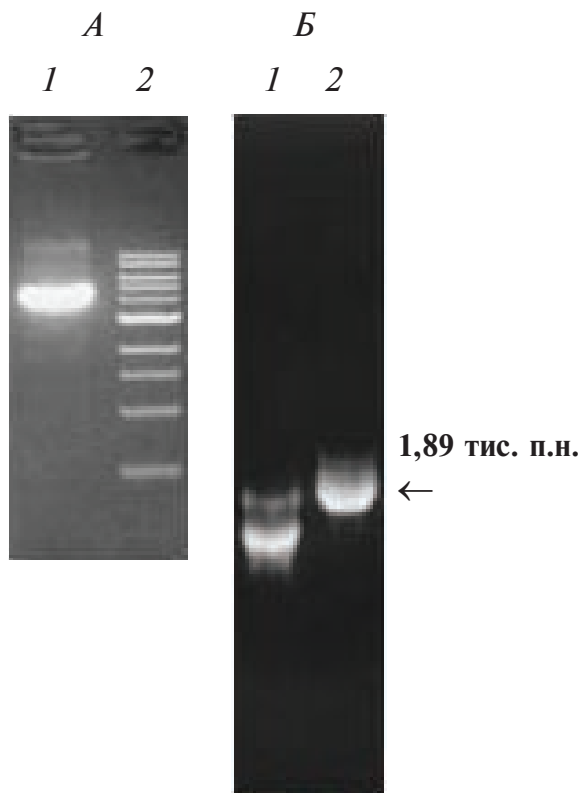


Рис. 1. А – Електрофореграма лінійної ДНК pGEMEX у 1,5%-му агарозному гелі після рестрикції суперспіральної ДНК pGEMEX ендонуклеазою ScaI: 1 – лінійна ДНК pGEMEX (довжина 3993 п.н.), 2 – маркер молекулярної маси (1000 п.н.). Смуга підвищеної інтенсивності відповідає фрагменту ДНК з довжиною 3000 п.н. Б – Аналіз РНК-транскриптів після проведення транскрипції з T7 РНКП на матриці фрагмента лінійної ДНК pGEMEX довжиною 1414 п.н. (1) і контрольній плазміді pTRI-Xef (2) та електрофорезу за умов денатурації в 1,2%-у агарозному гелі у присутності 1,8% формальдегіду. Очікувана довжина транскриптів – від 1032 до 1122 нуклеотидів.

20, 40 од. інгібітору РНК-азину і 20 од. РНКП. Реакцію транскрипції ініціювали додаванням до реакційної суміші рибонуклеотидів СТР, GTP, UTP та АТР (кінцева концентрація – 200 мкМ). Транскрипцію здійснювали протягом 4 хв при температурі 37 °С. Буфер Б (об'єм 20 мкл) містив реакційну суміш для транскрипції («Ambion», США), 40 од. РНК-азину, 20 од. РНКП та по 20 мкМ СТР, GTP, UTP і АТР. Після 20–65 хв інкубації при 31 °С реакцію зупиняли нагріванням протягом 15 хв при температурі 70 °С. Буфер В (об'єм 20 мкл) містив 20 мМ трис-НСl (рН 7,9), 5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 1 мМ дитіотреїтол, 40 од. РНК-азину і 20 од. РНК-полімерази.

Реакцію транскрипції ініціювали додаванням до інкубаційної суміші рибонуклеотидів (СТР, GTP, UTP та АТР) до кінцевої концентрації 100 мкМ. Після 65 хв інкубації при температурі 31 °С реакцію зупиняли швидким охолодженням розчину до 0 °С.

Для видалення матриці ДНК та продуктів деструкції нуклеїнової кислоти, які можуть забруднювати препарат РНК, після проведення транскрипції до реакційної суміші додавали 1 мкл ДНК-ази I, очищеної від РНК-аз («Ambion», США). Інкубацію здійснювали протягом 15 хв при 37 °С. Для інактивації ДНК-ази реакційну суміш нагрівали 10 хв при 70 °С. Ефективність транскрипції після її припинення визначали електрофоретичним методом у 1,2%-у агарозному гелі, що містив 1,8% формальдегіду (рис. 1, Б). Транскрипцію проводили у спеціальній кімнаті, призначеній для роботи з нуклеїновими кислотами. Розчини виготовляли на воді, очищеній від РНК-аз. Для інгібування ферменту воду обробляли діетилпіридинкарбонатом (DEPC). Ефективність транскрипції визначали за реакцією з контрольною ДНК-матрицею – плазмідною pTRI-Xef, що містила промотор транскрипції T7 РНКП з набору “MegaScript T7” («Ambion», США). РНК-транскрипти, утворені після транскрипції на плазміді pTRI-Xef, мали очікувану довжину – 1890 нуклеотидів, яку визначали після проведення електрофорезу з РНК-маркерами («Promega», США). Останні використовували як маркери молекулярної маси. Для проведення електрофорезу за умов денатурації 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% Ds-Na.

Атомно-силова мікроскопія (АСМ). У роботі використовували атомно-силовий мікроскоп Nanoscope IV MultiMode System («Veeco Instruments Inc.», США) з Е-сканером. АСМ-зображення ДНК записували за допомогою вібрувального варіанта мікроскопа в повітрі і режимі “висота”, застосовуючи OMCL-АС160TS-кантилевери («Olympus Optical Co.», Японія). Резонансна частота становить 340–360 кГц, константа твердості – 42 Н/м. Зображення, одержані у форматі 512 × 512 пікселів, було згладжено та проаналізовано з використанням програми “Nanoscope” (версія 5.12r3); («Veeco Instruments Inc.», США).

Підготовка ДНК для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та комплексів ДНК – T7 РНКП для АСМ. ПЛР здійснювали із

сконструйованими нами праймерами L1 та L2, які обмежують фрагмент ДНК рGEMEX, що містить промотор і область термінації транскрипції T7 РНКП (Rho-незалежний або внутрішній термінатор транскрипції [1]). Послідовності обох праймерів («Sigma», Японія) з відповідними позиціями на суперспіралізованій ДНК рGEMEX наведено нижче:

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

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

ПЛР із гарячим стартом проводили в 50 мкл реакційної суміші на ампліфікаторі GeneAmp 9700 («Perkin Elmer», США) при таких температурних та часових параметрах: 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 з метою мінімізації неспецифічних ПЛР-продуктів визначали теоретично за допомогою програми «Oligo», ґрунтуючись на температурі плавлення праймерів. Для візуалізації ампліконів 15 мкл ПЛР-продукту, розділеного шляхом електрофорезу в 2%-у агарозному гелі, забарвлювали бромистим етидієм.

Для очищення ампліфікованого фрагмента ДНК використовували наступну процедуру. Після електрофорезу вирізали смугу гелю, що містила амплікон, опромінюючи електрофореграму довгохвильовим УФ-джерелом випромінювання низької інтенсивності («BioRad», США). Подальше очищення амплікона від дезоксирибонуклеотидів, праймерів, ДНК-полімерази та етидію бромистого здійснювали застосовуючи набір «QIAquick PCR purification kit» («QIAGEN», Японія) відповідно до рекомендацій виробника, а також екстракцією фенол-хлороформом із наступним переосадженням етанолом.

Для проведення ПЛР використовували термостабільну ДНК-полімеразу високої точності – ДНК-полімеразу Pfu94 («Takara Co.», Японія) та ДНК-полімеразу Invitrogen Platinum («Invitrogen», Японія). Обидва ферменти характеризуються максимальною активністю при температурі 74 °С. З огляду на це, саме за таких умов здійснювали третій етап ампліфікації.

Комплекси ДНК – T7 РНКП наносили на свіжосколоту сльоду використовуючи 10 мМ Перес-буфер за наявності в ньому 2,5 мМ MgCl₂, або буфер, в якому здійснювали транскрипцію, оскільки він також містив катіони магнію. На смугу сльоди (площа 1 см²)

наносили краплю розчину (10 мкл) комплексу ДНК – T7 РНКП у транскрипційному буфері. Після 2-хвилинної експозиції сльоду промивали ультрачистою водою (за відсутності в ній РНК-аз) і обдували потоком азоту, після чого відразу проводили процедуру візуалізації.

Концентрацію T7 РНК-полімерази (молекулярна маса 98,8 кДа) у вихідному розчині реєстрували спектрофотометричним методом з використанням контрольного набору реагентів для визначення концентрації бичачого сироваткового альбуміну («Pierce», США). На основі калібрувального графіка залежності поглинання світла від відомої концентрації бичачого сироваткового альбуміну (для трьох значень концентрацій БСА) визначали концентрацію проміжного розчину T7 РНКП. Концентрація вихідного розчину T7 РНКП («Promega») становила $6,6 \cdot 10^{-6}$ М, а ДНК рGEMEX, яку використовували як матрицю для транскрипції, за умов АСМ-візуалізації – 200–800 фМ. У разі візуалізації комплексу ДНК – T7 РНКП величина співвідношення молярних концентрацій компонентів варіювала від 1 до 100. Відповідні розчини T7 РНКП готували методом послідовних розведень вихідного розчину.

Для візуалізації РНК-транскриптів видаляли ДНК-матрицю та продукти деструкції ДНК, що, зазвичай, забруднюють препарат РНК. Після проведення транскрипції до реакційної суміші додавали 1 мкл ДНК-ази I, вільної від РНК-аз («Ambion», США). Реакційну суміш інкубували 15 хв при температурі 37 °С. ДНК-азу інактивували протягом 10 хв і температурі 70 °С.

Результати та обговорення

На ефективність транскрипції впливає багато факторів, зокрема температура та тривалість реакції, концентрація компонентів і йонна сила розчину. Тому візуалізацію комплексів ДНК – T7 РНКП після транскрипції проводили при різних температурних та часових параметрах, а також із використанням трьох буферів для транскрипції, що відрізнялися як за складом, так і концентрацією компонентів.

Відомо, що зниження температури інкубації від 37 до 30 °С під час транскрипції збільшує частку повнорозмірних РНК-транскриптів. Водночас досить висока концентрація NaCl (> 30 мМ) може бути чинником зниження кількості РНК-транскриптів через можливу преципітацію ДНК-матриці [16]. Слід зазначити, що йонна сила буферів, використаних для транскрипції, становила 70–80 мМ Na⁺.

Контролем слугувало АСМ-зображення молекул ДНК-матриці або амплікона, іммобілізованих на свіжосколотій слюді в Нерес-буфері (рис. 2, А). Використовуючи побудований нами графік Гауссового розподілу контурної довжини ампліконів [16], вимірної безпосередньо на АСМ-зображенні, визначали контурну довжину ДНК-матриці. Виявилось, що контурна довжина досліджуваних ампліконів (435 ± 15 нм) менше теоретичного значення довжини молекул ДНК у В-формі майже на 10%. Раніше С. Rivetti et al. також установили, що контурна довжина молекул ДНК, обчислена з використанням АСМ-зображень молекул у повітрі, завжди менше очікуваної [15]. Таке зменшення лінійної довжини молекули майже на 45 нм для амплікона з довжиною 1414 п.н. істотно вище похибки її вимірювання за допомогою програмного забезпечення і значно більше роздільної здатності АСМ для біомолекул. Водночас висушування зразка ДНК після нанесення на поверхню слюди може спричинити перехід молекул із В-форми, характерної для розчину, в А-форму з меншою контурною довжиною.

На основі аналізу наведених даних ми припустили, що основними факторами індукції В \rightarrow А-переходу молекул ДНК, адсорбованих на поверхні свіжосколотої слюди після

іммобілізації зразка в буфері і у присутності іонів магнію, є процедура висушування зразка і поверхневі властивості слюди. Контурна довжина ДНК-матриці в комплексі з Т7 РНКП в буфері А для транскрипції (без проведення транскрипції), яку визначали також за Гауссовим розподілом, становить 386 ± 13 нм (рис. 2, Б). Таке істотне зменшення її пояснюється декількома причинами. По-перше, одночасна наявність у складі транскрипційного буфера А іонів магнію і спермидину істотно змінює порівняно з Нерес-буфером поверхневі властивості слюди, на якій іммобілізуються молекули ДНК. Збільшення щільності катіонів на поверхні слюди може призводити до переходу молекул ДНК з канонічної В-форми до стиснутої S-форми. При цьому, як показано нами раніше, лінійні та суперспіральні молекули S-ДНК на поверхні слюди з високою поверхневою щільністю заряду характеризуються значним зменшенням контурної довжини внаслідок зменшення відстані між нуклеотидами вздовж осі спіралі [17]. По-друге, зменшення контурної довжини молекул ДНК в комплексі з Т7 РНКП можна пояснити намотуванням її на молекулу РНКП. Відповідну модель запропонували G. Filsenfeld et. al. [6]. Аналогічні результати з компактизації ДНК описано для РНКП *E. coli* в роботі [15]. С. Bustamante et al.,

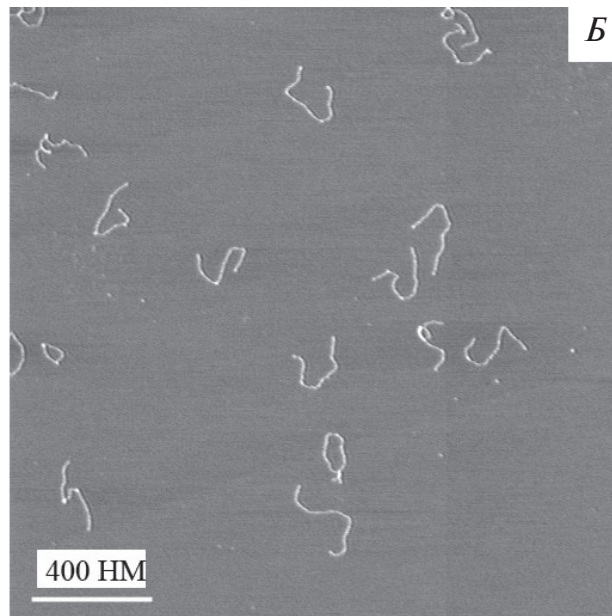
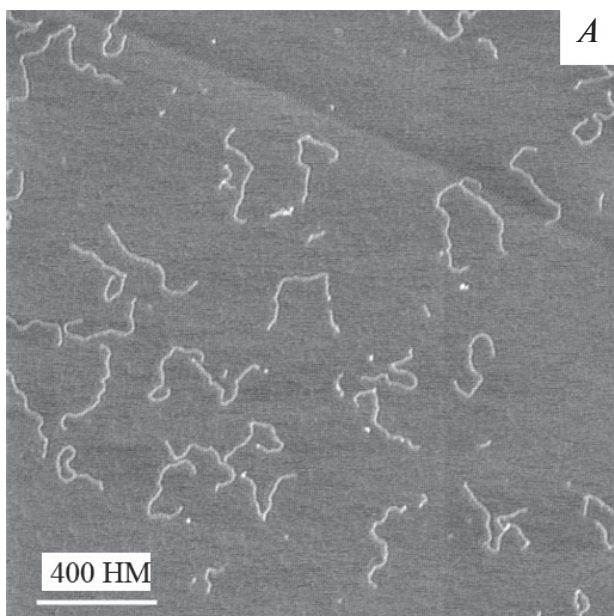


Рис. 2. А — АСМ-зображення молекул лінійної ДНК рGEMEX з довжиною 1414 п.н. (після проведення ПЛР з ДНК-полімеразою Invitrogen Platinum), використаної як матриця для транскрипції, після іммобілізації на свіжосколотій слюді у Нерес-буфері, що містив 2,5 мМ $MgCl_2$. Б — АСМ-зображення комплексу Т7 РНКП-ДНК у буфері А для транскрипції (без проведення транскрипції). Розмір кадрів А і Б — $2,08 \times 2,08$ мкм та 2×2 мкм відповідно.

застосовуючи візуалізацію елонгаційних комплексів РНКП з ДНК-матрицею за допомогою АСМ і блокування транскрипції на певних сайтах, виявили, що молекула ДНК дійсно намотується на молекулу РНКП.

Важливо відзначити, що в разі взаємодії ДНК із Т7 РНКП утворюються як специфічні, так і неспецифічні комплекси. Специфічне зв'язування, тобто взаємодія із промотором, відносно нечутливе до зміни іонної сили реакційної суміші, однак залежить від конформації фрагмента ДНК. Неспецифічні комплекси ДНК–Т7 РНКП виникають унаслідок електростатичної взаємодії позитивно заряджених залишків ферменту з негативно зарядженими фосфатними групами ДНК. Неспецифічне зв'язування надзвичайно чутливе до зміни іонної сили розчину і нечутливе до ступеня спіралізації ДНК. Аналізуючи властивості специфічних та неспецифічних комплексів ДНК–РНКП, дійшли висновку, що головним механізмом регуляції транскрипції бактеріофага Т7 є ефективність або швидкість утворення відкритого комплексу РНКП із промотором, але не зв'язування з різними промоторами [7].

У дослідах ми використовували промотор, локалізований в позиції 1212–1231 ДНК-матриці, тобто на відстані близько 200 нуклеотидів від кінця амплікона, що відповідає відстані близько 70 нм (200 нуклеотидів \times 0,34 нм). Слід зазначити, що АСМ дозволяє надійно візуалізувати комплекс, який утворюється на такій відстані від кінця амплікона. Водночас серед доволі великого масиву комплексів ДНК–Т7 РНКП (понад 200) нами виявлено такі (близько 30), що утворюються полімеразою саме з термінальними (тобто кінцевими) фрагментами ДНК. Типові АСМ- та тривимірні зображення їх наведено на рис. 3–5. Важливо, що процес транскрипції можна розглядати як своєрідне сканування ДНК-матриці РНКП, напрямок якого визначається послідовністю промотору в матричному ланцюзі ДНК [18]. Але для пошуку промотору та виключення можливості пропуску його сайту такою високоточною “машиною”, як РНКП, на нашу думку, полімераза починає сканування з кінцевого фрагмента ДНК, локалізованого біля промотору. Саме цим ми пояснюємо досить значну кількість візуалізованих термінальних комплексів або тих, які передують утворенню комплексів ініціації транскрипції. Наші припущення узгоджуються з експериментальними результатами з АСМ-візуалізації дифузії РНКП під час пошуку промотору [19] та моделлю переміщення її вздовж ДНК (швидкого перене-

сення між різними фрагментами молекули за механізмами одновимірної дифузії та слабого неспецифічного зв'язування) [20].

На іншому кінці ДНК-матриці роташована область термінації транскрипції (91–182 п.н.) на відстані близько 90 п.н. від кінця амплікона. Ефективність цього термінатора становить 70–80%. Після досягнення термінатора елонгаційний комплекс (ДНК – РНКП – РНК-транскрипт) зупиняється і дисоціює. Проте нами візуалізовано декілька молекул ДНК, що утворюють комплекс із Т7 РНКП на обох кінцях матриці (рис. 4). При цьому (рис. 4, А) можна бачити три молекули Т7 РНКП, які асоціюються з ДНК: одна утворює комплекс ініціації (біла стрілка), друга – комплекс в області термінації транскрипції (чорна стрілка), а третя молекула міститься всередині ДНК-матриці. Наявність декількох молекул Т7 РНКП, в комплексі з однією молекулою ДНК, свідчить, що після початку транскрипції за участю однієї молекули Т7 РНКП інша молекула для наступної преініціації та елонгації транскрипції може асоціюватися з термінальним фрагментом ДНК-матриці, локалізованим поряд із промотором Т7 РНКП.

В області термінації транскрипції виявлено декілька молекул Т7 РНКП, асоційованих з ДНК-матрицею (чорна стрілка на рис. 4, А та 4, Б). На тривимірному зображенні (рис. 4, Б), крім термінальних комплексів ДНК – Т7 РНКП, зображено ще 5 молекул полімерази, незв'язаних із ДНК-матрицею. Оскільки реакцію транскрипції проводили в умовах надлишку Т7 РНКП та досить високого значення іонної сили ($I = 70\text{--}80 \text{ мМ Na}^+$), що спричинює ілімінацію неспецифічного зв'язування полімерази з ДНК і утворення тільки одного комплексу ДНК – Т7 РНКП, то візуалізований термінальний комплекс (біла стрілка на рис. 4, А та 4, Б) є специфічним. Аналогічні комплекси Т7 РНКП з ДНК були також візуалізовані N. Crampton et al. [21]. Але, вірогідно, автори помилково їх інтерпретували як неспецифічні.

Наявність декількох молекул Т7 РНКП у комплексі з ДНК-матрицею, утвореному у процесі ініціації та елонгації транскрипції (рис. 4, А та 5, А), свідчить, що не одна, а декілька молекул РНКП ініціюють транскрипцію з одного промотору. Ці дані узгоджуються з результатами, описаними в роботі [3], в якій показано можливість об'єднання молекул РНКП під час елонгації транскрипції. Відомо, що в бактеріальних та евкаріотних клітинах транскрипція здійснюється з високою швид-

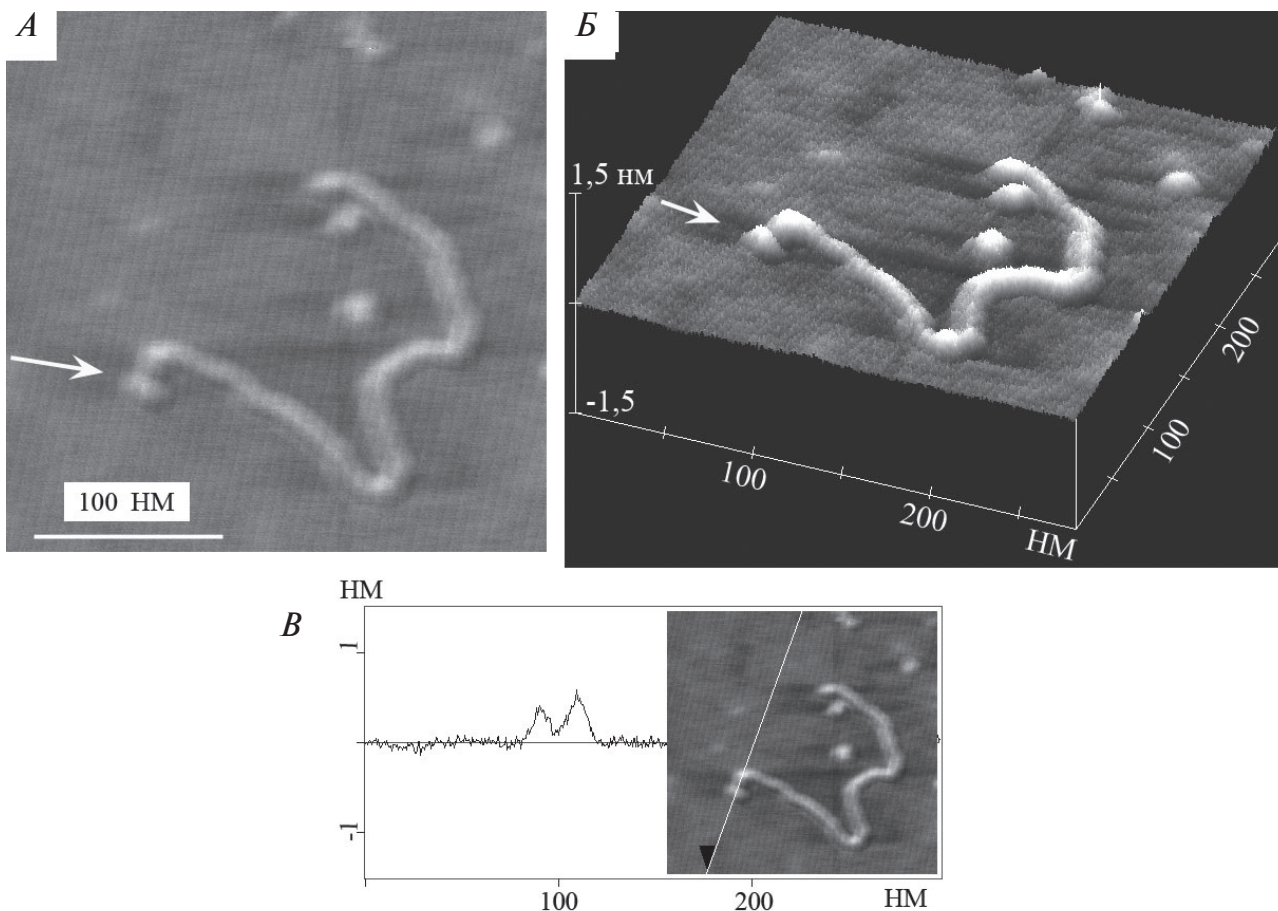


Рис. 3. Зображення одиної лінійної ДНК (довжина молекули 1414 п.н.) в комплексі з T7 РНКП (показано стрілкою) після проведення транскрипції в буфері А протягом 4 хв при 37 °С. Молекули T7 РНК-полімерази подібні до сфери, діаметр якої становить близько 20 нм. А – АСМ-зображення, розмір кадру – 280 × 280 нм; Б – тривимірне зображення комплексу ДНК – T7 РНКП; В – зріз комплексу T7 РНКП з ДНК, з якого визначено висоту цих молекул. На вставці показано лінію, вздовж якої проведено площину перпендикулярно до площини рисунка. Висота молекул T7 РНКП і ДНК становить відповідно 0,3 та 0,5 нм.

кістю, незважаючи на наявність численних точок її блокування. E. Nudler et al. показали, що більшість внутрішніх та зовнішніх локусів блокування транскрипції (сигналів паузи та зупинки) зникають, якщо більше ніж одна молекула РНКП ініціює транскрипцію з одного і того самого промотору. Навпаки, в разі одиного циклу транскрипції наявність внутрішніх термінаторів істотно впливає на швидкість елонгації та вихід повновимірних транскриптів.

У цій роботі ми зосередили увагу на візуалізації комплексів T7 РНКП з кінцевими фрагментами ДНК. Через швидку дисоціацію РНК-транскриптів з елонгаційного комплексу досить важко візуалізувати РНК-транскрипти очікуваної довжини. Так, наприклад, у роботі [22] на АСМ-зображеннях

нечітко ідентифікуються РНК-транскрипти в комплексі ДНК – T7 РНКП, насамперед через їхню незначну довжину. Проте і за таких умов РНК-транскрипти були нами візуалізовані. Для цього після проведення транскрипції ми видаляли ДНК-матрицю та праймери в інкубаційній транскрипційній суміші, що містила ДНК-азу I. АСМ-зображення РНК-транскрипта наведено на вставці (рис. 5, Б). Біла крапка відповідає молекулі T7 РНКП у комплексі з РНК-транскриптом. Виміряна на АСМ-зображенні довжина РНК-транскриптів (122 ± 10 нм) свідчить, що одониткові молекули РНК утворюють мультиланцюгові конденсовані структури. Одержані нами дані узгоджуються з результатами АСМ-візуалізації молекул РНК, наведеними в роботі [23], в якій показано, що РНК-транскрипти утворюють

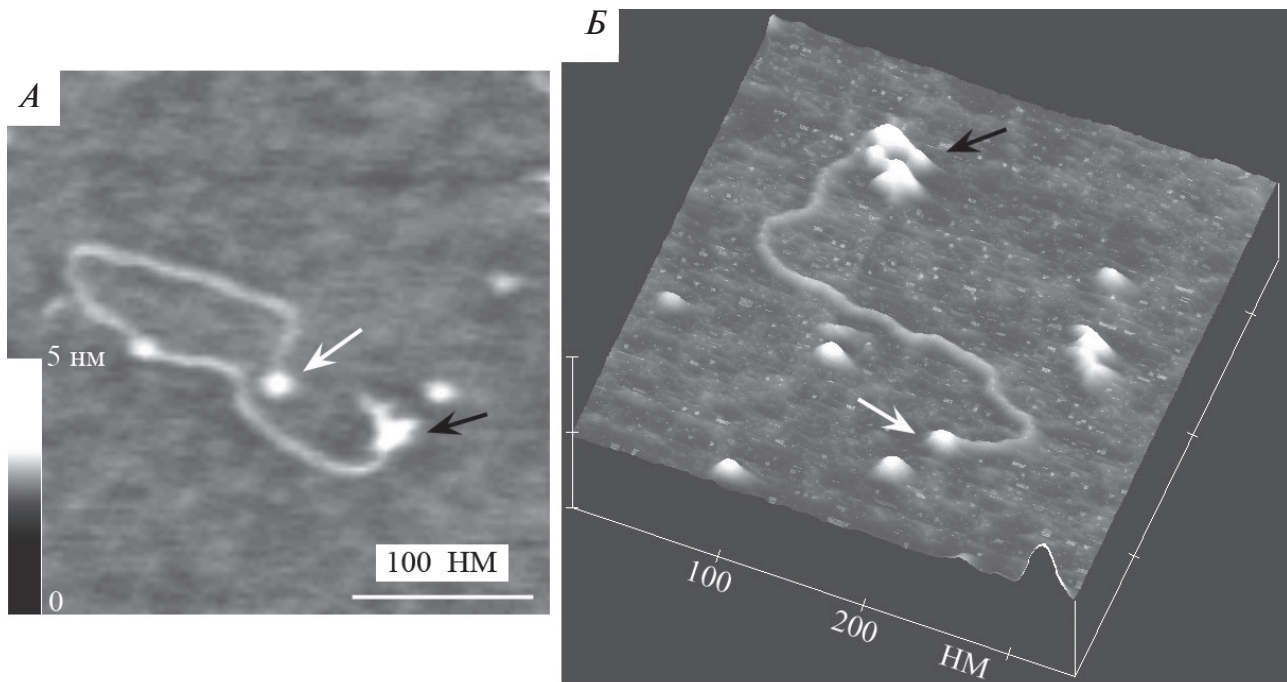


Рис. 4. АСМ-зображення (А) та тривимірне зображення (Б) комплексів Т7 РНКП і термінальних фрагментів ДНК-матриці. Біла стрілка – комплекс ініціації, чорна – комплекс в області термінації транскрипції. А – розмір кадру – 297×297 нм. Наведено шкалу градацій, яка відповідає діапазону висоти від 0 до 5 нм. Транскрипцію здійснювали протягом 65 хв при 31°C .

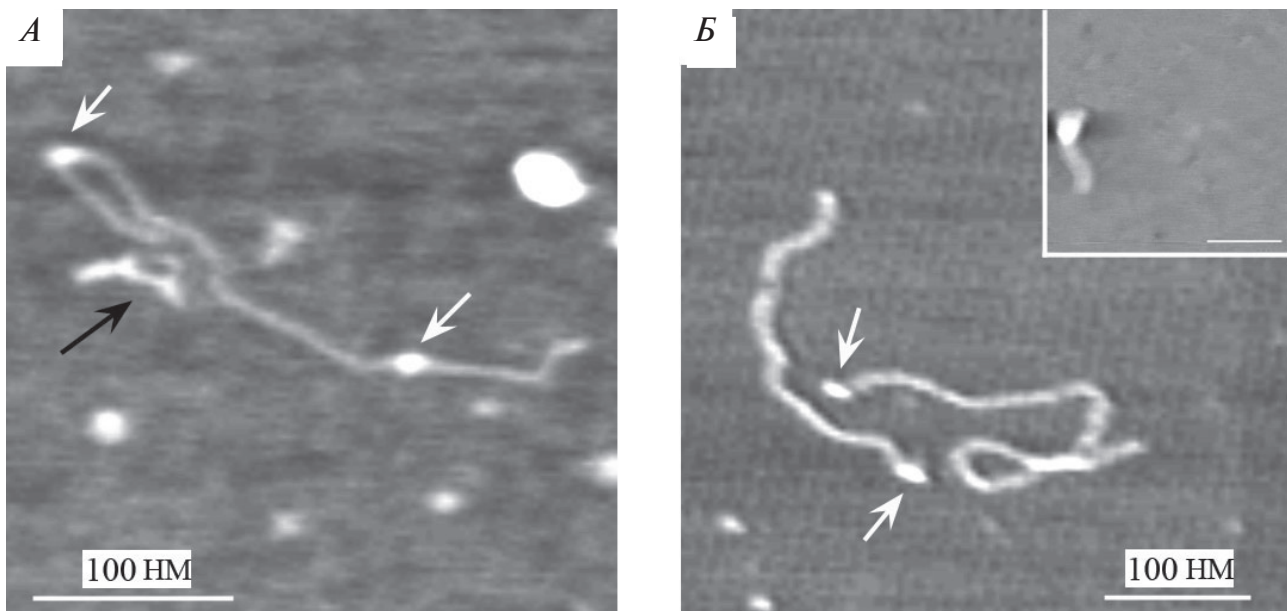


Рис. 5. АСМ-зображення комплексів Т7 РНК-полімерази з ДНК-матрицею. А – біла стрілка вказує молекулу РНКП, що утворює комплекс з однією молекулою ДНК у процесі транскрипції, чорна стрілка – на комплекс РНКП з термінатором транскрипції (розмір кадру – 323×323 нм). Б – білі стрілки вказують на комплекс однієї молекули Т7 РНКП з термінальними фрагментами однієї молекули ДНК-матриці (розмір кадру – 418×418 нм). Транскрипцію здійснювали протягом 65 хв при температурі 31°C . На вставці наведено АСМ-зображення РНК-транскрипта після транскрипції з Т7 РНКП на матриці лінійної ДНК рGEMEX та оброблення ДНК-азою І (розмір кадру на вставці – 315×315 нм). Довжина смужки – 100 нм.

подібні конденсовані структури, довжина яких удвічі менша очікуваної.

Візуалізація одиничних молекул суперспіральної ДНК, іммобілізованих на субстраті [24], свідчить, що надсуперспіралізація та компактизація їх відбуваються *in vitro* за відсутності протеїнів, однак необхідною умовою для цього є висока поверхнева щільність позитивного заряду субстрату, на якому іммобілізовано суперспіральну ДНК. Ми припускаємо, що за допомогою АСМ-візуалізації ДНК, іммобілізованої на модифікованій амінослюді, та комплексів ДНК з білками можливе моделювання процесів, які відбуваються із нативними молекулами ДНК *in vivo*, оскільки в ядрі вона міститься в середовищі з високою щільністю заряджених залишків різноманітних молекул, передусім білків.

Таким чином, нами візуалізовано комплекси, утворені Т7 РНКП з термінальними фрагментами ДНК-матриці у процесі транскрипції. Показано, що на одній молекулі ДНК-матриці (яка містить промотор та внутрішній термінатор транскрипції [25, 26]) у разі елімінації неспецифічного зв'язування молекули Т7 РНКП виявлено як специфічні термінальні комплекси з кінцевими фрагментами амплікона, так і комплекси в області термінації та у процесі елонгації транскрипції. Важливо, що термінальному комплексу ДНК – Т7 РНКП притаманна стабільність, специфічність і локалізація на кінцевому фрагменті амплікона – на відстані близько 200 п.н. від промотору. Подальші експерименти з використанням можливостей АСМ (візуалізації безпосередньо в буферному розчині, вимірювання сили міжмолекулярної взаємодії на рівні пар одиничних молекул) дозволять одержати детальнішу інформацію щодо елонгаційних комплексів транскрипції.

Робота частково підтримана грантом Japanese Society for the Promotion of Science (Японія), а також грантом АМН України.

Автор висловлює щире подяку О. Ю. Лиманській (ННЦ Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини) за конструктивні дискусії та критичні зауваження під час підготовки статті.

ВИЗУАЛІЗАЦІЯ КОМПЛЕКСОВ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ БАКТЕРИОФАГА Т7 С ДНК-МАТРИЦЕЙ ПРИ ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

А. П. Лиманский

Институт микробиологии и иммунологии
им. Мечникова АМН Украины, Харьков;
e-mail: o.lymunskiy@mail.ru

С помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) визуализированы комплексы, которые образует РНК-полимераза бактериофага Т7 (Т7 РНКП) с ДНК-матрицей, содержащей промотор и внутренний терминатор транскрипции Т7 РНКП. На уровне единичных молекул получено изображение стабильных специфических комплексов, образованных Т7 РНКП с терминальным фрагментом ДНК-матрицы, локализованных на расстоянии около 200 п.н. от промотора Т7 РНКП. В условиях подавления неспецифического связывания визуализированы единичные молекулы ДНК-матрицы, с которыми образуют комплексы 2–3 молекулы Т7 РНКП, соответствующие этапам инициации элонгации, терминации и транскрипции. Обсуждаются особенности образования специфических и неспецифических комплексов для системы ДНК–РНКП при инициации и элонгации транскрипции.

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

**VISUALIZATION OF BACTERIOPHAGE
T7 RNA-POLYMERASE COMPLEXES
WITH DNA TEMPLATE UNDER
TRANSCRIPTION ELONGATION**

A. P. Limanskii

Institute of Microbiology and Immunology, Academy
of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov;
e-mail: o.lymunskiy@mail.ru

S u m m a r y

Complexes of bacteriophage T7 RNA polymerase (T7 RNAP) with a DNA template (which contains a promoter and internal terminator of T7 RNAP) in transcription elongation were visualized by atomic force microscopy (AFM). Images of specific stable complexes of T7 RNAP with a terminal fragment of DNA template located at a distance of 200 bp from the T7 RNAP promoter 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 nonspecific DNA-protein binding. Details of specific and nonspecific complex formation for the T7 RNAP – DNA system during initiation and transcription elongation are discussed.

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

1. *Kashlev M., Komissarova N.* // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, N 17. – P. 14501–14508.
2. *Komissarova N., Becker J., Solter S. et al.* // Mol. Cell. – 2002. – **10**, N 5. – P. 1151–1162.
3. *Epstein V., Nudler E.* // Science. – 2003. – **300**. – P. 801–805.
4. *Tahirov T., Temiakov D., Anikin M. et al.* // Nature. – 2002. – **420**. – P. 43–50.
5. *Temiakov D., Anikin M., McAllister W. T.* // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, N 49. – P. 47035–47043.
6. *Studitsky V., Walter W., Kireeva M. et al.* // TRENDS in Biochem. Biosci. – 2004. – **29**. – P. 127–135.
7. *Smeekens S., Romano L.* // Nucl. Acids Res. – 1986. – **14**, N 6. – P. 2812–2827.
8. *Skinner G., Baumann C., Quinn D. et al.* // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**, N 5. – P. 3239–3244.
9. *Bai L., Santangelo T., Wang M.* // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. – 2006. – **35**. – P. 343–360.
10. *Revyakin A., Ebright R., Strick T.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – **101**. – P. 14731–14735.
11. *Harada Y., Ohara O., Takatsuki A. et al.* // Nature. – 2001. – **409**. – P. 113–115.
12. *Sakata-Sogawa K., Shimamoto N.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – **101**. – P. 14731–14735.
13. *Harada Y., Funatsu T., Murakami K. et al.* // Biophys. J. – 1999. – **76**. – P. 709–715.
14. *Leuba S., Karymov M., Tomschik M. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – **100**, N 2. – P. 495–500.
15. *Rivetti C., Codeluppi S., Dieci G., Bustamante C.* // J. Mol. Biol. – 2003. – **326**, N 5. – P. 1413–1426.
16. *Лиманский А. П.* // Биофизика. – 2005. – **50**, N 6. – С. 1019–1024.
17. *Лиманская Л. А., Лиманский А. П.* // Молекул. биология. – 2006. – **40**, № 1. – С. 122–136.
18. *Milligan J., Groebe D., Witherell G., Uhlenbeck O.* // Nucl. Acids Res. – 1987. – **15**. – P. 8783–8798.
19. *Guthold M., Zhu X., Rivetti C. et al.* // Biophys. J. – 1999. – **77**. – P. 2284–2294.
20. *Berg O., Winter R., Von Hippel P.* // Biochemistry. – 1981. – **20**. – P. 6929–6948.
21. *Crampton N., Thomson N., Kirkham J. et al.* // Eur. J. Oral. Sci. – 2006. – **114**, Suppl. 1. – P. 133–138.
22. *Mukherjee S., Briebe L., Sousa R.* // Cell. – 2002. – **110**. – P. 81–91.
23. *Hansma H. G., Oroudjev E., Baudrey S. et al.* // J. Microsc. – 2003. – **212**. – P. 273–279.
24. *Лиманская Л. А., Лиманский А. П.* // Биоорган. химия. – 2006. – **32**, N 5. – С. 494–510.
25. *Santangelo T., Roberts J.* // Molec. Cell. – 2004. – **14**. – P. 117–126.
26. *Yarnell W., Roberts J.* // Science. – 1999. – **284**. – P. 611–615.

Отримано 29.03.2006