

УДК 557.323.1112.823

**ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  
КОМПАКТИЗАЦИИ КОЛЬЦЕВЫХ ДНК В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ.  
I. КОМПАКТНЫЕ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСОВ СИНТЕТИЧЕСКОГО  
ПЕПТИДА ТРИВАЛИНА С КОЛЬЦЕВЫМИ ДНК,  
СОДЕРЖАЩИМИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ,  
ВЫЗЫВАЮЩИЕ СТАЦИОНАРНЫЙ ИЗГИБ ДНК**

© 1997 г. Ю. Ю. Венгеров, Л. П. Мартынкина<sup>1</sup>, М. М. Беспалов<sup>2</sup>, С. А. Стрельцов<sup>1</sup>,  
В. Ю. Юрченко<sup>2</sup>, А. А. Колесников<sup>2</sup>

Институт биомедицинской химии Российской академии медицинских наук, Москва, 119832

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 117984

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, 119899

Поступила в редакцию 23.09.96 г.

Методом электронной микроскопии исследовали структуру комплексов синтетического пептида, дансилгидразидтривалина, с кольцевыми суперскрученными ДНК плазмид, содержащих один или несколько участков с последовательностью, вызывающей стационарный изгиб ДНК. Использовали генноинженерные конструкции pLg-19 и pTbo-1, созданные на базе вектора pBluescript II KS<sup>+</sup>. ДНК pLg-19 содержала фрагмент миникольцевой ДНК *Leishmania gymnodactili* с одним стационарно изогнутым участком, а ДНК pTbo-1 – фрагмент миникольца *Trypanosoma boissoni*, имеющих четыре подобных участка. Изучение комплексов дансилгидразидтривалина с такими ДНК показало, что наличие изогнутых участков ДНК в целом не влияет на конечный результат процесса компактизации с дансилгидразидтривалином, и формируются кольцевые компактные структуры, идентичные описанным ранее для ДНК pBR322 тройным кольцам. Тем не менее обнаружены некоторые особенности, которые могут быть связаны с наличием изогнутых участков ДНК. Исследование компактных структур высокомолекулярных кольцевых ДНК показало, что димерные молекулы pTbo-1, размер которых более 12 т.п.н., содержат, наряду с тройными кольцами, не описанные ранее структуры с двумя и более соединенными между собой кольцевыми участками. Полученные данные свидетельствуют о возможности независимой компактизации отдельных участков одной кольцевой молекулы при взаимодействии с тривалином. Обсуждается возможная роль изогнутых участков ДНК в формировании необычных компактных структур.

**Ключевые слова:** компактизация ДНК, кольцевая ДНК, тройные кольца, синтетический пептид, миникольца кинетопластной ДНК, электронная микроскопия.

Формирование замкнутых кольцевых молекул ДНК может рассматриваться как одна из стадий упаковки нуклеиновых кислот. Кольцевая организация ДНК характерна для большинства оргanelл клетки. Циклизация безусловно имеет значение и для компактизации ядерной ДНК эукариот, так как фиксация концов линейных участков молекул ДНК на структурах типа “остова” хромосом делает ДНК таких участков (“доменов”) топологически эквивалентной замкнутым кольцевым молекулам [1, 2].

В связи с этим особый интерес представляют исследования компактизации кольцевых ДНК при взаимодействии с лигандами, моделирующими те или иные свойства агентов, обеспечивающих компактизацию ДНК *in vivo*. Такие исследования могут дать ключ к пониманию общих зако-

номерностей конформационных и структурных переходов кольцевых ДНК в ходе репликации, транскрипции и сопряженных с ними процессов компактизации-декомпактизации генетического материала.

Ранее нами было показано, что несколько синтетических пептидов, способных формировать β-структуру, вызывают компактизацию линейной и кольцевой ДНК с образованием упорядоченных компактных структур (см. обзор [3]). Эти пептиды были синтезированы в качестве модели контактирующих с ДНК участков *lac*-репрессора [4]. Простейший из исследованных компактизирующих ДНК пептидов – дансилгидразид тривалина (ДГТВ).

Исследования комплексов ДГТВ с ДНК показали, что результаты компактизации зависят от

топологического состояния ДНК [5–7]. Описаны названные тройными кольцами компактные кольцевые структуры, формируемые при взаимодействии кольцевой суперскрученной ДНК плазмиды pBR322 с ДГТВ.

На основании подробных исследований промежуточных структур и различных стадий формирования тройных колец предложена и подтверждена модель укладки кольцевой ДНК в составе тройных колец [8].

Механизм, обеспечивающий строго внутримолекулярную компактизацию суперскрученных кольцевых молекул при взаимодействии с простым пептидом в компактные тройные кольца со значительным коэффициентом компактизации (для тройных колец он составляет 3.6), безусловно представляет значительный интерес.

Многие вопросы, особенно касающиеся первичных стадий формирования тройного кольца и вовлечения в компактную структуру остальной части кольцевой молекулы ДНК, остаются неясными.

Как было показано, первым шагом процесса такой компактизации является образование “шпильки”, т.е. структуры, в которой нить ДНК делает поворот на  $180^\circ$ , и соседние участки одной дуплексной нити ДНК располагаются бок о бок, но направлены антипараллельно. Очевидно, что такой поворот возможен только при значительном искажении геометрии двойной спирали [9].

Подобные изломы (“кинки”) в структуре коротких кольцевых молекул ДНК, стимулированные взаимодействием с гистоноподобным белком, наблюдали электронно-микроскопически другие авторы [10]. Искращения пространственной организации двойной спирали в отсутствие лигандов описаны для определенных последовательностей ДНК, вызывающих стационарный изгиб ДНК и встречающихся в природе в составе миниколец кинетопластной ДНК (кпДНК) трипаносоматид [11]. Высказываются предположения о возможной структурно-функциональной роли таких последовательностей для процессов репликации топологически чрезвычайно сложно организованного комплекса кпДНК [12]. Стационарно изогнутые участки ДНК были визуализированы с помощью электронной микроскопии, как кольцевые структуры небольшого диаметра [12].

Наши исследования компактизации комплексов выделенной кпДНК при взаимодействии с тривалином показали, что имеет место как общая компактизация всего агрегата кпДНК, так и отдельных миникольцевых молекул, располагающихся по периферии кпДНК [13]. Однако подробное исследование компактизации миниколец с согнутыми участками ДНК в составе кпДНК затруднено из-за их близкого пространственного

расположения и взаимоперекрывания в этой структуре.

Выяснение возможности образования тройных колец и особенностей формирования комплексов ДГТВ с кольцевыми плазмидными ДНК различных молекулярных масс, содержащими один или несколько согнутых участков, и являлось задачей данного исследования. Установлено, что наличие согнутых участков ДНК не влияет на конечный результат процесса компактизации с тривалином, и тройные кольца, формируемые кольцевыми ДНК с согнутыми участками, по своей структуре, организации и коэффициентам компактизации практически не отличаются от тройных колец в ДНК pBR322 [6], хотя и обнаружены некоторые особенности, возможно связанные с присутствием участков с измененной структурой.

Компактные структуры кольцевых ДНК были исследованы в широком диапазоне молекулярных масс. Однако самые большие тройные кольца, встречавшиеся на препаратах, имели контурную длину не более 1.2 мкм (что соответствует некомпактизованной кольцевой ДНК около 12500 п.н.), хотя исходные препараты содержали заметное количество и более длинных кольцевых молекул. Комплексам этих длинных кольцевых молекул на препаратах соответствуют описанные впервые более сложные по организации компактные структуры, содержащие несколько кольцевых фрагментов.

Полученные данные свидетельствуют о возможности независимой компактизации отдельных участков одной кольцевой молекулы при взаимодействии с тривалином.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

**Синтез ДГТВ** проводили как описано в работе Макарова и соавт. [5].

**Комплексы ДГТВ с ДНК** готовили путем прямого смешивания воднотрифторэтанольного раствора пептида и раствора ДНК в 0.001 М какодилатном буфере, рН 7.0 [15]. Конечный раствор содержал 10 мкг/мл ДНК и 25% трифторэтанола. Концентрация ДГТВ варьировала от 0 до  $3 \times 10^{-4}$  М.

**Конструкции плазмид** pLg-19 и pTbo-1, содержащих фрагменты с последовательностями, вызывающими стационарные изгибы молекулы ДНК, созданы на основе вектора pBluescript II KS<sup>+</sup> [16]. pLg-19 и pTbo-1 содержат встройки миникольцевых кпДНК *Leishmania gymnodactili* и *Trypanosoma boissoni* соответственно. Миникольца *L. gymnodactili* содержат один стационарно изогнутый участок на кольцо, а миникольца *T. boissoni* – по нашим предварительным данным – четыре таких участка. Схематические изображения конструкций представлены на рис. 1.

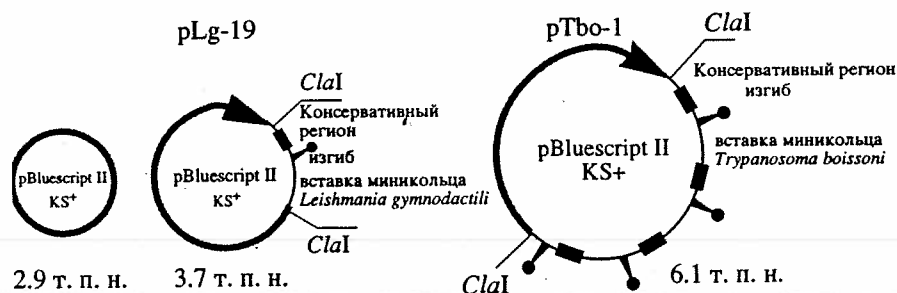


Рис. 1. Схематическое изображение плазмид pBluescript, pLg-19, pTbo-1.

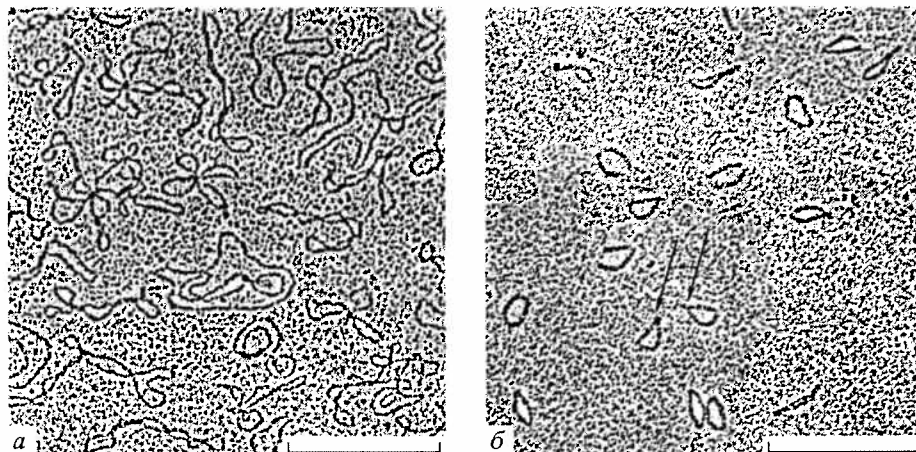


Рис. 2. а - Микрофотография препаратов ДНК плазмиды pBluescript, приготовленных белковым методом. б - Микрофотография комплексов pBluescript с ДГТВ. Стрелками указаны изломы тройного кольца, в которых компактная фибрилла делает крутой поворот ("кинк"). Масштабный отрезок равен 0.5 мкм.

**Электрофоретическое разделение** препаратов плазмидной ДНК проводили в стандартных условиях [16] в 0.8%-ном агарозном геле фирмы "Sigma" (1 × TAE буфер) в электрическом поле напряженностью 5 В/см. Полученные фрагменты окрашивали бромистым этидием [16].

**Плазмидные препараты очищали** с помощью набора "Wizard Minipreps DNA Purification System" ("Promega") по стандартной методике.

**Электронно-микроскопический контроль** исходных препаратов кольцевых суперскрученных ДНК проводили согласно белковому методу Дэвиса и соавт. [17].

**Для электронно-микроскопического исследования комплексов ДНК · ДГТВ** 5 мкл раствора помещали на электронно-микроскопическую сеточку, покрытую свежеприготовленной коллоидной пленкой-подложкой. Через 5–10 с избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой. После высушивания часть препаратов контрастировали круговым напылением сплава платины и палладия (4 : 1) под углом 6°, часть препаратов контрастировали спиртовым раствором уранил-ацетата. Препараты изучали с помощью электронного микроскопа JEM-100CX ("JEOL") при

ускоряющем напряжении 80 кВ с рабочим увеличением на экране X5000–20000. Измерения контурных длин проводили на фотографиях с увеличением X20000–80000 с помощью компьютера, снабженного дигитайзером.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведены схематические изображения плазмид pBluescript, pLg-19 и pTbo-1. Электрофоретический контроль показал, что основная доля ДНК во всех препаратах представлена кольцевыми суперскрученными молекулами (данные не приведены).

На рис. 2а, 3а, 4 представлены микрофотографии препаратов ДНК pBl, pLg-19 и pTbo-1, нанесенных с помощью белкового метода Дэвиса и соавт. [17]. Видно, что на этих препаратах большинство молекул имеет конформацию, типичную для кольцевых суперскрученных молекул. На препарате pTbo-1 присутствует значительное количество олигомерных молекул. На электрофограммах также выявлены интенсивные полосы, отвечающие высокомолекулярному материалу,

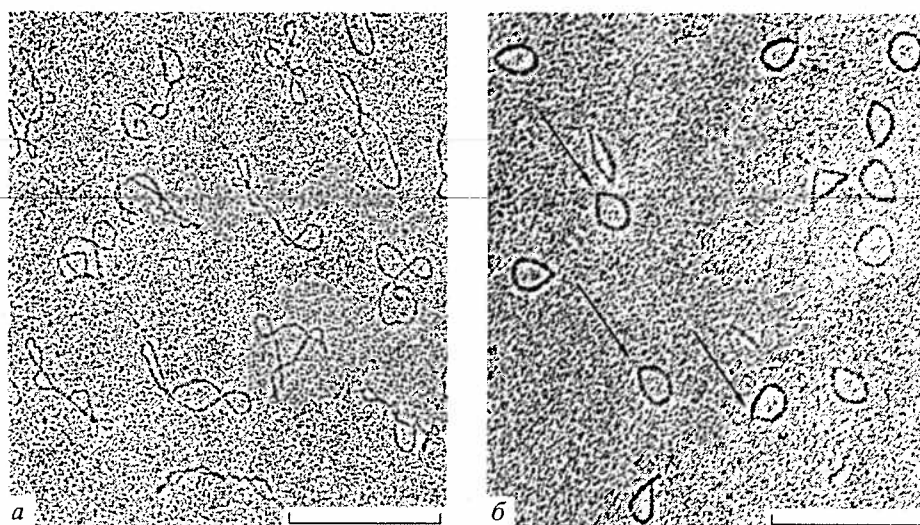


Рис. 3. *а* – Микрофотография препаратов ДНК плазмиды pLg-19, приготовленных белковым методом. *б* – Микрофотография комплексов pLg-19 с ДГТВ. Стрелками указаны изломы тройного кольца, в которых компактная фибрилла делает крутой поворот (“кинк”). Масштабный отрезок равен 0.5 мкм

что достаточно типично для сложной конструкции с большой по размеру вставкой.

На представленной фотографии димеры отмечены двумя, а тримерная молекула – тремя стрелками (рис. 4*а*). Следует отметить, что в заметных количествах встречаются и молекулы, отвечающие олигомерам более высоких порядков. Эти олигомерные молекулы также сохраняют кольцевую суперскрученную организацию. На рис. 4*б* показана кольцевая молекула, отвечающая гексамеру pTbo-1.

На рис. 2*б*, 3*б* и 5 приведены микрофотографии комплексов ДГТВ с ДНК плазмид pBluescript, pLg-19 и pTbo-1 соответственно. На всех препаратах основная часть материала представлена компактными кольцевыми структурами, организация и морфология которых полностью соответствуют описанию тройных колец [6].

Следует отметить, что многие кольца на приведенных микрофотографиях имеют характерный изгиб, в котором компактная фибрилла делает достаточно крутой поворот “кинк” (стрелки на рис. 2*б*, 3*б*, 5*а*). Структуры с такими изломами присутствуют на препаратах всех плазмид. Они могут отвечать “особой точке” в структуре тройного кольца, т.е. участку, в котором компактные фибриллы, сформированные тремя дуплексными нитями, расположенными бок о бок, соединяются участком одной нити дуплексной ДНК. Такие участки описаны ранее [6].

Фибриллы, образующие тройные кольца, имеют типичную морфологию, и их толщина составляет 180–220 Å при контрастировании круговым напылением. На фотографиях с более высоким увеличением (рис. 5*б*–5*ж*) хорошо заметна характерная поперечная исчерченность таких фибрилл.

Контрастирование уранилацетатом (данные не представлены) показывает, что толщина фибриллы, формирующей тройные кольца, составляет 90–110 Å, что хорошо совпадает с опубликованными данными [3, 6, 8].

Для определения коэффициентов компактизации ДНК в составе тройных колец у изучаемых плазмид измерили длины тройных колец и молекул ДНК на препаратах, приготовленных по методу Дэвиса и соавт. [17]. Данные измерений представлены в виде гистограмм на рис. 6*а*. На этих гистограммах пики, обозначенные *а* и *б*, соответствуют ДНК pBluescript и pLg-19, а пики *с*, *д* – мономерным и димерным молекулам pTbo-1 соответственно.

На гистограмме (рис. 6*б*) представлены данные измерения контурной длины тройных колец тех же плазмид, не имеющих серьезных структурных особенностей. Следует отметить, что таких колец длиной более 1 мкм на препаратах не обнаружено.

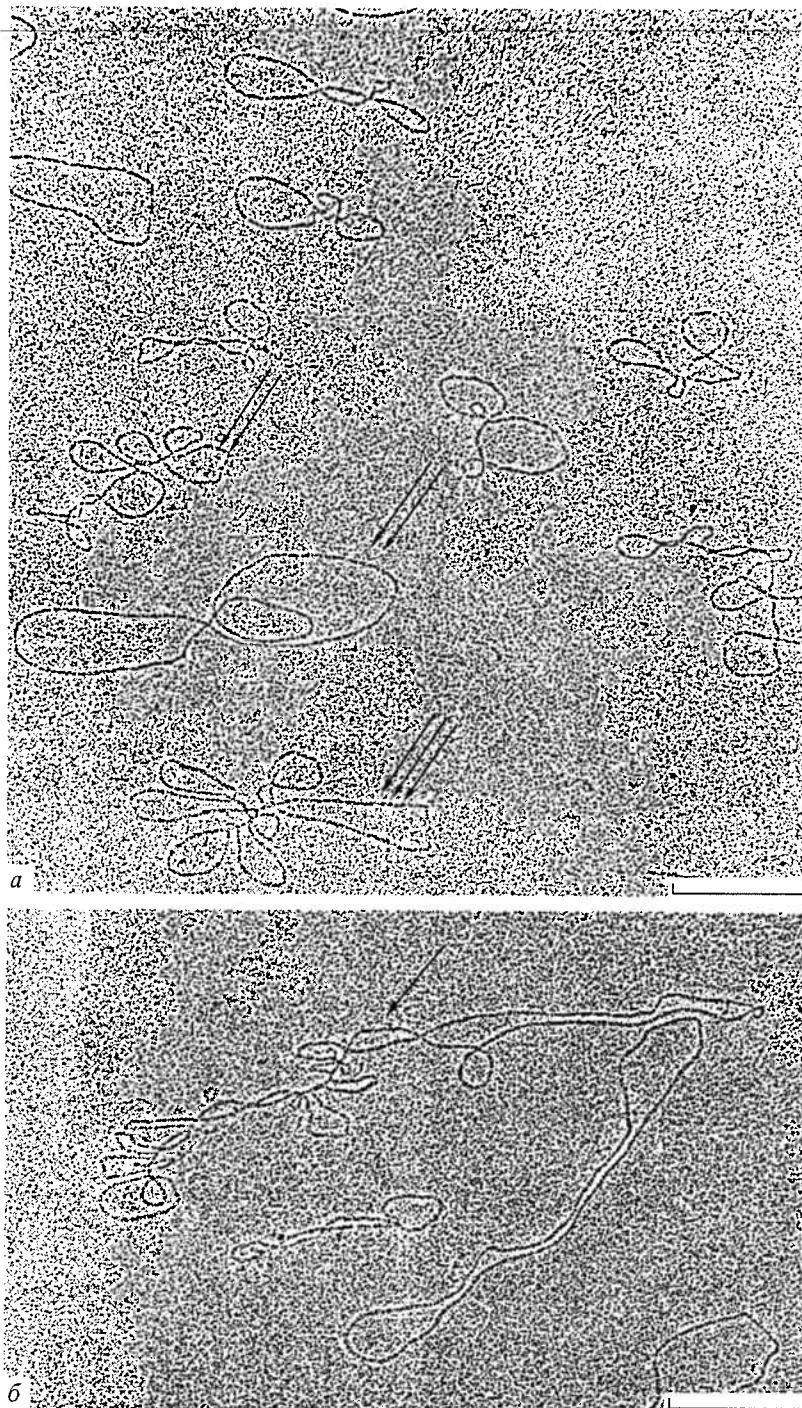
Усредненные данные по всем типам измеренных кольцевых структур препаратов трех плазмид и их комплексов с ДГТВ представлены в таблице. Согласно этим данным, все структуры имеют практически одинаковый коэффициент компактизации, составляющий примерно 3.5–3.7, что находится в полном соответствии с данными о коэффициенте компактизации ДНК pBR322, который составлял 3.6–3.8 [8].

Результаты показывают, что наличие одного или нескольких участков согнутой ДНК не оказывает принципиального влияния на процесс формирования тройных колец комплексов ДГТВ с ДНК. Большая часть тройных колец, отвечающих

мономерным или димерным молекулам рТбо-1, не имеет каких-либо неоднородностей образующих их компактных фибрилл. Можно было бы ожидать, что изогнутый из-за своей нуклеотидной последовательности даже в отсутствие пептида участок ДНК может способствовать образованию первичной "шпильки", с которой начинается

формирование тройного кольца, однако на молекулах, содержащих только один такой участок, заметных проявлений таких эффектов выявить не удастся.

В большинстве случаев "особый участок" никак не выделяется в структуре фибрилл, формирующих



**Рис. 4.** Микрофотография препаратов ДНК плазмиды рТбо-1, приготовленных белковым методом. *а* – Димеры отмечены двумя стрелками, тример – тремя стрелками. *б* – Стрелкой показана молекула, отвечающая гексамеру рТбо-1. Масштабный отрезок равен 0.5 мкм.



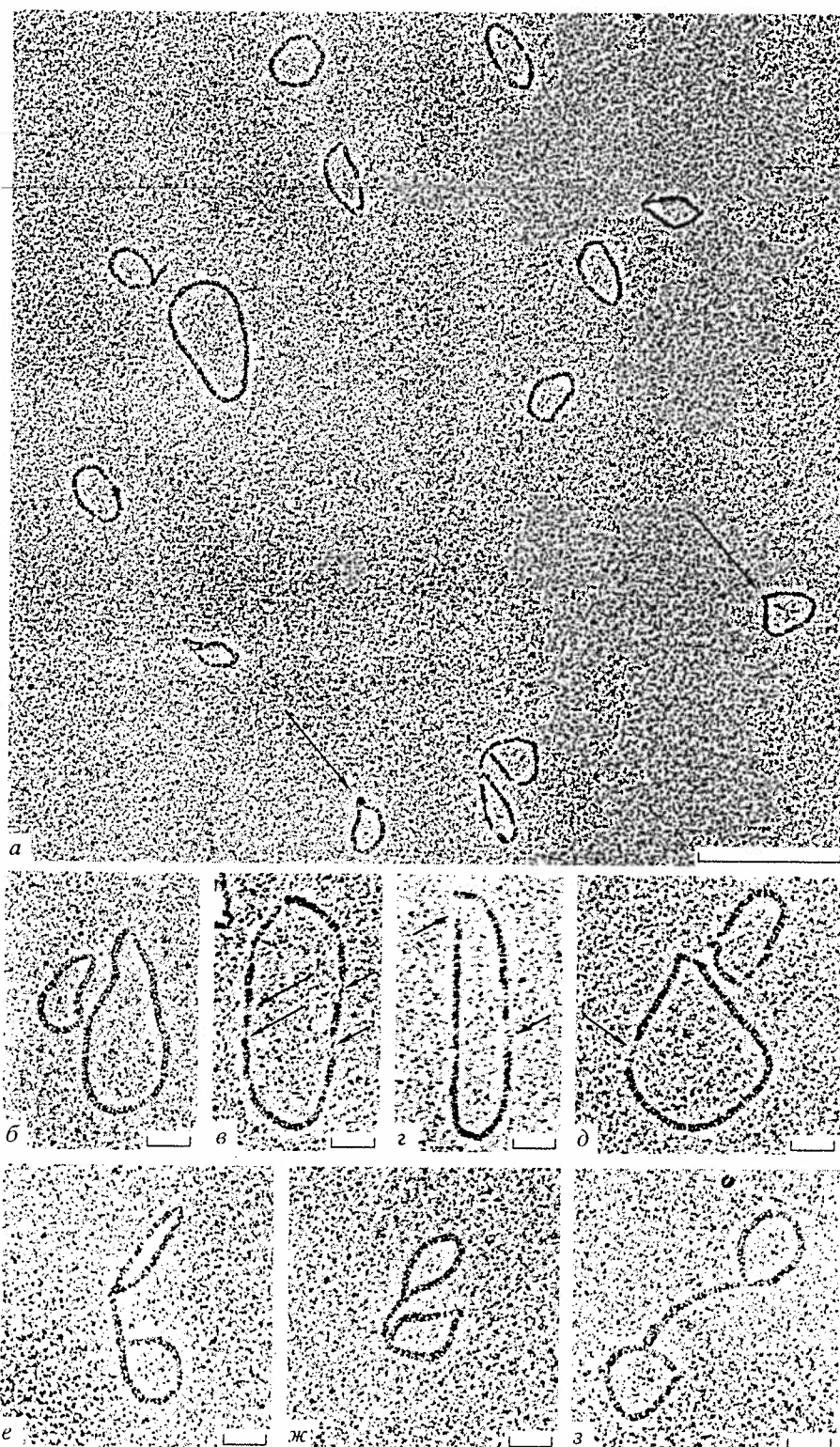


Рис. 5. Микрофотография комплексов рТбо-1 с ДГТВ. Основная часть препарата представлена тройными кольцами, соответствующими мономерам плазмиды рТбо-1 (а), встречаются димерные тройные кольца (а-д), а также структуры, отвечающие димерным молекулам или более высоким олигомерам, содержащие два кольцевых участка (а, е-з). Стрелками (а) указаны изломы тройного кольца, в которых компактная фибрилла делает крутой поворот ("кинк"). Стрелками (в-д) указаны нарушения однородности компактной фибриллы. Масштабный отрезок равен 0.5 мкм - (а); 0.1 мкм - (б-з).

Контурные длины молекул плазмид и тройных колец комплексов ДНК · ДГТВ. Коэффициенты компактизации плазмид при формировании комплексов с ДГТВ

Плаزمид	Мол. масса, п. н.	Средняя длина, мкм	Количество измерений	Длина тройных колец, мкм	Количество измерений	Коэффициент компактизации
pBluescript	2920	0.99 ± 0.05	80	0.28 ± 0.03	80	3.53
pLg-19	3820	1.36 ± 0.08	42	0.37 ± 0.02	48	3.67
pTbo-1-мономеры	6120	1.94 ± 0.08	174	0.53 ± 0.03	84	3.66
pTbo-1-димеры	12240	3.89 ± 0.24	45	1.06 ± 0.08	17	3.67
pTbo-1-тримеры	18360	5.9 ± 0.12	16	—	—	—

тройные кольца. Так что при наличии нескольких таких участков можно предполагать формирование нескольких “маскированных” особых точек в составе тройного кольца, которое на микрофотографии выглядит полностью однородным.

Свидетельством в пользу возможности такой организации тройных колец для комплексов ДНК pTbo-1 с ДГТВ могут служить встречающиеся на препаратах тройные кольца с нарушениями однородности компактной фибриллы, на которых хорошо видно, что фибриллы толщиной 180–210 Å, соответствующие по морфологии тройным фибриллам ДНК, соединены участком одиночной дуплексной ДНК (рис. 5, стрелки).

Полученные данные позволяют предположить, что располагающиеся рядом отрезки ДНК одной кольцевой молекулы компактизуются независимо. В пользу этого предположения говорит и наличие на препаратах компактных структур, содержащих два и более кольцевых участка. Такая структура отмечена жирной стрелкой на рис. 5а. На рис. 5е, 5ж, 5з приведены микрофотографии нескольких подобных структур при большем увеличении.

Эти структуры имеют вид двух колец, фибриллы которых абсолютно идентичны фибриллам, формирующим тройные кольца, связанных аналогичной по толщине и структуре фибриллой. Измерение контурной длины таких “гантелеобразных” структур показывает, что они содержат или димерные молекулы ДНК pTbo-1 или молекулы олигомеров более высокого порядка.

Предположив, что гантелеобразная структура содержит одиночную молекулу кольцевой ДНК димера или олигомера более высокого уровня pTbo-1 и исходя из принципа формирования тройных колец, можно сделать вывод, что каждый из кольцевых участков имеет свои точки инициации формирования компактной фибриллы.

Совокупность представленных данных позволяет заключить, что при компактизации длинных кольцевых ДНК pTbo-1 под действием ДГТВ отдельные фрагменты одной и той же молекулы ДНК могут компактизоваться независимо. Определенную роль при этом могут играть и имеющиеся в составе ДНК pTbo-1 стационарно изогнутые последовательности ДНК. Можно предположить, что наличие стационарно изогнутой последовательности способствует независимой компактизации за счет стимуляции формирования нескольких “шпилек” одновременно, или за счет создания препятствия распространению тройного ком-

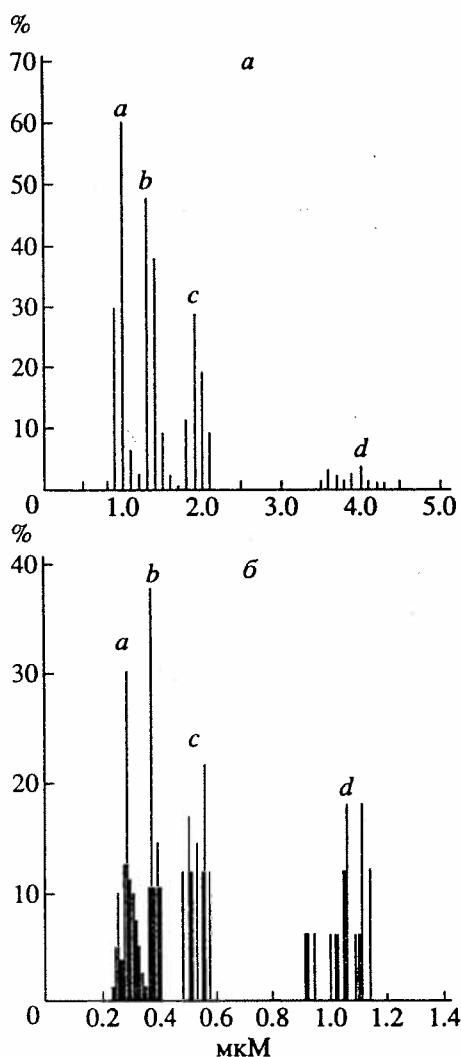


Рис. 6. а – Гистограммы контурных длин молекул некомпактизованных кольцевых ДНК. а) pBluescript, б) pLg-19, с) pTbo-1-мономеры. д) pTbo-1-димеры. б – Гистограммы измеренных контурных длин тройных колец, комплексов ДГТВ с кольцевыми ДНК. а) pBl, б) pLg-19, с) pTbo-1-мономеры. д) pTbo-1-димеры.

пактного участка. Подобные эффекты могут иметь значение при различных процессах функционирования кпДНК трипанасоматид, содержащей стационарно согнутые последовательности в миникольцах.

Мы благодарны Г.В. Сердюкову за помощь в электронной микроскопии, Т.Е. Семенову за поддержку и дружеское участие, С.В. Ткачуку за помощь в компьютерных работах, Е.А. Кутуковой за техническое участие в получении препаратов ДНК, а также И.А. Беспаловой за участие в подготовке статьи к печати.

Работа поддержана совместным грантом MV 9300 Международного научного фонда и правительства России, а также Российским фондом фундаментальных исследований (96-04-49-186).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Laemmli U.K., Cheng S.H., Adolf K.W., Paulson J.R., Brown J.A., Baumbach W.R. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1977. V. 42. P. 351-360.
2. Igo-Kemenez T., Zachau H.G. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1977. V. 42. P. 109-118.
3. Vengerov Yu.Yu., Semenov T.E. // Electron. Microsc. Rev. 1992. V. 5. P. 193-207.
4. Gursky G.V., Zasedatelev A.S., Zhuze A.L., Khorlin A.A., Grokhovsky S.L., Streltsov S.A., Nikitin S.M., Mikhailov M.V., Surovaya A.N., Rechinsky V.O., Beablashvilly R.Sh., Krylov A.S., Gottikh B.P. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1983. V. 47. P. 361-372.
5. Макаров В.Л., Стрельцов С.А., Венгеров Ю.Ю., Хорлин А.А., Гурский Г.В. // Молекуляр. биология. 1983. Т. 17. С. 1089-1102.
6. Венгеров Ю.Ю., Семенов Т.Е., Стрельцов С.А., Макаров В.Л., Хорлин А.А., Гурский Г.В. // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. С. 1223-1230.
7. Vengerov Yu.Yu., Semenov T.E., Streltsov S.A., Makarov V.L., Khorlin A.A., Gursky G.V. // FEBS Lett. 1985. V. 180. P. 81-84.
8. Vengerov Yu.Yu., Semenov T.E., Streltsov S.A., Makarov V.L., Khorlin A.A., Gursky G.V. // J. Mol. Biol. 1985. V. 184. P. 251-255.
9. Schlick T., Olson W. // J. Mol. Biol. 1992. V. 223. P. 1089-1119.
10. Toulme F., Le Cam E., Teysier C., Delain E., Sautiere P., Maurizot J.-C., Culard F. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 6286-6291.
11. Marini J.C., Levene S.D., Crothers D.M., Englund P.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1982. V. 79. P. 7664-7668.
12. Griffith J., Bleyman M., Rauch C.A., Kitchin P.A., Englund P.T. // Cell. 1986. V. 46. P. 717-724.
13. Martinkina L.P., Novikova E.G., Streltsov S.A., Kolesnikov A.A., Vengerov Yu.Yu. // Eur. J. Cell Biol. 1991. V. 56. P. 123-131.
14. Vengerov Yu.Yu., Semenov T.E., Surovaya A.N., Sidorova N. Yu., Streltsov S.A., Khorlin A.A., Zhuze A.L., Gursky G.V. // J. Biomol. Struct. Dynamics. 1988. V. 6. P. 311-330.
15. Стрельцов С.А., Хорлин А.А., Суровая А.Н., Гурский Г.В., Заседателев А.С., Жузе А.Л., Готтих Б.П. // Биофизика. 1980. Т. 25. С. 929-941.
16. Sambrook J., Fritsh G.F., Maniatis T. // Molecular Cloning. A laboratory manual / Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
17. Davis R.V., Simon M., Davidson N. // Methods Enzymol. / McCormic D.W., Wright L.D., Eds. L.: Acad. Press, 1971. V. 21D. P. 413-427.