

## ДНК в дисках политенных хромосом торсионно не напряжена

А. Д. Груздев, М. Лещи

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН  
630090, Новосибирск, пр. Академика Коптюга, 2

Институт Клеточной Биологии Швейцарского Технологического Института  
CH 8046, Цюрих, Лерхенберг, 37

---

*Микрофлюориметрическим методом с использованием флюорохроми-интеркалятора бромистого этидия и конфокального лазерного сканирующего флюоресцентного микроскопа изучали топологическое состояние ДНК в дисках политенных хромосом *Camptochironomus tentans*. Показано, что диски содержат топологически замкнутые отрицательно сверхспирализованные домены ДНК, относительная разность скрученности в которых не превышает 0,007.*

---

**Введение.** Топологическая замкнутость молекул ДНК в хромосомах эукариот обуславливает возможность изменения их вторичной структуры во всех процессах, вызывающих в ДНК торсионное напряжение. В настоящее время известны два типа источников торсионного напряжения в ДНК.

Согласно модели Лю и Вана [1], напряжение в транскрибируемой ДНК генерируется при движении РНК-полимеразы: положительное напряжение возникает впереди РНК-полимеразы, отрицательное — позади нее. Знак и величина результирующего напряжения в ДНК определяется, по-видимому, различиями в релаксирующих активностях молекул топоизомераз I, находящихся впереди и позади движущейся РНК-полимеразы.

В пользу существования такого механизма у эукариот свидетельствуют факты наличия напряжений во всех исследованных на сегодня транскрипционно активных генах: генах дигидрофолат-редуктазы и 45S РНК человека [2], а также в генах белка теплового шока *hsp70* и 18S РНК дрозофилы [3, 4]. Поскольку движение РНК-полимеразы индуцирует как положительное, так и отрицательное напряжение, среднее напряжение в суммарной ДНК ядра может быть мало и не обнаруживаться экспериментально [5].

Упомянутый динамический механизм генера-

ции напряжения отсутствует в нетранскрибируемой ДНК, преобладающей в ядре. Известен, однако, статический механизм появления торсионного напряжения в ДНК при образовании ею различной сложности комплексов с белками на всех уровнях вплоть до компактизации ДНК в метафазные хромосомы. Не исключено, что и в данном механизме топоизомеразы также служат регуляторами напряжения в ДНК, оставляя его большим в одних случаях или релаксируя практически до нуля — в других. Большое напряжение было обнаружено, например, в неактивированном к транскрипции гене теплового шока *hsp70* [3, 4]. Кроме того, существует мнение, что в большинстве неактивных генов ДНК находится в релаксированном состоянии. Такая точка зрения опирается преимущественно на результаты упомянутой выше работы [5], в которой не было обнаружено напряжения в ДНК интерфазных ядрах клеток HeLa дрозофилы *in vitro*. Однако, по нашим измерениям [6], ДНК интерфазных политенных хромосом хирономуса заметно напряжена до средней плотности сверхвитков, равной  $-0,019$ . При этом неясно, насколько велик вклад в измеренную величину транскрипционно активных генов и генов, не участвующих в транскрипции. Кроме того, не исключено, что различия в результатах работ [5] и [6] связаны со специфической организацией ДНК в неактивных локусах (дисках) политенных хромосом.

Нам кажется, что вопрос о топологическом состоянии ДНК в ядрах транскрипционно неактивных клеток (спермии, лимфоциты, метафазные хромосомы) и неактивном хроматине диплоидных и политенных ядер заслуживает экспериментального изучения. В настоящей работе измеряли торсионное напряжение в ДНК транскрипционно неактивных дисков политенных хромосом личинок *Campiochironomus tentans*. Использовали метод [6], основанный на зависимости степени связывания флуоресцентного красителя интеркалятора бромистого этидия (БЭ) от степени скрученности ДНК и на его способности компенсировать недокрученность.

Суть метода заключается в том, что при некоторой концентрации красителя отрицательно напряженная (недокрученная) ДНК становится релаксированной, ненапряженной молекулой потому, что торсионное напряжение в ней компенсировано интеркаляцией молекул БЭ. Поскольку введение однонитчатых разрывов в релаксированную ДНК не приводит к изменению ее вторичной структуры, оно не сопровождается изменениями ни в количестве связанного с ДНК красителя, ни в интенсивности его флуоресценции. Зная численное значение концентрации БЭ, при котором окраска окрашенной ДНК не меняет интенсивности ее флуоресценции, нетрудно вычислить величину относительной разности скрученности  $ОРС = \Delta T_w / T_w$ , являющейся мерой интересующего нас напряжения в исходной неокрашенной ДНК. (Обычно используемый термин «плотность сверхвитков» был введен Бауэром [7] для описания напряженной ДНК в растворе. Однако для описания ДНК в хроматине и хромосомах более корректно использовать термин «относительная разность скрученности» напряженной молекулы ДНК по отношению к релаксированной форме. Именно эта величина измеряется в эксперименте.) Следует отметить, что использованный нами метод позволяет сделать заключения лишь о «свободной» ДНК, т. е. о той части хромосомной ДНК, которая 1) доступна красителю, 2) доступна ДНКазе I и 3) может релаксировать после введения в нее разрыва. В неактивном хроматине дисков перечисленными свойствами обладает, прежде всего, ДНК межнуклеосомных линкеров.

Материалы и методы. Измерения проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе MCR-600 («BioRad», США), имеющем для целей данной работы целый ряд преимуществ перед обычным флуоресцентным микроскопом. К ним относятся, прежде всего, локальный способ возбуждения и регистрации флуоресценции препа-

рата при его сканировании лазерным лучом, что резко снижает вклад соседних точек (в том числе и в вертикальном направлении) в интенсивность флуоресценции измеряемой точки, а также возможность регистрации картин препарата в цифровой форме, их хранения и последующей количественной обработки.

В работе использовали личинки четвертого возраста лабораторной линии 2Lk3 *C. tentans*, находящиеся в состоянии олигопаузы [8], когда репликация в тканях личинок практически отсутствует.

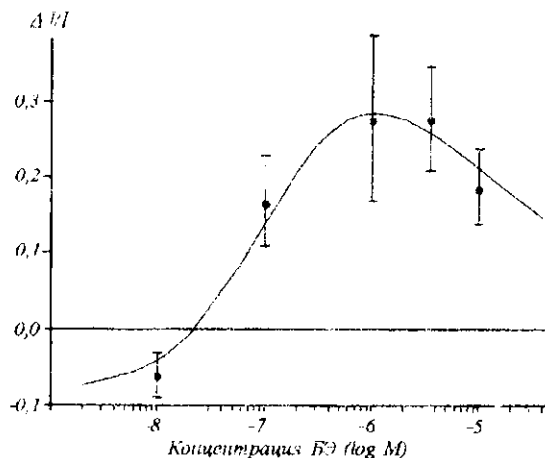
Слюнные железы выделяли иглами в растворе CR6.3 [8], состоящем из 87 мМ NaCl, 3,2 мМ MgCl<sub>2</sub> и 10 мМ трис-малеата, pH 6,3. Железы инкубировали на холоду в течение 40—45 мин в том же растворе с добавлением 0,5 % тритона X-100 и пипетировали. Дальнейшие процедуры проводили в растворе CR7.4, отличающемся от CR6.3 буфером (трис-HCl, pH 7,4).

Изолированные ядра личинок *C. tentans* помещали в проточную камеру, окрашивали БЭ в течение 1—1,5 ч, а для удаления флуоресцентного фона, создаваемого молекулами внутриядерной РНК, обрабатывали панкреатической РНКазой. Камеру с окрашенными ядрами помещали под объектив микроскопа и включали программу, позволяющую компьютеру MCR-600 записать серию картин препарата, регистрируемых через каждые 5—10 мин. После регистрации 3—5 картин в камеру добавляли ДНКазу I до конечной концентрации около 1 мкг/мл, индуцирующую в хромосомной ДНК однонитчатые разрывы. Опыт заканчивали после 15—20 картин.

Для каждой картины измеряли интенсивности нескольких одиночных дисков среднего размера, для каждого из дисков строили кривую изменения интенсивности его флуоресценции во времени и вычисляли величину относительного изменения интенсивности  $\Delta I/I = (I_{\text{после}} - I_{\text{до}}) / I_{\text{после}}$ , вызванного нарушением топологической замкнутости ДНК под действием ДНКазы I.

Опыты проводили с несколькими концентрациями БЭ для того, чтобы определить ту его концентрацию  $C_0$ , при которой напряжение в ДНК компенсировано интеркаляцией молекул красителя, т. е. когда  $\Delta I/I = 0$ . Затем вычисляли плотность посадки  $r_0$  БЭ на ДНК, принимая величину константы связывания  $K = 5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  [6], и находили величину относительной разности скрученности ДНК из  $ОРС = -0,72 r_0$ .

Результаты и обсуждение. Полученные результаты приведены на рисунке в виде зависимости величины  $\Delta I/I$  от десятичного логарифма молярной концентрации красителя. Из рисунка видно, что

Относительное изменение флуоресценции,  $\Delta I/I$ 

большинство измеренных величин  $\Delta I/I > 0$ , за исключением одной, измеренной при очень низкой концентрации ( $10^{-8}$  М) БЭ. Отсюда следует, что торсионное напряжение в ДНК дисков очень мало.

Для определения его величины была построена кривая (см. рисунок), рассчитанная по изотермам связывания (1) и (2) красителя с топологически замкнутой напряженной ДНК и с никованной ДНК соответственно.

$$r/C = K(1 - 3r)^3 / (1 - 2r)^2; \quad (1)$$

$$r/C = K \exp[a(r - r_0)] (1 - 3r)^3 / (1 - 2r)^2, \quad (2)$$

где  $r$  — плотность посадки красителя на топологически разомкнутой (1) и сверхспирализованной (2) ДНК;  $C$  — молярная концентрация БЭ в растворе,  $a = 10$  — параметр ДНК, пропорциональный ее торсионной жесткости.

Наилучшее согласие кривой с экспериментальными точками достигалось при условии, что величина  $ОРС = -0,007$ . Для ее наглядной оценки можно указать, что различия в скрученности А- или С-формы ДНК по сравнению с В-формой на порядок больше (по модулю) измеренной величины  $ОРС$  ДНК в дисках. На порядок больше нее также такие плотности сверхвитков ДНК, при которых возможно появление неканонических структур, например, Z-форм ДНК [9].

Хотя измеренная нами абсолютная величина  $ОРС$  ДНК в дисках политенных хромосом очень мала, есть основания полагать, что ее истинное значение еще меньше. Дело в том, что при компьютерной обработке картин политенных хромосом в

анализируемую часть картины вместе с изображением измеряемого диска неизбежно попадает изображение пары соседних с ним междисков, рыхлый хроматин которых более доступен действию ДНКазы I, чем плотный хроматин диска. Поэтому не исключено, что к концу эксперимента, когда каждая молекула ДНК получает лишь небольшое число однопочечных разрезов, молекулы ДНК междисков уже оказываются расщепленными до олигонуклеотидов, диффундирующих из междисков или распадающихся на одиночные цепи, теряющие способность к флуоресценции в комплексе с БЭ. При этом уменьшение интенсивности флуоресценции междисков, соседствующих с измеряемым диском, воспринимается как уменьшение интенсивности флуоресценции диска, вызванное никованием его ДНК, а не расщеплением ДНК междисков. Этот эффект не играет роли при больших изменениях интенсивности флуоресценции дисков после добавления ДНКазы I, т. е. при больших концентрациях БЭ в растворе. Однако он становится значимым при малых концентрациях красителя, когда изменения флуоресценции дисков, ожидаемые для топологически замкнутой, но торсионно ненапряженной ДНК, практически ничтожны.

В пользу высказанного предположения свидетельствует тот факт, что величины  $\Delta I/I$ , измеренные для длинных участков хромосом, содержащих пуфы и мелкие рыхлые диски, всегда оказывались меньше тех же величин, измеренных для плотных одиночных дисков.

И, наконец, о большей скорости расщепления ДНК междисков по сравнению с ДНК дисков свидетельствует очевидное возрастание контраста дискового рисунка политенных хромосом к концу эксперимента.

Из изложенного выше следует, что ДНК дисков политенных хромосом практически торсионно не напряжена, хотя топологически замкнута.

Работа выполнена при финансовой поддержке Швейцарского Национального научного фонда и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 94-04-11575а).

О. Д. Груздев, М. Лецци

ДНК у дисках политенных хромосом торсионно не напряжена

Резюме

Мікрофлюориметричним методом з використанням флюорохрома-інтеркалятора бромистого етидію і конфокального лазерного скануючого флуоресцентного мікроскопа вивчали топологічний стан ДНК у дисках політенних хромосом *Camptochironomus tentans*. Показано, що диски містять топологічно замкнені від'ємно суперспіралізовані домени ДНК, відносна різниця скрученості у яких не перевищує 0,007.

A. D. Gruzdev, M. Lezzi

DNA in bands of polytene chromosomes is not under torsional tension

#### Summary

*Topological state of DNA in bands of polytene chromosomes of *Camptochironomus tentans* was investigated under confocal laser scanning fluorescent microscope by microfluorometric method. It was shown that the bands contain topologically closed, negatively supercoiled domains of DNA in which the value of the relative twist difference is very low and does not exceed 0.007.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu L. F., Wang J. C. Supercoiling of the DNA template during transcription // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1987.—84.—P. 7024—7027.
2. Ljungman M., Hanawalt P. C. Localized torsional tension in the DNA of human cells // Ibid.—1992.—89.—P. 6055—6059.
3. Jupe E. R., Stinden R. R., Cartwright I. L. Stably maintained microdomain of localized unrestrained supercoiling at *Drosophila* heat shock gene locus // EMBO J.—1993.—12.—P. 1067—1075.
4. Jupe E. R., Stinden R. R., Cartwright I. L. Specialized chromatin structure domain boundary elements flanking a *Drosophila* heat shock gene locus are under torsional strain *in vivo* // Biochemistry.—1995.—34.—P. 2628—2633.
5. Stinden R. R., Carlson J. O., Pettijohn D. E. Torsional tension in the DNA double helix measured with trimethyl psoralen in living *E. coli* cells: Analogous measurements in insect and human cells // Cell.—1980.—21.—P. 773—783.
6. Шурдов М. А., Свиначук Ф. П., Груздев А. Д. Торсионное напряжение в ДНК политенных хромосом // Молекуляр. биология.—1989.—23, № 1.—С. 204—214.
7. Bauer W. R. Structure and reactions of closed duplex DNA // Ann. Rev. Biophys. and Bioeng.—1978.—7.—P. 287—313.
8. Meyer B., Maehr R., Eppenberger H. M., Lezzi M. The activity of Balbiani rings 1 and 2 in salivary glands of *Chironomus tentans* larvae under different modes of development and after pilocarpine treatment // Develop. Biol.—1983.—98.—P. 265—277.
9. Thomas M. J., Freeland T. M., Strobl J. S. Z-DNA formation in the rat growth hormone gene promoter region // Mol. and Cell. Biol.—1990.—10.—P. 5378—5387.

УДК 577.21:576.316.352  
Поступила в редакцию 18.02.97