

Стабильное торсионное напряжение в ДНК политенных хромосом *Chironomus thummi*

Ф. Э. Кузин, И. Э. Шилова, Д. В. Бугреев¹, Г. А. Невинский¹, А. Д. Груздев

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН
Пр. Академика Лаврентьева, 10, 630090, Новосибирск, Россия

¹Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского Отделения РАН
Новосибирск, 630090, Россия

*Микрофлюориметрическим методом определяли топологическое состояние ДНК в изолированных политенных хромосомах хирономуса *C. thummi*, находящихся на стадии активной транскрипции. Показано, что 15 % всей ДНК хромосом, доступной интеркаляции бромистого этидия, находится в торсионно напряженном состоянии. Численное значение обнаруженного напряжения, выраженное в относительной разности скручивания напряженной молекулы ДНК по отношению к ее релаксированной форме, равно $-0,1$. Показано также, что домены торсионно напряженной ДНК содержат транскрибируемые последовательности. Торсионно напряженная ДНК недоступна релаксирующему действию эндогенных топоизомераз, но теряет напряжение при добавлении экзогенной топоизомеразы I.*

Введение. На одном из уровней упаковки ДНК в хроматине происходит ее разделение на петлевые домены. Домены механически независимы друг от друга, и ДНК в них являются топологически замкнутыми [1]. Локальное перекручивание или недокручивание двойной спирали замкнутой ДНК создает в ней сверхспиральность, распространяющуюся в виде торсионного напряжения по всему домену. Многие процессы, в которые вовлечена ДНК, приводят к локальным изменениям ее вторичной структуры. Верно и обратное — изменения вторичной структуры ДНК могут влиять на ДНК-зависимые процессы. Например, увеличение отрицательных торсионных напряжений ДНК при инициации транскрипции у прокариот заметно облегчает образование открытого комплекса ДНК с РНК-полимеразой [2]. Подобная зависимость ожидается и при связывании с ДНК эукариотических РНК-полимераз [3], что подтверждается исследованием эукариотических генов в модельных системах [4].

Методы, используемые для изучения топологического состояния ядерной ДНК, обычно основаны на повышенной способности некоторых красителей

интеркалировать в недокрученную спираль ДНК. Отрицательные торсионные напряжения проявляются в уменьшении плотности посадки интеркалятора после релаксации ДНК. Часто в качестве интеркалятора используют триметилпсорален, который способен проникать в живые клетки. Для релаксации ДНК используются различные никующие агенты. Последующий анализ количества связанного псоралена с нативной и никованной ДНК дает возможность судить о существующих торсионных напряжениях. В работах [5—7], где исследовали отдельные транскрипционно активные гены *in vivo*, показали наличие в их ДНК значительных торсионных напряжений. Заметим, что авторы этих работ стремились получить «мгновенный» снимок топологического состояния исследуемой ДНК. При этом было невозможно отличить динамичное состояние, при котором происходят непрерывная генерация напряжения, например РНК-полимеразой [8], и одновременно релаксация ДНК топоизомеразой, от стабильно напряженного состояния ДНК. Существует мнение [9], что в ДНК эукариотических ядер нет длительно существующих несдерживаемых торсионных напряжений. Заметим также, что торсионно напряженная ДНК не была обнаружена при исследовании интерфазных

ядер [10]. Этот результат можно объяснить как особенностями применяемых методов, так и малым количеством напряженной ДНК в ядрах.

Для доказательства существования стабильно торсионно напряженной ДНК в интерфазных ядрах в настоящей работе использовали изолированные политенные хромосомы хирономуса. Из соотношения числа активных пуфов (336) и неактивных дисков (1500) в политенных хромосомах [11] нетрудно оценить, что напряженная ДНК в них составляет заметную часть (около 20 %) всей ядерной ДНК. Это позволяет надеяться на ее обнаружение используемым нами микрофлюориметрическим методом [12]. Кроме того, в изолированных политенных хромосомах не сохраняется исходного стационарного состояния генерации и релаксации напряжения. Иными словами, «мотор» (или «моторы»), продуцирующий торсионное напряжение (РНК-полимераза, геликазы или предполагаемые гиразы), останавливается из-за уменьшения пула нуклеозидтрифосфатов. Наконец, использование двух релаксирующих ДНК ферментов — ДНКазы I и топоизомеразы I — позволяет сделать некоторые выводы о механизме поддержания напряжения в активно транскрибируемой ДНК.

Материалы и методы. В работе использовали личинки 5-й фазы четвертого личиночного возраста хирономуса *C. thumml*, характеризующиеся максимальным уровнем транскрипции ДНК в слюнных железах [13]. Маркерами при отборе животных служили гениталии 9-го брюшного сегмента личинки [14]. Измерения производили на выделенных вручную политенных хромосомах с микрогигически удаленным ядрышком. Часть измерений была выполнена на политенных ядрах. Для выделения ядер слюнные железы личинок выдерживали в течение 40 мин на холоду в 1 %-м растворе сапонина («Merck», ФРГ) и пипетировали пипеткой с диаметром кончика около 100 мкм. При выделении ядер использовали раствор Роберта [15], содержащий 87 мМ NaCl, 3,2 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂ и 10 мМ трис-малеат, pH 6,3, при выделении хромосом — аналогичный раствор, но забуференный 10 мМ трис-малеатом до pH 7,3. Дальнейшее окрашивание хромосом и ядер бромистым этидием (БЭ, «Serva», ФРГ) и их обработку ДНК-релаксирующими ферментами проводили в последнем растворе.

Используемый нами метод [12] основан на свойстве БЭ вводить положительные сверхвитки ДНК при его интеркаляции в топологически замкнутую молекулу. Константа связывания БЭ с недокрученной ДНК больше, чем с релаксированной или перекрученной. Поэтому релаксация ДНК ка-

ким-либо агентом (мы использовали два фермента — эукариотическую топоизомеразу I и ДНКазу I) приводит к изменению интенсивности флюоресценции хромосом при всех концентрациях БЭ, кроме той, при которой имевшаяся в ДНК отрицательная сверхспирализация компенсирована интеркаляцией красителя. В работе измеряли величину относительной разности интенсивности $\Delta I/I$ флюоресценции хромосом до и после действия ферментов при нескольких концентрациях красителя и находили ту концентрацию C_0 , при которой $\Delta I/I = 0$. Затем вычисляли соответствующую плотность посадки r_0 красителя на ДНК, что давало возможность определить искомую величину плотности сверхвитков.

Отметим, что термин «плотность сверхвитков» был введен для описания топологически замкнутой ДНК в растворе [16], когда торсионное напряжение приводит к изменению как скрученности ДНК (Tw), так и положения ее оси в пространстве (Wr). Однако динамичное образование «сверхвитков» ДНК в хроматине и хромосомах не всегда возможно. Если же учесть, что связывание интеркалятора определяется вторичной структурой ДНК, т. е. периодом ее двойной спирали, то более корректно использовать термин «относительная разность скрученности» ($ORC = \Delta Tw/Tw$) напряженной молекулы ДНК по отношению к ее релаксированной форме.

В типичном опыте выделенные ядра или хромосомы помещали на дно камеры с раствором БЭ. Измерения проводили на группах по 4—5 ядер или соответствующем количестве хромосом. Конструкция камеры позволяла производить смену растворов, что обеспечивало неизменность концентрации красителя в течение опыта. В работе использовали микрофлюориметры собственной конструкции [12] и микрофлюориметр МФ-2 (Пушино, Россия). Флюоресценцию препарата возбуждали светом галогенной лампы (9 В, 100 Вт), пропущенным через интерференционный фильтр (480 нм). Интенсивность флюоресценции измеряли при 620 нм и непрерывно записывали самописцем. После достижения плато интенсивности флюоресценции при окрашивании хромосом в камеру добавляли ферменты. Затем находили изменение флюоресценции, обусловленное их действием, и вычисляли величину $\Delta I/I$. Конечная активность ДНК топоизомеразы I, выделенной из плаценты человека, согласно [17], составляла 200 ед/мл, а концентрация ДНКазы I («Sigma», США) — 0,1—0,5 мкг/мл в зависимости от того, на каком объекте (политенные хромосомы или ядра) проводили измерения. Типичная кривая изменений интенсивности флюо-

ресценции препарата в течение опыта приведена на рис. 1. Плотность посадки красителя на ДНК (r_0) вычисляли по уравнению изотермы для никованной ДНК [18]

$$r/C = K_{\text{ДНК}}(1-3r)^3/(1-2r)^2. \quad (1)$$

Показатель степени в числителе правой части выражения (1) — размер сайта связывания (n) красителя на ДНК, выраженный в числе пар оснований. Значения n для ДНК *in vitro* обычно лежат в пределах 2—2,5. Для «свободной» ДНК хроматина значение $n=3$ было вычислено из взвешенных значений $n=5-6$ для хроматина [19] и $n=6-7$ для коровых частиц нуклеосом [20].

Константу связывания БЭ с хромосомной ДНК определяли по измерениям интенсивностей флюоресценции изолированных, мягко предобработанных ДНКазой I хромосом в диапазоне концентраций от $5 \cdot 10^{-8}$ до $2 \cdot 10^{-7}$ М БЭ, построенных в координатах Клотца ($1/C$, $1/I$). Полученное значение $K_{\text{ДНК}} = (4,5 \pm 0,6) \cdot 10^5 \text{ М}^{-1}$. Принимая угол скручивания ДНК при интеркалировании одной молекулы БЭ равным 26° , находили величину относительной разности скручивания из $\Delta T_w/T_w = -(10 \cdot 26^\circ/360^\circ)r_0 = -0,72 r_0$.

Для оценки доли ДНК, релаксирующей под действием ферментов в хромосомах, экспериментальную кривую сравнивали с расчетной, вычисленной в виде относительной разности плотностей посадки красителя на никованной (уравнение (1)) и торсионно напряженной ДНК (уравнение (2)):

$$r/C = K_{\text{ДНК}} \cdot \exp[10(r_0-r)](1-3r)^3/(1-2r)^2. \quad (2)$$

Долю никованной ДНК рассчитывали из соотношения масштабов кривых по вертикальной оси.

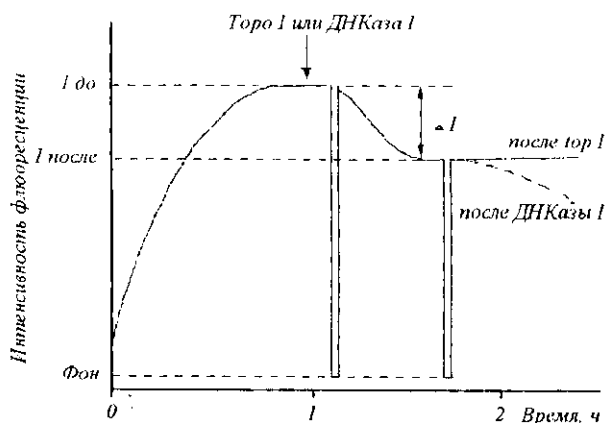


Рис. 1. Типичная кривая изменения препарата во время опыта

Результаты и обсуждение. Величины $\Delta I/I$, измеренные для изолированных политенных хромосом в диапазоне концентраций от 10^{-7} до 5×10^{-6} М БЭ, представлены на рис. 2, а. Здесь в качестве ДНК-релаксирующего агента использовали топоизомеразу I. Как видно, при $C < 10^{-6}$ М БЭ все измеренные величины отрицательны, что соответствует уменьшению флюоресценции после добавления фермента, а при $C > 10^{-6}$ М БЭ — положительны. Полученная зависимость не является следствием проявления изменений в структуре хроматина ни при окраске хромосомом БЭ, ни при релаксации напряжения в ДНК. Известно, что нарушения нуклеосомной организации хроматина наблюдаются лишь при очень высокой концентрации (10^{-5} М) красителя [22, 23], а релаксация ДНК не изменяет ее связи с белками так, чтобы уменьшилась доступность ДНК красителю [6, 10].

Для точного определения концентрации C_0 БЭ, при которой происходит компенсация сверхвитков ДНК во время окрашивания, на рис. 2, а, построена кривая, рассчитанная по изотермам связывания красителя с топологически открытой и топологически замкнутой ДНК.

Наилучшая корреляция расчетной кривой с результатами измерений на политенных хромосомах наблюдалась при $C_0 = 10^{-6}$ М БЭ. Отсюда величина $\Delta T_w/T_w = -0,1$. Второй варьируемый параметр кривой, показывающий, какая доля хромосомной ДНК напряжена и доступна релаксирующему действию топоизомеразы I, оказался близким к 15%. Остальные 85% ДНК либо малодоступны ферменту (вероятнее всего, это ДНК дисков политенных хромосом), либо разомкнуты.

Использование ДНКазы I приводило к более сложным последствиям. А именно, после быстрых изменений интенсивности следовало медленное (в течение нескольких часов) ее падение. Оно, по-видимому, связано с распадом никованной ДНК до олигонуклеотидов вследствие накопления однонитчатых разрывов. В то же время величины $\Delta I/I$ для «быстрых» изменений интенсивности флюоресценции после добавления ДНКазы I (данные не представлены) практически совпадали с таковыми, полученными при использовании топоизомеразы I. В этой связи напомним, что высокая чувствительность к нуклеазам характерна для активных районов интерфазного ядра [24]. Кроме того, проведенная нами оценка доли торсионно напряженной ДНК в 15% близка к оценке (22%) доли ДНК доменов, содержащих транскрибируемые последовательности, полученной из соотношения числа пуфов и общего числа дисков в политенных хромосомах хирономуса [11]. Все это позволяет считать

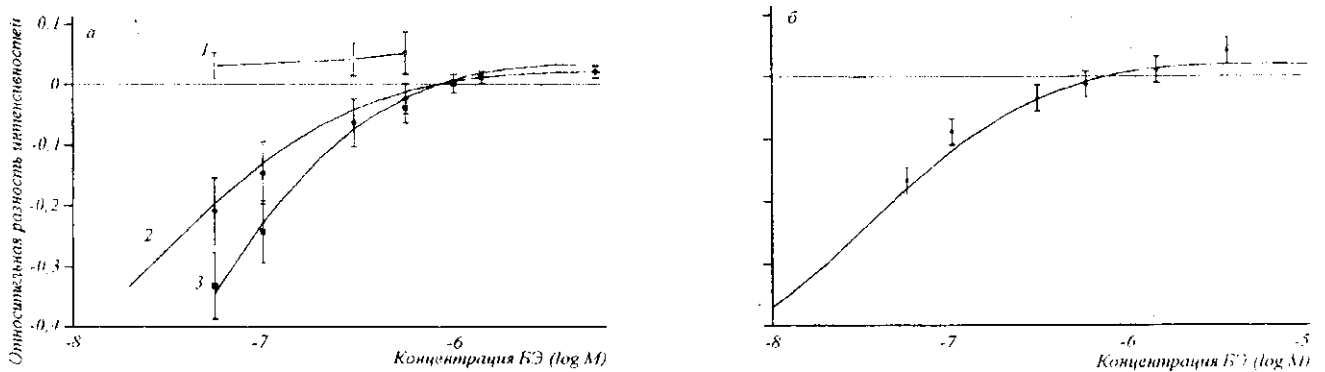


Рис. 2. А — зависимость относительного изменения флюоресценции политенных хромосом от концентрации красителя (1 — при действии ДНКазы I, добавленной после топоизомеразы I; 2 — при действии топоизомеразы I; 3 — при действии ДНКазы I на хромосомы IV без ядрышек); Б — относительное изменение флюоресценции политенных ядер при действии ДНКазы I после обработки панкреатической РНКазой

торсионно напряженную ДНК транскрибируемой ДНК.

Предложенная интерпретация результатов была подтверждена аналогичными измерениями на политенных хромосомах IV с микругически удаленным ядрышком. В самой малой хромосоме IV хирономуса *S. thummi* имеются три больших транскрипционно активных кольца Бальбиани, наличие которых приводит к увеличению в ней (по сравнению со всем хромосомным набором) доли транскрипционно активной ДНК. Поэтому обнаружив, что экспериментальные точки (рис. 2, а), принадлежащие торсионно напряженной ДНК, ложились на кривую, рассчитанную при условии, что она составляет не 15, а около 28 % всей окрашиваемой ДНК, мы получили еще одно свидетельство тому, что торсионно напряженная ДНК политенных хромосом содержит транскрибируемые последовательности ДНК.

При использовании БЭ мы учитывали, что он интеркалирует не только между парами оснований в ДНК, но и в двуцепочечные участки молекул РНК. Хотя наличие РНК в препарате не влияет на положение точки компенсации C_0 , оно приводит, однако, к искажению формы экспериментальных кривых и уменьшает долю торсионно напряженной ДНК. Для устранения этого эффекта при измерениях на политенных хромосомах было достаточно удалить ядрышко, тогда как в случае политенных ядер была необходима предварительная обработка РНКазой. Результаты измерений относительных

изменений интенсивности флюоресценции окрашенных БЭ ядер, предобработанных панкреатической РНКазой, представлены на рис. 2. б. В качестве ДНК-релаксирующего агента в данном случае использована ДНКазы I. Из сравнения рис. 2. а и б, легко заметить, что в пределах точности измерений доля торсионно напряженной ДНК и величина напряжения в ней одинаковы для политенных ядер и изолированных политенных хромосом.

Обнаруженные торсионные напряжения в ДНК очень велики. Поэтому нельзя исключить, что даже малые концентрации БЭ изменяют структуру хроматина так, что в ДНК возникают явления, связанные с разрушением структур, в которых аккумулированы сверхвитки ДНК. Такой особенностью обладают участки неканонических форм ДНК, стабилизированные взаимодействием с белками или нуклеиновыми кислотами [23]. Для проверки этой возможности использовали следующий тест.

Изолированные политенные хромосомы сначала обрабатывали раствором топоизомеразы I, которая, сохраняя топологическую замкнутость ДНК, сбрасывала имеющиеся в ней напряжения. Затем препараты отмывали от фермента и проводили стандартные измерения флюоресценции в растворах БЭ с добавлением ДНКазы I. В этих опытах отрицательно торсионно напряженная ДНК не была обнаружена. Более того, судя по кинетике действия ДНКазы I, исчезнувшая фракция ДНК заменялась на фракцию торсионно ненапряженной.

но топологически замкнутой ДНК, которая обнаруживалась по наличию значений $\Delta I/I$, целиком расположенных выше горизонтальной оси (рис. 2, а). Отсюда следует, во-первых, что фракция ДНК, релаксируемая топоизомеразой I, идентична фракции, наиболее доступной никующему действию ДНКазы I, и, во-вторых, что обнаруженное торсионное напряжение в ДНК не связано с воздействием БЭ на хроматин.

В настоящее время не известны эукариотические ферменты, которые подобно гиразам прокариот могут вводить отрицательное торсионное напряжение в ДНК. Поэтому считают, что напряжение в транскрибируемой ДНК порождается РНК-полимеразами, генерирующими при своем движении вдоль цепи ДНК положительное торсионное напряжение перед собой и отрицательное — за собой [8]. Возникновение напряжения объясняют энергетическими причинами: вращение транскрипционного комплекса энергетически менее выгодно, чем раскручивание двойной спирали ДНК. В такой модели небольшая разница в скоростях образования и релаксации торсионных напряжений может приводить к появлению стационарного положительного или отрицательного торсионного напряжения. В то же время известно, что топоизомераза I, сосредоточенная в транскрипционно активном хроматине [27], способна в равной мере релаксировать и отрицательные, и положительные торсионные напряжения в ДНК. Поэтому существует мнение [9], что в ДНК эукариотических ядер нет длительно существующих несдерживаемых торсионных напряжений.

Однако в наших опытах транскрипция была остановлена, а торсионное напряжение не исчезло. Его сохранение едва ли связано с вымыванием молекул топоизомераз из препаратов. Об этом свидетельствует значительно более медленная кинетика релаксации топоизомеразой I молекул ДНК в составе ядер, чем в изолированных хромосомах, зависящая от скорости диффузии молекул фермента в препарате. Следовательно, можно ожидать, что увеличенная скорость диффузии эндогенных топоизомераз из изолированных политеменных хромосом по сравнению с политеменными ядрами должна приводить к разным значениям торсионного напряжения в них. Этого, однако, не происходит.

Поэтому мы предположили, что стабильный уровень торсионного напряжения в ДНК интерфазных ядер поддерживается иным механизмом. Не исключено, что активность топоизомераз в ядре определяется их окружением. Известно [28], что при транскрипции рибосомных генов топоизомераза I ассоциирована с РНК полимеразой I, хотя

авторы указали, что у них нет подобных свидетельств для РНК полимеразы II. Однако существуют факты количественной и временной связи активностей РНК полимеразы II и топоизомеразы I [26]. Изменение конформации топоизомеразы I в комплексе с РНК полимеразой (или регуляторными белками) может приводить к тому, что торсионно напряженная ДНК будет восприниматься ферментом как релаксированная. В таком случае при транскрипции будут сбрасываться ферментом только надпороговые торсионные напряжения в ДНК.

Альтернативный механизм возможен на основе модулирования доступности топоизомеразе молекул ДНК за счет изменения конформации хроматина в составе транскрипционного комплекса. После остановки транскрипции, в частности, при выделении хромосом хроматин остается в таком состоянии, что его ДНК недоступна эндогенным топоизомеразам. Однако и в этом случае нужно предполагать, что топоизомеразы в ядре входят в состав неких комплексов, изменяющих их взаимодействие с ДНК, так как только экзогенные топоизомеразы, как показано нами, приводят к релаксации хромосомной ДНК.

Ф. Е. Кузин, I. Е. Шилова, Д. В. Бугрев, Г. А. Невинский, О. Д. Груздев

Стабільна торсійна напруга в ДНК політемених хромосом *Chironomus thummi*

Резюме

Мікрофлюориметричним методом визначено топологічний стан ДНК в ізольованих політемених хромосомах хірономусу *C. thummi*, які знаходяться на стадії активної транскрипції. Показано, що 15 % усієї ДНК хромосом, яка доступна in перкаляції бромистого етидію, знаходиться у торсійно напруженому стані. Числове значення виявленої напруги, виражене у відносній різниці скручення напруженої молекули ДНК по відношенню до її релаксованої форми, дорівнює -0,1. Показано також, що домени торсійно напруженої ДНК містять по слідовості, що транскрибуються. Торсійно напружена ДНК є недоступною релаксуєній дії ендогенних топоізомераз, але напруга зникає при додаванні екзогенної топоізомеразы I.

F. E. Kuzin, I. E. Shilova, D. V. Bugrev, G. A. Nevinski, A. D. Gruzdev

Stable torsional tension in DNA of *Chironomus thummi* polytene chromosomes

Summary

Topological state of DNA in isolated polytene chromosomes of *Chironomus thummi* at the stage of the highest transcription activity has been determined by microfluorometrical method. About 15 % of chromosomal DNA stained with EtBr have been found to be under torsional stress. The value of the stress expressed as the relative twist difference is -0.1. It has been shown that domains of the stressed DNA contain transcriptionally active genes. Torsionally stressed DNA relaxes after addition of endogeneous topoisomerase I.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kramer H. R., Sinden R. R. Measurement of unrestrained negative supercoiling and topological domain size in living human cells // *Biochemistry*.—1997.—36.—P. 3151—3158.
2. McClure W. R. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes // *Ann. Rev. Biochem.*—1985.—54.—P. 171—204.
3. Darst S. A., Edwards A. M., Kubalek E. W., Kornberg R. D. Threedimensional structure of yeast RNA polymerase II at 16 Å resolution // *Cell*.—1991.—66.—P. 121—128.
4. Hirose S., Suzuki Y. *In vitro* transcription of eukaryotic genes is affected differently by the degree of DNA supercoiling // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1988.—85.—P. 718—722.
5. Ijzerman M., Hanawalt P. C. Localized torsional tension in the DNA of human cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1992.—89.—P. 6055—6059.
6. Jupe E. R., Sinden R. R., Catwright I. L. Stably maintained microdomain of localized unrestrained supercoiling at *Drosophila* heat shock gene locus // *EMBO J.*—1993.—12.—P. 1067—1075.
7. Jupe E. R., Sinden R. R., Catwright 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.
8. Liu L. F., Wang J. C. Supercoiling of the DNA template during transcription // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1987.—84.—P. 1353—1358.
9. Freeman L. A., Garrard W. T. DNA supercoiling in chromatin structure and gene expression // *Crit. Rev. in Eukaryotic Gene Expression*.—1992.—2.—P. 165—205.
10. Sinden R. R., Carlson J. O., Pettijohn D. E. Torsional tension in the DNA double helix measured with trimethylpsoralen in living *E. coli* cells: Analogous measurements in insect and human cells // *Cell*.—1980.—21.—P. 773—783.
11. Кикнадзе И. И. Сравнительная характеристика пуффинга в хромосомах слюнных желез *Chironomus thummi* в личиночном возрасте и при метаморфозе. II. Пуффинг в хромосомах I, II и III // *Цитология*.—1978.—28.—С. 514—521.
12. Gruzdev A. D., Shurdov M. A. Topological state of DNA in polytene chromosomes // *Biochim. et biophys. acta*.—1992.—1131.—P. 35—40.
13. Кикнадзе И. И., Панова Т. М., Захаренко Л. П. Сравнительная характеристика пуффинга в хромосомах слюнных желез *Chironomus thummi* в личиночном развитии и при метаморфозе. III. Транскрипционная активность ядрышка и колец Бальбиани // *Цитология*.—1981.—23, № 5.—С. 531—538.
14. Кикнадзе И. И., Колесников Н. Н., Лопатин О. Е. Хиромомус *Chironomus thummi* Kieff. (лабораторная культура) // *Объекты биологии развития*.—М.: Наука, 1975.—С. 95—127.
15. Robert M. Einfluss von Ionenstärke und pH auf die differentielle Decondensation der Nucleoproteide isolierter Speicheldrüsen-Zellkerne und -Chromosomen von *Chironomus thummi* // *Chromosoma*.—1971.—37.—S. 1—33.
16. Bauer W. R. Structure and reactions of closed duplex DNA // *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*—1978.—7.—P. 287—313.
17. Бугреев Д. В., Васюткина К. Л., Максимова Г. А., Бунева В. Н., Андо Т., Невинский Г. А. Узнавание ДНК-топоизомеразой I человека суперскрученной ДНК: оценка относительного вклада специфических и неспецифических взаимодействий // *Молекуляр. биология*.—1997.—3(3). № 3.—С. 418—430.
18. McGhee J. D., von Hippel P. H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: cooperative and noncooperative binding of large ligands to a onedimensional homogeneous lattice // *J. Mol. Biol.*—1974.—54.—P. 171—204.
19. Vergani L., Gavazzo P., Mascetti G., Nicolini C. Ethidium bromide intercalation and chromatin structure: a spectropolarimetric analysis // *Biochemistry*.—1994.—33.—P. 6578—6585.
20. McMurray C. T., van Holde K. E. Binding of ethidium to nucleosome core particle. I. Binding and dissociation reaction // *Biochemistry*.—1991.—30.—P. 5631—5643.
21. Bauer W., Vinograd J. Interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. II. The free energy of superhelix formation in SV40 DNA // *J. Mol. Biol.*—1970.—47.—P. 419—435.
22. Doenecke D. Ethidium bromide binding to nucleosomal DNA // *Exp. Cell Res.*—1977.—109.—P. 309—315.
23. Straetling W. H., Seidel I. Relaxation of chromatin structure by ethidium bromide binding: determination by viscosity and histone dissociation studies // *Biochemistry*.—1976.—15.—P. 4803—4809.
24. Hutchison N., Weintraub H. Localization of DNase I-sensitive sequences to specific regions of interphase nuclei // *Cell*.—1985.—43.—P. 471—482.
25. Reaban M. E., Griffin J. A. Induction of RNA-stabilized DNA conformers by transcription of an immunoglobulin switch region // *Nature*.—1990.—348.—P. 342—344.
26. Van Holde K., Zlatanova J. Unusual DNA structures, chromatin and transcription // *BioEssay*.—1994.—16.—P. 59—68.
27. Gilmour D. S., Pflugfelder G., Wang J. C., Lis J. T. Topoisomerase I interacts with transcribed regions in *Drosophila* cells // *Cell*.—1986.—44.—P. 401—407.
28. Rose K. M., Szopa J., Han F.-S., Cheng Y. C., Richter A., Scheer U. Association of DNA topoisomerase I and RNA polymerase I: a possible role for topoisomerase I in ribosomal gene transcription // *Chromosoma*.—1988.—96.—P. 411—416.
29. Stewart A. F., Herrera R. E., Nordheim A. Rapid induction of *c-fos* transcription reveals quantitative linkage of RNA polymerase II and DNA topoisomerase I enzyme activities // *Cell*.—1990.—60.—P. 141—149.

УДК 577.213

Поступила в редакцию 14.04.98