УДК 577.2:577.32

О.П. ЛИМАНСЬКИЙ
Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова
АМН України, Харків
E-mail: o.lymunskiy@mail.ru
Laboratory of Plasma Membrane and Nuclear Signaling,
Graduate School of Biostudies
Kyoto University, Kyoto, 606-8502, Japan

ВІЗУАЛІЗАЦІЯ РНК-ТРАНСКРИПТІВ ЗА ДОПОМОГОЮ АТОМНО-СИЛОВОЇ МІКРОСКОПІЇ

За допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ) візуалізовано РНК-транскрипти після проведення транскрипції з Т7 РНК-полімеразою in vitro. Для транскрипції як матрицю використовували фрагмент лінеаризованої ДНК pGEMEX довжиною 1414 пар нуклеотидів, що містить промотор та область термінації транскрипції бактеріофагу Т7. РНК-транскрипти, іммобілізовані на слюді (субстраті для АСМ), утворюють джгутоподібні конденсовані структури довжиною 122 ± 10 нм з характерним співвідношенням довжини та ширини 4,5—5. Обговорюються особливості іммобілізації молекул РНК на слюді для їхньої наступної візуалізації за допомогою АСМ.

© О.П. ЛИМАНСЬКИЙ, 2007

Вступ. РНК — багатофункціональна молекула, для якої є характерними як функції ДНК, так і протеїнів. Головними функціями молекул РНК є комплементарна реплікація, кодування та декодування протеїнів, молекулярне впізнавання за рахунок формування унікальної просторової поверхневої структури глобули (яку утворюють молекули РНК), каталітична функція (каталітичні РНК були названі рибозимами) [1].

В прокаріотах та еукаріотах РНК синтезується за допомогою ДНК-залежних РНК-полімераз, які відповідають за зв'язування з промотором, плавлення ДНК, ініціацію транскрипції, елонгацію ланцюга РНК та термінацію транскрипції. Для еукаріотів відомі три різні РНК-полімерази (РНКП) — РНКП I, РНКП II та РНКП III, кожна з яких транскрибує різні класи генів. Численні дослідження за допомогою рентгеноструктурного аналізу, ДНК-футпринтінгу, флуоресцентної резонансної спектроскопії істотно покращили наші уявлення щодо елонгаційного комплексу РНКП з ДНК та РНК-транскриптом [2, 3]. Відомо, що РНК-транскрипт, який зростає, видавлюється при елонгації через вихідний канал РНКП, а контакти між РНК-транскриптом та РНКП здійснюються для 14—16 нуклеотидів від 3′-кінця. Отримання нових даних щодо структури промотору та елонгаційного комплексу стало можливим завдяки розвитку мікроскопічної техніки високої роздільної здатності. Електронна мікроскопія та атомно-силова мікроскопія дозволили одержати важливу інформацію про просторовий зв'язок між ДНК, РНК та РНКП при транскрипційній елонгації, а саме про глобальну топологію відкритого промотору та елонгаційного комплексу. Виходячи з експериментальних досліджень щодо транскрипції еукаріотів та прокаріотів, для комплексу елонгації була запропонована модель намотування ДНК [4]. В елонгаційному комплексі намотування ДНК на РНКП та утворення гібрида РНК-ДНК викликають розкриття подвійної спіралі ДНК та виникнення транскрипційної петлі. Проте залишається чимало невирішених проблем, що стосуються того, яким чином РНК-полімераза транскрибує довгі фрагменти ДНК. Особливо багато припущень було висловлено про рух РНКП вздовж ДНК *in vivo*, а саме: чи обертається РНКП навколо ДНК або фрагмент

TSitol. Genet. - Vol.41(2) www.cytgen.com

знаходиться у такому ротаційно напруженому стані, що ДНК повинна обертатися навколо спіральної осі так, що нитка ДНК проходить через протеїн. Проблемою залишається також візуалізація молекул РНК, що зростають в процесі елонгації.

Оскільки молекули РНК вивчені за допомогою АСМ значно менше, ніж молекули ДНК, в даній роботі представлено результати безпосередньої візуалізації за допомогою атомно-силової мікроскопії РНК-транскриптів, що утворилися після проведення транскрипції з бактеріальною Т7 РНК-полімеразою. Наше дослідження показує, що РНК-транскрипти на поверхні субстрату утворюють джгутоподібні конденсовані структури, що характеризуються співвідношенням довжини та ширини 4,5—5.

Матеріали і методи. *Підготовка зразків ДНК для ПЛР та АСМ.* Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) лінійну ДНК отримували рестрикцією суперспіральної ДНК pGEMEX («Promega», США) довжиною 3993 п.н. ендонуклеазою *Sca*I («New England Biolabs», Англія). Сконструйовані нами праймери L1 та L2 обмежували фрагмент ДНК, що містив промотор та область термінації транскрипції Т7 РНК-полімерази. Праймери L1 та L2, послідовності яких з відповідними позиціями на ДНК pGEMEX наведено нижче, отримані від «Sigma» (Японія): 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 з гарячим стартом проводили в об'ємі реакційної суміші 50 мкл на ампліфікаторі GeneAmp 9700 («Perkin Elmer», США). Параметри ПЛР: початкова інкубація — 95 °С, 2 хв, денатурація — 95 °С, 1 хв, відпал — 69—73 °С, 1 хв, синтез — 74 °С, 1 хв, кількість циклів — 35. Температуру відпалу визначали теоретично за допомогою програми Oligo. З метою мінімізації ампліфікації неспецифічних фрагментів проводили декілька постановок ПЛР за різних температур відпалу — 69, 71, 73 °С.

Для візуалізації ампліконів 15 мкл ПЛР-продукту розділяли шляхом електрофорезу в 2%-ному агарозному гелі в буфері з подальшим фарбуванням бромистим етидієм.

Для очищення ампліфікованого фрагмента ДНК після проведення електрофорезу вирізали смугу гелю, що містить амплікон, опромінюючи гель довгохвильовим УФ-джерелом випромінювання низької інтенсивності («BioRad», США). Для подальшої очистки амплікона від нуклеотидів, праймерів, ДНК-полімерази та бромистого етидію використовували набір QIAquick PCR purification kit («QIAgen», Японія) відповідно до рекомендацій виробника, а також екстракцію фенол/хлороформом з наступним переосадженням етанолом.

Для проведення ПЛР використовували термостабільну ДНК-полімеразу високої точності двох видів — Pyrobest ДНК-полімеразу (TaKaRa Co., Японія) та Invitrogen Platinum ДНК-полімеразу («Invitrogen», Японія).

Для нанесення ДНК на свіжосколоту слюду використовували 10 мМ HEPES буфер, який містив 2,5 мМ $MgCl_2$. На смугу слюди розміром 1 см² наносили краплю розчину ДНК з концентрацією 0,1 мкг/мл у ТЕ-буфері (10 мМ трис-HCl pH 7,9, 1 мМ ЕДТА) об'ємом 10 мкл, промивали після 2-хвилинної експозиції деіонізованою водою, обдували потоком аргону та витримували зразок під тиском 100 мм рт. ст. впродовж 20 хв.

Проведення транскрипції та візуалізація транскриптів. Для транскрипції як матрицю використовували амплікон довжиною 1414 п.н., що містив промотор та область термінації транскрипції Т7 РНК-полімерази. ДНК-матрицю було отримано за допомогою рестрикції ендонуклеазою ScaI (рис. 1, *а*) суперспіральної ДНК pGEMEX з наступною ампліфікацією та очисткою амплікона. Реакцію транскрипції проводили за наступним протоколом з використанням набору для транскрипції за допомогою Т7 РНК-полімерази («Promega», США). Реакційна суміш містила матрицю ДНК (2 мМ), буфер для транскрипції (40 мМ трис-HCl pH 7,9, 6 мМ $MgCl_2$, 10 мМ NaCl), 10 мМ дитіотритол, 2 мМ спермідин, 0,05 % твін 20, 40 од. РНазіну, 20 од. РНК-полімерази у загальному об'ємі 20 мкл. Реакцію транскрипції ініціювали додаванням нуклеотидів CTP, GTP, UTP та ATP до кінцевої концентрації 2,5 мМ. Після 60 хв інкубації реакція була зупинена нагріванням впродовж 15 хв за температури 70 °С. Для видалення матриці ДНК та деградації ДНК, що може призвести до контамінації препарату РНК, після проведення транскрипції до ре-

TSitol. Genet. - Vol.41(2) www.cytgen.com

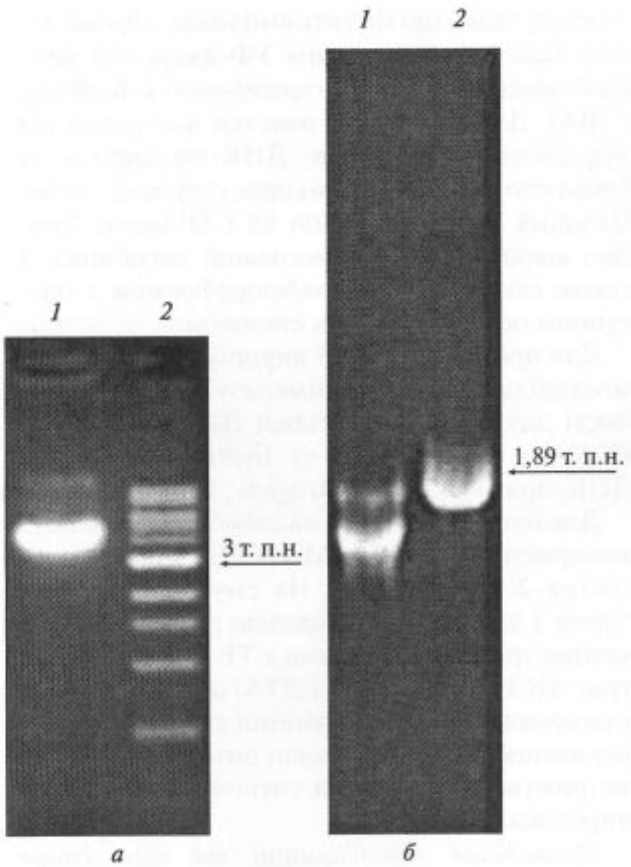

Рис. 1. (*а*) Аналіз лінійної ДНК pGEMEX після рестрикції суперспіральної ДНК pGEMEX з ендонуклеазою *Sca*I у 1,5%-ному агарозному гелі: *1* — лінійна ДНК pGEMEX довжиною 3993 п.н.; *2* — 1000 п.н. маркер молекулярної маси; смуга підвищеної інтенсивності відповідає фрагменту довжиною 3000 п.н. (*б*) Аналіз РНК-транскриптів після проведення транскрипції з Т7 РНК-полімеразою на матриці фрагмента лінійної ДНК pGEMEX довжиною 1414 п.н. у 1,8 %-ному агарозному гелі з формальдегідом та контрольній плазміді pTRI-Xef довжиною 1890 п.н. Очікувана довжина транскриптів дорівнює 1122 нуклеотиди

акційної суміші додавали 1 мкл ДНКази I, вільної від РНКаз («Ambion», США), та інкубували протягом 15 хв за температури 37 °С. Для інактивації ДНКази реакційну суміш інкубували за температури 70 °С протягом 10 хв. Для контролю ефективності транскрипції електрофорез проводили у 1,2%-ному агарозному гелі, що містив 1,8 % формальдегіду (рис. 1, *б*). Для проведення електрофорезу за денатуруючих умов 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 % SDS.

Атомно-силова мікроскопія. В роботі використовували атомно-силовий мікроскоп (АСМ) Nanoscope IV MultiMode System (Veeco Instruments Inc., США) з Е-сканером. АСМ-зображення ДНК були записані за допомогою вібруючого варіанта АСМ в повітрі у режимі «висота» з використанням OMCL-AC160TS кантилеверів («Olympus Optical Co.», Японія) з резонансною частотою 340—360 кГц та константою твердості 42 Н/м. Зображення отримані у форматі 512 × × 512 пікселей, згладжені та проаналізовані за допомогою програмного забезпечення Nanoscope (версія 5.12r3) (Veeco Instruments Inc., США).

Результати досліджень та їх обговорення. Важливою особливістю елонгаційних комплексів, що утворюються при транскрипції (ДНК — РНК-полімераза — РНК-транскрипт), є те, що після закінчення транскрипції елонгаційний комплекс швидко дисоціює. При цьому швидкість дисоціації для бактеріальної Т7 РНК-полімерази значно вище у порівнянні з еукаріотичними полімеразами. Зазначений факт істотно ускладнює візуалізацію як цілого елонгаційного комплексу, так і окремих РНК-транскриптів. Тому для АСМ-візуалізації елонгаційного комплексу часто застосовують ДНК-матриці, послідовність нуклеотидів яких синтезують таким чином, що транскрипція зупиняється у певних позиціях. Наприклад, у роботі [6] використовували три такі матриці. Одна з них довжиною 24 п.н. характеризувалась тим, що від положення старту ініціації транскрипції і до позиції 24 вище старту ініціації транскрипції ДНК містила тільки три нуклеотиди (dTTP, dATP, dCTP). При цьому в реакційну суміш додавали тільки три з чотирьох рибонуклеотидів (за винятком CTP), що призводило до термінації транскрипції у позиції 25, у якій знаходився dGTP.

У даній роботі було застосовано інший підхід для запобігання швидкої дисоціації елонгаційного комплексу, а саме: ми використовували ДНК-матрицю, що містила на відстані 1122 нуклеотидів від сайту ініціації транскрипції область термінації транскрипції Т7 РНК-полімерази. Ефективність термінації транскрипції можна регулювати: вона залежить від

TSitol. Genet. - Vol.41(2) www.cytgen.com

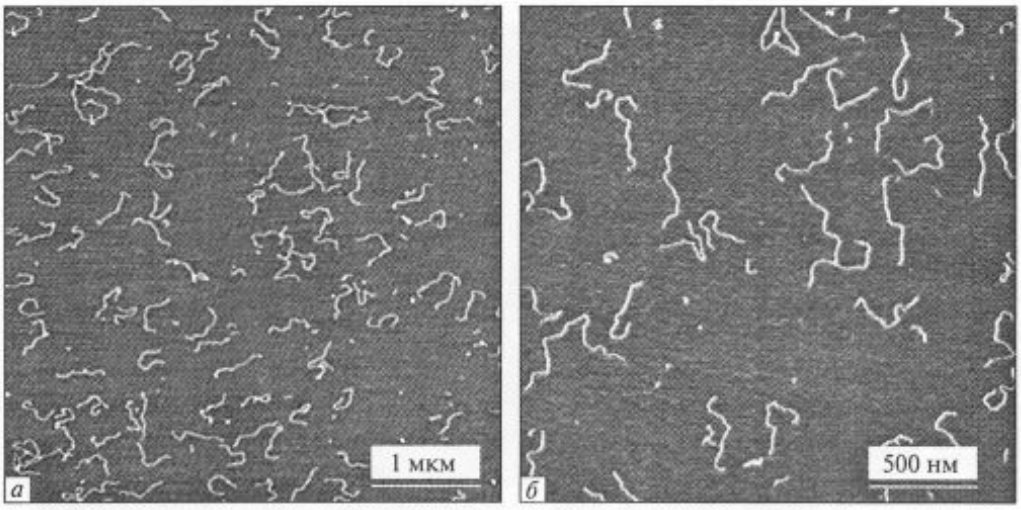

Рис. 2. Отримане за допомогою атомно-силової мікроскопії зображення фрагмента лінійної ДНК pGEMEX, довжиною 1414 п.н., яку використовували як матрицю для транскрипції: *а* — розмір кадру 4 мкм × 4 мкм; *б* — розмір кадру 2,1 мкм × 2,1 мкм

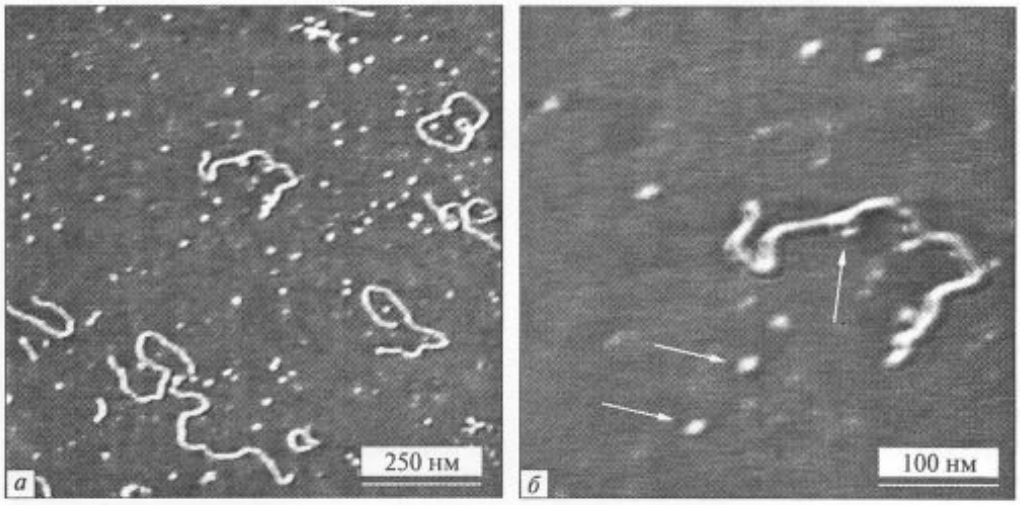

Рис. 3. АСМ-зображення фрагмента лінійної ДНК pGEMEX після проведення транскрипції з Т7 РНК-полімеразою без обробки ДНКазою I: *а* — розмір кадру 1 мкм × 1 мкм; *б* — розмір кадру 400 нм × 400 нм. Стрілки вказують на молекули Т7 РНК-полімерази

концентрації компонентів реакційної суміші, іонної сили і pH буфера для транскрипції та може сягати 70—80 %.

АСМ-зображення фрагмента лінійної ДНК pGEMEX довжиною 1414 п.н., що використовували як матрицю для транскрипції, наведено на рис. 2. Визначена безпосередньо з АСМ-зображень контурна довжина ампліконів дорівнює 435 ± 15 нм, що відповідає відстані між нуклеотидами вздовж осі спіралі 3,07 Å, знаходиться в межах очікуваної довжини у припущенні B-форми ДНК. Зазначимо, що промотор та термінатор транскрипції для Т7 РНК-полімерази локалізовані асиметрично по відношенню до 5′- та 3′-кінців фрагмента: промотор транскрипції Т7 РНКП (довжина якого дорівнює 19 н.) знаходиться в позиції 1211—1230 п.н. від 5′-кінця амплікона, а область термінації транскрипції — в позиції 91—182 п.н. Отже, очікувана довжина транскриптів дорівнює 1122 н. (без термінатора транскрипції) та 1214 н. (з урахуванням області термінації).

Для АСМ-візуалізації комплексів Т7 РНК-полімерази з лінійною ДНК без проведення

TSitol. Genet. - Vol.41(2) www.cytgen.com

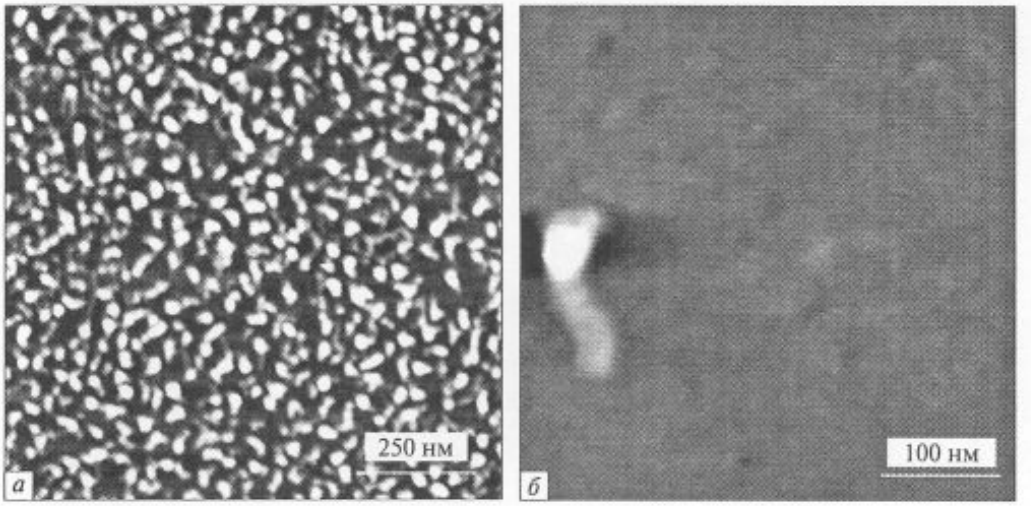

Рис. 4. АСМ-зображення РНК-транскриптів після проведення транскрипції з Т7 РНК-полімеразою на матриці лінійної ДНК pGEMEX довжиною 1414 п.н. та обробки ДНК-азою I. Очікувана довжина транскриптів дорівнює 1100 нуклеотидів: *а* — розмір кадру 1 мкм × 1 мкм; *б* — розмір кадру 315 нм × 315 нм

транскрипції використовували буфер для транскрипції Promega (США) (рис. 3). Молекули Т7 РНКП, молекулярна маса яких дорівнює 98,8 кДа, виглядають на АСМ-зображенні як сфери діаметром 18 нм. Зазначимо, що за даного високого співвідношення молярних концентрацій Т7 РНКП та ДНК (для молекул, зображених на рис. 3, це співвідношення становить 20) можна бачити, що зв'язування РНК-полімерази з фрагментом ДНК, що містить промотор (тобто сайт високоспецифічного зв'язування), не є специфічним. Зображення з високою роздільною здатністю (рис. 3, *б*) показує, що з даним ампліконом утворили комплекс 4—5 молекул Т7 РНКП.

Наші результати узгоджуються з даними роботи [5], в якій показано, що зв'язування Т7 РНК-полімерази з плазмідою pAR111, що несе промотор Т7 РНК-полімерази, порівняно з плазмідою pBR322, послідовність якої не містить промотор, носить неспецифічний характер у діапазоні іонної сили (I) 40—100 мМ Na^+ — поруч із зв'язуванням молекул Т7 РНК-полімерази з промотором відбувається зв'язування з іншими сайтами молекули ДНК (за рахунок електростатичної взаємодії позитивно заряджених сайтів Т7 РНКП з негативно зарядженими фосфатними групами ДНК). І лише за значення I = 0 відбувається зв'язування тільки з промотором Т7 РНКП.

Для візуалізації безпосередньо РНК-транскриптів (про те, що транскрипція з даного фрагмента ДНК успішно відбувається, свідчить аналіз продуктів транскрипції за допомогою електрофорезу в агарозному гелі з формальдегідом, наведений на рис. 1, *б*) ми видаляли ДНК-матрицю та праймери за допомогою інкубації з ДНКазою I реакційної суміші після проведення транскрипції.

Отримані АСМ-зображення РНК-транскриптів представлені на рис. 4. Можна бачити, що молекули ДНК повністю видалені, що збігається з результатами електрофорезу, а білі крапки відповідають молекулам РНК-полімерази, у комплексі з якими і знаходяться РНК-транскрипти. Завдяки АСМ-зображенню з високою роздільною здатністю було визначено, що РНК-транскрипти, іммобілізовані на слюді, утворюють джгутоподібні конденсовані структури довжиною 122 ± 10 нм із співвідношенням довжини та ширини 4,5—5. Оскільки це значення значно менше очікуваної довжини транскриптів, що дорівнює 336 нм (1122 н × × 0,3 нм = 336 нм), можна зробити висновок, що однониткові молекули РНК утворюють мультиланцюгові конденсовані структури. Раніше за

TSitol. Genet. - Vol.41(2) www.cytgen.com

допомогою АСМ [8] також було продемонстровано, що довжина молекул РНК (що утворюють подібні конденсовані структури), які транскрибуються з лінійної ДНК-матриці, є вдвічі меншою порівняно з довжиною ДНК-матриці.

Зазначені морфологічні особливості молекул РНК, візуалізованих за допомогою АСМ, пояснюються, можливо, значним впливом поверхневих властивостей слюди, на якій РНК-транскрипти іммобілізовані. В свою чергу поверхневі властивості субстрату визначаються гідрофобністю та щільністю катіонів, локалізованих на поверхні слюди. Річ у тому, що для візуалізації молекул РНК використовують таку ж саму слюду, як і для візуалізації молекул ДНК, тобто слюду з такою гідрофобністю та поверхневою щільністю катіонів, при якій лінійні та суперспіральні дволанцюгові молекули ДНК не утворюють конденсовані структури при іммобілізації на поверхні слюди, а характеризуються рівномірним розподілом фрагментів ДНК. Раніше нами було показано, що навіть незначна зміна гідрофобності та щільності катіонів поверхні слюди призводить до значної зміни морфології іммобілізованих молекул ДНК [8, 9]. Наприклад, зменшення гідрофобності веде до істотного витягнення суперспіральних молекул ДНК, яке характеризується збільшенням спірального райзу, тобто відстані між нуклеотидами вздовж осі дуплекса, з 0,34 нм (характерного для В-форми ДНК) до 4,8—5,3 нм. В той же час при збільшенні гідрофобності та щільності катіонів на поверхні слюди молекули суперспіральної ДНК компактизуються — переходять до S-ДНК, або стиснутих молекул ДНК, з відстанню між нуклеотидами вздовж осі спіралі 0,2 нм. Все сказане дає змогу зробити висновок, що зміна гідрофобності та поверхневої щільності катіонів слюди веде до вражаючої компактизації або витягнення молекул лінійної та суперспіральної ДНК.

Аналіз отриманих результатів з візуалізації РНК-транскриптів, а також суперспіральних молекул ДНК, іммобілізованих на слюді з різною гідрофобністю та поверхневою щільністю заряду [8, 9], показує, що гідрофобність та поверхнева щільність катіонів слюди, яку використовують для іммобілізації РНК-транскриптів, є занадто високими для того, щоб візуалізувати лінійні однониткові молекули РНК, а не утворені ними конденсовані структури. Тому для візуалізації поодиноких молекул РНК необхідно оптимізувати поверхневу щільність катіонів слюди таким чином, щоб при іммобілізації на ній молекул РНК формувалися шпилькові структури або витягнуті молекули на відміну від візуалізованих конденсованих структур.

Робота була частково підтримана грантом № P04653 Japanese Society for the Promotion of Science (Японія), а також грантом № АМН59/2004 Академії медичних наук України.

Автор висловлює подяку О. Лиманській (ННЦ «Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини») за допомогу та критичні зауваження при підготовці статті.

SUMMARY. RNA transcripts after transcription elongation with T7 RNA polymerase *in vitro* were visualized by using atomic force microscopy (AFM). Fragment of pGEMEX linear DNA with the length of 1414 nucleotide pairs carrying promoter and terminator of bacteriophage T7 was used as DNA template for transcription. Immobilized on the mica (AFM substrate) RNA transcripts formed rod-like condensed structures with the length of 122 ± ± 10 nm and characteristic aspect ratio ca. 4,5—5. Problems of RNA immobilization onto mica for subsequent visualization by AFM are discussed.

РЕЗЮМЕ. Посредством атомно-силовой микроскопии (АСМ) визуализированы РНК-транскрипты после проведения транскрипции с Т7 РНК-полимеразой *in vitro*. В качестве матрицы для транскрипции использовали фрагмент линеаризованной ДНК pGEMEX длиной 1414 пар нуклеотидов, содержащий промотор и область терминации транскрипции бактериофага Т7. РНК-транскрипты, иммобилизованные на слюде (субстрате для АСМ), образуют жгутоподобные конденсированные структуры длиной 122 ± 10 нм с характерным соотношением длины и ширины 4,5—5. Обсуждаются особенности иммобилизации молекул РНК на слюде для их последующей визуализации с помощью АСМ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Спирин А.С.* Мир РНК и его эволюция // Молекуляр. биология. — 2005. — **39**, № 4. — С. 550—556.
2. *Tahirov T., Temiakov D., Anikin M., Patlan V., McAllister W., Vassylyev D., Yokoyama S.* Structure of a T7 RNA polymerase elongation complex at 2.9 A resolution // Nature. — 2002. — **420**. — P. 43—50.
3. *Temiakov D., Anikin M., McAllister W.T.* Characteriza-

TSitol. Genet. - Vol.41(2) www.cytgen.com

tion of T7 RNA polymerase transcription complexes assembled of nucleic acid scaffolds // J. Biol. Chem. — 2002. — **277**, № 49. — P. 47035—47043.
4. *Rivetti C., Codeluppi S., Dieci G., Bustamante C.* Visualizing RNA extrusion and DNA wrapping in transcription elongation complexes of bacterial and eukaryotic RNA polymerases // J. Mol. Biol. — 2003. — **326**, № 5. — P. 1413—1426.
5. *Smeekens S., Romano L.* Promoter and nonspecific DNA binding by the T7 RNA polymerase // Nucl. Acids Res. — 1986. — **14**, № 6. — P. 2812—2827.
6. *Hansma H., Pietrasanta L.,Golan R., Sitko J., Viani M., Paloczi G., Smith B., Hansma P.* Recent highlights from atomic force microscopy // J. Biomol. Struct. & Dyn. — 2000. — **18**, № 2. — P. 271—275.
7. *Hansma H.G., Oroudjev E., Baudrey S., Jaeger L.* TectoRNA and 'kissing-loop' RNA: atomic force microscopy of self-assembling RNA structures // J. Microsc. — 2003. — **212**, Pt 3. — P. 273—279.
8. *Лиманский А.П.* Исследование аминомодифицированной слюды как субстрата для атомно-силовой микроскопии нуклеиновых кислот // Біополімери і клітина. — 2001. — **17**, № 4. — С. 292—297.
9. *Лиманская Л.А., Лиманский А.П.* S-форма ДНК — суперспиральная ДНК с 1.94 — 2.19 Å расстоянием между парами оснований вдоль оси дуплекса // Молекуляр. биология. — 2006. — **40**, № 1. — С. 122—136.

Надійшла 11.05.06

TSitol. Genet. - Vol.41(2) www.cytgen.com