

ФОРМИРОВАНИЕ СЛОЖНОЙ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ДНК В ПРОЦЕССЕ СИНТЕЗА *ab initio*

© 2024 г. Н.В. Зырина*, **, О.М. Селиванова***, Е.В. Шевченко****, В.Н. Антипов*, #

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

**Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН,
Институтская ул., 7, Пущино Московской области, 142290, Россия

***Институт белка РАН, Институтская ул., 4, Пущино Московской области, 142290, Россия

****Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники
Санкт-Петербургского государственного университета,
Ульяновская ул., 1, Петергоф, Санкт-Петербург, 198504, Россия

#E-mail: valery_a@rambler.ru

Поступила в редакцию 27.04.2024 г.

После доработки 27.04.2024 г.

Принята к публикации 17.07.2024 г.

В процессе синтеза *ab initio* большим фрагментом Bst ДНК-полимеразы образуются продукты со сложной пространственной организацией. Анализ методом атомно-силовой микроскопии продуктов синтеза, полученных с добавлением минимального количества никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I, позволил описать структуры, сформированные в результате этого синтеза, и предположить, что их формирование происходит по механизму репликации, зависимой от рекомбинации.

Ключевые слова: синтез ДНК *ab initio*, большой фрагмент ДНК-полимеразы Bst, атомно-силовая микроскопия.

DOI: 10.31857/S0006302924060016, **EDN:** LGUEHW

Синтез ДНК *ab initio* – это неканонический синтез ДНК термофильными ДНК-полимеразами прокариот из dNTP в отсутствие какой-либо добавленной ДНК [1]. Реакция является изотермической и при определенных условиях может отличаться крайне высоким выходом продукта. Эффективность реакции значительно увеличивается при добавлении ферментов, гидролизующих ДНК.

Последовательности ДНК, синтезированные *ab initio* состоят из коротких АТ-богатых повторов палиндромной или непалиндромной структуры. Первые сведения о структуре этих молекул были представлены в работах [2, 3]. Эксперименты с использованием атомно-силовой микроскопии (ACM), электрофореза и нуклеаз показали, что ДНК, полученная в ходе синтеза *ab initio* большим фрагментом ДНК-полимеразы Bst, как в присутствии никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I (далее низкоза), так и без этого фермента, состоит из разветвленных нитей разной длины, часть из которых образует сетевидные структуры [4].

Сокращение: ACM – атомно-силовая микроскопия.

Для выяснения причины формирования сложной пространственной организации продуктов синтеза *ab initio* в этом исследовании мы сфокусировались на детальном анализе изображений, полученных с помощью ACM. Исследовали изображения высокомолекулярной ДНК, синтезированной с добавлением минимального количества никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I и без нее, описали структуры, сформированные в результате синтеза, который не направляется матрицей, и предположили, какой механизм синтеза в этом задействован.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез ДНК *ab initio* большим фрагментом Bst полимеразы. Реакционная смесь (20 мкл) состоящая из 2 У большого фрагмента Bst полимеразы, 0.2 мМ dNTPs в реакционном буфере ThermoPol (20 мМ Трис–HCl, рН 8.8, 10 мМ KCl, 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.1% Тритона X-100) и 10 мМ MgCl₂ была инкубирована 24 ч при 55°C. Реакционная смесь с добавленной никующей эндонуклеазой Nt.BspD6I (0.2 У) была инкубирована в течение 1 ч при 55°C. Реакцию останавливали добавлени-

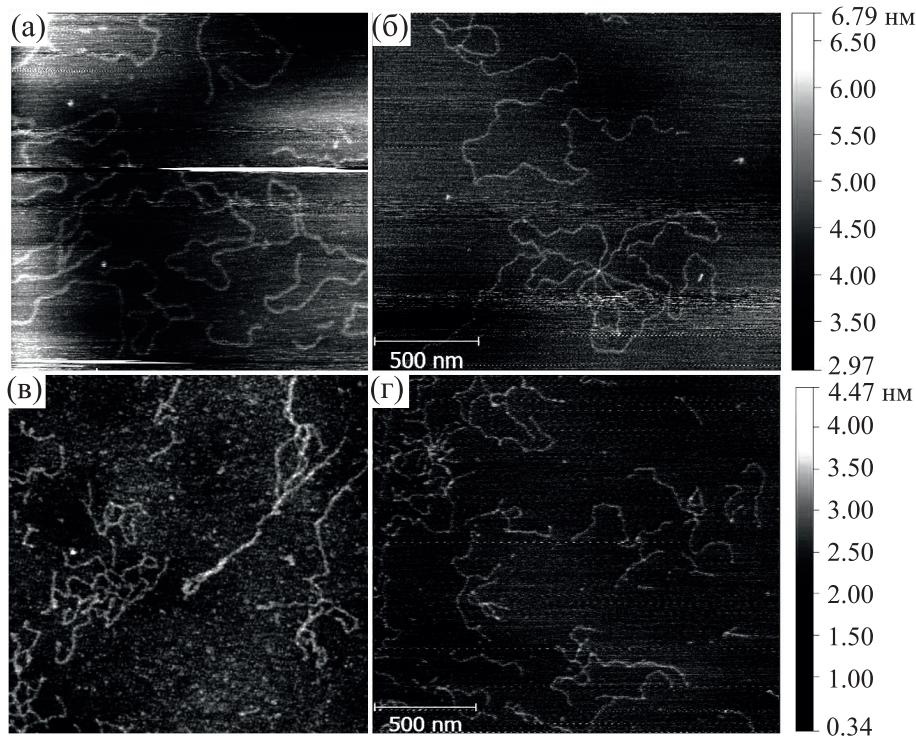


Рис. 1. Изображения, полученные методом АСМ: (а) – геномная ДНК *Bacillus stearothermophilus*, выделенная с помощью набора «ДНК-Экстрапон EX-512» (НПК ООО «Синтол», Москва, Россия); (б) – ДНК фага лямбда, 48502 п. о. (ООО «СибЭнзайм», Новосибирск, Россия); (в) – ДНК, полученная в процессе синтеза *ab initio* Bst-полимеразой в течение 24 ч; (г) – ДНК, полученная в процессе синтеза *ab initio* Bst-полимеразой с добавлением минимального количества (0.2 U) никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I в течение 1 ч. Буфер для нанесения на слюду: 2 мМ трипл-НСl (рН 7.6) и 10 мМ MgCl₂. 20 мкл раствора ДНК с концентрацией 1 нг/мкл. Шкала 500 нм. Примечание: образование сложных пространственных структур ДНК, синтезированной *ab initio*, не связано с какими-либо условиями АСМ (например, концентрацией MgCl₂ или концентрацией ДНК), поскольку природные ДНК в тех же условиях представлены плавно изогнутыми линейными молекулами.

ем 10 мМ ЭДТА. Продукты синтеза *ab initio* очищали, определяли концентрацию и анализировали в 1% агарозном геле, как описано в работе [4].

Атомно-силовая микроскопия. Сканирование продуктов синтеза *ab initio* было выполнено в ресурсном центре «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники» Научного парка СПбГУ на исследовательском комплексе люминесцентной и рамановской микроспектрометрии «Интегра Спектра» («НТ-МДТ», Зеленоград, Россия) в полуконтактном режиме, как описано ранее [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

АСМ позволила выявить значительные отличия продуктов синтеза *ab initio* Bst полимеразой от природных высокомолекулярных ДНК бактериофага лямбда и геномной ДНК *Bacillus stearothermophilus* (рис. 1). Природные ДНК представлены в основном линейными плавно изогнутыми двухцепочечными молекулами. Синтезированная *ab initio* ДНК, без добавления никующей эндо-

нуклеазы Nt.BstD6I, состоит из линейных участков, объединенных в сетевидную структуру. Некоторые участки ДНК резко изогнуты, местами скручены, с ответвлениями. В целом такая ДНК выглядит как РНК с развитой вторичной структурой, подобно тРНК, а также РНК различных вирусов [5–8].

Для выяснения причины формирования сложной структуры продуктов синтеза *ab initio*, первоначально были исследованы продукты синтеза, полученные с добавлением минимального количества (0.2 U) никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I (никазы). Этот фермент «узнает» в двухцепочечной ДНК последовательность (сайт) 5'-GAGTC-3'/5'-GACTC-3' и расщепляет верхнюю цепь на расстоянии четырех пар нуклеотидов от сайта в направлении 3'-конца [9]. Если два противоположно ориентированных сайта расположены на небольшом расстоянии друг от друга, никаза расщепит ДНК на фрагменты. Ранее было показано, что продукты синтеза с добавлением 0.2 U никазы имеют почти такую же длину, как продукты синтеза без ее добавления [4], но мор-

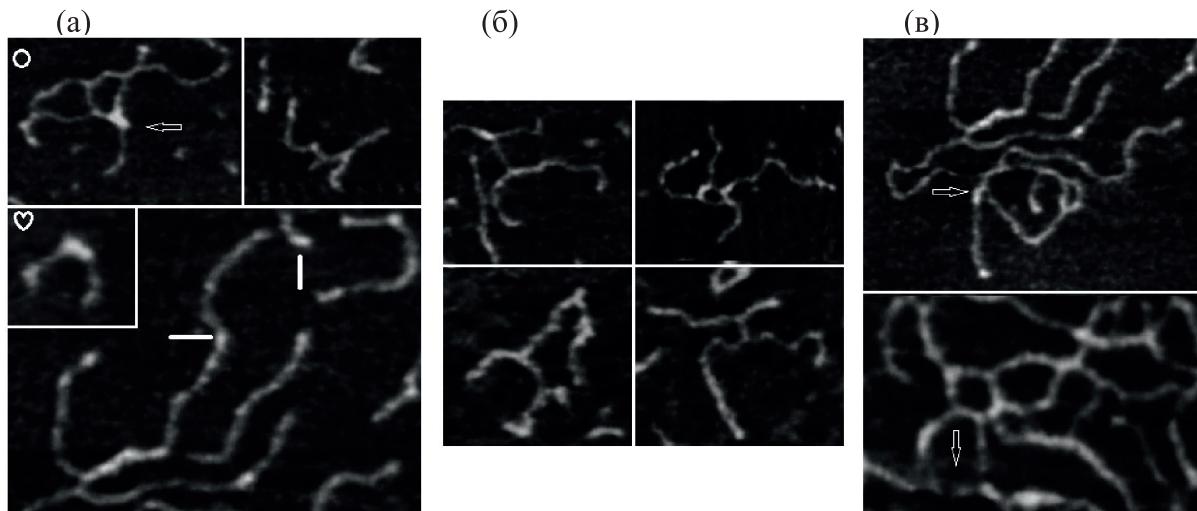


Рис. 2. Галерея АСМ-изображений продуктов синтеза *ab initio* с добавлением никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I. (а) – D-петля (показана стрелкой) на блоке с кружком, “kissing loop” – на блоке с сердечком, Y-разветвления. Небольшие утолщения на концах молекул отмечены линиями. (б) – X-разветвления. (в) – Фрагменты сложной структуры: вверху – D-кольцо с внедренными одноцепочечными участками, указаны стрелкой; внизу – D-кольцо и сложная структура, стрелкой показан одноцепочечный участок. Шкала 500 нм. Часть структур описана по аналогии с описанием в работе [12].

фология молекул менее изогнутая, они выглядят более «расслабленными» и менее «спутанными» (рис. 1г). Молекулы содержат структуры, похожие на: X- или Y-образные разветвления, петли и кольца, кольца с разветвлениями. Некоторые молекулы имеют утолщения, похожие на D-петли или R-петли [10, 11] (рис. 2). В целом оказалось, что структуры, синтезированные *ab initio* в присутствии низкозы, похожи на такие же структуры (петли, кольца, разветвления), подробно охарактеризованные в работе [12]. Вероятно, эти структуры являются промежуточными продуктами репликации и рекомбинации.

Структура, представленная на рис. 2а, была идентифицирована как D-петля, по аналогии с описанием в работах [10, 11]. Возможно, концы синтезированной *ab initio* ДНК формируют D-петли, подобные тем, которые наблюдали на теломерах хромосом [13]. Похожие на D-петли структуры были идентифицированы как на концах молекул, в том числе и коротких, так и в середине молекул. Наличием петель можно объяснить резкую изогнутость некоторых участков молекул. Вероятно они, как и R-петли, накладывают локальные физические ограничения на близлежащую ДНК, приводя к формированию углов/изломов [11].

Также были идентифицированы разветвленные молекулы Y-образной формы и удвоенной Y-образной формы (рис. 2а). Такие структуры могут возникнуть из больших кольцеобразных структур с разветвлениями во время репликации с двумя репликационными вилками [12]. X-об-

разные структуры на рис. 2б указывают на наличие промежуточных продуктов репликации, структур Холлидея. Для образования таких сложных структур (соединенные кольца с разветвлениями, D-кольца), как на рис. 2в, необходимы палиндромные последовательности, множественные репликационные вилки и/или рекомбинационные соединения, а также внедрения одноцепочечных концов ДНК в другой фрагмент своей же или соседней молекулы [12]. Места внедрения концов ДНК выглядят как треугольные структуры.

Интересно отметить наличие образования, похожего на “kissing loop” РНК [5] (рис. 2а), когда две разные молекулы взаимодействуют через палиндромные участки петель шпилечных структур. Небольшие утолщения на концах молекул и по «ходу» нитей ДНК на участках с резким изгибом (рис. 2а, нижний блок) можно интерпретировать как участки с двумя-тремя нуклеотидными неспаренными основаниями. Подобные структуры отмечали на повторяющихся последовательностях при образовании шпилечных петель и участках со сдвигом одной цепи относительно другой [14, 15].

Перечисленные выше структуры были идентифицированы и в продуктах синтеза *ab initio* без добавления низкозы. Но последние содержат больше резко изогнутых участков, больше одноцепочечных участков и больше сильно разветвленных D-кольц (рис. 1). Наличие одноцепочечной ДНК подтверждилось ранее в эксперименте с

использованием нуклеазы золотистой фасоли (Mung Bean) [4].

Точный механизм начала синтеза *ab initio* неизвестен. Предполагается, что в отсутствие праймера и матрицы ДНК полимераза должна связаться как минимум с двумя dNTP и катализировать неспецифическое образование динуклеотидов. Они могут служить праймерами для неспецифической элонгации случайных тримеров или тетramerов, из которых собираются короткие олигонуклеотиды [16]. Из олигонуклеотидов со случайной последовательностью дальнейшей амплификации подвергаются те, которые могут формировать шпилечные структуры, способствующие их дальнейшей репликации. Олигонуклеотиды могут частично гибридизоваться друг с другом, выступая матрицами и праймерами и способствуя амплификации более длинных повторяющихся нуклеотидных последовательностей [17, 18]. Возможно, что шпилечные структуры могут образовывать димеры через взаимодействие петлями, образуя, подобно РНК, структуры типа "kissing loop". У РНК такой димер считается временной промежуточной структурой, в дальнейшем преобразующейся в дуплекс [5].

Наличие таких структур, как D-петли, позволяет предположить, что часть продуктов синтеза *ab initio* образовалась в результате репликации, зависимой от рекомбинации [19]. Такой механизм репликации свойственен не только бактериофагу T4, но и, например, митохондриальной ДНК растений [20], вирусу герпеса [21], и даже теломерам [22, 23]. Поэтому возможно, что дуплексы, состоящие из повторяющихся последовательностей и содержащие одноцепочечный выступ на 3'-конце, состоящий из таких же последовательностей, способны образовывать структуру D-петли, подобную T-петле теломер [23] или R-петле [10]. Одноцепочечный 3'-конец внедряется в гомологичную двухцепочечную ДНК в месте соединения петли, инициируя обмен цепей ДНК и становится праймером с 3'-концом доступным для дальнейшего синтеза ДНК от 5' до 3' ДНК-полимеразой. Способность Bst-полимеразы ремоделировать линейную дДНК в структуру, похожую на D-петлю показана в работе [24]. Фермент может переключать матрицы во время синтеза, переходя от одной цепи к другой ([25], цитируется по обзору [26]). По аналогии с моделями, предложенными для объяснения альтернативной формы удлинения теломер [23, 27, 28] можно предположить, что за счет обмена цепей внутри D-петель образуются D-кольца, которые могут служить матрицей для образования промежуточных продуктов репликации по типу катящегося круга, включая σ-форму «хвостатых колец» и одноцепочечные петли ДНК с двухцепочечными участками, с последующим освобождением одноцепочечной ДНК. ОдДНК могут внедряться в го-

мологичные участки линейных или кольцевых двухцепочечных молекул ДНК [28] и приводить к образованию новых D-петель. Как Bst-полимераза частично разделяет дуплекс, остается неизвестным [26]. В живых клетках промежуточные продукты репликации расщепляются нуклеазами (например, резольвазой RuvC HJ *Escherichia coli*) [29]. При синтезе *ab initio*, *in vitro* разделения/расщепления не происходит, и в итоге образуется крупная сеть реплицирующихся молекул ДНК, удерживаемых вместе благодаря многочисленным разветвлениям Y-образной формы из промежуточных продуктов репликации.

ВЫВОДЫ

Наличие перечисленных структур согласуется с существующей гипотезой о формировании ДНК-полимеразой на начальных этапах синтеза *ab initio* пула случайных олигонуклеотидов и дальнейшей амплификации повторов преимущественно палиндромной структуры [17, 30]. Повторяющиеся нуклеотидные последовательности могут формировать не только шпилечные структуры. Они также могут участвовать в формировании структур, подобных D-петле, что запускает репликацию, зависимую от рекомбинации. Это способствует формированию сложной пространственной организации продуктов синтеза *ab initio*.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Государственных заданий № 075-00224-24-01 и № АААА-А19-119091190094-6 (исследования методом атомно-силовой микроскопии выполнено в ресурсном центре «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники» Научного парка СПбГУ).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zyrina N. V., Antipova V. N., and Zheleznyay L. A. *Ab initio* synthesis by DNA polymerases. *FEMS Microbiol. Lett.*, **351** (1), 1 (2014). DOI: 10.1111/1574-6968.12326
2. Zyrina N. V., Zheleznyay L. A., Dvoretsky E. V., Vasiliev V. D., Chernov A., and Matvienko N. I.

- N.BspD6I DNA nickase strongly stimulates template-independent synthesis of non-palindromic repetitive DNA by Bst DNA polymerase. *Biol. Chem.*, **388** (4), 367–372 (2007).
DOI: 10.1515/BC.2007.043
3. Cheng D. W. and Calderón-Urrea A. Nontemplate polymerization of free nucleotides into genetic elements by thermophilic DNA polymerase in vitro. *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids*, **30** (11), 979–990 (2011).
DOI: 10.1080/15257770.2011.628637
4. Antipova V. N., Reveguk Z. V., Kraynyukov E. S., and Zyrina N. V. Structure of DNA obtained during the *ab initio* synthesis by Bst DNA polymerase in the presence of the nicking endonuclease from *Bacillus stearothermophilus* (Nt.BstNBI). *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **37** (13), 3314–3321 (2019).
DOI: 10.1080/07391102.2018.1515662
5. Andersen E. S., Contera S. A., Knudsen B., Damgaard C. K., Besenbacher F., and Kjems J. Role of the trans-activation response element in dimerization of HIV-1 RNA. *J. Biol. Chem.*, **279** (21), 22243 (2004).
DOI: 10.1074/jbc.M314326200
6. Ma H., Jia X., Zhang K., and Su Z. Cryo-EM advances in RNA structure determination. *Signal. Transduct. Target Ther.*, **7** (1), 58 (2022).
DOI: 10.1038/s41392-022-00916-0
7. Pierce P. G. and Hancock R. L. Electron microscopy of negatively stained tRNA. *Nature*, **241**, 529–530 (1973).
DOI: 10.1038/241529a0
8. Meyer J. *Electron microscopy of viral RNA* (Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1981)
9. Железная Л. А., Качалова Г. С., Артиох Р. И., Юнусова А. К., Перевязова Т. А. и Матвиенко Н. И. Никующие эндонуклеазы. *Успехи биол. химии*, **49**, 107–128 (2009)
10. Klinov D. V., Lagutina I. V., Prokhorov V. V., Neretina T., Khil P. P., Lebedev Y. B., Cherny D. I., Demin V. V., and Sverdlov E. D. High resolution mapping DNAs by R-loop atomic force microscopy. *Nucl. Acids Res.*, **26** (20), 4603–4610 (1998).
DOI: 10.1093/nar/26.20.4603
11. Carrasco-Salas Y., Malapert A., Sulthana S., Molcrette B., Chazot-Franguiadakis L., Bernard P., Chédin F., Faivre-Moskalenko C., and Vanooosthuyse V. The extruded non-template strand determines the architecture of R-loops. *Nucl. Acids Res.*, **47** (13), 6783–6795 (2019).
DOI: 10.1093/nar/gkz341
12. Backert S. R-loop-dependent rolling-circle replication and a new model for DNA concatemer resolution by mitochondrial plasmid mp1. *EMBO J.*, **21** (12), 3128–3136 (2002).
DOI: 10.1093/emboj/cdf311
13. Greider C. W. Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell*, **97** (4), 419–422 (1999).
DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80750-3
14. Axford M. M., Wang Y. H., Nakamori M., Zannis-Hadjopoulos M., Thornton C. A., and Pearson C. E. Detection of slipped-DNAs at the trinucleotide repeats of the myotonic dystrophy type I disease locus in patient tissues. *PLoS Genet.*, **9** (12), e1003866 (2013).
DOI: 10.1371/journal.pgen.1003866
15. Sinden R. R., Potaman V. N., Oussatcheva E. A., Pearson C. E., Lyubchenko Y. L., and Shlyakhtenko L. S. Triplet repeat DNA structures and human genetic disease: dynamic mutations from dynamic DNA. *J. Biosci.*, **27**, 53–65 (2002).
DOI: 10.1007/BF02703683
16. Zhang S., Tang L., Zhang J., Sun W., Liu D., Chen J., Hu B., and Huang Z. Single-atom-directed inhibition of *de Novo* DNA synthesis in isothermal amplifications. *Anal. Chem.*, **94** (45), 15763–15771 (2022).
DOI: 10.1021/acs.analchem.2c03489
17. Ogata N. and Miura T. Genetic information 'created' by archaeabacterial DNA polymerase. *Biochem. J.*, **324** (Pt 2), 667–671 (1997).
DOI: 10.1042/bj3240667
18. Ogata N. and Morino H. Elongation of repetitive DNA by DNA polymerase from a hyperthermophilic bacterium *Thermus thermophilus*. *Nucl. Acids Res.*, **28** (20), 3999–4004 (2000).
DOI: 10.1093/nar/28.20.3999
19. Mosig G. Recombination and recombination-dependent DNA replication in bacteriophage T4. *Annu. Rev. Genetics*, **32**, 379–413 (1998).
DOI: 10.1146/annurev.genet.32.1.379
20. Cheng N., Lo Y. S., Ansari M. I., Ho K. C., Jeng S. T., Lin N. S., and Dai H. Correlation between mtDNA complexity and mtDNA replication mode in developing cotyledon mitochondria during mung bean seed germination. *New Phytologist*, **213** (2), 751–763 (2017).
DOI: 10.1111/nph.14158
21. Severini A., Scraida D. G., and Tyrrell D. L. Branched structures in the intracellular DNA of herpes simplex virus type 1. *J. Virology*, **70** (5), 3169–3175 (1996).
DOI: 10.1128/JVI.70.5.3169-3175.1996
22. Tomaska L., Nosek J., Kar A., Willcox S., and Griffith J. D. A new view of the T-loop junction: implications for self-primed telomere extension, expansion of disease-related nucleotide repeat blocks, and telomere evolution. *Front. Genetics*, **10**, 792 (2019).
DOI: 10.3389/fgene.2019.00792
23. Nabetani A. and Ishikawa F. Unusual telomeric DNAs in human telomerase-negative immortalized cells. *Mol. Cell. Biol.*, **29** (3), 703–713 (2009).
DOI: 10.1128/MCB.00603-08
24. Wang G., Ding X., Hu J., Wu W., Sun J., and Mu Y. Unusual isothermal multimerization and amplification by the strand-displacing DNA polymerases with reverse transcription activities. *Sci. Rep.*, **7** (1), 13928 (2017).
DOI: 10.1038/s41598-017-13324-0

25. Tsai C. H., Chen J., and Szostak J. W. Enzymatic synthesis of DNA on glycerol nucleic acid templates without stable duplex formation between product and template. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **104** (37), 14598–14603 (2007). DOI: 10.1073/pnas.0704211104
26. Oscrbin I. and Filipenko M. Bst polymerase – a humble relative of Taq polymerase. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **21**, 4519–4535 (2023). DOI: 10.1016/j.csbj.2023.09.008
27. Tomaska L., Nosek J., Kar A., Willcox S. and Griffith J. D. A new view of the t-loop junction: implications for self-primed telomere extension, expansion of disease-related nucleotide repeat blocks, and telomere evolution. *Front. Genetics*, **10**, 792 (2019). DOI: 10.3389/fgene.2019.00792
28. Hou K., Yu Y., Li D., Zhang Y., Zhang K., Tong J., Yang K., and Jia S. Alternative lengthening of telomeres and mediated telomere synthesis. *Cancers*, **14** (9), 2194 (2022). DOI: 10.3390/cancers14092194
29. West S. C. Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annu. Rev. Genetics*, **31**, 213–244 (1997). DOI: 10.1146/annurev.genet.31.1.213
30. Liang X., Jensen, K., and Frank-Kamenetskii M. D. Very efficient template/primer-independent DNA synthesis by thermophilic DNA polymerase in the presence of a thermophilic restriction endonuclease. *Biochemistry*, **43** (42), 13459–13466 (2004). DOI: 10.1021/bi0489614

Formation of Complex Spatial Structure of DNA in the Process of *ab initio* Synthesis

N.V. Zyrina*, **, O.M. Selivanova***, E.V. Shevchenko****, and V.N. Antipova**

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

**Institute for Biological Instrumentation, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 7, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

***Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 4, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

****The Saint Petersburg State University Centre for Diagnostics of Functional Materials for Medicine,
Pharmacology and Nanoelectronics, Ulianovskaya ul. 1, Peterhof, St. Petersburg, 198504 Russia

Products with a complex spatial organization are formed during the *ab initio* synthesis under the action of Bst DNA polymerase, large fragment. Using the analysis of AFM images of the products obtained with the addition of a minimal amount of the nicking endonuclease Nt. BspD6I during this synthesis, it became possible to describe the structures formed as a result of this synthesis and suggest that their formation occurs by the mechanism of replication-dependent recombination

Keywords: *ab initio* DNA synthesis, large fragment of Bst DNA polymerase, atomic force microscopy