

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.214

Влияние односторонних разрывов ДНК на транскрипцию нуклеосом

Н.С. Герасимова^{1,*} , М.С. Ахтар², В.М. Студитский^{1,3} ¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Molecular and Structural Biology Division, CSIR-Central Drug Research Institute, Lucknow 226031, Uttar Pradesh, India;³Cancer Epigenetics Team, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA

*e-mail: gerasimova@mail.bio.msu.ru

Ранее в исследованиях было показано, что односторонний разрыв нематричной цепи ДНК может вызывать остановку транскрибирующей РНК-полимеразы, но только при организации ДНК в нуклеосому. Наблюдаемый эффект объясняли в рамках модели транскрипции хроматина с образованием внутринуклеосомных петель — интермедиатов, в которых фермент оказывается остановленным в петле ДНК на гистоновом октамере. Согласно указанной модели, разрыв цепи ослабляет возникающее в ходе транскрипции напряжение структуры ДНК, что вызывает стабилизацию ДНК-гистоновых взаимодействий и арест РНК-полимеразы. В данной работе продолжено определение границ таких внутринуклеосомных петель и обнаружено, что образование контактов ДНК с гистонами позади фермента происходит на расстоянии не менее 17 пар нуклеотидов от активного центра.

Ключевые слова: транскрипция, хроматин, нуклеосома, внутринуклеосомная петля, РНКП 2, разрыв ДНК, репарация, односторонний разрыв

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-2022-77-4-241-247

Односторонние разрывы ДНК — одни из наиболее часто возникающих в клетке повреждений. Целостность сахарофосфатного остова ДНК нарушается в ходе различных процессов клеточного метаболизма (спонтанного гидролиза, реакций с радикалами, нарушения действия топоизомераз, репарации ДНК путем удаления оснований или нуклеотидов и др.) [1, 2]. Накапливающиеся односторонние разрывы могут препятствовать успешному протеканию транскрипции, репликации и репарации ДНК, вызывать накопление двусторонних разрывов и увеличивать геномную нестабильность. Нарушение системы репарации таких повреждений может приводить к развитию нейродегенеративных заболеваний [2, 3].

Разрыв матричной цепи ДНК в значительной степени ингибирует элонгацию транскрипта различными РНК-полимеразами (РНКП) *in vitro* и *in vivo* — РНКП 2 эукариот, РНКП *Escherichia coli*, а также бактериофагов SP6 и T7 [4–6]. Остановка РНКП у эукариот служит сигналом для начала репарации, однако при нарушениях комплементарной цепи такого ингибирования не наблюдается [7]. Ранее в экспериментальной системе *in vitro* было показано, что одиночные разрывы нематричной цепи ДНК также могут вызывать эффективную остановку РНКП, но только при организации ДНК в нуклеосому [8] — ДНК-белковый комплекс, составляющий наименьшую единицу надмолекулярной структурной организации ДНК эукариот (хроматина). Нуклеосома состоит из

участка ДНК длиной 145–147 п.н., накрученного на октамер белков-гистонов, включающий центральный тетрамер (H3-H4)₂ и два димера H2A-H2B [9]. Несмотря на то что хроматин удаляется при активации генов в живых клетках, кодирующие области умеренно транскрибируемых генов остаются упакованными в нуклеосомы [10] — таким образом, РНКП 2 встречается с нуклеосомами во время элонгации транскриптов, и обнаруженный эффект разрывов нематричной цепи на продвижение фермента может иметь важное биологическое значение.

Ранее [8] было показано, что места остановки РНКП при транскрипции нуклеосом с разрывами нематричной цепи ДНК дискретны, расположены после разрыва и имеют выраженную периодичность 10-п.н. внутри нуклеосомы (+24, +34 и +44 п.н. относительно ближайшей к промотору границы), а сила ингибирования фермента зависит от положения разрыва относительно места остановки. Наблюдаемый эффект объясняли в рамках модели транскрипции хроматина с образованием внутринуклеосомных петель — интермедиатов, в которых фермент оказывается остановленным в петле ДНК на гистоновом октамере [8, 11]. Остановки фермента при транскрипции нуклеосом в присутствии одиночных разрывов нематричной цепи ДНК, предположительно, вызваны релаксацией напряжения в небольших внутринуклеосомных петлях ДНК, которое в норме способствует транскрипции. Согласно модели, разрыв цепи уменьшает

вызываемое транскрипцией напряжение в структуре ДНК и затрудняет раскрытие петли и дальнейшую элонгацию.

В данной работе продолжено изучение размера таких внутринуклеосомных петель. Для этого получены нуклеосомы с однонитевым разрывом нематричной цепи в новом положении — +7 — и проведена их транскрипция *in vitro*. Предполагается, что образование контактов ДНК и гистонов позади РНКП происходит на расстоянии не менее 17 п.н. В живых организмах описываемый эффект может ускорять репарацию разрывов нематричной цепи ДНК, которые в других случаях могут оставаться незаметными для системы репарации из-за взаимодействия с гистонами.

Материалы и методы

Матрица ДНК. Работу проводили на позиционирующей нуклеосоме последовательности 603 [12], которая была точно изменена для внесения участка узнавания ферментом-никазой *Nt.BsmA1*. Фрагмент ДНК также включал дополнительный участок ДНК 123-п.н. с введенной на 5'-конец флуоресцентной меткой FAM с одной стороны и дополнительный участок 13-п.н. с другой стороны:

5'FAMd(CCGGGATCCAGATCCCGAAAATTTATCAAAAAGAGTATTGACTTAAAGTCTAACCTATAGGATACTTACAGCCATCGAGAGGGACACGGCGAAAGGCCAACCCAAAGCGACACCGGCACTGGGGCGTCTCT^CGCGCGCCCGCCTACCGTGTGAAGTCGTCACCTCGGGCTTCTAAGTACGCTTAGCGCACGGTAGAGCGCAATCCAAGGCTAACACCGTGCATCGATGTTGGAAGAGGGCCCTCCGTCCTGAATTCCTCAAGTCCCTGGGGTACGGATCCGACG)3' (последовательность 603 подчеркнута, сайт узнавания *Nt.BsmA1* выделен полужирным шрифтом, место разрезания сахарофосфатного остова указано знаком ^). Плазмида, содержащая позиционирующую нуклеосому последовательность 603 [12], была любезно предоставлена доктором Джоном Видомом (J. Widom).

Амплификация фрагментов ДНК. Необходимое количество ДНК получали методом полимеразной цепной реакции с использованием флуоресцентно меченого олигонуклеотида FAM-282Forwhst (5'-FAM-d(CCGGGATCCAGATCCCGAAAATTTA)-3') и немеченого олигонуклеотида 282Revwhst (5'-d(CGTCGGATCCGTACCCAGGGACTT)-3') (0,5 мкМ каждый) (Синтол, Россия). Реакцию проводили в 1× буфере для Taq-ДНК-полимеразы, содержащем 3 мМ MgCl₂, дезоксирибонуклеотиды в концентрации 0,2 мМ каждого и Taq-ДНК-полимеразу в концентрации 0,05 ед. акт./мкл (все реактивы — Евроген, Россия). Пробы инкубировали 3 мин при 95°C, 30 циклов повторения 93°C (10 с), 63°C (20 с), 72°C (20 с) и дополнительно 7 мин при 72°C в программируемом термостате Veriti Thermal Cycler (Life Technologies, США).

Продукты амплификации ожидаемой длины (282 п.н.) очищали от компонентов реакции электрофоретически в 1%-ном агарозном геле с использованием 0,5× буфера TBE в камере для горизонтального электрофореза Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad Laboratories, США). Для экстракции ДНК из геля использовали коммерческий набор реагентов QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Голландия).

Внесение однонитевого разрыва. Полученную ДНК инкубировали с ферментом-никазой *Nt.BsmA1* в буфере CutSmart (NEB, США) и очищали набором QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Голландия). Концентрацию ДНК измеряли спектрофотометрически с использованием оборудования Nanodrop 2000c UV-Vis CC (Thermo Fisher Scientific, США). Эффективность реакции определяли методом электрофореза в 8%-ном ПААГ (полиакриламидный гель; соотношение акриламида и бисакриламида 19:1) в денатурирующих условиях в присутствии мочевины в концентрации 8М с использованием 0,5× буфера TBE в камере для вертикального электрофореза Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad Laboratories, США). Определение длины одноцепочечных фрагментов ДНК проводили по метке FAM, внесенной на 5'-конец в составе олигонуклеотида 282Forwhst, с помощью системы детекции флуоресценции Amersham Typhoon (Cytiva, Швеция). ДНК-фрагменты с разрывами, внесенными с эффективностью не менее 95%, очищали от фермента и реактивов с использованием набора QIAquick PCR Purification Kit.

Сборка нуклеосом на анализируемых фрагментах ДНК. Нуклеосомы собирали на полученных фрагментах ДНК в ходе ступенчатого диализа против буферных растворов с уменьшающейся ионной силой в присутствии источника октамеров гистонов — хроматина без линкерных гистонов, выделенного из эритроцитов цыплят согласно протоколу, подробно описанному ранее [14]. Так, в буфере, содержащем 10 мМ Трис-НСl pH 7,5, 0,1% NP-40, 0,2 мМ ЭДТА, 5 мМ бета-меркаптоэтанол и 1М NaCl, смешивали фрагменты ДНК и хроматин в соотношении 1:4 по массе ДНК (например, 2 мкг синтетических фрагментов и 8 мкг хроматина). Диализ проводили при температуре 4°C против буферных растворов, содержащих 10 мМ Трис-НСl pH 7,5, 0,1% NP-40, 0,2 мМ ЭДТА, 5 мМ бета-меркаптоэтанол и хлористый натрий в понижающейся концентрации (1М в первом буфере, инкубация 1 ч; 0,75М — 1 ч; 0,5М — 2,5 ч; 0,01 М — ночь). Анализ продуктов сборки проводили методом электрофоретического разделения в 4,5%-ном ПААГ с использованием 0,5× буфера TBE в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, США). Условия процедуры подбирали так, чтобы минимизировать количество свободной ДНК. В дальнейшей работе использовали только смеси, содержащие не менее 90% мононуклеосом.

Очистка РНК-полимеразы *E. coli*. РНКП очищали по методике [13]. Кратко, клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) трансформировали плазмидой pVS1, несущей гены альфа-, бета-, бета'- и омега-субъединиц РНКП с внесенным в одну из них гистидиновым тэгом. Культуру выращивали в объеме 2 л в течение 16 ч с проведением индукции экспрессии. Клетки собирали центрифугированием и лизировали под действием ультразвука. Проводили хроматографию на носителе Ni Sepharose 6 Fast Flow (Cytiva, США). Фракции, содержащие РНКП, использовали для дальнейшей аффинной хроматографии на гепариновом носителе Heparin Hyper D (Sartorius, Германия). Последний этап очистки включал ионообменную хроматографию на колонке MonoQ 5/5 HR (объем 1 мл, Pharmacia, США). Фракции с РНКП собирали, фермент хранили в буфере, состоящем из 30 мМ TrisHCl, pH 8,0, 50% глицерина, 0,1 мМ ЭДТА, 1 мМ бета-меркаптоэтанола, 20 мМ NaCl.

Транскрипция нуклеосом РНК-полимеразой *E. coli*. Транскрипцию РНКП (200 нМ) начинали с формирования открытого комплекса на матрице (40 нМ) в транскрипционном буфере TB40 (20 мМ Tris HCl, pH 7,9, 5 мМ MgCl₂, 40 мМ KCl и 1 мМ бета-меркаптоэтанол) в ходе инкубации 7 мин при 37°C. Элонгационные комплексы с 11-мерной РНК (ЭК-39, число обозначает расположение активного центра фермента относительно промотор-проксимальной границы нуклеосомы) формировали добавлением затравочного тририбонуклеотида 5'-ApUpC, АТФ до 20 мкМ и α -[³²P]-ГТФ (3000 Ci/mmol) в буфере TB40 (10 мин при температуре 25°C). Затем добавляли немеченый ГТФ до концентрации 20 мкМ и продолжали реакцию 5 мин в тех же условиях. Для предотвращения повторной инициации в реакционную смесь добавляли рифампицин (20 мкг/мл). Транскрипцию продолжали добавлением всех рибонуклеотидтрифосфатов до концентрации 200 мкМ каждого в транскрипционном буфере с различным содержанием KCl в течение ограниченного времени (точная концентрация KCl и время реакции указаны в разделе «Результаты исследований»). Реакционную смесь обрабатывали взбалтыванием с фенолом, насыщенным цитратным буфером pH 4,3 (Sigma-Aldrich, США). После центрифугирования проб в течение 10 мин при максимальных оборотах в настольной центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) водную фазу отбирали, добавляли 1/10 объема 3М ацетата натрия (pH 5,2), гликоген (Thermo Fisher Scientific, США) до концентрации 0,2 мг/мл и 3 объема 96%-ного этилового спирта. После 18-часовой инкубации при -20°C нуклеиновые кислоты осаждали центрифугированием при +4°C в течение 20 мин при максимальных оборотах (13200 об./мин) в настольной центрифуге 5415R (Eppendorf, Германия).

Продукты РНК анализировали электрофоретическим разделением в 8%-ном ПААГ (соотношение акриламида и бисакриламида 19:1) в денатурирующих условиях в присутствии мочевины в концентрации 8М с использованием 0,5× буфера TBE в камере для вертикального электрофореза Sequi-Gen GT Sequencing Cell (Bio-Rad Laboratories, США). Пробы растворяли в буфере, содержащем 95% формамида, 0,1% додецилсульфата натрия (SDS), 0,01% бромфенолового синего и 0,01% ксиленианола. Перед нанесением пробы прогревали 5 мин при 95°C, тщательно перемешивая. Распределение продуктов в геле анализировали с помощью системы детекции радиоактивного распада ³²P флуоресцентного сканера Typhoon Trio (General Electric, Великобритания). Было проведено по три независимых эксперимента. Количественный анализ проводили с использованием программного обеспечения Fiji ImageJ (США), предел погрешностей определялся как стандартное отклонение значений в выборке.

Результаты и обсуждение

Экспериментальная система транскрипции хроматина *in vitro*. В данной работе процесс транскрипции хроматина с однонитевыми разрывами нематричной цепи ДНК изучался в экспериментальной системе с использованием собранных на коротких фрагментах ДНК одиночных нуклеосом (рис. 1А) [14]. Для точного позиционирования октамера гистонов в ДНК была внесена высокоаффинная к гистонам последовательность 603. Такие нуклеосомы представляют собой асимметричный барьер для РНКП 2 [15], то есть его высота зависит от ориентации последовательности относительно промотора. Здесь была использована так называемая «пропускающая» ориентация, которая лучше воспроизводит свойства транскрипции *in vivo*, такие как сохранение тетрамера гистонов (H3-H4)₂ на ДНК и потеря части димеров гистонов H2A-H2B [16, 17]. В экспериментах использовали РНКП *E. coli*, которая воспроизводит специфический для РНКП 2 механизм транскрипции через нуклеосому, в том числе в присутствии однонитевых разрывов нематричной цепи [8, 15, 17, 18]. РНКП была очищена в виде холофермента с сигма70-субъединицей, для инициации транскрипции в ДНК был внесен сигма(70)-зависимый промотор T7A1.

Методом ПЦР были получены фрагменты ДНК, включающие промотор T7A1 и модифицированную последовательность 603 (рис. 1В, дорожка «ДНК»; на рис. 1Б приведены результаты внесения однонитевого разрыва в ходе инкубации с никазой). На ДНК с разрывами и без были собраны нуклеосомы (рис. 1В, дорожки «Нукл»). Продукты диализа включали моонуклеосомы и динуклеосомы (указаны на рисунке как «Нукл» и «ДиНукл» соответственно). В случае образования динуклео-

сомной структуры второй гистоновый октамер взаимодействует с промоторным участком, поэтому на таких фрагментах не происходит инициация транскрипции и их присутствие не влияет на результаты транскрипционных экспериментов.

Разрыв +7 вызывает замедление РНКП при транскрипции нуклеосом. Контрольные эксперименты по транскрипции свободной от гистонов ДНК в течение 2 мин при разной ионной силе раствора (использованы концентрации КСl в реакционной смеси 40, 150 и 300 мМ) показали, что разрыв между 7 и 8 нуклеотидными остатками последовательности 603 от границы, ближайшей к промотору (далее +7), не влияет на элонгацию

модельной РНКП *E. coli*. Скорость продвижения фермента вдоль матричной ДНК с разрывами в исследуемом участке не отличалась от наблюдаемой на неповрежденной ДНК (рис. 1Г, показаны результаты транскрипции при 40 мМ КСl).

Нуклеосомы с разрывом и без транскрибировали в течение 2 мин после образования ЭК-39 при различных концентрациях КСl (40, 150 и 300 мМ). Результаты экспериментов показали, что при организации в нуклеосому тот же одиночный разрыв вызывает дополнительное замедление РНКП (рис. 1Д). Оказалось, что разрыв +7 вызывает остановку РНКП в том же положении, что и уже исследованные ранее +12 и +17 [8] — при

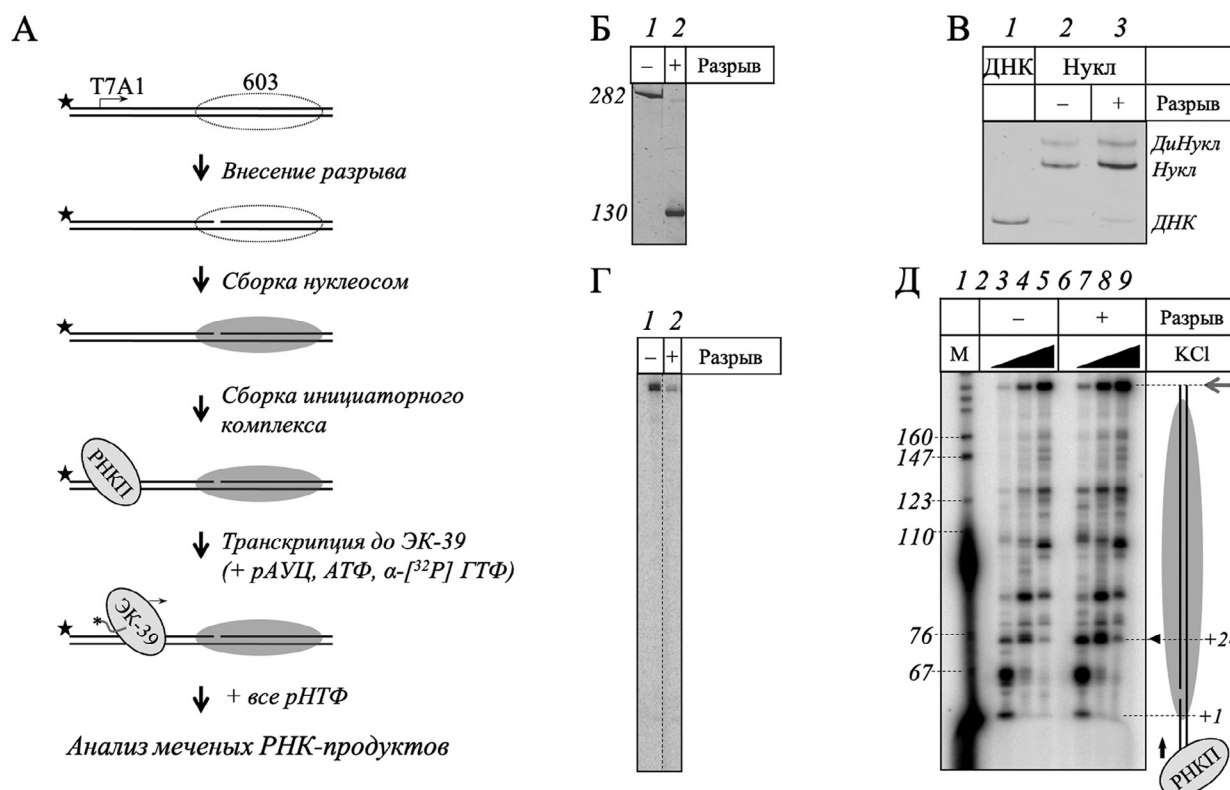


Рис. 1. Разрыв нематричной цепи ДНК в положении +7 п.н. относительно входа в нуклеосому вызывает замедление РНК-полимеразы при транскрипции нуклеосомной ДНК. **А** — экспериментальная система транскрипции хроматина *in vitro*. Матрица ДНК включает σ70-зависимый промотор Т7А1 для РНК-полимеразы *Escherichia coli* и позиционирующую октамер гистонов последовательность 603 ([12], показана овалом). В последовательность 603 внесен участок узнавания ферментом-никазой. В ДНК вносят разрыв, на фрагментах ДНК собирают нуклеосомы. Для определения эффективности внесения разрыва на 5'-конец нематричной цепи внесена флуоресцентная метка FAM (схематически изображена звездочкой). Последовательность нуклеотидов в точке старта транскрипции (указана стрелкой) позволяет проводить радиоактивное пульс-мечение продуктов для последующего количественного анализа. После мечения в присутствии ограниченного набора рибонуклеотид-5-трифосфатов (рНТФ) транскрипцию продолжают в различных условиях. Полученные в ходе реакции РНК-продукты анализируют методом электрофореза в полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) в денатурирующих условиях. **Б** — определение эффективности внесения разрыва в нематричную цепь ДНК методом ЭФ в ПААГ в денатурирующих условиях. Детекция флуоресцентного сигнала метки FAM, внесенной на 5'-конец нематричной цепи. После воздействия фермента-никазы *Nt.BsmAI* цепь разделяется на два более коротких участка — меченый и немеченый. **В** — сборка нуклеосом на ДНК. Электрофорез ДНК-белковых комплексов в ПААГ в нативных условиях. Детекция по включенной в ДНК флуоресцентной метке FAM. 1 — свободная от гистонов ДНК; 2 — нуклеосомы без повреждений; 3 — нуклеосомы с однонитевым разрывом +7. ДиНукл — динуклеосомы — комплексы со вторым октамером гистонов на промоторном участке. **Г** — результаты транскрипции свободной от гистонов ДНК в 40 мМ КСl в течение 2 мин (сигнал радиоактивного распада [³²P]). 1 («-») — без разрыва, 2 («+») — с разрывом +7. **Д** — результаты транскрипции нуклеосом с неповрежденной ДНК («-») или с разрывом в положении +7 («+») в различных солевых условиях в течение 2 мин. Участок, при прохождении которого остановка усиливается (+24), отмечен треугольником-стрелкой. Полноразмерный транскрипт длиной 207 нуклеотидов отмечен серой стрелкой. Справа серым овалом схематически обозначено расположение гистонного октамера на ДНК-матрице и направление транскрипции (сигнал радиоактивного распада [³²P]). 1 — М — радиоактивно меченые продукты расщепления плазмиды pBR322 эндонуклеазой *MspI*, длины указаны в нуклеотидах. 2 и 6 — элонгационный комплекс 39 на матрицах без разрыва и с разрывом соответственно. 3-5 и 7-9 — транскрипция в 40, 150 или 300 мМ КСl на матрицах без разрыва и с разрывом соответственно.

достижении активным центром фермента положения +24 — то есть его действие распространяется на 17 п.н. вперед по ходу транскрипции. Согласно полученным ранее данным [8, 11], место остановки оказалось определено не позицией самого разрыва, а положением активного центра РНКП. Так, в работе впервые показано влияние однонитевого разрыва, расположенного на расстоянии 17 п.н. от места остановки РНКП.

Эффект особенно хорошо выражен в условиях пониженной ионной силы (40 мМ КСl) и в физиологических солевых условиях (150 мМ КСl), он заметно ослабляется при повышении ионной силы (300 мМ КСl). Более эффективное продвижение фермента через нуклеосомные разрывы, скорее всего, объясняется дестабилизацией ДНК-гистоновых взаимодействий в буфере с более высокой ионной силой [19].

Эффективность замедления РНКП в присутствии разрыва нематричной цепи нуклеосомной ДНК зависит от расположения повреждения и активного центра фермента. Ранее было установлено, что разрыв +12 вызывает высокоэффективную остановку РНКП в положении +24 в физиологических солевых условиях ($92,0 \pm 2,6\%$), в то время как разрыв +17 замедляет лишь $39,5 \pm 5,0\%$ фермента в этом же положении [8]. Повреждение +17 находится всего за 7 п.н. до вызываемой им остановки фермента (+24). В работе [8] было предположено, что при достижении активным центром РНКП положения +24 разрыв +17 остается в транскрипционном «пузыре» — расплетенном участке матричной ДНК, полностью находящемся внутри РНКП, где структура ДНК может быть до-

полнительно стабилизирована самим ферментом. Возможно, в таком случае ослабление отрицательного суперскручивания, накапливаемого в замкнутой внутринуклеосомной петле, будет затруднено. В данной работе эффективность замедления РНКП в присутствии разрыва +7 была определена по результатам трех независимых экспериментов. В физиологических солевых условиях она составила всего около $13,5 \pm 1,0\%$. Так, для исследованных однонитевых разрывов эффективность остановки уменьшается в следующем порядке: $+12 > +17 > +7$. Возможно, вблизи положения +7 начинается формирование ДНК-гистоновых контактов позади фермента, которые стабилизируют ДНК вокруг разрыва. В рамках модели формирования внутринуклеосомных петель полученные данные свидетельствуют в пользу того, что, по-видимому, участки между активным центром фермента и границами ДНК-гистоновых взаимодействий имеют длину около 20 п.н., а общий размер петли составляет, соответственно, 40–60 нуклеотидов.

Замедление РНКП в присутствии разрыва +7 относительно кратковременно. Остановка в положении +24 в присутствии разрыва +12 крайне медленно преодолевается во времени [8]. В настоящей работе была изучена временная зависимость остановки РНКП в присутствии разрыва +7. Эксперименты проводились при концентрации КСl в транскрипционном буфере 150 мМ в течение ограниченного времени (30 с, 45 с, 90 с, 3 мин, 6 мин, 10 мин, 20 мин) (рис. 2А). Было определено, что остановка фермента успешно преодолевается через 3 мин после добавления всех рибонуклеотид-5-трифосфатов (рНТФ). Прове-

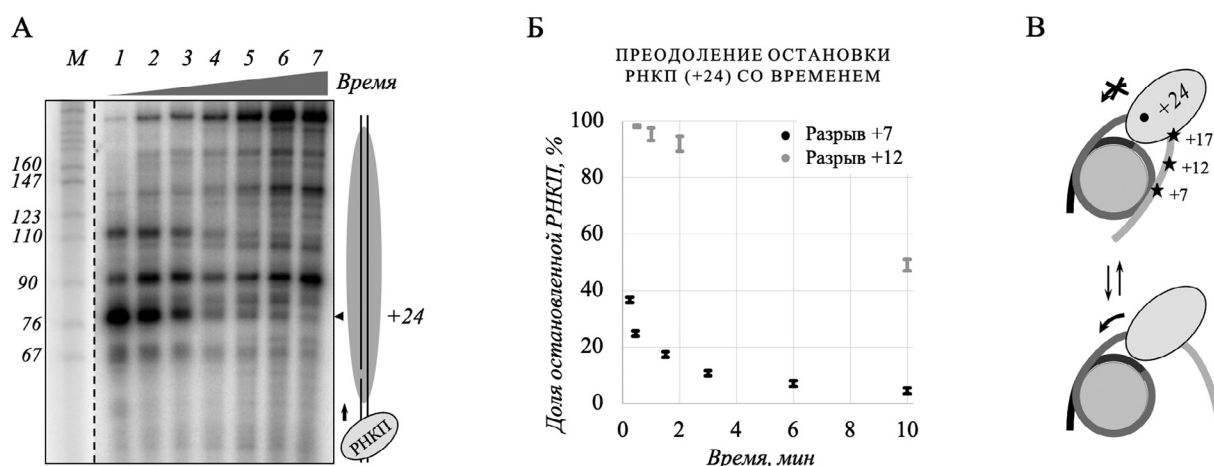


Рис. 2. Остановка РНК-полимеразы в присутствии разрыва нематричной цепи нуклеосомной ДНК в положении +7 относительно кратковременна. **А** — проведены эксперименты по транскрипции нуклеосом с разрывом +7 в течение различного времени (1 — 15 с, 2 — 45 с, 3 — 90 с, 4 — 3 мин, 5 — 6 мин, 6 — 10 мин, 7 — 20 мин). Реакция проводилась при концентрации КСl 150 мМ. Сигнал радиоактивного распада [32 P] в меченых РНК-продуктах, разделенных ЭФ в ПААГ в денатурирующих условиях. М — pBR322 *MspI*. Для удобства интерпретации справа приведена схема нуклеосомной матрицы с соблюдением расположения октамера гистонов, положения разрыва и остановки. Стрелкой указано направление транскрипции, треугольником-стрелкой указан участок, при прохождении которого наблюдается замедление РНК-полимеразы в присутствии разрыва +7. **Б** — доля остановленной в положении +24 РНК-полимеразы определена относительно общего количества продуктов транскрипции в нуклеосомной области. Анализ проведен по трем независимым экспериментам. Данные для разрыва +12 взяты из [8] для сравнения. **В** — модель действия однонитевых разрывов +7, +12 и +17. Их положение позади РНКП стимулирует остановку фермента (+24), «сила» которой зависит от расположения разрывов +7, +12 и +17 во внутринуклеосомной петле. При отворачивании ДНК от октамера гистонов позади фермента транскрипция может продолжаться.

ден сравнительный анализ доли комплексов с остановленной в положении +24 РНКП относительно общего числа продуктов транскрипции в нуклеосомной области в присутствии разрывов +7 и +12 (рис. 2Б). Определено, что скорость выхода РНКП из остановленного состояния заметно выше в случае разрыва +7, чем в случае +12. Стабилизация цепей ДНК внутри РНКП или вблизи ДНК-гистоновых взаимодействий, предположительно, способствует более успешному накоплению напряжения в ДНК, открыванию петли и дальнейшему продвижению фермента (рис. 2В).

Разрыв +7 снижает эффективность остановки РНКП в области +1. При пониженной ионной силе (40 мМ КСl) наблюдается замедление РНКП на границе нуклеосомы (рис. 1Д, дорожка 3, участок +1). В этом участке через 2 мин реакции накапливается $14,3 \pm 1,4\%$ РНКП. Разрыв +7 при низкой ионной силе раствора несколько ослабляет остановку РНКП в положении +1 (рис. 1Д, дорожка 7) — доля комплексов составляет $6,3 \pm 0,3\%$. Это подтверждает более ранние наши данные о стимулирующем действии разрывов нематричной цепи ДНК на элонгацию, осуществляемую РНКП, через специфичные для транскрипции нуклеосомной ДНК области замедления РНКП, расположенные до повреждения [8]. Предположительно, такой эффект связан с уменьшением положительного суперскручивания ДНК, которое возникает впереди РНКП при транскрипции и негативно сказывается на скорости продвижения фермента [20, 21].

Наши данные подтверждают предложенную ранее модель остановки РНКП в присутствии разрывов, расположенных на нематричной цепи ДНК. По мере продвижения фермента вдоль нуклеосомы происходит отворачивание ДНК от октамера гистонов, и его ДНК-связывающая поверхность открывается. В некоторых положениях РНКП (с периодичностью около 10 п.н.), по-видимому, может происходить кратковременное взаимодействие гистонов и ДНК позади фермента (на расстоянии около 20 п.н. от активного центра). В этом случае формируются временные комплексы, содержащие внутринуклеосомную петлю ДНК с остановленной РНКП. Такие структуры, вероятно, имеют небольшой размер (40–60 п.н.) и эффективно стабилизируются разрывами позади фермента. Остановка РНКП, в свою очередь, может служить сигналом для начала репарации поврежденной ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-44-02013). Работа доктора М.С. Ахтара поддержана Департаментом науки и технологии Индии (грант № DST/INT/RUS/RSF/P27). Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование выполнено с использованием инфраструктурных возможностей Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tubbs A., Nussenzweig A. Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer // *Cell*. 2017. Vol. 168. N 4. P. 644–656.
2. Caldecott K.W. DNA single-strand break repair and human genetic disease // *Trends Cell Biol.* 2022. Vol. 32. N 9. P. 733–745.
3. McKinnon P.J., Caldecott K.W. DNA strand break repair and human genetic disease // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2007. Vol. 8. P. 37–55.
4. Zhou W., Doetsch P.W. Effects of abasic sites and DNA single-strand breaks on prokaryotic RNA polymerases // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993. Vol. 90. N 14. P. 6601–6605.
5. Kathe S.D., Shen G.P., Wallace S.S. Single-stranded breaks in DNA but not oxidative DNA base damages block transcriptional elongation by RNA polymerase II in HeLa cell nuclear extracts // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. N 18. P. 18511–18520.
6. Neil A.J., Belotserkovskii B.P., Hanawalt P.C. Transcription blockage by bulky end termini at single-strand breaks in the DNA template: differential effects of 5' and 3' adducts // *Biochemistry*. 2012. Vol. 51. N 44. P. 8964–8970.
7. Li S., Smerdon M.J. Dissecting transcription-coupled and global genomic repair in the chromatin of yeast GAL1-10 genes // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. N 14. P. 14418–14426.
8. Pestov N.A., Gerasimova N.S., Kulaeva O.I., Studitsky V.M. Structure of transcribed chromatin is a sensor of DNA damage // *Sci. Adv.* 2015. Vol. 1. N 6: e1500021.
9. Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature*. 1997. Vol. 389. N 6648. P. 251–260.
10. Hartzog G.A., Speer J.L., Lindstrom D.L. Transcript elongation on a nucleoprotein template // *Biochim. Biophys. Acta*. 2002. Vol. 1577. N 2. P. 276–286.
11. Gerasimova N.S., Pestov N.A., Kulaeva O.I., Clark D.J., Studitsky V.M. Transcription-induced DNA supercoiling: New roles of intranucleosomal DNA loops in DNA repair and transcription // *Transcription*. 2016. Vol. 7. N 3. P. 91–95.
12. Lowary P.T., Widom J. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning // *J. Mol. Biol.* 1998. Vol. 276. N 1. P. 19–42.
13. Artsimovitch I., Svetlov V., Murakami K.S., Landick R. Co-overexpression of *Escherichia coli* RNA polymerase subunits allows isolation and analysis of mutant enzymes lacking lineage-specific sequence insertions // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. N 14. P. 12344–12355.
14. Thastrom A., Lowary P.T., Widlund H.R., Cao H., Kubista M., Widom J. Sequence motifs and free energies of

selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences // *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 288. N 2. P. 213–229.

15. Bondarenko V.A., Steele L.M., Ujvari A., Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Polikanov Y.S., Luse D.S., Studitsky V.M. Nucleosomes can form a polar barrier to transcript elongation by RNA polymerase II // *Mol. Cell.* 2006. Vol. 24. N 3. P. 469–479.

16. Chang H.W., Kulaeva O.I., Shaytan A.K., Kibanov M., Kuznedelov K., Severinov K.V., Kirpichnikov M.P., Clark D.J., Studitsky V.M. Analysis of the mechanism of nucleosome survival during transcription // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42. N 3. P. 1619–1627.

17. Kulaeva O.I., Gaykalova D.A., Pestov N.A., Golovastov V.V., Vassilyev D.G., Artsimovitch I., Studitsky V.M. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. Vol. 16. N 12. P. 1272–1278.

18. Walter W., Kireeva M.L., Studitsky V.M., Kashlev M. Bacterial polymerase and yeast polymerase II use similar

mechanisms for transcription through nucleosomes // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. N 38. P. 36148–36156.

19. Ausio J., Seger D., Eisenberg H. Nucleosome core particle stability and conformational change. Effect of temperature, particle and NaCl concentrations, and crosslinking of histone H3 sulfhydryl groups // *J. Mol. Biol.* 1984. Vol. 176. N 1. P. 77–104.

20. Bancaud A., Wagner G., Conde E.S.N., Lavelle C., Wong H., Mozziconacci J., Barbi M., Sivolob A., Le Cam E., Mouawad L., Viovy J.L., Victor J.M., Prunell A. Nucleosome chiral transition under positive torsional stress in single chromatin fibers // *Mol. Cell.* 2007. Vol. 27. N 1. P. 135–147.

21. Lilley D.M. DNA opens up – supercoiling and heavy breathing // *Trends Genet.* 1988. Vol. 4. N 4. P. 111–114.

Поступила в редакцию 01.08.2022

После доработки 24.10.2022

Принята в печать 16.11.2022

RESEARCH ARTICLE

Effect of single-strand DNA breaks on transcription of nucleosomes

N.S. Gerasimova^{1,*} , M.S. Akhtar², V.M. Studitsky^{1,3} 

¹Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;

²Molecular and Structural Biology Division, CSIR-Central Drug Research Institute, Lucknow 226031, Uttar Pradesh, India;

³Cancer Epigenetics Team, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA

*e-mail: gerasimova@mail.bio.msu.ru

Previous studies revealed the inhibitory effect of single-stranded breaks in a non-template DNA strand (NT-SSB) on RNA polymerase transcription through the nucleosome. The observed effect was explained within the model of chromatin transcription mechanism with the formation of intranucleosomal DNA loops (i-loops) – intermediates in which the enzyme is locked in the DNA loop on the histone octamer. According to the model, NT-SSBs reduce the tension in the DNA structure caused by transcription and hinders the opening of the i-loop with the enzyme and further elongation. In this work, the boundaries of such i-loops are determined. Nucleosomes with NT-SSBs were transcribed. It was determined that the formation of contacts between DNA and histones behind RNAP occurs at a distance of more than 17 base pairs from the active center of the enzyme.

Keywords: transcription, chromatin, nucleosome, i-loop, Pol 2, DNA repair, single-stranded breaks

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 19-44-02013. Work of Dr. Md Sohail Akhtar was funded by № DST/INT/RUS/RSF/P27. Part of the research was performed using facilities of the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow University «Molecular Technologies of the Living Systems and Synthetic Biology».

Сведения об авторах

Герасимова Надежда Сергеевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: gerasimova@mail.bio.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5048-0378>

Ахтар Мохаммад Сохаил – PhD, вед. науч. сотр. Центрального Института исследований лекарств Индии, Индия. Тел.: +91-522-277-2450; e-mail: sohail@cdri.res.in

Студитский Василий Михайлович – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, профессор Программы эпигенетики рака, Центр исследований рака Фокс Чейз, Филадельфия, штат Филадельфия 19111-2497, США. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7389-7993>