

МЕТОДЫ

УДК 577.214

РАЗРАБОТКА ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕНЫХ МОНОНУКЛЕОСОМ
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ТРАНСКРИПЦИИ МЕТОДОМ
МИКРОСКОПИИ ОДИНОЧНЫХ КОМПЛЕКСОВ**К.С. Кудряшова^{1,3}, Д.В. Никитин³, О.В. Чертков^{1,3}, Н.С. Герасимова³,
М.Е. Валиева³, В.М. Студитский^{2,3}, А.В. Феофанов^{1,3}**¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;² Программа эпигенетики рака, Центр исследований рака Фокс Чейз, Филадельфия, США (Cancer Epigenetics Program, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA); ³ кафедра биоинженерии; e-mail: avfeofanov@yandex.ru)

Флуоресцентная микроскопия одиночных молекул и комплексов становится все более востребованным методом изучения нуклеосом и функционально важных процессов с их участием. В данной работе на основе флуоресцентно-меченой матрицы ДНК разработаны строго позиционированные мононуклеосомы, которые являются новым инструментом для исследования структурных перестроек в хроматине в процессе транскрипции РНК-полимеразой (РНКП). В нетранскрибируемую цепь ДНК были введены два флуорофора — Су3 (донор) и Су5 (акцептор), которые после укладки ДНК на гистоновом октамере оказываются в средней части нуклеосомы на соседних участках ДНК на расстоянии менее 60 Å и взаимодействуют по механизму Фёрстеровского резонансного переноса энергии (Förster resonance energy transfer, FRET). Изменение структуры нуклеосомы регистрировали по изменению эффективности FRET при изучении одиночных комплексов нуклеосом с РНКП методом флуоресцентной микроскопии. Показано, что введение меток не повлияло на способность РНКП транскрибировать нуклеосомы. Получены и охарактеризованы открытый комплекс с РНКП, а также элонгационные комплексы, остановленные в положениях –39 и –5 до границы нуклеосомы. Показано, что после завершения транскрипции более 80% нуклеосом сохраняют свою структуру, восстанавливая исходную укладку ДНК на гистоновом октамере. Разработанная экспериментальная система открывает новые возможности изучения структуры нуклеосом и модулирующего воздействия на них различных белковых шаперонов и ремоделирующих хроматин комплексов.

Ключевые слова: нуклеосома, РНК-полимераза, флуоресценция, микроскопия, эпигенетика.

Жизненно необходимый для нормального функционирования любого организма процесс транскрипции включает в себя четыре стадии: связывание с промотором, инициацию, элонгацию и терминацию. Стадия элонгации — сложный, мало изученный биологический процесс, который сопровождается множественными структурными перестройками хроматина. Изучение этих перестроек важно для понимания механизма элонгации и, как показано, может осуществляться с использованием модельной системы на основе мононуклеосом, сформированных из октамера гистонов (H2A, H2B, H3, H4) и короткой ДНК-матрицы 603 [1–6]. Для инициации транскрипции бактериальной РНК-полимеразы (РНКП) в ДНК матрицу включают промотор T7A1 и последовательность из 50 нуклеотидов между промотором и нуклеосомой, необходимую для формирования стабильного элонгационного комплекса [6].

Последние достижения в области флуоресцентной микроскопии позволяют дополнить биохимические и молекулярно-биологические подходы к изучению транскрипции нуклеосом новыми методиками флуоресцентной микроскопии одиночных молекул и их комплексов на основе Фёрстеров-

ского резонансного переноса энергии (сокращенно spFRET-микроскопии) [7, 8]. Для этого в соседние сверхспиральные витки ДНК можно ввести пару флуорофоров, например донор Су3 и акцептор Су5, и по эффективности FRET, которая существенно зависит от расстояния между ними в диапазоне 3–9 нм, изучать изменения структуры нуклеосом. spFRET-микроскопия позволяет обнаруживать и характеризовать отдельно отличающиеся по структуре субпопуляции нуклеосом и их комплексов в составе гетерогенных образцов.

В настоящей статье описана разработка транскрибируемых флуоресцентно-меченых нуклеосом, которые являются новым инструментом для изучения методом spFRET-микроскопии структурных перестроек ДНК, происходящих при транскрипции центральной части ДНК нуклеосом.

Материалы и методы

В работе использовали набор для экстракции ДНК из агарозного геля фирмы “Omega Bio-Tek” (США), ферменты рестрикции, ДНК-лигазу бактериофага T4, Taq ДНК-полимеразу и соответству-

ющие буферные растворы фирмы “New England Biolabs” (США). РНКП выделяли из клеток *Escherichia coli*, следуя методике, представленной в [9]. Транскрипционный буфер (ТВ) включал в себя 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 5 мМ MgCl₂, 2 мМ 2-меркаптоэтанол и KCl в указанных в тексте концентрациях.

Нуклеосомную ДНК получали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием следующих флуоресцентно-меченых ДНК-праймеров: Mid_Fw 5' — AGCGACACCGGCACTGGGCCCCGGTTCGCGCTCCCTCCTTCGGTGTGTTGTCGTCTCTCGGGCGTCTAAGTACGCT*T (где T* — нуклеотид, меченный Cy3), Mid_Rev 5' — ACCCCAGGGACTT*GAAGTAATAAGGACGGAGGGCCTCTTCAACATCGATGCACGGTGGTTAGCCTTGGA (где T* — нуклеотид, меченный Cy5). Промоторную и (Cy3, Cy5)-меченую нуклеосомную ДНК инкубировали с ферментом TspRI в буфере NEB4 в течение 3 ч при 65°C. Полученные фрагменты ДНК разделяли электрофоретически (4–6 В/см, 2 ч) в 1,5%-м агарозном геле в 0,5-кратном буфере TBE (44,5 мМ Tris, 44,5 мМ борной кислоты, 1 мМ ЭДТА) с добавкой 4 М мочевины и 0,5 мг/мл бромистого этидия. Лигирование 1–2 мкг очищенного промоторного и (Cy3, Cy5)-меченого нуклеосомного фрагментов ДНК осуществляли в молярном соотношении фрагментов 1,15:1 в буфере для ДНК-лигазы (15 ч, 16°C). Разделение продукта и не прошедших лигирования фрагментов проводили в 1,8%-м агарозном геле в 0,5-кратном буфере TBE, содержащем 0,5 мг/мл бромистого этидия при 4–6 В/см в течение 2 ч. Выделение ДНК на каждой стадии осуществляли с помощью набора для экстракции ДНК из геля, следуя инструкциям производителя. Концентрацию ДНК определяли по оптической плотности раствора при длине волны 260 нм.

В качестве источника гистонов для сборки нуклеосом использовали хроматин без гистона H1, который выделяли из эритроцитов цыплят, как описано ранее [5]. Нуклеосомы собирали на (Cy3, Cy5)-меченой ДНК-матрице в ходе диализа против уменьшающейся концентрации NaCl по протоколу, описанному в работе [5].

Для формирования открытого комплекса (ОС) 200 нг матричной ДНК в свободной форме либо в форме нуклеосом инкубировали (37°C, 10 мин) с пятикратным молярным избытком РНКП в 20 мкл буфера ТВ, содержащего 40 мМ KCl. Для формирования элонгационного комплекса ЕС-39, остановленного в положении –39 (39 пар нуклеотидов (п.н.) до границы нуклеосомы со стороны промотора), ОС инкубировали (37°C, 10 мин) с РНК-праймером ApUpC (20 мМ), АТФ (20 мМ) и ГТФ (20 мМ). Для получения элонгационного комплекса ЕС-5, остановленного в положении –5 (5 п.н. до границы нуклеосомы со стороны промотора), ЕС-39 инкубировали (37°C, 10 мин) с 5 мМ

ЦТФ, 20 мг/мл рифампицина и 0,5 мг/мл ацетилированного бычьего сывороточного альбумина.

Для завершения полного цикла транскрипции и формирования пост-транскрипционного состояния РС (post chase) к ЕС-5 добавляли полный набор нуклеотидтрифосфатов (до конечной концентрации 100 мМ), повышали концентрацию KCl до 150 мМ и инкубировали 10 мин при комнатной температуре.

Для измерений методом spFRET-микроскопии нуклеосомы и их комплексы с РНКП разбавляли до концентрации 0,2 нМ в ТВ-буфере с добавкой 150 мМ KCl и 0,1% полиэтиленгликоля (380–420 Да). Измерения выполняли с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM710-Confocor3 (Zeiss, Германия) с 40-кратным водоиммерсионным объективом C-Apochromat (числовая апертура 1,2) в 8 луночных камерах на покровном стекле Lab-Tek (Thermo Scientific, США). Флуоресценцию возбуждали Ar⁺-ионным лазером (514,5 нм, 2 мВт под объективом) и регистрировали с помощью лавинных фотодиодов в диапазонах 530–635 нм (Cy3) и 635–800 нм (Cy5). Диаметр конфокальной диафрагмы был равен 1 диску Эйри. Для каждого образца зависимости интенсивности флуоресценции от времени измеряли в течение 10 мин с константой интегрирования 5 мс. В анализ включали нуклеосомы с интенсивностью сигнала $I_3 = 10 \div 80$ кГц и $I_5 = 5 \div 80$ кГц, где I_3 и I_5 — это интенсивности сигналов Cy3 и Cy5. I_3 и I_5 корректировали на величину фона равную соответственно 1,0 и 0,5 кГц. Интенсивности флуоресценции Cy3 и Cy5, измеренные для каждой нуклеосомы, пересчитывали в эффективность FRET (E) согласно уравнению:

$$E = (I_5 - 0,19 \times I_3) / (I_5 + 0,81 \times I_3), \quad (1)$$

где коэффициенты 0,19 и 0,81 введены для учета частичного перекрытия спектров флуоресценции Cy3 и Cy5 в области 635–800 нм. Набор значений E графически представляли в виде гистограммы относительной частоты распределения величины E и описывали в виде суперпозиции полос Гауссовой формы. Все измерения были повторены не менее чем в трех независимых экспериментах. Итоговый размер выборки составлял не менее 7000 частиц.

Результаты и обсуждение

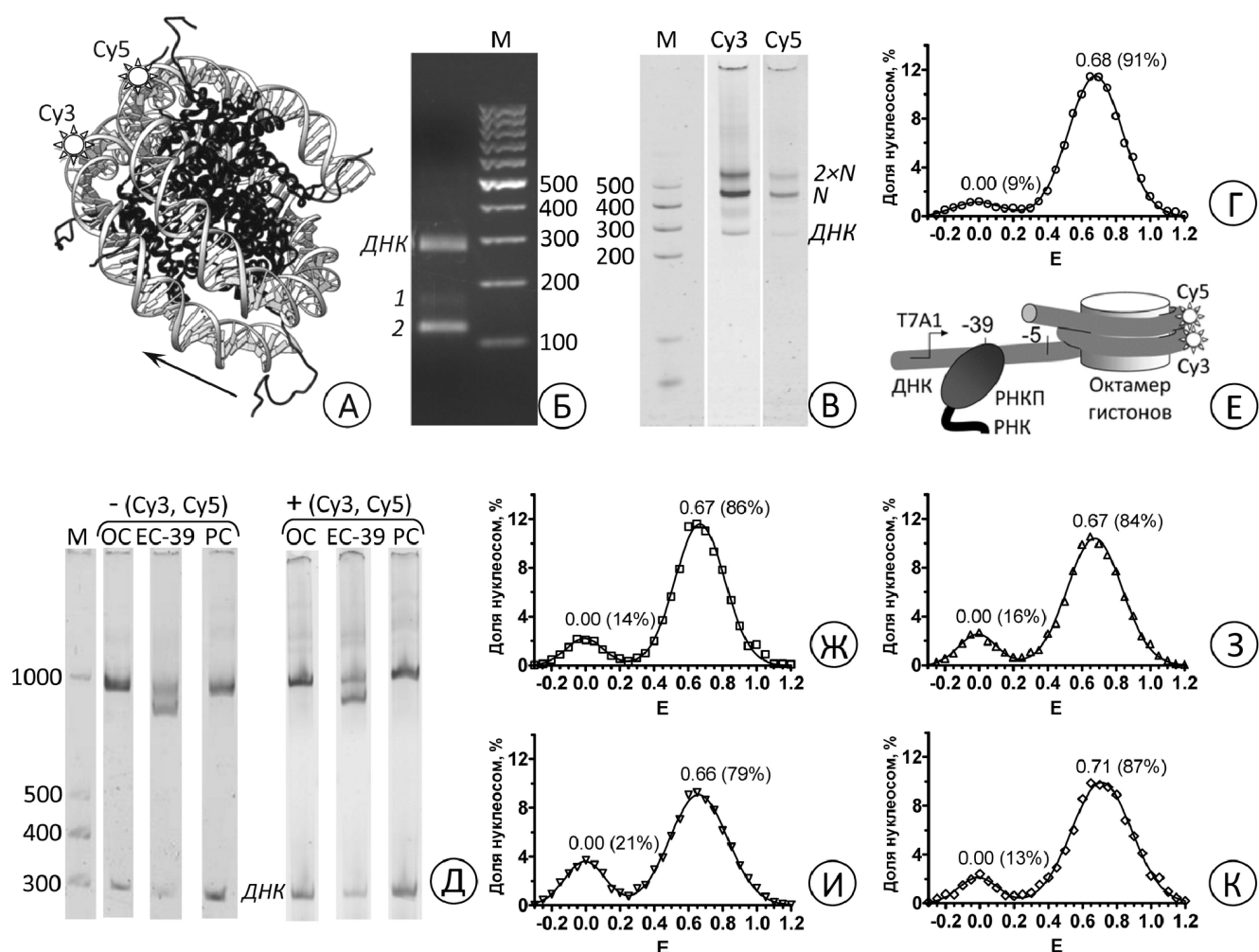
Для сборки нуклеосом использовали ДНК-матрицу 603, которая обеспечивает строгое позиционирование ДНК на гистоновом октамере. Флуоресцентные метки Cy3 и Cy5 вводили в не-транскрибируемую цепь ДНК так, чтобы обеспечить возможность изучения структурных перестроек в центральной части нуклеосомы. Используя данные о структуре нуклеосомы (pdb 1EQZ), для мечення выбрали остатки тимина в положениях +35 и +135 от ближней к промотору границы нуклеосомы, расположенные на соседних сверхспираль-

ных витках ДНК на расстоянии менее 60 Å и фосфатные группы которых ориентированы в сторону раствора (рисунок, А). Такой выбор призван исключить стерические напряжения в структуре нуклеосомы, связанные с введением меток, обеспечить конформационную подвижность Cy3 и Cy5 в растворе (важно для упрощения расчета E) и высокую эффективность FRET с участием этих флуорофоров.

Разработанная нами методика получения флуоресцентно-меченой ДНК с помощью ПЦР позволяет нарабатывать значительные количества (5–10 мкг) нуклеосомной матрицы и промоторной части в течение нескольких часов. Реакция лигирования представляет собой ключевую стадию сборки, на которой происходят основные потери

из-за образования конкатемеров и неполного прохождения реакции. Для оптимизации этой стадии мы использовали высокоактивную ДНК-лигазу фага T4 (30 ед./мкл; Fermentas, Литва), а реакцию проводили в течение 15 ч. Выход очищенной флуоресцентно-меченой матрицы после лигирования составил 20–40% (рисунок, Б).

Посадку октамера гистонов на (Cy3, Cy5)-меченую ДНК-матрицу выполняли в ходе диализа против буферов с понижающейся ионной силой (1 М, 0,75 М, 0,5 М и 10 мМ NaCl). В качестве донора гистонов использовали хроматин без гистона Н1, выделенный из эритроцитов цыплят, взятый в пятикратном весовом избытке относительно ДНК-матрицы. Эффективность сборки нуклеосом на основе (Cy3, Cy5)-меченой ДНК достигала



А — структура нуклеосомы и выбранные положения меток Cy3 и Cy5 в центральной части нуклеосомы. Стрелкой указано направление транскрипции. Гистоны показаны черным цветом. Б — результат лигирования (ДНК) нуклеосомного (1) и промоторного (2) фрагментов матрицы ДНК. Электрофорез в 1,5%-м агарозном геле. Окраска бромистым этидием. М — маркеры ДНК (п.о.). В — результат реконструкции (Cy3, Cy5)-меченых нуклеосом. Электрофорез в 4%-м нативном ПААГ. Дорожки Cy3, Cy5 — распределение флуоресценции меток в составе свободной ДНК-матрицы (ДНК), моно- (N) и ди- (2N) нуклеосом, сформированных на этой матрице. Г, Ж–К — частотные распределения нуклеосом (Г), ОС (Ж), ЕС-39 (З), ЕС-5 (И) и РС (К) по величине E и их аппроксимация суммой двух Гауссовых полос. Рядом со значениями максимумов пиков в скобках указан процент нуклеосом, соответствующий каждому пику (каждой субпопуляции нуклеосом или ДНК). Распределения нуклеосом измерены методом spFRET-микроскопии. Д — сравнительный анализ формирования комплексов ОС, ЕС-39 между РНКП и ДНК-матрицей (меченой +(Cy3, Cy5) и немеченой –(Cy3, Cy5)), а также результатов полной транскрипции ДНК (РС). Электрофорез в 4%-м нативном ПААГ. Окраска бромистым этидием

80–90%, подтверждая, что введение меток не мешает формированию нуклеосом (рисунок, В). Отметим, что из-за значительной длины ДНК-матрицы, содержащей промотор, помимо основной фракции мононуклеосом могут образовываться динуклеосомы (рисунок, В). Вторая нуклеосома собирается на участке ДНК, содержащем промотор, в результате чего динуклеосомы не формируют инициаторных комплексов с РНКП. Выделение мононуклеосом из 4,5% ПААГ позволяет получить образец, полностью отвечающий требованиям экспериментов с РНКП.

Измерения одиночных нуклеосом (и их комплексов) проводили в разбавленных растворах методом двухканальной лазерной конфокальной микроскопии. Нуклеосомы, свободно диффундируя в растворе, проходили через фокус лазерного луча, где от каждой из них измерялись интенсивности I_3 и I_5 , необходимые для расчета величины FRET. Флуоресценция нуклеосом вне фокуса луча либо не возбуждалась, либо блокировалась конфокальной схемой фильтрации сигнала. В каждый момент времени в фокусе луча находилось не более одной нуклеосомы. Основное преимущество данной методики измерений перед традиционным измерением средней величины FRET от нуклеосом в растворе — это возможность выявить субпопуляции нуклеосом, отличающихся по величине FRET (т.е. по структуре нуклеосомной ДНК), и охарактеризовать их.

Исследование сконструированных нами (Cu3, Cu5)-меченых нуклеосом выявило наличие двух субпопуляций: основной (91% нуклеосом) с $E = 0,68$ и минорной (9%) с $E = 0$ (рисунок, Г). Минорная фракция соответствует ДНК, появляющейся в результате диссоциации части нуклеосом в разбавленных растворах. Основная фракция — это нуклеосомы. Большая величина E подтверждает правильность выбора положения меток Cu3 и Cu5, а доминирование таких нуклеосом свидетельствует о высокой стабильности образца в условиях spFRET-анализа.

Согласно данным электрофореза РНКП эффективно связывается с промоторным участком (Cu3, Cu5)-меченой матрицы ДНК, образуя ОС (рисунок, Д). Добавка РНК-праймера ApUpC совместно с АТФ и ГТФ к открытому комплексу перемещает РНКП на 11 нуклеотидов и формирует элонгационный комплекс ЕС-39. Электрофоретическая подвижность ЕС-39 заметно отличается от ОС (рисунок, Д). Внесение в реакционную смесь полного набора нуклеотидов инициирует транскрип-

цию (Cu3, Cu5)-меченой ДНК, которая, как и в контроле, завершается диссоциацией РНКП с образованием свободной ДНК (состояние РС, рисунок, Д). Этот результат подтверждает, что введение меток в ДНК не препятствует транскрипции.

Исследование нуклеосом методом spFRET-микроскопии показывает, что формирование ОС и ЕС-39 не приводит к изменениям в укладке ДНК на октамере гистонов в центральной части нуклеосомы (рисунок, Ж и З). Этот результат согласуется с тем, что РНКП в ОС и ЕС-39 находится далеко от нуклеосомы и не влияет на ее структуру. Нуклеотидная последовательность ДНК-матрицы позволяет также сформировать элонгационный комплекс ЕС-5, остановленный в положении –5 нуклеотидов до входа в нуклеосому (рисунок, И). Несмотря на ожидаемые стерические контакты между РНКП и нуклеосомой в комплексе ЕС-5, структура ДНК в центральной части нуклеосомы не изменяется. Следовательно, вплоть до положения –5 РНКП не вызывает масштабной диссоциации ДНК от октамера гистонов, и эта абсолютно необходимая для транскрипции перестройка нуклеосомы происходит на более поздних этапах. Небольшое увеличение содержания свободной ДНК ($E = 0$, рисунок, Ж–И) вызвано дополнительными манипуляциями с нуклеосомами в процессе приготовления и (или) очистки комплексов с РНКП. Анализ нуклеосом в состоянии РС показывает, что после завершения транскрипции доминирующая часть нуклеосом полностью восстанавливает свою исходную структуру (рисунок, К). Таким образом, результаты spFRET-анализа однозначно подтверждают более ранние данные биохимических исследований о том, что транскрипция бактериальной РНКП происходит без потери гистонов H3/H4, связанных с центральным участком нуклеосомной ДНК [10, 11].

Применение разработанной нами экспериментальной системы на основе транскрибируемых флуоресцентно-меченых нуклеосом и современных методик spFRET-микроскопии позволит существенно дополнить данные о структурных перестройках в нуклеосоме, происходящих при транскрипции РНК-полимеразой. Данный экспериментальный подход открывает широкие возможности изучения структуры элонгационных комплексов и модулирующего воздействия на них различных белковых шаперонов и ремоделеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00031).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. 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.

3. Chang H.W., Shaytan A.K., Hsieh F.-K., Kulaeva O.I., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M. Structural analysis of the

key intermediate formed during transcription through a nucleosome // *Trends Cell. Mol. Biol.* 2013. Vol. 8. P. 13–23.

4. *Walter W., Studitsky V.M.* Construction, analysis, and transcription of model nucleosomal templates // *Methods*. 2004. Vol. 33. N 1. P. 18–24.

5. *Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M.* Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 523. P. 109–123.

6. *Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Pestov N.A., Hsieh F.K., Studitsky V.M.* Experimental analysis of the mechanism of chromatin remodeling by RNA polymerase II // *Methods Enzymol.* 2012. Vol. 512. P. 293–314.

7. *Buning R., van Noort J.* Single-pair FRET experiments on nucleosome conformational dynamics // *Biochimie*. 2010. Vol. 92. N 12. P. 1729–1740.

8. *Choy J.S., Lee T.H.* Structural dynamics of nucleosomes at single-molecule resolution // *Trends Biochem. Sci.* 2012. Vol. 37. N 10. P. 425–435.

9. *Walter W., Kireeva M.L., Tchernajenko V., Kashlev M., Studitsky V.M.* Assay of the fate of the nucleosome during transcription by RNA polymerase II // *Methods Enzymol.* 2003. Vol. 371. P. 564–577.

10. *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.

11. *Kireeva M.L., Walter W., Tchernajenko V., Bondarenko V., Kashlev M., Studitsky V.M.* Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription // *Mol. Cell*. 2002. Vol. 9. N 3. P. 541–552.

Поступила в редакцию
26.03.15

DEVELOPMENT OF FLUORESCENTLY LABELLED MONONUCLEOSOMES TO STUDY TRANSCRIPTION MECHANISMS BY METHOD OF MICROSCOPY OF SINGLE COMPLEXES

K.S. Kudryashova, D.V. Nikitin, O.V. Chertkov, N.S. Gerasimova, M.E. Valieva, V.M. Studitsky, A.V. Feofanov

Fluorescence microscopy of single molecules and complexes is becoming increasingly popular method to study nucleosomes and functionally important processes with their participation. In this work we report on the development of positioned mononucleosomes on the basis of fluorescently labeled DNA matrix, which are a new tool for investigation of structural rearrangements in chromatin during transcription by RNA polymerase (RNAP). Two fluorophores, Cy3 (donor) and Cy5 (acceptor), were introduced in a non-transcribed DNA chain. After DNA packing on histone core they are positioned in the middle part of a nucleosome in the neighboring supercoils at a distance of less than 60 Å and interact by the mechanism of Förster resonance energy transfer (FRET). Changes in the nucleosome structure were monitored by changes in FRET efficiency in the study of single complexes of nucleosomes with RNAP by fluorescence microscopy. It is shown that introduction of labels did not affect the ability of RNAP to transcribe nucleosomes. Open complex with RNAP as well as elongation complexes stalled at positions –39 and –5 before the nucleosome boundary were prepared and characterized. It is shown that more than 80% of histones maintain their structure, restoring the original packing of DNA on the histone core after transcription completion. A new experimental system offers new possibilities for the study of a structure of nucleosomes and modulating effects of various protein chaperones and remodelers on them.

Key words: *nucleosome, RNA polymerase, fluorescence, microscopy, epigenetics.*

Сведения об авторах

Кудряшова Ксения Сергеевна — мл. науч. сотр. ИБХ РАН, вед. инженер кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-336-64-55; e-mail: rekamoskva@mail.ru

Никитин Дмитрий Валерьевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: dvnikit@yandex.ru

Чертков Олег Валерьевич — вед. инженер кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: o_chertkov@mail.ru

Герасимова Надежда Сергеевна — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: gerasimova@mail.bio.msu.ru

Валиева Мария Евгеньевна — студентка биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: durnopreyko-maria@rambler.ru

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-926-215-05-01; e-mail: avfeofanov@yandex.ru