

БИОЛОГИЯ

УДК 577.214.32

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОХОЖДЕНИЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ
ЧЕРЕЗ НУКЛЕОСОМУ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОЙ КРИОМИКРОСКОПИИО.И. Волох¹, Ф.-К. Шей², М.Г. Карлова¹, Е.С. Трифонова¹,
В.М. Студитский³, О.С. Соколова^{1,*}¹ Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;² медицинский факультет им. Роберта Вуда Джонсона, университет Ратгерса;
США, штат Нью Джерси, 08901, г. Нью-Брансуик, ул. Патерсона, д. 125;³ лаборатория эпигенетики рака, Центр исследований рака Фокс Чейз;
США, штат Пенсильвания, 19111, г. Филадельфия, просп. Коттмана, д. 333

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

Одним из перспективных и надежных методов исследования структур макромолекул является получение изображений с помощью просвечивающей криоэлектронной микроскопии и последующей трехмерной реконструкции. Методом криоэлектронной микроскопии была исследована структура комплекса РНК-полимеразы при транскрипции через нуклеосому, остановленной в позиции +42. Получены проекционные изображения и трехмерная структура комплекса ЕС-42 с разрешением 2,5 нм. Это позволило подтвердить сохранность структуры нуклеосомы при прохождении РНК-полимеразы.

Ключевые слова: РНК-полимераза, транскрипция, криоэлектронная микроскопия, нуклеосома.

Недавние исследования показали, что элонгация транскриптов является важным этапом регуляции экспрессии многих генов высших эукариот. Регуляция на стадии элонгации чаще всего осуществляется тогда, когда РНК-полимераза II (РНКП II) покидает промотор и транскрибирует ДНК первой (положение +1) нуклеосомы. В этот регуляторный процесс вовлечены ферменты, модифицирующие гистоны и ремоделирующие хроматин, а также различные элонгационные факторы. Современные исследования в этой области сосредоточены на определении природы нуклеосомного барьера для транскрибирующей РНКП II и анализе механизма действия факторов, позволяющих его преодолеть. Исследования *in vitro* показывают, что нуклеосомная структура является серьёзным препятствием для РНКП II — большинство комплексов останавливаются при встрече с первой нуклеосомой [1–4]. Высокие нуклеосомные барьеры встречаются в положениях +15 и +45 нуклеосомной ДНК [4], и их высота определяет эффективность транскрипции хроматина [5].

Один из наиболее информативных подходов для исследования механизма транскрипции хроматина РНК-полимеразами II — это остановка комплекса работающей полимеразы в определенном положении на нуклеосомной ДНК во время транскрипции и детальное изучение свойств остановленных комплексов (интермедиатов). Ранее для исследования свойств таких комплексов применяли в основном молекулярно-генетические подходы [4]. На сегодняшний день известны кристаллические

структуры нуклеосомы [6] и РНКП II [7]. Однако структурные основы формирования нуклеосомного барьера пока недостаточно исследованы, и полный комплекс РНКП с нуклеосомой не был кристаллизован.

Известно, что изменение конформационного состояния белка отражается и на его функциональной активности [8]. Таким образом, знание пространственных структур макромолекулярных комплексов дает возможность интерпретировать конформационные изменения в молекулах в процессе их активации и автоингибирования, а также при связывании с лигандами. Это необходимо как для выяснения механизмов действия (и, соответственно, идентификации доменов данного белка в качестве мишени при заболевании), так и для конструирования новых лекарств.

Признанными методами для изучения структуры и конформационных изменений в белковых молекулах являются: рентгеноструктурный анализ, ЯМР, метод спиновых меток, детекция люминесценции и спектроскопические методы. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и ограничения. Большинство методов способны определять лишь незначительные изменения полипептидной цепи и далеко не все они могут определить, какая часть белка и как изменила свою конформацию.

Преимущество метода просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) перед другими методами структурной биологии заключается в том, что этот метод позволяет визуализировать не только трехмерную структуру, но и динамику (конформа-

ционные перестройки) самых разнообразных нанобиообъектов с разрешением от 2–5 нм до атомного (1,8 нм). Одновременно метод ПЭМ не обладает многими недостатками других структурных методов: в нем нет лимитирующего размера частиц, не нужны кристаллы; количество и концентрация используемого материала достаточно малы. Модификация метода (крио-ПЭМ) позволяет наблюдать макромолекулы в нативном водном окружении в состоянии, близком к физиологическому [9]. В сочетании с методом реконструкции макромолекул, ПЭМ белков позволяет получить трехмерные структуры макромолекулярных комплексов [10].

В данной работе мы использовали метод крио-ПЭМ для получения трехмерной структуры комплекса РНК-полимеразы *E. coli* с нуклеосомой, остановленной в положении +42.

Материалы и методы

Сборка нуклеосом. Матрица для создания остановленного комплекса (ЕС-42) была получена методом ПЦР. Для получения комплекса РНК-полимеразы с нуклеосомой нуклеосомы собирались из очищенных гистонов в присутствии ДНК Т7А1-603/+42, содержащей сильный промотор Т7А1 для РНК-полимеразы *E. coli*; последовательность ДНК 603, поддерживающую сборку точно расположенной нуклеосомы (расположенной на расстоянии 50 п.н. от точки инициации транскрипции), и последовательность ДНК, обеспечивающую остановку РНК-полимеразы в нуклеосоме, в положении 42 п.н. от промотор-проксимальной границы нуклеосомы [4]. Для этого готовили смесь следующих компонентов: ДНК Т7А1-603/+42, 5 М NaCl, 1 М Tris, pH 8, 2% NP-40, 4 мМ EDTA, H₂A/2В, H₃/4, дистиллированная вода до 50 мкл. Постепенно понижали концентрацию NaCl с 2 М до 10 мМ путем диализа.

Для получения транскрипционного комплекса использовали препарат нуклеосом в концентрации 400 нг/мкл с ДНК (Т7А1-603/+42, 269 п.н.). Готовили смесь нуклеосом с РНКП *E. coli* в буфере ТВ40 (нуклеосомы (400 нг/мкл), холофермент *E. coli*). Смесь инкубировали при 37°C в течение 10 мин. Для образования комплекса ЕС-39 (содержащего РНК длиной 11 н.) к смеси добавляли 400 мкМ [ArUpC], 1 мМ АТФ, 1 мМ ГТФ и инкубировали при 37°C 10 мин. Далее для образования комплекса ЕС-45 (содержащего РНК длиной 45 н.п.) к смеси добавляли Rifampicin, CH₃ОН в присутствии 50 мкМ ЦТФ, 150 мкМ KCl и инкубировали при комнатной температуре 10 мин с последующим диализом против ТВ300 в течение 2–3 ч. Для образования комплекса ЕС-42 к смеси добавляли 1 мкМ смеси ЦТФ, УТФ, ГТФ и 25 мкМ 3'-дАТФ. Инкубировали при комнатной температуре 4 мин. Эффект остановки РНКП в заданной позиции достигается за счет лимитирования реакции транскрипции по одному рибонуклеотиду. Из-за отсутствия субстрата фермент доходит до точки на матрице, где соот-

ветствующий рибонуклеотид должен был бы включаться в формируемый транскрипт, и останавливается из-за отсутствия рибонуклеотида в растворе.

В результате был получен комплекс РНКП *E. coli* с нуклеосомой, остановленной в позиции +42 (ЕС-42), с концентрацией 86 нг/мкл. Чистоту комплекса оценивали электрофоретически.

Подготовка образцов для изучения методом крио-ПЭМ. Приготовленные образцы в объеме 3 мкл сразу же наносили на сетки с использованием аппарата Vitrobot Mark IV (FEI). Использовали медные сетки Quantifoil (Германия) с диаметром 3 мм и числом ячеек 400/2,54 см², покрытые пластиковой подложкой с отверстиями диаметром 1,2 мкм. В камере аппарата Vitrobot Mark IV поддерживали постоянные температуру (22°C) и влажность (95%). Сетки зажимали в пинцете и автоматически промокали с помощью бумажных фильтров для удаления излишков жидкости в течение 2 сек. После этого пинцет с зажатой сеткой моментально погружали в жидкий этан для образования аморфного льда, содержащего частицы белка. Хранили сетки с нанесенными образцами в контейнерах, погруженных в жидкий азот.

Криоэлектронная микроскопия и обработка изображений. Сетки помещали в криодержатель Gatan 626 (Gatan) и просматривали в криоэлектронном микроскопе Tecnai G2 Spirit TEM (FEI), при напряжении 120 кВ в режиме низкой дозы электронов (10 е/Å²). Для захвата и фиксации изображений использовали ПЗС Eagle (FEI) с размерами матрицы 4000×4000 пикселей. Частицы комплексов собирали с изображений в полуавтоматическом режиме с использованием программы BOXER [11] и копировали в один файл для дальнейшей классификации и анализа. Всего было собрано 3500 частиц комплексов. Обработку изображений проводили с использованием программы IMAGIC [12].

Результаты и обсуждение

Комплекс нуклеосомы с РНКП, остановленной в положении +42 (ЕС-42), был собран в количестве 100 мкл (86 нг/мкл). Электрофоретический анализ подтвердил наличие корректно собранных комплексов. Образцы, содержащие комплексы, были заморожены в витрифицированном льду. Поскольку замораживание в криомикроскопии происходит моментально (менее чем за 1 мс [13]), это дает основание считать, что структура комплекса, соответствующая одной из фаз прохождения РНК-полимеразы через нуклеосому, сохранялась у всех комплексов в равной мере. Одинаковая структура одиночных комплексов является необходимым условием для построения трехмерной реконструкции с использованием множества одиночных частиц [14].

Поскольку, как правило, частицы не имеют преимущественной ориентации во льду, различные

проекции отображают различные ориентации молекулы (рис. 1а).

Для повышения контраста криоизображений применяли комбинированное воздействие сферической аберрации электронного микроскопа и дефокусировки на 1,5–1,9 мкм от точного фокуса [15]. Это воздействие индуцирует фазовый сдвиг, описываемый частотно-контрастной характеристикой (ЧКХ). Для того, чтобы воссоздать реальную структурную информацию, проводили коррекцию ЧКХ на изображениях.

Все 3500 проекционных изображений комплексов подвергались операции полосовой фильтрации для удаления нежелательных пространственных частот. Далее для центрирования частиц рассчитывали пики интенсивности сигнала для каждой частицы по сравнению с фоном. После этого с помощью программы IMAGIC [12] каждое изображение автоматически сдвигалось таким образом, чтобы количество пиков интенсивности вблизи центра было максимально. Центрированные частицы выравнивали с использованием корреляционного анализа [16] и итеративного алгоритма.

Для классификации сходные изображения частиц выделялись в отдельные классы. Было получено 100 классов, некоторые из которых приведены на рис. 1б. Для каждого класса рассчитывали

углы Эйлера — направления, которые определяют позицию и ориентацию частицы в пространстве относительно общего центра. Для построения трехмерной реконструкции комплекса ЕС-42 мы использовали поиск соответствующих проекций в пространстве Фурье или пространстве обратных координат [14]. Преобразование Фурье экспериментальных проекций выражается в формировании слоев вокруг общего центра, поэтому пересечения этих проекций уникальны, и их относительная ориентация может быть определена при использовании трех или более проекций.

В результате была рассчитана трехмерная реконструкция комплекса ЕС-42 (рис. 1г). Выбранный контурный уровень для визуализации реконструкции основывался на данных о молекулярной массе комплекса ~550 кДа и средней плотности белка, равной 810 Да/нм³. Полученная трехмерная структура представляет собой две электронные плотности, соединенные друг с другом, большая с высотой ~20 нм и шириной ~10 нм, и меньшая с диаметром ~8 нм. Разрешение полученной реконструкции, рассчитанное методом объемной корреляции Фурье [17, 18] при коэффициенте корреляции равном 0,5 оказалось 2,5 нм.

Для интерпретации полученной реконструкции мы использовали кристаллические структуры

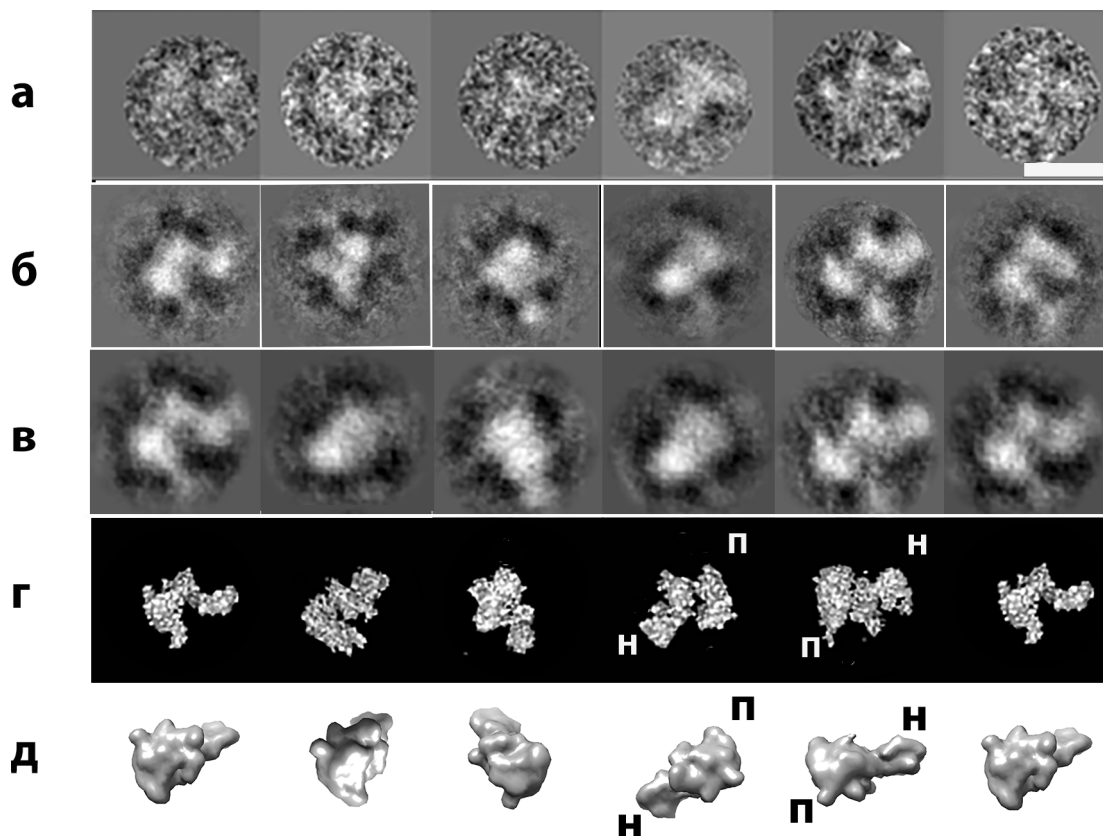


Рисунок. Анализ изображений и трехмерная реконструкция комплекса ЕС-42 с использованием криоданных: а — отдельные частицы комплексов во льду после полосовой фильтрации, контраст инвертирован (белок — белый); б — суммарные изображения комплексов в различных ориентациях; в — репроекции трехмерной структуры комплекса, рассчитанной с использованием изображений на (б) в соответствующих ориентациях; г — трехмерная реконструкция комплекса ЕС-42 в различных ориентациях; д — структуры РНКП (PDB ID: 2O5I) и нуклеосомы (PDB ID: 1AOI) с разрешением 2,5 нм в ориентациях, соответствующих изображениям на (г); н — нуклеосома; п — РНКП. Масштабный отрезок — 20 нм

нуклеосомы [6] и РНКП [19], отфильтрованные с разрешением 2,5 нм с помощью программы UCSF Chimera [20] (рис. 1д). При этом разрешении размеры кристаллических структур приближаются к размерам доменов, полученных с помощью крио-ПЭМ. Структура РНКП соответствует большему домену трехмерной реконструкции (отмечен символом “п” на рис. 1г, д). Меньший домен соответствует нуклеосоме (символ “н” на рис. 1г, д). В пользу этого варианта указывает и соответствие объемов субдоменов и кристаллических структур РНКП, и нуклеосомы при использованном разрешении 2,5 нм (рис. 1д). Домены в такой конфигурации связаны между собой коротким участком ДНК, по которой двигается РНКП, которая, однако, не различима на полученной нами реконструкции.

Такое расположение частей комплекса ЕС-42 соответствует выдвинутой ранее гипотезе о том, что механизм транскрипции хроматина РНКП II-типа позволяет сохранить на исходных позициях гистоны H3/H4, несущие специфичные ковалентные модификации (так называемый “гистоновый код”) и обеспечить сохранение эпигенетического статуса клетки [4]. Упомянутая гипотеза предполагает, что при осуществлении транскрипции по механизму РНКП II-типа, нуклеосомы не перемещаются, и

наблюдается обмен только гистонов H2A/H2B. Действительно, трехмерная структура интермедиата транскрипции, остановленного в позиции +42, содержит два домена, то есть нуклеосома полностью не разбирается при прохождении РНКП.

Таким образом, показана принципиальная возможность изучения комплексов РНКП с нуклеосомой, остановленных в определенной позиции, с применением криоэлектронной микроскопии. На основе полученных данных построена трехмерная реконструкция комплекса РНКП с нуклеосомой, остановленной в позиции +42 с разрешением 2,5 нм. Комплекс состоит из двух доменов, соответствующих РНКП и нуклеосоме, соединенных друг с другом. Полученные результаты могут использоваться в качестве стартовой модели для изучения и идентификации поверхностей, стабилизирующих взаимодействия в комплексах РНКП с нуклеосомой при транскрипции.

Авторы благодарят А.К. Шайтана за предоставление модели РНКП с нуклеосомой. Криоэлектронная микроскопия проводилась в ЦКП “Структурная диагностика материалов” ИК РАН им. А.В. Шубникова. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00031).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chang C.H., Luse D.S. The H3/H4 tetramer blocks transcript elongation by RNA polymerase II in vitro // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. N 37. P. 23427–23434.
2. Kireeva M.L., Hancock B., Cremona G.H., Walter W., Studitsky V.M., Kashlev M. Nature of the nucleosomal barrier to RNA polymerase II // *Mol. Cell.* 2005. Vol. 18. N 1. P. 97–108.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Davey C.A., Sargent D.F., Luger K., Maeder A.W., Richmond T.J. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution // *J. Mol. Biol.* 2002. Vol. 319. N 5. P. 1097–1113.
7. Armache K.J., Kettenberger H., Cramer P. Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. Vol. 100. N 12. P. 6964–6968.
8. Nguyen V.Q., Ranjan A., Stengel F., Wei D., Aebersold R., Wu C., Leschziner A.E. Molecular architecture of the ATP-dependent chromatin-remodeling complex SWR1 // *Cell.* 2013. Vol. 154. N 6. P. 1220–1231.
9. Dubochet J., Adrian M., Chang J.J., Homo J.C., Lepault J., McDowell A.W., Schultz P. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens // *Q. Rev. Biophys.* 1988. Vol. 21. N 2. P. 129–228.
10. van Heel M., Gowen B., Matadeen R., Orlova E.V., Finn R., Pape T., Cohen D., Stark H., Schmidt R., Schatz M., Patwardhan A. Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution // *Q. Rev. Biophys.* 2000. Vol. 33. N 4. P. 307–369.
11. Ludtke S.J., Baldwin P.R., Chiu W. EMAN: Semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions // *J. Struct. Biol.* 1999. Vol. 128. N 1. P. 82–97.
12. van Heel M., Harauz G., Orlova E.V., Schmidt R., Schatz M. A new generation of the IMAGIC image processing system // *J. Struct. Biol.* 1996. Vol. 116. N 1. P. 17–24.
13. Berriman J., Unwin N. Analysis of transient structures by cryo-microscopy combined with rapid mixing of spray droplets // *Ultramicroscopy.* 1994. Vol. 56. N 4. P. 241–252.
14. Vanheel M. Angular Reconstitution — a Posteriori Assignment of Projection Directions for 3-D Reconstruction // *Ultramicroscopy.* 1987. Vol. 21. N 2. P. 111–123.
15. Zhou Z.H., Hardt S., Wang B., Sherman M.B., Jaska J., Chiu W. CTF determination of images of ice-embedded single particles using a graphics interface // *J. Struct. Biol.* 1996. Vol. 116. N 1. P. 216–222.
16. Harauz G., Boekema E., van Heel M. Statistical image analysis of electron micrographs of ribosomal subunits // *Methods Enzymol.* 1988. Vol. 164. P. 35–49.
17. Saxton W.O., Baumeister W. The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein // *J. Microscopy.* 1982. Vol. 127. Pt 2. P. 127–138.
18. van Heel M., Schatz M. Fourier shell correlation threshold criteria // *J. Struct. Biol.* 2005. Vol. 151. N 3. P. 250–262.

19. Vassilyev D.G., Vassilyeva M.N., Perederina A., Tahirov T.H., Artsimovitch I. Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase // *Nature*. 2007. Vol. 448. N 7150. P. 157–162.

20. Goddard T.D., Huang C.C., Ferrin T.E. Visualizing density maps with UCSF Chimera // *J. Struct. Biol.* 2007. Vol. 157. N 1. P. 281–287.

Поступила в редакцию
04.07.2015

STUDY OF RNA POLYMERASE TRANSCRIPTION THROUGH NUCLEOSOME BY CRYO-ELECTRON MICROSCOPY APPROACH

O.I. Volokh¹, F.-K. Hsieh², M.G. Karlova¹, E.S. Trifonova¹, V.M. Studitsky³, O.S. Sokolova^{1,*}

¹ Department of Bioengineering, School of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

² Robert Wood Johnson Medical School, Rutgers University, Paterson Str. 125, New Brunswick, NJ 08901, USA;

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

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

One of the most promising and reliable methods for analysis of the structure of macromolecules is cryo-electron transmission microscopy with subsequent three-dimensional reconstruction. In this study, this method was used to study transcription by RNA polymerase, stalled at the position 42 bp into a nucleosome. We obtained the projection images and solved the three-dimensional structure of the complex EC-42 with the 2.5 nm resolution. It allowed us to confirm the conformational integrity of the nucleosome, during the passage of RNA polymerase.

Keywords: RNA polymerase, transcription, cryo-electron microscopy, nucleosome.

Сведения об авторах:

Волох Олеся Игоревна — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: olesyavolokh@gmail.com

Шей Фу-Кай — науч. сотр. школы медицины им. Роберта Вудса Джонстона, Университет Ратгерса. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: fukai.hsieh@gmail.com

Карлова Мария Георгиевна — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: mkarlova@yandex.ru

Трифонова Елизавета Сергеевна — лаб. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: nyska57@gmail.com

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, зав. лаб. регуляции транскрипции и репликации биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Сokolova Ольга Сергеевна — докт. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-00-05; e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru