

МЕТОДЫ

УДК 577.214.32

ОЧИСТКА ДНК-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ С ПОМОЩЬЮ
НАТИВНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ
В ЭЛЕКТРОННОМ МИКРОСКОПЕМ.Е. Валиева¹, Н.И. Деркачева², 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 кафедра биохимии, Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова;
Россия, 127473, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

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

Электрофоретическое разделение в нативных условиях может быть использовано для очистки белковых молекул, а также их комплексов с ДНК и другими лигандами. В данной работе этот метод использован для разделения фракций моно- и динуклеосом. Показана принципиальная возможность специфического выделения комплексов ДНК с белком размером около 200 кДа из нативного геля в препаративных количествах для изучения с помощью электронной микроскопии. Получены двумерные проекционные структуры нуклеосом с разрешением 25 Å. Проведено сравнение электронно-микроскопических изображений нуклеосом до и после выделения из нативного полиакриламидного геля. Выявлено, что ориентация нуклеосом на углеродной подложке до и после электрофоретического разделения различна.

Ключевые слова: мононуклеосома, динуклеосома, электронная микроскопия, обработка изображений, электрофорез в ПААГ.

Ядерная ДНК клеток эукариот находится в комплексе с гистоновыми и негистоновыми белками, образуя хроматин. Белки обеспечивают свертывание и компактизацию ДНК, а также процессы репликации, транскрипции, репарации и рекомбинации. В регуляции этих процессов существенную роль играет структура хроматина, которая зависит от конформационных изменений гистонов, а также хроматин-ремоделирующих факторов [1, 2], обеспечивающих доступность тех или иных участков ДНК для ферментов.

Основной структурной единицей хроматина является нуклеосома, состоящая из фрагмента ДНК длиной 146 пар нуклеотидов, образующего 1,75 витка, накрученного на октамер гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Гистоновый октамер состоит из центрального тетрамера (H3-H4)₂, окруженного двумя димерами H2A/H2B. Пространственная структура нуклеосомы напоминает шайбу или плоский цилиндр диаметром 11 нм и высотой 5,7 нм [3, 4].

Структурная целостность октамерного комплекса обеспечивается межмолекулярными взаимодействиями гистонов: два димера H3-H4 соединяются благодаря взаимодействию между гистонами H3. Образованные таким образом тетрамеры (H3-H4)₂ связываются с димерами H2A/H2B благодаря взаимодействию между гистонами H4 и H2B. Молекулярная масса нуклеосомы составляет около 215 кДа. Линкерный участок ДНК между нуклеосомами состоит в среднем из 60 пар нуклеотидов. К этому участку присоединена молекула гистона H1. Про-

цессы перемещения нуклеосом по ДНК, приводящие к изменению их плотности, называются ремоделированием хроматина. Оно может включать изменения в составе гистоновых октамера (“обмен/потеря” гистонов и их модификации). Данные процессы играют существенную роль в контроле экспрессии генов, формировании эпигенетической памяти клетки, регуляции процессов транскрипции и репарации. Особую роль в процессе ремоделирования выполняют N-концевые участки гистонов, наиболее часто подвергающиеся посттрансляционным модификациям. Они практически не структурированы и выходят за границу нуклеосомы, обеспечивая взаимодействия с ДНК и различными белковыми факторами [5].

При АТФ-зависимом ремоделировании хроматина могут образовываться динуклеосомы [6]. Перестройки хроматина, сборка и разборка нуклеосом сопровождают все процессы, происходящие с участием генетического материала в клетке. Нарушения процессов ДНК-гистоновых и гистон-гистоновых взаимодействий и необратимая потеря нуклеосом в результате действия различных факторов способны запускать патологические процессы и снижать жизнеспособность клеток, приводя, в частности, к блокировке процессов транскрипции [7–9].

Значимость процессов транскрипции для клеточной жизнедеятельности и метаболизма диктует необходимость понимания структурных характеристик динамических интермедиатов транскрипции. Кристаллизация ДНК-белковых комплексов затруд-

нена в связи с большими размерами и структурной лабильностью. Поэтому основным методом получения структурной информации в данном случае служит просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) макромолекул [10].

Однако на практике определенные белковые комплексы трудно наработать в количествах, необходимых для электронно-микроскопического исследования; кроме того, могут возникать сложности при использовании гель-фильтрации для разделения близких по весу белков.

В то же время, при нативном гель-электрофорезе комплексы белков с ДНК и отдельные белковые молекулы в соответствии с их молекулярным весом и зарядом образуют хорошо сформированные полосы, расположенные далеко друг от друга. Недавно была предложена методика выделения белков из нативного геля для последующего исследования с помощью электронной микроскопии [11]. Для отработки метода авторы использовали крупные молекулярные комплексы: термосому *T. acidophilum*, протеасому 20S и АТФазу (молекулярные массы комплексов, соответственно, 940 кДа, 680 кДа и 500 кДа), которые легко идентифицировать на электронных микрофотографиях.

В данном исследовании мы модифицировали предложенный метод выделения белков из геля для работы с небольшими ДНК-белковыми комплексами (нуклеосомы 215 кДа). Мы показали, что этот метод позволяет получить чистый препарат ДНК-белкового комплекса для изучения в электронном микроскопе.

Материалы и методы

Сборка нуклеосом. ДНК-матрицу, состоящую из промотора T7A1 и нуклеосом-позиционирующей последовательности получали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР), причем один из праймеров нес на 5'-конце флуоресцентную метку FAM, как описано ранее [12]. В качестве источника гистонов для сборки нуклеосом использовали хроматин без гистона H1, который выделяли из эритроцитов цыплят, как описано ранее [13]. Нуклеосомы собирали на FAM-меченной ДНК матрице по протоколу, описанному в работе [13]. А именно, посадку октамера гистонов на FAM-меченную ДНК-матрицу выполняли в ходе диализа против буферов (10 мМ трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,5 мМ бета-меркаптоэтанол, 0,1%-ный NP-40) с понижающейся концентрацией NaCl (от 1 М до 0,01 М).

Разделение белков в нативном геле. На гель наносили 3,3 пМ нуклеосом. Положение мононуклеосом/динуклеосом в геле (4%-ный полиакриламидный гель (ПААГ), буфер 0,5×TBE) детектировали по флуоресценции FAM, сканируя гель с помощью лазерного сканера Typhoon (GE Healthcare), затем распечатывали схему. Полосы геля с мононуклеосомами/динуклеосомами идентифицирова-

ли, совмещая гель и распечатанную 1:1 схему его флуоресценции.

Электронная микроскопия. Медные сетки для электронной микроскопии, покрытые слоем аморфного углерода, усиленного слоем формвара (SPI, США), помещались в аппарат Emitech K100X (Великобритания) и обрабатывались в режиме тлеющего разряда при силе тока 20 мА в течение 45 с для стандартной подготовки образцов и 2 мин для выделения из геля. Данная обработка придает углеродной подложке гидрофильные свойства, необходимые для лучшего осаждения на ней белковых молекул. При выделении нуклеосом из геля сразу же после обработки сетки помещались обработанной стороной вниз на смоченную буфером и процарапанную препаровальной иглой поверхность нативного геля в области, соответствующей искомой полосе белка и экспонировались во влажной камере при комнатной температуре в течение 5 мин. По истечении экспонирования излишки буфера, оставшиеся на подложке, быстро удалялись фильтровальной бумагой. При стандартной подготовке образца 3 мкл белка наносили на обработанную поверхность сетки на 30 сек при комнатной температуре, после чего излишки удаляли фильтровальной бумагой. Далее образцы подвергали негативному контрастированию 1%-ным водным раствором уранил-ацетата натрия, излишки быстро удалялись фильтровальной бумагой. Готовая сетка с нанесенным и контрастированным образцом высушивалась на воздухе.

Исследование образцов производили в просвечивающем электронном микроскопе JEOL 2100 (JEOL, Япония) на базе Межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ (Москва, Россия). Использовали ускоряющее напряжение 200 кВ в условиях низкой дозы (<10–20 электронов на Å² в секунду) для уменьшения повреждения образца под воздействием электронного пучка. Изображения получали с увеличением ×40 000 с помощью ПЗС-камеры с размером матрицы 2000×2000 пикселей (Gatan, США). Размер пикселя на микрофотографиях составил 3,7 Å.

Сбор частиц и дальнейшую обработку изображений производили в программе IMAGIC5 [14].

Результаты и обсуждение

В последние десятилетия ПЭМ превратилась в полноправный метод, применяемый в структурной биологии. Это стало возможным в связи со значительным улучшением методик электронной микроскопии и с совершенствованием компьютерных технологий, применяемых для расчетов трехмерных структур [10, 15, 16].

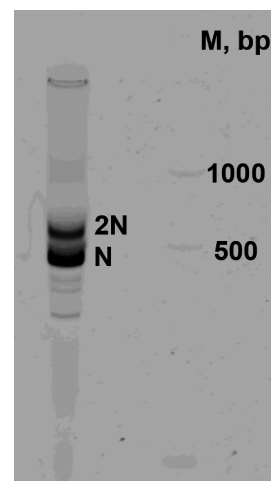
Электронная микроскопия расширяет возможности структурной биологии, поскольку она способна работать с макромолекулярными комплексами, которые могут находиться в различных конформациях. Метод ПЭМ требует значительно меньшего

количества белка по сравнению с другими структурными методами. С введением в практику прямых детекторов электронов (direct detectors) метод ПЭМ макромолекул достиг субнангстремного разрешения, позволил детектировать атомные структуры белковых молекул и по-новому интерпретировать меж- и внутримолекулярные взаимодействия в белковых комплексах [17].

В то же время подготовка проб для ПЭМ вызывает определенные сложности. Для изучения структуры белков их необходимо выделить в очищенном виде. В частности, при очистке транскрипционных интермедиативных комплексов ДНК с нуклеосомой критическим шагом оказывается разделение комплексов в различном олигомерном состоянии.

Подобная задача может быть решена с помощью электрофоретического разделения белков. В данной работе мы использовали нативный гель-электрофорез для разделения препарата моно- и динуклеосом и отделения их от ДНК донорного хроматина (рис. 1). При электрофоретическом разделении моноклеосомы и динуклеосомы идут двумя

Рис. 1. Электрофорез в 4%-ном нативном ПААГ, сканирование с помощью лазерного сканера Typhoon (GE Healthcare). Распределение флуоресценции меток в составе свободных моно- (N) и динуклеосом (2N), сформированных на ДНК-матрице, меченной FAM. M — маркеры ДНК (п.о.)



полосами, которые можно независимо перенести на сетку для исследования.

После переноса белковых комплексов из геля на сетку препарат изучался в электронном микроскопе в стандартных условиях (увеличение $\times 40\,000$, режим низкой дозы электронов, дефокус 1,5–1,9 мкм). Концентрация моноклеосом после выделения из ПААГ оказалась достаточной для визуализации отдельных частиц. На микрофотографиях нуклеосом, полученных по стандартной методике (рис. 2, а), присутствует плотный фон, видимо, образованный

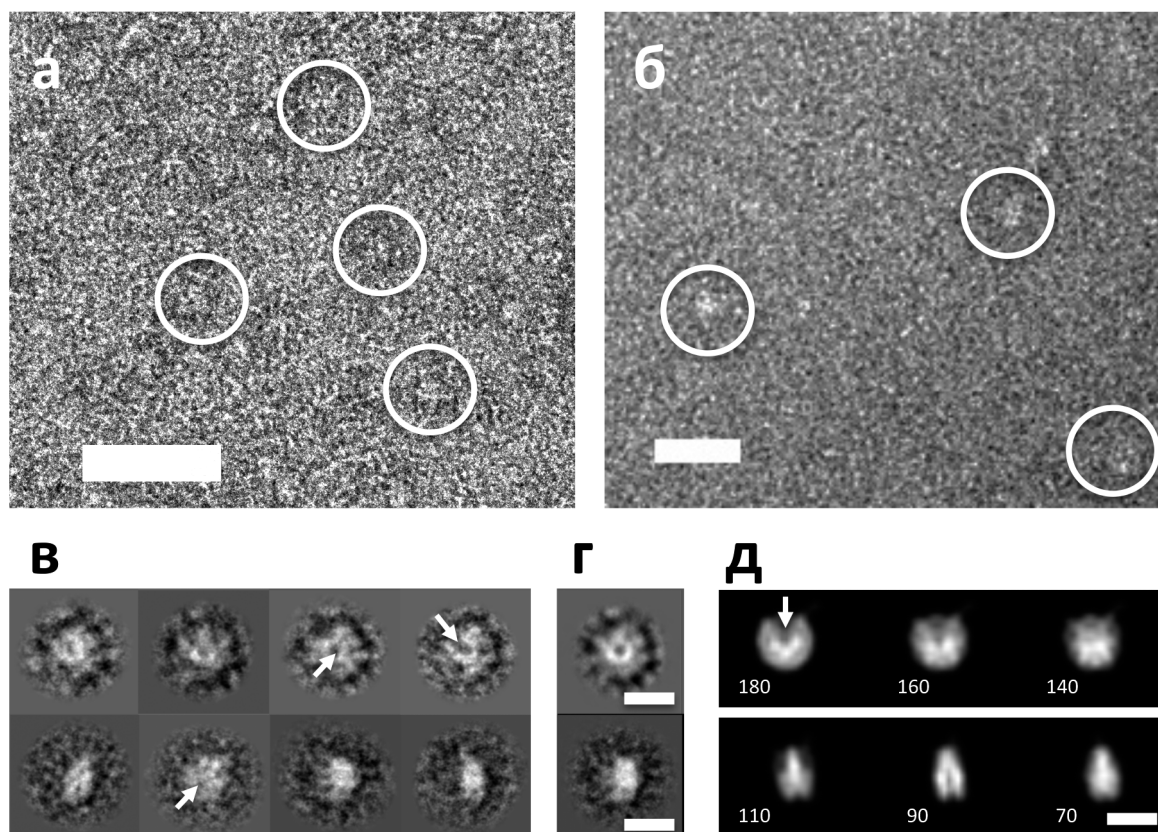


Рис. 2. Электронная микроскопия и анализ моноклеосом. **а** — Типичное поле зрения при окраске уранил-ацетатом и увеличении $40\,000\times$ препарата нуклеосом, полученного по стандартной методике до нанесения на гель. Белыми окружностями выделены отдельные нуклеосомы. Масштабный отрезок — 50 нм; **б** — Типичное поле зрения при окраске уранил-ацетатом и увеличении $40\,000\times$ препарата моноклеосом, выделенных из геля. Белыми окружностями выделены отдельные моноклеосомы. Масштабный отрезок — 30 нм; **в** — Классификация изображений нуклеосом. Верхний ряд — нуклеосомы, полученные по стандартной методике, нижний ряд — моноклеосомы, выделенные из геля; **г** — суммарные изображения всех частиц (сверху — по стандартной методике, снизу — моноклеосомы); **д** — проекции кристаллической структуры нуклеосомы, отфильтрованной с низким разрешением в различных ориентациях. Значения углов Эйлера бета, отражающих наклон частицы относительно плоскости подложки, указаны под соответствующими проекциями. Белыми стрелками на (в–д) отмечено направление нуклеосомной диадной оси. Длина масштабного отрезка — 10 нм

ДНК донорного хроматина, который затрудняет сбор и интерпретацию частиц. На микрофотографиях моноклеосом после электрофоретического разделения такой фон отсутствует (рис. 2, б).

Было отмечено различие в ориентации нуклеосом в препаратах, полученных до и после электрофоретического разделения. В первом случае нуклеосомы располагаются на подложке в основном в горизонтальной ориентации так, что гистоны контактируют с подложкой. После электрофоретического разделения моноклеосомы чаще располагаются в различных ориентациях, в том числе перпендикулярно к подложке, при этом с подложкой контактирует намотанная на нуклеосому ДНК. Это может быть связано с изменением суммарного заряда комплекса либо с изменением гидрофильных свойств ДНК в процессе электрофоретического разделения. Ранее мы не обнаружили достоверной зависимости ориентации белковых комплексов от времени обработки сеток в тлеющем разряде. Наличие разнообразных ориентаций значительно упрощает работу по получению трехмерной реконструкции молекулы, так как при изучении в электронном микроскопе не требуется поворачивать держатель образца в поисках отсутствующих пространственных конформаций [18].

Изображения моноклеосом в разнообразных ориентациях выравнивались относительно ротационной суммы всех частиц и суммировались для

улучшения контраста (рис. 2, в). Разрешение двумерных проекционных структур оценивалось по методу двумерной корреляции Фурье и составило 25 Å. Линейные размеры полученных двумерных изображений (рис. 2, г) сравнимы с размерами двумерных проекций кристаллической структуры нуклеосомы [19] при соответствующем разрешении (25 Å) (рис. 2, д), что свидетельствует об отсутствии принципиальных нарушений в структуре моноклеосом при выделении из нативного ПААГ.

Для характеристики позиции частицы в пространстве используют модельный объект — сферу Эйлера. Центр сферы Эйлера определяет положение частицы. Углы Эйлера определяют ориентацию частицы относительно центра. Угол альфа описывает поворот частицы в плоскости подложки от -180 до $+180$ градусов, а угол бета — наклон частицы относительно плоскости подложки.

Проведенное исследование показало, что на большинстве проекционных структур нуклеосом (80%), приготовленных по стандартной методике, хорошо видно углубление в центре, образованное октамером гистонов; это свидетельствует о горизонтальной ориентации нуклеосом на подложке (рис. 2, в). Об этом же свидетельствуют рассчитанные величины углов Эйлера (рис. 3).

В образце моноклеосом после электрофоретического разделения в неденатурирующих условиях доля частиц с горизонтальной ориентацией

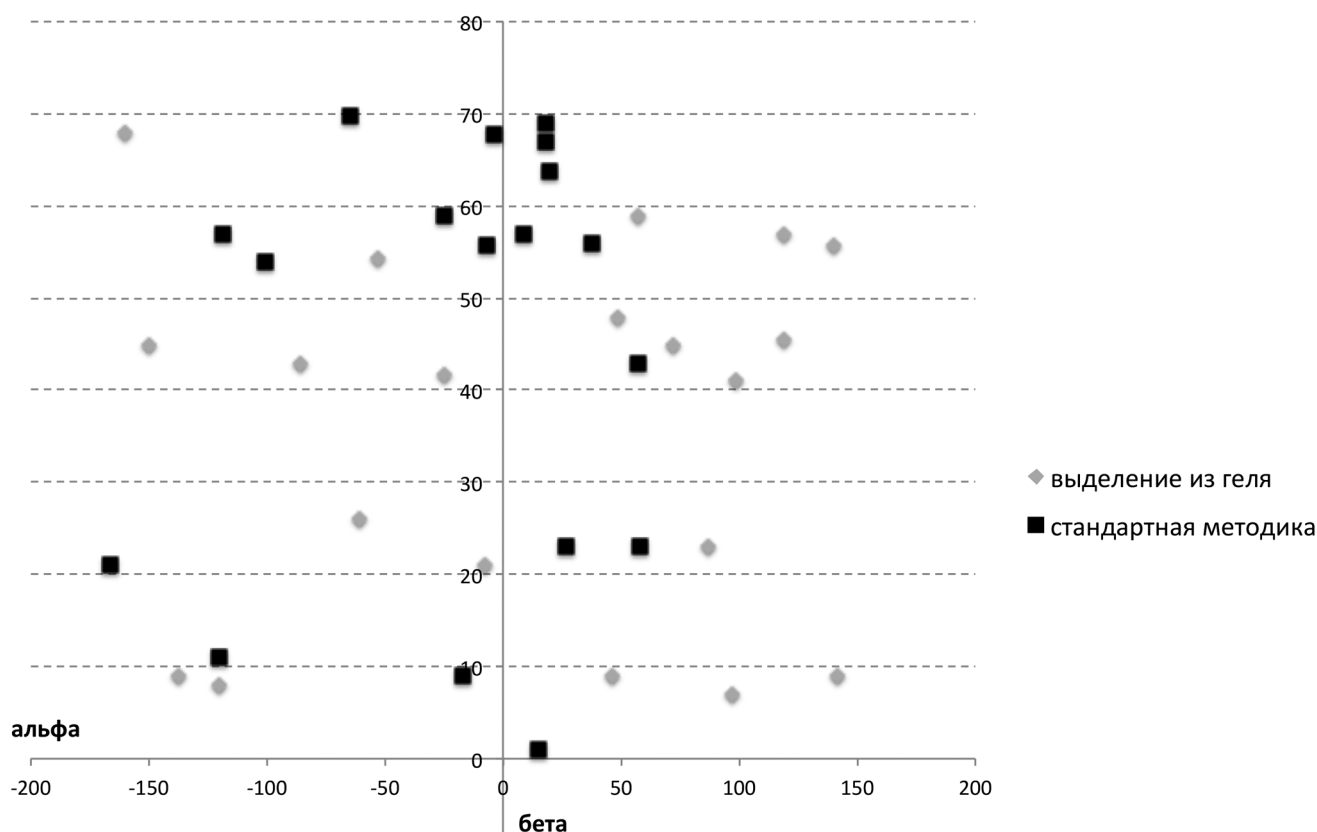


Рис. 3. Распределение углов Эйлера (альфа и бета) для двух исследуемых образцов: полученных по стандартной методике (чёрные квадраты) и после выделения из нативного полиакриламидного геля (серые ромбы)

на подложке составляла только около 20%. При этом кроме горизонтальной наблюдались и другие ориентации, в частности, боковые (рис. 2, в). Величины углов Эйлера для этого образца распределены более равномерно (рис. 3), что позволяет рассчитать трехмерную структуру белковой молекулы с большей точностью.

Таким образом, нами была показана принципиальная возможность специфического выделения комплексов ДНК с белком размером порядка 200 кДа из нативного ПААГ в препаративных количествах для изучения с помощью электронной микроскопии. Такой метод выделения позволяет получить более разнообразные пространственные ориентации ДНК-белковых комплексов на под-

ложке, что облегчает трехмерную реконструкцию по данным ПЭМ. Полученные результаты могут использоваться для дальнейшего изучения структурных основ процесса транскрипции и идентификации взаимодействий в транскрипционных комплексах, содержащих нуклеосому.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00031). Авторы благодарят Н.С. Герасимову за подготовку препарата нуклеосом, В.М. Студитского и А.К. Шайтана за плодотворные обсуждения и ценные рекомендации. Электронная микроскопия проводилась с использованием уникальной научной установки “Трёхмерная электронная микроскопия и спектроскопия” биологического факультета МГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clapier C., Cairns B. The biology of chromatin remodeling complexes // *Annu. Rev. Biochem.* 2009. Vol. 78. P. 273–304.
2. Vignali M., Hassan A., Neely K., Workman J. ATP-dependent chromatin-remodeling complexes// *Mol. Cell. Biol.* 2000. Vol. 20. N 6. P. 1899–1910.
3. Kornberg R.D., Thomas J.O. Chromatin structure; oligomers of the histones // *Science*. 1974. Vol. 184. N 4139. P. 865–868.
4. 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.
5. Arents G., Moudrianakis E.N. The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995. Vol. 92. N 24. P. 11170–11174.
6. Dechassa M.L., Zhang B., Horowitz-Scherer R., Persinger J., Woodcock C.L., Peterson C.L., Bartholomew B. Architecture of the SWI/SNF-nucleosome complex // *Mol. Cell. Biol.* 2008. Vol. 28. N 19. P. 6010–6021.
7. Feser J., D.T., Das C., Carson J.J., Kieft J., Harkness T., Tyler J.K. Elevated histone expression promotes life span extension // *Mol. Cell.* 2010. Vol. 39. N 5. P. 724–735.
8. Ljungman M., Hanawalt P. Efficient protection against oxidative DNA damage in chromatin // *Mol. Carcinog.* 1992. Vol. 5. N 4. P. 264–269.
9. Enright H.U., Miller W.J., Hebbel R.P. Nucleosomal histone protein protects DNA from iron mediated damage // *Nucleic. Acids Res.* 1992. Vol. 20. N 13. P. 3341–3346.
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. Knispel R.W., Kofler C., Boicu M., Nickel W.B.S. Blotting protein complexes from native gels to electron microscopy grids // *Nat. Methods*. 2012. Vol. 9. N 2. P. 182–184.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Frank J., Wagenknecht T., McEwen B.F., Marko M., Hsieh C.E., Mannella C.A. Three-dimensional imaging of biological complexity // 2002. *J. Struct. Biol.* Vol. 138. N 1–2. P. 85–91.
16. Henderson R. The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules // *Q. Rev. Biophys.* 1995. Vol. 28. N 2. P. 171–193.
17. Glaeser R.M. How good can cryo-EM become? // *Nat. Methods*. 2012. Vol. 13. N 1. P. 28–32.
18. Asturias F.J., Chung W.H., Kornberg R.D., Lorch Y. Structural analysis of the RSC chromatin remodeling complex // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. Vol. 99. N 21. P. 13477–13480.
19. 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.

Поступила в редакцию
01.11.2016

Принята в печать
05.12.2016

METHODS

PURIFICATION OF PROTEIN-DNA COMPLEXES BY NATIVE GEL ELECTROPHORESIS
FOR ELECTRON MICROSCOPY STUDYM.E. Valieva¹, N.I. Derkacheva², O.S. Sokolova^{1,*}¹ Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;² Department of Biochemistry, Evdokimov University of Medicine and Dentistry, Delegatskaya ul. 20–1, Moscow, 127473, Russia

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

Electrophoretic separation under native conditions may be used for purification of protein molecules and their complexes with DNA and other ligands. Here, we employed this approach to separate protein-DNA complexes with a molecular weight of about 200 kDa: mono- and dinucleosomes. The purified mononucleosomes were subjected to single particle electron microscopy study using negative stain contrasting, and the two-dimensional projections of the nucleosomes were obtained. A comparison of the nucleosome projections before and after separation in the native PAGE revealed different orientation of particles on the carbon film.

Keywords: mononucleosome, dinucleosome, electron microscopy, image processing, PAGE.

Сведения об авторах

Валиева Мария Евгеньевна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: durnopeyko-maria@rambler.ru

Деркачева Надежда Игоревна — канд. биол. наук, доц. кафедры биохимии МГМСУ им. А.И. Евдокимова. Тел.: 8-916-533-50-59; e-mail: nadya-derk@yandex.ru

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