

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.21

РОЛЬ БЕЛКА NHP6 В ТРАНСКРИПЦИИ НУКЛЕОСОМ *IN VITRO***Ф.К. Хсиех¹, А.Л. Козлова^{2,*}, Н.С. Герасимова²,
Е.Ю. Котова³, Т. Формоза⁴, В.М. Студитский^{2,3}**¹*Department of Molecular Biology, Harvard Medical School, 25 Shattuck St., Boston, MA 02114, USA;*²*кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*³*Cancer Epigenetics Program, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA;*⁴*University of Utah, School of Medicine, 30 N 1900 E, Salt Lake City, Utah, UT 84132, USA***e-mail: mika.lorens@yandex.ru*

Nhp6 – это небольшой белок дрожжей, неспецифично связывающий ДНК. Ранее было показано, что Nhp6 входит в состав нескольких комплексов (в том числе комплекса FACT), присутствует на многих дрожжевых промоторах и транскрибируемых участках генов *in vivo* и участвует в процессе дестабилизации структуры нуклеосом *in vitro*. В нашей лаборатории был изучен фактор FACT и показана его роль в транскрипции хроматина эукариотической РНК-полимеразой 2 *in vitro*, однако роль белка Nhp6 в транскрипции ранее не была исследована. В данной работе мы изучили влияние этого белка на транскрипцию нуклеосом эукариотической РНК-полимеразой 2 и показали, что он увеличивает эффективность транскрипции в нескольких положениях на нуклеосомной ДНК, в первую очередь – участка в положении +(11–17) в нуклеосоме. Предложена модель действия Nhp6, предполагающая стабилизацию транзитного отворачивания ДНК от октамера гистонов в процессе транскрипции хроматина.

Ключевые слова: *хроматин, нуклеосома, транскрипция, FACT, Nhp6, Spt16, Pob3*

Хроматин – это сложный нуклеопротеидный комплекс, структурной единицей которого на первом уровне упаковки является нуклеосома [1], состоящая из октамера белков-гистонов и нуклеосомной ДНК. Нуклеосомы участвуют в регуляции биологических процессов на ДНК.

Шаперон гистонов FACT (*facilitates chromatin transcription*) играет важную роль в поддержании и изменении структуры хроматина в ходе различных процессов с участием ДНК – репликации, репарации и транскрипции [2]. Наиболее исследованы комплексы FACT человека (*human FACT – hFACT*) и дрожжей (*yeast FACT – yFACT*).

yFACT – гетеротример, состоящий из белков Spt16 (*suppressor of TY16*), Pob3 (*poll binding protein 3*) и Nhp6 (*non histone protein 6*) [3] (рис. 1, А). В нашей лаборатории методом spFRET-микроскопии *in vitro* был подробно изучен механизм yFACT-зависимого разворачивания (реорганизации) нуклеосомной ДНК. Данное разворачивание проходит по механизму “все или ничего” – нуклеосомы при взаимодействии с комплексом находятся либо в полностью интактном состоянии, либо в реорганизованном [4]. Была доказана роль Nhp6 в отворачивании ДНК: присутствие в растворе только субъединиц Spt16 и Pob3 не вызывало реорганизацию нуклеосом [4].

Исследования на клетках дрожжей показали, что yFACT колокализуется с РНК-полимеразой 2 (РНКП2) [5] и необходим во время выполняемой

ей транскрипции для поддержания структуры хроматина [6, 7]. Скорее всего, FACT нужен для транскрибирования генов в районах с упорядоченной структурой хроматина [8]. Исследования *in vitro* показали, что hFACT облегчает движение РНК-полимеразы через нуклеосомы [9]. Возможно, FACT конкурирует с ДНК за связывание гистонов во время элонгации транскрипции. Таким образом, исследования *in vitro* и *in vivo* подтверждают, что FACT способствует более эффективному сохранению нуклеосом в процессе транскрипции.

В настоящей работе мы исследовали одну из субъединиц комплекса FACT – Nhp6. Это небольшой белок дрожжей с молекулярной массой 10,81 кДа (93 и 100 а.о. в разных формах), неспецифично связывающий ДНК [10]. Nhp6 связывается с небольшим участком ДНК и образует мультимолекулярные комплексы при взаимодействии с ДНК длиной 149 п.н *in vitro* [11]. Также было показано, что Nhp6 важен для ослабления ДНК-гистоновых взаимодействий в нуклеосомах [12].

Роль Nhp6 в транскрипции была продемонстрирована в работах по индукции генов, транскрибирующихся РНКП2, в мутантных по генам *nhrba* и *nhrbb* штаммах дрожжей; экспрессия исследуемых генов была подавлена [13]. Кроме этого, Nhp6 облегчает взаимодействие ТВР (TATA-box binding protein) с ДНК в присутствии ТФИИ (Transcription Factor IIА) [14]. Полногеномный анализ распределения Nhp6 по дрожжевому геному показал, что Nhp6 распо-

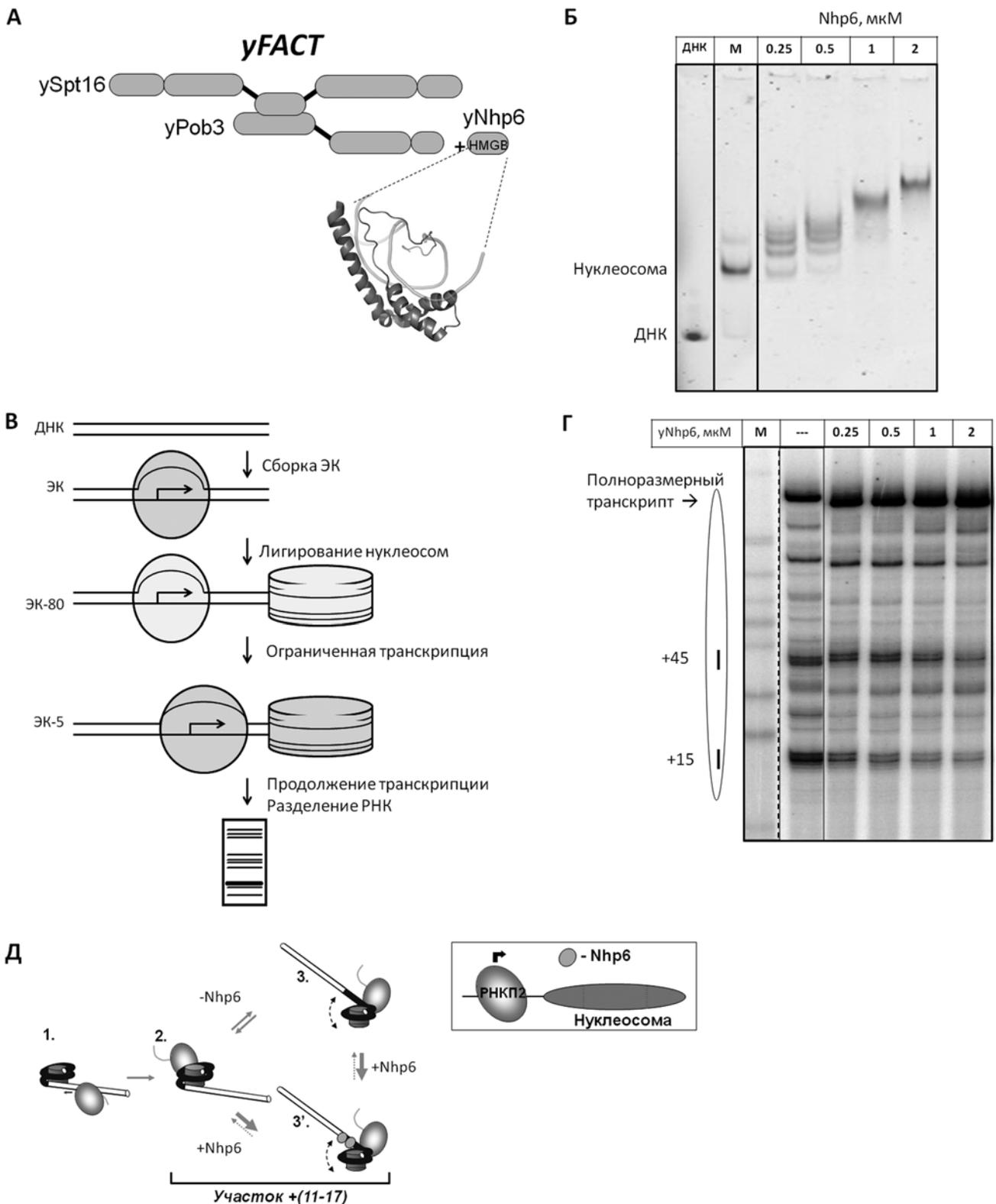


Рисунок. Белок Nhp6 облегчает транскрипцию нуклеосом РНКП 2. **А** – Субъединичная структура белкового комплекса yFACT. Показана доменная структура белков Spt16, Pob3 и HMGB-подобного ДНК-связывающего домена субъединицы Nhp6 в комплексе с ДНК (PDB ID – 1J5N). **Б** – Взаимодействие Nhp6 с нуклеосомами. Нуклеосомы инкубировали в присутствии указанных концентраций Nhp6 и анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в нативных условиях. Слева указаны значения электрофоретической подвижности нуклеосом и ДНК. **В** – Схема эксперимента: транскрипция нуклеосом эукариотической РНКП 2 (обозначена на рисунке овалом) в присутствии белка Nhp6 *in vitro*. **Г** – Транскрипция нуклеосом эукариотической РНКП 2 в присутствии белка Nhp6 *in vitro*. **Д** – Модель транскрипции в присутствии Nhp6. Показана модель, объясняющая облегчение транскрипции нуклеосом белком Nhp6: РНК-полимераза 2 открывает ДНК от октамера гистонов, Nhp6 связывает данный участок ДНК, затрудняя обратное связывание ДНК с октамером, и таким образом облегчает транскрипцию нуклеосом

ложен на транскрибируемых участках 104 генов, транскрибируемых РНКП2 [15], но его роль в транскрипции хроматина РНКП2 *in vitro* не была изучена.

Материалы и методы

Сборка нуклеосом. Получение позиционированных мононуклеосом проводили по протоколам, описанным ранее [16, 17].

Инкубация нуклеосом с белком Nhr6. К нуклеосомам, содержащим меченую ДНК (10–15 нМ), добавляли Nhr6 (от 0,25 до 2 мкМ в различных экспериментах) и инкубировали 10 мин при 30°C. Инкубация проводилась в транскрипционном буфере ТВ150 (20 мМ Трис-НСI (рН 7,9), 2 мМ MgCl₂, 150 мМ KCl, 1 мМ бета-меркаптоэтанол). Связывание белка Nhr6 анализировали с помощью электрофореза в 4%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) (акриламид:бисакриламид – 39:1), проводимом в нативных условиях при 4°C (электродный буфер 0,5xTBE).

Транскрипция *in vitro*. РНКП2 дрожжей и гистоны очищали по протоколам, описанным ранее [18, 19]. Элонгационный комплекс с дрожжевой РНКП2 собирали с использованием коротких синтетических ДНК- и РНК-фрагментов и лигировали с нуклеосомами. Транскрипцию проводили с дополнительным мечением изотопом α -³²P РНК-транскриптов до (–5)-нуклеотида относительно входа в нуклеосому, затем элонгация начиналась при добавлении в раствор недостающих нуклеотидов и избытка ГТФ, не содержащего метки, в буфере, содержащем 150 мМ KCl, при указанных концентрациях Nhr6. Исследуемый диапазон концентраций Nhr6 составлял 0,25–2 мкМ. После прохождения транскрипции РНК анализировали гель-электрофорезом в денатурирующих условиях. В качестве маркера использовали плазмиду рBR332, обработанную эндонуклеазой рестрикции MspI [9].

Результаты и обсуждение

Одна молекула Nhr6 (рис. 1, А) связывается с участком ДНК длиной около 10–15 п.н. [10]; таким образом, с длинными фрагментами ДНК белок может образовывать мультимолекулярные комплексы. Ранее это было подтверждено в экспериментах, проведенных на последовательностях ДНК, обладающих низкой аффинностью к гистоновому октамеру [11]; необходимо было доказать образование мультимолекулярных комплексов с Nhr6 высокоаффинной ДНК, используемой в наших экспериментах. Были изучены комплексы, образуемые Nhr6 с нуклеосомной ДНК (рис. 1, Б). ДНК-фрагмент для этого эксперимента состоял из нуклеосомопозиционирующей последовательности (НПП) и дополнительного промотора – такая матрица моделировала ДНК, используемую в последующих транскрипционных опытах; таким образом, в этом эксперименте изучалось связывание белка Nhr6

как с участками, связанными с гистонами (НПП), так и со свободными участками ДНК (промоторная область). Нуклеосомы инкубировали в присутствии повышающихся количеств (от 0,25 до 2 мкМ) белка Nhr6. Образование ДНК-белковых комплексов фиксировали по изменению электрофоретической подвижности в нативном ПААГ нуклеосом, содержащих флуоресцентно-меченную ДНК.

При взаимодействии Nhr6 с нуклеосомной ДНК наблюдается формирование мультимолекулярных комплексов, отличающихся по электрофоретической подвижности в ПААГ в нативных условиях, как было описано ранее для нуклеосом, ДНК которых не содержала НПП [11]. При постепенном повышении концентрации белка от 0,25 до 2 мкМ было выявлено последовательное образование нескольких мультимолекулярных комплексов (рис. 1, Б). Каждый такой комплекс состоит из одной нуклеосомы и одной или нескольких молекул Nhr6. Сравнение эффективности связывания Nhr6 с нуклеосомами, ДНК которых содержит НПП (рис. 1, Б), с опубликованными ранее данными [11] показало, что наличие НПП не оказывает существенного влияния на связывание Nhr6 с нуклеосомами. Таким образом, наша экспериментальная система может быть использована для анализа роли Nhr6 в транскрипции нуклеосом.

Для изучения влияния Nhr6 на процесс элонгации с помощью эукариотической РНКП2 в хроматине проводили анализ РНК-продуктов, полученных в ходе транскрипции мононуклеосомных матриц РНКП2 в присутствии повышающихся концентраций белка Nhr6 *in vitro* (рис. 1, В).

По результатам транскрипции *in vitro* удалось установить, что уже при низкой концентрации Nhr6 (0,25 мкМ) наблюдается уменьшение “паузирования” РНКП2 (временных остановок РНКП2 на ДНК-матрице) при элонгации участка +15 нуклеосомной ДНК. При более высоких концентрациях Nhr6 (1 и 2 мкМ) наблюдается также увеличение эффективности транскрипции участка +45 (рис. 1, Г).

На основе полученных данных нами была предложена возможная модель роли Nhr6 в элонгации (рис. 1, Д). Данный белок, связываясь с нуклеосомной ДНК, может изменять ее структуру: вызывать сильные изгибы в месте связывания и отгибать ДНК от октамера гистонов. Эти эффекты приводят к облегчению транскрипции в первую очередь при входе в нуклеосому (положение +15, рис. 1, Г, Д), а также при больших концентрациях могут влиять на “паузирование” РНКП2 в ходе элонгации через участок +45. В клетках дрожжей субъединица Nhr6 присутствует в избытке по отношению к остальным субъединицам фактора FACS [10]. Поэтому полученные нами данные позволяют предположить, что субъединица Nhr6 дрожжевого комплекса FACS может участвовать в транскрипции хроматина в клетках дрожжей как в составе комп-

лекса FACT, так, возможно, и как отдельная субъединица, облегчающая транскрипцию хроматина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kornberg R.D., Tomas J.O. Chromatin Structure: Oligomers of the Histones // *Science*. 1973. Vol. 184. N 4139. P. 865–868.
2. Bondarenko M.T., Maluchenko N.V., Valieva M.E., Gerasimova N.S., Kulaeva O.I., Georgiev P.G., Studitsky V.M. Structure and function of histone chaperone FACT // *Mol. Biol.* 2015. Vol. 49. N 6. P. 796–809.
3. Formosa T., Eriksson P., Wittmeyer J., Ginn J., Yu Y., Stillman D.J. Spt16-Pob3 and the HMG protein Nhp6 combine to form the nucleosome-binding factor SPN // *EMBO J.* 2001. Vol. 20. N 13. P. 3506–3517.
4. Valieva M.E., Armeev G.A., Kudryashova K.S., Gerasimova N.S., Shaytan A.K., Kulaeva O.I., McCullough L.L., Formosa T., Georgiev P.G., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Large-scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. Vol. 23. N 12. P.1111–1116.
5. Saunders A., Werner J., Andrulis E.D., Nakayama T., Hirose S., Reinberg D., Lis J.T. Tracking FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin *in vivo* // *Science*. 2003. Vol. 301. N 5636. P. 1094–1096.
6. Mason P.B., Struhl K. The FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation *in vivo* // *Mol. Cell. Biol.* 2003. Vol. 23. N 22. P. 8323–8333.
7. Cheung V., Chua G., Batada N.N., Landry C.R., Michnick S.W., Hughes T.R., Winston F. Chromatin- and transcription-related factors repress transcription from within coding regions throughout the *Saccharomyces cerevisiae* genome // *PLoS Biol.* 2008. Vol. 6. N 11. P. 277–281.
8. Reinberg D., Sims R.J. De FACTo nucleosome dynamics // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. N 33. P. 23297–23301.
9. Hsieh F.K., Kulaeva O.I., Patel S.S., Dyer P.N., Luger K., Reinberg D., Studitsky V.M. Histone chaperone FACT action during transcription through chromatin by RNA polymerase II // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. Vol. 110. N 19. P. 7654–7659.
10. Stillman D.J. Nhp6: A small but powerful effector of chromatin structure in *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. Vol. 1799. N 1–2. P. 175–180.
11. Ruone S., Rhoades A.R., Formosa T. Multiple Nhp6 molecules are required to recruit Spt16-Pob3 to form yFACT complexes and to reorganize nucleosomes // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. N 46. P. 45288–45295.
12. Xin H., Takahata S., Blanksma M., McCullough L., Stillman D.J., Formosa T. yFACT induces global accessibility of nucleosomal DNA without H2A-H2B displacement // *Mol. Cell.* 2009. Vol. 35. N 3. P. 365–376.
13. Yu Y., Eriksson P., Stillman D.J. Architectural transcription factors and the SAGA complex function in parallel pathways to activate transcription // *Mol. Cell. Biol.* 2000. Vol. 20. N 7. P. 2350–2357.
14. Biswas D., Imbalzano A.N., Eriksson P., Yu Y., Stillman D.J. Role for Nhp6, Gcn5, and the Swi/Snf complex in stimulating formation of the TATA-binding protein-TFIIA-DNA complex // *Mol. Cell Biol.* 2004. Vol. 24. N 18. P. 8312–8321.
15. Dowell N.L., Sperling A.S., Mason M.J., Johnson R.C. Chromatin-dependent binding of the *S. cerevisiae* HMGB protein Nhp6A affects nucleosome dynamics and transcription // *Genes. Dev.* 2010. Vol. 24. N 18. P. 2031–2042.
16. 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.
17. 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.
18. Kireeva M.L., Walter W., Tchernajenko V., Bondarenko V.A., Kashlev V., 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.
19. Dyer P.N., Edayathumangalam R.S., White C.L., Bao Y., Chakravarthy S., Muthurajan U.M., Luger K. Reconstitution of nucleosome core particles from recombinant histones and DNA // *Methods Enzymol.* 2004. Vol. 375. P. 23–44.

Поступила в редакцию
06.07.2017 г.

Принята к печати
09.09.2017 г.

MOLECULAR BIOLOGY

ROLE OF NHP6 PROTEIN IN TRANSCRIPTION THROUGH A NUCLEOSOME *IN VITRO*

F.K. Hsieh¹, A.L. Kozlova^{2,*}, N.S. Gerasimova², E. Kotova³, T. Formosa⁴, V.M. Studitsky^{2,3}

¹Department of Molecular Biology, Harvard Medical School, 25 Shattuck St., Boston, MA 02114, USA;

²Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskiye Gory, Moscow, 119234, Russia;

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

⁴University of Utah, School of Medicine, 30 N 1900 E, Salt Lake City, Utah, UT 84132, USA

*e-mail: mika.lorens@yandex.ru

Nhp6 is a small yeast protein, which binds DNA nonspecifically. It was shown that Nhp6 is a part of several protein complexes (including FACT complex) and is presented on many yeast promoters and transcribed regions of genes *in vivo*. It also participates in the process of destabilizing the structure of nucleosomes *in vitro*. In our laboratory, we studied FACT complex

and showed its role in the transcription of eukaryotic RNA-polymerase 2 *in vitro*, but the role of the Nhp6 protein in transcription has not been studied previously. In this paper, we describe the effect of Nhp6 protein on transcription through a nucleosome by eukaryotic RNA-polymerase 2 and show that Nhp6 protein increases the transcription efficiency at several positions on the nucleosomal DNA, primarily the transcription at the positions +(11–17) in the nucleosome. We proposed a model of the action of Nhp6 during transcription through chromatin, suggesting the stabilization of DNA transiently uncoiled from the octamer during this process.

Keywords: *chromatin, nucleosome, transcription, FACT, Nhp6, Spt16, Pob3*

Сведения об авторах

Хсиех Фу Кай – PhD, науч. сотр. Медицинского факультета Гарвардского университета. Тел.: +1-617-432-1000; e-mail: hsieh@molbio.mgh.harvard.edu

Козлова Анастасия Львовна – студентка кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: mika.lorens@yandex.ru

Герасимова Надежда Сергеевна – канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: shordome@gmail.com

Котова Елена Юрьевна – науч. сотр. кафедры эпигенетики рака Онкологического центра Фокс Чейз. Тел.: +1-215-728-7014, e-mail: elena.kotova@fccc.edu

Формоза Тим – PhD, проф. кафедры биохимии медицинского факультета университета Юты. Тел: +1-801-581-7201; e-mail: tim@biochem.utah.edu

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