

МЕТОДЫ

УДК 577.214.32

ОЧИСТКА ЭЛОНГАЦИОННЫХ КОМПЛЕКСОВ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕТОДОМ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

О.В. Чертков, М.Г. Карлова, Н.С. Герасимова, О.С. Соколова*

Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

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

Разработана методика подготовки образца остановленного элонгационного комплекса РНК-полимеразы *Escherichia coli* с нуклеосомой для исследования с помощью криоэлектронной микроскопии. Разработана методика очистки комплекса от избытка свободной РНК-полимеразы и непродуктивных комплексов на гепариновой смоле. Для концентрирования элонгационного комплекса был применен аффинный монослой, сформированный липидами, связанными с ионами Ni. Применение подготовленных аффинных сеток с иммобилизованным монослоем липидов позволило предотвратить агрегацию частиц комплекса на поверхности сетки. Разработанная методика может применяться для получения трехмерной реконструкции элонгационного комплекса ЕС+39.

Ключевые слова: РНК-полимераза, нуклеосома, элонгационный комплекс, аффинная сетка, очистка белка, электронная микроскопия

В хроматине нуклеиновые кислоты и белки компактно упакованы, и, в то же время, его структура позволяет ДНК- и РНК-полимеразам эффективно продвигаться вдоль цепи ДНК. Поддержание нуклеосомной организации при прохождении РНК-полимеразы необходимо для правильной регуляции генов и выживаемости клеток. Восстановление структуры хроматина происходит двумя разными способами. Во время интенсивной транскрипции наблюдается обмен всех основных гистонов, тогда как при умеренной транскрипции происходит обмен димеров H2A-H2B, но не тетрамеров H3-H4 [1, 2].

Прохождение РНК-полимеразы через хроматин характеризуется высоким нуклеосомным барьером транскрипции. После начального отворачивания нуклеосомной ДНК от октамера гистонов [3] и формирования ряда внутринуклеосомных петель ДНК [4] при транскрипции в области +45 РНК-полимераза может индуцировать формирование внутринуклеосомной петли малого размера [5]. Этот комплекс был назван петлей “нулевого размера” (или Ø-петлей), поскольку в нем ДНК-гистоновые взаимодействия сохраняются как в ДНК, находящейся перед РНК-полимеразой, так и в ее области, уже пройденной транскрибирующим ферментом. Результатом образования Ø-петли может быть частичное отворачивание ДНК от поверхности октамера и потеря димера H2A-H2B [5]. Формирование Ø-петли необходимо для прохождения транскрипции без диссоциации коровых гистонов H3-H4 от ДНК и, возможно, играет роль в сохранении гистоновой коды в процессе транскрипции. Для того, чтобы оценить возможность образования Ø-петли, было проведено моделиро-

вание комплекса методами докинга. Этот анализ показал, что Ø-петля может быть сформирована только при нахождении РНК-полимеразы в позициях +39 или +49 в нуклеосоме [5].

Общая схема строения ДНК-зависимых РНК-полимераз идентична для прокариот и эукариот. Холофермент РНК-полимеразы *Escherichia coli* состоит из “корового” фермента и сигма-фактора. “Коровый” фермент включает 5 субъединиц (β -, β' -, 2 α -, ω -). Он обладает каталитической активностью, но не способен распознавать точку начала транскрипции; для этого требуется сигма-фактор [6]. Архитектура всех известных к настоящему моменту структур ДНК-зависимых РНК-полимераз оказалась консервативной: область активного центра внешне напоминает клешню и характеризуется присутствием иона магния и консервативными мотивами.

Нуклеосома представляет собой октамер гистонов (центральный гетеротетрамер (H3-H4)₂ и два гетеродимера H2A-H2B), связывающий двухцепочечную ДНК размером 147 п.о. Структура нуклеосомы была определена при помощи рентгеноструктурного анализа [7].

В данной работе нами был разработан метод двухстадийной очистки и концентрирования элонгационного комплекса РНК-полимеразы *E. coli* с моноклеосомой, остановленного в положении +39 от входа в нуклеосому (ЕС+39). Данная очистка позволяет получить чистый препарат элонгационного комплекса, подходящий для изучения как методом электронной микроскопии с негативным окрашиванием, так и методом криоэлектронной микроскопии.

Материалы и методы

Сборка ДНК матрицы. Используемая в работе ДНК-матрица состоит из двух частей: нуклеосом-позиционирующая последовательность s603 и прокариотический промотор T7A1. Последовательность нуклеотидов ДНК была модифицирована таким образом, чтобы образовался участок, не содержащий основания Т от старта транскрипции до положения +39. Такая последовательность нуклеотидов позволяла получить элонгационный комплекс с РНК-полимеразой, остановленной в положении +39 пар нуклеотидов от входа в нуклеосомную ДНК в ходе транскрипции в присутствии ограниченного набора рибонуклеотидов.

Фрагменты ДНК для работы получали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для фрагмента T7A1 использовались праймеры: 282Forwhst 5'-CCGGGATCCAGATCCCGAAAATTTA 134rev40mod 5'-TGGCGCGCGTTCTGGGCCCTGTGCCGGTGTCTGCTTG

Для фрагмента s603 использовались праймеры: For40T CGCGCGCCCAACCGAGAGAAGAC GACACATGGGCTTCTAAG

282Revwhst 5'-CGTCGGATCCGTACCCAGGGACTT

Для очистки полученной ДНК использовали набор QIAquick PCR Purification Kit фирмы Qiagen (США).

В ходе перекрестного отжига с последующим удлинением цепей был получен полноразмерный фрагмент, включающий промотор и нуклеосом-позиционирующую последовательность, который был клонирован в плазмиде pDS1 в клетках *E. coli*. Фрагменты ДНК для работы получали методом ПЦР с использованием описанной плазмиды в качестве матрицы и олигонуклеотидов 282Forwhst и 282Revwhst.

Сборка нуклеосом. В качестве источника коровьих гистонов для сборки нуклеосом на ДНК-матрице, использовали хроматин без гистона H1, который выделяли из эритроцитов цыплят. Нуклеосомы собирали на ДНК-матрице в ходе диализа против NaCl в уменьшающихся концентрациях по протоколу, описанному нами ранее [8].

Сборка элонгационного комплекса ЕС+39. Для получения элонгационного комплекса в положении +39 от начала нуклеосомы использовали РНК-полимеразу *E. coli*, экспрессированную и очищенную, как было описано нами ранее [9]. Реакцию транскрипции проводили по методике, опубликованной в работе Гайкаловой с соавт. [10], с некоторыми изменениями и дополнительной стадией очистки. Для получения открытого комплекса брали 100 нг ДНК матрицы, ассоциированной с нуклеосомой, и добавляли холофермент РНК-полимеразу *E. coli* в пятикратном молярном избытке, затем инкубировали полученную смесь при 37°C в течение 10 мин. Реакция проводилась в буфере ТБ40 (10 mM Tris-HCl pH 7,9, 1 mM β-меркаптоэтанол, KCl – 40 mM) в объеме 10 мкл.

Элонгационный комплекс ЕС-39 (комплекс, остановленный в положении –39 относительно начала нуклеосомы со стороны промотора) получали путем добавления РНК-праймера ApUpC (20 мкМ), а также АТФ (20 мкМ) и ГТФ (20 мкМ) с последующим инкубированием при 37°C в течение 10 мин. Для получения комплекса ЕС+39 к раствору, содержащему ЕС–39, добавляли KCl до концентрации 150 mM и ЦТФ (5 mM), а затем инкубировали полученную смесь 10 мин при комнатной температуре.

Очистка открытого комплекса на гепариновой колонке. Для очистки использовали смолу Heparin-HyperD (Pall, США) для аффинной хроматографии. К полученному открытому комплексу добавляли 1 мкл смолы, инкубировали 15 с при комнатной температуре и осаждали центрифугированием в течение 10 с при 8000 об./мин. 100 мкл смолы предварительно были проинкубированы с БСА (бычий сывороточный альбумин; 10 мг/мл) в течение 10 мин при комнатной температуре. Для отмывки от остатков БСА к 100 мкл смолы добавляли 1 мл буфера ТБ40, осаждали центрифугированием, супернатант декантировали, процедуру повторяли 5 раз.

Приготовление аффинных сеток. При получении аффинных сеток [11] 1 мкл смеси липидов 80% POPC (1-пальмитоил-2-олеоил-фосфатидилхолин; Avanti, США), 20% DGS-NTA(Ni) (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-[(N-(5-амино-1-карбоксивентил) иминодиацетат) сукцинил], соль никеля; Avanti, США) наслаивали на каплю буфера (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH = 7,9). Тефлоновый контейнер, содержащий капли (25 мкл) буфера с липидами, инкубировали 15 мин во влажной камере при +4°C для формирования липидного монослоя. Далее монослой переносили на поверхность медных сеток для микроскопии, покрытых слоем аморфного углерода, усиленного слоем формвара (SPI, США), удаляли избыток жидкости и подсушивали. Сетки хранили в пластиковом контейнере при комнатной температуре до использования.

Электронная микроскопия. Для приготовления препарата аффинную сетку помещали на каплю раствора, содержащего комплекс ЕС+39, инкубировали 60 мин при +4°C во влажной камере. Затем сетку аккуратно снимали пинцетом с капли, излишки раствора удаляли с сетки фильтровальной бумагой. Препарат сразу же окрашивали 1%-ным раствором ацетата уранила два раза по 30 с.

Исследование образцов производили в просвечивающем электронном микроскопе JEOL 2100 (JEOL, Япония). 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 ×40000 с помощью ПЗС-камеры с размером матрицы 2000×2000 пикселей (Gatan, США). Размер пикселя на микрофотографиях составил 3,3 Å.

Криоэлектронная микроскопия. Сетки, приготовленные, как указано выше, снимали с капли раствора, помещали в прибор для замораживания образцов Vitrobot MarkIII (FEI, США) и замораживали в жидком этане при следующих параметрах: время промокания 4 с, температура климатической камеры +12°C, влажность 95%. Сетки хранили в жидком азоте до использования. Для изучения сетки переносили при температуре жидкого азота в криоэлектронный просвечивающий микроскоп Tecnai F20 (FEI, США), оснащенный источником полевой эмиссии электронов и работающий при ускоряющем напряжении 200 кВ. Изображения получали с увеличением $\times 50000$ с помощью ПЗС-камеры с размером матрицы 4000 $\times$ 4000 пикселей (Gatan, США). Размер пикселя на микрофотографиях составил 2,22 Å.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что РНК-полимераза *E. coli* воспроизводит основные особенности транскрипции хроматина РНК-полимеразой II [12]. В данной работе мы использовали конструкцию, состоящую из РНК-полимеразы *E. coli* и мононуклеосомы с промотором, расположенном на выступающем (не связанном с гистонами) участке ДНК. В качестве матрицы использовали нуклеосом-позиционирующую последовательность s603 длиной 147 п.о., содержащую участок без основания А в области 1–39 со стороны промотора, с присоединенным к ней промотором T7A1 длиной 135 п.н.

После предварительного анализа образцов оказалось, что в процессе транскрипции *in vitro* в растворе вместе с целевыми элонгационными

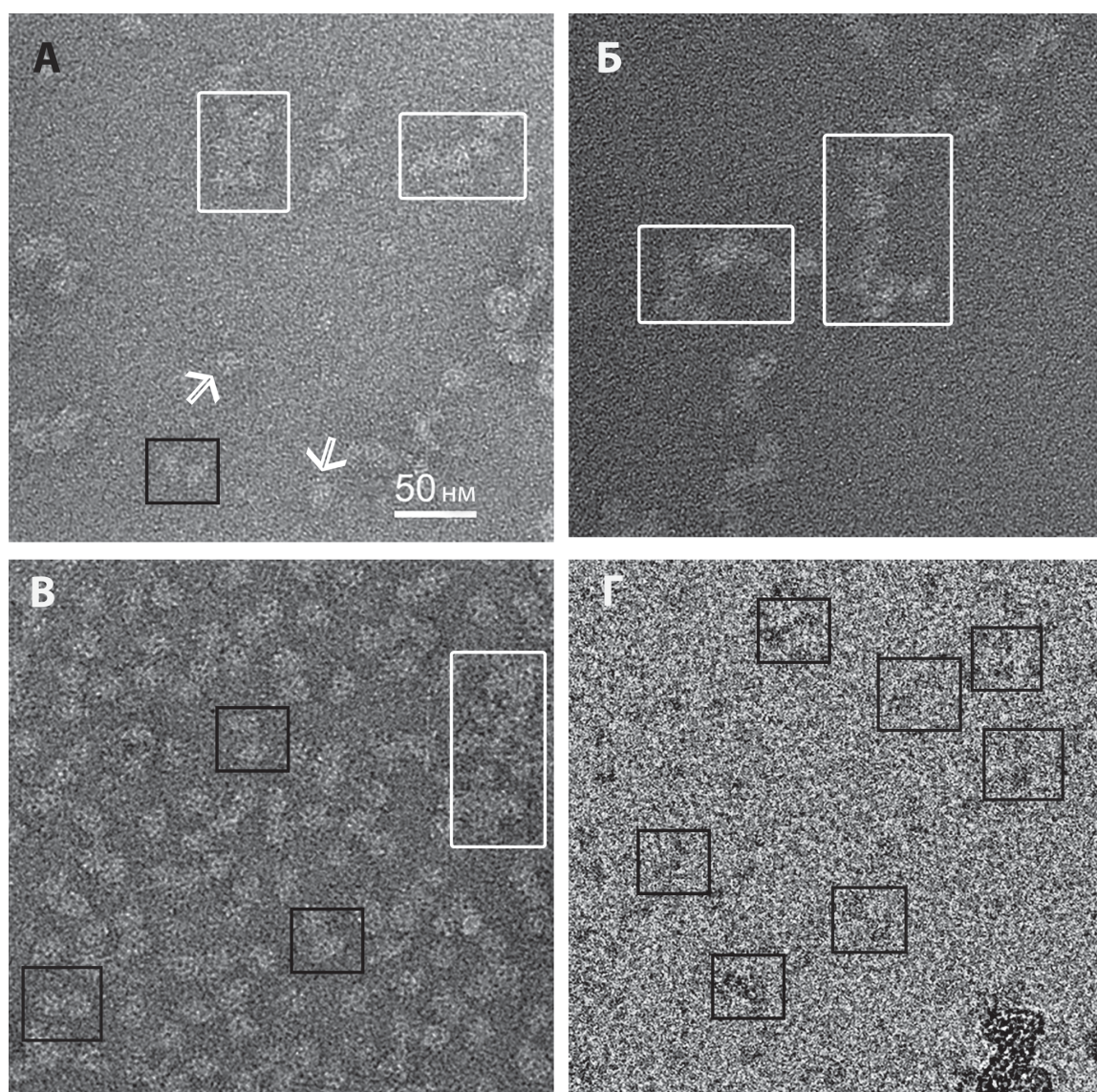


Рисунок. Электронно-микроскопическое исследование препаратов комплекса ЕС+39. А – Препарат, приготовленный на аффинном монослое липидов; Б – препарат после очистки на гепариновой смоле, на аффинном монослое липидов; В – препарат после очистки на гепариновой смоле, приготовленный на аффинной сетке для электронной микроскопии. Окраска – 1% ацетат уранила. Г – Криоэлектронное изображение препарата, приготовленного на аффинной сетке. Белые стрелки показывают расположение отдельных частиц РНК-полимеразы. Черными квадратами отмечены комплексы ЕС+39, белыми прямоугольниками – агрегаты белка. Масштабный отрезок – 50 нм

комплексами образуются также и непродуктивные комплексы; кроме того, остается большое количество свободной РНК-полимеразы. Для получения гомогенного препарата остановленных комплексов ЕС+39 мы использовали дополнительную стадию очистки (см. методы). Для этого использовали смолу HeparinHyperD. Гепариновая смола связывает свободную РНК-полимеразу и непродуктивные комплексы, тогда как остановленные целевые комплексы остаются в растворе.

Далее препарат комплексов РНК-полимеразы был сконцентрирован на аффинном монослое липидов (рис. 1А). Этот метод был применен нами ранее для очистки РНК-полимеразы от глицерина [9]. Метод заключается в насаивании смеси липидов (фосфатидилхолина и DGS-NTA(Ni) в различных соотношениях) на раствор, содержащий комплексы РНК-полимеразы. Липиды формируют монослой, обращенный группами с ионами Ni к поверхности раствора, в котором находится РНК-полимераза, несущая на N-конце аффинный таг. Специфическое связывание осуществляется за счет наличия на поверхности белка свободных электронодонорных групп.

Было обнаружено, что при концентрировании очищенного на гепарине комплекса ЕС+39 на аффинном монослое в условиях, аналогичных описанным нами ранее [9], происходит агрегация комплексов с образованием длинных цепочек (рис. 1Б). В этих агрегатах отдельные комплексы расположены настолько близко, что невозможно определить их границы и отобрать изображения индивидуальных частиц для последующего анализа изображений. Мы предположили, что агрегация комплекса может происходить из-за локального повышения концентрации частиц, фиксированных на монослое, но способных перемещаться в его плоскости из-за свободной диффузии липидов на поверхности воды.

Для проверки этой гипотезы мы приготовили аффинные сетки, покрытые углеродной подлож-

кой с адгезированным монослоем липидов, содержащих DGS-NTA(Ni). Зафиксированные на углеродной подложке липиды существенно менее склонны к латеральной диффузии [11]. Действительно, при использовании для концентрирования комплекса ЕС+39 аффинных сеток вместо аффинного монослоя в препаратах наблюдается меньшее количество агрегатов. При этом концентрация комплексов на сетке значительно увеличивается (рис. 1В).

Высокая концентрация образцов позволила нам изучить очищенные комплексы в криоэлектронном микроскопе. Для этого мы приготовили аналогичным образом сетки Quantifoil (1.2/1.3) (Quantifoil Micro Tools, Германия) и исследовали их в криоэлектронном микроскопе Tecnai F20 (FEI, США) при ускоряющем напряжении 200 кВ. В результате были получены изображения комплексов ЕС+39, замороженных в витрифицированном льду (рис. 1Г).

Таким образом, мы показали, что применение гепариновой смолы HeparinHyperD позволяет очистить препарат элонгационных комплексов от избытка свободной РНК-полимеразы и непродуктивных комплексов. Применение аффинных монослоев, сформированных липидами, связанными с ионами Ni, позволяет сконцентрировать образцы комплекса РНК-полимеразы с нуклеосомой, а также предотвратить их агрегацию. Использование подобных аффинных сеток в дальнейшем планируется для получения трехмерной реконструкции элонгационного комплекса ЕС+39.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00031). Электронная микроскопия проводилась с использованием аналитического электронного микроскопа JEOL2100 (JEOL, Япония) в составе уникальной научной установки “Трёхмерная электронная микроскопия и спектроскопия” биологического факультета МГУ и криоэлектронного микроскопа Tecnai F20 (FEI), расположенного в центре коллективного пользования университета Брандаиз (США).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dion M.F., Kaplan T., Kim M., Buratowski S., Friedman N., Rando O.J. Dynamics of replication-independent histone turnover in budding yeast // *Science*. 2007. Vol. 315. N 5817. P. 1405–1408.
2. 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.
3. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Volokh O., Shaytan A.K., Hsieh F.K., Kirpichnikov M.P., Sokolova O.S., Studitsky V.M. Structural analysis of nucleosomal barrier to transcription // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015. Vol. 112. N. 43. P. 5787–5795.
4. 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.
5. 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.

6. Murakami K.S., Darst S.A. Bacterial RNA polymerases: the whole story // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2003. Vol. 13. P. 31–39.

7. Luger K., Mader 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.

8. Kudryashova K.S., Nikitin D.V., Chertkov O.V., Gerasimova N.S., Valieva M.E., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Development of fluorescently labeled mononucleosomes for the investigation of transcription mechanisms by single complex microscopy // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 4. P. 189–193.

9. Karlova M.G., Volokh O.I., Chertkov O.V., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Sokolova O.S. Purification and concentration of RNA polymerase on Ni-lipid monolayers // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. Vol. 43. N 6. P. 637–643.

10. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Methods in Molecular Biology*. Vol. 523. Chromatin Protocols / S.P. Chellappan. Humana Press, 2009. P. 109–123.

11. Kelly D.F., Abeyrathne P.D., Dukovski D., Walz T. The Affinity Grid: a pre-fabricated EM grid for monolayer purification // *J. Mol. Biol.* 2008. Vol. 382. N 2. P. 423–433.

12. 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.

Поступила в редакцию
16.05.2018 г.

Принята к печати
18.06.2018 г.

METHODS

PURIFICATION OF RNA-POLYMERASE ELONGATION COMPLEXES FOR CRYO-ELECTRON MICROSCOPY INVESTIGATION

O.V. Chertkov, M.G. Karlova, N.S. Gerasimova, O.S. Sokolova*

*Department of Bioengineering, School of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;
e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

A procedure was developed for purification and preparation of a transcriptional stalled complex of *Escherichia coli* RNA polymerase for investigation by cryo-electron microscopy. The elongation complex has been concentrated on an affine monolayer formed by lipids bound to Ni ions. Additionally, the excess free RNA polymerase and unproductive complexes were removed on a heparin resin. The use of affinity grids with an immobilized monolayer of lipids helps to prevent aggregation of the particles on the grid surface. This technique can be used in the future to obtain a three-dimensional reconstruction of the EC+39 elongation complex.

Keywords: *RNA polymerase, nucleosome, elongation complex, affinity grid, protein purification, electron microscopy*

Сведения об авторах

Чертков Олег Валериевич — канд. биол. наук, вед. инж. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: o_chertkov@mail.ru

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

Герасимова Надежда Сергеевна — канд. биол. наук, асс. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: shordome@gmail.com

Соколова Ольга Сергеевна — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru