

На правах рукописи

Герасимова Надежда Сергеевна

**ХРОМАТИН-СПЕЦИФИЧНАЯ ОСТАНОВКА РНК-ПОЛИМЕРАЗ
НА ПОВРЕЖДЕНИЯХ ДНК**

03.01.03 – Молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2016

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор биологических наук

Студитский Василий Михайлович

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Кульбачинский Андрей Владимирович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук, лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов, заведующий.

Карпов Дмитрий Сергеевич, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, лаборатория регуляции внутриклеточного протеолиза, научный сотрудник.

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

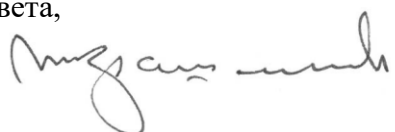
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук.

Защита диссертации состоится _____ 2016 г. в ____ часов на заседании Совета Д 501.001.76 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр. 12, биологический факультет, ауд. 389.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, 27, отдел диссертаций) и на сайте www.bio.msu.ru.

Автореферат разослан _____ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



И.А. Крашенинников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы:

Геном клетки постоянно подвергается разрушающему воздействию окружающей среды. Раннее выявление и восстановление повреждений ДНК имеет большое значение для функционирования и выживания клеток.

Одними из самых частых повреждений ДНК оказываются однонитевые разрывы. В клетках млекопитающих такие нарушения распознаются белком поли(АДФ-рибоза)-полимеразой 1 (poly (ADP-ribose) polymerase 1, PARP1), и удаляются системой эксцизионной репарации оснований (base excision repair, BER). В ядрах эукариотических клеток ДНК упакована в хроматин – сложную надмолекулярную структуру, формирующуюся с участием большого числа белков-гистонов, мономером которой является нуклеосома. Многие исследования показали, что организованная в нуклеосомы ДНК менее доступна для белков репарации, поэтому можно предположить, что часть включенных в хроматин разрывов будут скрыты от сенсорного белка PARP1.

Разрывы матричной цепи ДНК блокируют транскрипцию РНК-полимеразой II (РНКП II) *in vivo* и *in vitro*. Так как остановка РНКП II служит сигналом для начала процесса эксцизионной репарации нуклеотидов, ассоциированной с транскрипцией (TC-NER), то часть скрытых в хроматиновой структуре разрывов может быть репарирована по такому пути. Тем не менее, разрывы, локализованные в нематричной цепи ДНК, не влияют существенно на транскрипцию свободной от гистонов ДНК *in vitro*, хотя они эффективно устраняются *in vivo*.

При умеренном уровне транскрипции РНКП II элонгация через хроматин происходит по сложному механизму с сохранением гистонов на ДНК. Таким образом, можно предположить, что нуклеосомная структура способна повлиять на процесс элонгации через ДНК с повреждениями. Эта возможность ранее была оценена соавтором Н.А. Пестовым с помощью мононуклеосомных ДНК, содержащих случайные однонитевые разрывы ДНК в нематричной цепи. Оказалось, что такие разрывы заметно влияют на скорость транскрипции через нуклеосомы, но не

свободной от гистонов ДНК. Особенности такого влияния и его механизм стали предметом настоящего исследования.

Цель исследования:

Определить особенности и механизм действия разрывов нематричной цепи на эффективность транскрипции нуклеосомной ДНК по РНКП II – зависимому механизму.

Задачи исследования:

Спроектировать и получить точно позиционированные нуклеосомы для транскрипции, содержащие одиночные однонитевые разрывы нематричной цепи ДНК в различных положениях на нуклеосом-позиционирующей последовательности. Провести эксперименты по транскрипции полученных матриц модельной РНК-полимеразой *Escherichia coli* в различных экспериментальных условиях. По распределению остановок модельной РНК-полимеразы сделать выводы об особенностях и предполагаемому механизму влияния разрывов нематричной цепи на транскрипцию нуклеосомной ДНК.

Положения и результаты, выносимые на защиту:

1. Одиночные разрывы нематричной цепи ДНК могут вызывать высокоэффективную, нуклеосом-специфичную остановку РНК-полимеразы *E. coli* при транскрипции.
2. Остановка РНК-полимеразы *E. coli* при транскрипции нуклеосом в присутствии одиночного разрыва нематричной цепи ДНК происходит после того, как активный центр фермента миновал положение разрыва и находится на расстоянии 7-12 п.н. от него.
3. Позиции остановок РНК-полимеразы *E. coli* при транскрипции нуклеосом в присутствии одиночных разрывов нематричной цепи ДНК дискретны и имеют 10-п.н. периодичность.
4. Определены три позиции остановок РНКП *E. coli* (+24, +34, +44 п.н. относительно ближайшей к промотору границы нуклеосомы).

5. Эффективность остановки РНК-полимеразы *E. coli* зависит от положения разрыва нематричной цепи в нуклеосоме.
6. Характер остановки РНК-полимеразы при транскрипции нуклеосом в присутствии одиночных разрывов нематричной цепи ДНК позволяет предположить, что остановка вызвана формированием небольших внутринуклеосомных петель ДНК.
7. Полученные данные позволяют предположить, что формирование небольшой внутринуклеосомной петли ДНК приводит к накоплению напряжений в двойной спирали при вращении РНК-полимеразы, облегчающих транскрипцию нуклеосом.
8. Полученные данные позволяют предположить, что разрывы нематричной цепи ДНК вызывают релаксацию напряжений двойной спирали, накопленных при прохождении РНК-полимеразы и облегчающих транскрипцию нуклеосом.

Научная новизна работы:

В работе впервые показано, что разрывы нематричной цепи ДНК, в зависимости от их расположения в нуклеосомной структуре, могут вызывать почти полную остановку РНК-полимеразы. Обнаруженный эффект является хроматин-специфичным и не наблюдается на свободной от гистонов ДНК. Известно, что остановка РНКП II *in vivo* служит сигналом к началу транскрипционно-зависимой ветви эксцизионной репарации нуклеотидов. Таким образом, в ходе исследования впервые получены данные, позволяющие предположить существование хроматин-специфичного, транскрипционно-зависимого механизма, обеспечивающего обнаружение разрывов нематричной цепи ДНК, которые в противном случае оказываются скрытыми в нуклеосомной структуре и недектируемыми другими системами репарации. Настоящая работа демонстрирует принципиальную возможность нуклеосом-специфичного узнавания повреждений ДНК и открывает новую тематику в области исследований репарации хроматина.

Практическая значимость:

Не устраненные одонитевые разрывы ДНК препятствуют процессам транскрипции, репликации и репарации ДНК, индуцируют накопление двунитевых разрывов ДНК, увеличивают нестабильность генома и могут приводить к апоптозу.

Нарушения работы систем репарации однонитевых разрывов приводят к развитию серьезных нейродегенеративных заболеваний. При дальнейшем развитии тематики и показанном эффекте разрывов нематричной цепи на эффективность транскрипции РНКП II *in vivo* могут быть найдены или спроектированы химические соединения, воздействующие на изучаемый механизм. Таким образом, настоящее исследование актуально как для фундаментальной, так и для прикладной науки.

Достоверность результатов диссертации обеспечивается корректным использованием современных широко применяемых биохимических методов исследования.

Личный вклад автора состоял в обзоре имеющихся данных литературы, самостоятельной постановке экспериментов, обработке и интерпретации результатов экспериментов, представлении и апробации результатов исследования на конференциях, подготовке научных публикаций по выполненной работе.

Апробация работы:

Материалы работы были представлены на конференциях: 50-й международной ежегодной конференции FEBS-EMBO, Франция, Париж, 2014; XXI и XXII Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», Россия, Москва, 2014 и 2015; международной конференции Института молекулярной биологии г. Майнц (IMB) «DNA Repair and Genome Stability in a Chromatin Environment», Германия, Майнц, 2015; международной конференции молодых ученых «Molecular Control of Gene Expression», Россия, Москва, 2015.

Публикации:

По результатам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 статьи в российских рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК РФ, 1 статья в международном журнале, входящем в базу данных PubMed, и 6 материалов российских и международных конференций.

Структура и объем диссертации:

Диссертация изложена на 104 страницах машинописного текста и состоит из списков использованных сокращений и терминов, введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их

обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, приложений и благодарностей. Работа содержит 31 рисунок и 1 таблицу. Библиография включает 119 названий.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Материалы и методы

Исследования проводились в экспериментальной системе с использованием «минимальных» мононуклеосомных матриц, транскрибируемых *in vitro*. На основе 603 нуклеосом-позиционирующей последовательности (НПП) [Lowary, Widom, 1998] методом ПЦР-мутагенеза были получены фрагменты с возможностью ферментативного внесения однонитевых разрывов ДНК в определенные положения НПП. Методом ступенчатого диализа против растворов с понижающейся ионной силой в присутствии донора гистонов на фрагментах были собраны нуклеосомы. На полученных нуклеосомных матрицах без разрывов и с разрывами проводилась транскрипция модельной РНК-полимеразой *E. coli*, повторяющей все основные свойства элонгации хроматина РНКП II. По распределению остановок фермента делали выводы об особенностях и предполагаемому механизму влияния разрывов нематричной цепи на транскрипцию нуклеосомной ДНК. Для определения точных координат остановок РНКП использовали подход секвенирования ДНК-матриц транскрипцией в условиях недостатка отдельных рибонуклеотидов.

2. Результаты и обсуждение

2.1. Экспериментальная система

Ранее в нашей лаборатории было показано, что наиболее заметное замедляющее воздействие на транскрипцию через хроматин оказывают разрывы около (+10 – +13) положения НПП относительно ближайшей к промотору границы нуклеосомы. Поэтому для первого эксперимента были выбраны мононуклеосомы с разрывом сахарофосфатного остова между 12 и 13 нуклеотидными остатками НПП (разрыв +12, рисунок 1).

Методами ПЦР-мутагенеза и молекулярного клонирования на основе существующего фрагмента ДНК получили плазмиду, содержащую вставку с интересующей последовательностью нуклеотидов. Методом ПЦР на полученной

матрице амплифицировали фрагмент ДНК, содержащий промотор T7A1 и НПП с участком внесения однонитевого разрыва в положении нематричной цепи +12 относительно ближайшей к промотору границы нуклеосомы. ДНК обработали нуклеазой Nt.BsmA1 для введения однонитевых разрывов. В работе использовали только фрагменты, эффективность разрезания которых превышала 95%.

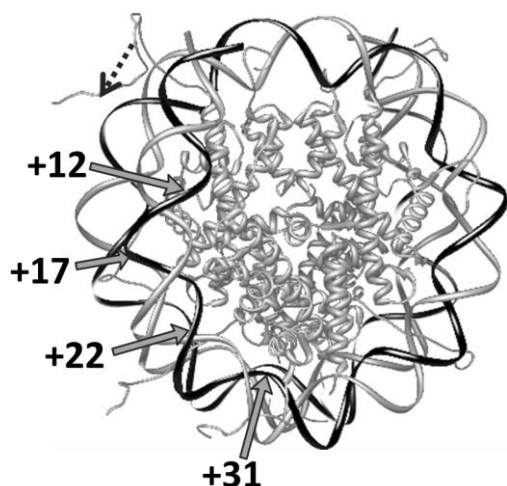


Рисунок 1. Схема расположения исследуемых однонитевых разрывов ДНК в нуклеосоме. Все разрывы расположены в нематричной цепи ДНК (выделенной темным цветом). Пунктирной стрелкой указано направление транскрипции. Рисунок нуклеосомы получен в программе Cn3D с использованием структуры 1EQZ [Harp et al., 2000].

На поврежденных и неповрежденных фрагментах ДНК собрали нуклеосомы. Для транскрипционных опытов использовали только пробы, в которых содержание нуклеосом не менее чем в четыре раза превышало количество свободной от гистонов ДНК. Для детекции продуктов транскрипции проводили радиоактивное пульс-мечение синтезируемой РНК. Введение меток только в начальный участок транскриптов позволяло затем проводить количественное сравнение представленности продуктов разной длины. Реакцию элонгации проводили ограниченное время, за которое в ходе реакции на неповрежденной матрице получали оптимальное соотношение полноразмерного транскрипта и продуктов, соответствующих изучаемым паузам РНК-полимеразы при элонгации через нуклеосому.

2.2. Позиционированный однонитевой разрыв нематричной цепи ДНК может вызывать дискретную нуклеосом-специфичную остановку РНК-полимеразы

Контрольный опыт по транскрипции свободной от гистонов ДНК показал, что внесение разрыва в выбранное положение само по себе не вызывает изменений в паузировании РНКП *E. coli* при транскрипции (рисунок 2).

М - +

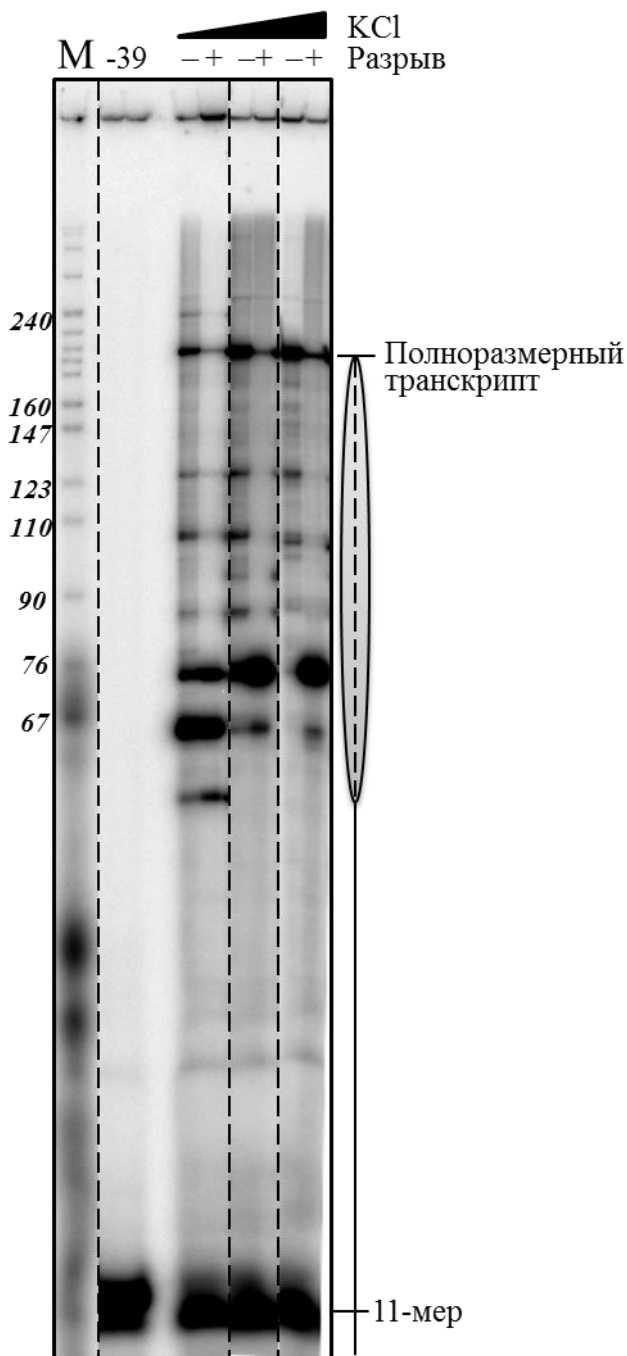


Рисунок 2. Разрыв нематричной цепи не влияет на эффективность транскрипции свободной от гистонов ДНК. Неповрежденный и никированный по +12 положению НПП фрагменты ДНК транскрибировали РНКП *E. coli* в течение 2 мин при 150 мМ КСl. М – радиоактивно меченые продукты обработки плазмиды pBR322 эндонуклеазой рестрикции MspI. Электрофоретическое разделение продуктов транскрипции в ПААГ в денатурирующих условиях, детекция по радиоактивному сигналу.

Оказалось, что при организации в нуклеосому тот же одиночный разрыв вызывает почти полную остановку РНКП (рисунок 3). Эффект хорошо выражен в физиологических солевых условиях (150 мМ КСl) и почти не преодолевается при повышении ионной силы. Интересно, что хроматин-специфичная остановка происходит строго в одном положении активного центра на ДНК-матрице. Кроме того, в том же положении происходит паузирование РНКП и на неповрежденной матрице, однако это паузирование заметно ослабляется при повышении ионной силы. Такой же эффект был показан совместно с Кулаевой О.И. при использовании дрожжевой РНК-полимеразы II [Pestov et al., 2015]. Таким образом, эффект остановки фермента при транскрипции нуклеосомы с разрывом нематричной цепи ДНК также воспроизводится при использовании модельной РНК-полимеразы *E. coli*. Совместно с Пестовым Н.А. было показано, что при длительной инкубации реакционной смеси большое количество остановленных комплексов завершает транскрипцию [Pestov et al., 2015]. Через 10 минут реакции представленность полноразмерных продуктов достигает около 50%, то есть при наблюдаемой остановке РНКП *E. coli* не происходит инактивация элонгирующего фермента, а присутствие разрыва вызывает только очень сильное снижение скорости транскрипции через конкретный участок матрицы.

С применением подхода транскрипционного секвенирования ДНК-матрицы было показано, что остановка РНК-полимеразы *E. coli* происходит в положении +24 НПП, то есть уже после того, как активный центр миновал разрыв сахарофосфатного остова нематричной цепи. В данном случае остановка произошла через 12 нт после разрыва.

Рисунок 3. Разрыв в +12 положении НПП вызывает количественную остановку РНК-полимеразы *E. coli* при транскрипции через нуклеосому.



Электрофореграмма транскриптов, полученных на нуклеосомных матрицах с неповрежденной ДНК (-) или с разрывом в положении +12 НПП (+) при 40, 150 или 300 мМ КСl (увеличивающаяся концентрация соли показана черным треугольником). Полноразмерный транскрипт длиной 207 нт указан. «-39» - комплекс, в котором синхронизованы молекулы РНК-полимеразы до входа в нуклеосому (положение указано относительно ближайшей к промотору границы нуклеосомы). Комплекс ЭК-39 содержит РНК-продукт длиной 11 нт (11-мер). Показаны дорожки от входа проб в гель до 11-мерного фрагмента РНК. М - радиоактивно меченые продукты обработки плазмиды рBR322 эндонуклеазой рестрикции MspI, длины в нт указаны рядом с соответствующими полосами. Справа серым овалом схематически

обозначено расположение гистонового октамера на ДНК-матрице. Детекция по радиоактивному сигналу.

Для объяснения эффекта замедления РНК-полимеразы одонитевыми разрывами нематричной цепи ДНК предложили два механизма. Первый предполагал стабилизацию РНК-ДНК гибрида в присутствии одонитевого разрыва и

последующую остановку фермента (аналогично [Belotserkovskii et al., 2013]). Тем не менее, совместно с Пестовым Н.А. было показано, что при добавлении к остановленным комплексам РНКазы Н, специфичной к РНК-ДНК гибридным структурам, все продукты транскрипции сохраняются [Pestov et al., 2015].

Вторая предложенная модель действия разрывов нематричной цепи основана на данных о транскрипции нуклеосом по РНКП II – зависимому механизму. Согласно данным, полученным в лаборатории ранее [Kulaeva et al., 2009], при транскрипции нуклеосомы РНКП II в положении +49 нт от входа фермента в нуклеосому происходит формирование переходного элонгационного комплекса с внутринуклеосомной петлей малого размера, содержащей транскрибирующий фермент. Исходя из полученных в опыте данных, мы предположили, что подобная структура может образовываться и в данном случае. Вероятно, при достижении активным центром фермента +24 положения НПП за РНКП открывается достаточно ДНК-связывающих контактов гистонового октамера, чтобы произошло взаимодействие с уже транскрибированным участком матрицы (рисунок 4). В таком случае замыкание петли приведет к образованию топологически замкнутых доменов, продвижение в которых РНКП вызовет положительное и отрицательное суперскручивание матричной ДНК впереди и позади фермента, соответственно. При достижении достаточного напряжения от отрицательного суперскручивания, произойдет разрушение контактов ДНК и гистонов позади фермента, что вызовет открытие петли и освобождение РНКП. В присутствии разрыва в области отрицательной суперспиральности накопление напряжений ослабится, и открытие петли замедлится.

Из такой модели следуют некоторые экспериментальные ожидания. Во-первых, предполагается, что внутринуклеосомные петли могут быть сформированы только при определенных вращательных ориентациях РНКП на ДНК [Kulaeva et al., 2009]. Тогда остановки фермента в присутствии односторонних разрывов нематричной цепи ДНК будут происходить только в некоторых довольно дискретных положениях нуклеосомной матрицы. Во-вторых, различные близко позиционированные разрывы могут быть расположены в пределах одной петли ДНК и будут вызывать остановку РНКП в одном и том же положении. В-третьих, так как сам процесс формирования

петли не зависит от присутствия разрыва, в этих положениях может наблюдаться паузирование РНКП даже на неповрежденных матрицах.

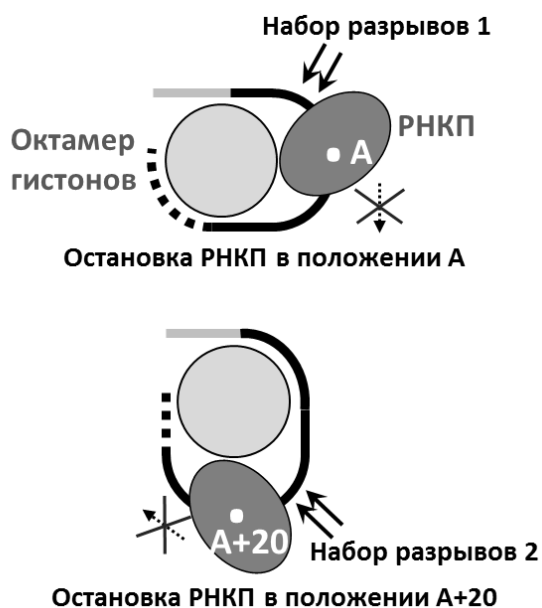


Рисунок 4. Предсказания петлевой модели механизма остановки РНКП во время транскрипции через хроматин с однонитевыми разрывами ДНК. Согласно предложенной модели различные близко расположенные разрывы будут вызывать остановку РНКП в одной петле, то есть в одном положении нуклеосомы (набор разрывов 1 – в положении А). Более отдаленные однонитевые разрывы будут вызывать остановку РНКП в положении, в

котором также стерически возможно образование петлевого переходного комплекса (например, А+20 для набора разрывов 2). РНКП (серый овал) – РНК-полимераза. Светло-серый круг – октамер гистонов. Пунктирной стрелкой показано направление транскрипции. Для удобства изображена половина нуклеосомной ДНК.

2.3. Особенности остановок РНК-полимеразы на разрывах нематричной цепи нуклеосомной ДНК

Для проверки предсказаний петлевой модели было изучено влияние на транскрипцию через хроматин разрывов нематричной цепи в других положениях НПП. Для исследования были выбраны разрывы с разными вращательными ориентациями в нуклеосоме (+17, +22 или +31, рисунок 1). Фрагменты были разработаны и синтезированы на основе 603 НПП и получены по той же экспериментальной схеме, что и в предыдущем опыте.

Транскрипция свободной от гистонов ДНК также значительно не отличалась по распределению транскриптов по длинам в отсутствие и в присутствии разрывов. После организации в хроматиновую структуру те же однонитевые разрывы стали вызывать эффективную остановку фермента в определенных положениях нуклеосомной матрицы (рисунок 5).

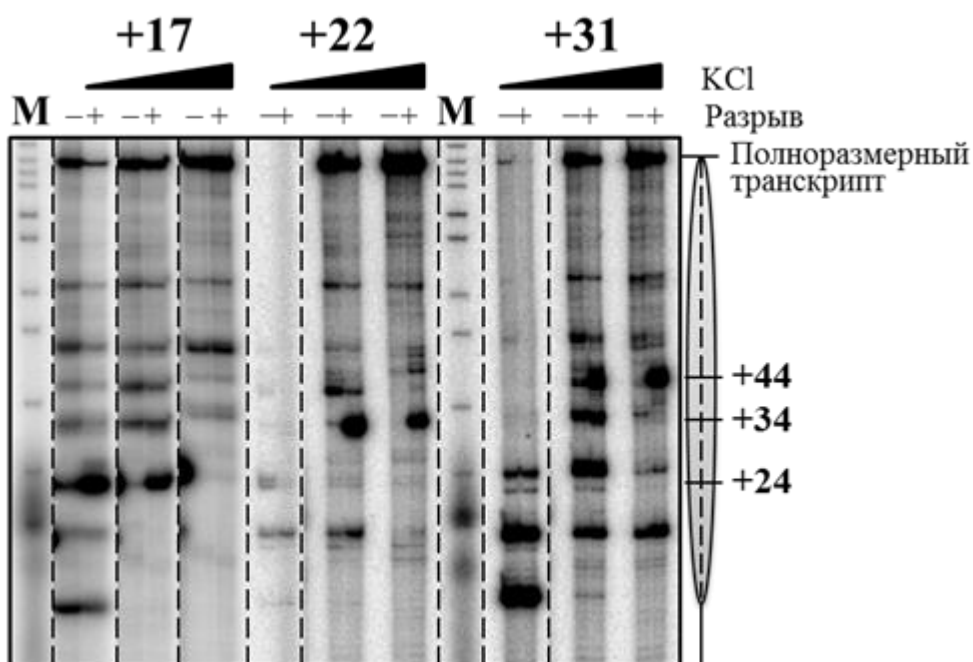


Рисунок 5. Разрывы нематричной цепи ДНК вызывают остановку РНК-полимеразы в отдельных положениях с периодичностью в 10 п.н. Электрофореграмма продуктов транскрипции нуклеосомных матриц с неповрежденной ДНК (-) или с разрывом нематричной цепи (+) в течение 2 мин при 40, 150 или 300 мМ КСl (увеличивающаяся концентрация соли показана черными треугольниками). Положение разрыва относительно ближайшей к промотору границы нуклеосомы указано сверху. М – радиоактивно меченые продукты обработки плазмиды pBR322 эндонуклеазой рестрикции MspI. Справа серым овалом схематически обозначено расположение гистонового октамера на ДНК-матрице. На схеме отмечены положения остановок РНК-полимеразы. Указано положение полноразмерных транскриптов длиной 207 нт. Детекция по радиоактивному сигналу.

Методом транскрипционного секвенирования ДНК-матрицы было установлено, что разрывы +22 и +31 вызывают остановку фермента в положениях +34 и +(43-44), соответственно. Доля остановленной на разрыве РНКП определена относительно общего количества продуктов транскрипции в нуклеосомной области по трём независимым транскрипционным экспериментам (рисунок 6). Наименее эффективна остановка, наблюдаемая в присутствии разрыва +17. Для исследованных однонитевых разрывов эффективность остановки уменьшается в следующем порядке: $+12 \geq +22 > +31 > +17$.

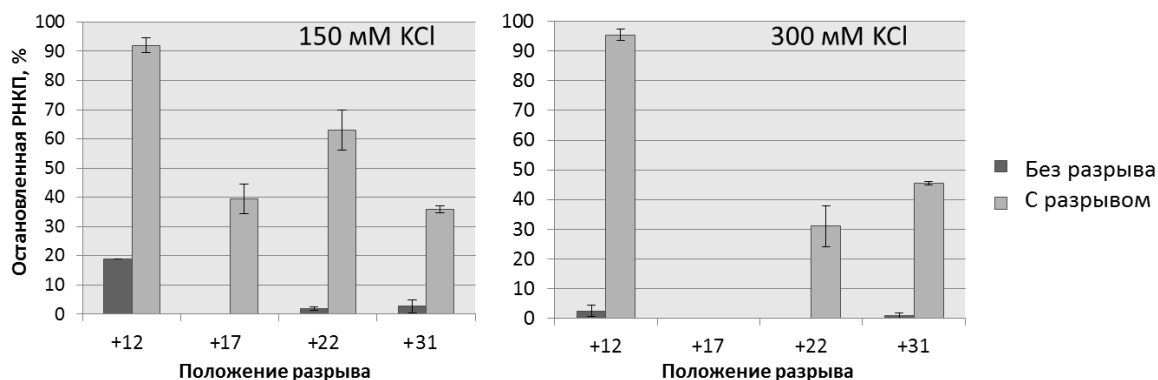


Рисунок 6. Количественный анализ остановок РНК-полимеразы *E. coli* в присутствии разрывов нематричной цепи при транскрипции нуклеосом. Анализ проведен по трём независимым экспериментам транскрипции для каждого разрыва.

Из полученных данных можно определить некоторые характерные особенности обнаруженных остановок РНКП *E. coli*:

1. Так, можно заметить четкую 10-п.н. периодичность остановки РНКП (положения +24, +34 и +(43-44)), индуцированной однонитевыми разрывами нематричной цепи нуклеосомной ДНК. Разрыв +17 вызывает остановку в том же положении, что и уже исследованный +12, что соответствует случаю попадания разных разрывов в одну внутринуклеосомную петлю.
2. Даже при транскрипции неповрежденных нуклеосом в положениях +24, +34 и +44 наблюдаются некоторые намного более слабые остановки РНКП.
3. Во всех случаях разрывы локализованы на 7-12 п.н. выше остановленной РНКП, свидетельствуя о том, что предполагаемые петли ДНК относительно невелики по размеру.
4. При увеличении ионной силы в реакционной среде эффект разрыва +17 может быть преодолен, в то время как разрывы +12, +22 и +31 продолжают вызывать заметное паузирование РНКП. Таким образом, эффективность остановки различна для разных разрывов и зависит от его расположения в нуклеосоме.

Так, полученные данные свидетельствуют в пользу предложенной петлевой модели действия однонитевых разрывов нематричной цепи ДНК на эффективность транскрипции нуклеосом по РНКП II – зависимому механизму.

2.4. Предполагаемый механизм нуклеосом-специфичной остановки РНК-полимеразы на разрыве нематричной цепи ДНК

Вместе с предыдущими данными [Kulaeva et al., 2009; Chang et al., 2014], настоящие результаты свидетельствуют в пользу следующей модели транскрипции РНК-полимеразы II через нуклеосомы (рисунок 7). Когда РНК-полимераза достигает нуклеосомы (рисунок 7, 1), ближайший к промотору участок нуклеосомной ДНК отворачивается от октамера гистонов (рисунок 7, 2). РНК-полимераза продвигается дальше, и за ферментом открывается ДНК-связывающая поверхность октамера гистонов, что позволяет формирование внутринуклеосомной петли ДНК, содержащей в своих пределах фермент. Первоначально такое происходит в положении +24 НПП (рисунок 7, 3).

Вероятно, из-за небольшого размера петли фактическое перемещение фермента затруднено, и спереди и сзади него образуются два независимых топологических домена. Один из них ограничен контактами ДНК с гистонами позади фермента и самим ферментом, другой – той же РНКП и ДНК-гистоновыми контактами впереди неё. Когда крупная молекула РНК-полимеразы продвигается в петле, перед ферментом и позади него накапливается положительное и отрицательное суперскручивание ДНК, соответственно. Когда от отрицательной суперспирализации накапливается достаточное напряжение, петля открывается позади фермента (рисунок 7, 4). Разрывы в любом участке матрицы позади фермента и до ДНК-гистоновых взаимодействий тормозят это частичное отворачивание, снимая суперскручивание ДНК. Таким образом, разрывы ингибируют транскрипцию, когда присутствует позади РНК-полимеразы.

После того, как фермент выходит из петли, формирующейся при расположении активного центра РНКП в позиции +24 (рисунок 7, 3), цикл, описанный выше, вероятно, повторяется по меньшей мере еще два раза (и сопровождается образованием подобных петель в положениях +34 и +44). Когда фермент освобождается из петли +44, формируется петля нулевого размера в положении +49, которая разрешается перед транскрибирующим комплексом (рисунок 7, 5; [Kulaeva et al., 2009]). Возможно, такое асимметричное раскрытие петли происходит за счет более сильного разрушающего воздействия положительной суперскрученности на

ДНК-гистоновые взаимодействия. Затем фермент перемещается вдоль матрицы и завершает транскрипцию нуклеосомной ДНК, что, как правило, сопровождается сохранением нуклеосомы в исходном положении на ДНК [Kulaeva et al., 2009].

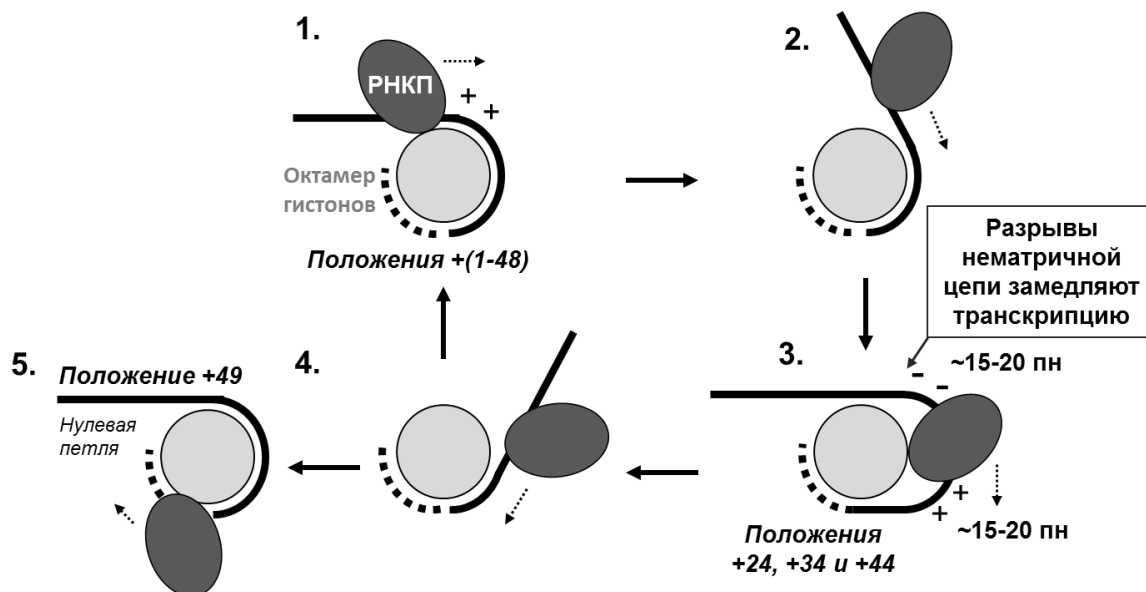


Рисунок 7. Предлагаемый механизм остановки РНКП II в хроматине, индуцированной разрывом нематричной цепи ДНК. При приближении РНКП к гистоновому октамеру возникают стерические затруднения, что приводит к положительному суперскручиванию ДНК перед ферментом. Предположительно односторонние разрывы в ДНК могут снимать это напряжение и облегчить транскрипцию через нуклеосомы (1). Затем ДНК нуклеосомы частично отворачивается от октамера (2) и в некоторых положениях фермента на ДНК могут образовываться переходные петлевые комплексы (3, положения активного центра РНК-полимеразы +24, +34 или +44). Разрывы, расположенные в области накопления отрицательной суперспиральности, снимают напряжение и замедляют открытие петли ДНК (переход из комплекса 3 в 4), вызывая остановку РНКП. Когда РНКП II достигает положения +49, происходит формирование нулевой петли (комплекс 5), ДНК отворачивается от октамера перед ферментом, и транскрипция продолжается эффективно с сохранением положения гистонового октамера [Kulaeva et al., 2009]. Показана половина нуклеосомной ДНК. РНКП (серый овал) – РНК-полимераза. Гистоновый октамер показан светло-серым кругом. Пунктирная стрелка указывает направление транскрипции.

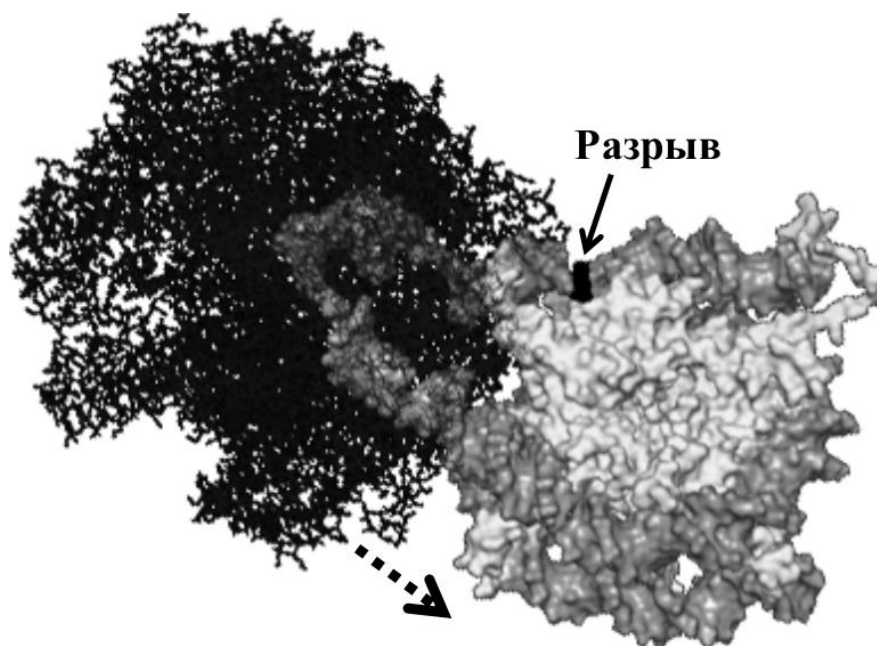


Рисунок 8. Примерная наглядная структура петлевого элонгационного комплекса РНКП II, стабилизированного разрывом +12 нематричной цепи нуклеосомной ДНК. Направление транскрипции показано пунктирной стрелкой. Граница однонитевого разрыва выделена чёрным цветом и указана стрелкой. Октамер гистонов показан светлым серым цветом, ДНК – тёмным серым, РНК-полимераза II – чёрным (слева).

На рисунке 8 приведена примерная наглядная структура переходного петлевого транскрипционного комплекса с разрывом нематричной цепи в +12 положении, полученная визуальным докингом молекулярных структур 1EQZ (нуклеосома, [Harp et al., 2000]), 3NOV (элонгационный комплекс РНК-полимеразы II с ДНК и РНК, [Sydow et al., 2009]) и 1CGC (декамер ДНК, [Heinemann et al., 1992]) в программе PyMOL.

Предположительное формирование внутринуклеосомных петель ДНК при транскрипции хроматина по РНКП II – зависимому механизму может иметь различные следствия, которые предстоит проверить экспериментально.

Ранее было показано, что при транскрипции нуклеосом РНК-полимеразой III происходит образование довольно крупных внутринуклеосомных петель ДНК. Вероятно, более сильное разрушающее действие положительной суперспиральности вызывает «преждевременное» асимметричное открытие петли перед ферментом и

облегчает транслокацию нуклеосом из положения перед РНКП III в положение за ней [Studitsky et al., 1995; Studitsky et al., 1994; Bednar et al., 1999; Studitskii et al., 2012a; Studitskii et al., 2012b].

Остановка элонгации РНК-полимеразой II в живой клетке служит сигналом к началу репарационного ответа, поэтому обнаруженный в работе ингибирующий эффект разрывов нематричной цепи на транскрипцию предполагает возможный механизм их распознавания *in vivo* по транскрипционно-зависимому пути.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые выявлен эффект остановки РНК-полимеразы при транскрипции нуклеосом с разрывами нематричной цепи по РНКП II – зависимому пути. С учётом характерных особенностей наблюдаемого эффекта предложен его возможный механизм. Так как остановка РНКП II *in vivo* служит сигналом к началу эксцизионной репарации нуклеотидов, то настоящее исследование впервые демонстрирует принципиальную возможность хроматин-специфичного узнавания повреждений ДНК. Результаты работы открывают новые возможности в изучении путей репарации одонитевых разрывов и процесса транскрипции нуклеосом по РНКП II – зависимому механизму.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность моему научному руководителю д.б.н. Василию Михайловичу Студитскому за внимательное руководство, интерес и ценные обсуждения; О.И. Кулаевой и Н.А. Пестову и другим соавторам за помощь в планировании и проведении экспериментов, переданные знания и умения; коллективу кафедр биоинженерии и молекулярной биологии биологического факультета МГУ за полезные замечания, дискуссии и дружеское участие; мужу, семье и друзьям за поддержку, помощь, любовь и терпение.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (соглашение № 14.604.21.0063, RFMEFI60414X0063).

ВЫВОДЫ

1. Одиночные разрывы нематричной цепи ДНК могут вызывать высокоэффективную, нуклеосом-зависимую остановку РНК-полимеразы *E. coli* при транскрипции, которая происходит через 7-12 п.н. после точки разрыва.
2. Положения остановок РНК-полимеразы *E. coli* при транскрипции нуклеосом в присутствии одиночных разрывов нематричной цепи ДНК дискретны и имеют периодичность 10 п.н. Определены три позиции остановок РНКП *E. coli* в +24, +34, +44 положениях относительно ближайшей к промотору границы нуклеосомы.
3. Эффективность остановки РНК-полимеразы *E. coli* зависит от положения разрыва нематричной цепи в нуклеосоме.
4. Остановки РНК-полимеразы при транскрипции нуклеосом в присутствии одиночных разрывов нематричной цепи ДНК, вероятно, вызваны релаксацией напряжения в небольших внутринуклеосомных петлях ДНК, которое в норме способствует транскрипции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК РФ:

1. Студитский В.М., Орловский И.В., Чертков О.В., **Ефимова Н.С.**, Логинова М.А., Кулаева О.И. Молекулярные механизмы транскрипции хроматина РНК-полимеразой III. Часть 1 // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2012. № 3. С. 6-11.
2. Студитский В.М., Орловский И.В., Чертков О.В., **Ефимова Н.С.**, Логинова М.А., Кулаева О.И. Молекулярные механизмы транскрипции хроматина РНК-полимеразой III. Часть 2 // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2012. № 4. С. 10-16.
3. Кулаева О.И., Малюченко Н.В., Никитин Д.В., Демиденко А.В., Чертков О.В., **Ефимова Н.С.**, Кирпичников М.П., Студитский В.М. Молекулярные механизмы транскрипции хроматина РНК-полимеразой 2 // Молекулярная биология. 2013. Т. 5. С. 754-766.
4. Pestov N.A., **Gerasimova N.S.**, Kulaeva O.I., Studitsky V.M. Structure of transcribed chromatin is a sensor of DNA damage // Science Advances. 2015. V. 1. N. 6. e1500021:1-9.
5. **Герасимова Н.С.**, Пестов Н.А., Кулаева О.И., Никитин Д.В., Кирпичников М.П., Студитский В.М. Репарация ДНК в составе хроматина // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2015. № 3. С. 21-25.

Тезисы докладов и материалы конференций:

1. **Герасимова Н.С.** Нуклеосом-специфичные остановки РНК-полимеразы в присутствии разрывов в нетранскрибируемой цепи ДНК // XXI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2014». Секция Биология. Россия. Москва. 2014. С. 235.
2. **Gerasimova N.S.**, Pestov N.A., Kulaeva O.I., Studitsky V.M. Chromatin-specific arrest of RNA polymerase by DNA single-stranded breaks // FEBS Journal Special Issue: FEBS EMBO 2014 Conference. France. Paris. 2014. V. 281. N. S1. P. 50.
3. Берсенева У.В., Боброва Т.А., **Герасимова Н.С.** Ускоряющий эффект одноцепочечных разрывов нематричной цепи ДНК на транскрипцию нуклеосом РНК-полимеразой *E. coli* // XXII Международная научная

- конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2015»
Секция Биология. Россия. Москва. 2015.
4. Валиева М.Е., **Герасимова Н.С.**, Кудряшова К.С. Белковый комплекс FACT позволяет РНК-полимеразе преодолевать индуцированные паузы и изменяет структуру нуклеосомной ДНК // XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2015». Секция Биология. Россия. Москва. 2015.
 5. **Gerasimova N.S.**, Pestov N.A., Kulaeva O.I., Studitsky V.M. Chromatin-specific arrest of RNA polymerase by DNA single-stranded breaks // IMB Conference «DNA Repair and Genome Stability in a Chromatin Environment». Germany. Mainz. 2015. P. 66.
 6. Pestov N.A., **Gerasimova N.S.**, Kulaeva O.I., Studitsky V.M. Structure of Transcribed Chromatin is a sensor of DNA damage // International conference for young scientists «Molecular Control of Gene Expression». Russia. Moscow. 2015. P. 16.

Для заметок