

**ФРАГМЕНТАЦИЯ ХРОМАТИНА КОДИРУЮЩИХ ОБЛАСТЕЙ
TRP-ДИОКСИГЕНАЗНОГО (*to*) И TYR-АМИНОТРАНСФЕРАЗНОГО (*tat*) ГЕНОВ
В АКТИВНОМ И РЕПРЕССИРОВАННОМ СОСТОЯНИЯХ
МИКРОКОККОВОЙ НУКЛЕАЗОЙ**

© Т. Н. Прияткина,¹ Е. Ю. Павлова, Н. Е. Войнова, Е. В. Дефорж

С.-Петербургский государственный университет;

¹электронный адрес: tpriyatkina@mail.ru

С использованием метода blot-гибридизации исследовали характер фрагментации микрококковой нуклеазой (МНазой) ДНК кодирующих областей генов trp-диоксигеназы (*to*) и тир-аминотрансферазы (*tat*) в активном (в ядрах клеток печени крыс) и репрессированном (в ядрах мозга) состояниях. Показано, что в ядрах печени на всем протяжении кодирующих областей генов *to* и *tat* не обнаруживается нуклеосомных устройств — нуклеазорезистентных компактных частиц, разделенных сегментами свободной ДНК (межнуклеосомными линкерами). В широком диапазоне концентраций фермента преимущественно продуцируются два класса фрагментов: близкие по длине полноразмерным *to*- и *tat*-единицам транскрипции (19 000 и 11 000 п. н. соответственно) и их крупные (от 1500 п. н.) сегменты различной протяженности. Сохранение в гидролизатах фрагментов обоих классов в лимите переваривания общей ДНК в составе ядер, когда МНазные разрывы реализуются практически во всех потенциально доступных сайтах хроматина, показывает, что они происходят из двух разных видов единиц транскрипции *to* и *tat*, представленных в ядрах печени. Одни из них не содержат доступных для МНазы сайтов на всем своем протяжении, тогда как в других резистентные области чередуются с редкими, нерегулярно располагающимися МНазочувствительными участками. Мы предполагаем, что устойчивость ДНК к МНазе на всем протяжении кодирующих областей присуща *to*- и *tat*-копиям в компетентном к транскрипции состоянии, но не транскрибируемым в данный момент времени. При транскрипции возникают МНазочувствительные зоны, которые, возможно, flankируют элонгирующие РНК-полимеразы.

Ключевые слова: хроматин дерепрессированных генов: компетентность к транскрипции; нуклеазная фрагментация, ремоделирование нуклеосом.

С развитием концепции нуклеосомной организации хроматина стали известны основные принципы упаковки ДНК в клеточных ядрах (Hewish, Burgoyne, 1973; Kornberg, 1974; Shick et al., 1980; Richmond et al., 1984; Arents, Moudrianakis, 1995; Luger et al., 1997; Ong et al., 2007). Механизмы обратных процессов — декомпактизации нуклеосомных цепей для реализации ее матричных функций — остаются до конца не выясненными. В исследовании характера преобразования (ремоделирования) нуклеосом для транскрипции перспективным подходом является анализ нуклеазной фрагментации ДНК в составе ядер, позволяющий установить изменения в характере ДНК-гистоновых взаимодействий. Регулярное чередование участков ДНК, прочно связанных с гистонами в составе компактных (коровых) частиц, и свободной ДНК межнуклеосомных линкеров в структурных единицах репрессированного хроматина (нуклеосомах) определяет нуклеосомную (через 200 п. н.) периодичность в распределении нуклеазных разрывов ДНК и достижение лимита реакции при переваривании свободных линкеров и выпадении мононуклеосомных фрагментов (Hewish, Burgoyne, 1973; Noll, 1974; Varshavsky et al., 1976; Noll, Kornberg, 1977; Simpson, 1978; Wolffe, 1998).

Первым биохимическим показателем преобразования нуклеосомной структуры хроматина при дерепрессии генов явились данные о появлении доступности внутриядерной ДНК для расщепления (двуихнитевых разрывов) ДНКазой I. При действии этого фермента не наблюдается накопления мононуклеосом, вся ДНК кодирующих областей переваривается до кислоторастворимого материала (Weintraub, Groudine, 1976; Bloom, Anderson, 1978, 1982; Garel, Axel, 1978). С использованием нового подхода для масштабного и высокоточного анализа ДНК-гистоновой ассоциации *in vivo*, включающего в себя иммунопреципитацию фрагментов хроматина гистоновыми антителами, было показано, что как промоторная ДНК, так и ДНК единиц транскрипции многих активных генов не связаны с гистонами (Schwabish, Struhl, 2004; Zhao et al., 2005; Williams, Tyler, 2007). О декомпактизации нуклеосом в участках транскрипции свидетельствуют и данные ультраструктурного анализа 1970—1980-х годов (Hamkalo et al., 1974; Foe, 1978; McKnight et al., 1978; Sheer, 1987). Однако в линеаризованной хроматиновой оси транскрибуемых участков иммунохимическими методами выявляются коровые гистоны (McKnight et al., 1978). Более того, ДНК кодирующих областей активных и компетентных к

транскрипции генов, полностью расщепляемая ДНКазой I до кислоторастворимых продуктов, резистентна к действию микрококковой нуклеазы (МНазы) (Weintraub, Groudine, 1976; Bloom, Anderson, 1978, 1982; Garel, Axel, 1978). По вопросу о том, соответствует ли характер протекции нуклеосомному типу организации хроматина, данные противоречивы (Clark, 1995; Wolffe, 1998; Toussaint et al., 2005).

В первых исследованиях, проведенных на глобиновых и овальбуминовых (Weintraub, Groudine, 1976; Bloom, Anderson, 1978; Garel, Axel, 1978), а также рРНК генах (Reeves, 1976) с использованием техники гибридизации в растворе, не было обнаружено различий между их активным и репрессированным состояниями по скорости переваривания ДНК МНазой и ее распределению в спектре фрагментов, кратных структурной единице. В ряде работ отмечался более быстрый распад части активного хроматина до моно- и коротких олигонуклеосом (Bellard et al., 1978; Bloom, Anderson, 1982; Rosha et al., 1984; Nacheva et al., 1989). Последующие анализы методом blot-гибридизации, позволяющим получать более точные результаты, не подтвердили нуклеосомного характера МНазной фрагментации овальбуминового (Bellard et al., 1982; Bloom, Anderson, 1982) и рРНК генов (Toussaint et al., 2005) в состоянии активной транскрипции. По β-глобиновому гену получены противоречивые результаты (Clark, 1995). Дерепрессированные гены из различных источников обнаружили большое разнообразие характеров МНазной фрагментации их ДНК в составе клеточных ядер.

Наряду с данными о сохранении нуклеосомной регулярности МНазных разрывов ДНК в их кодирующих областях (Gottesfeld, Melton, 1978; Baer, Rhodes, 1983; Rosha et al., 1984) существуют многочисленные свидетельства ее нарушений. В частности, продукция монотонных по длине фрагментов, накладывающихся на фрагменты дискретного нуклеосомного ряда (Bergman, Kramer, 1983; Lohr, 1983; Perez-Ortin et al., 1987; Szent-Györgyi et al., 1987), или полная потеря дискретности — образование широкого спектра МНазоустойчивых фрагментов гетерогенной величины (Bellard et al., 1982; Bloom, Anderson, 1982; Kohno et al., 1983; Weischet et al., 1983; Rose, Garrard, 1984; Widmer et al., 1984; Cohen, Sheffery, 1985; Sträpling et al., 1986; Conconi, Ryan, 1993).

Из всей совокупности имеющихся данных следует, что значительная часть ДНК генов, программированных на экспрессию в специализированных клетках или экспрессируемых, устойчива к действию МНазы. Однако противоречивость результатов не позволяет прийти к определенному заключению о характере распределения МНазочувствительных сайтов в их кодирующих областях. Кроме того, использование различных нуклеаз (ДНКазы I и МНазы) в анализе структуры активного хроматина привело к противоположным суждениям.

В качестве одной из причин имеющихся противоречий рассматривают множественность состояний, в которых могут быть представлены индивидуальные гены и их участки в клеточной популяции (Bellard et al., 1978; Foe, 1978; Weischet et al., 1983; Rosha et al., 1984; Toussaint et al., 2005). Существование в однотипных клетках или в одной и той же клетке репрессированной, компетентной к транскрипции и транскрибируемой форм хорошо документировано для рРНК генов (Foe, 1978; Toussaint et al., 2005). Того же можно ожидать для уникальных генов, инициируемых в интерфазе, если не все их копии в кле-

точной популяции отвечают на индуцирующие сигналы каждого уровня активации. Действие внутриядерных нуклеаз и протеаз во время инкубации ядер и потеря нативной конформации хроматина при накоплении одно- и двухнитевых разрывов ДНК (Rosha et al., 1984; Caplan et al., 1987) создают дополнительные трудности в оценке наблюдаемых характеров его фрагментации экзогенными ферментами.

Удобной моделью для сравнения доступности к нуклеазам ДНК активного и репрессированного хроматина являются гены тР-диоксигеназы (*to*) и тут-аминотрансферазы (*tat*). Эти гены были детально охарактеризованы в структурном и функциональном плане на основе выделенных фрагментов λгTO и λгТАТ генома крысы (Schmid et al., 1982; Becker et al., 1984; Shinomiy et al., 1984). Оба гена являются однокопийными. Их экспрессия тканеспецифична, а две ступени активации разделены во времени. Состояние компетентности к транскрипции устанавливается только в предшественниках гепатоцитов на конечных стадиях эмбриогенеза, сохраняется при последующих клеточных генерациях и в клетках печени взрослых крыс. Транскрипция включается в раннем постнатальном развитии и индуцируется глюкокортикоидами на всем протяжении жизни зрелых гепатоцитов (Schmid et al., 1982; Becker et al., 1984; Shinomiy et al., 1984). Таким образом, в клетках печени крыс гены *to* и *tat* представлены в двух состояниях — компетентном к транскрипции и транскрикционно активном. При этом число копий, вовлеченных в транскрипцию, в норме, по-видимому, не превышает 50 % от общего их числа в клеточной популяции (Reik et al., 1991).

Целью данной работы явился сравнительный анализ доступности ДНК в кодирующих областях генов *to* и *tat* для фрагментации МНазой в ядрах клеток печени и мозга крыс.

Установлено, что при обработке ядер клеток печени МНазой в широком диапазоне концентрации практически не образуется *to*- и *tat*-фрагментов с длиной мономеров или олигомеров нуклеосомного повтора. В лимите переваривания, который достигается при кратком действии фермента в насыщающей концентрации, ДНК кодирующих областей обоих генов сохраняется в гидролизатах преимущественно в виде протяженных (от 1500 п. н.) фрагментов, значительная часть которых близка их полной длине (19 и 11 тыс. п. н. для *to* и *tat* соответственно; Schmid et al., 1982; Shinomiy et al., 1984). В сходных условиях под действием ДНКазы I вся *to*- и *tat*-ДНК переходит в кислоторастворимые продукты или короткие негибридизующиеся фрагменты.

Материал и методика

Для получения ДНК-зондов в работе использовали плазмиды pUS19x(pC), содержащую ген *tat* (Shinomiy et al., 1984), и pTO(E-3.3), включающую в себя центральный сегмент кодирующей области гена *to* (Чихиржина и др., 1993).

Ядра выделяли из клеток печени и мозга беспородных белых крыс после лизиса цитоплазмы в растворе Тритона X-100. Охлажденную во льду ткань промывали раствором 1 (0.05 M Tris-HCl-буфер pH 7.5, 0.025 M KCl, 0.005 M MgCl₂ и 0.25 M сахароза), измельчали в ледяной суспензии раствора 1 и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тefлоновым пестиком в десятикратном

объеме (v) раствора 1 по отношению к исходной массе ткани (m). Гомогенат фильтровали через капроновый фильтр и центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин. Осадок промывали тем же раствором и супензировали (2 мин гомогенизации) в растворе 2 (0.5 % Тритона X-100 в буфере 1, 1 : 2, m : v). Супензию выдерживали 10 мин при 2—4 °C, после чего разбавляли в 5 раз раствором 1 и центрифугировали. Плотный белый осадок ядер промывали 2 раза раствором 1 (1 : 10, m : v) и затем раствором 3 (0.01 M Tris-HCl-буфер pH 7.5 и 0.003 M CaCl₂) в том же соотношении к массе исходной ткани. При всех промывках ядерные осадки супензировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком и осаждали центрифугированием при 1000 g в течение 7—10 мин. Всю операцию по очистке ядер проводили при температуре около 0 °C. Все промывающие растворы предварительно охлаждали до —2 °C.

Для действия МНазы ядерные осадки супензировали в 0.01 M Tris-HCl-буфере pH 7.5, содержащем 1.5 mM CaCl₂ и 1 mM PMSF (Sigma, США) (1 : 1, m : v). К супензии, охлажденной до 0—(+2) °C, добавляли МНазу (Sigma, США, 10—360 A₂₆₀ ед. на 1 мг ДНК). Пробы помещали в водяную баню при 20 °C на 10—15 мин. Обработку ДНКазой I (Sigma, США) проводили при тех же условиях в растворе 1, разведенном в 2 раза. Реакцию останавливали добавлением додецилсульфата натрия (DS-Na), ЭДТА и ЭГТА.

ДНК из ядер печени и мозга выделяли с помощью фенольной депротеинизации в стандартных условиях (Маниатис и др., 1984) после обработки протеиназой K (Sigma, США) и РНКазой (по 200—400 мкг/мл) в 0.05 M Tris-HCl-буфере pH 8.0, содержащем 0.5 % DS-Na, 0.2 M NaCl, 10 mM ЭДТА и 2 mM ЭГТА, при 37 °C в течение 2 ч. ДНК осаждали этанолом при —20 °C и растворяли в буфере TE (Маниатис и др., 1984).

Фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в 1%-ных агарозных гелях (0.3×7×8 см) в буфере TAE (Маниатис и др., 1984). Перенос ДНК на мембрану Hybond N (Amersham, США) осуществляли электрофоретически с использованием аппарата «Blotter» для полусухого переноса в 0.025 M Tris-HCl-буфере pH 8.0 при силе тока 1 mA в течение 2 ч. ДНК фиксировали на мемbrane облучением УФ-светом на трансиллюминаторе «Флускоп 2» при длине волн 310 нм в течение 2—3 мин, затем мембранные выдерживали при 90 °C в течение 1 ч.

Плазмидные ДНК выделяли из клеток бактерий методом щелочного лизиса и очищали равновесным центрифугированием в градиенте плотности CsCl (Маниатис и др., 1984). Обработку рестриктазами осуществляли в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. Фрагменты генов, используемые для гибридизации, получали после препаративного электрофореза смеси рестриктов в 6%-ном ПААГ.

Для введения в ДНК флуоресцентной метки и детекции меченой ДНК в гибридах использовали два модуля набора ECL — Random prime labelling module (RPN 3540) и Star detection module (RPN 3510) (Amersham, США). Условия блот-гибридизации ДНК, фиксированной на Hybond N-мембранных, с фрагментами генов *to* и *tat* и условия выявления гибридов соответствовали рекомендациям фирмы Amersham. Для визуализации флуоресцентной метки использовали высокочувствительную рентгеновскую пленку (Hyperfilm ECL, Amersham, США). Время экспозиции варьировали от 1 до 18 ч.

Результаты

Мы попытались по возможности исключить влияние внутриядерных нуклеаз и протеаз на характер фрагментации ДНК при получении ядер и инкубации с экзогенными ферментами. Для сохранения целостности хроматина до обработки нуклеазами все операции по очистке ядер проводили при 0 °C, промывающие растворы предварительно охлаждали до —2 °C, гомогенизацию осадков начинали в разбавленной ледяной супензии промывающего раствора. Из выделенных в таких условиях ядер ДНК не освобождалась в водную фазу при стандартных условиях фенольной депротеинизации. Для полного выхода оказалось достаточным инкубации ядер в отсутствие добавленных ферментов. Различие в эффективности выхода ДНК, вероятно, связано с разрывами ДНК по сайтам гиперчувствительности к ДНКазе I (ГЧ-сайтам) эндогенными ферментами во время инкубации. При анализе фрагментации хроматина МНазой и ДНКазой I выделенные ядра инкубировали с ферментами в течение 10—15 мин при градиенте температуры от 0 до 20 °C. Интенсивность переваривания ДНК регулировали только вариациями концентрации фермента.

Для определения длины МНазорезистентных участков (всех вариантов распределения в кодирующих областях доступных для МНазы сайтов) ядра инкубировали при насыщающей концентрации фермента. Для выявления МНазочувствительных зон использовали широкий диапазон концентраций МНазы от 10 до 360 A₂₆₀ ед. на 1 мг ДНК (A₂₆₀ ед.). Было установлено, что лимит в переваривании общей ДНК в составе ядер достигался при 120—150 A₂₆₀ ед. МНазы и 120—160 ед. на 1 мг ДНК ДНКазы I. Дальнейшее увеличение концентрации ферментов не приводило к заметным изменениям в спектре продуцируемых фрагментов общей ДНК (данные не приводятся). Количество образующихся кислоторастворимых продуктов при достижении этого лимита оказалось крайне низким (не превышало 2—3 %).

Фрагменты генов *to* и *tat* в суммарной ДНК нуклеазных гидролизатов выявляли с помощью блот-гибридизации. В качестве зондов использовали сегменты их кодирующих областей — зонд TO1 с координатами (+5000/+8300 п.н.) и TAT1 (+800/+3700 п.н.). Проводили прямое сравнение длины фрагментов общего (отражающего репрессированное состояние) и активного (генов *to* и *tat* в ядрах печени) хроматина, а также фрагментов гена *to* в репрессированном (в ядрах мозга) состоянии, образующихся под действием МНазы.

Рис. 1, а демонстрирует типичную картину фрагментации хроматина печени и мозга крыс при концентрации МНазы, обеспечивающей достижение лимита в переваривании общей ДНК в составе ядер. При этих условиях большая часть общего хроматина переваривается преимущественно до моно- и динуклеосом (рис. 1, а, дорожки 3, 4). При этом в спектре фрагментов отчетливо выявляется пик высокополимерной ДНК (рис. 1, а, дорожки 3, 4, вверху). Результаты гибридизации фрагментов с зондом TO1 (рис. 1, б) оказались неожиданными. При условиях, когда в репрессированном хроматине МНазные разрывы ДНК реализуются практически в каждом или в каждом втором межнуклеосомному линкеру, в гидролизатах сохраняются протяженные (от 1500 до 20 000 п.н.) фрагменты гена *to* (рис. 1, б, дорожка 3), часть из которых сопоставима с величиной его единицы транскрипции (19 тыс. п.н.; Schmid et al., 1982). В ядрах мозга (в репрессированном состоянии) тот же ген распадается на моно-

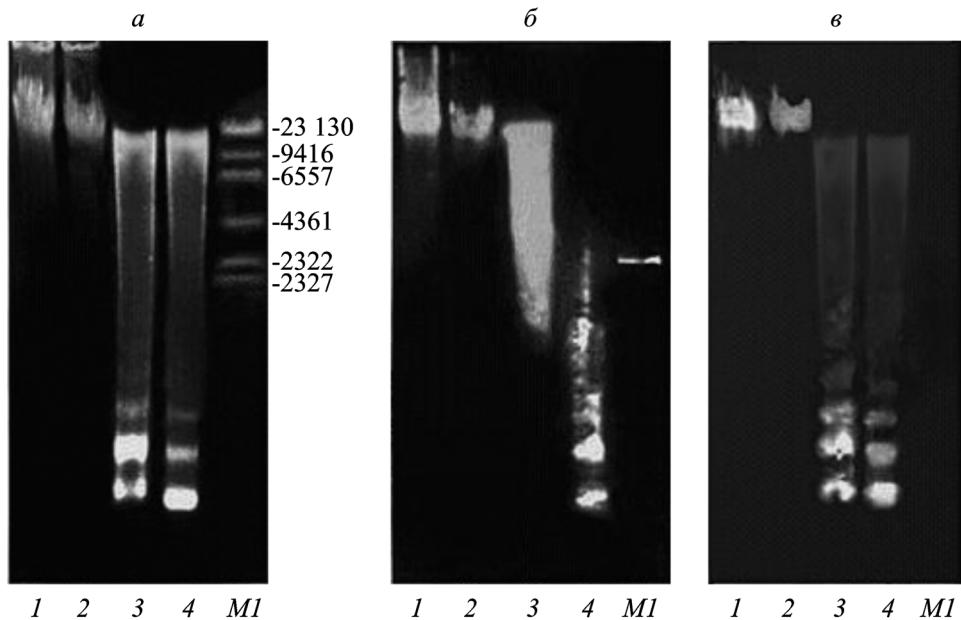


Рис. 1. Сравнение характера фрагментации микрококковой нуклеазой (МНазой) ДНК общего хроматина и хроматина кодирующей области гена *to* в ядрах клеток печени и мозга крыс при концентрации МНазы 120 A₂₆₀ ед. на 1 мг ДНК.

a — электрофорограмма фрагментов ДНК в 1%-ном агарозном геле, окраска бромистым этидием; *b, c* — автографы с электрофорограммы после гибридизации с зондом ТО1 (*b*) или с флуоресцентно меченной суммарной ДНК из клеток печени крыс (*c*). Дорожки: 1, 2 — ДНК из ядер клеток соответственно печени и мозга крыс, инкубированных в отсутствие МНазы; 3, 4 — из тех же ядер, инкубированных с МНазой; *M1* — маркеры длины (п. н.) — фрагменты Hind III-рестрикции λДНК (в качестве положительного контроля гибридизации добавлено около 2 пкг не меченной ТО1 ДНК).

динуклеосомные фрагменты (рис. 1, *b*, дорожка 4), как и общий хроматин (рис. 1, *a*, *c*, дорожки 3, 4).

Чтобы определить 5'- и 3'-граници МНазоустойчивых зон на нуклеотидной последовательности гена *to* в ядрах печени, мы использовали метод непрямого мечения концов ДНК (Nedospasov, Georgiev, 1980). Единица транскрипции *to* содержит одиничный Xho I сайт рестрикции на расстоянии +7800 п. н. (Schmid et al., 1982) и делит кодирующую область гена *to* на два сегмента (около 8 и 11 тыс. п. н.) и зонд ТО1 на две части — ТО1-2800 и ТО1-500 (рис. 2, *a*). ДНК, выделенная из ядер, инкубированная без МНазы, и МНазных гидролизатов рестриционными ферментами Xho I и образующиеся фрагменты гибридизовали последовательно с зондами ТО1-2800 и ТО1-500. Как видно на рис. 2, *b, c*, дорожка 1, в ядрах, не обработанных МНазой, длина фрагментов *to* превышает размеры единицы транскрипции. Фрагменты рестрикции Xho I, гибридизующиеся с зондом ТО1-2800, имеют длину, близкую к 10000 п. н. (рис. 2, *b*, дорожка 2). Сходные по длине фрагменты *to* обнаруживаются и в гидролизатах при лимите МНазного переваривания ядерной ДНК (рис. 2, *b*, дорожка 4). Длина фрагментов гена *to* от Xho I сайта рестрикции в 3'-направлении составляет около 20 тыс. п. н. (рис. 2, *c*, дорожка 2). После интенсивного МНазного переваривания ядер видимые фрагменты имеют длину от 4000 до около 10 000 п. н. (рис. 2, *c*, дорожка 4). Вероятно, разрывы под действием эндогенных ядерных ферментов во время инкубации ядер происходят в проксимальной части 5'-фланга, содержащей 3 сильных сайта нуклеазной гиперчувствительности (Becker et al., 1984), и в дистальных частях 3'-фланга гена *to*. Хотя используемая система электрофореза не является оптимальной для анализа ДНК такой величины, наблюдаемая максимальная длина фрагментов в 5'- и 3'-направлениях от Xho I сайта (около 10 тыс. п. н.) (рис. 2, *b, c*, дорожка 4) показывает,

что в гидролизатах сохраняются полноразмерные единицы транскрипции *to*.

Как видно на рис. 3, протяженные МНазорезистентные зоны кодирующей области *to* чувствительны к ДНКазе I (рис. 3, *b*;ср. дорожки 1 и 2): под действием этого фермента в концентрации 120 ед. на 1 мг ДНК практически вся *to*-ДНК переваривается до кислоторастворимых или негибридизующихся продуктов (рис. 3, *b*, дорожка 1). Остаточная (выявляющаяся при длительной экспозиции рентгеновской пленки) фракция представлена монотонно убывающими по длине фрагментами — от 2000 до 800 п. н. (рис. 3, *b*, дорожка 1). Как и в случае с МНазой, при интенсивном переваривании ДНКазой I не образуется фрагментов *to*-ДНК, соответствующих коровым частицам или хроматосомам — конечным продуктам нуклеолитического распада нуклеосомных цепей (рис. 3, *b*, дорожки 1, 2).

Различия в характере МНазной фрагментации ДНК активного (гена *to*) и репрессированного (общего) хроматина обнаружаются и при слабом переваривании хроматина — до появления моно- и олигонуклеосомных фрагментов. При концентрации фермента 10 A₂₆₀ ед. общая ДНК ядер печени выявляется в одном пике высокополимерных фрагментов с широким распределением по длине — от 2000 до десятков тысяч п. н. (рис. 4, *a*, дорожка 1). ДНК гена *to* представлена в нем узкой полосой компонентов с длиной, близкой к 20 тыс. п. н. (рис. 4, *b*, дорожка 1), соответствующей полноразмерным единицам транскрипции *to*. Их субфрагменты (от 5000 п. н. и выше) появляются при концентрациях МНазы 20 и 40 A₂₆₀ ед. одновременно с минорной фракцией относительно низкомолекулярной *to*-ДНК, в которой при этом большом нанесении (40 мкг) на фоне монотонного распределения длин видны пики мультиплетов нуклеосомного повтора (рис. 4, *b*, дорожки 2, 3). На этой стадии переваривания

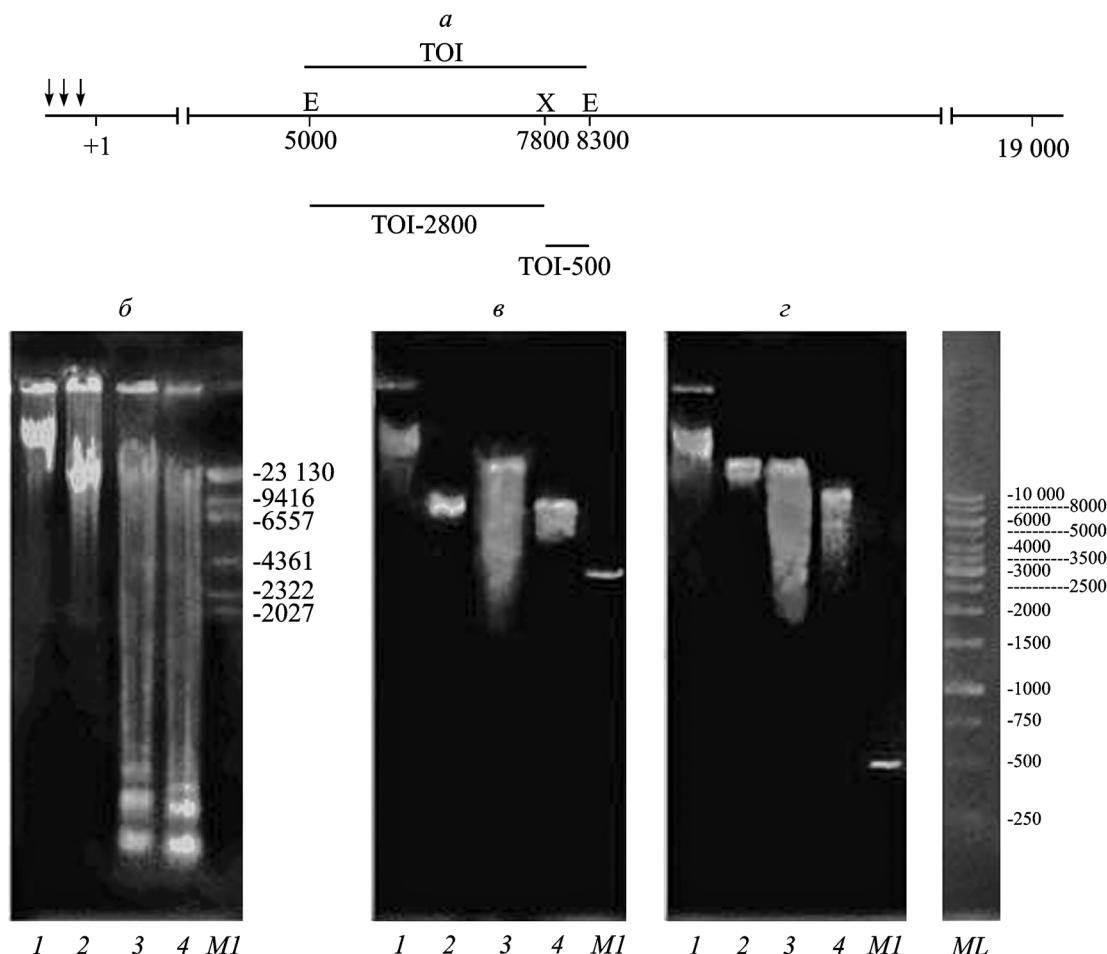


Рис. 2. Определение 5'- и 3'-границ фрагментов гена *to*, продуцируемых МНазой в ядрах клеток печени крыс, методом непрямого мечения концов ДНК.

a — Xba I (X) и Eco RI (E) сайты рестрикции в кодирующей области гена *to*, позиции зондов TO1-2800 и TO1-500; *b* — электрофореграмма фрагментов ДНК в 1%-ном агарозном геле; *c*, *d* — автографы после гибридизации с зондами TO1-2800 (*c*) и TO1-500 (*d*). Дорожки: 1, 2 — ДНК из ядер, инкубированных в отсутствие МНазы, исходная (1) и обработанная рестриктазой Xba I (2); 3 — ДНК из ядер, обработанных МНазой (120 A₂₆₀ ед. на 1 мг ДНК); 4 — та же ДНК после рестрикции Xba I; *M1* — фрагменты Hind III-рестрикции λ-ДНК (добавлено около 2 пкг не меченных TO1-2800 и TO1-500 ДНК); *ML* — 1 kb Ladder («Fermentas»).

обнаруживается «нуклеосомная дискретность» и фрагментов общего хроматина (рис. 4, *a*, *дорожки 2, 3*). Из сравнения данных на дорожках 4 и 5 (рис. 4, *г*) видно, что фрагменты *to*, продуцируемые в ядрах печени и мозга при одинаковых условиях (60 A₂₆₀ ед. МНазы), по-разному распределяются по длине геля: из ядер мозга — параллельно общей ДНК (рис. 4, *в*, *г*, *дорожка 4*), из ядер печени — преимущественно концентрируются в одном превалирующем пике высокополимерных компонентов (рис. 4, *г*, *дорожка 5*).

В интервале концентраций МНазы от 20 до 120 A₂₆₀ ед. выявляются три класса фрагментов МНазного переваривания гена *to* в ядрах печени (рис. 5, *б*, *дорожки 2—5*): полноразмерные единицы транскрипции, их крупные субфрагменты гетерогенной величины и минорная фракция низкомолекулярной *to*-ДНК. Последняя накапливается в диапазоне от 20 до 60 A₂₆₀ ед. МНазы (рис. 5, *б*, *дорожки 2, 3*, а также рис. 4, *б*, *дорожки 2, 3* и *г*, *дорожка 5*) и не сохраняется при достижении лимита в МНазном переваривании ДНК в составе ядер (рис. 5, *б*, *дорожки 4, 5*). В ядрах мозга, где ген *to* репрессирован, *to*-ДНК при действии МНазы распадается на фрагменты нуклеосомного ряда (рис. 6, *б*, *дорожки 2, 3*).

Наблюдаемая резистентность к действию МНазы не является спецификой только гена *to*. Другой ген — *tat*, который тоже дерепрессирован в печени крыс (Schmid et al., 1982), обнаружил сходный характер МНазной фрагментации (рис. 7). При 120 A₂₆₀ ед. МНазы *tat*-ДНК выявляется в пике высокополимерных фрагментов (от 1.5 до 10 тыс. п. н. или выше) (рис. 7, *б*, *дорожка 1*). При сверхвысоких концентрациях фермента (240—360 A₂₆₀ ед.) в гидролизатах сохраняются моно- и динуклеосомные фрагменты ДНК общего хроматина (рис. 7, *а*, *дорожки 2, 3*), тогда как ДНК кодирующей области *tat* практически полностью переходит в кислоторастворимую (или негибридизирующуюся) форму (рис. 7, *б*, *в*, *дорожки 2, 3*). Важно отметить, что на промежуточных стадиях этого перехода сохраняются наиболее крупные фрагменты *tat*. При этом не наблюдается накопления продуктов в виде мономеров или олигомеров нуклеосомного повтора. Максимальная длина МНазорезистентных областей в дерепрессированном гене *tat* по приблизительной оценке коррелирует с размерами его единиц транскрипции (11 тыс. п. н.; Shinomiya et al., 1984). В ядрах печени, инкубированных без МНазы, большая часть *tat*-ДНК представлена фрагментами такой длины (рис. 7, *б*, *в*, *дорожка 4*). Это показывает, что разрывы

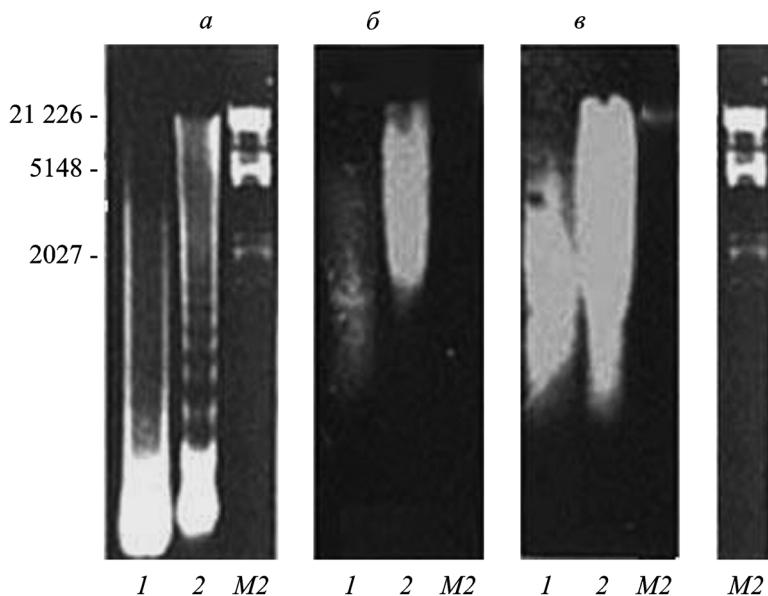


Рис. 3. Сравнение характера фрагментации ДНК общего хроматина и хроматина кодирующей области гена *to* в ядрах клеток печени крыс ДНКазой I и МНазой при концентрациях, обеспечивающих лимит в переваривании ДНК в составе ядер.
а — электрофореграмма фрагментов ДНК; б, в — автографы после гибридизации с зондом ТО1 при времени экспозиции рентгеновской пленки 1 (б) или 4 (в) ч. Дорожки: 1 — ДНК из ядер, инкубированных с ДНКазой I при концентрации 120 ед. на 1 мг ДНК; 2 — из ядер, инкубированных с МНазой при концентрации 120 A₂₆₀ ед. на 1 мг ДНК; M2 — фрагменты Hind III/EcoR I рестрикции λ-ДНК.

по границам единиц транскрипции *tat* происходят без участия этого фермента, тогда как их субфрагменты обра-зуются в результате МНазного действия.

Таким образом, при распаде общего хроматина до мо-но- и динуклеосом и достижении лимита МНазного пере-варивания (расщепления ДНК во всех потенциально до-

ступных сайтах) часть ДНК генов *to* и *tat* оказывается представленной фрагментами, сопоставимыми с длиной их единиц транскрипции (около 20 и 10 тыс. п. н., соот-ветственно 100 и 50 единиц в нуклеосомном экви-валенте). Сохранение в гидролизатах фрагментов активных генов такой величины указывает на то, что, по-видимому,

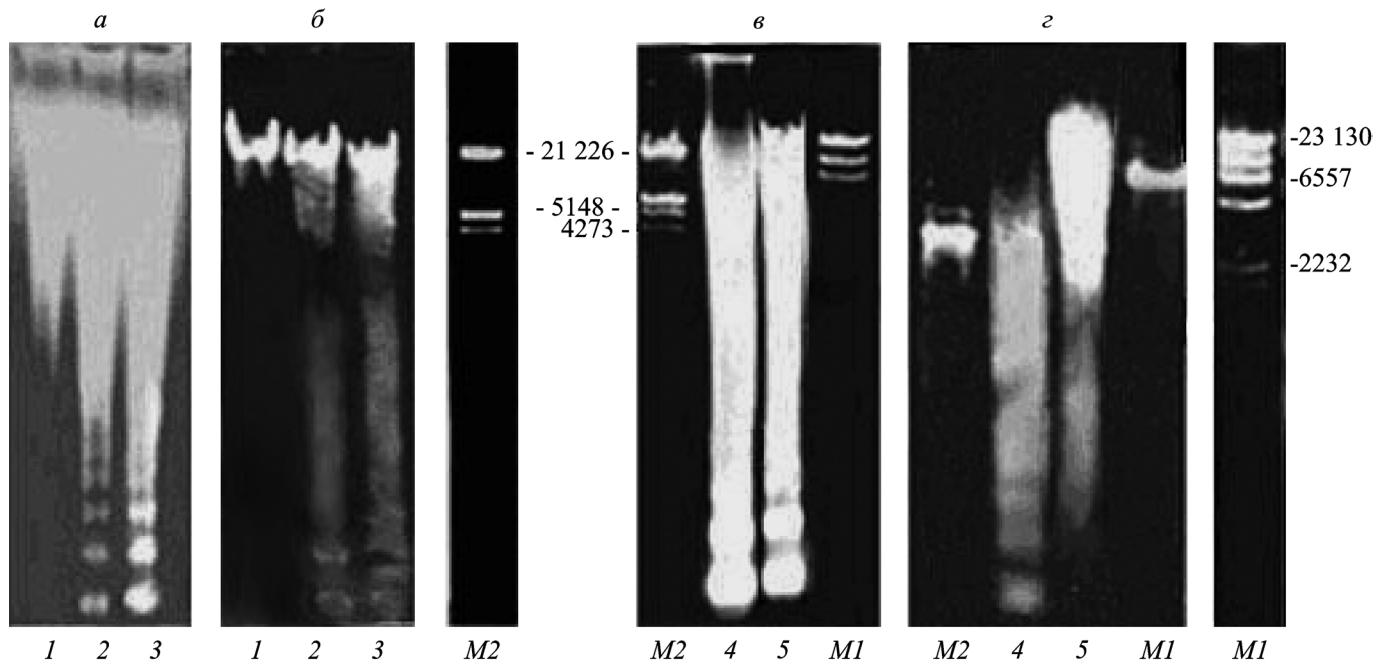


Рис. 4. Сравнение характера фрагментации ДНК общего хроматина и хроматина кодирующей области гена *to* в ядрах клеток печени и мозга крыс при низких концентрациях МНазы.

а, б — соответствуют обозначениям на рис. 1; в — электрофореграмма фрагментов ДНК из ядер печени и мозга крыс; г — автограф после гибридизации с зондом ТО1. Дорожки: 1—3 — ДНК из ядер клеток печени, обработанных МНазой при концентрациях соответственно 10, 20 и 40 A₂₆₀ ед. на 1 мг ДНК; 4, 5 — из ядер соответственно мозга и печени, обработанных МНазой при концентрации 60 A₂₆₀ ед. на 1 мг ДНК; M1 и M2 — фрагменты рестрик-ции Hind III λ-ДНК и Hind III/EcoR I λ-ДНК соответственно; к пробам M2 и M1 в качестве положительного контроля гибридизации добавлено около 2 пкг не меченный ТО1 ДНК и ДНК плазмиды pTO(E-3,3) соответственно.

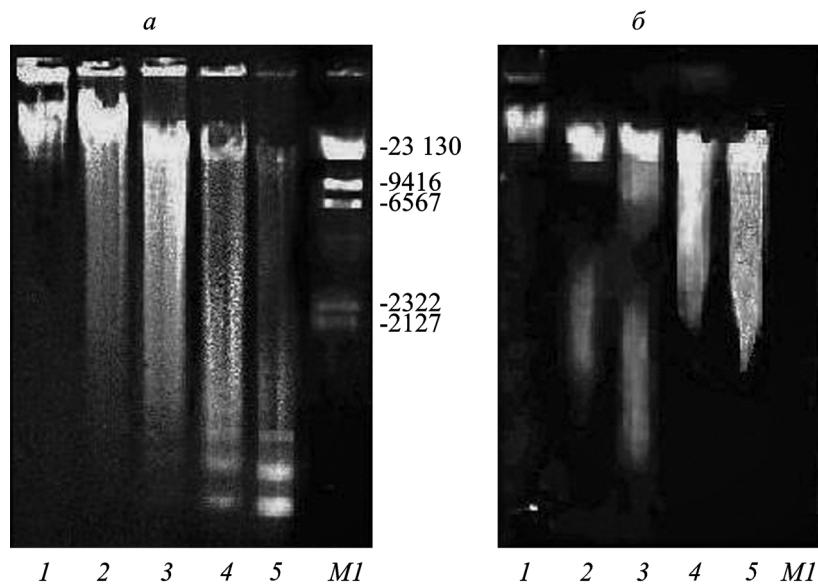


Рис. 5. Динамика фрагментации хроматина кодирующей области гена *to* в ядрах печени крыс при возрастании концентрации МНазы.

Дорожки: 1 — ДНК из ядер клеток печени, инкубированных в отсутствие МНазы; 2—5 — из ядер печени, обработанных МНазой при концентрациях соответственно 20, 40, 80 и 120 А₂₆₀ ед. на 1 мг ДНК. Остальные обозначения те же, что и на рис. 4.

нам удалось свести к минимуму влияние эндогенных ядерных ферментов и что наблюдаемые картины фрагментации адекватно отражают распределение доступных для МНазы сайтов в хроматине. Благодаря большой протяженности единиц транскрипции *to* и *tat* в сравнении с большинством исследованных до сих пор генов различие в характере доступности ДНК к МНазе в двух формах хроматина оказывается особенно выраженным и наглядным: МНазоустойчивые фрагменты активного (*to*- и *tat*-генов) и репрессированного (общего) хроматина печени оказываются контрастными по длине, занимают противоположные стороны электрофоретического спектра фрагментов (рис. 1, 3, 7).

Обсуждение

Согласно наиболее популярной модели, транскрипция РНК полимеразой II идет на нуклеосомной матрице при разворачивании нуклеосом во фронте движения полимеразы и ресборке позади нее (Clark, 1995; Belotserkovskaya, Reinberg, 2004; Hahn, 2004; Walter, Studitsky, 2004; Clapier, Cairns, 2009). Это означает, что на стадиях инициации и элонгации протяженные участки умеренно экспрессируемых генов транзитно сохраняют нуклеосомную организацию в конформации «струна бус». Это предположение исходит, в частности, из данных о том, что МНаза расщепляет ДНК ряда активных генов в составе клеточных ядер на мультиплеты нуклеосомного повтора или мононуклеосомы (Clark, 1995; Wolffe, 1998). При этом первые, освобождающиеся при МНазной фрагментации хроматина моно- и динуклеосомные частицы обогащены в 3—5 раз транскрибуируемыми последовательностями (Bellard et al., 1978; Bloom, Anderson, 1982; Rosha et al., 1984; Nacheva et al., 1989). Эти компоненты растворимы в средах различного состава и могут быть выделены в виде отдельной фракции, которая, однако, как правило, представляет собой лишь небольшую долю общего дерепресс-

ированного хроматина (Bellard et al., 1978; Rosha et al., 1984; Sträling et al., 1986).

При наших условиях выделения ядер и МНазной обработки в некоторых препаратах ядер печени обнаруживалась миорная фракция *to*- и *tat*-ДНК, распадающейся с нуклеосомной периодичностью (рис. 4, б; 7, в), которая, по всей вероятности, не отражает основного характера фрагментации хроматина этих генов как в компетентном, так и в транскрикционно активном состояниях.

На всем протяжении кодирующих областей генов *to* и *tat*, дерепрессированных в клетках печени, не обнаруживается нуклеазорезистентных компактных частиц,

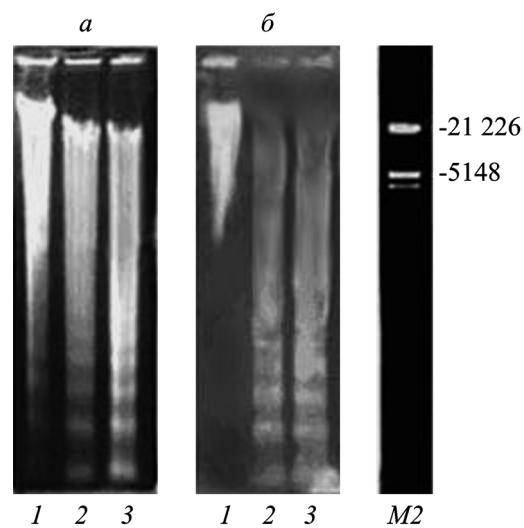


Рис. 6. Динамика фрагментации хроматина кодирующей области гена *to* в ядрах мозга крыс при возрастании концентрации МНазы.

Дорожки: 1—3 ДНК из ядер клеток мозга, обработанных МНазой при концентрациях соответственно 20, 40 и 80 А₂₆₀ ед. на 1 мг ДНК. Остальные обозначения те же, что и на рис. 4.

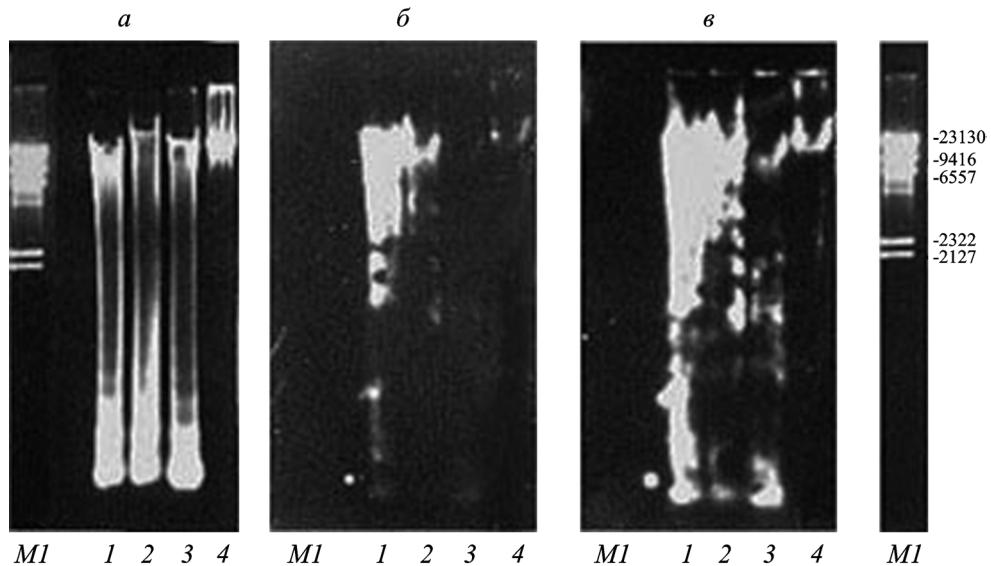


Рис. 7. Сравнение характера МНазной фрагментации ДНК общего хроматина и хроматина кодирующей области гена *tat* в ядрах печени крыс в интервале концентрации МНазы 120—360 А₂₆₀ ед. на 1 мг ДНК.

a, б, в—автографы с электрофорограммы после blot-гибридизации с зондом TAT1 при времени экспозиции рентгеновской пленки 1 (*б*) и 4 (*в*) ч. *Дорожки:* 1—3 — ДНК из ядер, инкубированных с МНазой при концентрациях соответственно 120, 240 и 360 А₂₆₀ ед. на 1 мг ДНК соответственно; 4 — ДНК из ядер, инкубированных без МНазы.

разделенных сегментами свободной ДНК (межнуклеосомными линкерами). Так, *to*- и *tat*-ДНК не выявляется в составе моно- и динуклеосомных фрагментов конечных стадий МНазного переваривания хроматина печени. Она представлена в высокополимерной части электрофоретического спектра (рис. 1, 3, 7). При сверхвысоких концентрациях ДНКазы I (рис. 3) или МНазы (рис. 7) в гидролизатах печени сохраняются фрагменты общего хроматина моно- или динуклеосомной длины, а ДНК генов *to* и *tat* генов практически полностью переходит в субнуклеосомные кислоторастворимые или негибридизующиеся фрагменты.

В широком диапазоне концентраций МНазы преимущественно продуцируются крупные сегменты генов *to* и *tat*, значительная часть которых близка к их полной длине. Как следует из данных рис. 2, последние включают полноразмерные единицы транскрипции. Важно отметить, что как полноразмерные единицы транскрипции, так и их субфрагменты обнаруживаются в гидролизатах при насыщающей концентрации МНазы, обеспечивающей лимит переваривания ДНК в составе хроматина (рис. 1, 3, 5, 7), т. е. ее расщепление практически во всех потенциально доступных сайтах хроматина. Сохранение обоих классов фрагментов при этих условиях показывает, что они происходят из двух разных видов единиц транскрипции, представленных в препаратах ядер печени: одни из них не содержат доступных для МНазы участков на всем своем протяжении, тогда как другие включают в себя редкие нерегулярно расположенные МНазочувствительные области.

Две формы единиц транскрипции, различающиеся по характеру МНазной протекции, возможно, отражают два функциональных состояния, в которых могут быть представлены гены *to* и *tat* в ядрах печени — компетентном к транскрипции и транскрибируемом (Reik et al., 1991). Логично предположить, что устойчивость ДНК к МНазе на всем протяжении кодирующих областей присуща тем *to*- и *tat*-копиям, которые нечитываются в данный момент

времени. Включение транскрипции приводит к появлению МНазочувствительных зон, которые, возможно, фланкируют элонгирующие РНК-полимеразы. После их расщепления остаются устойчивые к МНазе фрагменты гетерогенной длины, которые (по этой модели) представляют собой сегменты кодирующих последовательностей, лежащие между очагами транскрипции. Указанием на такое их происхождение в известной мере являются данные по фрагментации гена *to* при низких концентрациях МНазы (рис. 5, *б*), в частности параллельность в появлении первых крупных субфрагментов его кодирующей области и фракции низкомолекулярных МНазочувствительных (не видимых после интенсивного переваривания ядер: рис. 5, *б*, *дорожки 2—5*) фрагментов *to*.

В дрожжевых клетках компетентное состояние индуцируемых генов ограничивается изменениями хроматина только в регуляторных областях. Оно выражается в появлении сайтов гиперчувствительных к ДНКазе I и безнуклеосомных зон в специфических локализациях (Boeger et al., 2003; Reinke, Hörz, 2003; Williams, Tyler, 2007). Нуклеосомная структура хроматина кодирующих областей нарушается при транскрипции и восстанавливается сразу после удаления индуктора (Schwabish, Struhl, 2004; Adkins, Tyler, 2006; Williams, Tyler, 2007). В этом случае под действием ДНКазы I только около 50 % ДНК дерепрессированного гена переходит в кислоторастворимый материал в лимите переваривания хроматина ДНКазой I. При этом обнаруживаются участки фрагментации с полунуклеосомной периодичностью, соответствующие концам единиц транскрипции (Szent-Györgyi et al., 1987). При действии МНазы наблюдается перекрывание двух характеров — дискретного (нуклеосомного) и монотонной серии (Bergman, Kramer, 1983; Lohr, 1983; Perez-Ortin et al., 1987; Szent-Györgyi et al., 1987). Их соотношение, по-видимому, зависит от индекса индукции.

Возможно, что гены высших организмов, программированные в эмбриогенезе на экспрессию в специализированных клетках, не возвращаются в компактную нуклео-

сомную форму после временного истощения индуктора и прекращения транскрипции. Так, транскрипция β -глобинового гена останавливается при созревании эритроцитов. При этом хроматин его кодирующей области обнаруживает черты ремоделированной формы. Об этом свидетельствуют доступность всей нуклеосомной ДНК для переваривания ДНКазой I (Weintraub, Groudine, 1976) и представленность гистонов в гиперацетилированной форме (Schubeler et al., 2000). В одной работе показано (Ridsdale, Davie, 1987), что β -глобулиновый ген резистентен к действию МНазы — сохраняется в виде фрагментов, со-поставимых с длиной β -глобиновой единицы транскрипции после интенсивного МНазного переваривания ядер эритроцитов. В условиях транскрипции β -глобина в культуре эритролейкемических клеток наблюдается другой характер фрагментации его ДНК — продукция МНазоустойчивых фрагментов с монотонным распределением по длине (Cohen, Sheffery, 1985).

Сходный характер МНазной протекции обнаружен и для гена *hsp70* дрозофилы (Levy, Noll, 1981). В компетентном состоянии (в отсутствие шока) ДНК его кодирующей области сохраняется в МНазных гидролизатах как целостный фрагмент длиной около 2000 п. н. с границами, примыкающими к 5'- и 3'-концам единицы транскрипции. При тепловом шоке ДНК переваривается до кислоторасторимых продуктов.

Илгин с соавторами (Elgin et al., 1983) при картировании позиций нуклеосом в области 67B1 генома дрозофилы, включающей в себя три гена *hsp*, также обнаружили, что при определенных условиях действия МНазы единицы транскрипции всех трех генов выявляются в гидролизатах как резистентные зоны (футпринты в спектре фрагментов), не содержащие в отличие от спайсерного хроматина доступных для МНазы участков, соответствующих межнуклеосомным линкерам.

«Ненуклеосомный характер» (Cohen, Sheffery, 1985) фрагментации (отсутствие нуклеосомной дискретности длины фрагментов, продуцируемых МНазой) наблюдали для многих генов, дерепрессированных в специализированных клетках, как индуцильных, так и конститтивно экспрессируемых: актина (Elgin et al., 1983), овалбумина (Bellard et al., 1982; Bloom, Anderson, 1982), α - и β -глобинов (Cohen, Sheffery, 1985), иммуноглобулинов (Rose, Garrard, 1984), лизоцима (Sträpling et al., 1986). Однако неясно, на какой ступени активации гена возникают наблюдаемые изменения в характере доступности ДНК к нуклеазам на всем протяжении единиц транскрипции и требуется ли для этого перехода хотя бы единичный рэнд транскрипции. Наши данные для генов *to* и *tat* и ряд других (Weintraub, Groudine, 1976; Foe, 1978; Levy, Noll, 1981; Elgin et al., 1983; Rose, Garrard, 1984; Cohen, Sheffery, 1985; Ridsdale, Davie, 1987; Zhao et al., 2005; Williams, Tyler, 2007) позволяют предполагать, что в этой *in vivo* ремоделированной форме повторяющиеся структурные единицы хроматина не подразделяются на «коровую» и линкерную области, различающиеся по доступности ДНК к нуклеазам. На протяженных участках умеренно экспрессируемых генов вся нуклеосомная ДНК расщепляется ДНКазой I и одновременно не обнаруживает сайтов для МНазных разрывов, соответствующих межнуклеосомным линкерам.

Две нуклеазы различаются по способу нуклеолитического действия (Drew, 1984). ДНКаза I вводит в свободную ДНК и ДНК коровой части нуклеосомы однонитевые надрезы (ники) (Noll, 1974; Noll, Kornberg, 1977). Расщеп-

ление двойной спирали является результатом совпадений их позиций на комплементарных цепях. МНаза осуществляет симметричный двухцепочечный разрыв. Обе нуклеазы могут фрагментировать репрессированный хроматин только по межнуклеосомным линкерам (Hewish, Burgoyne, 1973; Noll, 1974; Varshavsky et al., 1976; Noll, Kornberg, 1977; Simpson, 1978; Wolffe, 1998).

Высокая вероятность двухнитевых разрывов внутрикоровой ДНК ДНКазой I в хроматине дерепрессированных генов (распада до кислоторасторимых продуктов) (Weintraub, Groudine, 1976; Bloom, Anderson, 1978, 1982; Garel, Axel, 1978) свидетельствует об освобождении фосфодиэфирных связей, экранированных гистонами в компактных частицах. Однако ДНК остается недоступной для МНазного действия — разрыва двух связей, противолежащих на двойной спирали. При этом зона резистентности распространяется на всю длину структурной единицы хроматина.

Если петельные устройства, образованные полипептидной цепью каждого гистона (Arents, Moudrianakis, 1995), лежат на ДНК, блокируя половину поверхности двойной спирали (Shick et al., 1980; Richmond et al., 1984; Nacheva et al., 1989), то освобождение фосфодиэфирных связей может быть следствием расхождения α -спиральных складок, преобразования октамера в линейную двухцепочечную структуру, перекрывающую всю нуклеосомную ДНК и сохраняющую с ней ограниченный контакт, который может прерываться в центрах транскрипции. Эта интерпретация требует дополнительного экспериментального подтверждения. Вопрос об организации нуклеогистоновой матрицы в компетентном к транскрипции состоянии и в очагах транскрипции пока остается открытым.

Список литературы

- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. 1984. Методы генной инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 480 с.
- Чихиржина Г. И., Федорова С. А., Чесноков И. Н., Романовская Е. В. 1993. Ядерные белки, специфически связывающиеся с регуляторной областью гена *to*. Биохимия. 58 : 392—398.
- Adkins M. W., Tyler J. K. 2006. Transcriptional activators are dispensable for transcription in the absence of Spt-mediated chromatin reassembly of promoter regions. Mol. Cell. 21 : 405—416.
- Arents G., Moudrianakis E. N. 1995. The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 92 : 11 170—11 174.
- Baer B. W., Rhodes D. 1983. Eukaryotic RNA polymerase II binds to nucleosome cores from transcribed genes. Nature. 301 : 482—488.
- Becker P., Renkawitz R., Schütz G. 1984. Tissue-specific DNA-se I hypersensitive sites in the 5'-flanking sequences of the tryptophan oxygenase and the tyrosine aminotransferase genes. EMBO J. 3 : 2015—2020.
- Bellard M., Cannon F., Chambon P. 1978. Nucleosome structure III: the structure and transcriptional activity of the chromatin containing the ovalbumin and globin genes in chick oviduct nuclei. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42 : 779—791.
- Bellard M., Dretzen G., Bellard F., Oudet P., Chambon P. 1982. Disruption of the typical chromatin structure in a 2500 base-pair region at the 5' end of the actively transcribed ovalbumin gene. EMBO J. 1 : 223—230.
- Belotserkovskaya R., Reinberg D. 2004. Facts about FACT and transcript elongation through chromatin. Curr. Opin. Gen. Develop. 14 : 139—146.

- Bergman L. W., Kramer R. A. 1983. Modulation of chromatin structure associated with derepression of the acid phosphatase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 258 : 7223—7227.
- Bloom K. S., Anderson J. N. 1978. Conformations of ovalbumin and globin genes in chromatin during differential gene expression. *J. Biol. Chem.* 254 : 10 532—10 539.
- Bloom K. S., Anderson J. N. 1982. Hormonal regulation of the conformation of the ovalbumin gene in chick oviduct chromatin. *J. Biol. Chem.* 257 : 13 018—13 027.
- Boeger H., Griesenbeck J., Strattan J. S., Kornberg R. D. 2003. Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter. *Mol. Cell.* 11 : 1587—1598.
- Caplan A., Kimura T., Gould H., Allan J. 1987. Perturbation of chromatin structure in the region of the adult beta-globin gene in chicken erythrocyte chromatin. *J. Mol. Biol.* 193 : 57—70.
- Clapier C. R., Cairns B. R. 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 78 : 273—304.
- Clark D. J. 1995. Transcription through the nucleosome. In: *The Nucleus*. Greenwich: JAI Press Inc. 1 : 207—239.
- Cohen R. B., Sheffery M. 1985. Nucleosome disruption precedes transcription and is largely limited to the transcribed domain of globin genes in murine erythroleukemia cells. *J. Mol. Biol.* 182 : 109—129.
- Conconi A., Ryan C. A. 1993. DNase I and micrococcal nuclelease analysis of the tomato proteinase inhibitor 1 gene in chromatin. *J. Biol. Chem.* 268 : 430—435.
- Drew H. R. 1984. Structural specificities of five commonly used DNA nucleases. *J. Mol. Biol.* 176 : 535—557.
- Elgin S. C. R., Cartwright I. L., Fleischmann G., Lowenhaupt K., Keene M. A. 1983. Cleavage reagents as probes of DNA sequence organization and chromatin structure: *Drosophila melanogaster* locus 67B1. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47 : 529—538.
- Foe V. E. 1978. Modulation of ribosomal RNA synthesis in *Oncopeltus fasciatus*: an electron microscopic study of the relationship between changes in chromatin structure and transcriptional activity. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42 : 723—740.
- Garel A., Axel R. 1978. The structure of the transcriptionally active ovalbumin genes in chromatin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42 : 701—708.
- Gottesfeld J. M., Melton D. A. 1978. The length of nucleosome-associated DNA is the same in both transcribed and nontranscribed regions of chromatin. *Nature.* 273 : 317—319.
- Hahn S. 2004. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 : 394—403.
- Hamkalo B. A., Miller O. L., Bakken A. H. 1974. Ultrastructure of active eukaryotic genomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38 : 915—919.
- Hewish D. R., Burgoyne L. A. 1973. Chromatin substructure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52 : 504—510.
- Kohno K., Yamamoto M., Endo H. 1983. Transcription renders chromatin resistant to micrococcal nuclease digestion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116 : 3122—3130.
- Kornberg R. D. 1974. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. Chromatin structure is based on a repeating unit of eight histone molecules and about 200 DNA base pairs. *Science.* 184 : 868—871.
- Levy A., Noll M. 1981. Chromatin fine structure of active and repressed genes. *Nature.* 289 : 198—203.
- Lohr D. 1983. Chromatin fine structure of actively expressed, single copy yeast gene. *Nucl. Acids Res.* 11 : 6755—6773.
- Luger K., Maeder A. W., Richmond R. K., Sargent D. E., Richmond T. J. 1997. X-ray structure of nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 389 : 251—259.
- McKnight S. L., Bustin M., Miller O. L. 1978. Electron microscopic analysis of chromosome metabolism in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42 : 741—754.
- Nacheva G. A., Guschin D. Y., Preobrazhenskaya O. V., Kar-pov V. L., Ebralidse K. K., Mirzabekov A. D. 1989. Change in the pattern of histone binding to DNA upon transcriptional action. *Cell.* 58 : 27—36.
- Nedospasov S. A., Georgiev G. P. 1980. Non-random cleavage of SV 40 DNA in compact minichromosome and free in solution by micrococcal nuclease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92 : 532—539.
- Noll M. 1974. Internal structure of the chromatin subunit. *Nucl. Acids Res.* 1 : 1573—1578.
- Noll M., Kornberg R. D. 1977. Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1. *J. Mol. Biol.* 109 : 393—404.
- Ong M. S., Richmond T. J., Davey C. A. 2007. DNA stretching and extreme kinking in the nucleosome core. *J. Mol. Biol.* 368 : 1067—1074.
- Perez-Ortin J. E., Estruch F., Matallana E., Franco L. 1987. Fine analysis of the chromatin structure of the yeast *SUC2* gene and of its changes upon derepression. Comparison between the chromosomal and plasmid-inserted genes. *Nucl. Acids Res.* 15 : 6937—6956.
- Reeves R. 1976. Ribosomal genes of *Xenopus laevis*: evidence of nucleosomes in transcriptionally active chromatin. *Science.* 194 : 529—532.
- Reik A., Schütz G., Stewart A. F. 1991. Glucocorticoids are required for establishment and maintenance of an alteration in chromatin structure: induction leads to a reversible disruption of nucleosomes over an enhancer. *EMBO J.* 10 : 2569—2576.
- Reinke H., Hörz W. 2003. Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated *PHO5* promoter. *Mol. Cell.* 11 : 1599—1607.
- Richmond T. J., Finch J. T., Rushton B., Rhodes D., Klug A. 1984. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature.* 311 : 532—537.
- Ridsdale J. A., Davie J. R. 1987. Chicken erythrocyte polynucleosomes which are soluble at physiological ionic strength and contain linker histones are highly enriched in β-globin sequences. *Nucl. Acids Res.* 15 : 1081—1096.
- Rose S. M., Garrard W. T. 1984. Differentiation-dependent chromatin alteration precede and accompany transcription of immunoglobulin light chain genes. *J. Biol. Chem.* 259 : 8534—8544.
- Rosha E., Davie J. R., Van Hold K. E., Weintraub H. 1984. Differential salt fractionation of active and inactive genomic domains in chicken erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 259 : 8558—8563.
- Schmid W., Sherer G., Danesch U., Zentgraf H., Matthias P., Strange C. M., Röwkamp W., Schütz G. 1982. Isolation and characterization of the rat tryptophan oxygenase gene. *EMBO J.* 1 : 1287—1293.
- Schubeler D., Francastel C., Cimbora D. M., Reik A., Martin D. I. K., Groudine M. 2000. Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human β-globin locus. *Genes Develop.* 14 : 940—950.
- Schwabish M. A., Struhl K. 2004. Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 24 : 10111—10117.
- Sheer U. 1987. Structure of lampbrush chromosome loops during different states of transcriptional activity as visualized in the presence of physiological salt concentrations. *Biol. Cell.* 59 : 33—42.
- Shick V. V., Belyavsky A. V., Bavykin S. G., Mirzabekov A. D. 1980. Primary organization of the nucleosome core particle. Sequential arrangement of histones along DNA. *J. Mol. Biol.* 139 : 491—517.
- Shinomiya T., Sherer G., Schmid W., Zentgraf H., Schütz G. 1984. Isolation and characterization of the rat tyrosine aminotransferase gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 81 : 1346—1350.
- Simpson R. T. 1978. Structure of chromatosome, a chromatin particle containing 160-base pairs of DNA and all histones. *Biochemistry.* 17 : 5524—5533.
- Sträling W. H., Dölle A., Sippel A. E. 1986. Chromatin structure of the chicken lysozyme gene domain as determined by chromatin fractionation and micrococcal nuclease digestion. *Biochemistry.* 25 : 495—502.

- Szent-Györgyi Ch., Finkelstein D. B., Garrard W. T. 1987. Sharp boundaries demarcate the chromatin structure of a yeast heat-shock gene. *J. Mol. Biol.* 193 : 71—80.
- Toussaint M., Levasseur G., Tremblay M., Paquette M., Concony A. 2005. Psoralen photocrosslinking, a tool to study the chromatin structure of RNA polymerase I-transcribed ribosomal genes. *Biochem. Cell Biol.* 83 : 449—459.
- Varshavsky A. J., Bakaev V. V., Gergiev G. P. 1976. Heterogeneity of chromatin subunits in vitro and location of histone H1. *Nucl. Acids Res.* 3 : 477—484.
- Walter W., Studitsky V. M. 2004. Construction, analysis, and transcription of model nucleosomal templates. *Methods.* 33 : 18—24.
- Weintraub H., Groudine M. 1976. Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science.* 193 : 846—856.
- Weischet W. G., Glotov B. O., Zachau H. G. 1983. Protection of expressed immunoglobulin genes against nuclease cleavage. *Nucl. Acids Res.* 11 : 3583—3612.
- Widmer R. M., Lucchini R., Lezzi M., Meyer B., Sogo J. M., Edstrom J. E., Koller T. 1984. Chromatin structure of a hyperactive secretory protein gene (in Balbiany ring 2) of Chironomus. *EMBO J.* 3 : 1635—1641.
- Williams S. K., Tyler J. K. 2007. Transcriptional regulation by chromatin disassembly and reassembly. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 17 : 88—93.
- Wolffe A. 1998. Chromatin: structure and function. New York: Acad. Press.
- Zhao J., Herrera-Diaz J., Gross D. S. 2005. Domain-wide displacement of histones by activated heat shock factor occurs independently of Swi/Snf and is not correlated with RNA polymerase II density. *Mol. Cell. Biol.* 25 : 8985—8999.

Поступила 20 IX 2010

FRAGMENTATION OF THE CODING REGION CHROMATIN OF TRP-DIOXYGENASE (*TO*)
AND TYR-AMINOTRANSFERASE (*TAT*) GENES IN THEIR ACTIVE
AND REPRESSED STATE BY MICROCOCCAL NUCLEASE

T. N. Priyatkina,¹ E. Ju. Pavlova, N. E. Voynova, E. V. Deforges

St. Petersburg State University; ¹ e-mail: tpriyatkina@mail.ru

The blot-hybridization technique-assisted we have studied the pattern of fragmentation by mirococcal nuclease (MNase) of DNA tyr-aminotransferase (*tat*) and trp-dioxygenase (*to*) genes in active (in rat cell liver nuclei) and repressed (in brain nuclei) states. It was provided, over a wide range of enzyme concentration two types of fragments are mainly produced: near full-size *to*- and *tat*-transcription unit (19 000 and 11 000 bp, respectively) and their large (from 1500 bp) heterogeneous in length. *To*-and *tat*-fragments of both kinds are preserved in hydrolyzates at limit of MNase digestion of total chromatin DNA when nuclease breaks occur in nearly all accessible sites of chromatin. This means that these fragments originate from two distinct subsets of transcription units coexistent in liver nuclei. The first of them do not contain MNase accessible sites over their entire length, whereas in other resistant regions alternate with rare irregular located MNase-sensitive segments. We presume that resistance to MNase within transcription units is peculiar to the competent genes. As a result of transcription MNase-sensitive areas arise which possibly flank elongating RNA polymerases.

Key words: chromatin competence to transcription, nuclease fragmentation, remodeling of nucleosomes.