

УДК 577

Открытие ядерной ДНК-подобной РНК (дРНК, гяРНК) и рибонуклеопротеидных частиц, содержащих гяРНК

Г. П. Георгиев

Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

С 9 по 11 августа 2014 г. проводился специальный симпозиум в Колд Спринг Харборе (США), посвященный открытию матричной, или информационной, РНК и основным тенденциям в дальнейшем изучении ее синтеза, регуляции синтеза, созревания и транспорта. Существование мРНК у бактерий на основании генетических исследований предположили в 1961 г. Жакоб и Моно [1], и в том же году Бреннер и соавт. подтвердили это предположение [2]. Наша лаборатория сыграла ключевую роль в открытии информационной РНК у эукариот, а также содержащих ее ядерных рибонуклеопротеидов с расшифровкой их структурной организации. Поэтому я был приглашен на симпозиум от России, и перечисленным вопросам должен был быть посвящен мой доклад. Однако виза была выдана уже после окончания симпозиума, и доклад был зачитан моим бывшим сотрудником Г.Н. Ениколоповым, работающим в лаборатории Колд Спринг Харбора. Ниже приведен перевод этого доклада на русский язык.

ОТКРЫТИЕ ЯДЕРНОЙ дРНК

Работы, о которых пойдет речь, были начаты моей группой в лаборатории И.Б. Збарского в Институте морфологии животных им. А.Н. Северцова АН СССР. Основная же их часть была выполнена в Институте молекулярной биологии АН СССР, куда в качестве заведующего лабораторией меня пригласил его директор В.А. Энгельгардт, чьим именем позднее был назван этот институт.

Моим основным сотрудником в открытии ядерной дРНК была В.Л. Мантьева, позднее кандидат биологических наук. Нас интересовала природа ядерной РНК [3]. Для выделения РНК использовали недавно разработанный фенольный метод [4]. Суспензию клеток асцитного рака Эрлиха

мышей в 0.14 М NaCl встряхивали с фенолом, рН 6.0, на холоду, а затем центрифугировали смесь. Неожиданно мы обнаружили, что промежуточный слой, образующийся после центрифугирования между водной и фенольной фазами, состоит из сохранивших свою форму клеточных ядер [5]. Эти ядра содержали хроматин и ядрышки, в которых сохраняются ДНК, ядерная РНК и большая часть ядерных белков (рис. 1). Поскольку фенол подавляет активность ферментов, мы предположили, что «фенольные» ядра могут служить хорошим материалом для приготовления ядерной РНК. В дальнейшем оказалось, что ядерную РНК из «фенольных» ядер можно извлечь с помощью той же про-



Директор Института молекулярной биологии АН СССР В.А. Энгельгардт с автором

цедуры, но осуществляя встряхивание при температуре 65°C [3]. Выделенная ядерная РНК содержала в своем составе компоненты с коэффициентом седиментации 28S и 18S, характерные для рибосомной РНК, и гетерогенный материал. Нуклеотидный

состав ядерной РНК был промежуточным между ДНК мыши ($G+C/A+T = 0.72$) и рибосомной РНК ($G+C/A+T = 1.65$) (рис. 1). Мы предположили, что ядерная РНК представлена рибосомной РНК и новым типом РНК, нуклеотидный состав которой сходен с составом ДНК, т.е. информационной РНК. Первые же опыты по фракционированию ядерной РНК, выполненные в 1961 г., подтвердили это предположение [3].

Наилучшее разделение дал разработанный в 1962 г. метод термического фенольного фракционирования, т.е. обработки фенольных ядер смесью 0.14 М NaCl-фенол, pH 6.0, при ступенчато повышающейся температуре [6]. При 40°C в водную фазу переходила чистая РНК с нуклеотидным составом, соответствующим рибосомной РНК (рРНК), которая содержала предшественники рибосомной РНК. В температурном интервале 55–65°C в водной фазе обнаруживалась чистая РНК, имеющая нуклеотидный состав, сходный с составом ДНК ($G+C/A+U = 0.7-0.74$). Существенно, что нуклеотидный состав тотальной РНК выделенной фракции и присутствующей в ее составе новообразованной РНК, определяемый по меченой радиоактивным фосфором РНК, полностью совпадал [7, 8] (таблица). Открытая и очищенная ДНК-подобная РНК была названа дРНК. Описавшие эту РНК тремя годами позднее (в 1965 г.) американские авторы обозначили ее термином гетерогенная ядерная РНК (hnRNA, или гяРНК) [9–12].

Далее мы охарактеризовали ядерную дРНК. Она оказалась весьма гетерогенной по молекулярному весу, который достигал очень высокого уровня. Новообразованная ядерная дРНК имела значительно более высокий молекулярный вес, чем тотальная ядерная дРНК, что предполагало

Выделение ядерной дРНК методом фенольного термического фракционирования

Фракции РНК (ДНК)	G	C	A	U(T)	$G+C / A+U(T)$
ДНК мыши	21	21	29	29	0.72
Цитоплазматическая, 4°C	32	30	20	18	1.63
Ядерная, 4–40°C	32	29	20	19	1.50
Ядерная, 55–65°C, тотальная	23	20	28	29	0.76
Новообразованная ядерная, 55–65°C	21	20	29	30	0.71

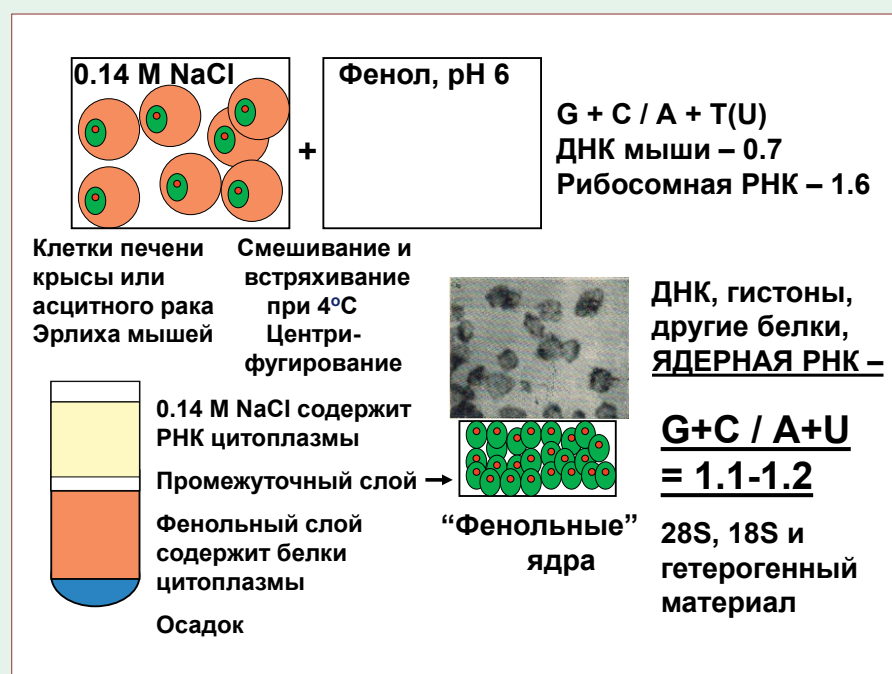


Рис. 1. Получение и свойства «фенольных» клеточных ядер. Слева – схема получения клеточных ядер путем обработки фенолом. Приведена фотография «фенольных» ядер из клеток асцитного рака Эрлиха. Справа – состав полученных ядер и свойства их РНК: нуклеотидный состав, промежуточный между ДНК и рРНК, и данные ультрацентрифугирования

ее расщепление в клеточном ядре (процессинг) [7, 8] (рис. 2).

В то же время мы определили размеры дРНК цитоплазмы, предположительно, зрелой мРНК. Для этого был разработан метод частичного блока синтеза РНК актиномицином Д, малые дозы которого избирательно подавля-

ют синтез рРНК, не затрагивая синтез дРНК. Молекулярный вес новообразованной дРНК ядра существенно превышал таковой у дРНК цитоплазмы [7, 8] (рис. 2).

Наконец, были проведены опыты по гибридизации и конкуренции ядерной дРНК и цитоплазматической мРНК с ДНК.

Добавление ядерной дРНК полностью подавляло гибридизацию мРНК с ДНК, тогда как избыток мРНК лишь частично снижал гибридизацию ядерной дРНК с ДНК (рис. 2).

Мы предположили, что ядерная дРНК является высокомолекулярным предшественником цитоплазматической мРНК, или про-мРНК, которая частично разрушается в ходе процессинга дРНК и созревания мРНК, что происходит в клеточном ядре, откуда мРНК экспортируется в цитоплазму. Окончательное доказательство этого потребовало нескольких лет и усилий ряда лабораторий. Однако первое доказательство существования информационной РНК у эукариот было получено в описанных работах [6–8].

**ОТКРЫТИЕ
РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДНЫХ (РНП)
ЧАСТИЦ: дРНП (гяРНП)**

Следующим шагом стало изучение состояния ядерной дРНК в клеточном ядре. Моим главным соавтором в этом цикле работ была О.П. Самарина, позднее доктор биологических наук, профессор, лауреат Ленинской премии.

Для изучения структур, содержащих гяРНП, использовали мягкую процедуру. Ядра печени крысы экстрагировали 0.14 М NaCl, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ трис-буфером, рН 7.0. Некоторая часть РНК переходила в экстракт, и ее нуклеотидный состав был промежуточным между рРНК и дРНК. Зато последующая трехкратная экстракция тем же раствором, но при рН 7.8–8.0 переводила в раствор значительно большую часть РНК, причем эта РНК имела нуклеотидный состав такой же, как у чистой дРНК. ДНК-подобный состав был характерен и для тотальной, и для новообразованной РНК экстракта [13].

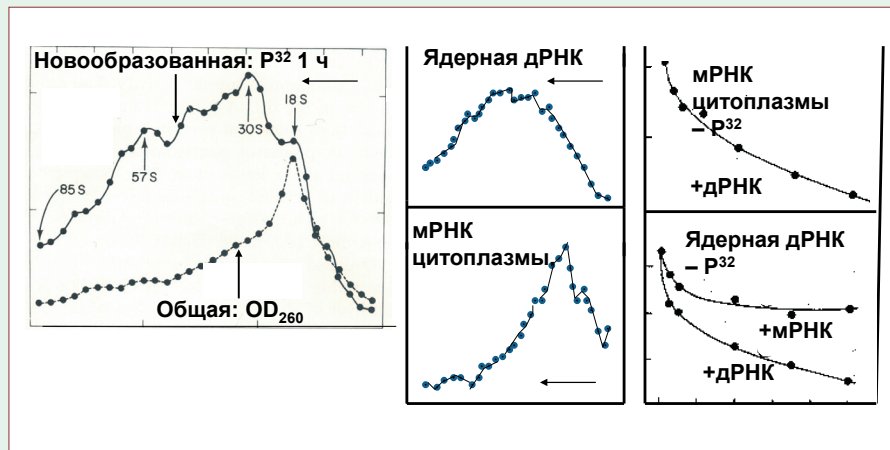


Рис. 2. Характеристика ядерной дРНК. Слева – ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы ядерной дРНК, меченой в течение 1 ч P³². Видно, что молекулярный вес меченой дРНК существенно выше, чем у тотальной дРНК, определяемой по оптической плотности. Здесь и далее тонкие стрелки указывают направление ультрацентрифугирования. В центре – сравнение молекулярных весов меченой в течение 1 ч ядерной дРНК и меченой в течение того же времени мРНК цитоплазмы. Первая имеет значительно больший молекулярный вес. Справа – гибридизация меченой мРНК цитоплазмы и ядерной дРНК с ДНК в конкуренции с немеченой ядерной дРНК и цитоплазматической мРНК

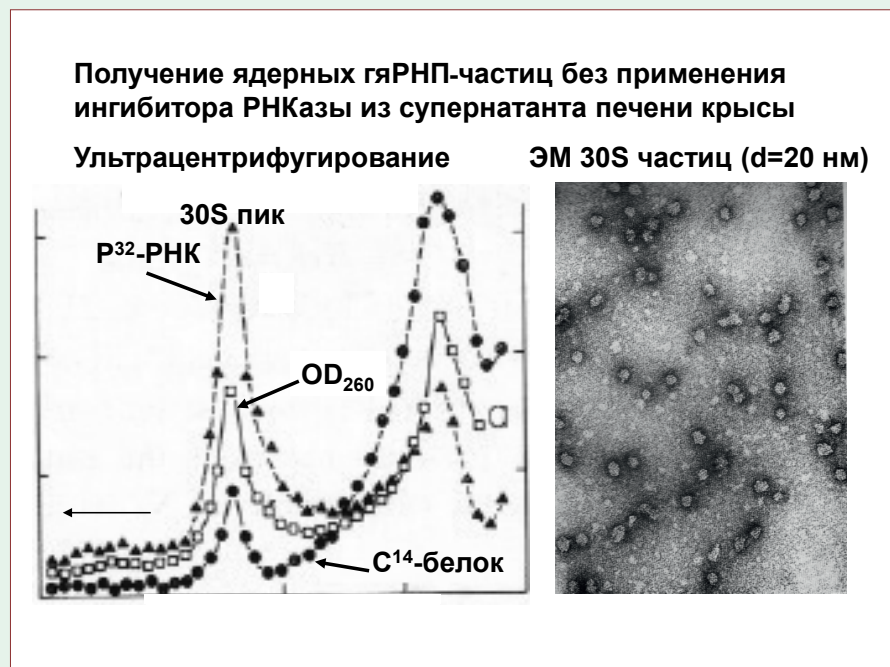


Рис. 3. Свойства ядерных гяРНП-частиц, полученных на первом этапе работы. Слева: ультрацентрифугирование в сахарозном градиенте ядерных экстрактов, содержащих гяРНП. РНК метили P³²-ортофосфатом, белок смесью C¹⁴-аминокислот. Справа – электронная микроскопия 30S частиц из сахарозного градиента

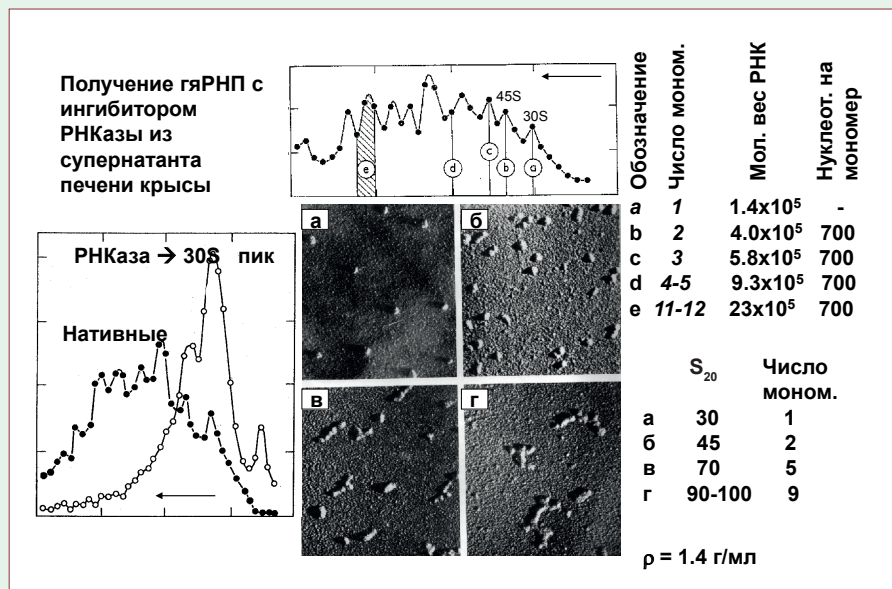


Рис. 4. Свойства ядерных гяРНП-поличастиц. Слева – распределение при ультрацентрифугировании гяРНП, полученных при подавлении РНКазы. Превращение поличастиц в 30S мономеры при мягкой обработке РНКазой. Справа сверху – поличастицы, молекулярный вес РНК, выделенной из частиц с разным числом мономеров, и число нуклеотидов, приходящихся на один мономер. Внизу справа – ЭМ (напыление) частиц из разных областей градиента, коэффициенты седиментации и число мономеров. Плавающая плотность одинакова для всех частиц (1.4)

При ультрацентрифугировании большая часть гяРНК обнаруживалась в гомогенном 30S пике, содержащем частицы с диаметром около 20 нм. Молекулярный вес РНК, выделенной из 30S пика, был незначительным (рис. 3). Это противоречило данным о весьма высоком молекулярном весе гяРНК, выделенной фенольным фракционированием. Чтобы разрешить это противоречие, мы провели выделение экстрактов в присутствии ингибитора РНКаз из супернатанта цитоплазмы печени крысы. Совершенно иной была картина ультрацентрифугирования таких экстрактов: выявлена целая серия пиков, начиная с небольшого 30S пика и кончая материалом с коэффициентом седиментации 200S и выше (рис. 4). Очевидно, что такая ситуация была много ближе к нативной [14].

Интересно, что и 30S пик, и все более тяжелые пики имели одинаковую плавающую плотность в CsCl (после фиксации формальдегидом), равную примерно 1.4 г/мл, что соответствует отношению РНК/белок порядка 1 : 4–1 : 5.

Далее мы охарактеризовали крупные частицы. Мягкая обработка рибонуклеазой А количественно превращала их в 30S частицы диаметром 20 нм, которые являются, таким образом, мономером поличастиц. Действительно, электронная микроскопия с напылением показала, что 30S частицы представляют собой мономеры, 45S частицы – димеры, 70S частицы – пентамеры, а 90–100S пик содержит поличастицы, состоящие из 9 мономеров. Определение размеров РНК, выделенной из разных пиков, показало,

что во всех случаях на мономер приходится отрезок РНК длиной примерно 700 нуклеотидов. Это согласуется с тем, что плавающая плотность всех пиков гяРНП одинакова (рис. 4).

Таким образом, гяРНП представляют собой цепи сходных РНП-частиц, соединенных мостиками РНК, которые наиболее чувствительны к обработке рибонуклеазой [15].

Чтобы лучше понять структуру гяРНП-частиц, мы изучили структуру 30S мономера. Интенсивная обработка рибонуклеазой полностью разрушает РНК 30S частиц, что предполагает ее поверхностную локализацию. Далее белки 30S частиц метили I^{125} и обрабатывали 30S частицы 2 М NaCl, который вызывает диссоциацию РНК и белка. При ультрацентрифугировании вся гяРНК оставалась в верхних фракциях, тогда как белок открывался в том же 30S пике, несмотря на удаление РНК. Плавающая плотность 30S частиц соответственно падала до 1.34 г/см^3 [1–6] (рис. 5).

При смешивании белковых частиц с гяРНК и удалении диализом 2 М NaCl происходит реконструкция гяРНП-частиц, не отличимых от исходных по целому ряду тестов. При электронной микроскопии исходные 30S частицы, белковые частицы и реконструированные гяРНП выглядят одинаково (рис. 5). При реконструкции в присутствии гяРНК размером около 1.4 тыс. нуклеотидов образуются димерные гяРНП [15]. Белковые 30S частицы были названы информоферами (носители информационной РНК), но этот термин в литературе не удержался.

Информоферы представляют собой белковые комплексы, содержащие примерно 20 белков с молекулярным весом около 40 кДа, относящихся, по данным других авторов, к шести разным типам

[16]. Был сделан вывод, что ядерные гяРНП – это длинные гяРНК, регулярно намотанные на поверхность серии похожих или одинаковых белковых глобулярных частиц. Подобная структура приводит к сильной компактизации длинных гяРНК, в то же время оставляя ее доступной для взаимодействия с более специфичными факторами, участвующими в процессинге и экспорте РНК.

Интересно, что сходный принцип организации позднее обнаружили и в нуклеосомах хроматина [17].

ДАЛЬНЕЙШЕЕ РАЗВИТИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ мРНК В ИНСТИТУТЕ БИОЛОГИИ ГЕНА РАН

Автор статьи далее переключился на другие проблемы, связанные с организацией генома (открытие и характеристика мобильных генетических элементов в клетках животных) и хроматина. Однако изучение регуляции синтеза гяРНК и экспорта мРНК активно развивается в организованном 25 лет назад Институте биологии гена РАН, где является основным направлением. Другое важное направление, разрабатываемое в Институте, – новые подходы к терапии рака. В этом направлении сейчас участвует автор. Ниже кратко указаны некоторые ключевые исследования, связанные с мРНК.

Прежде всего, были открыты новые свойства инсуляторов, важных *цис*-элементов в регуляции транскрипции. Оказалось, что их функционирование во многом зависит от способности одинаковых инсуляторов прочно связываться между собой [18, 19]. Это их свойство определяется димеризацией ряда белков, входящих в состав инсуляторных комплексов, например, белка Mod(mdg4), открытого в Институте [20] (рис. 6).

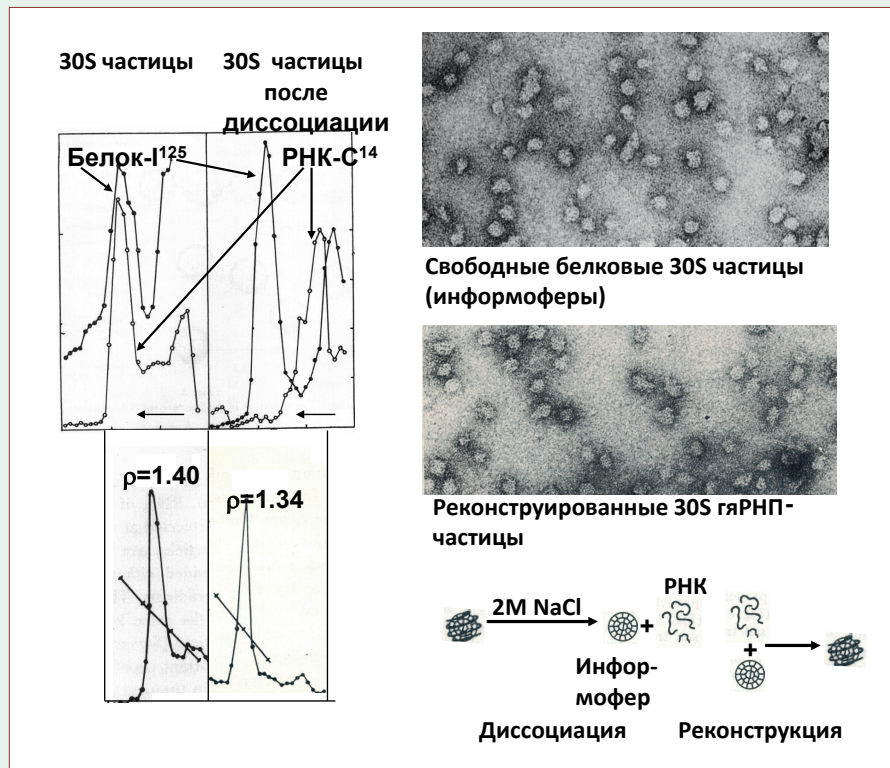


Рис. 5. Структура гяРНП-частиц. Справа 30S частицы, меченные по РНК и белку (последний с помощью I¹²⁵) до и после обработки 2 М NaCl. В отличие от исходных, частицы, обработанные 2 М NaCl, теряют всю РНК, хотя их коэффициент седиментации и размеры при ЭМ остаются неизменными. Плавучая плотность при этом снижается с 1.4 до 1.34 г/мл. Слева – ЭМ диссоциированных и реконструированных 30S частиц. Внизу – схема диссоциации и реконструкции гяРНП

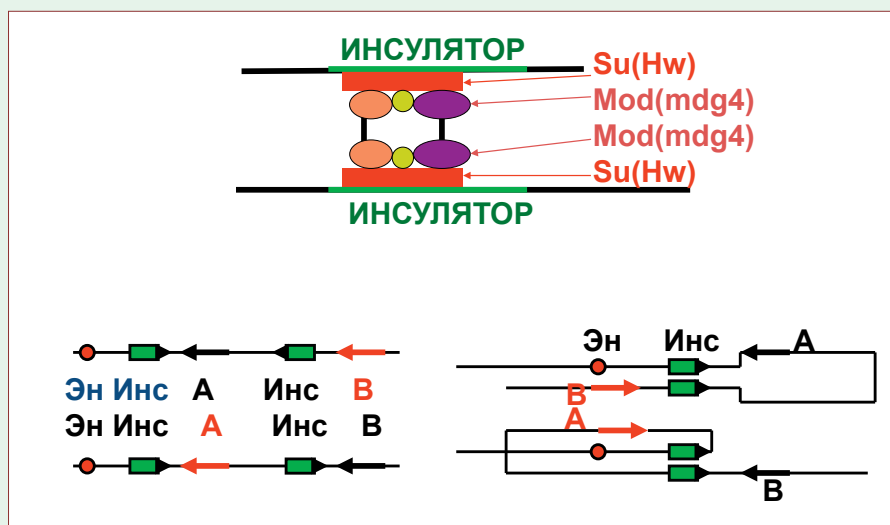


Рис. 6. Взаимодействие инсуляторов. Благодаря наличию серии белков в инсуляторном белковом комплексе образуется несколько контактов, что определяет прочное связывание одноименных инсуляторов и полярность их взаимодействия. Связываются лишь однонаправленные инсуляторы, что определяет конфигурацию петли и активацию того или иного гена

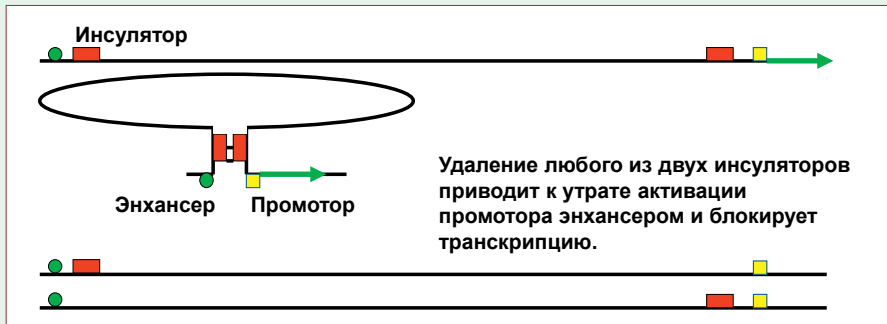


Рис. 7. Сверхдальние взаимодействия в геноме. Они определяются взаимодействием инсульторов и могут вести к активации промотора энхансером. Удаление двух или одного любого инсультора разрушает это взаимодействие

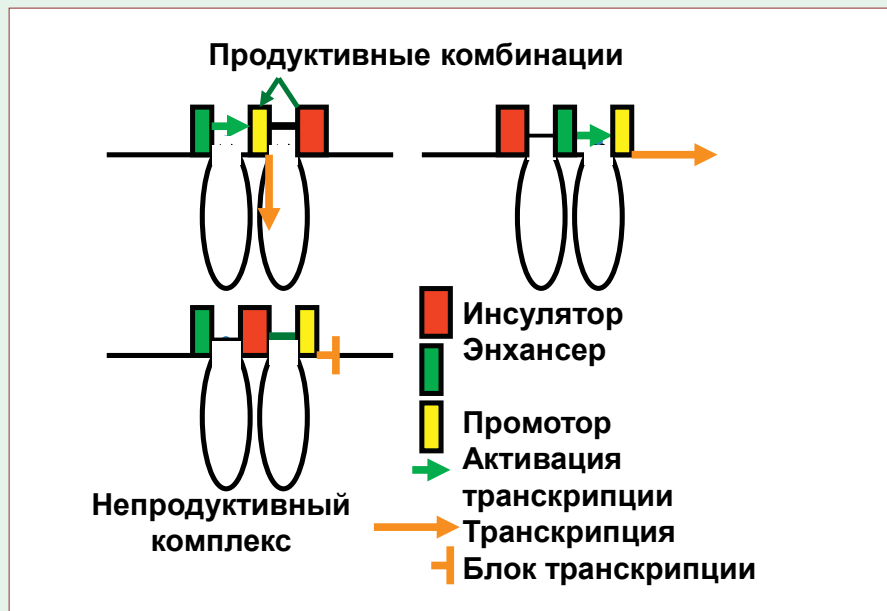


Рис. 8. Взаимодействие инсульторов с другими элементами. Инсульторы взаимодействуют с промоторами, активируя их, и с энхансерами (более избирательно). Оказавшись между ними, инсультор, если вблизи нет другого инсультора, может взаимодействовать с обоими, образуя непродуктивный комплекс

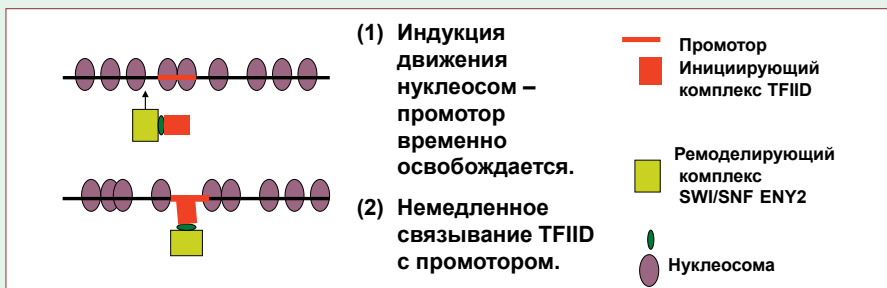


Рис. 9. Схема образования суперкомплекса белком SARP. Благодаря образованию суперкомплекса резко повышается эффективность связывания TFIID с промотором и активность транскрипции

В отличие от энхансеров, инсульторы обладают полярностью: они взаимодействуют, только находясь в одинаковой ориентации. Поэтому в зависимости от ориентации инсульторов в геноме конфигурации петель ДНК, образуемых в результате их взаимодействия, различаются, что, в свою очередь, определяет, какой ген будет активирован [21, 22] (рис. 6).

Были открыты сверхдальние взаимодействия в геноме [23, 24]. Они достигают десятков миллионов пар нуклеотидов и могут происходить даже между негомологичными хромосомами. Они зависят от взаимодействия между инсульторами и могут вести к активации промотора энхансером. Вырезание одного из инсульторов ведет к полной утрате сверхдального взаимодействия, что отражается в инактивации зависящей от него транскрипции (рис. 7).

Наконец, было установлено, что инсульторы способны взаимодействовать с промоторами (с низкой избирательностью), активируя их, и с энхансерами (более избирательно). Поэтому инсультор, расположенный между энхансером и промотором, может взаимодействовать с обоими, образуя непродуктивный комплекс. Это может объяснять хорошо известное разобщающее действие инсультора [25, 26] (рис. 8).

Были открыты два новых белка, играющих важную роль в контроле транскрипции гяРНК и последующих этапах формирования и экспорта мРНК, E(y)2/ENY2 и SARP [27, 28].

SARP связывает белковый иницирующий комплекс TFIID и ремоделирующий хроматин комплекс SWI/SNF в единый суперкомплекс. Нокдаун SARP блокирует рекрутирование TFIID и SWI/SNF на промоторе и подавляет транскрипцию

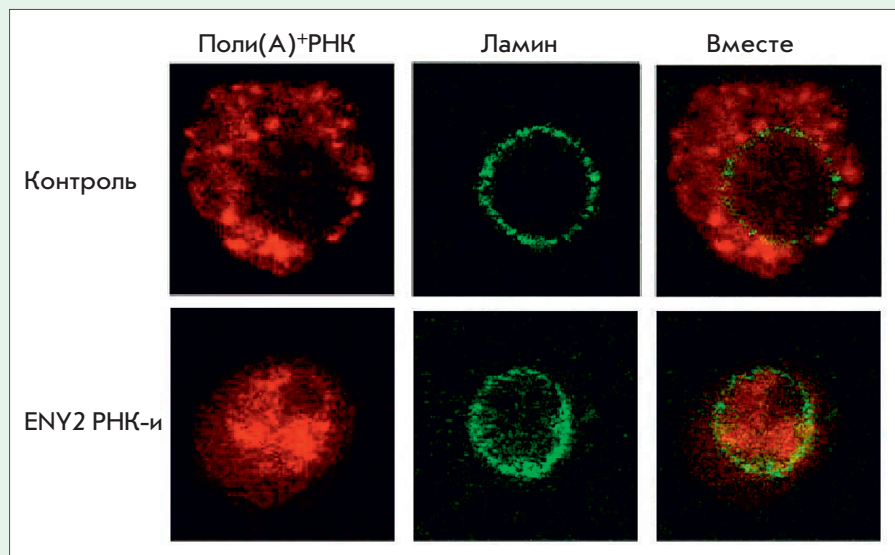


Рис. 10. Нокдаун белка ENY2 приводит к блоку экспорта мРНК из ядра в цитоплазму. Подавление образования белка достигается с помощью РНК-интерференции. В результате почти вся поли(А)⁺РНК остается в ядре

многих генов. Можно предположить, что объединение комплексов позволяет TFIID, как только вызванное SWI/SNF движение нуклеосом вдоль ДНК приведет к освобождению промотора от ну-

клеосом, сразу с ним связаться [29] (рис. 9).

Было установлено, что E(y)2/ENY2 является многофункциональным белком. Он входит в состав комплекса SAGA, его

модуля DUB, участвуя в активации инициации транскрипции [30]. ENY2 также входит в белковый комплекс ТНО, участвующий в элонгации гяРНК, связывающийся с гяРНК и вовлеченный в экспорт ряда мРНК. ENY2 – важный компонент белкового комплекса АМЕХ дрозофилы, связывающийся с гяРНК и играющий ключевую роль в экспорте многих мРНК. Нокдаун ENY2 с помощью РНК-интерференции ведет к полному блоку транспорта мРНК из ядра в цитоплазму. Вся мРНК задерживается в ядре [31] (рис. 10). Наконец, ENY2 входит в состав некоторых инсуляторных комплексов, выполняя при этом барьерную функцию инсулятора [32].

Это только часть работ Института по контролю синтеза и экспорта мРНК.

Таким образом, ранние работы по выявлению информационной РНК у эукариот продолжают успешно развиваться.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jacob F., Monod J. // *J. Mol. Biol.* 1961. V. 3. P. 318–356.
- Brenner S., Jacob F., Meselson M. // *Nature.* 1961. V. 190. P. 576–581.
- Георгиев Г.П. // *Биохимия.* 1961. Т. 26. С. 1095–1126.
- Kirby K.S. // *Biochem. J.* 1956. V. 64. P. 405–408.
- Георгиев Г.П., Мانتьева В.Л. // *Биохимия.* 1960. Т. 25. С. 143–150.
- Georgiev G.P., Mantieva V.L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1962. V. 61. P. 153–154.
- Georgiev G.P., Samarina O.P., Lerman M.I., Smirnov M.N. // *Nature.* 1963. V. 200. P. 1291–1294.
- Самарина О.П., Лерман М.И., Туманян В.Г., Ананьева Л.Н., Георгиев Г.П. // *Биохимия.* 1965. Т. 30. С. 880–893.
- Scherrer K., Marcaud L., Zajdela F., London I.M., Gros F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1966. V. 56. P. 1571–1578.
- Warner J.R., Soeiro R., Birnboim H.C., Girard M., Darnell J.E. // *J. Mol. Biol.* 1966. V. 19. P. 349–356.
- Penman S. // *J. Mol. Biol.* 1966. V. 17. P. 117–130.
- Houssais J.F., Attardi G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1966. V. 56. P. 616–623.
- Samarina O.P., Krichevskaya A.A., Georgiev G.P. // *Nature.* 1966. V. 210. P. 1319–1322.
- Samarina O.P., Lukanidin E.M., Molnar J., Georgiev G.P. // *J. Mol. Biol.* 1968. V. 33. P. 251–263.
- Lukanidin E.M., Zalmanzon E.S., Komaromi L., Samarina O.P., Georgiev G.P. // *Nat. New Biol.* 1972. V. 238. P. 193–197.
- Dreyfus G., Matenis M.J., Pino-Roma S., Burd C.G. // *Ann. Rev. Biochem.* 1993. V. 62. P. 289–321.
- Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. // *Nature.* 1997. V. 389. P. 251–260.
- Gause M., Hovhannisyann H., Kan T., Kuhfittig S., Mogila V., Georgiev P. // *Genetics.* 1998. V. 149. P. 1393–1405.
- Muravyova E., Golovnin A., Gracheva E., Parshikov A., Belenkaya T., Pirrotta V., Georgiev P. // *Science.* 2001. V. 291. P. 495–498.
- Bonchuk A., Denisov S., Georgiev P., Maksimenko O. // *J. Mol. Biol.* 2011. V. 412. P. 423–436.
- Kyrchanova O., Chetverina D., Maksimenko O., Kullyev A., Georgiev P. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. P. 7019–7028.
- Kyrchanova O., Ivlieva T., Toshchakov S., Parshikov A., Maksimenko O., Georgiev P. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. P. 3042–3052.
- Kyrchanova O., Georgiev P. // *FEBS Lett.* 2014. V. 588. P. 8–14.
- Kravchenko E., Savitskaya E., Kravchuk O., Parshikov A., Georgiev P., Savitsky M. // *Mol. Cell Biol.* 2005. V. 25. P. 9283–9291.
- Erokhin M., Davydova A., Kyrchanova O., Parshikov A., Georgiev P., Chetverina D. // *Development.* 2011. V. 138. P. 4097–4106.
- Kyrchanova O., Maksimenko O., Stakhov V., Ivlieva T., Parshikov A., Studitsky V.M., Georgiev P. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. e1003606.

27. Shidlovskii Y.V., Krasnov A.N., Nikolenko J.V., Lebedeva L.A., Kopantseva M., Ermolaeva M.A., Ilyin Y.V., Nabirochkina E.N., Georgiev P.G., Georgieva S.G. // *EMBO J.* 2005. V. 24. P. 97–107.
28. Georgieva S., Nabirochkina E., Dilworth F.J., Eickhoff H., Becker P., Tora L., Georgiev P., Soldatov A. // *Mol. Cell Biol.* 2001. V. 21. P. 5223–5231.
29. Vorobyeva N.E., Soshnikova N.V., Nikolenko J.V., Kuzmina J.L., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 11049–11054.
30. Kurshakova M.M., Krasnov A.N., Kopytova D.V., Shidlovskii Y.V., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N., Spehner D., Schultz P., Tora L., Georgieva S.G. // *EMBO J.* 2007. V. 26. P. 4956–4965.
31. Kopytova D.V., Orlova A.V., Krasnov A.N., Gurskiy D.Y., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N., Shidlovskii Y.V., Georgieva S.G. // *Genes Dev.* 2010. V. 24. P. 86–96.
32. Kurshakova M., Maksimenko O., Golovnin A., Pulina M., Georgieva S., Georgiev P., Krasnov A. // *Mol. Cell.* 2007. V. 27. P. 332–338.