

БИОХИМИЯ

УДК 577.214.39

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТРАНСКРИПЦИИ
ХРОМАТИНА РНК-ПОЛИМЕРАЗой 3. ЧАСТЬ 1**В.М. Студитский*, И.В. Орловский, О.В. Чертков, Н.С. Ефимова,
М.А. Логинова, О.И. Кулаева****(лаборатория регуляции транскрипции и репликации, кафедра биоинженерии;
e-mail: studitym@umdnj.edu)*

Хроматин обеспечивает плотную упаковку ДНК в эукариотических ядрах и ее надлежащее функционирование. В обзоре описаны механизмы, с помощью которых РНК-полимераза 3 (РНКП3) транскрибирует хроматин. Этот механизм характерен для эукариотических РНКП3, РНКП некоторых бактериофагов и многих АТФ-зависимых комплексов, ремоделирующих хроматин. При ремоделировании хроматина по этому механизму нуклеосомы перемещаются вдоль ДНК без диссоциации октамера в раствор.

Ключевые слова: хроматин, транскрипция, элонгация, нуклеосома, РНК-полимераза 3.

Транскрипция является первой стадией экспрессии генетического материала в клетках всех организмов. Именно на уровне транскрипции действуют основные механизмы генетической регуляции. Главным ферментом, осуществляющим транскрипцию, является РНК-полимераза (РНКП). Структура РНКП и механизм синтеза РНК высококонсервативны у всех организмов, от бактерий до человека [1]. У эукариот синтез РНК осуществляется на ДНК, организованной в хроматин.

Хроматин состоит из повторяющихся элементов, называемых нуклеосомами. Ядро ("кор") нуклеосомы представляет собой участок ДНК длиной 147 п.н., организованный в виде 1,66 сверхспиральных витков на поверхности гистоновой октамеры, включающего две молекулы коровых гистонов H2A, H2B, H3 и H4 [2, 3]. Одна молекула линкерного гистона H1 связана с ДНК на входе и выходе из кор-нуклеосомы, а также с участками ДНК между соседними нуклеосомами [4]. Нуклеосомы упакованы в 30-нм фибриллы хроматина [5, 6], которые в свою очередь упакованы в пока недостаточно изученные, более компактные структуры.

Компактная структура хроматина существенно затрудняет протекание таких процессов, как репликация, рекомбинация, репарация и транскрипция ДНК *in vivo*. В работах лабораторий Бикмор и Кука была предложена двухступенчатая модель изменений структуры хроматина, ассоциированных с транскрипцией РНКП2 *in vivo* [7]. (1) Нетранскрибируемый, высококомпактный хроматин переходит в состояние го-

товности к транскрипции (30-нм фибриллы, (2)) (3). При транскрипции структура 30-нм фибриллы нарушается. Участки ДНК, расположенные между транскрибирующими молекулами РНКП2, остаются связанными с нуклеосомами, за исключением случаев, когда гены транскрибируются с чрезвычайно высокой эффективностью. В то же время транскрипция генов РНК-полимеразой 3 (РНКП3) сопровождается существенно более выраженным нарушением структуры хроматина и, скорее всего, интенсивным обменом всех коровых гистонов.

Структуры 30-нм фибрилл и нуклеосом несовместимы с процессом транскрипции и должны быть по крайней мере частично разрушены, чтобы РНКП могли двигаться вдоль ДНК (рис. 1: цепочка нуклеосом образует соленоид, в котором на виток приходится шесть—восемь динуклеосом. Показана только ДНК. Для сравнения приведен приблизительный размер мультисубъединичной РНК-полимеразы 3 (РНКП3) и РНК-полимеразы бактериофага SP6. При транскрипции РНКП3 нарушается как структура 30-нм фибриллы, так и нуклеосомная структура (вставка)). В то же время нарушение нормального метаболизма хроматина во время элонгации транскриптов приводит к потере жизнеспособности клеток [8], преждевременному старению [9] и часто наблюдается при развитии различных форм рака [10]. Таким образом, понимание детального механизма транскрипции хроматина представляет не только фундаментальный интерес, но имеет и важнейшее практическое значение.

*Department of Pharmacology, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, 675 Hoes Lane, Room 405, Piscataway, NJ 08854, USA.

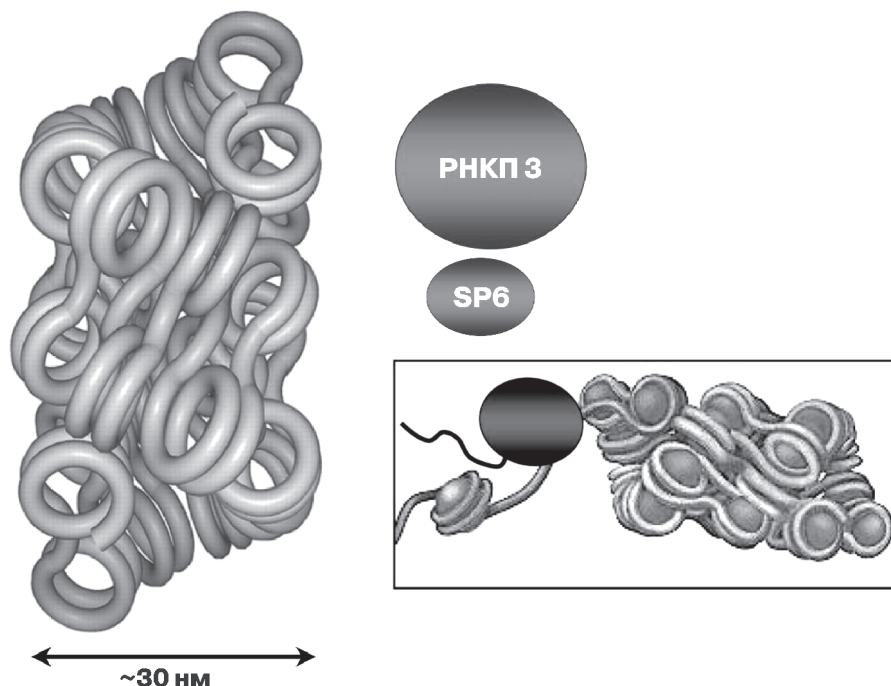


Рис. 1. Структура 30-нм фибрилл хроматина

РНК-полимераза бактериофага SP6 была использована для анализа механизмов транскрипции хроматина главным образом потому, что эта РНКП способна эффективно транскрибировать большинство матриц, упакованных в нуклеосомы, и поэтому позволяет проводить прямые биохимические исследования механизма транскрипции хроматина *in vitro*. Кроме того, такая экспериментальная система успешно воспроизводит сохранение нуклеосом на транскрибируемой матрице [11], описанное *in vivo* [12].

Современные представления о механизме транскрипции хроматина опираются на открытие транслокации нуклеосом при транскрипции хроматина РНК-полимеразой бактериофага SP6 [11, 13]. Эти работы были выполнены с использованием линейных матриц, имеющих длину, достаточную для образования только одного нуклеосомного кора (во всех описанных в этой части работах использовали только гистоновый октамер без линкерных гистонов) (рис. 2. **Верх**: рестрикционная карта 227-п.н. моонуклеосомной матрицы, использованной в эксперименте. ДНК была помечена по концу. Основные позиции нуклеосом до и после транскрипции показаны. **Низ**: защита от рестриктаз моонуклеосомной ДНК: анализ с помощью ПААГ-электрофореза в нативных условиях. Нуклеосомы обрабатывали различными рестриктазами (А, В и Н). Устойчивость и чувствительность нуклеосомной ДНК к различным рестриктазам до и после транскрипции указывают на то, что происходит перенос нуклеосомы (нуклеосомы, расположенные на разных концах фрагмента ДНК, имеют одинаковую подвижность в нативном геле)).

Использование коротких (220—265 п.н.) матриц ДНК ограничивает число возможных положений нук-

леосомы и поэтому облегчает их анализ во время и после транскрипции. Кроме того, позиционные изомеры нуклеосом легко различить по их подвижности после гель-электрофореза и по изменению чувствительности участков, защищенных от гидролиза рестриктазами (если сайт рестрикции приходится на участок ДНК, упакованный в нуклеосому, он становится практически полностью защищенным от гидролиза).

Было показано, что после первого раунда транскрипции октамер остается на матрице, но перемещается (обычно на 40—80 п.н.) в направлении, обратном транскрипции (рис. 2 [11]), так что нуклеосомы после транскрипции располагаются на промоторе, блокируя последующую реинициацию транскрипции (рис. 3: анализ меченых транскриптов в денатурирующем геле). Нуклеосомы транскрибировали без меченых нуклеотидов, чтобы вызвать перемещение октамера гистонов в область промотора и чтобы *ScaI* и *AvaI* сайты были защищены от рестриктаз (как показано на схеме). Затем все чувствительные матрицы были обработаны *ScaI* и *AvaI* (только матрицы с нуклеосомами на промоторе не чувствительны к ферментам). Добавлены [α - 32 P] УТФ и свежая

меченых нуклеотидов, чтобы вызвать перемещение октамера гистонов в область промотора и чтобы *ScaI* и *AvaI* сайты были защищены от рестриктаз (как показано на схеме). Затем все чувствительные матрицы были обработаны *ScaI* и *AvaI* (только матрицы с нуклеосомами на промоторе не чувствительны к ферментам). Добавлены [α - 32 P] УТФ и свежая

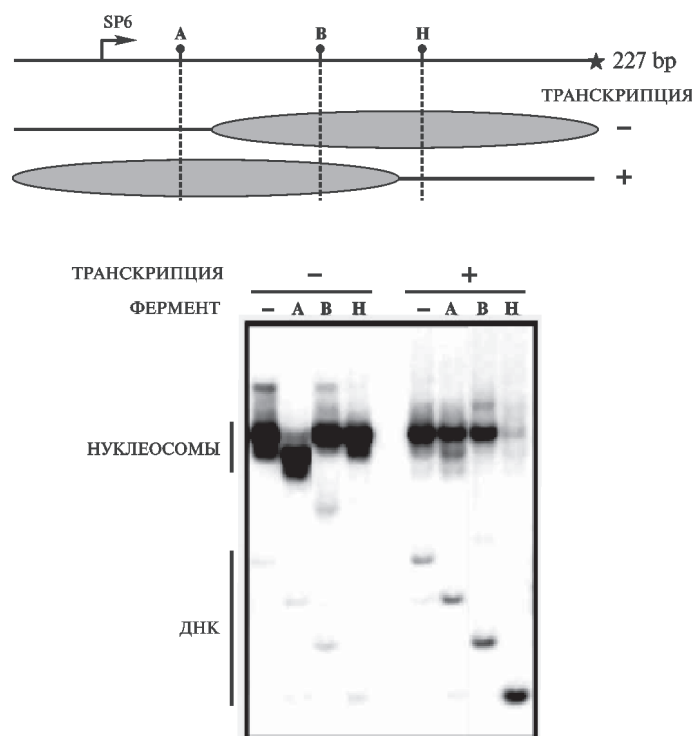


Рис. 2. Транскрипция коротких (227 п.н.) линейных моонуклеосомных матриц SP6 РНК-полимеразой вызывает транслокацию нуклеосомного кора на расстояние около 80 п.н. [11]

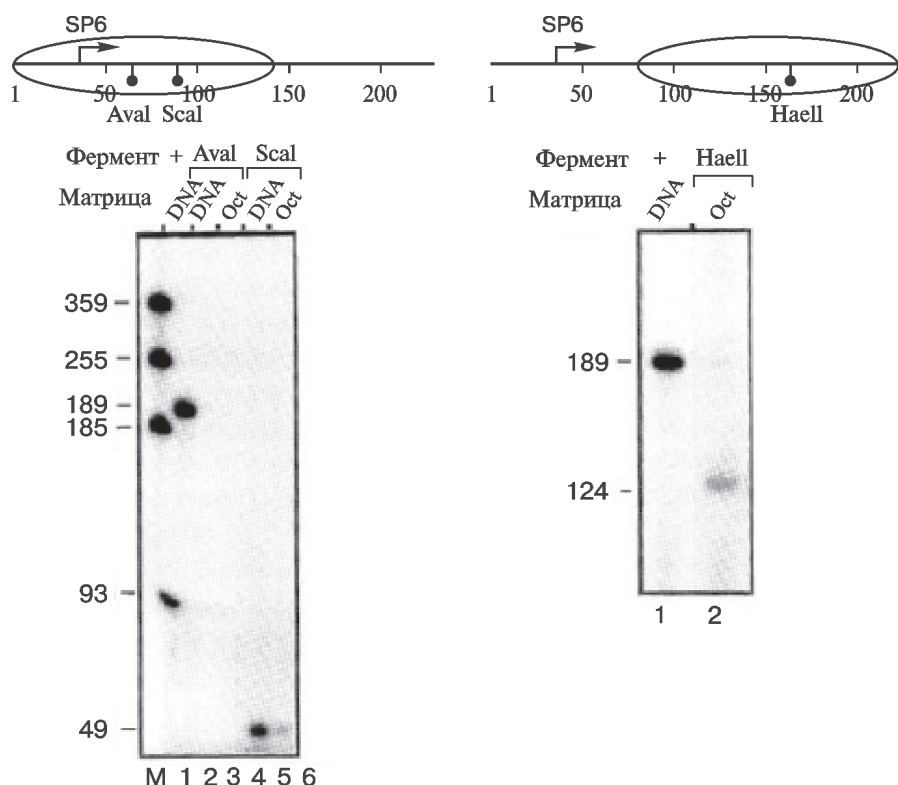


Рис. 3. Транслокация нуклеосом во время транскрипции приводит к блокировке промотора [11]

полимераза, после чего транскрипцию продолжали в течение 20 мин. Видно, что после предварительной транскрипции ДНК продолжает транскрибироваться, тогда как нуклеосомные матрицы (после транслокации) не дают полноразмерных транскриптов (М — маркеры РНК). Переносится более 90% октамеров, и этот процесс зависит от транскрипции: при удалении из реакционной смеси РНК-полимеразы или одного из нуклеозидтрифосфатов (НТФ) переноса октамера не происходит. Таким образом, в условиях относительно простой и высокоочищенной экспериментальной системы воспроизводятся важные характеристики транскрипции хроматина *in vivo* (см. выше): способность нуклеосом сохраняться при транскрипции и при этом менять свое положение на ДНК.

Эти данные позволяют предположить, что октамеры гистонов либо: 1) диссоциируют от ДНК и затем снова связываются с фрагментом ДНК, либо 2) напрямую (без полного выхода октамера в раствор) переносятся к промотору при продвижении РНК-полимеразы. В поддержку второй модели были получены данные по распределению позиционных изомеров нуклеосом, в которых единичные нуклеосомы расположены на разных участках одного фрагмента ДНК до транскрипции. Каждый позиционный изомер генерирует определенный набор положений октамера после транскрипции (рис. 4: расположение нуклеосом на матрицах длиной 262 п.н. до и после транскрипции. Стрелкой отмечено положение

промотора для РНК-полимеразы бактериофага SP6. Для каждой матрицы (2 и 3) положения нуклеосом до и после транскрипции показаны в верхней и нижней частях рисунка соответственно. Распределения положений нуклеосом, полученных после транскрипции матриц 2 и 3, совпадают только частично). Трудно было бы найти объяснение такому “запоминанию” претранскрипционного положения октамера на ДНК, если допустить полную диссоциацию октамера в раствор с последующим его связыванием с ДНК [11].

Дополнительное доказательство модели прямого переноса гистонов октамера было получено в следующих биохимических опытах. В определенных экспериментальных условиях (например, в присутствии низких концентраций НТФ) не происходит переноса октамера на конкурентную ДНК. В то же время октамер эффективно переносится *in cis* на тот же фрагмент ДНК, с которым он был изначально связан [11]. Этот результат также согласуется только с опи-

санной выше моделью прямого переноса, но не с моделью диссоциации октамера в раствор и его реассоциации. Тот факт, что при высоких концентрациях НТФ октамер может быть перенесен на фрагмент ДНК *in trans*, свидетельствует о том, что концентрация конкурентной ДНК была бы достаточна для связывания с октамером, если бы произошел его выход в раствор во время переноса при низких концентрациях НТФ [11].

Для объяснения механизма прямого переноса была предложена модель “намотки” (рис. 5: 1 — при достижении РНК-полимеразой SP6 нуклеосом происходит диссоциация проксимальной нуклеосомной ДНК и частично высвобождается поверхность гистонов октамера. Отмечена граница (В) нуклео-

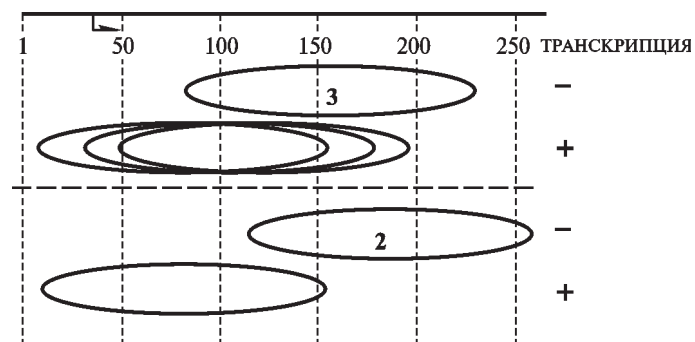


Рис. 4. “Память” при транслокации нуклеосомы: положение нуклеосом после транскрипции зависит от их положения до транскрипции [11]

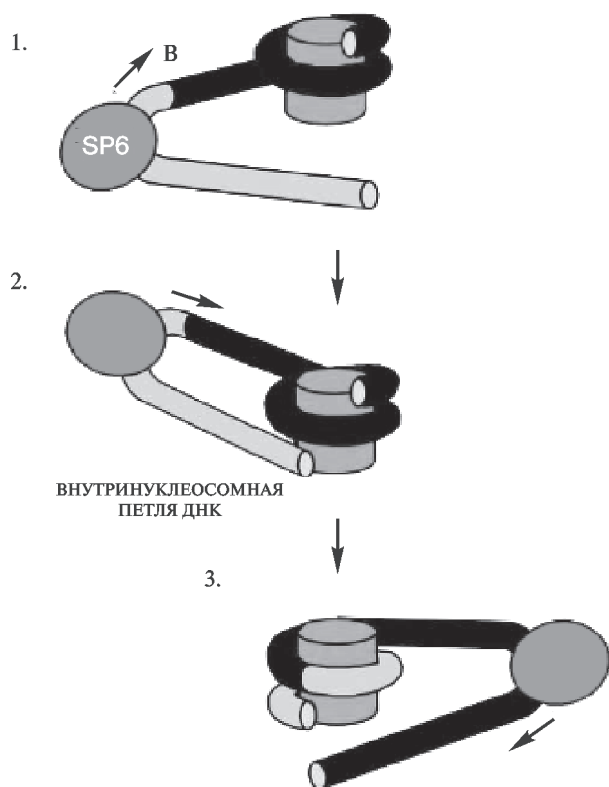


Рис. 5. Механизм “намотки” (прямого переноса) нуклеосом при транскрипции [11]

сомы, черным выделена нуклеосомная ДНК до переноса. 2 — ДНК сзади полимеразы связывается с поверхностью гистоновых октамеров, формируя внутринуклеосомную петлю, причем сохраняется связь между нуклеосомной ДНК и полимеразой. Такая петля является топологически обособленным доменом и подвергается сильному сверхспирализующему воздействию. ДНК перед транскрибирующей полимеразой продолжает раскручиваться с поверхности октамера, ДНК же сзади полимеразы начинает накручиваться на октамер. 3 — нуклеосомный кор располагается сзади полимеразы, которая завершает транскрипцию. РНК не показана [11]). Когда транскрибирующая полимеразы достигает нуклеосомы, она вызывает частичное раскручивание проксимального участка ДНК с поверхности гистоновых октамеров. По мере того как полимеразы входит в нуклеосому, происходит дальнейшее разворачивание сверхспиралей нуклеосомной ДНК, поверхность гистоновых октамеров высвобождается и может связывать только что пройденный полимеразой участок ДНК, в результате чего образуется петля ДНК внутри нуклеосомного кора. Образование внутринуклеосомной петли ДНК в элонгационном комплексе, скорее всего, облегчается с помощью индуцируемого полимеразой излома ДНК в элонгационном комплексе. Участок ДНК перед транскрибирующей полимеразой раскручивается с поверхности октамера гистонов, в то время как участок ДНК за полимеразой

накручивается на октамер гистонов. Таким образом, нуклеосомный кор переносится в новое положение, а полимеразы получает возможность завершить транскрипцию.

Транслокация нуклеосом наблюдалась при транскрипции РНК-полимеразой бактериофага SP6 как коротких линейных, так и гораздо более длинных кольцевых моноклеосомных матриц. Многочисленные наблюдения подтверждают, что такой механизм “намотки” работает и в случае полинуклеосомных матриц. Так, при транскрипции полинуклеосомных матриц не наблюдалось потери гистоновых октамеров, что может свидетельствовать об участии в этом процессе сходных механизмов.

В опытах *in vitro* было показано значительное уменьшение скорости транскрипции всеми исследованными РНК-полимеразой (бактериофага SP6, *E. coli*, полимеразы 2 и 3) в присутствии нуклеосом. При завершении этапа прямого переноса гистоновых октамера во время транскрипции на нуклеосоме можно было бы ожидать, что этот нуклеосомный барьер исчезнет. Так, изучение вызванных нуклеосомными пауз при транскрипции может позволить определить момент переноса гистоновых октамера. Для изучения замедления транскрипции нуклеосомными использовали короткие моноклеосомные матрицы, позволяющие синхронизировать момент начала транскрипции. Сразу после точки начала транскрипции на матрицах помещали короткую последовательность, не содержащую цитозина, что допускало синтез только коротких транскриптов, после чего реакция блокировалась в отсутствие ЦТФ. Добавление ЦТФ в реакцию снимало блокаду и запускало немедленное синхронное продолжение всех транскриптов. При транскрипции нуклеосом наблюдаются отчетливые и специфичные паузы [14]. Для двух нуклеосом, по-разному позиционированных на одном и том же фрагменте ДНК, участок зависимого от нуклеосомы замедления транскрипции ограничен участком нуклеосомной ДНК, предшествующей диадной оси нуклеосомы (25–60 п.н. внутри нуклеосомы). Тот факт, что участки замедления транскрипции расположены в сходных местах относительно нуклеосомы независимо от последовательности ДНК, показывает, что такой механизм замедления транскрипции связан, скорее всего, со свойствами нуклеосомы, чем со свойствами ДНК как таковой. Не обнаружено пауз в транскрипции на участке после диадной оси; это свидетельствует о том, что этот участок нуклеосомной ДНК транскрибируется так, как будто он находится в свободном состоянии, и что, по-видимому, перенос гистоновых октамера завершается до этого. Перед переносом ДНК-связанный октамер приводит к формированию пауз при транскрипции; после переноса октамера никаких других препятствий для продвижения полимеразы нет, и задержки транскрипции не проис-

ходит. Таким образом, анализ распределения нуклеосом-специфичных пауз позволяет предположить, что перенос гистоновых октамеров завершается до того момента, когда полимеразы достигают диадной оси нуклеосомы [14].

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства РФ в рамках выполнения постановления № 220 (Договор с Министерством науки и образования № 11.G34.31.0009).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Borukhov S., Nudler E. RNA polymerase: the vehicle of transcription // *Trends Microbiol.* 2008. Vol. 16. N 3. P. 126—134.
2. Davey C.A., Sargent D.F., Luger K., Maeder A.W., Richmond T.J. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1,9 Å resolution // *J. Mol. Biol.* 2002. Vol. 319. N 5. P. 1097—1113.
3. Luger K., Mader A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2,8 Å resolution // *Nature.* 1997. Vol. 389. N 6648. P. 251—260.
4. Syed S.H., Goutte-Gattat D., Becker N., Meyer S., Shukla M.S., Hayes J.J., Everaers R., Angelov D., Bednar J., Dimitrov S. Single-base resolution mapping of H1-nucleosome interactions and 3D organization of the nucleosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. Vol. 107. N 21. P. 9620—9625.
5. Schalch T., Duda S., Sargent D.F., Richmond T.J. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre // *Nature.* 2005. Vol. 436. N 7047. P. 138—141.
6. Routh A., Sandin S., Rhodes D. Nucleosome repeat length and linker histone stoichiometry determine chromatin fiber structure // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. Vol. 105. N 26. P. 8872—8877.
7. Fraser P., Bickmore W. Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation // *Nature.* 2007. Vol. 447. N 7143. P. 413—417.
8. Martens J.A., Wu P.Y., Winston F. Regulation of an intergenic transcript controls adjacent gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes Dev.* 2005. Vol. 19. N 22. P. 2695—2704.
9. Feser J., Truong D., Das C., Carson J.J., Kieft J., Harkness T., Tyler J.K. Elevated histone expression promotes life span extension // *Mol. Cell.* 2010. Vol. 39. N 5. P. 724—735.
10. Chi P., Allis C.D., Wang G.G. Covalent histone modifications—miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers // *Nat. Rev. Cancer.* 2010. Vol. 10. N 7. P. 457—469.
11. Studitsky V.M., Clark D.J., Felsenfeld G. A histone octamer can step around a transcribing polymerase without leaving the template // *Cell.* 1994. Vol. 76. N 2. P. 371—382.
12. Mavrich T.N., Jiang C., Ioshikhes I.P., Li X., Venters B.J., Zanton S.J., Tomsho L.P., Qi J., Glaser R.L., Schuster S.C., Gilmour D.S., Albert I., Pugh B.F. Nucleosome organization in the *Drosophila* genome // *Nature.* 2008. Vol. 453. N 7193. P. 358—362.
13. Bednar J., Studitsky V.M., Grigoryev S.A., Felsenfeld G., Woodcock C.L. The nature of the nucleosomal barrier to transcription: direct observation of paused intermediates by electron cryomicroscopy // *Mol. Cell.* 1999. Vol. 4. N 3. P. 377—386.
14. Studitsky V.M., Clark D.J., Felsenfeld G. Overcoming a nucleosomal barrier to transcription // *Cell.* 1995. Vol. 83. N 1. P. 19—27.

Поступила в редакцию
17.10.11

MOLECULAR MECHANISMS OF TRANSCRIPTION THROUGH CHROMATIN BY RNA POLYMERASE III

V.M. Studitsky, I.V. Orlovsky, O.V. Chertkov, N.S. Efimova,
M.A. Loginova, O.I. Kulaeva

Chromatin is designed to tightly package DNA into the eukaryotic nucleus while maintaining its proper functioning. This review describes the mechanisms by which RNA polymerase III transcribes through the chromatin templates. This mechanism is characteristic of eukaryotic Pol III, bacteriophage RNA polymerases, and probably ATP-dependent chromatin remodeling complexes. In this case, nucleosomes are translocated without release of the octamer into solution.

Key words: chromatin, transcription, elongation, nucleosome, RNA polymerase III.

Сведения об авторах

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, зав. лабораторией регуляции транскрипции и репликации биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-938-22-91; e-mail: studitm@umdnj.edu
Орловский Игорь Вячеславович — науч. сотр. лаборатории регуляции транскрипции и репликации биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-938-22-91, 8-495-922-89-91, e-mail: igor.orlovski@gmail.com

Чертков Олег Валерьевич — науч. сотр. лаборатории регуляции транскрипции и репликации биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-938-22-91; e-mail: o_chertkov@mail.ru

Ефимова Надежда Сергеевна — аспирантка кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-938-22-91; e-mail: shordome@gmail.com

Логинова Мария Андреевна — аспирантка кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-938-22-91; e-mail: perhydroselenazina@gmail.com

Кулаева Ольга Игоревна — канд. биол. наук, глав. науч. сотр. лаборатории эпигенетической регуляции транскрипции (Университет Ратгерса, США). E-mail: studitoi@umdnj.edu