

БИОХИМИЯ

УДК 577.214.39

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТРАНСКРИПЦИИ
ХРОМАТИНА РНК-ПОЛИМЕРАЗой 3. ЧАСТЬ 2**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)*

Нуклеосома формирует “нуклеосомный барьер”, который представляет серьезное препятствие для транскрипционного аппарата. Рассмотрены исследования формирования и преодоления “нуклеосомного барьера” некоторыми видами РНК-полимераз. Показано, что для транскрипции хроматина сходные механизмы используются очень разными полимеразми. Приведены данные, свидетельствующие о сходстве механизмов транскрипционного и АТФ-зависимого ремоделирования хроматина. Предложена модель транскрипции через нуклеосому.

Ключевые слова: *хроматин, транскрипция, нуклеосома, “нуклеосомный барьер”, ремоделирование хроматина, элонгация, РНК-полимераза 3.*

В первой части обзора рассмотрена структура хроматина и общие принципы транскрипции ДНК, организованной в хроматин. В этой части будут детально рассмотрены дополнительные аспекты транскрипции хроматина.

Нуклеосома, формируя “нуклеосомный барьер”, представляет серьезное препятствие для элонгационного комплекса. В случае транскрипции РНК-полимеразой бактериофага SP6 “нуклеосомный барьер” изучали, используя короткие моонуклеосомные матрицы, позволяющие блокировать РНК-полимеразу в определенных положениях на нуклеосоме [1]. Так, полимеразу блокировали в положении, где возникает пауза (42 п.н. от начала нуклеосомы), а также в положении еще до достижения ею нуклеосомного барьера (23 п.н.). Структуру интермедиатов, формирующихся в различных позициях на нуклеосоме, анализировали с помощью электронной криомикроскопии (ЕСМ); эти данные сравнивали с данными биохимического анализа тех же проб. При транскрипции через нуклеосому формируются три вида интермедиатов (рис. 1: (*a–f*) частицы с одним “хвостом” ДНК, в некоторых случаях (*a, e, f*) комплекс полимеразы-РНК находится вблизи октамера, в некоторых случаях между комплексом и октамером обнаруживается свободная ДНК (*b–d*). (*g–j*) Частицы с двумя “хвостами” ДНК. Предполагаемые комплексы полимеразы-РНК — электронно-плотные участки, указанные стрелками. (*k, l*) Частицы с одним “хвостом” ДНК, в которых участок ДНК, прокси-

мальный промотору, связан с нуклеосомой; такая конформация может приводить к формированию интермедиата с петлей. Масштаб — 10 нм. Вверху приведена трехмерная модель комплекса *a*, показанная под двумя углами. Нуклеосома изображена в виде диска, транскрипт в виде черного цилиндра. Данные, в том числе идентификация комплексов полимеразы-РНК, интерпретируются на основе сравнения оригинальных и обработанных микрофотографий стереопар. Такая обработка позволяет визуализировать ДНК, но затрудняет определение транскрипта. На матрице длиной 227 п.н. формировали нуклеосомы и транскрибировали их РНК-полимеразой бактериофага SP6. На рис. 2 показаны три класса комплексов, образующихся при транскрипции нуклеосом: *a* — частички с одним “хвостом” ДНК при расположении комплексов полимеразы-РНК (стрелки), близком к гистоновому октамеру; *b* — со свободной ДНК между полимеразой и октамером; *c* — частички с двумя “хвостами” ДНК. Комплексы *a* и *c* являются “закрытыми” интермедиатами и наблюдаются только при достижении РНК-полимеразой нуклеосомного барьера. Масштаб — 10 нм. Приведены трехмерные модели комплексов *a* и *c*. Нуклеосома изображена в виде диска, транскрипт — в виде черной линии) [1].

Только два указанных “закрытых” интермедиата можно обнаружить при спонтанных остановках полимеразы в различных позициях в нуклеосоме. Таким образом, наличие “закрытых” интермедиатов

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

В статье сохранены стиль и орфография авторов.

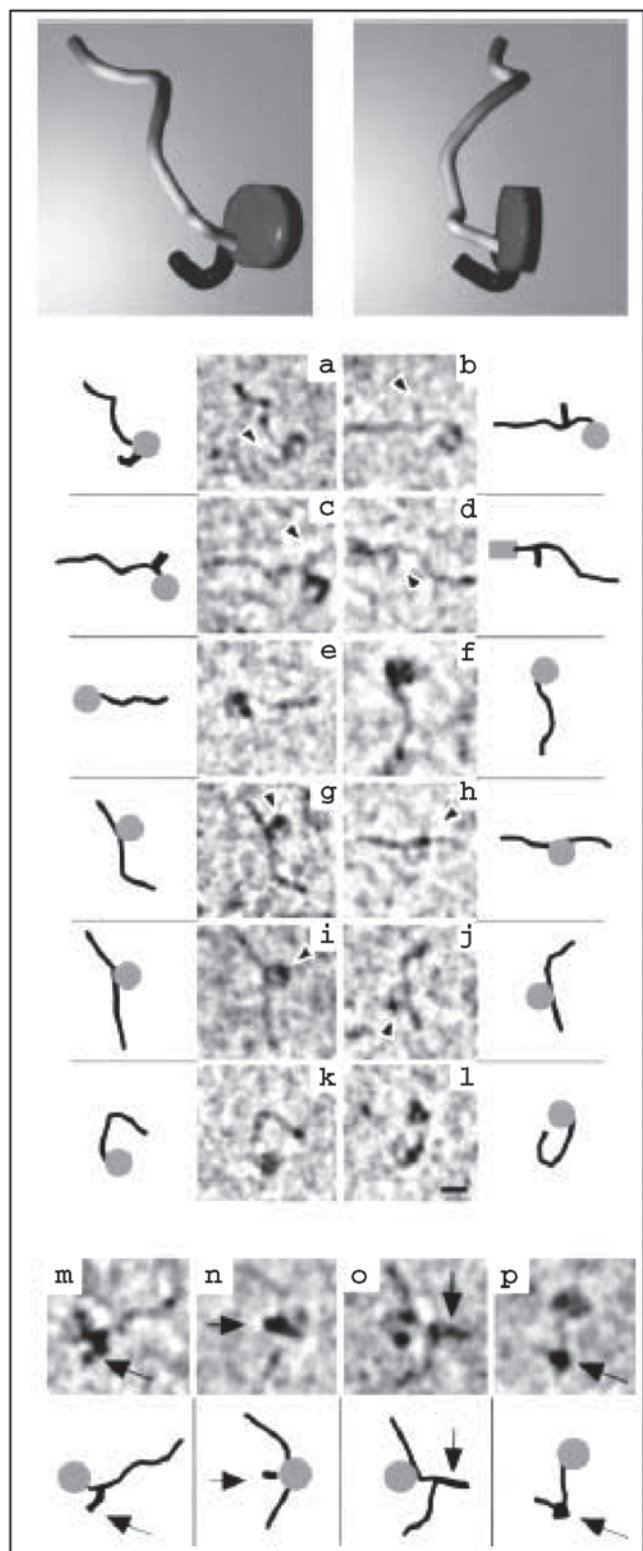


Рис. 1. Данные криоэлектронной микроскопии для остановленных (*a–l*) и транскрибирующих (*m–p*) транскрипционных комплексов [1]

коррелирует с нуклеосом-специфичными паузами. Можно предположить, что такие интермедиаты действительно отвечают за возникновение пауз и для продолжения процесса транскрипции требуется перевести их в “открытую” форму (рис. 2). Следует отметить, что по данным электронной микроскопии

во всех интермедиатах транскрипции на нуклеосоме всегда сохраняется только один сверхспиральный виток ДНК, ассоциированный с октамером. Это позволяет предполагать, что второй виток ДНК стерически вытесняется транскрибирующей полимеразой, расположенной на соседнем витке суперспирали ДНК.

Удивительно, но на границах нуклеосомы не наблюдается задержки транскрипции [1]. Можно предположить, что связанные с ДНК гистоны могут быть “прозрачны” для полимеразы и что интермедиаты, образующиеся при переносе нуклеосом, участвуют в формировании нуклеосомного барьера для транскрипции. Возможно также, что более сильные ДНК-гистоновые взаимодействия, характерные для центрального участка нуклеосомной ДНК, вызывают задержку продвижения РНК-полимеразы только после того, как она транскрибирует 20–30 п.н. нуклеосомной ДНК. Как показывают исследования транскрипции нуклеосом РНК-полимеразой 2 (см. ниже), оба эти механизма участвуют в формировании нуклеосомного барьера [1].

На основании приведенных данных нами был предложен следующий сценарий транскрипции через нуклеосому (рис. 3: 1 — РНК-полимераза (РНКП) быстро считывает первые 25 п.н. нуклеосомной ДНК; при этом происходит частичная диссоциация ДНК от октамера (2). 3 — ДНК позади РНКП связывается с освободившейся поверхностью гистонного октамера, образуя внутринуклеосомную петлю. Дальнейшее продвижение РНКП ведет к разрыву петли и формированию интермедиатов с РНКП, расположенной в непосредственной близости от нуклеосомы (4, 5). Здесь РНКП останавливается. Вероятно, затем ДНК диссоциирует с поверхности октамера и восстанавливается конфигурация 2. Этот цикл может повторяться несколько раз. При прохождении полимеразой около 60 п.н. нуклеосомной ДНК оставшаяся впереди ДНК диссоциирует с поверхности октамера, образуя конформацию 6; перенос октамера завершен (7) [1]). После инициации транскрипции (интермедиат 1) и проникновения в нуклеосому РНК-полимераза без задержек считывает 20–25 п.н. нуклеосомной ДНК и стерически вытесняет по крайней мере 20 п.н. ДНК с поверхности гистонного октамера перед элонгационным комплексом (интермедиат 2). Так полимеразы “расчищают” свой путь; это может объяснить, почему гистоновый октамер практически полностью “прозрачен” для транскрипции. Как только полимеразой считано более 25 п.н. нуклеосомной ДНК, образуется внутринуклеосомная петля (интермедиат 3) как результат взаимодействия между высвободившейся поверхностью октамера и ДНК за полимеразой. Размер этой петли зависит от длины доступного для взаимодействия участка ДНК за полимеразой и варьирует в диапазоне 10–900 п.н. Внутринуклеосомная петля может быть открыта с любой стороны полимеразы: на ранних стадиях транскрипции более удобным является высвобождение проксимального от промотора конца матрицы. Когда ДНК оборачивается вокруг

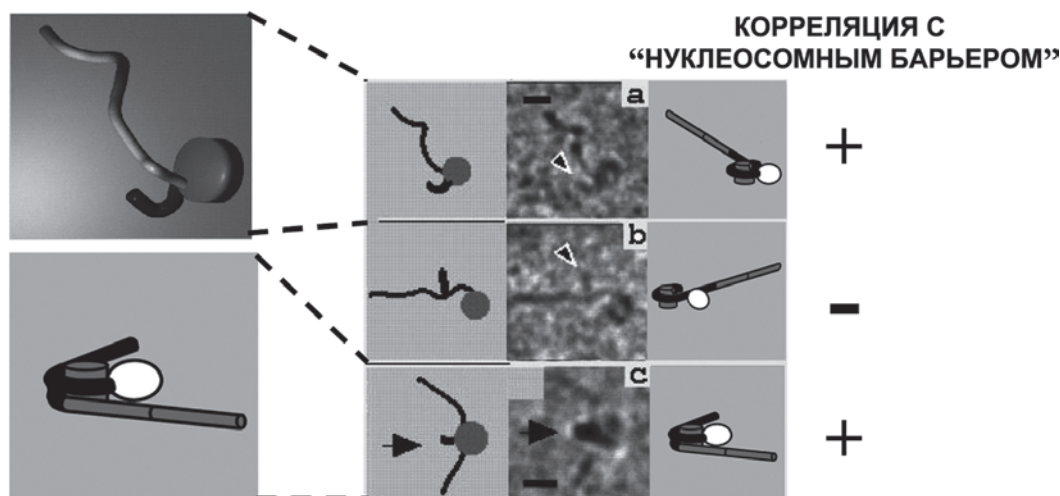


Рис. 2. Структура “нуклеосомного” барьера для транскрипции: идентификация интермедиатов, образующихся при нуклеосом-специфичной остановке транскрипции (на основе данных, полученных с помощью электронной криомикроскопии (ECM) [1])

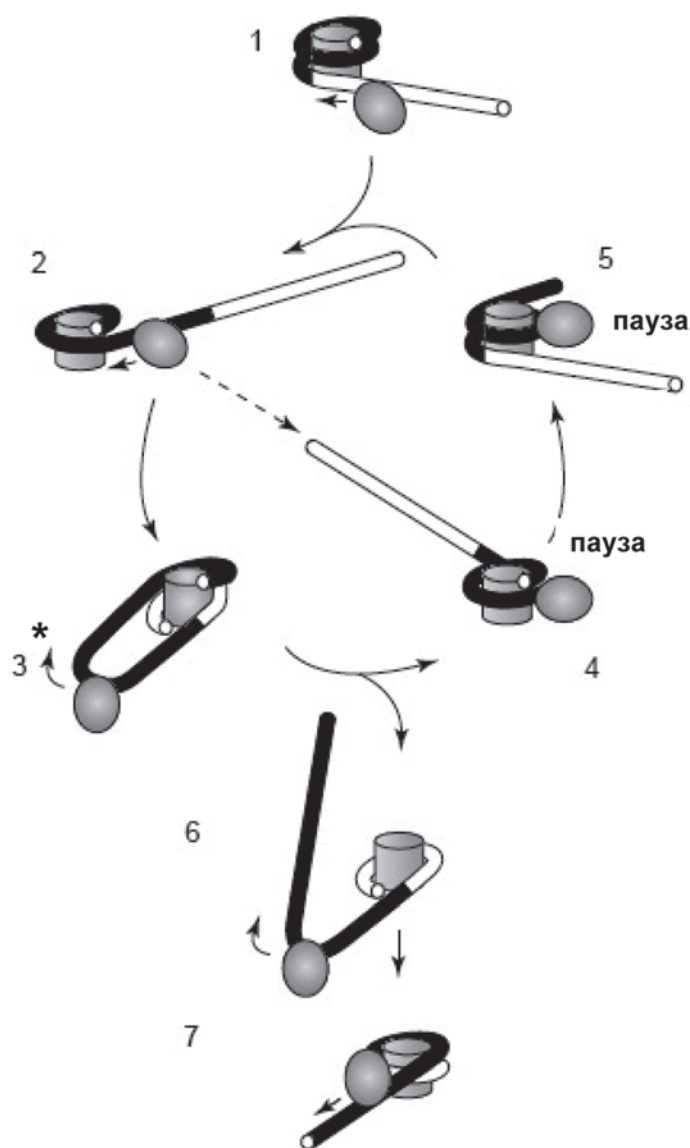


Рис. 3. Механизм транскрипции нуклеосом РНК-полимеразой бактериофага SP6 (и РНКПЗ, см. рис. 5) [1]

гистонового октамера, вначале образуется интермедиат 4 с одним свободным “хвостом” ДНК. При дальнейшем вытеснении полимеразой другого конца ДНК возникает интермедиат 5 с двумя свободными “хвостами” ДНК, в котором до 50 п.н. ДНК вытеснены элонгационным комплексом. Примечательно, что вытесненный участок ДНК находится перед полимеразой на расстоянии около 80 п.н. В результате такого “вытеснения на расстоянии” элонгационный комплекс при транскрипции через нуклеосому не окружен большим количеством ДНК-гистоновых взаимодействий; это может способствовать выходу полимеразы из состояний паузирования. Элонгация приостанавливается до тех пор, пока дальнейшее замещение ДНК с поверхности гистонового октамера не позволит возвратиться к интермедиату 2 — это позволяет РНК-полимеразе продвинуться по матрице примерно на 10 п.н. Попеременное формирование открытых и “закрытых” транскрипционных комплексов происходит несколько раз по мере того, как РНК-полимераза продвигается внутрь нуклеосомного кора на расстояние до 60 п.н. Наконец, ДНК-гистоновые взаимодействия позади полимеразы становятся сильнее, чем взаимодействие перед элонгационным комплексом, и нуклеосома восстанавливается на новом участке позади транскрибирующей полимеразы (интермедиат 6). По достижении этого этапа дальнейшая транскрипция протекает беспрепятственно на свободной ДНК, образовавшейся перед полимеразой (интермедиат 7).

Может ли механизм транскрипции нуклеосом небольшой (около 100 кДа) односубъединичной РНК-полимеразой бактериофага SP6 быть сходен с механизмом, используемым заведомо более крупными (до 600 кДа) многосубъединичными эукариотическими РНК-полимеразами? Попытка ответить на этот вопрос предпринята в исследовании, где изучали транскрипцию короткой моноклеосомной матрицы

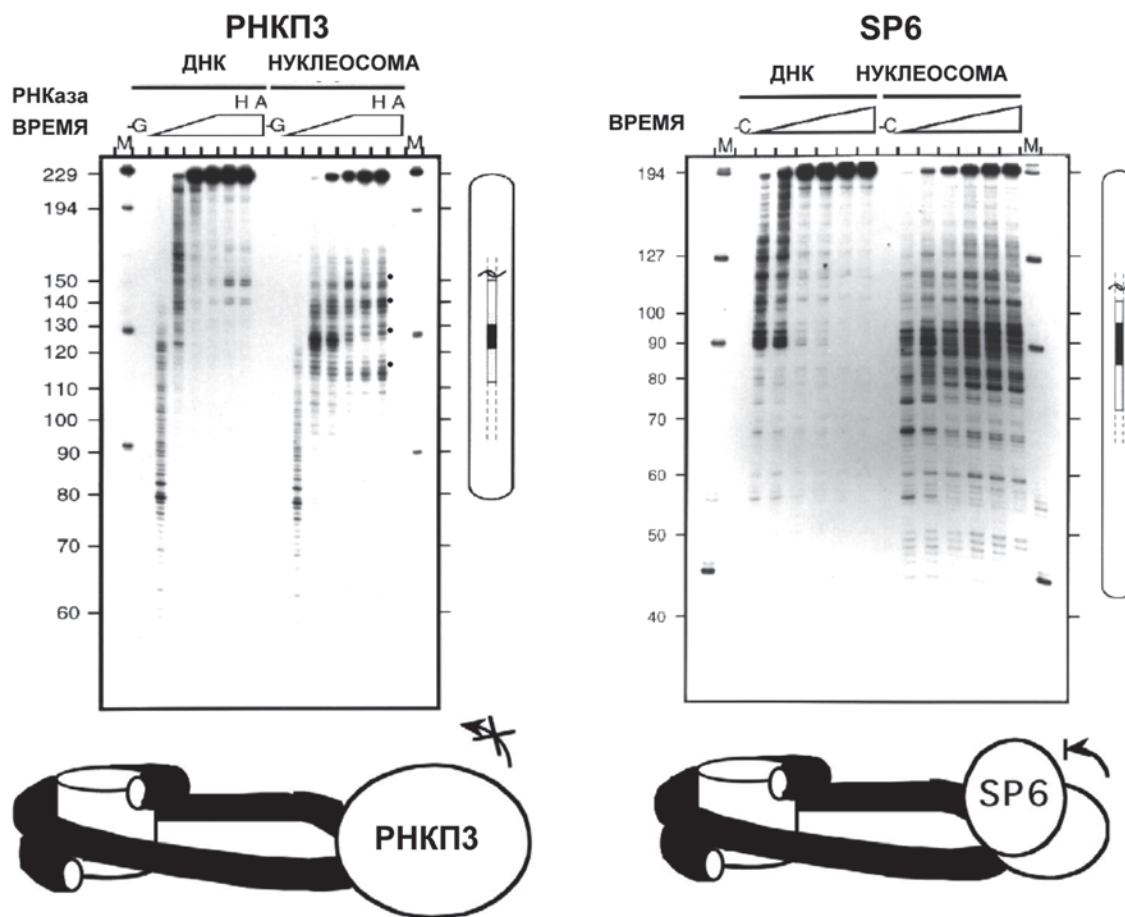


Рис. 4. Транскрипция через нуклеосому прокариотическими и эукариотическими РНК-полимеразой осуществляется сходными механизмами [2]

РНК-полимеразой бактериофага SP6 и дрожжевой РНК-полимеразой 3, что позволило напрямую сравнить транскрипцию прокариотической и эукариотической РНК-полимеразой на очень сходных матрицах и в сходных условиях (рис. 4: сверху: анализ нуклеосом-специфичных пауз при транскрипции сходных 227-п.н. дрожжевой РНК-полимеразой 3 и РНК-полимеразой бактериофага SP6. Анализ меченых транскриптов проводили в денатурирующем ПААГ. Нуклеосомы и ДНК транскрибировали разное время (2, 4, 8, 30, 180 с и 4, 10, 5, 60, 180, 600 с для РНК-полимеразы 3 и РНК-полимеразы бактериофага SP6 соответственно). Для обеих полимераз наблюдались паузы при транскрипции одного и того же участка (25–60 п.н. от начала нуклеосомы). Однако только в случае РНК-полимеразы 3 наблюдали паузы с периодичностью 10 п.н. (отмечены точками). Положение нуклеосом отмечено справа; участки сильных нуклеосом-специфичных пауз обозначены черным прямоугольником, менее сильных — белым прямоугольником, и слабых — пунктирной линией. Указано положение диадной оси нуклеосомы. М — РНК-маркеры. Внизу на рисунках — предполагаемые структуры интермедиатов переноса нуклеосом [2]).

Как распределение нуклеосом-специфичных пауз при транскрипции, так и расстояние прямого переноса гистоновых октамера оказались сходными в обоих

случаях (рис. 4). Эти данные показывают, что для транскрипции через нуклеосому сходные механизмы используются очень разными полимеразой. Так как *in vivo* РНК-полимераза бактериофага SP6 не транскрибирует нуклеосомы, это может указывать на то, что механизм транскрипции через нуклеосому отражает некоторые отличия фундаментальных свойств различных элонгационных комплексов и структуры нуклеосом [2].

Может ли петлевой механизм, аналогичный транскрипционному механизму переноса, работать в случае АТФ-зависимого ремоделирования хроматина? Следующие данные свидетельствуют о значительном сходстве механизмов транскрипционного и АТФ-зависимого ремоделирования хроматина [3, 4]. Во-первых, схожесть многих эффектов функционирования ферментов АТФ-зависимого ремоделирования и РНК-полимераз, а именно: транслокация нуклеосом на короткие расстояния, частичное вытеснение ДНК с поверхности октамера и перенос октамера *in trans* (между различными молекулами ДНК). Эти эффекты, вероятно, связаны с частичным раскручиванием ДНК с октамера гистонов в ходе транскрипционного и АТФ-зависимого ремоделирования. Во-вторых, октамер гистонов остается интактным после транслокации. В-третьих, оба вида ремоделирования хроматина сопряжены с гидролизом нуклеозидтрифос-

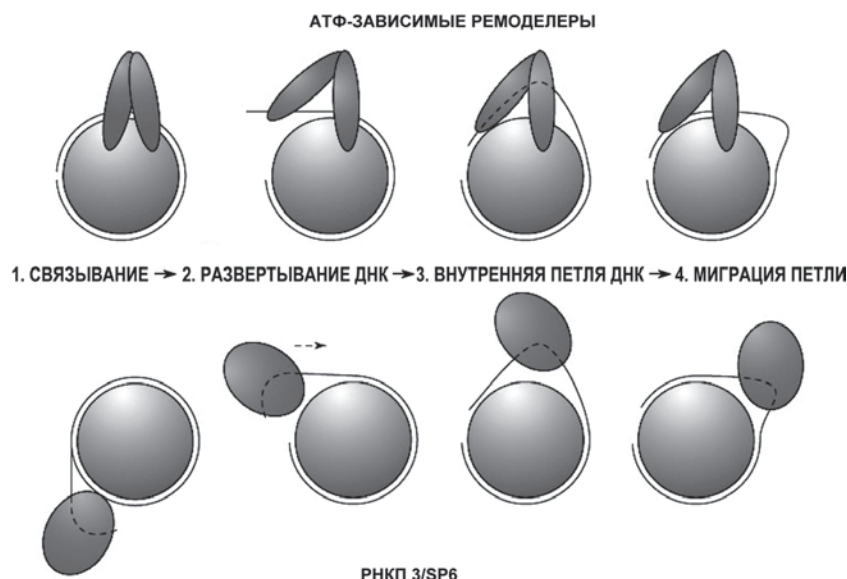


Рис. 5. Петлевые механизмы ремоделирования хроматина некоторыми АТФ-зависимыми ремоделерами (вверху), дрожжевой РНКП3 и РНК-полимеразой бактериофага SP6

фатов (НТФ). Наконец, по крайней мере некоторые АТФ-зависимые ремоделирующие комплексы (ремоделеры) могут перемещаться вдоль ДНК. Все указанные комплексы имеют выраженные хеликаза-подобные мотивы (но не имеют хеликазной активности) и являются ДНК-транслоказами, которые могут направленно двигаться вдоль ДНК, вероятнее всего вращаясь вокруг двойной спирали. Таким образом, АТФ-зависимые ремоделеры обладают всеми свойствами, характерными для транскрибирующей РНК-полимеразы, которые, видимо, и определяют судьбу нуклеосом во время соответствующего процесса. Вполне вероятно, что АТФ-зависимыми ремоделерами и РНК-полимеразами во время транскрипции используются аналогичные механизмы (рис. 5: элонгирующая РНК-полимераза вносит $\sim 90^\circ$ изгиб в ДНК. (1) Связывание: ремоделирующий комплекс приближается к нуклеосоме. (2) ДНК частично разворачивается с поверхности октамера. (3) Ремоделеры вносят изгиб в ДНК, облегчая формирование внутринуклеосомной петли ДНК. Предполагается, что АТФ-зависимые ремоделеры имеют как ДНК-связывающий, так и октамер-связывающий сайты, и что гидролиз АТФ приводит к изменению конформации белкового комплекса, облегчающего внесение изгиба в ДНК. (4) Изгиб ДНК перемещается в пределах нуклеосомной ДНК или спонтанно (АТФ-зависимые ремоделеры) или вместе с транскрибирующим ферментом, которые также могут быть использованы в других механистически сходных процессах, таких как репликация ДНК. В самом деле, октамер гистонов переносится при репликации минихромосом ви-

руса SV40 *in vitro* без вытеснения гистонов в раствор. Кроме того, эффективная репликация проходит без диссоциации октамера от ДНК.

Таким образом, использование коротких (220—250 п.н.) моонуклеосомных матриц оказалось полезным для изучения некоторых ключевых свойств транскрибируемого хроматина, например таких, как сохранение нуклеосом при транскрипции. Именно использование коротких матриц позволило открыть ряд удивительных особенностей механизма транскрипции ДНК, упакованной в хроматин. Наиболее примечательны “акробатические” способности гистонового октамера, которые, вероятно, способствуют продвижению РНК-полимеразы через нуклеосомы даже без кратковременной диссоциации октамера и выхода его в раствор. Аффинность гистонового октамера к ДНК очень высока, в то же время для многих

транскрибирующих полимераз он является практически “прозрачным” (как, например, при транскрипции моонуклеосомных матриц РНК-полимеразой бактериофага SP6). Тем не менее, единичная нуклеосома, расположенная как на короткой (200—250 п.н.) матрице, так и на длинных полинуклеосомных матрицах, представляет собой серьезное препятствие для элонгационного комплекса, причем основным барьером, замедляющим транскрипцию, являются, видимо, интермедиаты переноса гистонового октамера, поскольку формирование таких интермедиатов коррелирует с формированием нуклеосомного барьера для транскрипции.

Используется ли описанный выше механизм, специфичный для РНКП3, при транскрипции *in vivo*? Результаты применения модели нуклеосомного переноса к полинуклеосомным участкам транскрибируемых генов представлены на рис. 6: каждый комплекс транскрибирующей РНКП вызывает перенос каждой нуклеосомы в направлении промотора по механизму “намотки” (см. рис. 4). Это приводит к уменьшению

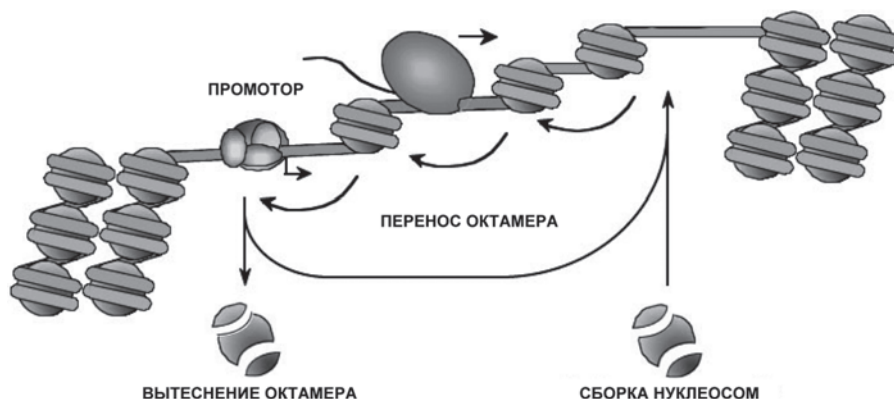


Рис. 6. Гипотетическая “челночная” модель нуклеосомной организации активного гена, транскрибируемого РНКП 3 [5]

числа нуклеосом в дистальной от промотора части гена; этот процесс может компенсироваться сборкой нуклеосом заново. Каждый октамер, вытесненный на занятый транскрипционными факторами промотор, либо вытесняется и уходит в раствор, либо напрямую переносится в другую зону (например, в дистальную от промотора часть гена) [5]. Поскольку нуклеосомы при транскрипции движутся в направлении, противоположном направлению движения РНК-полимеразы, то происходит передвижение нуклеосом к промотору. Число нуклеосом на дистальной по отношению к промотору части гена уменьшается, чему может препятствовать либо одновременная сборка нуклеосом, либо прямой перенос некоторых октамеров гистонов на свободные от нуклеосом участки гена. Октамеры гистонов, переносимые в направлении промоторов, вероятно, будут вытеснены в раствор, поскольку факторы инициации транскрипции и АТФ-зависимые ремоделеры, расположенные на активных промоторах, препятствуют сборке нуклеосом. Такая “челночная” модель предполагает динамичную организацию нуклеосом на генах, транскрибируемых

РНКПЗ, и поэтапный перенос целых рядов нуклеосом в направлении промотора при каждом акте транскрипции. Действительно, недавние геномные исследования хроматина, транскрибируемого РНКПЗ, показали, что соответствующие участки генома интенсивно ремоделируются при транскрипции и, возможно, представляют собой “места доступа” для факторов, участвующих в транскрипционной регуляции генома [6]. Таким образом, экспериментальные данные, наряду с приведенными выше соображениями, позволяют считать, что описанный выше механизм транскрипции нуклеосом (рис. 3 и 6), по всей вероятности, используется и *in vivo*, по крайней мере в случае генов, транскрибируемых РНКПЗ. Следует отметить, что механизмы транскрипции хроматина РНКП2 и РНКПЗ существенно различаются [7, 8].

* * *

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. 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.
2. Studitsky V.M., Kassavetis G.A., Geiduschek E.P., Felsenfeld G. Mechanism of transcription through the nucleosome by eukaryotic RNA polymerase // *Science*. 1997. Vol. 278. N 5345. P. 1960–1963.
3. Gangaraju V.K., Bartholomew B. Mechanisms of ATP dependent chromatin remodeling // *Mutat. Res*. 2007. Vol. 618. N 1–2. P. 3–17.
4. Cairns B.R. Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies // *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2007. Vol. 14. N 11. P. 989–996.
5. 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.
6. Oler A.J., Alla R.K., Roberts D.N., Wong A., Hollenhorst P.C., Chandler K.J., Cassidy P.A., Nelson C.A., Hagedorn C.H., Graves B.J., Cairns B.R. Human RNA polymerase III transcriptomes and relationships to Pol II promoter chromatin and enhancer-binding factors // *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2010. Vol. 17. N 5. P. 620–628.
7. Kireeva M.L., Walter W., Tchernajenko V., Bondarenko V., Kashlev M., Studitsky V.M. Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription // *Mol. Cell*. 2002. Vol. 9. N 3. P. 541–552.
8. Kulaeva O.I., Gaykalova D.A., Pestov N.A., Golovastov V.V., Vassilyev D.G., Artsimovitch I., Studitsky V.M. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II // *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2009. Vol. 16. N 12. P. 1272–1278.

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

The nucleosome forms the so-called “nucleosome barrier”, which presents a serious obstacle to the transcription machinery. We consider the study of formation and overcoming of the “nucleosomal barrier” by different RNA polymerases. It is shown that similar mechanisms are used by very different polymerases for transcription through chromatin. We discuss the data showing a high similarity between the mechanisms of transcription through chromatin and ATP-dependent chromatin remodeling. A model of transcription through the nucleosome is proposed.

Key words: *chromatin, transcription, nucleosome, nucleosome barrier, chromatin remodeling, elongation, 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: studitvm@umdnj.edu

Орловский Игорь Вячеславович — науч. сотр. лаборатории регуляции транскрипции и репликации биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; 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. научн. сотр. лаборатории эпигенетической регуляции транскрипции (Университет Патгерса, США). E-mail: studitoi@umdnj.edu