БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи Д. Создия са и

студитский Василий Михайлович

Молекулярные механизмы транскрипции хроматина эукариот

03.01.03 - молекулярная биология

Диссертация на соискание учёной степени доктора биологических наук в виде научного доклада

Москва – 2011

Работа выполнена в Лаборатории механизмов транскрипции хроматина (Национальный институт здоровья), в медицинской школе при Университете Вэйна штата Мичиган и в медицинской школе Роберта Вуда Джонстона штата Нью Джерси, США.

Официальные оппоненты:

академик РАН, доктор биологических наук, профессор Богданов Алексей Алексеевич академик РАН, доктор биологических наук Георгиев Павел Георгиевич академик РАН, доктор биологических наук, профессор Свердлов Евгений Давыдович

Ведущая организация:

Институт Молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Защита диссертации состоится 23 декабря 2011 г. в 11.00 на заседании диссертационного совета Д 501.001.76 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119992, Россия, Москва, Воробьевы горы, МГУ, НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, ауд. 536.

С диссертацией в виде научного доклада можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова

Диссертация в виде научного доклада разослана «____» октября 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук

gan much.

Крашенинников И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы 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 высоко консервативны у всех организмов, от бактерий до человека. 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



Рис. 1. Изменения структуры хроматина при активации транскрипции. Молчащий хроматин (1) существует в высококонденсированном виде в пределах территории хромосомы (СТ). Сначала он переводится в состояние готовности к транскрипции, т.е. в форму 30 нм фибрилл (2), дальнейшая деконденсация которых происходит при транскрипции (3). Локальные нарушения структуры 30 нм фибрилл хроматина наблюдаются также в регуляторных и промоторных участках, с которыми связываются факторы, специфичные к нуклеотидной последовательности транскрипции, и разрушается нуклеосомная структура.

виде 1.66 сверхспиральных витков на поверхности гистонового октамера, включающего две молекулы коровых гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Одна молекула линкерного гистона H1 связана с ДНК на входе и выходе из кор-нуклеосомы, а также с участками ДНК между соседними нуклеосомами. Нуклеосомы упакованы в 30-нм фибриллы хроматина, 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 vitro*. *In*

vivo, при инициации транскрипции и элонгации транскриптов РНК-полимеразой 2 (РНКП2) происходит ремоделирование хроматина. Хотя инициация традиционно считается наиболее регулируемой стадией, недавние исследования показали, что экспрессия многочисленных генов эукариот регулируется на уровне элонгации транскриптов, с участием первой (+1) нуклеосомы и факторов, взаимодействующих с хроматином (показано в лабораториях Адельман (2007) и Йонга (2007)). В то же время, после того, как РНКП2 проходит +1 нуклеосому, транскрипция генов происходит эффективно.

В работах нескольких лабораторий (Бикмор (2004), Вайнтрауба (1985) и Фельзенфельда (1984)) была предложена двухступенчатая модель изменений структуры хроматина, ассоциированных с транскрипцией РНКП2 *in vivo* (рис. 1). (1) Нетранскрибируемый, высококомпактный хроматин переходит в состояние готовности к транскрипции (30-нм фибриллы, (2)). (3) При транскрипции структура 30-нм



~30 HM

Рис. 2. Структура 30-нм фибрилл хроматина. Цепочка нуклеосом образует соленоид, в котором на виток приходится шесть-восемь динуклеосом. Показана только ДНК. Для сравнения приведен приблизительный размер мультисубъединичной РНК (PHKП2) полимеразы 2 и бактериофаговой SP6 РНКП. При транскрипции РНКП2 нарушается как структура 30-нм фибриллы, так нуклеосомная и структура (вставка).

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 (рис. 2) несовместимы с процессом транскрипции и должны быть по крайней мере частично разрушены, чтобы РНКП2 могла двигаться вдоль ДНК. Поэтому не удивительно, что транскрипцию хроматина могут облегчать различные факторы, дестабилизирующие хроматиновые фибриллы и нуклеосомы. Эти факторы, способствующие транскрипции ДНК в составе хроматина, остаются недостаточно изученными - за исключением ацетилирования гистонов и удаления гистона Н1 из транскрибируемых генов.

Нарушение нормального метаболизма хроматина во время элонгации транскриптов приводит к потере жизнеспособности клеток, преждевременному старению, и часто наблюдается при развитии различных форм рака. Таким образом, понимание детального механизма транскрипции хроматина представляет не только фундаментальный интерес, но имеет и важнейшее практическое значение. Кроме того, анализ механизма транскрипции хроматина необходим для разработки новых методов активности РНКП, получения новых ингибиторов подавления фермента И антибиотиков, которые могут найти применение в терапии многих инфекционных заболеваний.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлась расшифровка детальных молекулярных механизмов элонгации транскриптов РНКП2 и РНКП3 в хроматине, а также механизмов действия белковых факторов, влияющих на эффективность и скорость транскрипции хроматина.

Для достижения вышеописанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать новые подходы для анализа механизмов элонгации транскриптов РНКП2 и РНКП3 в хроматине с использованием «минимальной» экспериментальной системы (мононуклеосомных матриц).

2. Охарактеризовать молекулярные механизмы элонгации транскриптов РНКП2 и РНКП3 на мононуклеосомных матрицах в терминах структур ДНК-белковых комплексов, формирующихся во время и после транскрипции хроматина.

3. Выяснить роль различных компонентов используемых экспериментальных систем (РНК полимераз, последовательностей ДНК и гистонов) при транскрипции хроматина РНКП2.

факторы дополнительные белковые 4. Определить, какие меняют высоту РНКП2 нуклеосомного барьера при транскрипции И обеспечивают сохранение/восстановление структуры хроматина во время/после транскрипции.

5. Определить, как идентифицированные факторы влияют на структуры ДНК-белковых комплексов, формирующихся во время и после транскрипции хроматина РНКП2.

6. На основе полученных данных разработать детальные модели, описывающие конформационные перестройки хроматина, происходящие при транскрипции хроматина РНКП2 и РНКП3 в присутствии различных идентифицированных белковых факторов.

Научная новизна и практическая ценность работы. В результате проделанной работы созданы новые «минимальные» экспериментальные системы для анализа механизмов элонгации транскриптов в хроматине различными РНК-полимеразами (РНКП2, РНКП3, *E. coli* РНКП и РНКП бактериофага SP6) с использованием мононуклеосом. Разработанные системы сделали возможным анализ таких важных аспектов механизма транскрипции хроматина *in vivo*, как: ко-транскрипционное

сохранение/восстановление структуры хроматина (все системы), вытеснение/обмен гистонов H2A/H2B, высокий нуклеосомный транскрипционный барьер и вытеснение всех гистонов при интенсивной транскрипции (РНКП2).

С помощью разработанных систем были открыты два различных молекулярных механизма элонгации транскриптов в хроматине: РНКП2- и РНКП3-типа (табл. 1). Первый механизм характеризуется высоким нуклеосомным барьером для РНКП2, вытеснением/обменом гистонов H2A/H2B, и сохранением позиций нуклеосом при транскрипции. Второй механизм, характерный для РНКП3 отличается внутриматричным переносом октамера гистонов без потери/обмена гистонов H2A/H2B, и относительно низким нуклеосомным барьером.

В результате работы оба процесса описаны в терминах структур ДНК-белковых комплексов, формирующихся до, во время и после окончания транскрипции. Установлены молекулярные механизмы формирования нуклеосомного барьера для транскрибирующих РНКП2 и РНКП3, и сохранения нуклеосом при транскрипции РНКП2. Определены молекулярные поверхности РНК полимераз и гистонов, а также последовательности и участки нуклеосомной ДНК и гистонов, играющие ключевую роль в этих процессах.

Выяснено, что белковые факторы (FACT, TFIIS и нуклеолин), меняют высоту нуклеосомного барьера при транскрипции РНКП2 и обеспечивающие сохранение/восстановление структуры хроматина во время/после транскрипции. Механизм действия факторов описан в терминах их влияния на процессивность РНКП2 и на структуры ДНК-белковых комплексов, формирующихся во время и после транскрипции хроматина РНКП2.

В целом, полученные в работе данные существенно углубляют наши знания о молекулярных механизмах транскрипции хроматина и представляют значительный интерес для понимания основных принципов регуляции экспрессии генов. Кроме фундаментальной значимости, результаты работы имеют важное практическое значение и могут найти применение во многих прикладных исследованиях. Так, экспрессия многих человеческих прото-онкогенов (например, *c-myc* и *c-fos*) регулируется на уровне элонгации транскриптов; более того, элонгационные факторы играют важную роль в развитии многочисленных заболеваний человека, включая ВИЧ и лейкемию. Наконец, процесс восстановления хроматина во время элонгации транскриптов имеет важное значение для нормального старения. Открытия, сделанные в работе, могут быть использованы для создания новых типов ингибиторов и стимуляторов транскрипции РНКП2, а также для контроля метаболизма хроматина во время транскрипции.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на следующих конференциях и симпозиумах: на всех конференциях Гордона «Хроматин и

транскрипция» (проводятся раз в два года) в период 1994-2010 г.г., на всех конференциях FASEB «Хроматин и транскрипция» (проводятся раз в два года) в период 1993-2011 г.г., на всех конференциях PennState «Динамичный хроматин» (проводятся раз в четыре года) в период 1995-2007 г.г. и др. Автор работы многократно был приглашенным докладчиком на этих конференциях. Работа официально апробирована на заседании диссертационного совета Д 501.001.76 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Биологическом факультете Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова 22 апреля 2011 г.

Публикации. По результатам работы опубликовано 52 статьи в рецензируемых научных изданиях, в том числе 2 монографии, 4 обзорных статьи в международных периодических изданиях (в том числе в Trends in Biochemical Sciences, Mutat. Res Biochem. Cell. Biol). Основные результаты и теоретические обобщения опубликованы в ведущих российских и международных журналах (Молекулярная биология, Nat. Struct. Mol. Biol., Science, Cell, EMBO Journal, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, RNA Biology, Mol. Cell, Molecular and Cellular Biology, J. Biol. Chemistry, Nucl. Acids Res. и др.). Совокупный импакт-фактор статей B.M. Студитского составляет 1950; индекс цитируемости (H-index)- 21.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные о механизме транскрипции хроматина РНКП2 *in vivo*, рассмотренные выше, ставят целый ряд вопросов для данной работы. Что происходит с нуклеосомной структурой при передвижении РНК-полимеразы? Как формируется нуклеосомный барьер для транскрипции? Как он регулируется и преодолевается РНК-полимеразой? Наши исследования показали, что транскрипция сопровождается значительными конформационными изменениями нуклеосом, которые помогают РНК-полимеразам перемещаться без диссоциации октамера гистонов и разрушения структуры хроматина.

1. Механизм транскрипции хроматина, характерный для РНКПЗ (РНКПЗ-типа)

РНК-полимераза бактериофага SP6 была использована на ранних этапах нашей работы, главным образом потому, что SP6 полимераза 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 (см. ниже), описанное *in vivo*.

Современные представления о механизме транскрипции хроматина опираются на открытие транслокации нуклеосом при транскрипции хроматина РНК-полимеразой

бактериофага SP6. 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. 3).

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



Рис. 3. Транскрипция коротких (227 п.н.) линейных мононуклеосомных матриц SP6 РНК-полимеразой вызывает транслокацию нуклеосомного кора на расстояние около 80 п.н. Bepx: Рестрикционная карта 227-п.н. мононуклеосомной матрицы, использованной в эксперименте. ДНК была помечена по концу. Основные позиции нуклеосом до и после транскрипции показаны. Низ: Защита от рестриктаз мононуклеосомной ДНК: анализ с помощью ПААГ-гель-электрофореза в нативных обрабатывали условиях. Нуклеосомы различными рестриктазами (А, В и Н). Устойчивость И чувствительность нуклеосомной ДНК К различным рестриктазам до и после транскрипции, соответственно, указывает на то, что перенос происходит нуклеосомы (нуклеосомы, расположенные на разных концах фрагмента ДНК, имеют одинаковую подвижность в нативном геле).

Было показано, что после первого раунда транскрипции октамер остается на матрице, но перемещается (обычно на 40-80 п.н.) в направлении, обратном транскрипции (рис. 3), так что нуклеосомы после транскрипции располагаются на промоторе, блокируя последующую ре-инициацию транскрипции (рис. 4). Переносится более чем 90% октамеров, и этот процесс зависит от транскрипции: при удалении из реакционной смеси РНК-полимеразы или одного из нуклеотидтрифосфатов (NTP) 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



Рис. 4. Транслокация нуклеосом во время транскрипции приводит к блокировке промотора. Анализ меченых транскриптов в денатурирующем геле. транскрибировали Нуклеосомы без меченых нуклеотидов, чтобы вызвать перемещение октамера гистонов в область промотора, и чтобы Scal и Aval сайты были защищены от рестриктаз (как показано на схеме). Затем все чувствительные матрицы были обработаны Scal и Aval (только матрицы с нуклеосомами на промоторе не чувствительны к ферментам). [³²Ф] УТФ и свежая полимераза были добавлены, и 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 – маркёры РНК.

распределению позиционных изомеров нуклеосом, в которых единичные нуклеосомы расположены на разных участках одного фрагмента ДНК до транскрипции. Каждый



Рис. 5. "Память" при транслокации нуклеосомы: положение нуклеосом после транскрипции зависит от их положения до транскрипции. 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.

позиционный изомер генерирует определенный набор положений октамера после транскрипции (рис. 5). Трудно было бы найти объяснение такому "запоминанию" претранкрипционного положения октамера на ДНК, если допустить полную диссоциацию октамера в раствор с последующим его связыванием с ДНК.

Дополнительное доказательство модели прямого переноса гистонового 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. Этот результат тоже согласуется только с описанной 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 перенесён 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 NTP.

Для объяснения механизма прямого переноса была предложена модель "намотки"



Рис. 6. Механизм "намотки" (прямого переноса) нуклеосом при транскрипции. 1 -При достижении РНК-полимеразой (SP6) диссоциация нуклеосом происходит проксимальной нуклеосомной ДНК и частично высвобождается поверхность гистонового октамера. Отмечена граница (В) нуклеосомы и черным выделена нуклеосомная ДНК до переноса. 2 - ДНК сзади полимеразы связывается с поверхностью гистонового октамера, формируя внутринуклеосомную петлю. причем сохраняется связь между нуклеосомной ДНК и полимеразой. Такая петля является топологически обособленным доменом подвергается И 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.

(рис. 6). Когда транскрибирующая полимераза достигает нуклеосомы, она вызывает частичное раскручивание проксимального участка ДНК с поверхности гистонового октамера. По мере того, как полимераза входит в нуклеосому, происходит дальнейшее разворачивание сверхспиралей нуклеосомной ДНК, поверхность гистонового октамера 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, облегчатся 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 полимераза получает возможность завершить транскрипцию. Транслокация нуклеосом наблюдалась при транскрипции РНК-полимеразой бактериофага SP6 как коротких линейных, так и гораздо более длинных кольцевых мононуклеосомных 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-полимеразами (бактериофага SP6, *E. coli*, полимеразы 2 и 3) в присутствии нуклеосом. При завершении этапа прямого переноса гистонового



Рис. 7. Нуклеосомный барьер возникает в зоне 20-60 п.н. от начала нуклеосомного кора и исчезает после прохождения РНК-полимеразой диадной оси нуклеосомы. Схематическая диаграмма участков нуклеосом-специфичных пауз в транскрипции матриц 2 и 3 (матрица 262 п.н., см. рис. 5). Нуклеосомные матрицы транскрибировали в присутствии меченых НТФ в течение ограниченного времени, достаточного для завершения транскрипции около 90% свободных от гистонов матриц, и меченые РНК анализировали в денатурирующем ПААГ. Положения участков пауз изображены в виде черных вертикальных линий, высота которых прямо пропорциональна интенсивностям полос в геле. Пунктиром обозначены участки пауз, присутствующих и в нуклеосоме, и в свободной от гистонов матрице. Средний уровень фона обозначен горизонтальной линией.

октамера во время транскрипции на нуклеосоме можно было бы ожидать, что этот нуклеосомный барьер исчезнет. Так, изучение вызванных нуклеосомами пауз при транскрипции может позволить определить момент переноса гистонового октамера. Для изучения замедления транскрипции нуклеосомами мы использовали короткие мононуклеосомные 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. Как показано на рис. 7, при транскрипции нуклеосом

наблюдаются отчетливые и специфичные паузы. 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. внутрь 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, 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, повидимому, перенос гистонового 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 происходит. Таким образом, анализ распределения нуклеосом-специфичных пауз позволяет предположить, что перенос гистонового октамера завершается до того момента, когда полимераза достигает диадной оси нуклеосомы.



Рис. 8. Структура нуклеосомного барьера для транскрипции: идентификация интермедиатов, образующихся при нуклеосом-специфичной остановке транскрипции с помощью электронной крио-микроскопии (ЕС-М). Нуклеосомы форрмировали на матрице длиной 227 п.н. и транскрибировали РНК полимеразой бактериофага SP6. Показаны три класса комплексов, образующихся при транскрипции нуклеосом: а - частички с одним "хвостом" ДНК при расположении комплексов полимеразой и октамером; с - частички с двумя "хвостами" ДНК. Комплексы а и с являются "закрытыми" интермедиатами и наблюдаются только при достижении РНК-полимеразой нуклеосомного барьера. Масштаб - 10 нм. Приведена трехмерная модель комплексов а и с. Нуклеосома изображена в виде диска, транскрипт – в виде черной линии.

Далее нуклеосомный барьер для транскрипции SP6 PHK полимеразой изучали, используя короткие мононуклеосомные матрицы, позволяющие блокировать PHKполимеразу в различных определённых положениях на нуклеосоме. 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, формирующиеся в различных позициях на нуклеосоме, анализировали с помощью электронной крио-микроскопии (ЕС-М); эти данные сравнивали с данными биохимического анализа тех же проб. Три вида интермедиатов формируются при транскрипции через нуклеосому (рис. 8). Два из них (а и с) можно было наблюдать только тогда, когда полимераза достигала барьера. Только эти два "закрытых" интермедиата можно обнаружить при спонтанных остановках полимеразы в различных позициях в нуклеосоме. Таким образом, наличие "закрытых" интермедиатов коррелирует с нуклеосом-специфичными паузами. Можно предположить, что такие интермедиаты действительно отвечают за возникновение пауз и что для продолжения процесса транскрипции требуется перевести их в "открытую" форму (рис. 8). 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 (рис. 7). Можно предположить, что связанные с ДНК гистоны могут быть "прозрачны" для полимеразы, и что интермедиаты переноса 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 этих механизма участвуют в формировании нуклеосомного барьера.

На основании пприведённых данных нами был предложен следующий сценарий транскрипции через нуклеосому (рис. 9). 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 гистонового октамера перед элонгационным комплексом (интермедиат 2). Так полимераза "расчищает" свой путь; это может объяснять, почему гистоновый октамер практически полностью "прозрачен" для транскрипции. Как только полимеразой более 25 нуклеосомной ДНК, образуется считано п.н. 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 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 вплоть до 50 п.н. ДНК вытеснены элонгационным комплексом. Примечательно, что вытесненный участок ДНК находится перед полимеразой на расстоянии около 80 п.н. Результатом такого "вытеснения на расстоянии" является то, что элонгационный комплекс при транскрипции через нуклеосому не окружен большим количеством ДНКгистоновых взаимодействий; это может способствовать выходу полимеразы из



Рис. 9. Механизм транскрипции нуклеосом РНК-полимеразой бактериофага SP6 (и РНКПЗ, см. рис. 10). 1 - РНК-полимераза быстро считывает первые 25 п.н. нуклеосомной ДНК; при этом происходит частичная диссоциация ДНК от октамера (2). 3 - ДНК позади полимеразы РНКП связывается с освободившейся поверхностью гистонового октамера, образуя внутринуклеосомную петлю. Дальнейшее продвижение РНКП ведет к петли и формированию разрыву интермедиатов с РНКП, расположенной в непосредственной близости от нуклеосомы Здесь РНКП останавливается. (4,5). Вероятно, затем ДНК диссоциирует с октамера, поверхности 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).

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 сзади 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 (интермедиат 7) на образовавшейся перед полимеразой свободной ДНК.

Может ли механизм транскрипции нуклеосом небольшой (около 100 кДа) односубъединичной РНК-полимеразы бактериофага SP6 быть сходен с механизмом, используемым заведомо более крупными (до 600 кДа) многосубъединичными эукариотическими РНК полимеразами? Попытка ответить на этот вопрос была нашем исследовании, где изучали транскрипцию короткой предпринята В мононуклеосомной матрицы РНК полимеразой бактериофага SP6 и дрожжевой РНКполимеразой 3, что позволило напрямую сравнить транскрипцию прокариотической и эукариотической РНК полимеразами на очень сходных матрицах и в сходных условиях (рис. 10).

Как распределение нуклеосом-специфичных.пауз при транскрипции, так и расстояние прямого переноса гистонового октамера оказались сходными в обоих случаях (рис. 10). Эти данные показывают, что сходные механизмы используются для



Рис. 10. Транскрипция через нуклеосому прокариотическими и эукариотическими РНКполимеразами осуществляется сходными механизмами. Наверху: анализ нуклеосомоспецифичных пауз при транскрипции сходных 227-п.н. дрожжевой РНКполимеразой 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 полимераз 3 и 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.

транскрипции через нуклеосому очень разными полимеразами. Так как *in vivo* PHKполимераза бактериофага SP6 не транскрибирует нуклеосомы, это может указывать на то, что механизм транскрипции через нуклеосому отражает некоторые различные фундаментальные свойства различных элонгационных комплексов и структуры

нуклеосом.

Может ли петлевой механизм, аналогичный транскрипционному механизму переноса случае АТФ-зависимого хроматина? работать в ремоделирования Следующие данные свидетельствуют 0 высоком сходстве механизмов транскрипционного и АТФ-зависимого ремоделирования хроматина. Во-первых, многие активности ферментов АТФ-зависимого ремоделирования и РНК-полимераз схожи. включают транслокацию нуклеосом на короткие расстояния, частичное Они вытеснение ДНК с поверхности октамера и перенос октамера in trans (между различными молекулами ДНК). Все эти активности, вероятно, связаны с частичным

АТФ-ЗАВИСИМЫЕ РЕМОДЕЛЕРЫ



1. СВЯЗЫВАНИЕ -> 2. РАЗВЁРТЫВАНИЕ ДНК -> 3. ВНУТРЕННЯЯ ПЕТЛЯ ДНК -> 4. МИГРАЦИЯ ПЕТЛИ



PHKI 3/SP6

Рис. 11. Петлевые механизмы ремоделирования хроматина некоторыми АТФзависимыми ремоделерами (вверху) и дрожжевой 3 и SP6 PHK-полимеразами. Элонгирующая PHK-полимераза вносит ~90° 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 и октамер-связывающий сайты, и что гидролиз АТФ приводит к изменению конформации белкового комплекса, облегчающий внесение изгиба в ДНК. (4) Изгиб ДНК перемещается в пределах нуклеосомной ДНК либо спонтанно (АТФ-зависимые ремоделеры) или, вместе с транскрибирующим ферментом.

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 нуклеотидтрифосфатов (НТФ). Наконец, по крайней мере некоторые АТФзависимые ремоделеры могут перемещаться вдоль ДНК. Все АТФ-зависимые ремоделеры имеют выраженные хеликаза-подобные мотивы (но не имеют хеликазной активности) и являются транслоказами ДНК, которые могут направленно двигаться вдоль ДНК, вероятнее всего, вращаясь вокруг двойной спирали. Таким образом, АТФзависимые ремоделеры обладают всеми свойствами, которые характерны для транскрибирующей РНК полимеразы, и которые, видимо, и определяют судьбу

нуклеосом во время этого процесса. Таким образом, вполне вероятно, что аналогичные механизмы используются АТФ-зависимыми ремоделерами и РНК полимеразами во время транскрипции (рис. 11), а также могут быть использованы в других механистически сходных процессах, таких как репликация ДНК. В самом деле, октамер гистонов переносится при репликации минихромосом вируса 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.) мононуклеосомных матриц оказалось плодотворным для изучения некоторых ключевых свойств транскрибируемого хроматина, таких как, например, способность нуклеосом сохраняться при транскрипции. Именно использование коротких матриц позволило открыть ряд удивительных особенностей механизма транскрипции упакованной в хроматин ДНК. 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,



Рис. 12. Гипотетическая "челночная" модель нуклеосомной организации активного гена, транскрибируемого РНКП 3. Каждый комплекс транскрибирующей РНКП вызывает транслокацию каждой нуклеосомы в направлении промотора по механизму "намотки" (см. рис. 9). Это приводит к уменьшению 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 напоямую переносится в доугую зону (например. в дистальную от промотора часть гена). при транскрипции мононуклеосомных матриц РНК-полимеразой бактериофага SP6). Тем не менее, единичная нуклеосома, расположенная как на короткой (200-250 п.н.) матрице, так и на длинных полинуклеосомах, представляет собой серьёзное 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 описанный выше РНКПЗ-специфичный механизм ли при транскрипции in vivo? Результаты применения модели нуклеосомного переноса к полинуклеосомным участкам транскрибируемых генов представлены на рис. 12. 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 АТФзависимые 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. Таким образом, наши экспериментальные данные, наряду с приведенными выше соображениями, позволяют считать, что описанный выше механизм транскрипции нуклеосом (рис. 9 и 12), по всей вероятности, используется и *in vivo*, по крайней мере, в случае генов, транскрибируемых РНКПЗ.

2. Механизм транскрипции хроматина, характерный для РНКП2 (РНКП2-типа)

2.1. Общие характеристики механизма транскрипция хроматина РНКП2: высокий нуклеосомный барьер, вытеснение димера Н2А/Н2В и сохранение



Рис. 13. Анализ РНКП 2 и нуклеосом на SDS ПААГ. Подвижности трех наибольших субъединиц РНКП 2 и всех коровых гистонов указаны на правой стороне каждого геля.

позиционирования нуклеосом

В случае РНКП2, до недавнего времени не существовало экспериментальной системы, позволяющей получать аутентичные элонгационные комплексы (обладающие свойствами комплексов, инициированных на промоторе) с высоким выходом, необходимым для биохимического анализа процесса транскрипции хроматина. В частности, очищенные промотор-зависимые системы поддерживают транскрипцию только на ~1% матриц. Кроме того, мы показали, что другая широко используемая и эффективная экспериментальная система, разработанная М.



Рис. 14. Экспериментальный подход для анализа механизма транскрипции мононуклеосом РНКП2. Элонгационный комплекс (ЕС9, содержащий РНК длиной 9 нуклеотидов) реконструировали с использованием очищенной дрожжевой РНКП2 и иммобилизовали на частицах Ni²⁺NTA. Нуклеосомы реконструировали отдельно, лигировали с ЕС9, и удлиняли РНК до ЕС45 в присутствии неполной комбинации меченых НТФ (РНКП2 останавливали до того, как она дойдёт до нуклеосомы). Меченые НТФ отмывали, и проводили дальнейшую транскрипцию через нуклеосому в присутствии всех немеченых НТФ. После окончания транскрипции РНКП2 диссоциирует от матрицы. Цепи ДНК показаны как черные линии, РНК представлена линией со стрелкой на 3'-конце.

Чамберлайном и использующая инициацию с выступающего 3'-конца матрицы, не воспроизводит механизм транскрипции хроматина РНКП2, описанный *in vivo*. Поэтому нами в сотрудничестве с лабораторией М. Кашлева (Национальный Институт Здоровья, США) была разработана новая эффективная экспериментальная система для анализа транскрипции хроматина этим ферментом.

В новой, «минимальной» системе используются высокоочищенные белки (рис. 13). Мононуклеосомы реконструировали отдельно, на коротком (204-п.н.) фрагменте ДНК, содержащем нуклеосом-позиционирующую последовательность 5S гена X. laevis (рис. 14). Несмотря на использование нуклеосом-позиционирующей последовательности, только около половины нуклеосом занимали последовательность позиционирования 5S нуклеосомы (N2). Остальные нуклеосомы (N1) были позиционированы на другом конце матрицы (данные не приводятся). Элонгационный комплекс (ЕС, elongation complex), содержащий РНКП2, собирали по методу М. Кашлева, используя очищенную



Рис. 15. Нуклеосомный барьер для РНКП 2 понижается при повышении ионной силы. Комплекс ЕС55, содержащий РНК, меченую по позициям +51, +53 и +55 (выделены жирным шрифтом в последовательности под гелем) транскрибировали в различных условиях. Стрелки с левой стороны от геля указывают положение исходного, длиной 55 нуклеотидов, и побочного, длиной 64 нуклеотида (read-through), продуктов РНК, а также полноразмерного транскрипта размером 244 нуклеотида. Образцы в дорожках 3-6 и 9-12 были инкубированы с НТФ в присутствии указанных концентраций КСІ. Дорожки 7 и 13 соответствуют образцам комплекса EC55, инкубированного с НТФ в буфере ТВ40 (40 мМ КСІ) в течение 5 минут с последующим повышением концентрации КСІ до 1М и дополнительной инкубацией элонгационного комплекса в течение еще 5 мин.

+65

дрожжевую РНКП2 и синтетические РНК и ДНК олигонуклеотиды. Такие комплексы обладают свойствами, характерными для элонгационных всеми комплексов, инициированных на промоторе. Иммобилизированный комплекс ЕС9 с меченным TDS50 (фрагментом смысловой цепи ДНК размером 50 нуклеотидов) был лигирован с немеченным фрагментом ДНК 204 п.о. или с нуклеосомными матрицами. Затем комплексы (элюированные со смолы с помощью имидазола или иммобилизованные на смоле), транскрибировали в буферах, содержащих различные концентрации KCI.

Природа нуклеосомального барьера для РНК-полимеразы 2 была исследована с помощью сравнения эффективностей транскрипции ДНК и нуклеосомных матриц (рис. 15). Для выборочного анализа только лигированных комплексов, транскрипция РНКП2, начиная с комплекса ЕС9 была проведена в несколько этапов: сначала до формирования ЕС45, далее от ЕС45 до ЕС55. В процессе формирования ЕС55 РНК была помечена в позициях +51, +53 и +55 путем инкубации с α-[³²Φ]АТФ и немеченным ЦТФ. Полученные элонгационные комплексы представляли собой смесь ЕС55 и ЕС64 (рис. 15).

После формирования ЕС55/ЕС64 транскрипция была продолжена при различных концентрациях КСІ после добавления всех четырех нуклеозидтрифосфатов (НТФ) (рис. 15). На свободной ДНК полимераза была способна закончить синтез полноразмерных 244-нуклеотидных транскриптов с незначительными задержками при всех использованных концентрациях КСІ (линии 3-7). Напротив, нуклеосомы вызывали практически полную блокировку транскрипции в условиях физиологической или более низкой ионной силы (40 и 150 мМ КСІ, линии 9 и 10), вызывая остановку полимеразы в позициях от +65 до +150. Большая часть полученных полноразмерных транскриптов (в этих условиях менее 10% от всех транскриптов), вероятно, могут образовываться вследствие транскрипции небольших количеств свободной ДНК, присутствующих в нуклеосомальных препаратах. При повышенной концентрации KCI (300 мМ), когда около 30% РНКП2 могут преодолеть структура нуклеосом не нарушена, нуклеосомальный барьер (линия 11). Когда ионная сила была увеличена до концентрации 1 М KCI, дестабилизирующей нуклеосомы, но сохраняющей элонгационные комплексы, РНКП2 была способна завершить транскрипцию (линия 12). Более того, в случае, когда транскрипцию проводили при 40 мМ KCI, а затем продолжали при концентрации 1 М КСІ, более чем 50% молекул полимеразы, которые изначально блокировались в нуклеосомах при более низкой ионной силе, были способны продолжить транскрипцию. Следовательно, большинство элонгационных комплексов, остановленных нуклеосомами в условиях более низкой ионной силы, оставались интактными, но заблокированными, и нуклеосомный барьер является по крайней мере частично обратимым.

Для того, чтобы изучить судьбу нуклеосомы после транскрипции с участием РНКП2, были собраны комплексы ЕС9 с использованием меченного TDS50, которые затем были лигированы с нуклеосомной матрицей. Эти элонгационные комплексы инкубировали в присутствии АТФ, ЦТФ и ГТФ, чтобы сформировать ЕС45 на лигированной матрице. Комплексы ЕС45, иммобилизированные на гранулах аффинного носителя, после отмывки были элюированы и проанализированы нативным ПААГ-электрофорезом после добавления всех четырех НТФ (рис.16).

Транскрипция в физиологических условиях (150 мМ КСІ) и при 300 мМ КСІ сопровождалась появлением нового ДНК-белкового комплекса, имеющего большую подвижность в геле, чем нуклеосомы, и ДНК (в соотношении 1:1, рис. 16). Возможность того, что в результате транскрипции возникает нуклеосома, расположенная в другой позиции на ДНК, крайне маловероятна, поскольку нуклеосомы находящиеся на конце матрицы (такие как N2) обладают наибольшей подвижностью на нативном геле). Следовательно, данные указывают на то, что транскрипция РНКП2 вызывает формирование субнуклеосомного комплекса.

Чтобы идентифицировать новый комплекс, октамер гистонов, гексамер (получаемый в отсутствии одного H2A/H2B димера), и тетрамер (H3/H4)₂ были реконструированы на 204-п.н. ДНК, выделены из нативного геля и лигированы к



Рис. 16. После транскрипции нуклеосом РНКП 2 образуются новый ДНК-белковый комплекс и свободная ДНК. Нуклеосомные матрицы, содержащие меченую ДНК, транскрибировали РНКП2 в присутствии 300 мМ КСІ и разделяли на нативном геле. Указаны позиции нуклеосом, нового комплекса (гексасом) и ДНК. Новый комплекс был идентифицирован как гексасома по характерной подвижности в нативном ПААГ и с помощью ДНазаІ футпринтинга (данные не приводятся).

TDS50:NDS59 ДНК для получения 254-п.н. матрицы. Сравнение подвижностей реконструированных комплексов и нового нуклепротеинового комплекса показало, что новый комплекс, получаемый в результате транскрипции, обладал той же подвижностью в нативном геле, что и реконструированная гексасома (рис. 16). Таким образом, прохождение РНКП2 через нуклеосому вызывает потерю одного димера H2A/H2B. Этот вывод был дополнительно подтвержден добавлением гистонов H2A и H2B к гексасоме и транскрибированной матрице (данные не приводятся). После добавления H2A/H2B количество гексасом снизилось, тогда как количество N1- и N2-

нуклеосом увеличилось. Следовательно, продуктом, возникающим в результате транскрипции РНКП2 через нуклеосомы, является гексасомы, остающиеся на тех же позициях на ДНК, что и нуклеосомы до транскрипции. Это заключение было также подтверждено с помощью картирования положения гексасом на ДНК с помощью ферментов рестрикции и ДНКаза І-футпринтингом (данные не приводятся). Итак, гистоны остаются на их исходных позициях на ДНК после транскрипции (за исключением вытесненного димера H2A/H2B).

Таким образом, наши данные, описанные в этом разделе, показывают, что при физиологической ионной силе нуклеосомы формируют чрезвычайно высокий барьер для РНКП2. Транскрипция РНКП2 через нуклеосому вызывает диссоциацию одного из димеров H2A/H2B, что приводит к формированию гексасомы, расположенной на ДНК в



Рис. 17. Мононуклеосомные матрицы для транскрипции РНКП2 (человека и дрожжей) и РНКП *Е. coli*, содержащие точно позиционированные нуклеосомы. На всех матрицах нуклеосомы расположены на одинаковом расстоянии от первого синтезированного нуклеотида РНК (+1). Нуклеосомы формируются на различных, полученных методом SELEX последовательностях ДНК (601, 603 или 605), имеющих высокую аффинность к коровым гистонам и точно позиционирующих нуклеосомы.

той же позиции, как и нуклеосомы до транскрипции. Не обнаружено признаков того, что нуклеосома или гексасома переносятся в область выше РНКП2, осуществляющей транскрипцию. Таким образом, все основные характеристики транскрипции через нуклеосому РНК полимеразами 2 и 3 существенно отличаются (табл. 1).

Недавние геномные исследования лаборатории Рандо (2007) показали, что при умеренной транскрипции РНКП2 *in vivo* происходит вытеснение и обмен только гистонов H2A/H2B (гистоны H3 и H4 не обмениваются), что согласуется с нашими данными, полученными *in vitro*. Таким образом, наша «минимальная» экспериментальная система успешно воспроизводит эту важную характеристику транскрипции хроматина РНКП2 *in vivo*. Кроме того, недавно было показано, что

экспрессия многочисленных генов эукариот регулируется на уровне элонгации транскриптов с участием первой (+1) нуклеосомы, формирующей, видимо, чрезвычайно высокий, регулируемый барьер *in vivo*.

Поэтому основной задачей следующего этапа нашей работы была характеризация нуклеосомного барьера для транскрипции РНКП2 и описанного выше РНКП2специфичного механизма транскрипции хроматина в терминах интермедиатов, формирующихся во время этого процесса.

2.2. Механизмы формирования нуклеосомного барьера для РНКП2

В предыдущих исследованиях использовались короткие фрагменты ДНК, поддерживающие формирование мононуклеосом в 2-3 альтернативных позициях (рис.



Рис. 18. Анализ позиций нуклеосом на 603 и 605 последовательностях ДНК. А. Ожидаемые позиции 603 и 605 нуклеосом на ДНК. Указаны сайты для ферментов рестрикции. Позиции нуклеосом обозначены пунктирными линиями. Б. Анализ позиций 603 и 605 нуклеосом на ДНК С помощью рестрикционных ферментов. Анализ до (-), либо после расщепления указанными ферментами рестрикции. В. Анализ позиций 603 нуклеосом ДНК на методом гидроксильного и ДНКаза I футпринтинга.







16). Одной из неотложных задач была разработка матриц, содержащих точно позиционированные нуклеосомы. Это стало возможным только после недавнего получения в лаборатории Д. Видома последовательностей ДНК, имеющих высокую аффинность к гистонам и точно позиционирующим нуклеосомы. С использованием таких последовательностей ДНК были разработаны структурно сходные матрицы, поддерживающие транскрипцию РНК полимеразами 2 дрожжей и человека, а также

РНКП E. coli (рис. 17). Преимуществами вновь созданных матриц является возможность прямого структурного анализа интермедиатов, формирующихся при мононуклеосом, транскрипции а также сравнительного анализа механизмов транскрипции хроматина этими ферментами в очень сходных условиях. Предварительно нами было показано, что все основные аспекты РНКП2-специфичного механизма транскрипции нуклеосом воспроизводятся обоими РНК-полимеразами. РНКП Е. coli использовали для анализа консервативных аспектов механизма, когда требовалось получить структурно гомогенные интермедиаты, формирующиеся при транскрипции через нуклеосомы.

Как и в вышеописанных исследованиях, мононуклеосомы реконструировали до инициации транскрипции. Нуклеосомы формировались в ожидаемых позициях на ДНК: это было показано с помощью анализа нуклеосом электрофорезом в нативном ПААГ, с помощью картирования рестрикционными ферментами, а также ДНКаза I и гидроксильным футпринтингом (рис. 18). Транскрипцию *E. coli* РНКП инициировали с промотора или лигировали собранные элонгационные комплексы; транскрипцию человеческой РНКП2 инициировали с промотора (в сотрудничестве с лабораторией Д.



Рис. 19. Высота 601 и 603 нуклеосомных барьеров для транскрипции РНКП 2 зависит от ориентации нуклеосом на ДНК. Транскрипция РНК-меченых комплексов EC45 дрожжевой РНКП2 была проведена в присутствии немеченых НТФ при указанных концентрациях KCI. R (reverse) – обратная ориентация нуклеосом. Показаны нуклеосомные барьеры в позициях +15 и +45 (15 и 45 п.н. от промотор-проксимальной границы нуклеосомы). На нуклеосомах 601R и 603 («разрешающие» ориентации матриц) нуклеосомный барьер менее выражен, и полноразмерные транскрипты формируются на значительно большей фракции матриц при 150 и 300 мМ KCI.

Луза); в случае дрожжевой РНКП2 лигировали собранные элонгационные комплексы. Для анализа механизма транскрипции использовали подход, сходный с описанным выше. ЕС55 РНК была пульс-мечена; после формирования ЕС55 меченные НТФ отмывали, и транскрипция была продолжена при различных концентрациях КСI после добавления всех четырех нуклеозидтрифосфатов. При таком подходе сигнал от меченной РНК, присутствующей в каждой позиции на геле, соответствует молярной доле РНК данной длины, и паузирование РНКП может быть количественно оценено без дополнительных вычислений.

При анализе транскрипции нуклеосом, сформированных на трех различных высокоаффинных последовательностях (601, 603 и 605), РНКП2 дрожжей и человека, а также РНКП *E. coli* были получены сходные результаты (рис. 19). Во всех случаях в одной из двух транскрипционных ориентаций матриц (601, 603R и 605R) нуклеосомы формируют необычайно высокий, нуклеосом-специфичный, непреодолимый +45 барьер для полимераз (эта транскрипционная ориентация была названа запрещающей). Этот высокий нуклеосомный барьер преодолевается только в присутствии 1 М КСI, когда структура нуклеосом разрушена. Ни один из известных





Рис. 20. Sin мутации и удаление N-концевых доменов гистонов уменьшает высоту +45 и +15 нуклеосомных барьеров, соответственно, препятствующих транскрипции РНКП 2. А. 603 нуклеосомы, содержащие гистоны дикого типа (+N-ДОМЕНЫ), Sin мутант H3 (H3 T118I) или «бесхвостые» (-N-ДОМЕНЫ) гистоны были транскрибированы при указанных концентрациях КСІ. Анализ пульс-меченных РНК в денатурирующем ПААГ. Б. Позиции различных Sin мутаций в гистонах H3 (показаны синим цветом) и H4 (показаны зелёным цветом) по отношению к нуклеосомной диадной оси (белый ромб).

элонгационных факторов не обеспечивает эффективного преодоления этого барьера. Нуклеосомный барьер такой высоты не был описан в случае нуклеосом, сформированных на последовательностях ДНК, имеющих более низкую аффинность к гистонам. Поэтому было предположено, что последовательности ДНК, имеющие высокую аффинность к гистонам, определяют формирование такого барьера.

В альтернативной ориентации (601R, 603 и 605) все нуклеосомные матрицы формируют барьер, сходный по высоте с барьером, изученным в случае нуклеосом, сформированных на геномных последовательностях ДНК (рис. 15). Эта транскрипционная ориентация была названа разрешающей. Этот барьер может быть преодолён в присутствии 0.3M KCl, а также при физиологической концентрации ионов (0.15M KCl) в присутствии различных элонгационных факторов (см. ниже). В

дальнейшей работе использовали, главным образом, нуклеосомы, позиционированные в разрешающей ориентации на последовательностях ДНК, имеющих высокую аффинность к гистонам.

Анализ распределения нуклеосом-специфичных пауз на нуклеосомной ДНК (рис. позволил идентифицировать два участка предпочтительного паузирования РНКП2, расположенных на расстоянии 15 и 45 п.н. от промотор-проксимальной границы нуклеосомной ДНК (участки +15 и +45, соответственно). Анализ транскрипции нуклеосом, сформированных ДНК. имеющей рандомизированную на последовательность подтвердил, что, действительно, на такой ДНК движение РНКП2 через участки нуклеосомной ДНК +15 и +45 замедлено (данные не приводятся). На большинстве нуклеосомных матриц именно барьер +45 является наиболее высоким, и определяет общую скорость транскрипции нуклеосом РНКП2 (рис. 19). Было предположено, что участки +15 и +45 соседствуют с участками ДНК-гистоновых взаимодействий повышенной аффинности, которая в значительной степени не зависит



Рис. 21. Позиции нуклеосом-специфичных барьеров, препятствующих транскрипции РНКП 2 в структуре нуклеосом. Структура кор-нуклеосом показана слева и ход нуклеосомной ДНК - справа. Н3/Н4 тетрамер выделен фиолетовым цветом и H2A/H2B димеры - зеленым и голубым. Участки ДНК, взаимодействующие с гистонами, показаны справа соответствующими цветами. Направление транскрипции РНКП2 указано стрелкой. Позиции сильных нуклеосом-специфичных барьеров для транскрипции РНКП2 показаны белыми прямоугольниками, а участки ДНК-гистоновых взаимодействий, влияющих на высоты этих барьеров – серыми линиями. Взаимодействия в областях +35,+70 и +95 определяют высоты +15. +45 и +45 барьеров. соответственно.

от последовательности ДНК. В тоже время, определённые последовательности ДНК дополнительно увеличивают силу ДНК-гистоновых взаимодействий в этих участках, иногда создавая очень высокий барьер для транскрибирующей РНКП2.

Для картирования последовательностей гистонов, участвующих в этих высокоаффинных взаимодействиях и/или определяющих высоту нуклеосомного барьера для РНКП2 анализировали транскрипцию через нуклеосомы, содержащие различные мутанты гистонов. Для анализа были выбраны 4 мутации класса Sin, которые уменьшают аффинность гистонов НЗ или Н4 к нуклеосомной ДНК и которые были предварительно структурно охарактеризованы методом рентгеноструктурного анализа в лаборатории К. Люгер (рис. 20Б). Все выбранные мутации ослабляют ДНКгистоновые взаимодействия в районе диадной оси нуклеосомы (участка +60 - +80 нуклеосомной ДНК), и существенно уменьшают нуклеосомный барьер в позиции +45 нуклеосомной ДНК (рис. 20А). Таким образом, ДНК-гистоновые взаимодействия на участке +60 - +80 нуклеосомной ДНК определяют высоту нуклеосомного барьера, формирующегося, когда активный центр РНКП2 находится в позиции +45. Скорее всего, РНКП2 встречает этот нуклеосомный барьер, когда передняя граница фермента, расположенная ~10-20 п.н. перед активным центром, находится в области сильных ДНК-гистоновых взаимодействий в участке +60 - +80 нуклеосомной ДНК. Наши выводы были подтверждены анализом силы ДНК-гистоновых взаимодействий, проведённых недавно в лаборатории М. Ванг методом разворачивания нуклеосомной ДНК с помощью лазерного пинцета. В этих исследованиях было показано, что нуклеосомы



Рис. 22. Асимметричное распределение последовательностей нуклеосомной ДНК, имеющих высокую аффинность к коровым гистонам (НА-последовательностей). Верх: сравнение последовательностей 601, 603, 605 в соответствии с их транскрипционной ориентацией (показаны стрелками). Справа показана (в %) степень идентичности левой (L) и правой (R) последовательностей с HA-консенсусом (CON, помечен красным цветом). Ромбом положение нуклеосомальной диадной оси. Низ: Отмечены измененные показано последовательности ДНК 603R [603R-L, -R, -R3 и R(2-3), изменённые последовательности зачёркнуты] и позиция блокировки РНКП2 (красная стрелка). Последовательность 603R-R(2-3) вызывает остановку РНКП. расположенной на расстоянии 45 п.н. до этой последовательности. содержат три участка сильных ДНК-гистоновых взаимодействий: +25 - +35, +60 - +80 и +110 - +120. Соответственно, высокий нуклеосомный барьер в участке +15 определяется, скорее всего, сильными ДНК-гистоновыми взаимодействиями на участке +25 - +35 (рис. 21). Кроме того, нами был картирован дополнительный участок сильных ДНК-гистоновых взаимодействий в положении +85 - +95, определяющий высоту нуклеосомного барьера +45 (см. ниже).

Высота нуклеосомного барьера определяется также присутствием N-концевых доменов коровых гистонов (рис. 20). Удаление N-концевых доменов всех коровых

гистонов приводит к локализованному и значительному ослаблению нуклеосомного барьера +15. Удаление только N-концевых доменов коровых гистонов H2A/H2B или H3/H4 также приводит к менее выраженному ослаблению нуклеосомного барьера +15 (данные не приводятся), причём эффекты удаления доменов суммируются. Нуклеосомы, не содержащие N-концевые домены коровых гистонов и содержащие Sinмутантные гистоны, транскрибируются высокоэффективно, причём эффекты Sinмутаций и удаления N-концевых доменов коровых гистонов также суммируются. Таким образом, N-концевые домены коровых гистонов также суммируются. Таким образом, N-концевые домены коровых гистонов ингибируют транскрипцию PHKП2. Эти исследования показали, что определённые модификации структуры нуклеосом не нарушают стабильности нуклеосом, и позволяют успешно преодолеть нуклеосомный барьер. В то же время, Sin-мутации вызывают диссоциацию гистонов во время транскрипции (данные не приводятся) и, таким образом, нарушают процесс транскрипции хроматина, необходимый для нормальной жизнедеятельности клетки.

Пока неясно, как N-концевые домены коровых гистонов ингибируют транскрипцию хроматина. Эти домены не влияют на силу внутринуклеосомных ДНК-гистоновых взаимодействий и, таким образом, маловероятно их прямое влияние на нуклеосомный барьер. Скорее всего, N-концевые домены влияют на эффективность и/или скорость формирования интермедиатов, определяющих скорость транскрипции хроматина РНКП2 (см. ниже).

На следующем этапе работы определяли, какие последовательности ДНК определяют высокую аффинность гистонов к ДНК и, соответственно, формирование высокого нуклеосомного барьера для транскрибирующей РНК полимеразы (рис. 21). Эти исследования позволяют определить, может ли высота нуклеосомного барьера определяться специфическими последовательностями ДНК. Сравнение последовательностей, обеспечивающих позиционирование нуклеосом 601, 603 и 605, позволило идентифицировать НА (high-affinity)-последовательности, определяющие высокую аффинность кор-гистонов к нуклеосомной ДНК (рис. 22). На всех матрицах НА-последовательности расположены в области ДНК, связанной с центральным Н3/Н4 тетрамером. Эти последовательности распределены ассиметрично относительно нуклеосомной диады: эти последовательности более сходны с консенсусом в удаленной от промотора половине нуклеосомной ДНК в запрещающей ориентации матриц.

Чтобы подтвердить, что именно присутствие консенсус-последовательностей отвечает за высокую аффинность нуклеосомной ДНК к кор-гистонам и формирование высокого нуклеосомного барьера. Для этого исследовали эффект различных элементов последовательности нуклеосомной ДНК на аффинность ДНК к коровым гистонам и на позиционирование нуклеосом, у которых различные участки матрицы 603R были мутированы (рис. 22). Нуклеосомы собирали на полученных

последовательностях меченой 603R ДНК в присутствии избытка немеченой геномной ДНК. При такой сборке часть гистонов перераспределяется на конкурентную геномную ДНК, и количество меченой ДНК в геле обратно пропорционально эффективности сборки гистонов на 603R ДНК и аффинности этой ДНК к гистонам. Полученные нуклеосомы анализировали методом нативного ПААГ-электрофореза (рис. 23). Мутации последовательностей, схожих с консенсусом, в левой, приближенной к промотору половине матрицы (603R-L, рис. 22), практически не влияли на аффинность ДНК к гистонам и на позиционирующие свойства матрицы 603R (рис. 23). Мутации консенсус-последовательностей, введенные в правую половину этой матрицы (603R-R, рис. 22), снижали аффинность ДНК к коровым гистонам и вызывали потерю позиционирования нуклеосомы на матрице (рис. 23). Таким образом, HAпоследовательности, расположенные в дистальной от промотора половине матрицы 603R обеспечивают высокую аффинность нуклеосомной ДНК к гистонам и точное



Рис. 23. Анализ нуклеосом, сформированных на мутантных вариантах матрицы 603R, методом нативного ПААГ-электрофореза. Промотор-проксимальные (L) или дистальные (R) области нуклеосомальной ДНК были мутированы (см. рис. 22). Нуклеосомы были собраны на меченой 603R ДНК в присутствии избытка немеченой геномной ДНК. При такой сборке часть гистонов перераспределяется на конкурентную геномную ДНК, и количество меченой ДНК в геле обратно пропорционально эффективности сборки гистонов на 603R ДНК и аффинности этой ДНК к гистонам. Мутации в участке R(2-3) приводят к уменьшению аффинности 603 ДНК к гистонам, а мутации R – также и к нарушению позиционирования нуклеосом на 603 ДНК. Расположение нуклеосом на матрицах отмечено овалами. М: маркер, плазмида pBR322, рестрицированая *Msp*I.

позиционирование нуклеосомы. Частичный мутагенез правой половины (матрица 603R-R(2-3)) также приводил к понижению аффинности этой матрицы к коровым гистонам, однако не влиял на позиционирование нуклеосомы (рис. 23). Следовательно, детерминанты позиционирования нуклеосомы и аффинности ДНК к кор-гистонам различаются.

Далее был исследован эффект НА-последовательностей на транскрипцию РНКполимеразой 2. Эксперименты проводили с использованием мононуклеосомальных

матриц 603R, формирующих сильный, полярный барьер для продвижения РНКП2 (рис. 19). Позиционированные 603R нуклеосомы лигировали С собранными элонгационнными комплексами ЕС-119 (цифровой индекс указывает на позицию активного центра РНКП2 на матрице относительно проксимальной к промотору границе нуклеосомальной ДНК). Затем вновь синтезированную РНК метили в процессе формирования ЕС-83, после чего транскрипция была продолжена в присутствии избытка немеченых НТФ. Чтобы количественно оценить силу нуклеосомного барьера, расположенного преимущественно в районе +45 нуклеосомальной ДНК, рассчитывали фракцию молекул РНКП2, достигших конца матрицы (фракцию полноразмерных транскриптов). Сходный подход использовали для изучения транскрипции хроматина РНК-полимеразой E.coli, но в этом случае транскрипцию инициировали на сильном промоторе А1 бактериофага Т7 (Т7А1).

Результатом введения мутаций в наиболее важные НА-последовательности



Рис. 24. Мутации в R(2-3)-области (матрица 603R-R) влияют на высоту нуклеосомного барьера, препятствующего транскрипции РНКП2. А. Различные мутанты 603R нуклеосом были транскрибированы ΡΗΚΠ2 и количество полученных полноразмерных транскриптов определено (% от всех транскриптов). диаграммы Каждый столбец представляет среднее значение, полученное, по крайней мере, в трех независимых экспериментах (±станд. откл.). Б. Эффект R(2-3) мутаций на остановку РНКП может объясняться расположением соответствующих последовательностей ДНК в нуклеосоме. РНКП2, остановленная в области +45 (1) может формировать небольшую внутринуклеосомную петлю ДНК (Ø-петлю) и стерически вытеснять промотор-дистальный конец нуклеосомной ДНК С поверхности октамера (2 и 3) для облегчения дальнейшей транскрипции через нуклеосому. Сильные ДНКгистоновые контакты в области R(2-3) блокируют вытеснение ДНК И дальнейшую транскрипцию.

(матрица 603R-R, рис. 23) была более эффективная транскрипция значительно большей доли нуклеосомных матриц по сравнению с исходной матрицей 603R (65% и 32% при 300 мМ KCI, соответственно, рис. 24A). Таким образом, -R мутации преобразуют запрещающую матрицу 603R в разрешающую – 603R-R. В то же время, транскрипционные свойства матриц 603R и 603R-L (содержащей мутации в левой, менее важной половине нуклеосомной ДНК) практически идентичны. Мутации в последовательностях -R(2-3) приводят к значительному ослаблению

транскрипционного барьера (рис. 24А), не влияя при этом на позиционирование нуклеосомы (рис. 23). Соответственно, именно высокая аффинность последовательностей -R(2-3) к гистонам главным образом определяет формирование высокого, полярного нуклеосомного барьера для транскрипции.

Таким образом, проведенные эксперименты позволили картировать дополнительную последовательность ДНК (603 R -R(2-3)), определяющую высокий нуклеосомный +45 барьер для транскрипции РНКП2 (НА-последовательность). В отличие от участков нуклеосомной ДНК, картированных ранее (+25 - +35 и +60 - +80, рис. 21), расположенных близко (10-20 п.н.) перед активным центром паузированной РНКП2, эта последовательность расположена на расстоянии более чем 40 п.н. перед активным центром фермента, блокировка которого происходит в позиции +45 (рис. 23). Только в случае этой последовательности была показана зависимость высоты нуклеосомного барьера от последовательности ДНК.

В настоящем разделе нашей работы описано создание экспериментальной системы, позволяющей проводить анализ механизма транскрипции точно позиционированных нуклеосом РНКП2 и РНКП *E. coli*. Идентифицированы участки нуклеосомной ДНК и гистонов, а также последовательности нуклеосомной ДНК, определяющие аффинность гистонов к нуклеосомной ДНК, точное позиционирование нуклеосом на ДНК, а также высоту нуклеосомного барьера для РНКП2.

2.3. Механизмы сохранения нуклеосом и их позиционирования на ДНК при транскрипции РНКП2

Каким образом последовательности ДНК, расположенные значительно ниже по ходу от РНКП2 могут вызывать остановку этого фермента в области +45 нуклеосомной ДНК (рис. 22)? Ранее в наших исследованиях было показано, что в процессе транскрипции нуклеосом РНКП бактериофага SP6, локализованная в участке +45 нуклеосомной ДНК, индуцирует частичное разворачивание промотор-дистального конца нуклеосомной ДНК, чтобы дать возможность продолжения транскрипции. При этом формируется внутринуклеосомная петля ДНК очень небольшого размера (рис. 9, комплекс 5). Мы предположили, что РНКП2, осуществляя транскрипцию в участке +45, также может индуцировать формирование сходной внутринуклеосомной петли ДНК, содержащей активный фермент (рис. 24Б). Эта петля была названа петлей «нулевого размера» (или Ø-петлей), поскольку она настолько мала, что в этом комплексе исходные, «пре-транскрипционные» ДНК-гистоновые взаимодействия сохраняются и в области, находящейся перед транскрибирующей РНКП2, и в области, уже пройденной ферментом. Вероятным результатом формирования Ø-петли является вытеснение комплексом РНКП2 промотор-дистального конца нуклеосомной ДНК. Это, в свою очередь, может вызывать частичное разворачивание ДНК с поверхности октамера

гистонов по ходу движения РНКП2 и облегчать дальнейшую транскрипцию через нуклеосому (рис. 24Б, (2) и (3)). В то же время, наличие высокоаффинных НАпоследовательностей по ходу движения РНКП2 может блокировать разворачивание ДНК с поверхности октамера и, таким образом, мешать продолжению транскрипции через нуклеосому (рис. 24Б).

Для оценки возможности формирования Ø-петли полимеразой РНКП2 в области +45 нуклеосомной ДНК, проводили моделирование этого комплекса в различных позициях в +38 - +48 участке с использованием метода докинга структуры элонгационного комплекса дрожжевой РНКП2 высокого разрешения и структуры



Рис. 25. Модель внутринуклеосомной Ø-петли **ДНК, содержащей РНКП2. А.** Схематическое изображение структуры. ДНК-гистоновые контакты, характерные для интактной нуклеосомы (в состоянии до транскрипции), формируются вокруг транскрибирующего фермента, формируя Ø-петлю; 50-нуклеотидная область нуклеосомальной ДНК, включающая HAпоследовательность R3 должна быть вытеснена с октамера. Розовая и серая стрелки указывают проксимальную к промотору границу нуклеосомы и направление транскрипции, соответственно. Б. С помощью метода докинга было выполнено совмещение структур нуклеосомы и дрожжевого комплекса элонгационного РНКП2 (идентификаторы по базе PDB 1aoi и 1у1w) с активным сайтом в позиции +39. Матричная ДНК, комплиментарная матричной цепь ДНК и РНК окрашены красным, синим и желтым цветами, соответственно.

нуклеосомы (идентификаторы по базе PDB 1aoi и 1у1w, рис. 25). Этот анализ показал, что Ø-петля может быть сформирована только при нахождении PHKП2 в позициях +39 или +49 в нуклеосоме, при этом с поверхности октамера вытесняется по крайней мере 50 п.н. дистального от промотора конца нуклеосомной ДНК.

Элонгационный комплекс EC+39, содержащий Ø-петлю, обладает следующими свойствами (рис. 25). (i) Большая часть комплекса РНКП2 расположена в растворе, без пространственного перекрывания с молекулами коровых гистонов. (ii) Изгиб ДНК под углом 90°, существующий в элонгационном комплексе, направлен к поверхности октамера и облегчает формирование Ø-петли. (iii) ДНК-гистоновые контакты за элонгационным комплексом (на участке ДНК длиной около 20 п.н.) стабилизируют Ø-петлю. (iv) Вытеснение участка ≥50 п.н. дистального от промотора конца ДНК нуклеосомы уменьшает размер области ДНК, взаимодействующей с гистонами и находящейся по ходу движения фермента, с ~100 п.н. до ≤50 п.н. Это должно

облегчать дальнейшее разворачивание ДНК, находящейся перед РНКП2 с поверхности гистонового октамера, и дальнейшую транскрипцию через нуклеосому. (v) R3 – НА-последовательность ДНК находится в составе вытесняемого 50-п.н. участка нуклеосомной ДНК, и, как ожидалось, может препятствовать его вытеснению и вызывать блокирование РНКП2 в области +45.

Пространственные ограничения, полученные в процессе моделирования EC+39 (рис. 25), не являются достаточно жесткими, чтобы провести надежную идентификацию потенциальных, взаимодействующих между собой, боковых цепей



Рис. 26. Анализ распределения зарядов на контактирующих поверхностях РНКП2 и октамера гистонов в модели элонгационного комплекса ЕС+39. Показаны контактирующие поверхности РНКП2 в комплексе ЕС+39 (слева, гистоновый октамер не показан) и гистонового октамера (справа). Синим и красным цветами показаны позитивно и негативно заряженные поверхности гистонового октамера, соответственно. Области РНКП2 и заряды октамера, имеющие противоположные находящиеся гистонового и в непосредственной близости в элонгационном комплексе ЕС+39, обведены прямоугольниками. ДНК (слева) и положение ДНК в составе интактной нуклеосомы (справа) изображены оранжевым цветом. Отмечены позиции +39 и +49 на нуклеосомной ДНК, и положения некоторых гистоновых N-концевых доменов кор-гистонов. Были использованы структуры РНКП2 и нуклеосомы (идентификаторы по базе PDB 1aoi и 1у1w).

октамера гистонов и РНКП2. Поэтому для дальнейшей оценки возможных взаимодействующих поверхностей в комплексе было проанализировано распределение зарядов на поверхности взаимодействия октамера и РНКП2 (рис. 26). Этот анализ позволил обнаружить сильный отрицательный заряд на поверхности РНКП2, находящийся в непосредственной близости с положительно заряженной областью на поверхности гистонового октамера. Эта область располагается внутри коровой части clamp-домена субъединицы RPB1 РНКП2 и, скорее всего, формирует электростатические взаимодействия между октамером и РНКП2 в комплексе EC+39. Эта же положительно заряженная область на поверхности гистонового октамера взаимодействует с ДНК в интактной нуклеосоме; эти взаимодействия отсутствуют в комплексе EC+39. Следовательно, электростатические взаимодействия РНКП2 с гистонами в комплексе EC+39 могут компенсировать ДНК-гистоновые взаимодействия, которые разрушаются в процессе формирования элонгационного комплекса, и стабилизировать комплекс EC+39. Сходные взаимодействия могут стабилизировать комплекс EC+49.



Рис. 27. Экспериментальная система, использованная для остановки РНКП *Е. coli* в различных позициях на 603 нуклеосомной ДНК. А. РНКП останавливали в различных позициях на двух вариантах нуклеосомной матрицы 603 с различными последовательностями ДНК (603-42 и 603-49) в присутствии различных комбинаций нуклеозидтрифосфатов. Остановку РНКП проводили в позициях -39, -5 (обе матрицы), +41 или +49. **Б.** Активный элонгационный комплекс может быть остановлен в различных позициях на нуклеосомной ДНК. Анализ элонгационных комплексов, формируемых RNAP *E.coli* на нуклеосомах 603. Анализ пульс-меченой РНК с помощью денатурирующего ПААГ-электрофореза. Активные элонгационные комплексы содержат РНК, синтез которых может быть продолжен. Опыты по продолжению транскрипции были проведены при концентрации 1М КСI для того, чтобы разрушить нуклеосому и облегчить транскрипцию.

Если отрицательно заряженная область на поверхности РНКП2 важна для корректной транскрипции хроматина, то можно ожидать, что эта область является консервативной у РНКП2 и РНКП *Е. coli,* которые осуществляют транскрипцию

хроматина с использованием сходных механизмов. Сравнение последовательностей соответствующих отрицательно заряженных областей субъединиц β' (*E. coli* PHKП) и RPB1 (PHKП2 дрожжей) обнаружило 39% идентичности и 59% сходства для этих последовательностей. В частности, 5 из 6 ключевых отрицательно заряженных остатков сохранены, а один остаток заменен на полярную аминокислоту. Более, чем 50%, общего отрицательного заряда в консервативной области сохраняются. Эти данные демонстрируют, что отрицательно заряженная область PHK-полимеразы 2 может быть важна для корректной транскрипции хроматина. Наиболее вероятно, что эта область формирует электростатические взаимодействия с октамером гистонов в комплексах EC+39 и/или EC+49, чтобы компенсировать отсутствие контакта основных остатков на поверхности октамера с ДНК, и, таким образом, стабилизировать эти комплексы.

Формирование Ø-петли возможно лишь в одной ротационной ориентации элогационного комплекса на ДНК (в позициях +39 или +49). Смещение фермента на один нуклеотид приведет к его вращению вокруг оси ДНК на ~36° и пространственному столкновению между РНКП2 и гистоновым октамером. Соответственно, перемещение РНКП2 после формирования Ø-петли должно приводить к разрыву ДНК-гистоновых взаимодействий либо до, либо после комплекса РНКП2. Если разрушаются ДНКгистоновые взаимодействия *только* в направлении по ходу движения фермента, то РНКП2 может осуществлять транскрипцию хроматина без вытеснения октамера гистонов в раствор, как было нами показано ранее.

Предполагаемую 24) тестировали модель (рис. методом футпринтинга элонгационных комплексов, остановленных в различных ДНК позициях на разрешающей нуклеосомной матрицы 603. Технически крайне сложно получить большие количества гомогенных элонгационных комплексов РНКП2, остановленных в точно определённых позициях в нуклеосоме. В то же время все основные аспекты механизма РНКП2-типа воспроизводятся РНК-полимеразой *E.coli* (РНКП), но не другими ранее изученными РНК-полимеразами. Так как гомогенные элонгационные комплексы *E.coli* РНКП могут быть получены в достаточных количествах, мы использовали их для начального анализа механизма транскрипции хроматина РНКП2типа.

Результаты моделирования (рис. 25) позволяют предположить, что Ø-петля может формироваться, когда РНКП транскрибирует 39 или 49 п.н. нуклеосомной ДНК. Поэтому мы анализировали набор элонгационных комплексов, остановленных в этих и других (контрольных) позициях на матрице 603 (позиции -39, -5, +42 или +49, рис. 27). Для того, чтобы картировать позицию активного центра РНКП в элонгационных комплексах, их инкубировали в присутствии фактора GreB. Этот фактор значительно облегчает процесс разрезания РНК полимеразой РНКП *E.coli* в непродуктивных,

арестованных комплексах. Элонгационные комплексы EC+49 были устойчивы к фактору GreB (данные не приводятся). Когда РНКП останавливается в позиции +42, происходит ее «откат» на 1-2 нуклеотида с формированием комплекса EC+41. Следовательно, в обоих комплексах активный центр остается в непосредственной близости к 3'-концу РНК, и продвижение РНКП не блокируется.



Рис. 28. РНКП Е.coli формирует внутринуклеосомную Ø-петлю в позиции +49. А. Формирование Ø-петли сопряжено с частичным вытеснением дистального от промотора конца нуклеосомальной ДНК. Анализ 603 ДНК и нуклеосомных комплексов, содержащих транскрибирующую РНКП *Е. соli*, остановленную в различных позициях, методом ДНКазаl футпринтинга. Анализ меченной по одному концу ДНК методом денатурирующего ПААГэлектрофореза. Показаны футпринты элонгационных комплексов (пунктирными линиями), сформированных на ДНК и нуклеосомах (НУКЛ.), а также позиции активного центра РНКП (стрелками). Б. Механизм ремоделирования хроматина, характерный для РНКП2. Когда РНКП приближается к нуклеосоме (1), (стрелками указано направление транскрипции), участок нуклеосомной ДНК, находящийся выше положения фермента, частично диссоциирует от октамера (прерывистые стрелки, (2)). Затем Ø-петля формируется в позиции +49 (3), и РНКП вытесняет дистальный от промотора конец нуклеосомной ДНК (4). По мере того, как РНКП продолжает транскрипцию, сохраненные ДНК-гистоновые контакты, находящиеся выше фермента, выступают в качестве «якоря» для восстановления структуры нуклеосомы после прохождения РНКП (5). Вставка: Механизм сохранения нуклеосомы в процессе транскрипции. Показано ~2/3 одного витка сверхспирали ДНК, контактирующей с октамером.

Структуры комплексов были проанализированы с использованием эндонуклеазы ДНКазы I (рис. 28). Как ожидалось, каждый из остановленных элонгационных комплексов (например, EC-39) защищал примерно 30 п.н., а нуклеосома защищала порядка 150 п.н. от ДНКазы I (рис. 28А). Когда РНКП формирует элонгационный комплекс EC+41, нуклеосомная ДНК, находящаяся выше положения фермента, полностью вытеснена с поверхности гистонового октамера. Нуклеосомная ДНК, находящаяся по ходу движения элонгационного комплекса, остается связанной с октамером, хотя и становится локально чувствительной к ДНКазе I в позициях +90 и +100, что выражается в появлении гиперчувствительных сайтов.

Хотя элонгационный комплекс ЕС+49 остановлен внутри нуклеосомы, свойства футпринта, специфичные для нуклеосомы (защита около 150-п.н. участка ДНК от ДНКазы I, сохраняются на большинстве матриц (≥70%). На ЕС+49 сложно различить эффект защиты ДНК элонгационным комплексом, но, по всей видимости, это объясняется тем, что защита ДНК, специфичная для нуклеосомы, маскирует защиту, осуществляемую ЕС. ЕС +49 остается активным в течении 30 секунд работы ДНКазыI, поскольку большинство комплексов способно продуцировать полноразмерные транскрипты (рис. 27). Таким образом, сохранение специфичного для нуклеосомы паттерна защиты ДНК в элонгационном комплексе ЕС +49 указывает на то, что исходные ДНК-гистоновые контакты восстановлены и в области ДНК, находящейся выше положения остановленной РНКП, и в области, расположенной ниже по ходу ее движения. Это возможно только в том случае, если элонгационный комплекс ЕС +49 формирует Ø-петлю на поверхности октамера («закрытый» промежуточный продукт (3), рис. 28Б). Следовательно, данные футпринтинга подтверждают предположение о том, что РНКП формирует Ø-петлю в позиции +49.

Несмотря на то, что черты, специфичные для нуклеосомы, преобладают в футпринте элонгационного комплекса ЕС+49, и область ДНК, находящаяся выше положения ЕС, и область, находящаяся далее по ходу его движения, становятся более доступными для ДНКазы I по сравнению с ДНК интактной нуклеосомы. С помощью количественного анализа (данные не приводятся) было продемонстрировано, что доступность нуклеосомной ДНК, находящейся выше положения РНКП (область от позиции +20 до позиции +30), наблюдается в меньшей степени (на 10% матриц), чем в области по ходу движения фермента (на 30% матриц). Короткий фрагмент ДНК (от позиции +1 до позиции +20) практически полностью устойчив к действию ДНКазы І. Суммируя эти данные, можно предположить, что ДНК, находящаяся перед ферментом, пребывает в развернутом с октамера состоянии на <30% матриц, и на еще меньшей доле матриц (≤10%) нуклеосомная ДНК частично развёрнута с октамера в области, находящейся за РНКП. Область нуклеосомной ДНК от позиции +1 до позиции +20 остается связанной с октамером. Так как не происходит ухода гистонового октамера, интермедиаты на рис. 28А, вероятнее всего, находятся в состоянии быстрого равновесия.

Приведенные данные позволяют предположить следующий механизм

транскрипции через нуклеосому (рис. 28Б). При входе РНКП в нуклеосому фермент изначально вытесняет с октамера нуклеосомную ДНК, находящуюся сзади от него (как в EC+41). Когда РНКП достигает позиции +49, ДНК, находящаяся за ней, снова связывается с поверхностью октамера, формируется Ø-петля, а ДНК, находящаяся перед комплексом, начинает частично развертываться с поверхности октамера. Последовательное разрушение и формирование ДНК-гистоновых контактов при формировании Ø-петли позволяет прохождение транскрипции через нуклеосому, а также дает возможность восстановления нуклеосомы (за счет восстановления исходных ДНК-гистоновых взаимодействий в области, находящейся выше положения



Рис. 29. Механизм обратной связи позволяет сохранять гистоны H3/H4 в процессе транскрипции РНКП2. Когда РНКП2 приближается к нуклеосоме (1), ее продвижение сопровождается вытеснением ДНК с поверхности октамера гистонов, расположенной за ферментом (2), и может вызывать вытеснение октамера в раствор при дальнейшей транскрипции (3). В то же время, когда РНКП2 достигает +45-области, где ДНК-гистоновые взаимодействия особенно сильны, формируется Ø-петля (4). Формирование Ø-петли предотвращает вытеснение октамера и позволяет продолжение процесса транскрипции за счет разворачивания нуклеосомной ДНК перед РНКП2 ((4) и (5)). Если нуклеосомная ДНК перед РНКП2 не может быть развёрнута с поверхности октамера, РНКП2 останавливается в нуклеосоме. Таким образом, транскрипция хроматина РНКП2 сопряжена с сохранением нуклеосом на ДНК.

ΡΗΚΠ).

Для того, чтобы подтвердить, что РНК-полимераза *E. coli* и РНКП2 дрожжей формируют сходные комплексы в процессе транскрипции при проходе через нуклеосому, РНКП2 была остановлена в позициях -5, +41 или +49 на нуклеосоме с матрицей 603, и была изучена доступность ДНК в составе этих комплексов с использованием ферментов рестрикции (данные не приводятся). Полученные данные подтвердили предположение о том, что РНКП *E. coli* и РНКП2 дрожжей вызывают формирование сходных интермедиатов в процессе транскрипции через нуклеосому. Итак, полученные нами данные показывают, что структуры интермедиатов, формируемых до и после того, как РНКП2 достигает позиции +49, существенно

различаются: сначала нуклеосомная ДНК вытесняется в области, расположенной за ферментом, но после прохождения позиции +49 вытеснение ДНК происходит в основном в области, расположенной по ходу движения фермента (рис. 28Б). Таким образом, формирование Ø-петли в позиции +49 определяет позицию конформационного изменения в структуре нуклеосом, позволяющего нуклеосоме восстановить свою исходную позицию на ДНК.

Открытый нами механизм обеспечивает сопряжение между транскрипцией хроматина и сохранением нуклеосом на ДНК с участием конформационного перехода в структуре нуклеосом при формировании Ø-петли: РНКП2 задерживается в нуклеосоме, пока не формируется Ø-петля (необходимая для сохранения нуклеосом на ДНК) (рис. 29). Поскольку механизмы транскрипции хроматина дрожжевой и



Рис. 30. Предложенные механизмы транскрипции нуклеосом РНКП2- и РНКП3-типа. Когда РНК-полимеразы входят в нуклеосому (1), они частично вытесняют ДНК с поверхности гистонового октамера (2 и 2'). Однако более протяженный участок ДНК, находящийся ниже по ходу фермента, вытесняется в процессе транскрипции, проходящей по механизму РНКП3типа, чем в процессе транскрипции по механизму РНКП2-типа (скорее всего, из-за более высокой скорости транскрипции нуклеосом по механизму РНКП3-типа). Таким образом, формирование Ø-петли РНКП2 (3) происходит более эффективно, чем РНКП3, и в последнем случае существует тенденция к формированию внутринуклеосомных петель ДНК большего размера (3'). Формирование петель вызывает разрушение ДНК-гистоновых взаимодействий в области перед РНК-полимеразами (4 и 4'), а затем восстановление нуклеосом в исходной позиции (в случае РНКП2, 5) или на позиции расположенной выше исходного положения (в случае РНКП3, 5') на ДНК.

человеческой РНКПами сходны, этот механизм, видимо, используется у всех эукариот.

Каковы структурные отличия интермедиатов, характерных для механизмов РНКП2и РНКП3-типов? Структуры интермедиатов, формируемых в процессе транскрипции через нуклеосому по механизму РНКП3-типа были ранее охарактеризованы (рис. 9). Сравнение структур интермедиатов, формирующихся при транскрипции хроматина по механизмам РНКП2- и РНКП3-типов показано на рис. 30. Структуры комплексов ЕС+41, формируемые РНК-полимеразой *E.col*i, РНКП2 и РНКП бактериофага SP6 сходны: ДНК, находящаяся выше положения элонгационного комплекса, пребывает в развёрнутном с октамера состоянии и полностью доступна для ДНКазыІ и рестрикционных ферментов (рис. 30, интермедиаты 2 и 2'). Однако, видимо, в

процессе транскрипции по механизму РНКПЗ-типа ДНК частично развёртывается с поверхности октамера ниже положения комплекса ЕС+41 в большей степени. Таким образом, на ранних этапах транскрипции по механизму РНКПЗ-типа большая поверхность октамера экспонирована в раствор. Это структурное отличие может объяснять более высокую вероятность переноса гистонового октамера на ДНК выше элонгационного комплекса в процессе транскрипции по механизму РНКПЗ-типа. Соответственно, комплексы, содержащие Ø-петлю, формируются лишь на 30% матриц. Напротив, отсутствие развёртывания ДНК перед РНКП2 или РНКП *Е.coli* может сделать процесс формирования Ø-петли и сопутствующее вытеснение дистального от промотора конца нуклеосомальной ДНК более эффективными. Так как формирование Ø-петли позволяет сохранить взаимодействие ДНК с октамером, транскрипция с участием РНКП2 полностью совместима с эффективным сохранением нуклеосом в исходных позициях на ДНК.

Таким образом, в настоящем разделе нашей работы показано, что сохранение гистонов на ДНК при транскрипции РНКП2 осуществляется без диссоциации гистонов в раствор, и сопровождается формированием внутринуклеосомной петли ДНК минимального размера (Ø-петли). Механизм РНКП2-типа описан в терминах структур



Рис. 31. FACT понижает нуклеосомный барьер **РНКП2**. для После (EC45), формирования комплексов РНК пульс-меченую содержащих 1), (дорожка 254-п.н. нуклеосомные матрицы инкубировали с НТФ в присутствии указанных концентраций КСІ в присутствии (+) или отсутствии (-) rFACT (рекомбинантного белкового комплекса FACT) или rFACT∆C (rFACT с делетированным С-концом субъединицы Spt16, полосы от 2 до 6). Пунктирными линиями показаны области, где задержка РНКП2 снимается в присутствии 0,3 М КСІ или rFACT. Слева показаны длины транскриптов.

интермедиатов низкого разрешения (по данным футпринтинга), формирующихся на различных этапах этого процесса. Получена модель высокого разрешения ключевого интермедиата, формирующегося при транскрипции хроматина РНКП2 (Ø-петли). Доказано, что транскрипция через нуклеосому сопряжена с сохранением гексасом на ДНК, и расшифрован механизм такого сопряжения (через формирование Ø-петли).

Наконец, показано, что механизм РНКП2-типа используется РНКП2 и РНКП Е. coli.

2.4. Механизмы преодоления нуклеосомного барьера РНКП2

Хотя мононуклеосомная «минимальная» экспериментальная система *in vitro* воспроизводит важные свойства транскрибируемого хроматина, описанные *in vivo* (такие, как вытеснение гистонов H2A/H2B и сохранение гексасомы во время транскрипции), эта система работает не оптимально. В частности, при транскрипции нуклеосомы теряются на 50% матриц и полноразмерные транскрипты при физиологической ионной силе формируются только на незначительной фракции матриц. Эти данные позволяют предположить, что *in vivo* существуют дополнительные более эффективное сохранение нуклеосом при транскрипции. Действительно, в процессе нашей работа было идентифицировано несколько белковых комплексов, облегчающих транскрипцию хроматина (TFIIS, FACT, nucleoline и множественные молекулы PHKП2). Механизмы их работы были определены; некоторые из них описаны ниже.

Наиболее эффективно транскрипция нуклеосомных матриц in vitro в минимальной системе облегчается белковым комплексом FACT (рис. 31). Человеческий комплекс FACT состоит из двух субъединиц (Spt16 и SSRP1) и является шапероном коровых гистонов. FACT связывается с димером H2A/H2B с существенно более высокой аффинностью, чем с тетрамером Н3/Н4. FACT ассоциирован с транскрипционноактивными генами in vivo, причем движется вместе с РНКП2. Наконец, FACT является одним из факторов, обеспечивающих сохранение нуклеосом при транскрипции in vivo. позволяют предположить, что FACT может быть Эти данные фактором. как эффективную транскрипцию хроматина, обеспечивающим так И более эффективное сохранение нуклеосом при транскрипции in vitro.

Для анализа эффекта человеческого фактора FACT на транскрипцию использовали 5S мононуклеосомную экспериментальную систему, где мононуклеосомы формируются в двух позициях на матрице (рис. 16). Транскрипцию проводили, как показано на рис. 14, в присутствии различных концентраций КСІ и FACT (использовали рекомбинантный полноразмерный FACT и FACT, содержащий делецию С-концевого домена субъединицы Spt16). В присутствии FACT нуклеосомный барьер был существенно ниже, чем в его отсутствии (полноразмерные транскрипты были получены на 40% матриц в присутствии FACT. И только на 10% - в его отсутствии, рис. 31). Кроме того, задержка РНКП2 в нуклеосоме была существенно ингибирована. В тоже время, FACT понижал нуклеосомный барьер не на всех внутринуклеосомных позициях – задержка РНКП2 была ингибирована после транскрипции около 20 – 65 п.н. ДНК нуклеосомы N1 (рис. 31). Действие FACT полностью зависело от присутствия С-

концевого домена субъединицы Spt16.

Анализ нуклеосом, полученных после транскрипции в присутствии FACT показал, что, как и в случае транскрипции в отсутствии FACT (при 300 мМ KCI), нуклеосомы теряют один H2A/H2B димер и превращаются в гексасомы (рис. 32A). Кроме того, относительное количество ДНК, полученной после транскрипции в присутствии FACT,



Рис. 32. FACT-зависимая транскрипция нуклеосом РНКП2 приводит к более эффективному образованию гексасом. А. ДНК-меченые 5S нуклеосомы были транскрибированы в присутствии или отсутствии rFACT, rFACT_ΔC, и в присутствии 40 мМ или 300 мМ КСІ. Анализ продуктов транскрипции в нативном ПААГ. Показаны позиции нуклеосом N1 и N2, гексасом и ДНК. Соотношение гексасомы:ДНК выше при транскрипции в присутствии FACT комплекса. что свидетельствует о более эффективном образовании гексасом. **Б.** Предложенный механизм стимуляции транскрипции нуклеосом РНКП2 FACT комплексом. Предполагается, что в каждый отдельно взятый момент FACT взаимодействует с ДНКсвязывающей поверхностью одного димера Н2А/2В (после частичного разворачивания нуклеосомной ДНК) и облегчает транскрипцию за счет уменьшения скорости его последующей ре-ассоциации с ДНК. Сначала FACT взаимодействует с промотор-проксимальным димером, облегчая транскрипцию. После прохождения позиции +49, FACT взаимодействует с промотордистальным димером, способствуя формированию промежуточного комплекса 4 и дальнейшей транскрипции.

было существенно меньше, чем после транскрипции в его отсутствие. Таким образом, транскрипция в присутствии FACT не приводит к появлению новых продуктов реакции, но эффективность сохранения гексасомы на ДНК существенно увеличивается (практически все транскрибируемые матрицы конвертируются в гексасомы). Все FACTспецифичные эффекты на транскрипцию хроматина наблюдали только в присутствии НТФ и С-концевого домена субъединицы Spt16 (рис. 32A).

Для объяснения действия FACT при транскрипции хроматина PHKП2 была предложена следующая модель (рис. 32Б). Предполагается, что в каждый момент FACT взаимодействует с ДНК-связывающей поверхностью одного из двух димеров H2A/2B (после частичного разворачивания нуклеосомной ДНК с поверхности октамера гистонов) и облегчает транскрипцию за счет уменьшения скорости его последующей ре-ассоциации с ДНК (рис. 32Б). Модель сохранения гексасом при транскрипции хроматина предполагает, что этот процесс зависит от эффективности формирования Ø-петли (рис. 29). Эффективное формирование Ø-петли, в свою очередь, зависит от присутствия промотор-проксимального димера H2A/H2B во время транскрипции



Рис. 33. Стратегия эксперимента для изучения транскрипции через нуклеосому одним или несколькими комплексами РНКП. А. Экспериментальный подход с использованием РНКП *Е. coli*. Нуклеосомные матрицы, содержащие -УТФ (-У) и -УТФ/ЦТФ (-У/Ц) последовательности ДНК (1), после формирования единичного комплекса ЕС45 (2), или остановленных комплексов (EC11/EC45 тандема ИЗ двух элонгационных (3)) транскрибировали в присутствии соответствующих наборов НТФ. Затем транскрипцию продолжали в присутствии всех НТФ (4). Числовой индекс указывает на позицию активного центра РНКП на матрице относительно проксимальной к промотору границы нуклеосомы. Б. Экспериментальный подход с использованием РНКП2. Комплекс ЕС45 формировали после предварительной сборки и лигирования комплекса EC9 с нуклеосомой ((1) and (2)). Затем собирали второй комплекс ЕС9, лигировали к комплексу ЕС45 (3), и продолжали транскрипцию (4).

(данные не приведены). FACT взаимодействует с промотор-проксимальным димером H2A/H2B во время транскрипции (рис. 32Б, интермедиат 2), замещая вытесненную ДНК. При этом FACT, скорее всего, стабилизирует взаимодействие димера H2A/H2B с остальными гистонами в нуклеосоме, и предотвращает вытеснение димера в раствор РНКП2. Таким образом, взаимодействие белкового комплекса FACT с H2A/H2B димерами во время транскрипции приводит к уменьшению нуклеосомного барьера и увеличивает эффективность сохранения гексасом при транскрипции РНКП2. Этими же

свойствами FACT обладает при транскрипции in vivo.

Как было показано ранее, нуклеосомы сохраняются во время умеренной транскрипции эукариотических генов РНКП2; при этом наблюдается только обмен гистонов H2A/H2B, зависимый от транскрипции. Такие параметры транскрибируемого хроматина воспроизводятся в нашей системе *in vitro*, описанной выше, где нуклеосомы транскрибируются одиночным комплексом РНКП2 и проходит только один цикл транскрипции. В то же время зачастую на тех же генах, транскрибируемых с более высокой эффективностью *in vivo*, наблюдается частичное удаление нуклеосом и обмен всех коровых гистонов. Ранее мы предположили, что большинство вышеописанных параметров активно транскрибируемого хроматина определяются высокой плотностью транскрибируемых комплексов РНКП2 на гене. Для проверки этой гипотезы была разработана экспериментальная система, позволяющая проведение транскрипции несколькими комплексами РНКП2 или РНКП *E. coli*.

Экспериментальный подход, использованный для изучения транскрипции мононуклеосом одним или несколькими комплексами РНКП, приведен на рис. 33. Точно позиционированные нуклеосомы были сформированы на двух высокоаффинных последовательностях: матрице 603 (разрешающей) и матрице 601 (запрещающей) (рис. 19).

Некоторые из описанных ниже экспериментов требуют нескольких циклов инициации с одной и той же матрицы, что сложно осуществить с использованием РНКП2. Поэтому многие эксперименты были проведены с использованием РНКП Е. coli и/или РНКП2 дрожжей. Один или два тандемных транскрипционных комплекса РНКП Е. coli были остановлены перед мононуклеосомами. Первый (лидирующий) комплекс E. coli РНКП останавливался после формирования 45-нуклеотидного транскрипта на последовательности -УТФ (ЕС45, рис. 33А). Затем проводили иммобилизацию фермента, удаляли НТФ и второй (преследующий) комплекс РНКП останавливали в конце последовательности -УТФ/ЦТФ, за лидирующим комплексом, формируя комплекс ЕС11. В результате идентичные нуклеосомные матрицы содержали перед нуклеосомой либо единичный (ЕС45), либо два тандемных транскрипционных комплекса РНКП Е. coli (EC11/EC45). Для проведения транскрипции с участием РНКП2, элонгационные комплексы были собраны как описано ранее. Затем единичный элонгационный комплекс ЕС9 был иммобилизован, лигирован с мононуклеосомами, после чего транскрипция была продолжена для формирования комплекса ЕС45 (Рис. 33Б). Второй комплекс РНКП2 ЕС9 был лигирован перед ЕС45 и элонгация транскриптов была продолжена в присутствии немеченых НТФ. Были изучены эффективность транскрипции и структура нуклеосомных матриц.

Для изучения влияния второго комплекса РНКП на нуклеосомный барьер для транскрипции, радиоактивно РНК-меченый комплекс ЕС45 промывали и проводили

формирование второго немеченого элонгационного комплекса на той же матрице. В этом случае было изучено влияние преследующего комплекса РНКП, расположенного непосредственно за лидирующим комплексом, на скорость и эффективность транскрипции через нуклеосому. Как ожидалось, транскрипция через разрешающую (603) и запрещающую (601) нуклеосомы единичными комплексами РНКП2 и *E. coli* РНКП сопровождалась появлением нуклеосомных барьеров (рис. 34). Взаимодействие тех же самых нуклеосом с тандемными комплексами РНКП приводит к более эффективному преодолению барьера при всех концентрациях КСІ, а также к



Рис. 34. Два комплекса уменьшают высоту нуклеосомного барьера при транскрипции in vitro PHKП E. coli (A, нуклеосома 601) и PHKП2 (Б, нуклеосома 603). Во всех экспериментах нуклеосомный PHK-пульс-меченный EC45 комплекс транскрибировали при указанных концентрациях КСI единичными или тандемными элонгационными комплексами. Продукты реакций анализировали с использованием денатурирующего ПААГ-электрофореза, и определяли количество полученных меченых полноразмерных транскриптов (% от всех транскриптов). Каждый столбец диаграммы представляет среднее значение, полученное, по крайней мере, в трех независимых экспериментах; ±S.D.(±станд. откл.).

повышению выхода полноразмерных транскриптов (рис. 34). Степень стимуляции выше на матрице 601 (высокий барьер) по сравнению с матрицей 603 при всех исследованных значениях ионной силы. Стоит отметить, что даже высокий нуклеосомный барьер (на матрице 601) практически полностью снимается в процессе транскрипции двумя комплексами РНКП. Ранее нами было продемонстрировано, что высокий нуклеосомный барьер на матрице 601 лишь незначительно ослабляется при наличии факторов элонгации TFIIS и FACT, либо после удаления N-концевых доменов коровых гистонов (данные не приводятся). Следовательно, стимулирующий эффект второго комплекса РНКП на процесс транскрипции через хроматин является существенно более сильным, чем ранее описанные эффекты добавления элонгационных факторов и удаления N-концов гистонов. Наличие преследующего комплекса РНКП в значительной степени повышает эффективность и скорость транскрипции лидирующего комплекса при прохождении нуклеосомного барьера. Более того, эффективность транскрипции тандемным комплексом через нуклеосому на

матрице 601, которая является сильным барьером для обоих РНК-полимераз, приближается к эффективности транскрипции ДНК, свободной от гистонов. Несмотря на то, что продолжительность специфичных для нуклеосомы остановок существенно снижена, характерные для нуклеосом особенности исчезают не полностью. Таким образом, гистоновый октамер остается связанным с нуклеосомной ДНК в процессе транскрипции двумя тандемными комплексами РНК-полимераз.

Вытеснение нуклеосом, наблюдаемое на высокоактивных генах, может происходить, по крайней мере, посредством двух механизмов. Первый механизм предполагает столкновение одной нуклеосомы с двумя тандемными комплексами РНКП. В этом случае преследующий комплекс может предотвратить восстановление



Рис. 35. Гистоновый гексамер вытесняется в процессе транскрипции РНКП2. Чтобы оценить эффективность вытеснения гексасомы, формируемой в результате предшествующего цикла транскрипции (A), нуклеосомы или гексасомы формировали на 603 матрице, и транскрибировали единичными комплексами РНКП2 при различных концентрациях КСІ. NC – транскрипция (формировали ЕС45). ДНК-меченые матрицы были проанализированы методом нативного ПААГ-электрофореза (Б). Количество вытесненной в раствор ДНК определено ((B), % от всех матриц, присутствующих в реакции). Каждый столбец диаграммы представляет среднее значение, полученное, по крайней мере, в трех независимых экспериментах; ±S.D (±станд. откл.).

контактов ДНК с октамером в области, расположенной выше лидирующего комплекса, и, таким образом, предотвратить восстановление нуклеосомы на прежней позиции (Øпетля не формируется). Второй механизм предполагает, что преследующий комплекс РНКП2 может вытеснять с ДНК гексасому, формируемую за первым транскрибирующим комплексом (рис. 35А); в рамках последнего механизма не требуется одновременного столкновения нуклеосомы с двумя комплексами РНКП2.

Для того, чтобы проверить возможность протекания процесса по первому механизму, нуклеосомы на радиоактивно меченной матрице 601 были

транскрибированы при участии одного комплекса или тандема из двух комплексов РНКП Е. coli или РНКП2 дрожжей при различных концентрациях КСІ. После транскрипции нуклеосомы были проанализированы с помощью нативного ПААГэлектрофореза (данные не приводятся). Как предполагалось, тандемный элонгационный комплекс, формируемый из двух комплексов РНКП, более эффективно формировал продукты транскрипции (свободную от гистонов ДНК и гексасомы, образованные в результате потери одного димера H2A/H2B), чем единичные комплексы. Транскрипция при участии одного комплекса или тандема из двух комплексов РНКП приводила к вытеснению ДНК на ~50-60% транскрибируемых матриц (данные не приводятся). Таким образом, неожиданно, во всех описанных случаях значительная доля гексасом (40-50%) сохранялась на ДНК в процессе транскрипции при участии одного комплекса или тандема из двух, близко расположенных комплексов **РНКП2**.

Поскольку транскрипция тандемом из двух комплексов РНКП2 не приводит к вытеснению гексамера гистонов, мы также провели изучение модели, предполагающей последовательное столкновение нескольких комплексов РНКП2 с одной и той же нуклеосомой. В этом случае преследующий комплекс РНКП2 сталкивается с гексасомой, сформированной после транскрипции с участием лидирующего комплекса РНКП2 (рис. 35А).

Был проведен один цикл транскрипции через нуклеосому на матрице 601 с участием РНКП *E. coli* при 300 мМ КСІ для того, чтобы сформировать гексасому (данные не приводятся). Затем, после разбавления КСІ до 100 мМ и добавления свежей РНК-полимеразы была проведена повторная инициация транскрипции, и дополнительный цикл транскрипции был завершен при 300 мМ КСІ. После второго цикла транскрипции доля вытесненной ДНК возросла с ~60% до >90%, что указывает на то, что все коровые гистоны были вытеснены с ДНК на подавляющем большинстве матриц (~90%). Похожий результат был получен с использованием РНКП2 дрожжей (рис. 35Б). В этом случае 18% и 55% ДНК были вытеснены в процессе транскрипции одиночным комплексом через нуклеосомы и гексасомы, соответственно. Таким образом, транскрипция вызывает вытеснение всех коровых гистонов из гексасом, сформованных в процессе предшествующего цикла транскрипции, и из гексасом, заранее сформированных на матрице и не подвергавшихся транскрипции.

Наиболее вероятно, что интермедиаты, формируемые в процессе транскрипции через гексасомы, являются менее стабильными, чем интермедиаты, формируемые при транскрипции нуклеосом (рис. 36). Действительно, каждый гистоновый димер H2A/H2B стабилизирует область нуклеосомной ДНК размером ~35 п.н. Во время входа РНКП2 в нуклеосому, она изначально (до того как РНКП2 достигает позиции +49) разрушает ДНК-гистоновые взаимодействия за транскрипционным комплексом (рис. 36). В

соответствии с этим, комплекс РНКП2 EC+45 с нуклеосомой, в которой отсутствует дистальный от промотора димер H2A/H2B (вытесненный предыдущим транскрибирующим комплексом РНКП2), стабилизирован небольшим количеством ДНК-гистоновых взаимодействий (рис. 36, комплекс 2') и октамер гистонов может спонтанно диссоциировать в раствор из такого комплекса.

Таким образом, транскрипция с участием «димера» двух близко расположенных комплексов РНКП2 приводит к более эффективной транскрипции нуклеосомных матриц. При этом, как и при транскрипции единичным комплексом, вытесняется димер H2A/H2B и формируется гексасома. В то же время, транскрипция нуклеосом двумя последовательно идущими комплексами РНКП2 также облегчает прохождение



Рис. 36. Близость комплексов РНКП2 друг к другу определяет участь нуклеосом при транскрипции. Предполагаемый механизм вытеснения гистонового гексамера в процессе транскрипции РНКП2. Интермедиаты 1->2->3: Механизм сохранения нуклеосомы в процессе транскрипции. По мере приближения РНКП2 (этап 1) и при ее входе в нуклеосому (2), полимераза частично вытесняет ДНК с поверхности октамера гистонов. Однако область ДНК, расположенная перед РНКП2, остаётся связанной с октамером, в результате чего происходит формирование стабильного промежуточного комплекса и сохранение гексасомы в исходной позиции (3). Напротив, в процессе транскрипции через гексасомы, образованные в результате потери одного димера H2A/H2B (1'), формируется нестабильный промежуточный комплекс с меньшим количеством ДНК-гистоновых контактов (2'), что ведет к вытеснению гексамера гистонов с ДНК (3').

гексасомы преследующим комплексом (данные не приводятся), но приводит к потере всего октамера гистонов.

В настоящем разделе нашей работы были идентифицированы белковые факторы и комплексы, понижающие нуклеосомный барьер для РНКП2 и увеличивающие эффективность сохранения гексасом после транскрипции (элонгационный фактор TFIIS, множественные комплексы РНКП2 и гистоновые шапероны FACT и нуклеолин). Механизмы действия FACT и множественных комплексов РНКП2 описаны в терминах изменений, вносимых этим фактором в структуры интермедиатов, формирующихся при транскрипции хроматина РНКП2, а также изменений в скорости и эффективности преодоления нуклеосомного барьера, и эффективности сохранения гексасом после

транскрипции.

2.5. Механизмы транскрипции хроматина РНКП2 in vivo

Современные исследования показали, что на генах, умеренно транскрибируемых РНКП2 обмен гистонов Н3/Н4 по крайней мере в 20 раз медленнее, чем обмен гистонов Н2А/Н2В (см. выше). Наша работа позволяет предположить, что гистоны Н3/Н4 не вовлекаются в обмен, поскольку они никогда полностью не вытесняются из комплекса с ДНК в процессе транскрипции хроматина, протекающей с формированием Ø-петель. Так как большинство эукариотических генов транскрибируются на умеренном уровне, транскрипционно-зависимый обмен гистонов H3/Н4 в масштабах всего генома проходит намного медленнее, чем обмен димеров H2A/H2B, как было показано *in vivo*.



Полученные

нами данные

Рис. 37. Предложенный механизм транскрипции хроматина РНКП2 *in vivo*. После инициации транскрипции на промоторе (1), на многих генах человека и дрозофилы РНКП2 останавливается после вхождения в +1 нуклеосому. +1 нуклеосомный барьер может сниматься с участием факторов DSIF и NELF (данные не приводятся). Дальнейшая транскрипция хроматина единичными (2) или множественными тандемными комплексами РНКП2 (3) осуществляется с участием указанных факторов и сопровождается вытеснением и обменом гистонов H2A/H2B или всех коровых гистонов, соответственно.

позволяют предположить следующий механизм транскрипции хроматина in vivo (рис. 37). После инициации транскрипции на промоторе (1), на многих генах человека и дрозофилы РНКП2 останавливается после вхождения в +1 нуклеосому. +1 нуклеосомный барьер, скорее всего, формируется с участием определённых последовательностей ДНК, и может сниматься с участием факторов DSIF и NELF. Дальнейшая транскрипция хроматина может проводиться единичными или множественными тандемными комплексами РНКП2, и осуществляется с участием указанных факторов. Высокая плотность комплексов РНКП2, осуществляющих транскрипцию, может вызывать вытеснение гистонов с транскрибируемых генов. При низкой плотности РНКП2 транскрипция осуществляется единичными комплексами (2),

и сопровождается временным вытеснением/заменой димера(ов) H2A/H2B; структура нуклеосомы восстанавливается до транскрипции следующим комплексом РНКП2. При более высокой плотности комплексы РНКП2 (3) сталкиваются с гексасомами, в которых отсутствует димер H2A/H2B; в этом случае вытесняются или замещаются все коровые гистоны.

Транскрипция хроматина РНКП2 сопряжена с сохранением нуклеосом на исходных позициях на ДНК. Почему сохранение нуклеосом на исходных позициях может быть важно? Транскрипция эукариотических генов с использованием альтернативного механизма РНКП3-типа сопровождается вытеснением/обменом всех коровых гистонов (рис. 12). Механизм РНКП2-типа, наоборот, приводит лишь к незначительному обмену гистонов НЗ/Н4 (рис. 37). Поскольку гистоны НЗ/Н4 содержат большинство посттрансляционных модификаций, включая некоторые эпигенетические метки, механизм РНКП2-типа может осуществлять сохранение исходных гистонов НЗ/Н4 и их ковалентных модификаций в процессе транскрипции. Поскольку практически весь эукариотический геном транскрибируется с определенной частотой, мы предположили, что этот механизм может служить для поддержания эпигенетических меток в геноме эукариот.

Таким образом, транскрипция большинства эукариотических генов РНКП2 сопровождается минимальными нарушениями структуры хроматина, что, по всей обеспечивает поддержание стабильности генома. В ВИДИМОСТИ, частности, минимальный уровень обмена гистонов Н3/Н4 может служить гарантией сохранения эпигенетических «меток» и других пост-трансляционных модификаций этих гистонов. Наши результаты предполагают, ЧТО интермедиаты, содержащие Ø-петлю. обеспечивают эффективную транскрипцию хроматина с участием РНКП2, а также сохранение Н3/Н4-кода.

3. Механизмы преодоления нуклеосомного барьера и сохранения структуры хроматина процессивными ферментами

Хотя механизмы сохранения структуры хроматина другими процессивными ферментами (ДНК-полимеразами и АТФ-зависимыми ремоделерами) изучены в значительно меньшей степени, чем механизмы транскрипции, полученные данные позволяют предположить, что в этих случаях используется механизм ремоделирования хроматина, сходный с механизмом РНКПЗ-типа (показан для АТФзависимых ремоделеров на рис. 11). Так, нами было показано, что при репликации ДНК октамер гистонов остается связанным с матрицей, не происходит обмена гистонов, и осуществляется транслокация нуклеосом. АТФ-зависимые ремоделеры также обычно вызывают транслокацию нуклеосом (без потери гистонов), хотя некоторые из них участвуют и в обмене гистонов Н2А/Н2В. Таким образом, механизм РНКПЗ-типа более

распространён среди ферментов метаболизма ДНК различного типа, а появление механизма РНКП2-типа может быть связано с необходимостью поддержания эпигенетических меток и других ковалентных модификаций гистонов в геноме эукариот.

4. ВЫВОДЫ

- 1. Разработана «минимальная» мононуклеосомная экспериментальная система *in vitro*, которая воспроизводит важные аспекты транскрипции хроматина РНКПЗ *in vivo* (такие, как сохранение и транслокация нуклеосом при транскрипции).
- 2. Используя разработанную экспериментальную систему, был открыт новый механизм транскрипции хроматина РНКПЗ-типа:

a. Транскрипция по механизму РНКПЗ-типа характеризуется невысоким нуклеосомным барьером для РНКП и транслокацией октамера гистонов в направлении, противоположном направлению транскрипции.

б. Транслокация октамера гистонов осуществляется по механизму прямого переноса и без диссоциации гистонов в раствор.

в. Показано, что механизм РНКПЗ-типа используется дрожжевой РНКПЗ и РНКП бактериофага SP6. Кроме того, сходные механизмы используются во время репликации и АТФ-зависимого ремоделирования хроматина.

- Механизм РНКПЗ-типа описан в терминах структур интермедиатов (ДНК-белковых комплексов) низкого разрешения, формирующихся на различных этапах этого процесса (по данным электронной крио-микроскопии). Ключевым интермедиатом переноса октамера гистонов является внутринуклеосомная петля ДНК вариабельного размера (от 10 до 900 п.н.).
- 4. Разработана «минимальная» мононуклеосомная экспериментальная система in vitro, которая воспроизводит важные аспекты транскрипции хроматина РНКП2 in vivo (сохранение нуклеосом и вытеснение/обмен гистонов Н2А/Н2В при транскрипции единичными комплексами; вытеснение/обмен всех коровых гистонов при транскрипции множественными комплексами; действие различных элонгационных факторов и мутаций гистонов).
- 5. Используя разработанную экспериментальную систему, был открыт новый механизм транскрипции хроматина РНКП2-типа:

а. Транскрипция по механизму РНКП2-типа характеризуется высоким нуклеосомным барьером для РНКП2, вытеснением гистонов H2A/H2B и сохранением гексамера гистонов в первоначальной позиции на ДНК.

б. Сохранение гистонов на ДНК осуществляется без их диссоциации в раствор.

в. Показано, что механизм РНКП2-типа используется дрожжевой и человеческой РНКП2, и РНКП *E. coli*.

6. Механизм РНКП2-типа описан в терминах структур интермедиатов (по данным футпринтинга), формирующихся на различных этапах этого процесса:

а. Показано, что сохранение гексамера гистонов на ДНК осуществляется с помощью формирования внутринуклеосомной петли ДНК минимального размера (Ø-петли), содержащей транскрибирующую РНКП2. Получена модель высокого разрешения интермедиата, содержащего Ø-петлю ДНК.

б. Доказано, что транскрипция через нуклеосому сопряжена с сохранением гексасом на ДНК, и расшифрован механизм этого сопряжения (через формирование Ø-петли).

- 7. Идентифицированы белок-белковые (РНКП2-октамер гистонов) и ДНК-белковые взаимодействия, а также последовательности нуклеосомной ДНК, определяющие высоту нуклеосомного барьера для РНКП2 и эффективность сохранения гексасом после транскрипции. Показано, что N-концевые домены коровых гистонов влияют на высоту нуклеосомного барьера для РНКП2.
- Идентифицированы белковые факторы и комплексы, понижающие нуклеосомный барьер для РНКП2 и увеличивающие эффективность сохранения гексасом после транскрипции (элонгационный фактор TFIIS, множественные комплексы РНКП2 и гистоновые шапероны FACT и нуклеолин):

a. Механизмы действия TFIIS и FACT описаны в терминах изменений, вносимых этими факторами в структуры различных интермедиатов, формирующихся при транскрипции хроматина РНКП2, а также изменений в скорости и эффективности преодоления нуклеосомного барьера.

б. Показано, что тандемные комплексы РНКП2 понижают высоту нуклеосомного барьера для РНКП2. Механизмы действия комплексов РНКП2, последовательно транскрибирующих через нуклеосому, описаны в терминах их влияния на скорость и эффективность преодоления нуклеосомного барьера, и на эффективность сохранения гексасом после транскрипции.

9. Разработаны детальные модели, описывающие конформационные перестройки хроматина, происходящие при транскрипции хроматина РНКП2 и РНКП3 *in vivo*:

а. Моделирование показывает, что возможной функцией механизма транскрипции хроматина РНКПЗ-типа является формирование активного хроматина, или «участков доступа» для факторов, участвующих в транскрипционной регуляции генома.

б. Вероятной функцией механизма транскрипции хроматина РНКП2-типа является сохранение исходных гистонов Н3/Н4 и их ковалентных модификаций в процессе транскрипции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

- 1. Студитский В.М., Храпко К.Р. Энхансеры, ДНК-петли и стабильные комплексы: механизм активации транскрипции //Молекулярная биология.-1990.- Т.24.- С. 909-919.
- Studitsky V.M. Allosteric mechanism of enhancer action //FEBS Lett.- 1991.-V280.- P. 5-7.
- Brodolin K.L., Studitsky V.M., Mirzabekov A.D. Study of the structure of Escherichia coli RNA polymerase and its complex with the lacUV5-promotor using protein-protein and DNA-protein crosslinks, formed by formaldehyde//Mol. Biol.-1993.- V.27.- P.1085-1093.
- Brodolin K.L., Studitsky V.M., Mirzabekov A.D. Conformational changes in E. coli RNA polymerase during promoter recognition// Nucleic Acids Res.-1993.- V. 21.- P. 5748-5753.
- Clark D. J., Reitman M., Studitsky V.M., Chang J., Westphal H., Felsenfeld G. Chromatin structure of transcriptionally active genes// In Cold Spr. Harb. Symp. Quiant. Biol.- 1993.-V. 58. - P. 1-6.
- 6. Studitsky V. M., Clark D.J., Felsenfeld G. A histone octamer can step around a transcribing polymerase without leaving the template// Cell.- 1994.-V. 76.-P.371-382.
- 7. Studitsky V.M., Clark D.J., Felsenfeld G. Overcoming a nucleosomal barrier to transcription// Cell.-1995.- V.83.- P. 19-27.
- 8. Studitsky V.M., Clark D.J., Felsenfeld G. Preparation of nucleosomal templates for transcription in vitro// Methods Enzymol.- 1996.- V. 274.- P. 246-256.
- 9. Felsenfeld G., Boyes J., Chung J., Clark D., Studitsky V. M. Chromatin structure and gene expression // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.-1996.- V. 93.- P. 9384-9388.
- Studitsky V. M., Kassavetis G. A., Geiduschek E. P., Felsenfel G. Mechanism of transcription through the nucleosome by eukaryotic RNA polymerase// Science.- 1997.-V.278.- P.1960-1963.
- 11. Studitsky V. M. Preparation and analysis of positioned nucleosomes// Methods Mol. Biol.-1999.- V. 119.- P. 17-26.
- 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.- V. 4.- P. 377-386.
- 13. Felsenfeld G., Clark D., Studitsky V.M. Transcription through nucleosomes// Biophys. Chem.- 2000.- V. 86.- P. 231-237.
- Walter W., Studitsky V.M. Facilitated transcription through the nucleosome at high ionic strength occurs via a histone octamer transfer mechanism// J. Biol. Chem.- 2001.- V. 276.- P.- 29104-29110.
- 15. Studitsky V. M., Brodolin K. L., Liu Y., Mirzabekov A. D. Topography of lacUV5 initiation complexes // Nucleic Acids Res.- 2001.- V. 29.- P. 854-861.
- 16. Студитский В.М. Транскрипция хроматина// Молекулярная биология.- 2001.- Т. 35.-С. 235-247.
- 17. Liu Y., Bondarenko V., Ninfa A., Studitsky V.M. DNA supercoiling allows enhancer action over a large distance //Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.- 2001.- V. 98.- P. 14883-14888.
- Atkinson M. R., Blauwkamp T.A., Bondarenko V., Studitsky V.M, Ninfa A. J. Activation of the glna, glnk, and nac promoters as Escherichia coli undergoes the transition from nitrogen excess growth to nitrogen starvation// J. Bacteriol.- 2002.- V. 184.- P. 5358-5363.
- 19. Kireeva M., 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.- V.9.- P. 541-552.

- 20. Bondarenko V. A, Liu Y., Ninfa A.J., Studitsky, V.M. Action of prokaryotic enhancer over a distance does not require continued presence of promoter-bound sigma 54 subunit// Nucleic Acids Res.- 2002.- V. 30.- P. 636-642.
- 21. Bondarenko V.A., Liu Y.V., Jiang Y.I., Studitsky V.M. Communication over a large distance: enhancers and insulators// Biochem. Cell. Biol.- 2003.- V. 81.- P. 241-251.
- 22. Bondarenko V.A, Liu Y. V., Ninfa A.J., Studitsky V.M. Assay of prokaryotic enhancer activity over a distance in vitro// Methods Enzymol.- 2003.- V. 370.- P. 324-337.
- 23. Bondarenko V.A, Jiang Y., Studitsky, V.M. Rationally designed, inducible insulator can block enhancer action in vitro// EMBO J.- 2003.- V. 22. P. 4728-4737.
- 24. Belotserkovskaya R., Sangtaek O., Bondarenko V.A., Orphanides G., Studitsky V.M., Reinberg D. FACT Facilitates transcription-dependent nucleosome alteration// Science.-2003.- V. 301.- P. 1090-1093.
- Walter W., Kireeva M., Studitsky V.M. Kashlev, M. Bacterial polymerase and yeast pol II use similar mechanisms for transcription through nucleosomes// J. Biol. Chem.- 2003.- V. 278.- P. 36148-36156.
- 26. Liu Y., Clark D., Tchernajenko V., Dahmus M. E., Studitsky V. M. Role of CTD phosphorylation in transcription through the nucleosome by polymerase II// Biopolymers.-2003.- V. 68.- P. 528-538.
- 27. Walter W., Kashlev M., Studitsky V.M. Transcription through the nucleosome by mRNAproducing RNA polymerases// Methods Enzymol.- 2004.- V. 377.- P. 445-460.
- 28. Studitsky V.M., Walter W., Kireeva M., Kashlev M., Felsenfeld G. Chromatin remodeling by RNA polymerases// Trends Biochem. Sci.- 2004.- V. 29.- P. 127-135.
- 29. Walter W., Kireeva M.L., Tchernajenko V., Kashlev M., Studitsky, V.M. The fate of the nucleosome during transcription by RNA polymerase II// Methods Enzymol.- 2004.- V. 371.- P. 564-577.
- Angelov D., Verdel A., An,W., Bondarenko V., Hans F., Doyen C.M., Studitsky V.M., Hamiche A., Roeder R.G., Bouvet P. Dimitrov S. SWI/SNF remodeling and p300dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays// EMBO J.- 2004.-V. 23.- P.- 3815-3824.
- 31. Walter W., Studitsky V. M. Construction, analysis, and transcription of model nucleosomal templates// Methods.- 2004.- V. 33.- P. 18-24.
- 32. Студитский, В. М. Ремоделирование хроматина РНК-полимеразой II// Молекулярная биология.- 2005.- Т. 39.- С. 639-654.
- 33. Kireeva M.L, Hancock B., Komissarova N., Walter W., Studitsky V.M. Kashlev M Nature of the nucleosomal barrier to RNA polymerase II// Mol. Cell.- 2005.- V. 18.- P. 97-108.
- Rubtsov M.A., Polikanov Y.S., Bondarenko V.A., Wang Y.-H. Studitsky V.M. Chromatin structure can greatly facilitate enhancer action over a distance // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 2006.- V. 103.- P. 17690-17695.
- Bondarenko V.A., Steele L., Újvári A., Gaykalova D., Kulaeva O.I., Polykanov Y., Luse D.S. Studitsky V.M. Nucleosomes can form a polar barrier to transcript elongation by RNA Polymerase II// Mol. Cell.- 2006.- V. 24.- P. 469-479.
- Angelov D., Bondarenko V.A, Almagro S., Ménoni H., Mongélard F., Hans F., Mietton F., Studitsky V.M, Hamiche A., Dimitrov S., Bouvet P. Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodelling of nucleosomes// EMBO J.- 2006.- V. 25.- P. 1669-1679.
- Doyen C.-M., Woojin A., Angelov D., Bondarenko V., Mietton F., Studitsky V.M, Hamiche A., Roeder R.G., Bouvet P., Dimitrov S. Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A// Mol. Cell. Biol.- 2006.- V. 26.- P. 1156-1164.

- 38. Polikanov Y.S., Rubtsov M.A. Studitsky V.M. Biochemical analysis of enhancer-promoter communication in chromatin// Methods.- 2007.- V. 41.- P. 250-258.
- 39. Kulaeva O.I., Gaykalova D.A. Studitsky V.M. Transcription through chromatin by RNA polymerase II: Histone displacement and exchange// Mutat. Res.- 2007.- V.-618.- P. 116-129.
- 40. Polikanov Y.S., Bondarenko V.A., Tchernaenko V., Jiang Y.I., Lutter L.C., Vologodskii A. Studitsky V.M. Probability of the site juxtaposition determines the rate of protein-mediated DNA looping// Biophys. J.- 2007.- V. 93.- P. 2726-2731.
- 41. Ujvari A., Hsieh F.K., Luse S.W., Studitsky V.M. Luse, D.S. Histone N-terminal tails interfere with nucleosome traversal by RNA polymerase II// J. Biol. Chem.- 2008.- V. 283.- P. 32236-32243.
- 42. Morozov A.V., Fortney K., Gaykalova D.A., Studitsky V.M., Widom J., Siggia E.D. Using DNA mechanics to predict in vitro nucleosome positions and formation energies// Nucl. Acids Res.- 2009.- V. 37.- P. 4707-4722.
- 43. Kulaeva O.I., Gaykalova D., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned nucleosomes // Methods Mol. Biol.- 2009.- V. 523.- P. 109-123.
- 44. Студитский В.М. Механизмы дистанционной регуляции транскрипции на ДНК и в хроматине// Молекулярная биология.- 2009.- Т. 43.- С. 204-214.
- 45. Polikanov Y.S., Studitsky V.M. Analysis of distant communication on defined chromatin templates in vitro // Methods Mol. Biol.- 2009.- V. 549.- P. 563-576.
- 46. Kulaeva O.I., Gaykalova D.A., Pestov N.A., Golovastov V.V., Vassylyev D.G., Artsimovitch I. Studitsky V.M. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II// Nat. Struct. Mol. Biol.- 2009.-V. 16.- P. 1272-1278.
- Kulaeva O.I., Hsieh F.K. Studitsky V.M. RNA polymerase complexes cooperate to relieve the nucleosomal barrier and evict histones// Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 2010.- V. 107.-P. 11325-11330.
- Hsieh F.K., Fisher M., Újvári A., Studitsky V.M. Luse D.S. Histone Sin mutations promote nucleosome traversal and histone displacement by RNA polymerase II// EMBO Rep.-2010.- V. 11.- P. 705-710.
- 49. Kulaeva O.I. Studitsky V.M. Mechanism of histone survival during transcription by RNA polymerase II// Transcription.- 2010.- V. 1.- P. 85-88.
- 50. Gaykalova D.A., Vivekananthan N., Bondarenko V.A., Bartholomew B., Clark D.J. Studitsky V.M. A polar barrier to transcription is circumvented by remodeller-induced nucleosome translocation// Nucl. Acids Res.- 2011.- V. 39.-P. 3520-3528.
- Luse D.S. Studitsky V.M. The mechanism of nucleosome traversal by RNA polymerase II: roles for template uncoiling and transcript elongation factors// RNA Biol.- 2011.- V. 8.-P. 825-830.

Монографии и главы в книгах

52. Studitsky V.M., Clark, D.J., Felsenfeld G. Mechanism of nucleosome displacement by a transcribing polymerase// In Structural Biology: the state of art / Ed. R.H. Sarma. Adenine Press.- 1994.- P. 125-131.