

УДК 577.214.39

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТРАНСКРИПЦИИ ХРОМАТИНА РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ 2

© 2013 г. О. И. Кулаева^{1,2}, Н. В. Малюченко², Д. В. Никитин^{2,3}, А. В. Демиденко^{2,4},
О. В. Чертков², Н. С. Ефимова², М. П. Кирпичников², В. М. Студитский^{1,2*}

¹Department of Pharmacology, UMDNJ–Robert Wood Johnson Medical School, NJ 08854, USA

²Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119991, Россия

³Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук,
Пушино, Московская обл., 142290, Россия

⁴Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, 127276, Россия

Поступила в редакцию и принята к печати 30.04.2013 г.

Механизм транскрипции хроматина РНК-полимеразой 2 (РНКП2) у разных организмов – от дрожжей до человека – консервативен. После инициации транскрипции РНКП2, как правило, останавливается перед нуклеосомой или в нуклеосоме, расположенной в ранней транскрибируемой области гена. Затем, преодолев этот барьер, полимеразы транскрибируют протяженные участки ДНК, организованной в хроматин. При низкой или умеренной интенсивности транскрипции этот процесс сопровождается временным вытеснением димера гистонов H2A/H2B, а образовавшиеся “гексасомы” (субнуклеосомы, не содержащие один из димеров H2A/H2B) сохраняются за счет формирования небольших внутринуклеосомных петель ДНК. При умеренной интенсивности транскрипции структура нуклеосом восстанавливается до начала транскрипции следующим комплексом РНКП2. Этот механизм, вероятнее всего, обеспечивает сохранение “гистоновой” коды при транскрипции. При высоком уровне транскрипции расстояние между транскрибирующими комплексами РНКП2 становится меньше, и вытесненный димер H2A/H2B не успевает реассоциировать и обеспечить восстановление полных нуклеосом. В этом случае следующий транскрибирующий комплекс РНКП2 сталкивается с гексасомой, которая имеет меньшее число ДНК-гистоновых контактов, чем нуклеосома; это приводит к вытеснению/обмену всех коровых гистонов при транскрипции. В транскрипции хроматина РНКП2 *in vivo* участвуют различные белковые факторы и шапероны гистонов.

Ключевые слова: хроматин, транскрипция, нуклеосома, нуклеосомный барьер, РНК-полимераза 2, фактор FACT.

MOLECULAR MECHANISMS OF TRANSCRIPTION THROUGH A NUCLEOSOME BY RNA POLYMERASE II, by O. I. Kulaeva^{1,2}, N. V. Maluchenko², D. V. Nikitin^{2,3}, A. V. Demidenko^{2,4}, O. V. Chertkov², N. S. Efimova², M. P. Kirpichnikov², V. M. Studitsky^{1,2*} (¹Department of Pharmacology, UMDNJ–Robert Wood Johnson Medical School, Piscataway, NJ 08854, USA, *e-mail: Vasily.Studitsky@fccc.edu; ²Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia; ³Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia; ⁴Timiryasev’s Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276, Russia). The Pol II-type mechanism is conserved from yeast to human. After initiation of transcription, Pol II can be paused within the early transcribed region of a gene. Then Pol II overcomes the initial nucleosomal barrier, and efficiently proceeds through chromatin. At low- to moderate-level transcription progression of Pol II is characterized by displacement/exchange of only H2A/H2B dimer(s) and hexasome survival, likely mediated through formation of small intranucleosomal DNA loops. This mechanism helps to preserve the “histone” code during transcription. As the transcription rate is increased, the distance between transcribing Pol II complexes becomes shorter, and trailing Pol II complexes may encounter the hexasome formed after previous transcription round, before the H2A/H2B dimer re-binds to the hexasome. In this case an unstable intermediate with a smaller number of DNA–histone contacts is formed, resulting in eviction of the histone hexamer from DNA *in vitro*; there-

Принятые сокращения: ZLS (Zero-Loop-Stabilizing) – отрицательно заряженные участки РНК-полимераз; FACT (Facilitates Chromatin Transcription) – фактор транскрипции; РНКП2 – РНК полимеразы 2; РНКП3 – РНК полимеразы 3; ЭК – элонгационный комплекс; АЦ – активный центр; ПААГ – полиакриламид; НА (High Affinity) – область высокой аффинности.

* Эл. почта: Vasily.Studitsky@fccc.edu

fore here all core histones are evicted/exchanged *in vivo*. Various protein factors and histone chaperones are involved in chromatin transcription by Pol II *in vivo*.

Keywords: chromatin, transcription, elongation, nucleosome, RNA polymerase II, FACT.

DOI: 10.7868/S0026898413050091

ВВЕДЕНИЕ

РНК-полимераза 2 (РНКП2), осуществляющая транскрипцию генов, представляет собой гетеромультимерный комплекс из 12 различных субъединиц общей массой 0.5 МДа [1]. Во время транскрипции РНКП2 делает полный оборот каждые 10 п.н. вдоль спирали ДНК, продвигаясь через сильно компактизованную структуру хроматина [2]. Нуклеосомная упаковка хроматина существенно затрудняет как доступ ферментов и факторов транскрипции к ДНК, так и движение транскрибирующей РНКП2. Таким образом, нуклеосомы регулируют доступность ДНК, препятствуя или способствуя связыванию транскрипционных факторов и РНК-полимераз (РНКП) [3–8]. После инициации транскрипции на многих эукариотических генах РНКП2 останавливается после транскрипции начальных 50–100 п.н. [9–11]; часто это происходит в результате столкновения с (+1)-нуклеосомой, расположенной в начале транскрибируемой области гена [12, 13]. Как только фермент преодолевает (+1)-нуклеосомный барьер, считывание следующих за ним протяженных участков ДНК (до более сотен т.п.н.), организованных в нуклеосомы, идет с высокой скоростью (3–4 т.п.н./минуту [14]). Такая скорость транскрипции наблюдается также *in vitro* на ДНК, свободной от гистонов [15, 16]. Это указывает на то, что (+1)-нуклеосома является одним из ключевых факторов в регуляции транскрипции на стадии элонгации.

При дальнейшей транскрипции гена полимеразой наблюдаются различные изменения нуклеосомной структуры, сопровождаемые временным нарушением ДНК-гистоновых взаимодействий. При интенсивной транскрипции происходит частичная потеря [6, 17–20] и обмен [21–26] всех коровых гистонов (включая H3/H4) на транскрибируемых участках генов. При умеренной транскрипции, характерной для большинства транскрибируемых генов, потери нуклеосом не наблюдаются [17–19, 27, 28]. Для этих генов характерен быстрый, зависимый от транскрипции, обмен только гистонов H2A/H2B, но не H3/H4 [23–25]. Кроме того, транскрипция вызывает временное разворачивание октамера гистонов. Известно, что интактная (нетранскрибируемая) нуклеосома не имеет реакционноспособных SH-групп, в то время как на транскрибируемых генах SH-группы гистонов H3 становятся доступными для различных зондов [29–31]. При этом доступность SH-

групп коррелирует с процессом транскрипции [29, 30, 32]. Нарушения нуклеосомной структуры во время транскрипции *in vivo* носят временный характер, а сохранение хроматиновой структуры совершенно необходимо для нормального функционирования клеток [33, 34]. Необратимая потеря гистонов способствует формированию структуры хроматина, доступной для различных агентов, повреждающих ДНК [35, 36], и приводит к потере жизнеспособности клеток и преждевременному старению клетки [34].

НУКЛЕОСОМНЫЙ БАРЬЕР

При изучении транскрипции нуклеосом *in vitro* обнаружено, что РНКП2 останавливается в определенных позициях на нуклеосомной ДНК [37]. Определены два участка предпочтительных мест остановки (“паузирования”) РНКП2, когда активный центр (АЦ) фермента находится на расстоянии примерно 15 и 45 п.н. от проксимальной к промотору границы нуклеосомной ДНК (далее по тексту – (+15)- и (+45)-участки) (рис. 1). Показано, что при транскрипции нуклеосом, сформированных на рандомизированных последовательностях ДНК, движение РНКП2 через участки (+15) и (+45) также замедлено. Предполагается, что эти участки соседствуют с участками ДНК-гистоновых взаимодействий повышенной аффинности, которая лишь частично зависит от последовательности ДНК. На большинстве нуклеосомных матриц именно барьер (+45) оказывается наиболее высоким и определяет общую скорость продвижения РНКП2 через нуклеосому [37].

Для картирования областей гистонов, участвующих в этих взаимодействиях и определяющих высоту нуклеосомного барьера для РНКП2, изучали транскрипцию нуклеосом, содержащих различные мутанты гистонов. Для экспериментов были выбраны четыре мутации класса Sin, которые уменьшают аффинность гистонов H3 или H4 к нуклеосомной ДНК [38]. Все эти мутации ослабляют ДНК-гистоновые взаимодействия в районе диадной оси нуклеосомы (участок (+60)–(+80), рис. 1) и существенно понижают нуклеосомный барьер в позиции (+45) нуклеосомной ДНК [39]. Это позволяет предположить, что барьер формируется тогда, когда передняя граница фермента (расположенная на расстоянии примерно 10–20 п.н. перед активным центром РНКП2), находится в области сильных ДНК-гистоновых взаи-

модействий в участке (+60)–(+80) нуклеосомной ДНК, а сам активный центр РНКП2 при этом находится в участке (+45) нуклеосомной ДНК.

Таким образом, ДНК-гистоновые взаимодействия на участке (+60)–(+80) нуклеосомной ДНК в значительной степени определяют общую высоту нуклеосомного барьера, формирующегося при транскрипции полимеразой. Сходные результаты получены при изучении ДНК-гистоновых взаимодействий методом разворачивания нуклеосомной ДНК с помощью лазерного “пинцета” [40]. В этих опытах показано, что нуклеосомы содержат три участка сильных ДНК-гистоновых взаимодействий ((+25)–(+35), (+60)–(+80) и (+115)–(+125)). Можно предположить – по аналогии с (+45)–барьером, – что нуклеосомный барьер в участке (+15) определяется, скорее всего, сильными ДНК-гистоновыми взаимодействиями на участке (+25)–(+35) (рис. 1).

Как уже отмечено выше, высота барьеров (+15) и (+45) только частично зависит от последовательности ДНК в областях (+25)–(+35) и (+60)–(+80), расположенных за 10–20 п.н. перед АЦ РНКП2. В то же время, мутации в участке (+85)–(+95) нуклеосомной ДНК в значительной степени изменяют высоту (+45)-нуклеосомного барьера [41]. Таким образом определили дополнительную область (+85)–(+95) нуклеосомной ДНК (рис. 1, далее по тексту область высокой аффинности обозначена НА, от англ. High Affinity), которая обуславливает высокий нуклеосомный (+45)-барьер для транскрипции полимеразой. В отличие от участков нуклеосомной ДНК, картированных ранее в положении (+25)–(+35) и (+60)–(+80), эта последовательность расположена на расстоянии более чем 40 п.н. перед активным центром фермента, и в этом случае высота нуклеосомного барьера сильно зависит от последовательности ДНК. Эти опыты позволяют предположить, что имеется еще один механизм регуляции транскрипции РНКП2, который состоит в том, что определенные последовательности ДНК могут дополнительно увеличивать силу ДНК-гистоновых взаимодействий, создавая очень высокий (и, возможно, регулируемый) барьер для фермента.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТРАНСКРИПЦИИ РНКП2

Каким образом РНКП2 преодолевает нуклеосомный барьер во время транскрипции? Схема, обобщающая результаты многолетних исследований, представлена на рис. 2. При приближении РНКП2 (комплекс 1) и вхождении ее в нуклеосому (комплекс 2) происходит частичное разворачивание участка ДНК, находящегося позади фермента, от октамера гистонов [41]. Когда РНКП2 проходит (+45)-участок, она встречает область сильных ДНК-гистоновых взаимодействий (в об-

ластях (+60)–(+80) и (+85)–(+95), рис. 1). Разворачивание этих участков ДНК и прохождение барьера опосредуется формированием в (+49)-положении внутринуклеосомной петли ДНК очень небольшого размера (Ø-петли, рис. 2, комплекс 3; структура Ø-петли, рис. 3). Название нулевой, или Ø-петли, структура получила из-за своих малых размеров. В данном комплексе сохраняются исходные, “претранскрипционные”, ДНК-гистоновые взаимодействия как в области, находящейся перед транскрибирующей полимеразой, так и в области, уже пройденной ферментом.

Следует отметить ряд особенностей элонгационного комплекса, содержащего Ø-петлю, которые выявлены при анализе модели комплекса высокого разрешения (рис. 3) [41]. Во-первых, большая часть комплекса РНКП2 обращена в раствор, пространственно не перекрываясь с молекулами коровых гистонов. Во-вторых, изгиб ДНК под углом 90°, образующийся в элонгационном комплексе, направлен к поверхности октамера и облегчает формирование Ø-петли. В-третьих, ДНК-гистоновые контакты за элонгационным комплексом (на участке ДНК длиной около 20 п.н.) стабилизируют Ø-петлю. В четвертых, вытеснение участка ≥50 п.н., дистального по отношению к промотору конца ДНК нуклеосомы, уменьшает размер области ДНК, взаимодействующей с гистонами и находящейся по ходу движения фермента, от ~100 п.н. до ≤50 п.н. Это должно облегчить дальнейшее разворачивание ДНК, находящейся перед РНКП2, с поверхности гистонового октамера и дальнейшую транскрипцию через нуклеосому. И, наконец, НА-последовательность ДНК находится в составе вытесняемого участка (50 п.н. нуклеосомной ДНК) и, как и ожидалось, может препятствовать его вытеснению и блокировать РНКП2 в области (+45).

Формирование петли (стадия, лимитирующая скорость транскрипции нуклеосом) происходит медленно и вызывает характерное “паузирование” РНКП2 в положении (+45) [41]. Важно отметить, что структура элонгационного комплекса (+49) несовместима с наличием двух витков нуклеосомной ДНК; в такой структуре один виток ДНК должен быть вытеснен. В результате формирования Ø-петли происходит стерическое вытеснение и разворачивание нуклеосомной ДНК по ходу движения РНКП2, что облегчает дальнейшую транскрипцию (рис. 2, комплекс 4). Затем происходит реформирование исходных ДНК-гистоновых взаимодействий (комплекс 5) и восстановление структуры нуклеосом после прохождения их РНКП2 (комплекс 6).

Во время транскрипции через нуклеосому Ø-петля формируется, по крайней мере, дважды, – в положениях (+39) и (+49) [39, 41]. Образование небольших внутринуклеосомных, топологически

закрытых, петель ДНК приводит к накоплению положительной суперспирализации ДНК впереди полимеразы — за счет вращения фермента в такой петле. Это может являться ключевым механизмом разворачивания гистонового октамера во время транскрипции. Моделирование ЭК+49 (элонгационного комплекса, где активный центр фермента находится в положении +49) с использованием структур высокого разрешения показало (рис. 3), что формирование \emptyset -петель может происходить только при определенном вращательном положении РНКП2, когда большая часть молекулы обращена в раствор, когда нет стерических перекрываний с коровыми гистонами и когда ДНК направлена к октамеру под углом 90° . Смещение фермента на один нуклеотид приводит к его повороту вокруг оси ДНК на $\sim 36^\circ$ и происходит пространственное столкновение РНКП2 и гистонового октамера. В комплексе \emptyset -петли контакты ДНК с гистонами (около 20 п.н.) заменяются электростатическими взаимодействиями РНКП2 с гистонами, которые стабилизируют комплекс (рис. 4). При анализе распределения зарядов на поверхности взаимодействия октамера и РНКП2 обнаружен сильный отрицательный заряд на поверхности РНКП2, который локализуется в непосредственной близости к положительно заряженной области на поверхности октамера гистонов [41]. Эта область располагается внутри коровой части clamp-домена субъединицы RPB1 РНКП2, обеспечивает электростатические взаимодействия с октамером [41] и временно компенсирует нарушение ДНК-гистоновых взаимодействий в нуклеосоме при транскрипции. Скорее всего, именно формирование \emptyset -петли обеспечивает преодоление нуклеосомного барьера во время транскрипции РНКП2 [41].

Ранее было предложено две модели молекулярного механизма элонгации транскриптов в хроматине — характерных для РНКП2 и РНКП3 (таблица). Первый механизм, как описано выше, характеризуется высоким нуклеосомным барьером для РНКП2, вытеснением/обменом гистонов H2A/H2B и сохранением позиций нуклеосом при транскрипции. Второй механизм, характерный для РНКП3 и РНКП бактериофага SP6, характеризуется внутриматричным переносом октамера гистонов, без потери/обмена гистонов H2A/H2B, и относительно низким нуклеосомным барьером [42–45].

Структуры интермедиатов, образующихся в процессе транскрипции нуклеосом по механизму РНКП3-типа, изучены [42–44, 46, 47]. Сравнение структур, формирующихся при транскрипции хроматина по механизмам РНКП2- и РНКП3-типов, показано на рис. 5. При вхождении РНКП2 и РНКП3 в нуклеосому вначале образуются сходные структуры, в частности ДНК, находящаяся за элонгационным комплексом, отделяется от по-

Характеристики механизмов транскрипции хроматина РНКП3 и РНКП2 типов

Активность	Фермент	
	РНКП3/SP6	РНКП2/ <i>E. coli</i>
Перемещение нуклеосом*	+	–
Вытеснение H2A/2B димера	–	+
Высота нуклеосомного барьера	+	+++

* При транскрипции нуклеосомы перемещаются в направлении, противоположном направлению движения фермента.

верхности октамера гистонов (рис. 5, интермедиаты 2 и 2'). Затем, в процессе транскрипции по механизму РНКП3-типа, ДНК частично снимается с поверхности октамера перед ферментом, чего, скорее всего, не происходит при транскрипции РНКП2. Таким образом, на ранних этапах транскрипции по механизму РНКП3-типа большая поверхность октамера экспонирована в раствор. Это структурное отличие может объяснять более высокую вероятность транслокации (перемещения) нуклеосом в процессе транскрипции по этому типу [42, 43, 45]. Соответственно, лишь 30% всех транскрибируемых матриц образуют комплексы, содержащие \emptyset -петлю [44]. Напротив, если разворачивания ДНК перед РНКП2 с поверхности октамера гистонов не происходит, то процесс образования \emptyset -петли и сопутствующее вытеснение дистального от промотора конца нуклеосомной ДНК становится более эффективным. Так как \emptyset -петля позволяет сохранить исходные взаимодействия ДНК с октамером, при транскрипции с участием РНКП2 нуклеосомы остаются в исходных позициях на ДНК. Таким образом, основной отличительной особенностью механизма РНКП2-типа является более эффективное формирование внутринуклеосомной \emptyset -петли ДНК, что и определяет остальные особенности этого механизма.

РОЛИ ДИМЕРОВ H2A/H2B ВО ВРЕМЯ ТРАНСКРИПЦИИ

Прохождение единичного комплекса РНКП2 через нуклеосому вызывает потерю одного димера H2A/H2B [48]. Таким образом, во время транскрипции РНКП2 *in vitro* от 50 до 95% нуклеосом “выживают” в виде гексасомы, которая остается на исходной позиции на ДНК [48]. Потеря/вытеснение гистонов H2A/H2B происходит во время критического перехода полимеразой паузы в (+45)-положении [41]. Как упоминалось выше, этот переход связан с формированием \emptyset -петли и включает в себя согласованное образование

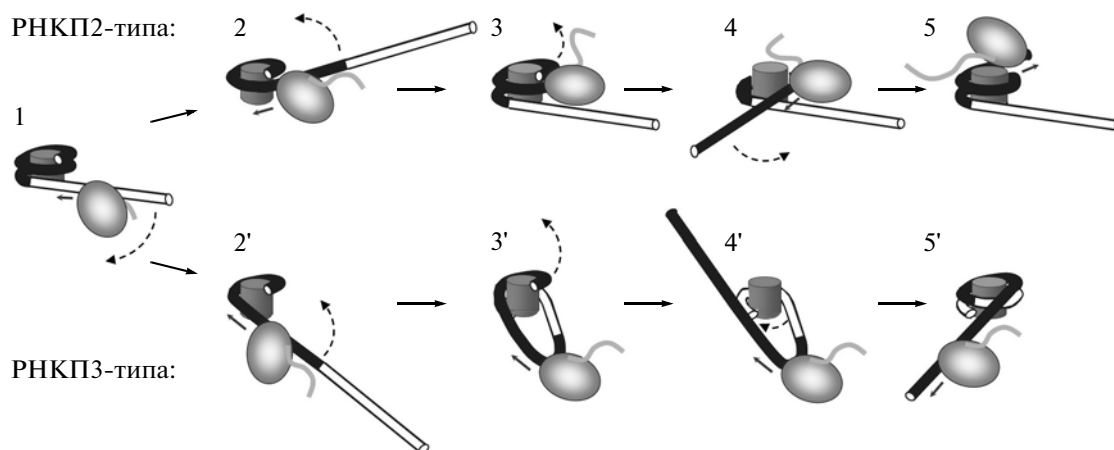


Рис. 5. Гипотетические механизмы транскрипции нуклеосом РНКП2- и РНКП3-типов. Когда РНКП входят в нуклеосому (1), они частично вытесняют ДНК с поверхности гистонового октамера (2 и 2'). Однако более протяженный участок ДНК, находящийся ниже по ходу фермента, вытесняется в процессе транскрипции, проходящей по механизму РНКП3-типа, более эффективно, чем в процессе транскрипции по механизму РНКП2-типа (возможно, из-за более высокой скорости транскрипции нуклеосом по механизму РНКП3-типа). Таким образом, формирование \emptyset -петли РНКП2 (3) происходит более эффективно, чем петли РНКП3, и в последнем случае возникает тенденция к формированию внутринуклеосомных петель ДНК большого размера (3'). Образование петель ведет к нарушению ДНК-гистоновых взаимодействий в области перед РНК-полимеразами (4 и 4'), а затем происходит восстановление нуклеосом в исходной позиции (в случае РНКП2, 5) или на позиции, расположенной выше исходного положения (в случае РНКП3, 5') на ДНК.

ДНК-гистоновых взаимодействий, находящихся позади фермента, и диссоциацию ДНК от октамера гистонов перед ферментом. Формирование подобных временных внутринуклеосомных петель обеспечивает сохранение нуклеосомы во время транскрипции [41].

Два практически одинаковых димера H2A/H2B играют разные роли в процессе транскрипции через нуклеосому, и потеря одного из них имеет различные последствия для транскрипции [41]. Удаление дистального димера H2A/H2B (D-димера) приводит к высвобождению дистального к промотору конца нуклеосомной ДНК в раствор, облегчает формирование \emptyset -петли и транскрипцию нуклеосом [41]. Совершенно противоположный эффект наблюдается при удалении проксимального димера H2A/H2B (P-димера): его смещение приводит к остановке РНКП2 в нуклеосоме [41]. Таким образом, проксимальный димер H2A/H2B необходим для выживания нуклеосомы и для эффективной транскрипции. Скорее всего, в результате диссоциации P-димера происходит удаление ДНК-связывающего сайта, который остается позади элонгационного комплекса в (+45)-положении, что и приводит к дестабилизации \emptyset -структуры. Как уже отмечалось выше, если \emptyset -петля не образуется, то не происходит высвобождения ДНК с октамера перед РНКП2, что необходимо для дальнейшего продвижения фермента.

РОЛЬ ШАПЕРОНА ГИСТОНОВ FACT ВО ВРЕМЯ ТРАНСКРИПЦИИ

Высокоочищенные экспериментальные системы *in vitro*, содержащие только одиночный элонгационный комплекс РНКП2, воспроизводят важные свойства транскрибируемого хроматина, характерные для условий *in vivo*, и позволяют исследовать механизм транскрипции нуклеосом. Но эти системы работают неоптимально. При транскрипции полимеразой в хроматине *in vivo* наблюдается высокая скорость продвижения ферментативного комплекса и эффективное преодоление нуклеосомных барьеров. Очевидно, что *in vivo* существуют дополнительные факторы, облегчающие транскрипцию хроматина и способствующие, в то же время, сохранению нуклеосомы при транскрипции. Действительно, в клетке транскрибируемые гены ассоциированы с множеством факторов, таких как АТФ-зависимые хроматиновые ремоделлеры, факторы транскрипции, гистоновые шапероны, ферменты, осуществляющие модификацию гистонов ([49, 50] и см. ниже). Обнаружено несколько белковых комплексов, облегчающих транскрипцию хроматина *in vitro* (TFIIS, FACT, нуклеолин и множественные молекулы РНКП2). Наиболее эффективно транскрипция нуклеосомных матриц *in vitro* в минимальной системе обеспечивается белковым комплексом FACT.

FACT (Facilitates Chromatin Transcription) – гетеродимерный белковый комплекс, состоящий из двух субъединиц (Spt16 и SSRP1), – является фактором транскрипции и репликации, а также

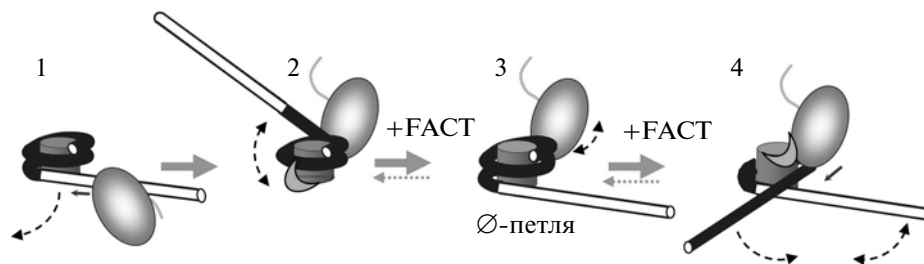


Рис. 6. Механизм стимуляции транскрипции нуклеосом комплексом РНКП2 FACT. Предполагается, что в каждый отдельно взятый момент фактор FACT взаимодействует с ДНК-связывающей поверхностью одного димера H2A/H2B (после частичной диссоциации нуклеосомной ДНК) и стимулирует транскрипцию за счет уменьшения скорости его последующей ре-ассоциации с ДНК. Сначала FACT взаимодействует с промотор-проксимальным димером, облегчая транскрипцию (комплекс 2). После прохождения позиции (+49) и частичной диссоциации-нуклеосомной ДНК от октамера гистонов перед РНКП2, FACT взаимодействует с промотор-дистальным димером, способствуя формированию промежуточного комплекса 4 и дальнейшей транскрипции.

шапероном коровых гистонов [51–54]. Он связывается с димером H2A/H2B с более высокой аффинностью, чем с H3/H4-тетрамером [51, 55–57], и способствует более быстрой транскрипции в хроматине *in vitro* [37, 51, 53, 58]. В условиях *in vivo* FACT колокализует с РНКП2, а кинетика его связывания с хроматином и распределение в хроматине также сходны с аналогичными параметрами, характерными для РНКП2 [59]. Комплекс FACT необходим также для поддержания структуры хроматина во время элонгации транскриптов РНКП2 [60, 61]. Он способствует транскрипции генов, расположенных в районах с высокоупорядоченной структурой хроматина благодаря своей ремодулирующей нуклеосомы активности, которая дестабилизирует структуру нуклеосом и облегчает, таким образом, прохождение РНКП [62]. Для описания действия FACT в хроматине предложено несколько гипотез. Согласно одной из них, FACT способствует диссоциации одного из гистоновых димеров H2A/H2B из нуклеосомы и, тем самым, облегчает транскрипцию [51]. Авторы другой гипотезы предполагают, что комплекс FACT может увеличивать доступность нуклеосомной ДНК без вытеснения димера H2A/H2B [63, 64]. Но пока гипотезы противоречивы и не могут в полной мере объяснить действие FACT во время транскрипции. Наши исследования показали, что комплекс FACT существенно ослабляет нуклеосомный барьер при транскрипции РНКП2, и его действие полностью зависит от присутствия С-концевого домена субъединицы Spt16 [51]. Кроме того, нуклеосомы, полученные после транскрипции в присутствии FACT, теряют один H2A/H2B-димер и превращаются в гексасомы [51]; при этом новых продуктов реакции не образуется.

Наши опыты свидетельствуют также, что стимуляция транскрипции хроматина фактором FACT человека зависит от наличия H2A/H2B-димеров в нуклеосоме [65]. Кинетический анализ показывает,

что FACT уменьшает время жизни непродуктивных (остановленных в нуклеосоме) комплексов РНКП2 и способствует формированию продуктивных комплексов, содержащих ДНК, частично удаленную с поверхности октамера. Кроме того, относительное количество свободной ДНК, полученной после транскрипции в присутствии FACT, существенно меньше, чем без него [65]. Вероятнее всего, фактор FACT взаимодействует с ДНК-связывающей поверхностью димеров гистонов H2A/H2B, облегчая частичную спонтанную диссоциацию нуклеосомной ДНК от октамера.

Способ действия FACT при транскрипции хроматина РНКП2 описан в следующей модели (рис. 6, [65]). Предполагается, что FACT взаимодействует с ДНК-связывающей поверхностью одного из двух димеров H2A/H2B (после частичной диссоциации нуклеосомной ДНК с поверхности октамера гистонов) и облегчает транскрипцию за счет уменьшения скорости его последующей ре-ассоциации с ДНК (рис. 6). Модель сохранения гексасом при транскрипции хроматина предполагает, что этот процесс обусловлен эффективностью формирования Ø-петли, что зависит, как подробно рассмотрено выше, от присутствия промотор-проксимального димера H2A/H2B во время транскрипции. FACT взаимодействует с этим димером (рис. 6, 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. После формирования Ø-петли (рис. 6, интермедиат 3) и разворачивания нуклеосомной ДНК с поверхности промотор-дистального димера H2A/H2B, FACT взаимодействует с этим димером, затрудняя реассоциацию ДНК с октамером гистонов (рис. 6, интермедиат 4). 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.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ МНОЖЕСТВЕННЫМИ КОМПЛЕКСАМИ РНКП2

Во время умеренной транскрипции эукариотических генов полимеразой *in vivo*, нуклеосомы сохраняются; при этом наблюдается только обмен гистонов H2A/H2B, зависимый от транскрипции [17–19, 27, 28]. Такие параметры транскрибируемого хроматина воспроизводятся в системах *in vitro*, описанных выше, где нуклеосомы транскрибируются одиночными комплексами РНКП2, и проходит только один цикл транскрипции. В то же время, и на тех же генах, транскрибируемых с более высокой эффективностью *in vivo*, наблюдается частичное удаление нуклеосом и обмен всех коровых гистонов [6, 17–26]. Мы предположили, что большинство описанных выше параметров активно транскрибируемого хроматина определяются более высокой плотностью транскрибирующих комплексов РНКП2 на гене. Для проверки этой гипотезы разработана экспериментальная система, позволяющая проведение транскрипции несколькими комплексами РНКП2 или РНКП *E. coli* (ранее показано, что РНКП *E. coli* использует механизм транскрипции РНКП2-типа [66]). Взаимодействие нуклеосом с тандемными комплексами РНКП способствует более эффективному преодолению барьера, а также повышает выход полноразмерных транскриптов. Стоит отметить, что даже высокий нуклеосомный барьер (который РНКП2 не преодолевает даже в присутствии комплекса FАСТ [65]) практически полностью снимается в процессе транскрипции двумя комплексами РНКП [67]. Наличие следующего комплекса РНКП в значительной степени повышает эффективность (и практически приближает ее к уровню транскрипции ДНК, свободной от гистонов) и скорость транскрипции лидирующего комплекса при прохождении нуклеосомного барьера. Сходные данные о влиянии множественных комплексов на эффективность процесса транскрипции хроматина получены в лаборатории М. Ванга (M. Wang) [68].

Можно предложить, по крайней мере, две модели механизма вытеснения нуклеосом, работающих на высокоактивных генах. Первый предполагает столкновение одной нуклеосомы с двумя тандемными комплексами РНКП. В этом случае преследующий комплекс может предотвратить восстановление контактов ДНК с октамером в области, расположенной выше лидирующего комплекса, и, таким образом, предотвратить восстановление нуклеосомы на прежней позиции (Ø-петля не формируется). Второй механизм предполагает, что следующий комплекс РНКП2 может вытеснить с ДНК гексасому, которая формируется вслед за первым

транскрибирующим комплексом. В рамках этого механизма не требуется одновременного столкновения нуклеосомы с двумя комплексами РНКП2.

Для проверки первого предположения изучали транскрипцию при участии одного комплекса или тандема из двух комплексов РНКП *E. coli* или РНКП2 дрожжей [67]. Оказалось, что тандемный элонгационный комплекс, образованный из двух комплексов РНКП, идущих непосредственно друг за другом, проходит нуклеосомы более эффективно, чем единичные комплексы. В то же время, транскрипция тандемным элонгационным комплексом не приводит к увеличению доли свободной от нуклеосом ДНК или гексасом, сохранявшихся на ДНК после транскрипции.

Согласно второй модели, последовательное столкновение нескольких комплексов РНКП2 с одной и той же нуклеосомой приведет к тому, что преследующий комплекс РНКП2 сталкивается с гексасомой, сформированной после транскрипции с участием лидирующего комплекса РНКП2. Экспериментальная проверка данной модели показала, что в этом случае вытесняются все коровые гистоны из гексасом, как образовавшихся в процессе предшествующего цикла транскрипции, так и из гексасом, заранее сформированных на матрице. Вероятно, ключевые интермедиаты (в особенности Ø-петля), образующиеся в процессе транскрипции через гексасомы, являются менее стабильными, чем интермедиаты, получаемые при транскрипции полных нуклеосом [67] (рис. 7). Действительно, каждый димер гистонов H2A/H2B стабилизирует область нуклеосомной ДНК длиной около 35 п.н. Во время входа РНКП2 в нуклеосому, фермент (до того, как он достигает позиции +49) нарушает ДНК-гистоновые взаимодействия за транскрипционным комплексом. В соответствии с этим комплекс РНКП2 • ЭК(+45) с нуклеосомой, в которой отсутствует дистальный от промотора димер H2A/H2B (вытесненный предыдущим транскрибирующим комплексом РНКП2), стабилизирован небольшим количеством ДНК-гистоновых взаимодействий (рис. 7 комплекс 2'), и гексамер гистонов может спонтанно диссоциировать в раствор из такого комплекса. Эти данные согласуются с явлением обмена/вытеснения гистонов, наблюдаемым *in vivo* во время интенсивной транскрипции [21–26, 69, 70].

Результаты опытов *in vitro* с множественными комплексами РНКП2 позволяют предположить, что следующий комплекс может сталкиваться с гексасомой, которая была сформирована в результате предыдущего раунда транскрипции и перед тем, как произошла реассоциация H2A/H2B-димера. Гексасома является нестабильной промежуточной формой нуклеосомы с меньшим количеством ДНК-гистоновых контактов. В случае столкновения гекса-

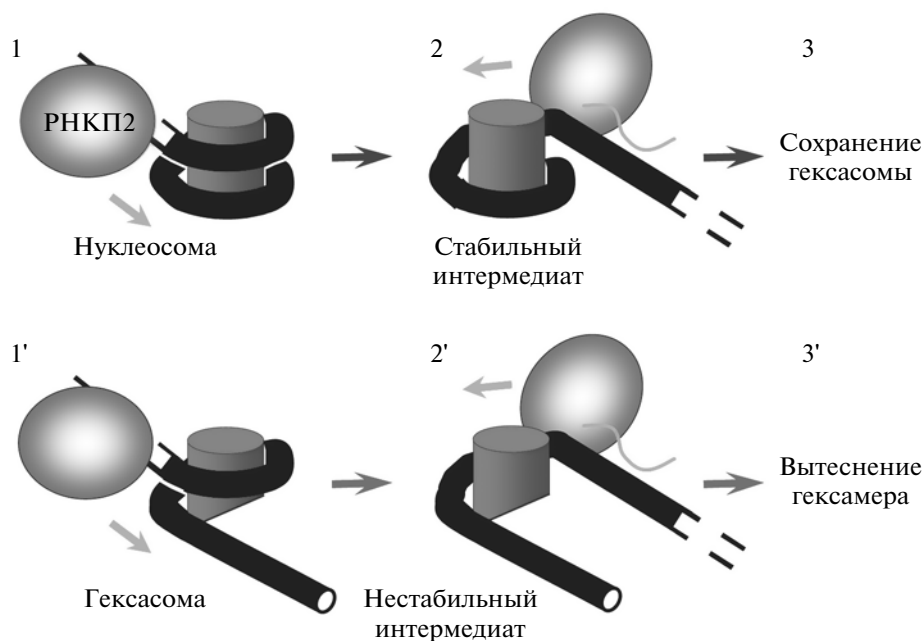


Рис. 7. Сохранение нуклеосом при транскрипции зависит от расстояния между комплексами РНКП2. Интермедиаты 1, 2, 3: механизм сохранения нуклеосомы в процессе транскрипции. По мере приближения РНКП2 (этап 1) и при ее входе в нуклеосому (2) полимеразы частично вытесняет ДНК с поверхности октамера гистонов. Однако область ДНК, расположенная перед РНКП2, остается связанной с октамером, в результате чего происходит формирование стабильного промежуточного комплекса и сохранение гексасомы в исходной позиции (3). Напротив, в процессе транскрипции через гексасомы, образовавшиеся 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').

сомы со следующей РНКП все коровые гистоны удаляются с ДНК *in vitro*. Эта модель позволяет объяснить тот факт, что удаления гистонов H3/H4 при умеренном уровне транскрипции не происходит, но на активно транскрибируемых генах они вытесняются. Более того, эта модель позволяет объяснить зависимость эффективности вытеснения гистонов от эффективности транскрипции *in vivo* [17–19, 24], поскольку она предполагает, что эффективность удаления гистонов обратно пропорциональна среднему расстоянию между транскрибирующими комплексами.

МЕХАНИЗМЫ ТРАНСКРИПЦИИ ХРОМАТИНА РНКП2 *in vivo*

В условиях *in vivo* транскрипция на тысячах генов высших организмов (от человека до дрозофилы) РНКП2 останавливается вскоре после инициации на промоторе [9–11] (часть (1), рис. 8). Длина синтезированной и связанной с ферментом РНК в таком случае составляет не более 100 н. [71–75]. Первая нуклеосома, расположенная ниже точки начала транскрипции ((+1)-нуклеосома), формирует высокий барьер для РНКП2 и может участвовать в регуляции транскрипции у эука-

риот. При активации транскрипции белковыми факторами на промоторе этот барьер преодолевается, и полимеразы продолжают синтез цепи РНК. Барьер может быть “взят” при участии элонгационного фактора TFIIIS, фактора FACT, комплексов ремоделирования хроматина, при удалении репрессоров DSIF и NELF, а также при ацетилировании N-концевых хвостов гистонов. Кроме того, как уже показано выше, *in vitro* две идущие подряд РНКП2 успешно преодолевают (+1)-нуклеосомный барьер, причем стимулирующий транскрипцию эффект такого тандема сильнее, чем факторов, упомянутых выше. Принимая во внимание, что место для остановки полимераз достаточно типично (активный центр фермента локализован на расстоянии 30–50 п.н. после старта [76]), можно предположить, что на таких генах происходит сближение двух тандемных элонгационных комплексов РНКП2, что позволяет преодолевать (+1)-нуклеосомный барьер и иные препятствия (например, ДНК-связанные белки) на пути РНКП2 [67, 68, 77, 78]. Возможно также, что тандем РНКП2 может выступать в роли фермента-“первопроходца”, модифицирующего структуру хроматина транскрибируемых генов и делающего его более доступным для последующей транскрипции.

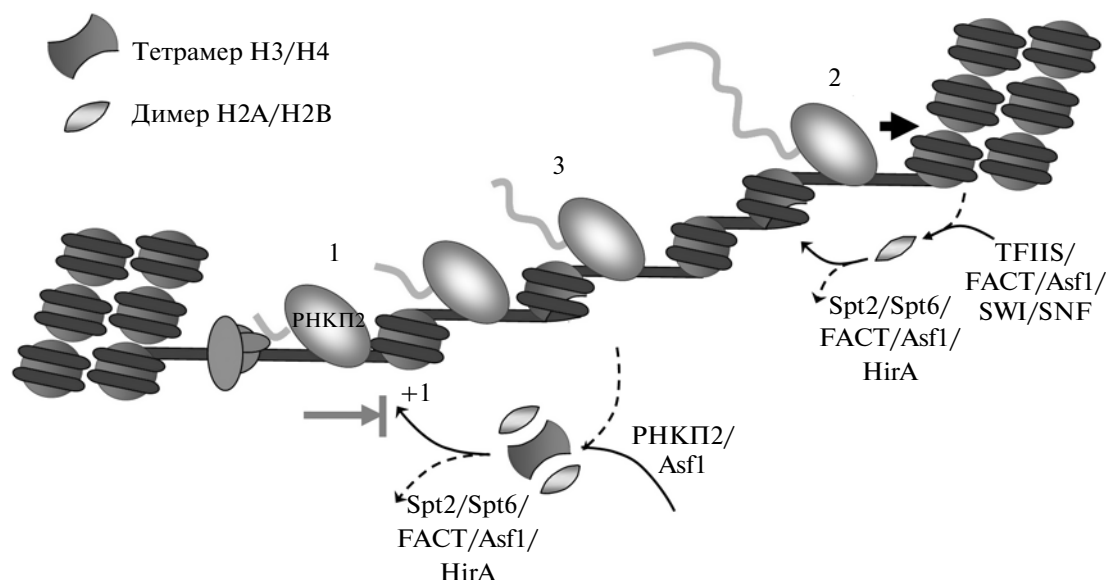


Рис. 8. Механизм транскрипции хроматина РНКП2 *in vivo*. После инициации транскрипции на промоторе (1) многих генов человека и дрозофилы полимеразы РНКП2 останавливается после проникновения в (+1)-нуклеосому. После преодоления (+1)-нуклеосомного барьера дальнейшая транскрипция хроматина единичными (2) или множественными тандемными комплексами РНКП2 (3) сопровождается вытеснением и обменом гистонов H2A/H2B или всех коровых гистонов соответственно. При низкой плотности РНКП2 транскрипция сопровождается временным вытеснением /обменом только H2A/H2B-димера; при этом нуклеосомная структура восстанавливается до прохождения следующего комплекса РНКП2. При высокой плотности комплексы РНКП2 проходят гексасомы, лишённые H2A/H2B-димеров, все коровые гистоны вытесняются и обмениваются. Указаны некоторые взаимодействующие с хроматином факторы, ассоциированные с транскрибируемыми генами.

После преодоления начального нуклеосомного барьера (возможно, с помощью второго РНКП2-комплекса и факторов, перечисленных выше) РНКП2 может осуществлять, со скоростью порядка 3–4 т.п.н. в минуту [11, 12], дальнейшую транскрипцию, которая также требует участия ряда факторов, таких как АТР-зависимые хроматиновые ремоделеры, факторы транскрипции, гистоновые шапероны, ферменты модификации гистонов [49, 50]. Шапероны гистонов FACT и Asf1 ассоциированы с транскрибируемыми генами и облегчают нуклеосомную сборку-разборку во время элонгации [59, 80]. Ацетилирование гистонов способствует транскрипции хроматина и транскрипционно-зависимому обмену гистонов, в то время как метилирование приводит к связыванию деацетилаз гистонов и восстановлению неактивного состояния хроматина после транскрипции [49, 81, 82]. Ацетилтрансферазы PCAF и E1p3, которые модифицируют гистоновые “хвосты”, специфически взаимодействуют с элонгирующей фосфорилированной формой РНКП2 [50, 83], NuA3 взаимодействует с элонгационным фактором FACT как *in vitro*, так и *in vivo* [84]. Убиквитинилирование H2B и присутствие фермента ремоделирования хроматина CHD1 необходимо для привлечения белкового фактора Spt16 к транскрибируемым генам, для эффективной транскрипции РНКП2 и сборки нукле-

осом [85–87]. Кроме того, ацетилированный H3K56 ассоциирован с транскрибирующей РНКП2 [88].

Описанные выше факторы, вместе с РНКП2, участвуют в нескольких – вероятных – вариантах развития событий при транскрипции генов *in vivo* (рис. 8). При низком и умеренном уровне транскрипции единичными молекулами фермента (пространственно разделенными на большие расстояния) процесс сопровождается временным вытеснением/заменой димера(ов) H2A/H2B [24–25] и сохранением нуклеосом в виде гексасом в результате формирования небольших внутринуклеосомных петель ДНК (часть (2), рис. 8). Затем димер H2A/H2B связывается с гексасомой, и исходная структура нуклеосомы восстанавливается до начала транскрипции этого участка хроматина следующим комплексом РНКП2. Известно, что в гистонах H3/H4 содержится большинство посттрансляционных модификаций, включая некоторые эпигенетические метки. Таким образом, механизм транскрипции РНКП2-типа обеспечивает сохранение исходных гистонов H3/H4 и их ковалентных модификаций в процессе транскрипции. Поскольку практически весь эукариотический геном транскрибируется с определенной частотой, возможно, этот механизм транскрипции может служить основой сохранения “гистонового” кода.

При высоком уровне транскрипции расстояние между транскрибирующими комплексами РНКП2 становится короче, и они встречают гексасомы, в которых отсутствует димер H2A/H2B (часть 3, рис. 8). В этом случае образуется нестабильный интермедиат с меньшим количеством ДНК-гистоновых контактов, что приводит к вытеснению с ДНК и обмену всех гистонов [21–26, 69, 70]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизм транскрипции в хроматине РНКП2-типа консервативен у разных видов организмов — от дрожжей до человека — и представляет собой четкую регулируемую последовательность временных нарушений-восстановлений ДНК-гистоновых и гистон-гистоновых взаимодействий. Нарушение этих процессов и необратимая потеря нуклеосом приводят к снижению жизнеспособности клеток и часто наблюдаются при развитии патологических процессов [33–36]. В связи с этим изучение и понимание детального механизма транскрипции в хроматине представляет интерес не только с позиций фундаментальной науки, но имеет и важнейшее практическое значение для разработки новых лекарственных препаратов, которые могут найти применение в терапии опухолевых и возрастных заболеваний.

Работа получила финансовую поддержку Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы” (Государственный контракт № 14.512.11.0028) и Национального Института Здоровья США (RO1 GM058650).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Thuriaux P., Sentenac A. 1992. Molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: Gene expression. Eds Jones E.W., Pringle J.R., Broach J.R. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. **2**, 1–8.
- Gnatt A.L., Cramer P., Fu J., Bushnell D.A., Kornberg R.D. 2001. Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science*. **292**, 1876–882.
- Boeger H., Griesenbeck J., Kornberg R.D. 2008. Nucleosome retention and the stochastic nature of promoter chromatin remodeling for transcription. *Cell*. **133**, 716–726.
- Kim H.D., O’Shea E.K. 2008. A quantitative model of transcription factor activated gene expression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 1192–1198.
- Lam F.H., Steger D.J., O’Shea E.K. 2008. Chromatin decouples promoter threshold from dynamic range. *Nature*. **453**, 246–250.
- Petes S.J., Lis J.T. 2008. Rapid, transcription-independent loss of nucleosomes over a large chromatin domain at *Hsp70* loci. *Cell*. **134**, 74–84.
- Whitehouse I., Rando O.J., Delrow J., Tsukiyama T. 2007. Chromatin remodelling at promoters suppresses antisense transcription. *Nature*. **450**, 1031–1035.
- Zhao X., Pendergrast P.S., Hernandez N. 2001. A positioned nucleosome on the human U6 promoter allows recruitment of SNAPc by the Oct1 POU domain. *Mol. Cell*. **7**, 539–549.
- Guenther M.G., Levine S.S., Boyer L.A., Jaenisch R., Young R.A. 2007. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell*. **130**, 77–88.
- Zeitlinger J., Stark A., Kellis M., Hong J.W., Nechaev S., Adelman K., Levine M., Young R.A. 2007. RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Nat. Genet.* **39**, 1512–1516.
- Mavrich T.N., Jiang C., Ioshikhes I.P., et al. 2008. Nucleosome organization in the *Drosophila* genome. *Nature*. **453**, 358–362.
- Churchman L.S., Weissman J.S. 2011. Nascent transcript sequencing visualizes transcription at nucleotide resolution. *Nature*. **469**, 368–373.
- Gilchrist D.A., Dos Santos G., Fargo D.C., Xie B., Gao Y., Li L., Adelman K. 2010. Pausing of RNA polymerase II disrupts DNA-specified nucleosome organization to enable precise gene regulation. *Cell*. **143**, 540–551.
- Singh J., Padgett R.A. 2009. Rates of *in situ* transcription and splicing in large human genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1128–1133.
- Cheng B., Price D.H. 2007. Properties of RNA polymerase II elongation complexes before and after the P-TEFb-mediated transition into productive elongation. *J. Biol. Chem.* **282**, 21901–21912.
- Izban M.G., Luse D.S. 1992. Factor-stimulated RNA polymerase II transcribes at physiological elongation rates on naked DNA but very poorly on chromatin templates. *J. Biol. Chem.* **267**, 13647–13655.
- Kristjuhan A., Svejstrup J.Q. 2004. Evidence for distinct mechanisms facilitating transcript elongation through chromatin *in vivo*. *EMBO J.* **23**, 4243–4252.
- Lee C.K., Shibata Y., Rao B., Strahl B.D., Lieb J.D. 2004. Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nat. Genet.* **36**, 900–905.
- Schwabish M.A., Struhl K. 2004. Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 10111–10117.
- Zhao J., Herrera-Diaz J., Gross D.S. 2005. Domain-wide displacement of histones by activated heat shock factor occurs independently of Swi/Snf and is not correlated with RNA polymerase II density. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 8985–8999.
- Wirbelauer C., Bell O., Schubeler D. 2005. Variant histone H3.3 is deposited at sites of nucleosomal displacement throughout transcribed genes while active histone

- modifications show a promoter-proximal bias. *Genes Dev.* **19**, 1761–1766.
22. Schwartz B.E., Ahmad K. 2005. Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes Dev.* **19**, 804–814.
 23. Thiriet C., Hayes J.J. 2005. Replication-independent core histone dynamics at transcriptionally active loci *in vivo*. *Genes Dev.* **19**, 677–582.
 24. Dion M.F., Kaplan T., Kim M., Buratowski S., Friedman N., Rando O.J. 2007. Dynamics of replication-independent histone turnover in budding yeast. *Science*. **315**, 1405–1408.
 25. Rufiange A., Jacques P.E., Bhat W., Robert F., Nourani A. 2007. Genome-wide replication-independent histone H3 exchange occurs predominantly at promoters and implicates H3 K56 acetylation and Asf1. *Mol. Cell.* **27**, 393–405.
 26. Jamai A., Imoberdorf R.M., Strubin M. 2007. Continuous histone H2B and transcription-dependent histone H3 exchange in yeast cells outside of replication. *Mol. Cell.* **25**, 345–355.
 27. Nacheva G.A., Guschin D.Y., Preobrazhenskaya O.V., Karpov V.L., Ebralidse K.K., Mirzabekov A.D. 1989. Change in the pattern of histone binding to DNA upon transcriptional activation. *Cell.* **58**, 27–36.
 28. Jiang C., Pugh B.F. 2009. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 161–172.
 29. Chen T.A., Allfrey V.G. 1987. Rapid and reversible changes in nucleosome structure accompany the activation, repression, and superinduction of murine fibroblast protooncogenes *c-fos* and *c-myc*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 5252–5256.
 30. Chen T.A., Smith M.M., Le S.Y., Sternglanz R., Allfrey V.G. 1991. Nucleosome fractionation by mercury affinity chromatography. Contrasting distribution of transcriptionally active DNA sequences and acetylated histones in nucleosome fractions of wild-type yeast cells and cells expressing a histone H3 gene altered to encode a cysteine 110 residue. *J. Biol. Chem.* **266**, 6489–6498.
 31. Prior C.P., Cantor C.R., Johnson E.M., Littau V.C., Allfrey V.G. 1983. Reversible changes in nucleosome structure and histone H3 accessibility in transcriptionally active and inactive states of rDNA chromatin. *Cell.* **34**, 1033–1042.
 32. Walia H., Chen H.Y., Sun J.M., Holth L.T., Davie J.R. 1998. Histone acetylation is required to maintain the unfolded nucleosome structure associated with transcribing DNA. *J. Biol. Chem.* **273**, 14516–14522.
 33. Martens J.A., Wu P.Y., Winston F. 2005. Regulation of an intergenic transcript controls adjacent gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **19**, 2695–2704.
 34. Feser J., D.T., Das C., Carson J.J., Kieft J., Harkness T., Tyler J.K. 2010. Elevated histone expression promotes life span extension. *Mol. Cell.* **39**, 724–735.
 35. Ljungman M., Hanawalt P.C. 1992. Efficient protection against oxidative DNA damage in chromatin. *Mol. Carcinog.* **5**, 264–269.
 36. Enright H.U., Miller W.J., Hebbel R.P. 1992. Nucleosomal histone protein protects DNA from iron-mediated damage. *Nucl. Acids Res.* **20**, 3341–3346.
 37. Bondarenko V.A., Steele L.M., Ujvari A., Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Polikanov Y.S., Luse D.S., Studitsky V.M. 2006. Nucleosomes can form a polar barrier to transcript elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell.* **24**, 469–479.
 38. Muthurajan U.M., Bao Y., Forsberg L.J., Edayathumangalam R.S., Dyer P.N., White C.L., Luger K. 2004. Crystal structures of histone Sin mutant nucleosomes reveal altered protein-DNA interactions. *EMBO J.* **23**, 260–271.
 39. Hsieh F.K., Fisher M., Ujvari A., Studitsky V.M., Luse D.S. 2010. Histone Sin mutations promote nucleosome traversal and histone displacement by RNA polymerase II. *EMBO Rep.* **11**, 705–710.
 40. Hall M.A., Shundrovsky A., Bai L., Fulbright R.M., Lis J.T., Wang M.D. 2009. High-resolution dynamic mapping of histone-DNA interactions in a nucleosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 124–129.
 41. Kulaeva O.I., Gaykalova D.A., Pestov N.A., Golovastov V.V., Vassilyev D.G., Artsimovitch I., Studitsky V.M. 2009. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1272–1278.
 42. Studitsky V.M., Clark D. J., Felsenfeld G. 1995. Overcoming a nucleosomal barrier to transcription. *Cell.* **83**, 19–27.
 43. Studitsky V.M., Clark D.J., Felsenfeld G. 1994. A histone octamer can step around a transcribing polymerase without leaving the template. *Cell.* **76**, 371–382.
 44. Bednar J., Studitsky V.M., Grigoryev S.A., Felsenfeld G., Woodcock C.L. 1999. The nature of the nucleosomal barrier to transcription: direct observation of paused intermediates by electron cryomicroscopy. *Mol. Cell.* **4**, 377–386.
 45. Studitsky V.M., Kassavetis G.A., Geiduschek E.P., Felsenfeld G. 1997. Mechanism of transcription through the nucleosome by eukaryotic RNA polymerase. *Science.* **278**, 1960–1963.
 46. Студитский В.М., Орловский И.В., Чертков О.В., Ефимова Н.С., Логинова М.А., Кулаева О.И. 2012. Молекулярные механизмы транскрипции хроматина РНК-полимеразой 3. Часть 1. *Вестник Московского университета, Сер. 16. Биология.* **3**, 6–11
 47. Студитский В.М., Орловский И.В., Чертков О.В., Ефимова Н.С., Логинова М.А., Кулаева О.И. 2012. Молекулярные механизмы транскрипции хроматина РНК-полимеразой 3. Часть 2. *Вестник Московского университета, Сер. 16. Биология.* **4**, 10–16.
 48. Kireeva M.L., Walter W., Tchernajenko V., Bondarenko V., Kashlev M., Studitsky V.M. 2002. Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription. *Mol. Cell.* **9**, 541–552.

49. Selth L.A., Sigurdsson S., Svejstrup J.Q. 2010. Transcript elongation by RNA Polymerase II. *Annu Rev Biochem.* **79**, 271–293.
50. Wittschleben B.O., Otero G., de Bizemont T., Fellows J., Erdjument-Bromage H., Ohba R., Li Y., Allis C.D., Tempst P., Svejstrup J.Q. 1999. A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol. Cell.* **4**, 123–128.
51. Belotserkovskaya R., Oh S., Bondarenko V.A., Orphanides G., Studitsky V.M., Reinberg D. 2003. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science.* **301**, 1090–1093.
52. Wittmeyer J., Formosa T. 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase alpha catalytic subunit interacts with Cdc68/Spt16 and with Pob3, a protein similar to an HMG1-like protein. *Mol. Cell Biol.* **17**, 4178–4190.
53. Orphanides G., LeRoy G., Chang C.H., Luse D.S., Reinberg D. 1998. FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell.* **92**, 105–116.
54. Orphanides G., Wu W.H., Lane W.S., Hampsey M., Reinberg D. 1999. The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature.* **400**, 284–288.
55. Stuwe T., Hothorn M., Lejeune E., Rybin V., Bortfeld M., Scheffzek K., Ladurner A.G. 2008. The FACT Spt16 “peptidase” domain is a histone H3-H4 binding module. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 8884–8889.
56. Winkler D.D., Luger K. 2011. The histone chaperone FACT: structural insights and mechanisms for nucleosome reorganization. *J. Biol. Chem.* **286**, 18369–18374.
57. Winkler D.D., Muthurajan U.M., Hieb A.R., Luger K. 2011. Histone chaperone FACT coordinates nucleosome interaction through multiple synergistic binding events. *J. Biol. Chem.* **286**, 41883–41892.
58. Ujvari A., Hsieh F.K., Luse S.W., Studitsky V.M., Luse D.S. 2008. Histone N-terminal tails interfere with nucleosome traversal by RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **283**, 32236–32243.
59. Saunders A., Werner J., Andrulis E.D., Nakayama T., Hirose S., Reinberg D., Lis J.T. 2003. Tracking FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin *in vivo*. *Science.* **301**, 1094–1096.
60. Mason P.B., Struhl K. 2003. The FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation *in vivo*. *Mol. Cell Biol.* **23**, 8325–8333.
61. Cheung V., Chua G., Batada N.N., Landry C.R., Michnick S.W., Hughes T.R., Winston F. 2008. Chromatin- and transcription-related factors repress transcription from within coding regions throughout the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *PLoS Biol.* **6**, e277.
62. Reinberg D.S.R. 2006. de FACTo nucleosome dynamics. *J. Biol. Chem.* **281**, 23297–23301.
63. McCullough L., Rawlins R., Olsen A., Xin H., Stillman D.J., Formosa T. 2011. Insight into the mechanism of nucleosome reorganization from histone mutants that suppress defects in the FACT histone chaperone. *Genetics.* **188**, 835–846.
64. Xin H., Takahata S., Blanksma M., McCullough L., Stillman D.J., Formosa T. 2009. yFACT induces global accessibility of nucleosomal DNA without H2A-H2B displacement. *Mol. Cell.* **35**, 365–376.
65. Hsieh F.K., Kulaeva O.I., Patel S.S., Dyer P.N., Luger K., Reinberg D., Studitsky V.M. 2013. Mechanism of FACT action during Pol II transcription through chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 7654–7659.
66. Walter W., Kireeva M.L., Studitsky V.M., Kashlev M. 2003. Bacterial polymerase and yeast polymerase II use similar mechanisms for transcription through nucleosomes. *J. Biol. Chem.* **278**, 36148–36156.
67. Kulaeva O.I., Hsieh F.K., Studitsky V.M. 2010. RNA polymerase complexes cooperate to relieve the nucleosomal barrier and evict histones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 11325–11330.
68. Jin J., Bai L., Johnson D.S., Fulbright R.M., Kireeva M.L., Kashlev M., Wang M.D. 2010. Synergistic action of RNA polymerases in overcoming the nucleosomal barrier. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 745–752.
69. Deal R.B., Henikoff J.G., Henikoff S. 2010. Genome-wide kinetics of nucleosome turnover determined by metabolic labeling of histones. *Science.* **328**, 1161–1164.
70. Katan-Khaykovich Y., Struhl K. 2011. Splitting of H3-H4 tetramers at transcriptionally active genes undergoing dynamic histone exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 1296–1301.
71. Core L.J., Lis J.T. 2008. Transcription regulation through promoter-proximal pausing of RNA polymerase II. *Science.* **319**, 1791–1792.
72. Price D.H. 2008. Poised polymerases: on your mark...get set...go! *Mol. Cell.* **30**, 7–10.
73. Nechaev S., Adelman K. 2008. Promoter-proximal Pol II: when stalling speeds things up. *Cell Cycle.* **7**, 1539–1544.
74. Gilmour D.S. 2009. Promoter proximal pausing on genes in metazoans. *Chromosoma.* **118**, 1–10.
75. Adelman J.T.L. 2012. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in *K. metazoans*. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 720–731.
76. Muse G.W., Gilchrist D.A., Nechaev S., Shah R., Parker J.S., Grissom S.F., Zeitlinger J., Adelman K. 2007. RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nat. Genet.* **39**, 1507–1511.
77. Epshtein V., Nudler E. 2003. Cooperation between RNA polymerase molecules in transcription elongation. *Science.* **300**, 801–805.
78. Epshtein V., Toulme F., Rahmouni A.R., Borukhov S., Nudler E. 2003. Transcription through the roadblocks: the role of RNA polymerase cooperation. *EMBO J.* **22**, 4719–4727.
79. Gaykalova D.A., Vivekananthan N., Bondarenko V.A., Bartholomew B., Clark D.J., Studitsky V.M. 2010. A polar barrier to transcription is circumvented by re-

- modeller-induced nucleosome translocation. *Nucl. Acids Res.* **39**, 3520–3528.
80. Schwabish M.A., Struhl K. 2006. Asf1 mediates histone eviction and deposition during elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell.* **22**, 415–422.
81. Carrozza M.J., Li B., Florens L., Suganuma T., Swanson S.K., Lee K.K., Shia W.J., Anderson S., Yates J., Washburn M.P., Workman J.L. 2005. Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell.* **123**, 581–592.
82. Workman J.L. 2006. Nucleosome displacement in transcription. *Genes Dev.* **20**, 2009–2017.
83. Cho H., Orphanides G., Sun X., Yang X.J., Ogryzko V., Lees E., Nakatani Y., Reinberg D. 1998. A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5355–5363.
84. John S., Howe L., Tafrov S.T., Grant P.A., Sternglanz R., Workman J.L. 2000. The something about silencing protein, Sas3, is the catalytic subunit of NuA3, a yTAF(II)30-containing HAT complex that interacts with the Spt16 subunit of the yeast CP (Cdc68/Pob3)-FACT complex. *Genes Dev.* **14**, 1196–11208.
85. Fleming A.B., Kao C.F., Hillyer C., Pikaart M., Osley M.A. 2008. H2B ubiquitylation plays a role in nucleosome dynamics during transcription elongation. *Mol. Cell.* **31**, 57–66.
86. Pavri R., Zhu B., Li G., Trojer P., Mandal S., Shilatifard A., Reinberg D. 2006. Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell.* **125**, 703–717.
87. Lee J.S., Garrett A.S., Yen K., Takahashi Y.H., Hu D., Jackson J., Seidel C., Pugh B.F., Shilatifard A. 2012. Codependency of H2B monoubiquitination and nucleosome reassembly on Chd1. *Genes Dev.* **26**, 914–919.
88. Schneider J., Bajwa P., Johnson F.C., Bhaumik S.R., Shilatifard A. 2006. Rtt109 is required for proper H3K56 acetylation: a chromatin mark associated with the elongating RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **281**, 37270–37274.

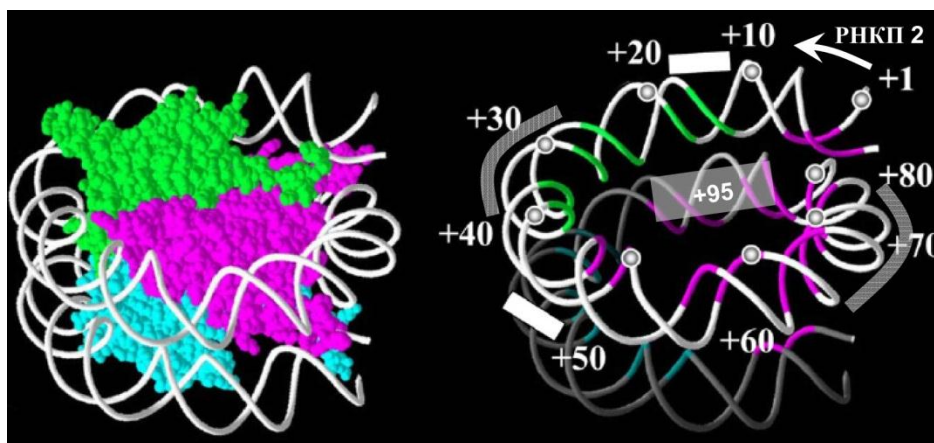


Рис. 1. Позиции нуклеосом-специфичных барьеров (белые линии), препятствующих транскрипции ДНК РНК-полимеразой 2 в структуре кор-нуклеосом. ДНК-гистоновые взаимодействия, влияющие на высоту этих барьеров, указаны серыми линиями. Структура кор-нуклеосом показана слева и ход нуклеосомной ДНК – справа. Н3/Н4-тетрамер выделен фиолетовым цветом, и Н2А/Н2В-димеры – зеленым и голубым. Участки взаимодействия гистонов и ДНК показаны соответствующими цветами (справа). Направление траскрипции указано стрелкой. Взаимодействия в областях (+35), (+70) и (+95) определяют высоты (+15)-, (+45)- и (+45)-барьеров соответственно.

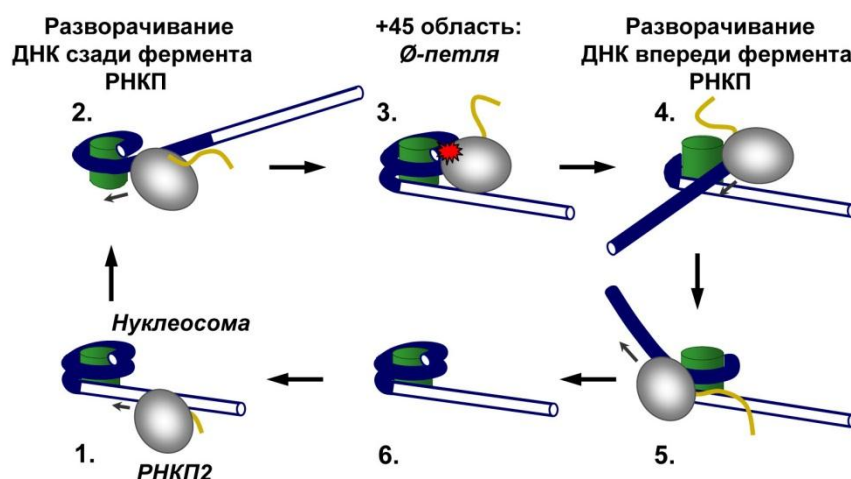


Рис. 2. Механизм транскрипции нуклеосом РНК-полимеразой 2. Комплекс 1: РНКП2 – серый овал; октамер гистонов – зеленый цилиндр; маленькие стрелки указывают направление транскрипции. Комплекс 2: РНКП2 приближается к нуклеосоме, происходит частичное разворачивание ДНК, находящейся за ферментом, от октамера. Комплекс 3: по мере дальнейшего продвижения РНКП2 встречается сильные ДНК-гистоновые взаимодействия. Происходит формирование внутринуклеосомной Ø-петли ДНК, которая способствует сохранению гистонов на матрице и разворачиванию ДНК, находящейся перед ферментом. Комплекс 4: разворачивание ДНК и продолжение транскрипции. Комплекс 5: завершение транскрипции через нуклеосому, восстановление ДНК-гистоновых контактов после прохождения фермента и восстановление нуклеосом в первоначальной позиции на ДНК (комплекс 6). Временное удаление димера гистонов Н2А/Н2В не показано.

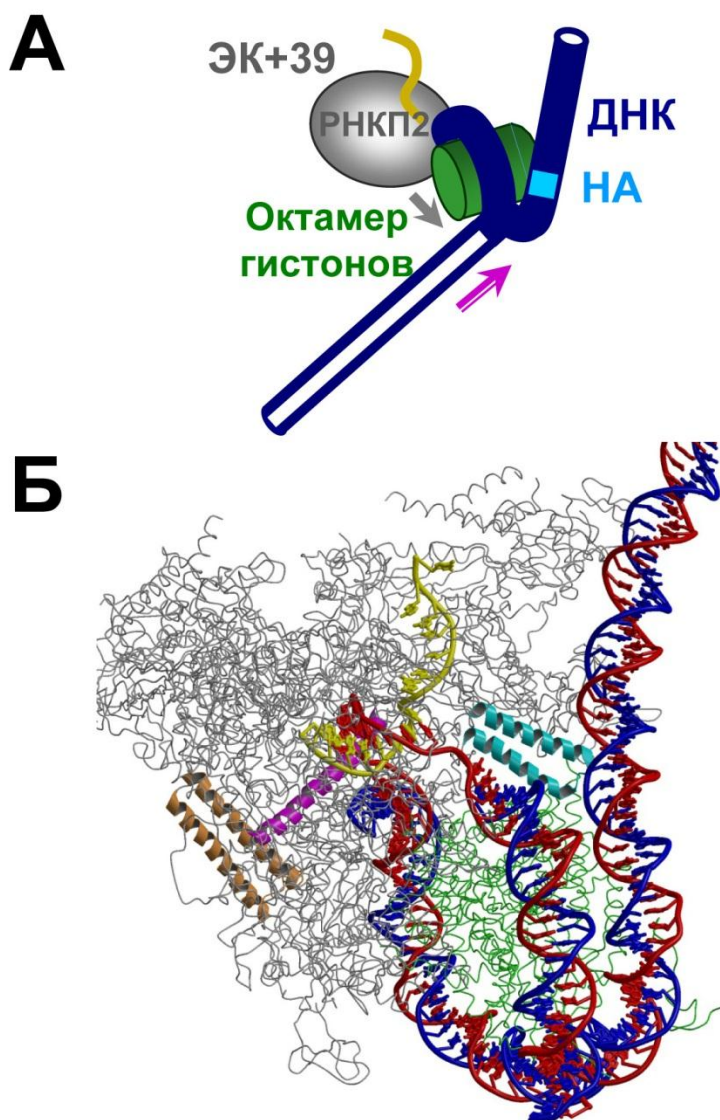


Рис. 3. Модель внутринуклеосомной \emptyset -петли ДНК, содержащей РНКП2. *а* – Элонгационный комплекс ЭК(+39), формирующийся после транскрипции 39 пар нуклеотидов нуклеосомной ДНК. ДНК-гистоновые контакты, характерные для интактной нуклеосомы (в состоянии до транскрипции), формируются перед и за транскрибирующим ферментом, образуя \emptyset -петлю. Участок нуклеосомной ДНК длиной 50 п.н. диссоциирует с поверхности октамера. Розовая и серая стрелки указывают на проксимальную к промотору границу нуклеосомы и направление транскрипции соответственно. НА – участок нуклеосомной ДНК, афинность которого к октамеру гистонов в значительной степени определяет высоту (+45)-нуклеосомного барьера. *б* – Совмещали структуры нуклеосомы и дрожжевого элонгационного комплекса РНКП2 (идентификаторы по базе PDB 1a0i и 1y1w) с активным сайтом в позиции (+39). Матричная ДНК, комплементарная матричной цепи ДНК и РНК даны красным, синим и желтым цветами соответственно.

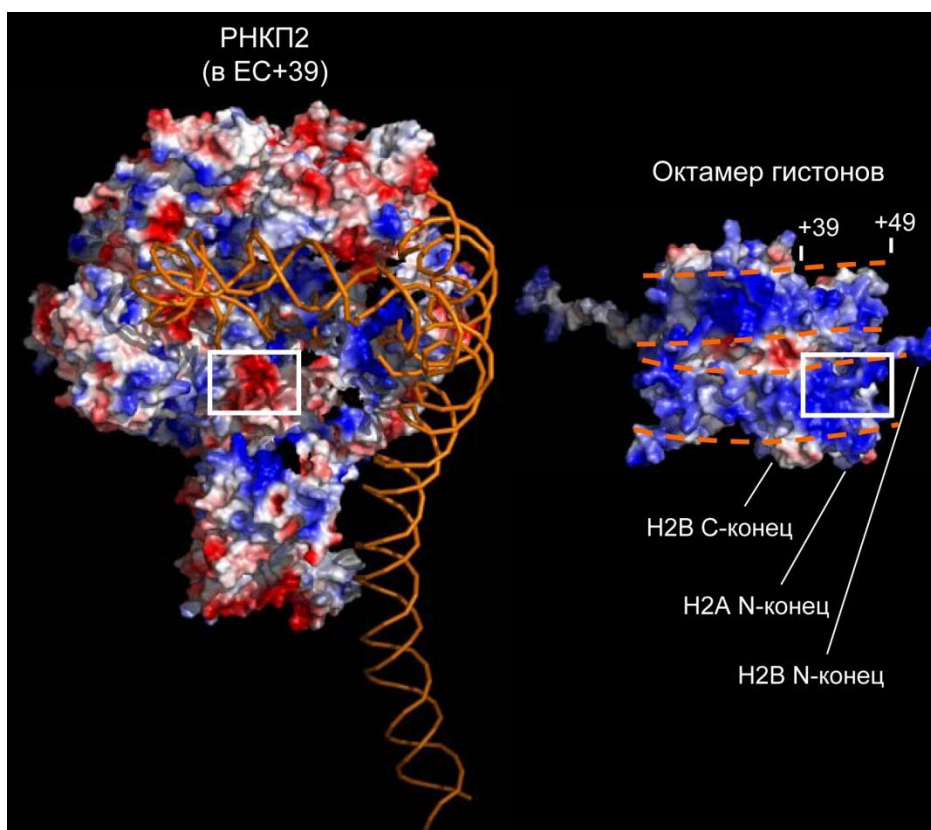


Рис. 4. Распределение зарядов на контактирующих поверхностях РНКП2 и октамера гистонов в модели элонгационного комплекса ЕС(+39). Показаны контактирующие поверхности РНКП2 в комплексе ЕС(+39) (слева, гистоновый октамер не показан) и гистонового октамера (справа). Наиболее темные области синего цвета и наиболее темные области красного цвета соответствуют значениям потенциала 82.3 кТ/е и -82.3 кТ/е соответственно. Области, имеющие противоположные электростатические заряды и находящиеся в непосредственной близости в элонгационном комплексе ЕС(+39), обведены прямоугольниками. ДНК (слева) и местоположение ДНК в составе интактной нуклеосомы (справа) даны оранжевым цветом. Отмечены позиции (+39) и (+49) на нуклеосомной ДНК и положения некоторых N-концевых «хвостов» гистонов. Использованы структуры РНКП2 и нуклеосомы (идентификаторы по базе PDB 1a0i и 1y1w).