

КОРРЕЛЯЦИЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ КОМПЛЕКСОВ КОГЕЗИИ СЕСТРИНСКИХ ХРОМАТИД С РАЗЛИЧНЫМИ МОДИФИКАЦИЯМИ ГИСТОНОВ H3 И H4

© А. В. Марков,^{1,*} А. А. Захаров,¹ Н. С. Родионова,¹ А. А. Михайлуца,¹
А. В. Струнников,² А. Ф. Смирнов¹

¹ Кафедра генетики и селекции С.-Петербургского государственного университета
и ² National Institute of Health, NICHD, Unit of Chromosome Structure and Function, Bethesda, USA;
* e-mail: markov@mail.ru

Открытие «гистонового кода» повлекло за собой активные исследования по выявлению роли модификаций гистонов и других надмолекулярных факторов укладки ДНК в регуляции транскрипционной активности. В работе проведен анализ локализации гистонов H3, метилированных по лизинам в 9, 36 и 79-м положениях, гиперацетилированного гистона H4 и субъединицы когезинового комплекса DRAD21 относительно компактизации хроматина политенных хромосом *Drosophila melanogaster*. Предложена гипотеза каскадной регуляции транскрипционной активности, определяемой модификациями гистонов, и адаптивной роли когезии сестринских хроматид в транскрипции высокоактивных и протяженных генов.

Ключевые слова: когезия, гистон, гистоновый код, транскрипция, политенные хромосомы, дрозофила.

В настоящее время показано, что наряду с сигнальной регуляцией генной экспрессии большое влияние на активность хроматина оказывает его структурное состояние. Одним из наиболее изученных аспектов укладки ДНК в ядре является модифицирование коровых гистонов, играющее определяющую роль в структурно-функциональных перестройках хроматина. Для всех четырех коровых гистонов известно тринадцать ацетилируемых лизиновых точек на N-терминальных участках («хвосты») (Roth, 2001). Три сериновых остатка гистонов H2A, H3 и H4 в определенных состояниях способны фосфорилироваться (Cheung, 2000; Thomson, 1999). Шесть лизиновых и три аргининовых аминокислотных остатка гистонов H3 и H4 могут быть метилированы (Murray, 1964; Chen et al., 1999; Strahl et al., 1999), а два на C-терминальных концах гистонов H2A и H2B — убиквитинированы (Giannattasio et al., 2005; Jason et al., 2005). Многие из этих модификаций осуществляются ферментами, взаимодействующими с ДНК-связывающимися белками. Определенные сочетания модифицированных гистонов связаны с функциональным состоянием хроматина и определяют его. Так, например, гиперацетилирование гистонов, как правило, связывают с транскрипционно активным хроматином, находящимся в декомпактизованном состоянии (Zlatanova et al., 2000), тогда как метилирование по Lys9 и Lys27 гистона H3 и Lys20 гистона H4 коррелирует с транскрипционно молчащими участками, как правило гетерохроматизирующимися. Однако метилирование гистона H3 по лизинам в 4, 36 и 79-м положениях ассоциировано с активной транскрипцией (Zhang, Reinberg, 2001; Li et al., 2002; Ng et al., 2003; Sims et al., 2003). Важно отметить, что для конкретных областей хромосом в определенный момент времени характерна та или иная комбинация гистоновых модификаций (Sedkov et al., 2003; Schneider et al., 2004).

В ходе исследований этого явления стало ясно, что пост-трансляционные модификации нуклеосомных гистонов занимают важнейшее место в функциональной организации хроматина, влияя на активность биохимических процессов, а сочетания модификаций были названы «гистоновым кодом» (Turner, 2000; Fishle et al., 2003).

Политенные хромосомы — удобный объект для цитологического выявления транскрипционно активных районов — пuffed, описания участков нарушений когезии и синапсиса гомологов, иммуноцитофлуоресцентной локализации белков. В частности, на политенных хромосомах удалось проследить распределение одного из компонентов когезинового комплекса белка DRAD21p и обнаружить неравномерность его распределения — привязанность к междисковым участкам и его присутствие в пuffed (рис. 1, а, б) (Марков и др., 2003).

В представленной работе нами предпринята попытка описания закономерностей распределения с помощью антител ряда вариантов гистонов (H3-K36(Met), H3-K79(Met), H3-K9(Met) и H4-K4,7,10,12(Ac)) по политенным хромосомам *Drosophila melanogaster* в целях сопоставления с ранее описанными закономерностями местоположения белка DRAD21p и транскрипционной активности хроматина.

Материал и методика

Для приготовления препаратов политенных хромосом использовали слюнные железы. Выделение органов проводили в растворе Эфрусси-Бидла. Замораживали препарат в жидком азоте. Скальвали покровное стекло и помещали препараты в 1×раствор фосфатного буфера (PBS) на 5—20 мин, после чего незамедлительно использовали

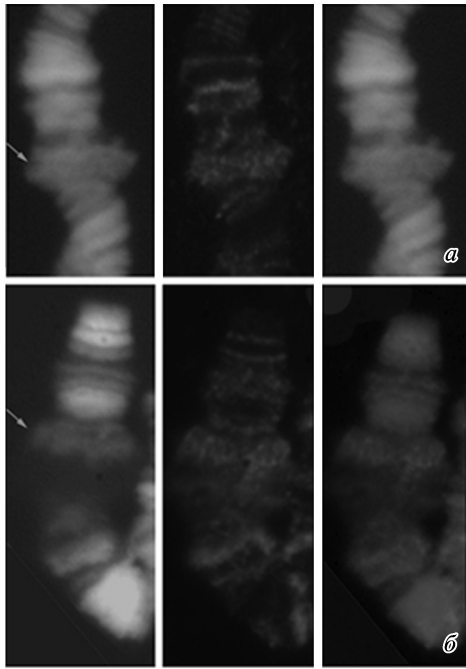


Рис. 1. Результат иммуноокрашивания политенных хромосом *Drosophila melanogaster* антителами к белку DRAD21.

Слева — хроматин, связанный с DAPI; в центре — антитела к DRAD21p; справа — совмещенные изображения. Стрелками отмечены районы конститутивных пухов. а) район 68В 3L плеча, б) район 2В X-хромосомы.

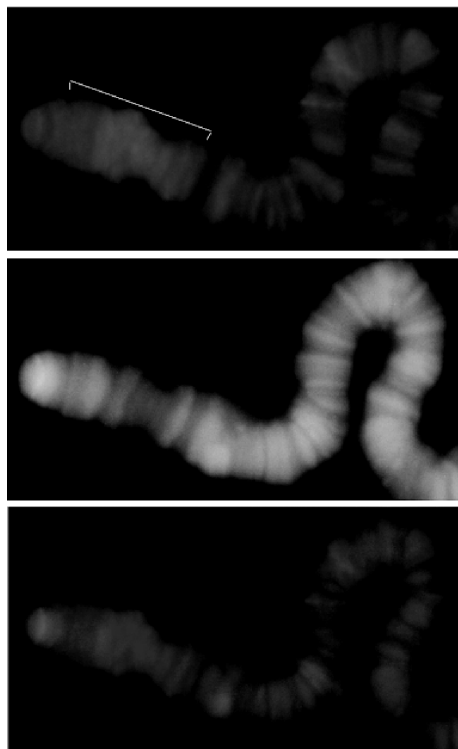


Рис. 2. Результат иммуноокрашивания политенных хромосом *Drosophila melanogaster* антителами к гистону H3-K36(Met).

Сверху — антитела к H3-K36(Met)p; в центре — хроматин, связанный с DAPI; снизу — совмещенные изображения. Скобкой отмечен район перекрытия данной модификацией гистона нескольких областей политенных хромосом.

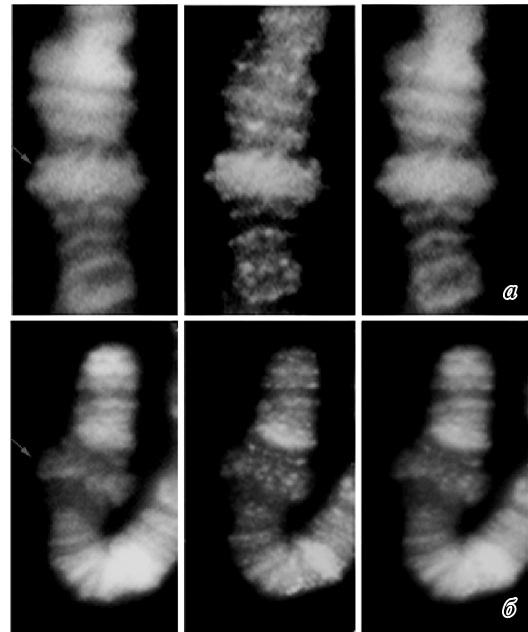


Рис. 3. Результат иммуноокрашивания политенных хромосом *Drosophila melanogaster* антителами к гистону H3-K79(Met).

Слева — хроматин, связанный с DAPI; в центре — антитела к H3-K79(Met)p; справа — совмещенные изображения. Стрелками отмечены районы конститутивных пухов. а) район 68В 3L плеча, б) район 2В X-хромосомы.

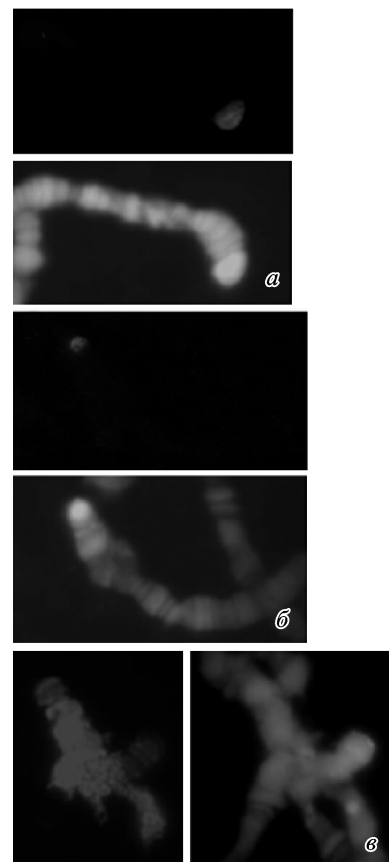


Рис. 4. Результат иммуноокрашивания политенных хромосом *Drosophila melanogaster* антителами к гистону H3-K9(Met).

а) плечо 2R. Сверху — антитела к H3-K9(Met)p; снизу — хроматин, связанный с DAPI. б) X-хромосома. Сверху — антитела к H3-K9(Met)p; снизу — хроматин, связанный с DAPI. в) хромоцентр. Слева — антитела к H3-K9(Met)p; справа — хроматин, связанный с DAPI.

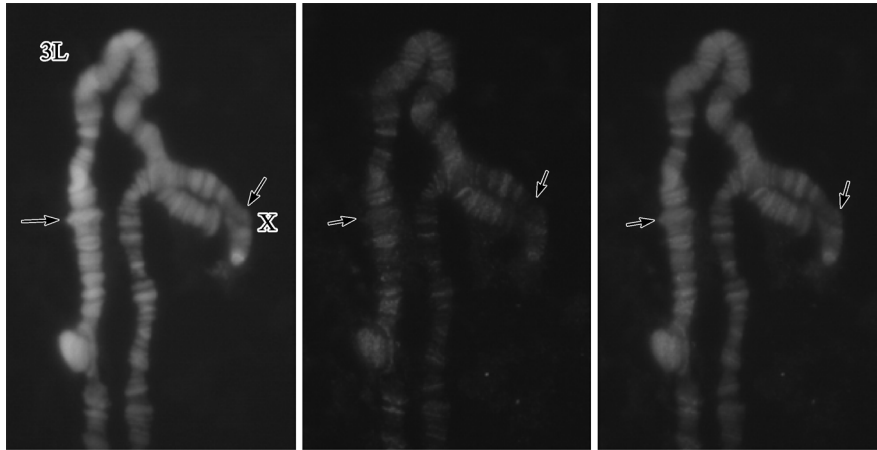


Рис. 5. Результат иммуноокрашивания политенных хромосом *Drosophila melanogaster* антителами к гиперацетилованному гистону H4-K4,7,10,12(Ac).

Снизу — хроматин, связанный с DAPI; в центре — антитела к H4-K4,7,10,12(Ac); сверху — совмещенные изображения. Стрелками отмечены районы конститутивных пuffed.

для иммуноокрашивания. Для иммуноокрашивания использовали кроличьи моноклональные антитела к гистонам диметил H3-K79, H3-R26, гиперацетилованному гистону H4, антидиметил Arg17-H3, антидиметил K9-H3 и антидиметил K76-H3 (Upstate Biotechnology, США).

Детекцию проводили с помощью стандартных антител к тяжелой цепи кроличьих IgM, связанных с флуорохромом AlexaFluor594 или Cy3. Антитела разводили в 1×PBS, содержащем 1% БСА (бычий сывороточный альбумин), в соотношении антител к раствору как 1 : 300 для политенных хромосом. Промывали препараты в 1×PBS, содержащем 1% Triton X-100, в течение 10 мин.

Забивку проводили 1%-ным БСА в 1×PBS в течение 30 мин при 25 °С. С 20 мкл АТ1 препараты инкубировали во влажной камере при 4 °С в течение ночи (12—16 ч). Промывали в 1×PBS 3 раза по 5 мин. Нанесли по 20 мкл АТ2, инкубировали во влажной камере в течение 1 ч и промывали в 1×PBS 3 раза по 5 мин. Наносили краситель DAPI и через 5 мин промывали препараты в 1×PBS. Закрывали в Vectashield-1000 (Vector, США).

В качестве маркера комплекса когезии использовали белок DRAD21, который является связывающей субъединицей двух ДНК-связывающихся субкомплексов белков (Марков и др., 2003).

Анализ препаратов проводили на люминесцентном микроскопе ЛЮМАМ-И-3 со специальным набором светофильтров, оборудованном черно-белой CCD-камерой, подключенной к компьютеру. Запись изображения осуществляли с помощью программы VideoTesT FISH (Иста Видео-Тест, Россия).

Результаты

Локализация гистона H3, метилированного по лизину в 36-м положении, показала, что ширина полос окрашивания часто захватывает несколько дисков и междисков (рис. 2). Однако следует отметить несомненное дискретное распределение данной модификации гистона H3 по политенным хромосомам. При этом H3-K36(Met) присутствует в большинстве междисков и наименее компактизованных диска и, как правило, не выявляется в плотных. Анализ локализации H3-K36(Met) в наименее компактизованных областях показал, что $75.0 \pm 2.3\%$ всех проанализированных междисков содержат данный тип гистонов.

Иммуноокрашивание политенных хромосом антителами к гистону H3 с метилированным лизином в 79-м положении показало, что данная модификация гистона присутствует исключительно в дисках, практически не выявляясь в областях междисков (рис. 3, а). Анализ пuffed-областей в районах как с индуцируемой транскрипцией, так и с конститутивной (рис. 3, б) показал, что в транскрипционно активных политенных хромосомах наблюдается совпадение локализации когезиновых комплексов с модифицированным гистонами H3.

Для гистона H3 с метилированным лизином в 9-м положении показано связывание с крупными блоками конститутивного гетерохроматина, расположенными в теломерных участках хромосом и в хромоцентре (рис. 4).

В результате иммуноокрашивания политенных хромосом показана четкая связь присутствия гиперацетилованного гистона H4 с дисками. Кроме того, наблюдается обогащенность данной модификацией гистонов хро-

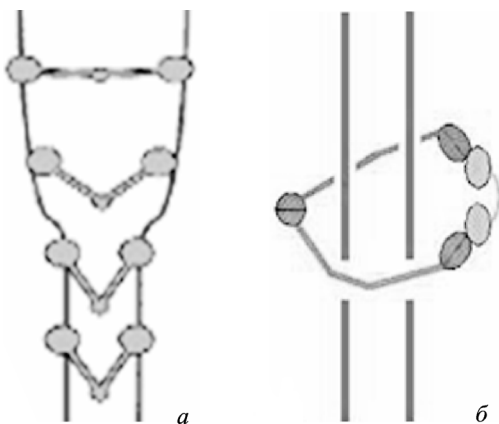


Рис. 6. Основные гипотезы механизма когезии сестринских хроматид.

а) — модель моста (Hirano, 1995). Комплексы когезии формируют стяжки между сестринскими нитями ДНК, связываясь с ними активными доменами; б) — модель кольца (Haering, Nasmyth, 2003). Комплексы когезии формируют кольцо вокруг сестринских нитей ДНК посредством взаимодействия активных доменов с регуляторным белковым комплексом.

моцентра (рис. 5). Области пуффов не окрашиваются антителами либо при наличии плотного диска, как случае с районом 68C (хромосома 3L), окрашиваются слабо. Интересно отметить, что часть дисков не обнаруживает присутствия H4-K4,7,10,12(Ac).

Обсуждение

В настоящее время различными авторами предложены две основные гипотезы, объясняющие механизм удержания вновь реплицированных молекул ДНК когезиновым комплексом. По одной из моделей, кольцо из молекул SMC1—SMC3 замкнутое, SCC1(Rad21) и SCC3 образуют когезиновый комплекс и удерживают внутри себя молекулы ДНК или даже фибриллы 30 нм (Haering, Nasmyth, 2003; Hopfner, 2003) (рис. 6, б). Другая гипотеза, предложенная ранее Т. Хирано, (Hirano, 1999) объясняет работу комплекса когезии как стягивающего мостика между двумя сестринскими нитями ДНК (рис. 6, а). Однако, ни одна из таких моделей не может объяснить удержание нескольких сотен хроматид тесно синаптированных политенных хромосом и одновременное прохождение аппарата транскрипции.

Данные по анализу ДНК-специфичности когезиновых комплексов показали, что когезиновые «скрепки» возникают лишь в дискретных участках геномной ДНК. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* районы связывания когезина CAR (cohesin associated region) располагаются с интервалом 9 т. п. н., обогащены АТ-парами и имеют размер 0.8—1.0 т. п. н. (Laloraya et al., 2000). В геноме человека обнаружена корреляция между посадкой hRAD21 и участками ДНК, обогащенными Alu-повторами и ацетилированными гистонами H3 и H4, метилированными по лизину 4 гистона H3. В работах последних лет обращается внимание на возможную роль метилирования ДНК и гистонов в связывании когезина с хромосомами (Nakimi et al., 2002).

В ранее опубликованных данных (Марков и др., 2003) показано, что когезиновые комплексы располагаются на политенных хромосомах, формируя зону когезии, занимающую достаточно протяженные районы междисковых областей хромосом (рис. 1). Мы предположили, что данное явление может иметь функциональную природу, отраженную в «гистоновом коде» хромосом. Данная работа является попыткой выявить связь когезии с некоторыми модификациями гистонов как маркерами функционального состояния хроматина.

Следует отметить, что из-за небольшого размера, низкого содержания ДНК и неясной генетической организации причины декомпактизованного состояния междисков и характеристика специфических для них белков затруднены, кроме того, попытки выявить междиск-специфичные нуклеотидные последовательности не дали никаких результатов (Горчаков и др., 2002). Полученные в данной работе факты не указывают на существование какой-либо приуроченной к междискам метилированной формы гистона H3. Однако представляется важным отметить факт дискретного распределения модифицированных (метилированных или ацетилированных) гистонов H3 и H4, что может свидетельствовать в пользу функциональной роли дисковой структуры политенных хромосом.

Гистоны H3-K79(Met) и H4-K4,7,10,12(Ac) проявляют высокую схожесть в распределении, связываясь исключительно с дисками, однако стоит отметить, что при этом гистон H3-K79(Met) в отличие от H4-K4,7,10,12(Ac)

не обнаруживается в плотных дисках, а также присутствует в конститутивных пуффах. В противоположность этому гистон H4-K4,7,10,12(Ac) демонстрирует отрицательную динамику в отношении пуффующихся областей. Аналогичное явление наблюдается и для индуцируемых экдизоном пуффов в районах с активной транскрипцией. При этом дезактивация пуффа приводит к восстановлению характерной междисковой локализации когезина и не влияет на гистон H3-K79(Met).

Наиболее интересное поведение показано для гистона H3-K36(Met), который, имея дискретное распределение по хромосомам, выявляется как в дисках, так и в междисках, как правило перекрывая сразу несколько областей. При этом, данный тип гистона присутствует в транскрипционно активных районах пуффов, что в наибольшей степени из проанализированных типов гистонов совпадает с характером распределения когезина DRAD21 (рис. 1, 2).

Как и следовало ожидать, гистон H3 с метилированным лизином в 9-м положении связан в основном с крупными блоками гетерохроматина (рис. 3) и какая-либо корреляция с распределением DRAD21p отсутствует. Полученные нами данные вполне согласуются с результатами других исследователей для политенных хромосом дрозофилы (Cowell et al., 2002; Li et al., 2003). Однако следует отметить, что белок DRAD21 не выявляется в хромоцентре и плотных гетерохроматиновых теломерах политенных хромосом, что может говорить о специфичности когезии эухроматиновым районом либо районам с факультативной гетерохроматизацией.

По литературным данным, H3(Met)K36 и H3-K79 (Met) являются характерными метками транскрипционной активности ДНК. Так, метилирование гистона H3 в положении K79 является маркером эухроматина (Ng et al., 2003), т. е. зоны связывания антител с H3-K79(Met) можно охарактеризовать как открытый хроматин, потенциально транскрибируемый. В свою очередь гистон H3, метилированный в положении K36, маркирует транскрипционно активные районы, в которых синтез РНК находится на стадии элонгации (Li et al., 2002; Xiao et al., 2003).

Таким образом, можно предположить, что метилирование гистона H3 в положении K79 необходимо для привлечения транскрипционных факторов, а метилирование в положении K36 разрешает элонгацию транскрипции. Присутствие гистона H3-K36(Met) как в дисках, так и в междисках может свидетельствовать в пользу того, что в дисках транскрибируются небольшие по протяженности гены, а в междисках, в которых выявляется H3-K36(Met), расположены протяженные гены, транскрипция которых в компактных дисках может быть топологически затруднена.

Гиперацетилирование гистона H4, вероятно, имеет первоочередную роль на пути активации транскрипции, маркируя эухроматин. При этом в районах с высокой степенью декомпактизации (междисках, пуффах) снимается гиперацетилирование, а выявленный прямой антагонизм с когезией позволяет предположить, что гиперацетилирование гистона H4 препятствует когезии и способствует более плотной укладке молчащего эухроматина.

В свете вышеизложенной гипотезы о структурно-функциональном распределении модифицированных гистонов можно предположить, что когезия выполняет вспомогательную роль, стабилизируя хроматин в районах с высокой (или) протяженной транскрипционной активностью.

Таким образом, в работе продемонстрирована возможность каскадной регуляции структуры хроматина политенных хромосом, в которой одну из решающих ролей

играют модификации гистонов, определяя возможность прохождения транскрипции, и адаптивную функцию выполняет аппарат когезии, стабилизируя высокодекомпактизованный хроматин.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-49036-а).

Список литературы

Горчаков А. А., Эггерт Г., Заумвебер Х. 2002. Клонирование и анализ экспрессии гена *ChriZ*, кодирующего белок, специфический для междисков политенных хромосом *Drosophila melanogaster*. Цитология. 44 (9) : 871—879.

Марков А. В., Захаров А. А., Галкин А. П., Струнников А. В., Смирнов А. Ф. 2003. Локализация когезиновых комплексов в политенных хромосомах *Drosophila melanogaster* связана с междисками. Генетика. 39 (9) : 1203—1211.

Chen D., Ma H., Hong H., Koh S. S., Huang S. M., Schurter B. T., Aswad D. W., Stallcup M. R. 1999. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*. 284 : 2174—2177.

Cheung P., Allis C. D., Sassone-Corsi P. 2000. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*. 103 : 263—271.

Cowell I., Aucott R., Mahadevaiah S., Burgoyne P., Huskisson N., Bongiorno S., Prantera G., Fanti I., Pimpinelli S., Wu A., Gilbert D., Shi W., Fundele H., Morrison H., Jeppesen P., Singh P. 2002. Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals. *Chromosoma*. 111 : 22—36.

Fishle W., Wang Y., Allis C. 2003. Histone and chromatin cross-talk. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 : 172—183.

Giannattasio M., Lazzaro F., Plevani P., Muzi-Falconi M. 2005. The DNA damage checkpoint response requires histone H2B ubiquitination by Rad6-Bre1 and H3 methylation by Dot1. *J. Biol. Chem.* 280 : 9879—9886.

Haering C., Nasmyth K. 2003. Building and breaking bridges between sister chromatid. *BioEssays*. 25 : 1178—1191.

Hakimi M., Bochar D., Schmiesing J., Dong Y., Barak O., Speicher D., Yokomori K., Shiekhattar R. 2002. A chromatin remodeling complex that loads cohesin onto human chromosomes. *Nature*. 418 : 994—997.

Hirano T. 1999. SMS-mediated chromosome mechanics: a conserved scheme from bacteria to vertebrates? *Genes Develop.* 13 : 11—19.

Hopfner K. 2003. Chromosome cohesion: closing time. *Curr. Biol.* 13 : R866—R868.

Jason L. J., Finn R. M., Lindsey G., Ausio J. 2005. Histone H2A ubiquitination does not preclude histone H1 binding, but it facilitates its association with the nucleosome. *J. Biol. Chem.* 280 : 4975—4982.

Laloraya S., Guacchi V., Koshland D. 2000. Chromosomal addresses of the cohesin component Mcd1p. *J. Cell Biol.* 151 : 1047—1056.

Li J., Moazed D., Gygi S. P. 2002. Association of the histone methyltransferase Set2 with RNA polymerase II plays a role in transcription elongation. *J. Biol. Chem.* 277 : 49 383—49 388.

Li Y., Danzer J., Alvarez P., Belmont A., Wallrath L. 2003. Effects of tethering HP1 to euchromatic regions of the *Drosophila* genome. *Development*. 130 : 1817—1824.

Murray K. 1964. The occurrence of N-methyl lysine in histones. *Biochemistry*. 3 : 10—15.

Ng H. H., Ciccone D. N., Morshead K. B., Oettinger M. A., Struhl K. 2003. Lysine-79 of histone H3 is hypomethylated at silenced loci in yeast and mammalian cells: a potential mechanism for position-effect variegation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 100 : 1820—1825.

Roth S. Y., Denu J. M., Allis C. D. 2001. Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 70 : 81—120.

Schneider R., Bannister A., Myers F., Thorne A., Crane-Robinson C., Kouzarides T. 2004. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nature Cell Biol.* 6 : 73—77.

Sedkov Y., Cho E., Petruk S., Cherbus L., Smith S., Jones R., Cherbas P., Canaani E., Jaines J., Mazo A. 2003. Methylation at lysine of histone H3 in ecdysone-dependent development of *Drosophila*. *Nature*. 426 : 78—83.

Sims R. J., 3rd, Nishioka K., Reinberg D. 2003. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends in Genetics*. 19 : 629—639.

Strahl B. D., Ohba R., Cook R. G., Allis C. D. 1999. Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 96 : 14 967—14 972.

Thomson S., Mahadevan L. C., Clayton A. L. 1999. MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Semin. Cell. Develop. Biol.* 10 : 205—214.

Turner B., Birley A., Lavender J. 2000. Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell*. 69 : 375—384.

Xiao T., Hall H., Kizer K. O., Shibata Y., Hall M. C., Borchers C. H., Strahl B. D. 2003. Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast. *Genes Develop.* 17 : 654—663.

Zhang Y., Reinberg D. 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Develop.* 15 : 2343—2360.

Zlatanova J., Caiafa P., van Holde K. 2000. Linker histone binding and displacement: versatile mechanisms for transcriptional regulation. *FASEB J.* 14 : 1697—1704.

Поступила 28 VI 2009

CORRELATIONS OF SISTER CHROMATIDS COHESION COMPLEXES DISTRIBUTION WITH HISTONES H3 AND H4 MODIFICATIONS

A. V. Markov,^{1,*} A. A. Zakharov,¹ N. S. Rodionova,¹ A. A. Mikhailutsa,¹ A. V. Strunnikov,² A. F. Smirnov¹

¹ Department of Selection and Breeding, St. Petersburg State University, and ² National Institute of Health, NICHD, Unit of Chromosome Structure and Function, Bethesda, USA; * e-mail: markov@mail.ru

The formulation of «histone code» theory brings active investigations of the role of histone modifications and other supramolecular factors of DNA condensation in transcription regulation. In this work, we have analyzed the localization of methylated histones on 9, 36 and 79 lysines, hyperacetylated H4 histone, and subunits of cohesion complex DRAD21 relatively of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes chromatin condensation. We propose the hypotheses of a cascade regulation of transcription activity defined by histone modifications and the adaptive role of sister chromatids cohesion in the transcription of high active and extensive genes.