

ИЗУЧЕНИЕ АТФ-ЗАВИСИМЫХ ФАКТОРОВ СБОРКИ И РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОМАТИНА ДРОЗОФИЛЫ

© *А. Ю. Конев, А. А. Макаев, Д. К. Покровский, М. А. Игнатъева, Ю. А. Ильина, Л. В. Котлованова*

*Петербургский институт ядерной физики, Гатчина;
электронный адрес: konev.alexander@gmail.com*

Сборка хроматина — это фундаментальный процесс, необходимый для восстановления хроматиновой структуры после репликации ДНК, а также происходящий в течение всего клеточного цикла в ходе транскрипции, репарации или рекомбинации. Исследования *in vitro* свидетельствуют о том, что для эффективной сборки протяженных нуклеосомных повторов необходимо взаимодействие белковых факторов, относящихся к двум различным классам — гистоновых шаперонов и АТФ-зависимых хроматинремодулирующих факторов. Исследование функций хроматинремоделирующего белка CHD1 *in vivo* выявило ключевую роль этого фактора в независимой от репликации сборке хроматина, содержащего вариантный гистон H3.3. Выявлен новый АТФ-зависимый фактор сборки хроматина — комплекс ToRC, образованный белками Toutatis, CtBP и ISWI. АТФ-зависимые факторы, вовлеченные в сборку хроматина у дрозофилы (CHD1, dRsf1, Tou и Acf1), образуют сеть генетически взаимодействующих факторов, способных частично компенсировать отсутствие друг друга. Исследования функций факторов сборки хроматина дрозофилы *in vivo* показывают, что АТФ-зависимые хроматинремоделирующие факторы, такие как CHD1, участвуют не только в ремоделировании существующего хроматина, но и в сборке хроматина из ДНК и гистонов *de novo*.

Ключевые слова: хроматин, сборка хроматина, хроматинремоделирующие факторы, гистоновые шапероны, вариантные гистоны, CHD1, Acf1, Toutatis.

Все процессы метаболизма ДНК, такие как репликация, транскрипция, рекомбинация и репарация, происходят в эукариотической клетке с ДНК в составе хроматина, все они в той или иной степени требуют его разборки и сборки. Основной повторяющейся единицей хроматина является нуклеосома, образованная 147 парами оснований ДНК, закрученными вокруг октамера, образованного коровыми гистонами H2A, H2B, H3 и H4. Для всех гистонов, кроме H4, показано существование альтернативных вариантных гистонов, которые могут заменять канонические гистоны в составе нуклеосом. Вариантные гистоны и факторы, вовлеченные в инкорпорирование замещающих гистонов в хроматин, играют существенную роль в контроле хромосомной архитектуры, экспрессии генов, формировании эпигенетической памяти клетки и в регуляции репарации ДНК (Henikoff, Ahmad, 2005; Jin et al., 2005; Kush, Workman, 2007). Процесс сборки хроматина является важнейшим компонентом регуляторной сети, контролирующей продвижение клеток по клеточному циклу и процессы, происходящие в ходе развития организма.

В делящихся клетках, сборка хроматина происходит в ходе репликации ДНК, когда «родительские» и вновь синтезированные гистоны распределяются между дочерними нитями ДНК (Krude, Keller, 2001). Кроме того, сборка нуклеосом требуется при обмене гистонов и в ходе репарации. Считается, что независимая от репликации сборка хроматина вовлекает исключительно гистоно-

вые варианты (например, H3.3, H2A.Z и CenpA), в то время канонические гистоны могут быть включены только во время репликации (Krude, Keller, 2001; Jin et al., 2005). Для эффективной сборки хроматина необходимо взаимодействие факторов, относящихся к двум различным классам: гистоновых шаперонов и АТФ-зависимых SWI/SNF-подобных хроматинремодулирующих факторов (Haushalter, Kadonaga, 2003; Polo, Almouzni, 2006). Гистоновые шапероны играют роль в доставке вновь синтезированных гистонов в ядро и участвуют во включении гистонов в ДНК (Tyler, 2002). Были идентифицированы шапероны, которые специфически взаимодействуют с определенными вариантами гистонов, и именно участие специфических шаперонов определяет репликативно-ассоциированный и независимый от репликации путь сборки хроматина (Tagami et al., 2004).

Несмотря на существенную роль шаперонов, биохимические исследования процесса сборки хроматина *in vitro* показали, что этот процесс требует участия гидролизующих АТФ хроматинремоделирующих факторов (Ito et al., 1997). Эти факторы увеличивают эффективность включения гистонов в хроматин, а также регулируют расстояние между нуклеосомами в хроматине (Ito et al., 1997; Varga-Weisz et al., 1997; Ito et al., 1999; Loyola et al., 2001; Lusser et al., 2005). Недавно было показано, что в то время как гистоновые шапероны опосредуют формирование пренуклеосомных структур, АТФ-зависимые факторы необходимы для их преобразования в периоди-

ческие повторы зрелых нуклеосом (Torigoe et al., 2011). Все АТФ-зависимые факторы сборки хроматина содержат хроматин-ремоделирующие моторные белки (ISWI/SNF2H, CHD1 или ATRX) из SNF2-семейства АТФаз в качестве каталитических субъединиц (Ito et al., 1997; Loyola et al., 2001; Lusser et al., 2005; Lewis et al., 2010). АТФ-зависимая сборка протяженных периодических повторов нуклеосом *in vitro* к настоящему времени показана для факторов ACF и CHRAC дрозофилы, комплекса RSF из клеток человека и белка CHD1 дрозофилы (Ito et al., 1997; Loyola et al., 2003; Kukimoto et al., 2004; Lusser et al., 2005). Каталитическая субъединица комплексов ACF, CHRAC и RSF относится к ISWI-подсемейству SNF2-подобных белков. ACF и CHRAC содержат дополнительную субъединицу Acf1, которая стимулирует присущие ISWI активности сборки и ремоделирования хроматина (Lusser et al., 2005). Комплекс RSF содержит полипептид Rsf-1, схожий с Acf1 (но не гомологичный) (Loyola et al., 2003). У дрозофилы *ISWI* является жизненно важным геном, его мутации вызывают глобальные изменения в структуре хромосом, особенно X-хромосомы у самцов (Deuring et al., 2000). ISWI участвует во включении линкерного гистона H1 в хроматин *in vivo* (Corona et al., 2007). Хромодоменсодержащий белок CHD1 относится к CHD-подсемейству АТФаз, родственному ISWI-подсемейству (Kelley et al., 1999).

Несмотря на то что исследования *in vitro* свидетельствуют о том, что АТФ-зависимые факторы необходимы для эффективной сборки хроматина, роль этих факторов в сборке хроматина *in vivo* продемонстрирована не была. Конечным с соавторами были охарактеризованы мутации гена *Chd1* дрозофилы (Konev et al., 2007). Нуль-мутантные по по гену *Chd1* особи выживают, но они стерильны. Потомки мутантных самок являются гаплоидными и гибнут на эмбриональной стадии развития. У дрозофилы слияние мужского и женского геномов после оплодотворения происходит только после первого митоза, происходящего независимо в мужском и женском пронуклеусах. Отсутствие фактора CHD1 в потомстве мутантных самок приводит к неспособности отцовского генома преодолеть первый зиготический митоз и развитию нежизнеспособных гаплоидных эмбрионов. В процессе образования мужского пронуклеуса происходит удаление протаминов, после чего следует независимая от репликации сборка хроматина отцовского генома, и именно этот процесс нарушен у особей, нуль-мутантных по гену *Chd1*.

В деконденсирующийся спермий включается не канонический, а вариант гистон H3.3, и в этом процессе участвует гистоновый шаперон HIRA (Lorpin et al., 2005). Нами показано, что CHD1 и HIRA физически взаимодействуют друг с другом. В отличие от мутантов *Hira*, у которых мужской пронуклеус лишен гистонов, в мужском пронуклеусе *Chd1*-мутантных эмбрионов на периферии ядра детектируется гистон H3.3, однако он не встраивается в хроматин. Таким образом, CHD1 кооперирует с HIRA для осуществления независимой от репликации сборки нуклеосом на уровне всего генома в транскрипционно неактивном мужском пронуклеусе. В то же время этот фактор существен для инкорпорации H3.3 и на более поздних этапах эмбриогенеза, совпадающих с началом зиготической транскрипции. Данное исследование выявило, что CHD1 является ключевым фактором в независимой от репликации сборке хроматина и впервые продемонстрировало необходимость АТФ-зависимых факторов для сборки хроматина *in vivo*.

В совместных исследованиях с лабораторией д-ра Д. В. Федорова нами выявлен новый АТФ-зависимый фактор сборки хроматина — комплекс ToRC, образованный белками Toutatis, ISWI и белком корепрессором транскрипции CtBP (Emelyanov et al., 2012). Сходство доменной структуры белков Tou и Acf1 позволило предположить, что Tou также может быть компонентом собирающего хроматин комплекса. Действительно, было установлено, что комплекс ToRC, в сочетании с гистоновым шапероном NAP-1 способствует осуществлению АТФ-зависимой сборки протяженных периодических нуклеосомных повторов *in vitro*.

Наличие всех трех компонентов комплекса ToRC необходимо для его оптимальной ферментативной активности. Нами показано, что именно CtBP отвечает за привлечение комплекса к специфическим сайтам хромосом. У мутантов по гену *CtBP* в политенных хромосомах полностью исчезала специфическая окраска с помощью антител на белок Tou; в диплоидных клетках нейробластов и имагинальных дисков мутантов белок Tou рассредоточен по всей клетке, а не локализован в ядре. У мутантов *tou* изменений в локализации белка CtBP не наблюдается. Tou, как и CtBP, функционирует как репрессор генов комплекса *achaete-scute*. Репрессивная функция CtBP опосредована, по крайней мере частично, привлечением фактора сборки и ремоделирования хроматина ToRC к сайтам его активности.

Сборка хроматина является фундаментальным процессом, и кажется парадоксальным, что мутации в ключевых АТФ-зависимых факторах сборки хроматина, таких как CHD1 или Acf1 (Fyodorov et al., 2004), лишь незначительно влияют на жизнеспособность особей. Мы предположили, что слабые эффекты мутаций таких генов могут быть следствием наличия существенного компенсаторного потенциала в механизмах сборки и ремоделирования хроматина. Для проверки этого предположения нами изучена жизнеспособность одиночных и двойных мутантов по генам, кодирующим субъединицы АТФ-зависимых факторов сборки хроматина, — *Chd1*, *acf1*, *dRsf*, *tou* и *ISWI*. С помощью метода неточного вырезания Р-элемента и прямой идентификации мутантных аллелей с помощью ПЦР-анализа с использованием ген-специфичных праймеров нами получены 3 новые делеционные аллели гена *Acf1* и 2 делеции в гене *tou*. Все выделенные мутации являются нуль-аллелями по результатам Вестерн-блот-анализа, однако все они лишь незначительно снижают жизнеспособность.

Аналогичным образом, с помощью Р-элемент-индуцированного вырезания инсерции в первый интрон гена *CG8677 (dRsf1)*, гомолога гена *RSF1* у дрозофилы, нами получены 2 мутации гена *dRsf1*, которые удаляют часть 5'-конца гена. Обе мутации вызывают сдвиг рамки считывания, приводящий к появлению стоп-кодона, и являются нуль-мутациями по результатам Вестерн-блот-анализа. Мухи, мутантные по гену *dRsf1*, жизнеспособны и фертильны. Сочетание мутаций в каталитических субъединицах факторов сборки хроматина CHD1 и ISWI приводит к существенно более ранней (эмбриональной) гибели двойных мутантов по сравнению с одиночными мутантами *ISWI* (доживают до третьей личиночной стадии). Результаты анализа взаимодействия мутаций *Chd1* с мутациями в генах, кодирующих некаталитические субъединицы трех ISWI-содержащих комплексов (*Acf1*, *Tou* и *Rsf1*) приведены в таблице. Показано, что в то время как одиночные мутанты лишь относительно незначительно снижают

**Взаимодействие мутаций в гене *Chd1* с мутациями
в других хроматин-ассемблирующих факторах**

Генотип ^а	№ ^б	Выживаемость, % от ожидаемой
<i>Chd1[1]/Chd 1[1]</i>	411	23
<i>Chd1[3]/Chd1[3]</i>	307	22
<i>Chd1[1]/Df(2L)Exel7014]</i>	201	51
<i>acf1[1]/acf1[1]</i>	213	64
<i>tou[1]/tou[1]</i>	340	49
<i>tou[1]/Df(2R)ED2219</i>	232	2.6
<i>dRsf1[1]/dRsf1[1]</i>	543	84
<i>dRsf1[1]/Df(2L)Exel6047</i>	435	96
<i>Chd1[3]/Chd1[3]; acf1[1]/acf1[1]</i>	257	0
<i>Chd1[1] tou[1]/Chd1[1] tou[1]</i>	241	0
<i>Chd1[1] tou[1]/Df(2L) Exel7014] tou[1]</i>	212	0
<i>Df(2L)Exel7014 tou[1]/Chd1[1] Df(2R)ED2219</i>	378	0
<i>Chd1[1] tou[1]/Chd1[1] Df(2R)ED2219</i>	52	0
<i>Df(2L)Exel7014 dRsf1[1]/Chd1[1] dRsf1[1]</i>	357	0.6
<i>Chd1[1] dRsf1[1]/Chd1[1] dRsf1[1]</i>	147	4.2
<i>Df(2L)Exel7014 dRsf1[1]/Chd1[1]Df(2L)Exe6047</i>	376	2
<i>Chd1[1] dRsf1[1]/Chd1[1] Df(2L)Exe6047</i>	127	4.8

^а Делеции *Df(2L)Exel7014*, *Df(2L)Exel6047* и *Df(2R)ED2219* удаляют гены *Chd1*, *dRsf1* и *tou* соответственно. ^б Количество особей, проанализированных в соответствующих скрещиваниях.

жизнеспособность особей, двойные мутанты являются синтетическими летальными.

Таким образом, факторы, вовлеченные в сборку хроматина у дрозофилы, способны компенсировать отсутствие друг друга. Исследования, проведенные на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, также показали высокий уровень дублирования функций белков ISWI и CHD1 (Gkikopoulos et al., 2011). Избыточность характерна и для другого класса факторов сборки хроматина — гистоновых шаперонов (Bonnefooy et al, 2007). Синтетическая летальность двойных мутантов, каждый из которых слабо влияет на жизнеспособность особей, недавно показана для мутантов *xpr* (гомолога фактора ATRX, вовлеченного во включение гистона H3.3 в теломерный и центромерный хроматин у млекопитающих) и шаперона *hira* (Schneiderman et al., 2012). При этом у двойных мутантов *hira*; *xpr* нарушено встраивание гистона H3.3 в хроматин полигенных хромосом. Более того, и гистон H3.3, который является крайне эволюционно консервативным, не является необходимым для жизнеспособности организма и может быть заменен гистоном H3 в нерепликативной сборке хроматина (Sakai et al., 2009). Вероятно, существование различных, частично перекрывающихся друг с другом путей сборки хроматина, вовлекающих различные АТФ-зависимые факторы, гистоновые шапероны и варианты гистонов, необходимо для тонкой регуляции процессов, сопровождающихся обменом нуклеосом в ходе развития многоклеточных организмов.

В целом исследование функций факторов сборки хроматина дрозофилы *in vivo* показывают, что АТФ-зависимые хроматинремоделирующие факторы, такие как CHD1, участвуют не только в ремоделировании существующего хроматина, но и в сборке хроматина из ДНК и гистонов *de novo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект

09-04-01676, проекты мол_а 12-04-32101, 12-04-31566 и 12-04-31900), Министерства образования и науки РФ (2012-1.2.2-12-000-1013-069, Госконтракт № 8131) и правительства Санкт-Петербурга.

Список литературы

- Bonnefooy E., Orsi G. A., Couble P., Loppin B. 2007. The essential role of *Drosophila* HIRA for *de novo* assembly of paternal chromatin at fertilization. *PLoS Genet.* 3 : 1991—2006.
- Corona D. F., Siriaco G., Armstrong J. A., Snarskaya N., McClymont S. A., Scott M. P., Tamkun J. W. 2007. ISWI regulates higher-order chromatin structure and histone H1 assembly *in vivo*. *PLoS Biol.* 5 : 1—15 (e232).
- Deuring R., Fanti L., Armstrong J. A., Sarte M., Papoulas O., Prestel M., Daubresse G., Verardo M., Moseley S. L., Berloco M., Tsukiyama T., Wu C., Pimpinelli S., Tamkun J. W. 2000. The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure *in vivo*. *Mol. Cell.* 5 : 355—365.
- Emelyanov A. V., Vershilova E., Ignatieva M. A., Pokrovsky D. K., Lu X., Konev A. Y., Fyodorov D. V. 2012. Identification and characterization of ToRC, a novel ISWI-containing ATP-dependent chromatin assembly complex. *Genes Develop.* 26 : 603—614.
- Fyodorov D. V., Blower M. D., Karpen G. H., Kadonaga J. T. 2004. Acf1 confers unique activities to ACF/CHRAC and promotes the formation rather than disruption of chromatin *in vivo*. *Genes Develop.* 18 : 170—183.
- Gkikopoulos T., Schofield P., Singh V., Pinskaya M., Mellor J., Smolle M., Workman J. L., Barton G. J., Owen-Hughes T. 2011. A role for Snf2-related nucleosome-spacing enzymes in genome-wide nucleosome organization. *Science.* 6050 : 1758—1760.
- Haushalter K. A., Kadonaga J. T. 2003. Chromatin assembly by DNA-translocating motors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 : 613—620.
- Henikoff S., Ahmad K. 2005. Assembly of variant histones into chromatin. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 21 : 133—153.
- Ito T., Bulger M., Pazin M. J., Kobayashi R., Kadonaga J. T. 1997. ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell.* 90 : 145—155.

Ito T., Levenstein M. E., Fyodorov D. V., Kutach A. K., Kobayashi R., Kadonaga J. T. . 1999. ACF consists of two subunits, Acl1 and ISWI, that function cooperatively in the ATP-dependent catalysis of chromatin assembly. *Genes Develop.* 13 : 1529—1539.

Jin J., Cay Y., Li B., Conaway R. C., Workman J. L., Conaway J. W., Kusch T. 2005. In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem. Sci.* 30 : 680—687.

Kelley D. E., Stokes D. G., Perry R. P. 1999. CHD1 interacts with SSRP1 and depends on both its chromodomain and its ATPase/helicase-like domain for proper association with chromatin. *Chromosoma.* 108 : 10—25.

Konev A. Y., Tribus M., Park S. Y., Podhraski V., Lim C. Y., Emelyanov A. V., Vershilova E., Pirrotta V., Kadonaga J. T., Lusser A., Fyodorov D. V. 2007. The CHD1 motor protein is required for deposition of histone H3.3 into chromatin *in vivo*. *Science.* 317 : 1087—1090.

Krude T., Keller C. 2001. Chromatin assembly during S phase: contributions from histone deposition, DNA replication and the cell division cycle. *Cell Mol. Life Sci.* 58 : 665—672.

Kukimoto I., Elderkin S., Grimaldi M., Oelgeschlager T., Varga-Weisz P. D. 2004. The histone-fold protein complex CHRAC-15/17 enhances nucleosome sliding and assembly mediated by ACF. *Mol. Cell.* 13 : 265—277.

Kush T., Workman J. L. 2007. Histone variants and complexes involved in their exchange. *Subcell. Biochem.* 41 : 91—109.

Lewis P. W., Elsaesser S. J., Noh K. M., Stadler S. C., Allis C. D. 2010. Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 107 : 14 075—14 080.

Loppin B., Bonnefoy E., Anselme C., Laurencon A., Karr T. L., Couple P. 2005. The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. *Nature.* 437 : 1386—1390.

Loyola A., Huang J. Y., LeRoy G., Hu S., Wang Y. H., Donnelly R. J., Lane W. S., Lee S. C., Reinberg D. 2003. Functional analy-

sis of the subunits of the chromatin assembly factor RSF. *Mol. Cell. Biol.* 23 : 6759—6768.

Loyola A., LeRoy G., Wang Y. H., Reinberg D. 2001. Reconstitution of recombinant chromatin establishes a requirement for histone-tail modifications during chromatin assembly and transcription. *Genes Develop.* 15 : 2837—2851.

Lusser A., Urwin D. L., Kadonaga J. T. 2005. Distinct activities of CHD1 and ACF in ATP-dependent chromatin assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12 : 160—166.

Polo S. E., Almouzni G. 2006. Chromatin assembly: a basic recipe with various flavours. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 16 : 104—111.

Sakai A., Schwartz B. E., Goldstein S., Ahmad K. 2009. Transcriptional and developmental functions of the H3.3 histone variant in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 21 : 1816—1820.

Schneiderman J. I., Orsi G. A., Hughes K. T., Loppin B., Ahmad K. 2012. Nucleosome-depleted chromatin gaps recruit assembly factors for the H3.3 histone variant. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 109 : 19 721—19 726.

Tagami H., Ray-Gallet D., Almouzni G., Nakatani Y. 2004. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell.* 116 : 51—61.

Torigoe S. E., Urwin D. L., Ishii H., Smith D. E., Kadonaga J. T. 2011. Identification of a rapidly formed nonnucleosomal histone-DNA intermediate that is converted into chromatin by ACF. *Mol. Cell.* 43 : 638—648.

Tyler J. K. 2002. Chromatin assembly. Cooperation between histone chaperones and ATP-dependent nucleosome remodeling machines. *Eur. J. Biochem.* 269 : 2268—2274.

Varga-Weisz P. D., Wilm M., Bonte E., Dumas K., Mann M., Becker P. B. 1997. Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature.* 388 : 598—602.

Поступила 26 XI 2012

STUDIES OF *DROSOPHILA* ATP-DEPENDENT CHROMATIN ASSEMBLY AND REMODELING FACTORS

A. Yu. Konev, A. A. Makase, D. K. Pokrovsky, M. A. Ignatiev, Yu. A. Iliina, L. V. Kotlovanova

St. Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina;
e-mail: konev.alexander@gmail.com

Chromatin assembly is a fundamentally important process that is essential for chromosome duplication subsequent to DNA replication. In addition, histone removal and incorporation take place constantly throughout the cell cycle in the course of DNA-utilizing processes, such as transcription, damage repair or recombination. *In vitro*, chromatin assembly requires the concerned action of histone chaperones and ATP-utilizing chromatin assembly factors. A novel, evolutionary conserved, ISWI-containing ATP-dependent chromatin assembly complex termed ToRC has been described. ToRC comprises ISWI, Toutatis and the transcriptional corepressor CtBP. *In vivo* studies have identified the *Drosophila* ATP-dependent chromatin-remodeling protein CHD1 as a key factor in the replication independent assembly of nucleosomes containing the variant histone H3.3. CHD1 functions within the network of partially redundant factors: mutations in individual chromatin assembly factors are viable, but combination of *Chd1* mutations with mutations of other ATP-dependent chromatin assembly factors (*acfl*, *dRsf1*, *tau*) causes synthetic lethality. Thus, ATP-dependent molecular motor proteins, such as CHD1, function not only in remodeling of existing nucleosomes but also in *de novo* nucleosome assembly from DNA and histones.

Key words: chromatin, chromatin assemble, chromatin-remodeling factors, histone chaperones, variant histones, CHD1, Acl1, Toutatis.