

## СПОСОБНОСТЬ Su(Hw) СОЗДАВАТЬ ПЛАТФОРМУ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ОРИДЖИНОВ РЕПЛИКАЦИИ НЕ ЗАВИСИТ ОТ ТИПА ОКРУЖАЮЩЕГО ХРОМАТИНА

© М. Ю. Мазина, Н. Е. Воробьев, А. Н. Краснов<sup>1</sup>

*Институт биологии гена РАН, Москва;* <sup>1</sup>*электронный адрес: krasnov@genebiology.ru*

Инициация репликации происходит на множестве сайтов в геноме, которые называются ориджинами репликации. Несмотря на большое количество данных о свойствах репликационных ориджинов, до сих пор неизвестно, какие факторы определяют позиционирование ORC-комплексов в геноме. Белок Su(Hw) содержит домен цинковых пальцев и необходим для функционирования инсулаторов *Drosophila melanogaster*. Было показано, что инсулаторный белок Su(Hw) рекрутирует гистонацетилтрансферазный комплекс SAGA и ремоделер хроматина dSWI/SNF на Su(Hw)-зависимые инсулаторы и создает условия для посадки репликационного комплекса ORC. Было показано, что белок Su(Hw) необходим для создания областей с низкой плотностью нуклеосом и позиционирования ориджинов репликации не зависимо от типа окружающего хроматина, т. е. глобальное состояние хроматина не оказывает влияния на механизм позиционирования ORC; скорее, именно ДНК-связывающие белки являются ключевыми детерминантами, формирующими подходящую структуру хроматина для посадки ORC-комплекса. Su(Hw) — это первый пример такого белка.

**Ключевые слова:** белок Su(Hw), ориджин репликации, ORC, dSWI/SNF, SAGA.

**Принятые сокращения:** п. о. — пары оснований, ПЦР — полимеразная цепная реакция, ChIP — chromatin immunoprecipitation (иммунопрепарации хроматина), ORC — origin recognition complex (комплекс узнавания ориджинов репликации), Su(Hw) — suppressor of hairy wings (белок-супрессор ворсистых крыльев) у *Drosophila melanogaster*.

Белок Su(Hw) содержит домен «цинковые пальцы» и необходим для функционирования инсулаторов *D. melanogaster*. Для функционирования Su(Hw)-зависимых инсулаторов необходимы также белки Mod(mdg4) и CP190 (Gerasimova et al., 1995; Georgiev, Kozycina, 1996; Pai et al., 2004). Кроме того, белок ENY2 привлекается белком Su(Hw) в состав инсулаторного комплекса и является необходимым для барьевой активности Su(Hw)-зависимых инсулаторов (Kurshakova et al., 2007b). ENY2 — это небольшой белок, который является субъединицей комплекса SAGA и играет важную роль в регуляции транскрипции (Kurshakova et al., 2007a).

Комплекс SAGA является высококонсервативным коактиваторным комплексом, который содержит более 20 белковых субъединиц (Koutelou et al., 2010). Для *D. melanogaster* гистонацетилтрансфераза GCN5 является катализической субъединицей данного комплекса. Основной функцией данного комплекса является модификация (ацетилирование и деубиквитинилирование) гистонов хроматина. Субъединицы комплекса SAGA взаимодействуют с различными транскрипционными активаторами, привлекая, таким образом, комплекс на определенные промоторы генов (Brown et al., 2001; Baker, Grant, 2007). Предполагается, что между комплексами, ремоделирующими и модифицирующими хроматин, существует определенный синергизм действия. Показано, что комплекс SAGA ацетилирует нуклеосомы на промоторах генов в процессе ак-

тивации транскрипции. Это приводит к привлечению комплекса ремоделирования хроматина dSWI/SNF и стимулированию его ремоделирующей активности (Li et al., 2007; Chatterjee et al., 2011).

Комpleксы ремоделирования хроматина семейства SWI/SNF играют важную роль в регуляции экспрессии генов эукариот. Все гомологи данного семейства содержат в своей структуре бромодомен, распознавающий ацетилированные остатки лизина. Наличие бромодомена в комплексах семейства SWI/SNF позволяет предполагать функциональную взаимосвязь между ацетилированием гистонов и ремоделированием хроматина.

Инициация репликации происходит на множестве сайтов в геноме, которые называются ориджинами репликации. Комплекс узнавания ориджинов репликации (ORC) состоит из 6 субъединиц (ORC1-6) и связывается с ориджинами репликации. Этот комплекс участвует в создании платформы для связывания белков пререпликативного комплекса и в инициации репликации ориджина. Чтобы обеспечить правильный временной паттерн репликации генома в течение S-фазы, в клетках эукариот создается множество ориджинов репликации, определенная часть из которых запускается в зависимости от стадии развития организма и условий роста. Полногеномный анализ показал, что не существует определенного нуклеотидного консенсуса для связывания белков ORC (MacAlpine et al., 2010). Несмотря на отсутствие явной специ-

личности к последовательностям ДНК, ORC связывают определенные участки генома в клеточных линиях и тканях (Eaton et al., 2011; Kim et al., 2011). Причем для многих типов клеток и тканей данные участки совпадают, т. е. позиционирование ORC не происходит случайным образом. ORC-комплекс часто локализуется в области начала транскрипции активно транскрибуемых генов и связывается преимущественно с АТ-богатыми участками ДНК (MacAlpine et al., 2004; Balasov et al., 2007). Сайты обогащения белками комплекса ORC в геноме характеризуются низкой плотностью нуклеосом и активным обменом гистонов (Deal et al., 2010; MacAlpine et al., 2010). Кроме того, было показано, что ориджины репликации обогащены комплексами ремоделирования хроматина, включая NURF и SWI/SNF (Eaton et al., 2011; Euskirchen et al., 2011).

В недавних исследованиях весь хроматин генома дрозофилы был разделен на несколько типов в зависимости от ассоциированных с хроматином белков и ковалентных модификаций гистонов (Filion et al., 2010). Оказалось, что белки комплекса ORC ассоциированы в основном с активными типами хроматина, в то время как *Su(Hw)* преимущественно располагается в синем и черном типах (Filion et al., 2010). Однако несмотря на разницу в распределении, *Su(Hw)* оказался ответственным за позиционирование части ориджинов репликации.

В настоящей работе было продемонстрировано, что *Su(Hw)* привлекает комплексы ацетилирования гистонов SAGA и ремоделирования хроматина dSWI/SNF на *Su(Hw)*-зависимые инсуляторы, что приводит к созданию областей с низкой плотностью нуклеосом и создает условия для связывания комплекса белков, узнающих участки начала репликации (ORC). Мы показали, что данные события происходят на сайтах связывания *Su(Hw)*, расположенных во всех основных типах хроматина. Таким образом, сайты связывания *Su(Hw)* формируют условия для посадки ORC-комплекса независимо от типа окружающего хроматина. Мы предполагаем, что ключевыми детерминантами позиционирования ORC-комплексов в геноме являются ДНК-связывающие белки, которые привлекают комплексы модификации и ремоделинга хроматина на промоторы, инсуляторы и энхансеры, что создает платформу для посадки ORC-комплекса и связывает транскрипцию и репликацию. *Su(Hw)* — это первый пример белка, который использует этот механизм.

## Материал и методика

Иммунопреципитация хроматина (ChIP). Для получения хроматина из куколок мух *D. melanogaster* (200 мг) гомогенизировали материал при комнатной температуре в гомогенизаторе Доусона в 5 мл буфера A1 с добавлением формальдегида до концентрации 1.8 %. Инкубировали в течение 15 мин. Затем добавляли 1/20 объема 2.5 М раствора глицина и инкубировали в течение 5 мин. Гомогенат фильтровали и центрифугировали 5 мин при 4000 g при 4 °C. Супернатант отбрасывали, осадок ресуспендировали в 1 мл буфера для лизиса и центрифугировали 5 мин при 4000 g при 4 °C. Процедуру отмыки повторяли 3 раза. Затем добавляли 0.5 мл буфера для лизиса и обрабатывали материал ультразвуком. Фрагменты ДНК после обработки составляли примерно 300 п. о. Полученную фракцию хроматина центрифугировали при 14 000 g при 4 °C 15 мин, супернатант отбирали, к осадку вновь добавляли 0.5 мл буфера для лизиса и повторяли процедуру экстрак-

ции хроматина. Супернатант из двух экстракций объединяли, центрифугировали при 14 000 g при 4 °C 15 мин и использовали для проведения иммунопреципитации.

Далее 10 % от количества экстракта, использованного на одну иммунопреципитацию, замораживали и хранили при -20 °C до этапа расшивки хроматина. Использовали антитела против белков OSA, GCN5, ORC3, *Su(Hw)* и гистона H3 по 4 мкг на иммунопреципитацию. К хроматиновому экстракту добавляли соответствующие антитела, а также бычий сывороточный альбумин (BSA) и очищенную ДНК из семенников сельди до концентрации 10 мг/мл, чтобы заблокировать неспецифическое связывание антител, и инкубировали в течение 12 ч при 4 °C. Одновременно растворяли протеин A-сефарозу в растворе для озвучивания, добавляли BSA и очищенную ДНК из семенников сельди до концентрации 10 мг/мл и тоже инкубировали в течение 12 ч при 4 °C. После этого к хроматину добавляли 20 мкг протеин A-сефарозы и инкубировали еще 3 ч при 4 °C. Затем проводили отмытие сефарозы от неспецифически связавшихся компонентов последовательно следующими растворами: раствором для озвучивания, буфером A, буфером Б и TE. Отмытие проводили в течение 5 мин при 4 °C, осаждали сефарозу центрифугированием в течение 5 мин при 1000 g при 4 °C. После добавляли 250 мкл буфера для элюции и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, сефарозу осаждали центрифугированием и отбирали супернатант. Элюцию хроматина с сефарозы повторяли еще раз в тех же условиях. Объем отобранный и замороженный ранее фракции хроматина также доводили до 500 мкл буфером для элюции. Супернатанты с первой и второй элюцией объединяли, добавляли NaCl до концентрации 160 mM и инкубировали элюят в течение 12 ч в термостате при 65 °C для расшивки хроматина. Затем к элюату добавляли 50 мкг протеиназы K и ЭДТА до концентрации 5 mM и инкубировали в термостате при 55 °C в течение 4 ч. Для дестабилизации элюата после обработки протеиназой K супендировали в равном объеме фенольной смеси (фенол : хлороформ : изоамиловый спирт — 25 : 24 : 1), затем центрифугировали 5 мин при 14 000 g, после чего верхнюю фазу переносили в чистую пробирку, добавляли 3 объема 95%-ного этанола и выдерживали 20 мин при -20 °C. Затем раствор центрифугировали 10 мин при 14 000 g при +4 °C; промывали осадок ДНК 70%-ным спиртом, центрифугировали в тех же условиях. Осадок ДНК сушили и пререрастворяли в 80 мкл раствора TE. Для оценки количества фрагментов определенной последовательности ДНК, осажденных данными антителами, проводили реакцию ПЦР в реальном времени с праймерами к данной последовательности.

В работе использовали следующие растворы: для озвучивания хроматина (50 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 140 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 % Тритона X-100, 0.1 % дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) Na, 0.1 % SDS); буфер A1 (60 mM KCl, 15 mM NaCl, 15 mM HEPES, pH 7.9, 0.5 % Тритона X-100); буфер для лизиса (140 mM NaCl, 15 mM HEPES, pH 7.9, 1 mM ЭДТА, 0.5 mM ЭГТА, 1 % Тритона X-100, 0.5 mM DTT, 0.1 % дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) Na, 0.05 % SDS, однократный ингибитор протеиназ от фирмы Roche); буфер A (50 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 500 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 % Тритона X-100, 0.1 % дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) Na, 0.1 % SDS); буфер B (20 mM Трис-HCl, pH 8.0, 1 mM ЭДТА, 250 mM LiCl, 0.5 % NP-40, 0.5 % дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) Na); буфер TE (10 mM Трис-HCl, pH 8.0, 1 mM ЭДТА); буфер для элюции (50 mM Трис-HCl, pH 8.0, 1 mM ЭДТА, 1 % SDS). Использовали антитела, полученные ранее в нашей лаборатории против OSA, GCN5

(Kurshakova et al., 2007a), ORC3, Su(Hw) (Kurshakova et al., 2007b), а также антитела против гистона H3 ( $\alpha$ H3, Abcam, ab1791).

Для ПЦР в реальном времени в экспериментах ChIP использовали следующие праймеры:

RED1 (CCGACTTGGTGGTGAAGGCC,  
TCGATTGAACATGGAACCTGAATGC);  
RED2 (GACGCAATTATCTGACAGCACTTG,  
GCCGTTTTGGTTGTTATTG);  
RED3 (ACCCAATAATCCCTAGAATCTTGC,  
TTGCGATGGAATTGCTGTGG);  
YELLOW1 (ACATGGGCACTGCGATTGAC,  
TCCACCTGCTGTTATTCTGTTCG);  
YELLOW2 (CGTCATTGATGGAACGGATAGAAC,  
TTGAGAGAGCCAAGTATGAAAACC);  
YELLOW3 (CAGATCAGCTTCTGACTTGTG,  
TCGATAGTTACCACTCTACATTAATC);  
BLACK1 (AGCACGAACTAATGCCACTCAATC,  
AGAAGGATGTTCCACAGCGATATG);  
BLACK2 (GGTGTAAATGCTGCGAGTGGATAG,  
GGCTGCGGCGAATGTGAATC);  
BLACK3 (TCAGCTCATAACAGAGTGTCTTCC,  
CCAAATCACAACTAACAGCACATCAAAG);  
BLUE1 (GCCGCTCCCTAAAGTATGC,  
CCGAGATTGTGAAATATAACAAGTTG);  
BLUE2 (GCTTTAGTCGTGCTTAATGTGG,  
AGTAATGTTGACTTGTATGTTGGG);  
BLUE3 (GTAGGTCAATTGGCAAATTAAGCG,  
AATAGCCGAGACACAGTAACCTC);  
1A1 (CTATTAATGATTATCGCCCCGATTAC,  
GCTTAGTGGATATACTCGTACATATAC);  
1A6 (GGCGACATACGAACGACACAATG,  
CGGGACGATCTGGAGCAATCTG);  
Mcp (AACGCATTACGCACACTTACAAAC,  
TCACTTACTCTACGCACAAACAC).

## Результаты

Su(Hw) привлекает комплекс SAGA на сайты связывания Su(Hw). Ранее в нашей лаборатории было показано, что белок Su(Hw) взаимодействует с белком ENY2 (Kurshakova et al., 2007b), который является компонентом комплекса SAGA (Kurshakova et al., 2007a). Решено было проверить, присутствует ли комплекс SAGA на сайтах белка Su(Hw). В качестве объекта исследований выбрали линию *D. melanogaster* *su(Hw)<sup>V</sup>/su(Hw)<sup>E8</sup>*, мутантную по гену *su(Hw)*. Мухи данной мутантной линии продуцируют белок Su(Hw), который не способен связываться с ДНК. В качестве контрольной линии использовали линию, экспрессирующую белок Su(Hw) дикого типа. Для проверки экспериментальных линий проводили реакцию ChIP с использованием антител к белку Su(Hw).

Исследовали сайты связывания белка Su(Hw), расположенные в «черном» (BLACK1, BLACK2 и BLACK3), «синем» (BLUE1, BLUE2 и BLUE3), «красном» (RED1, RED2, RED3) и «желтом» (YELLOW1, YELLOW2 и YELLOW3) типах хроматина. Эти сайты были отобраны на основе анализа профиля белка Su(Hw) из базы данных modENCODE. В качестве отрицательных контролей использовали сайты 1A1 и 1A6, в которых, как ранее было показано, отсутствует Su(Hw), а также CTCF-зависимый инсулятор Mcp, который тоже не связывает белок Su(Hw). Результат эксперимента показал, что белок Su(Hw) присутствует на всех протестированных сайтах в линии дикого типа и полностью отсутствует в мутантной линии (рис. 1). Для проверки наличия комплекса SAGA на сайтах связывания Su(Hw) проводили иммунопреципитацию хроматина с использованием антител к белку GCN5, который является катализитической субъединицей комплекса SAGA. В экспериментах по ChIP из куколок линии дикого типа все отобранные сайты Su(Hw) и инсулятор Mcp продемонстри-

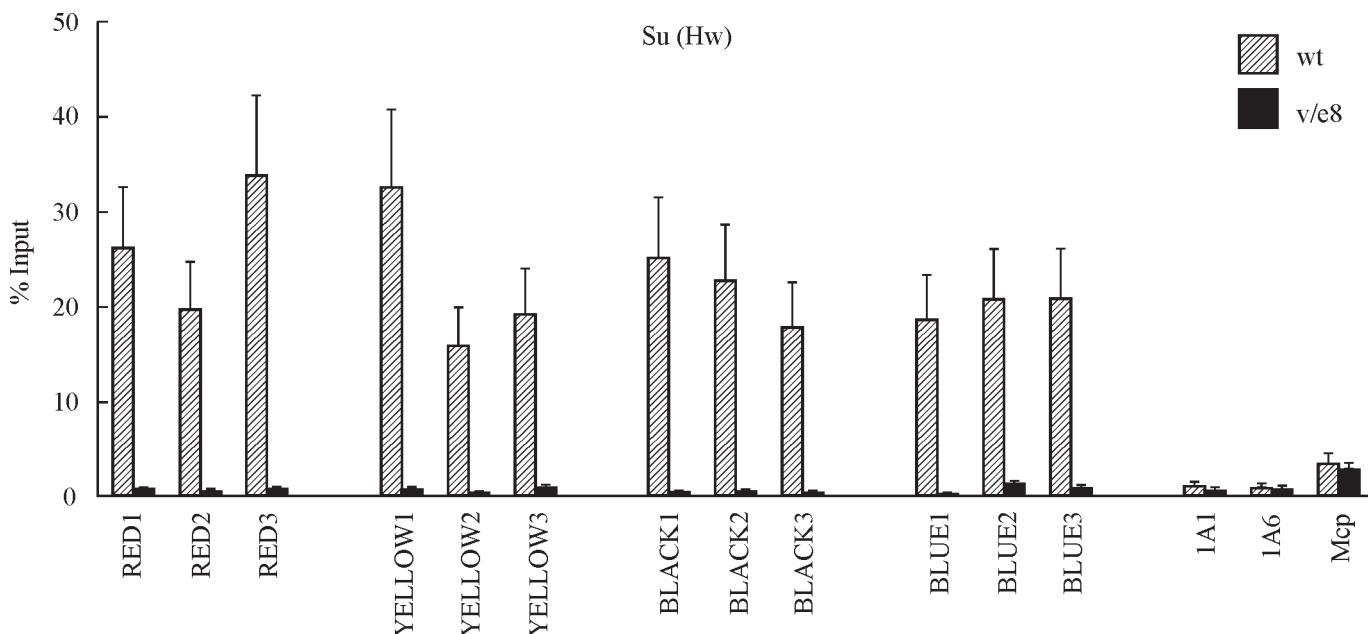


Рис. 1. Привлечение белка Su(Hw) на собственные сайты связывания в линиях дикого типа и мутантной линии *su(Hw)<sup>V</sup>/su(Hw)<sup>E8</sup>*.

Защищенные и темные столбики — Su(Hw) на сайтах связывания Su(Hw) в линиях дикого типа (wt) и в мутантной линии (v/e8) соответственно. Здесь и на рис. 2, 3 приведены данные для сайтов связывания Su(Hw) из разных типов хроматина: сайты RED1–3, YELLOW1–3, BLACK 1–3 и BLUE 1–3 расположены в «красном», «желтом», «черном» и «синем» типах хроматина соответственно; показаны среднее значение и его стандартная ошибка из трех экспериментов; результаты представлены в % от исходного количества ДНК (% Input).

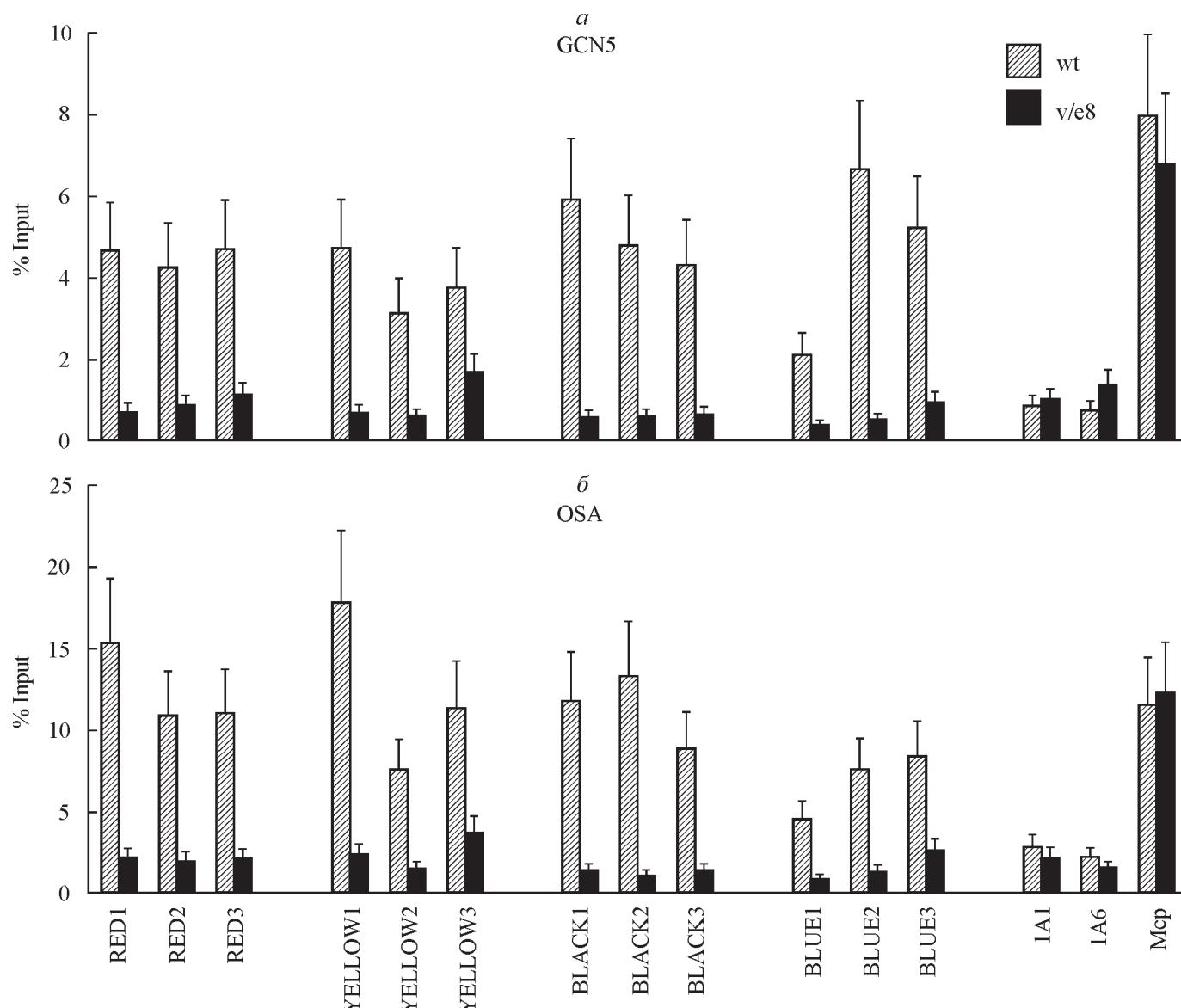


Рис. 2. Белок *Su(Hw)* привлекает комплекс ацетилирования гистонов SAGA и комплекс ремоделирования хроматина dSWI/SNF на сайты связывания *Su(Hw)*.

Связывание субъединицы GCN5 комплекса SAGA (*a*) и субъединицы OSA комплекса dSWI/SNF (*b*) с сайтами *Su(Hw)* в линии дикого типа (wt) и мутантной линии *su(Hw)<sup>v</sup>/su(Hw)<sup>E8</sup>* (*v/e8*); заштрихованные столбцы — GCN5 (*a*) и OSA (*b*) на сайтах *Su(Hw)* в линии wt, темные столбцы — GCN5 (*a*) и OSA (*b*) на сайтах *Su(Hw)* в линии (*v/e8*).

ровали значительное обогащение субъединицей GCN5 по сравнению с контрольными последовательностями 1A1 и 1A6 (рис. 2, *a*).

Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что комплекс SAGA присутствует на сайтах *Su(Hw)*. Связывание комплекса SAGA с инсулятором Mcp согласуется с ранее полученными данными о том, что CTCF-зависимые инсуляторы обогащены комплексами ацетилирования гистонов (Huang et al., 2007). Чтобы оценить роль белка *Su(Hw)* в привлечении комплекса SAGA, провели ChIP из куколок линии *su(Hw)<sup>v</sup>/su(Hw)<sup>E8</sup>*. Уровень связывания белка GCN5 с сайтами *Su(Hw)* вне зависимости от типа хроматина, в котором они расположены, был значительно снижен в мутантной линии по сравнению с линией дикого типа. В то же время мутация *Su(Hw)* не вызвала изменения уровня связывания белка GCN5 с CTCF- зависимым инсулятором Mcp (рис. 2, *a*).

*Su(Hw)* привлекает комплекс dSWI/SNF на сайты связывания *Su(Hw)*. Известно, что комплекс SAGA участвует в модификации гистонов и совместно с комплексами ремоделирования хроматина dSWI/SNF принимает участие в формировании открытой структуры хроматина на промоторах активно транскрибирующихся генов (Hassan et al., 2001; Mitra et al., 2006). После того как мы обнаружили комплекс SAGA на сайтах связывания *Su(Hw)*, интересно было проверить, привлекается ли на данные сайты комплекс dSWI/SNF. Чтобы выяснить это, мы провели ChIP антителами к субъединице OSA. Оказалось, что, как и в случае с субъединицей GCN5 комплекса SAGA, последовательности сайтов *Su(Hw)* связывают значительное количество белка OSA по отношению к контрольным сайтам (рис. 2, *b*). Связывание субъединицы OSA с инсулятором Mcp также согласуется с ранее полученными данными о том, что CTCF-зависимые инсу-

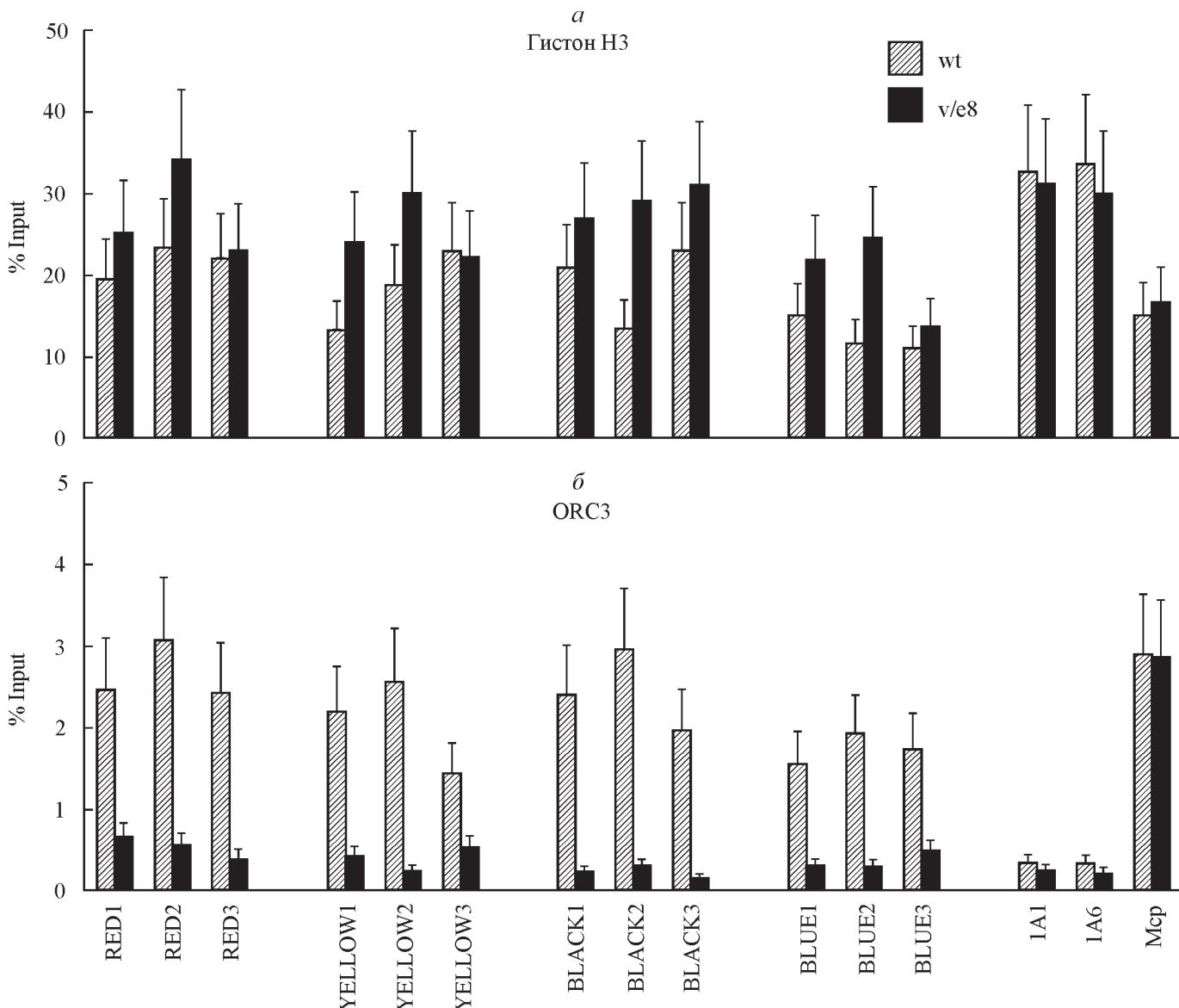


Рис. 3. Белок Su(Hw) необходим для формирования областей с низкой плотностью нуклеосом и привлечения комплекса ORC.

Связывание гистона H3 (*a*) и субъединицы ORC3 комплекса ORC (*b*) с сайтами Su(Hw) в линии дикого типа (wt) и в мутантной линии *su(Hw)<sup>v/e8</sup>/su(Hw)<sup>E8</sup>* (v/e8). Защищенные столбки — гистон H3 (*a*) и ORC3 (*b*) на сайтах Su(Hw) в линии wt, темные столбки — гистон H3 (*a*) и ORC3 (*b*) на сайтах Su(Hw) в мутантной линии (v/e8).

ляторы обогащены комплексами ремоделирования хроматина семейства dSWI/SNF (Euskirchen et al., 2011). Для определения роли белка Su(Hw) в привлечении комплекса dSWI/SNF провели ChIP из куколок линии *su(Hw)<sup>v/e8</sup>/su(Hw)<sup>E8</sup>*. Уровень связывания белка OSA со всеми сайтами Su(Hw) был значительно снижен в мутантной линии по сравнению с линией дикого типа. В то же время мутация Su(Hw) не оказала влияния на связывание белка OSA с CTCF-зависимым инсулятором Mcp (рис. 2, *b*).

Su(Hw) необходим для формирования областей с низкой плотностью нуклеосом. После того как мы обнаружили комплексы SAGA и dSWI/SNF на сайтах связывания Su(Hw), оказался существенным вопрос о том, происходит ли на данных сайтах ремоделирование хроматина. Чтобы оценить структуру хроматина и плотность расположения нуклеосом на сайтах Su(Hw), мы провели эксперименты по осаждению хроматина из куколок дикого типа антителами против гистона

H3 и обнаружили, что уровень гистона H3 на сайтах Su(Hw) заметно ниже, чем на контрольных сайтах 1A1 и 1A6 (рис. 3, *a*). Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными о том, что сайты связывания белков, ассоциированные с инсуляторами, являются областями с пониженной плотностью нуклеосом (Negre et al., 2010). Чтобы определить роль Su(Hw) в формировании областей с пониженной плотностью нуклеосом, была проведена иммунопреципитация хроматина из куколок линии *su(Hw)<sup>v/e8</sup>/su(Hw)<sup>E8</sup>*. Уровень связывания белка H3 с сайтами Su(Hw), расположенными в разных типах хроматина, заметно возраст в мутантной линии по сравнению с линией дикого типа. В то же время мы не наблюдали значительных изменений количества гистона H3, связанного с последовательностями контрольных сайтов и CTCF-зависимого инсулятора Mcp (рис. 3, *a*).

Комплекс ORC привлекается на сайты связывания Su(Hw). Полученные нами данные по-

зволяют заключить, что существуют некоторые общие свойства между промоторами активно транскрибуемых генов и сайтами связывания Su(Hw). Так, сайты Su(Hw), как и промоторы, связывают комплекс ацетилирования гистонов SAGA и комплекс ремоделирования хроматина dSWI/SNF и являются областями с низкой плотностью нуклеосом. Мы предположили, что сайты связывания Su(Hw) могут иметь и другие общие свойства с промоторами активных генов. Известно, что комплекс ORC часто локализуется поблизости от промоторов активных генов (MacAlpine et al., 2004). Мы провели эксперименты по осаждению хроматина из куколок дикого типа антителами против субъединицы ORC3 комплекса узнавания ориджинов репликации и обнаружили, что ORC3 также присутствует и на сайтах связывания Su(Hw) (рис. 3, б). Чтобы оценить роль Su(Hw) в привлечении комплекса ORC была проведена иммунопреципитация хроматина из куколок линии *su(Hw)<sup>V</sup>/su(Hw)<sup>E8</sup>*. На основании результатов данного эксперимента можно заключить, что нарушение связывания белка Su(Hw) со своими сайтами в мутантной линии *su(Hw)<sup>V</sup>/su(Hw)<sup>E8</sup>* приводит к падению уровня связывания факторов комплекса ORC на данных сайтах до фонового уровня (рис. 3, б).

## Обсуждение

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы. Su(Hw) привлекает комплекс ацетилирования гистонов SAGA и комплекс ремоделирования хроматина dSWI/SNF на сайты связывания Su(Hw). Это приводит к формированию областей с низкой плотностью нуклеосом и создает условия для связывания комплекса белков, узнающих участки начала репликации (ORC). Отсутствие Su(Hw), способного связывать сайты на ДНК в мутантной линии *su(Hw)<sup>V</sup>/su(Hw)<sup>E8</sup>*, приводит к значительному снижению количества белковых комплексов SAGA, dSWI/SNF и ORC и в то же время к увеличению плотности нуклеосом на сайтах связывания Su(Hw). Таким образом, Su(Hw) создает условия для связывания комплекса ORC и формирования пререпликативных комплексов.

Сайты связывания белка Su(Hw) расположены преимущественно в черном и синем хроматинах, в то время как в красном и желтом хроматинах расположена лишь малая часть Su(Hw)-сайтов. Несмотря на это, мы показали общие свойства сайтов связывания Su(Hw) независимо от глобальной структуры хроматина. Во всех типах хроматина (в красном, желтом, синем и черном) белок Su(Hw) необходим для ремоделинга хроматина и позиционирования ориджинов репликации. Таким образом, можно заключить, что независимо от типа хроматина именно белок Su(Hw) является первичным детерминантом в позиционировании комплексов ORC, т. е. глобальное состояние хроматина не оказывает влияния на этот процесс, ключевыми детерминантами являются ДНК-связывающие белки, формирующие подходящую структуру хроматина для посадки комплекса ORC.

Описанный нами механизм формирования открытого хроматина на сайтах связывания Su(Hw) имеет много общего с формированием открытого хроматина на промоторах активных генов. Известно, что активаторы транскрипции привлекают на промоторы этих генов комплексы ремоделирования и ацетилирования хроматина. Аналогично комплекс ORC привлекается на промоторы

активных генов и на сайты связывания Su(Hw). Сходные свойства таких различных геномных элементов, как сайты связывания Su(Hw) и промоторы, позволяют нам предположить, что в клетке реализуются универсальные механизмы позиционирования ориджинов репликации. Эти механизмы позволяют клетке создать множество ориджинов репликации, позиционируемых ДНК-связывающими белками, которые организуют необходимую для связывания комплекса ORC структуру хроматина. В ряде исследований показано, что основные известные классы регуляторных элементов ДНК, включая промоторы, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы, области контроля локусов, являются областями открытого хроматина (Gross, Garrard, 1988; Cockerill, 2011). Таким образом, универсальный механизм позиционирования ориджинов репликации мог бы позволить связать процессы транскрипции и репликации на разнообразных регуляторных элементах генома.

Мы предполагаем, что ключевыми детерминантами позиционирования комплексов ORC в геноме являются ДНК-связывающие белки, которые привлекают комплексы модификации и ремоделинга хроматина на промоторы, инсуляторы и энхансеры, что создает платформу для посадки комплекса ORC и связывает транскрипцию и репликацию. Белок Su(Hw) — это первый пример белка, который использует этот механизм.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 10-04-01820 и 12-04-33289), программ НШ 2814.2012.4, а также программами президента Российской Федерации (МК-5961.2012.4 и МД-4874.2011.4).

## Список литературы

- Baker S. P., Grant P. A. 2007. The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. *Oncogene*. 26 : 5329—5340.
- Balasov M., Huijbregts R. P., Chesnokov I. 2007. Role of the Orc6 protein in origin recognition complex-dependent DNA binding and replication in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 27 : 3143—3153.
- Brown C. E., Howe L., Sousa K., Alley S. C., Carrozza M. J., Tan S., Workman J. L. 2001. Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science*. 292 : 2333—2337.
- Chatterjee N., Sinha D., Lemma-Dechassa M., Tan S., Shogren-Knaak M. A., Bartholomew B. 2011. Histone H3 tail acetylation modulates ATP-dependent remodeling through multiple mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 39 : 8378—8391.
- Cockerill P. N. 2011. Structure and function of active chromatin and DNase I hypersensitive sites. *FEBS J.* 278 : 2182—2210.
- 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.
- Eaton M. L., Prinz J. A., MacAlpine H. K., Tretyakov G., Kharchenko P. V., MacAlpine D. M. 2011. Chromatin signatures of the *Drosophila* replication program. *Gen. Res.* 21 : 164—174.
- Euskirchen G. M., Auerbach R. K., Davidov E., Gianoulis T. A., Zhong G., Rozowsky J., Bhardwaj N., Gerstein M. B., Snyder M. 2011. Diverse roles and interactions of the SWI/SNF chromatin remodeling complex revealed using global approaches. *PLoS Gen.* 7 : e1002008.
- Filion G. J., van Bemmel J. G., Braunschweig U., Talhout W., Kind J., Ward L. D., Brugman W., de Castro I. J., Kerkhoven R. M., Bussemaker H. J., van Steensel B. 2010. Systematic protein locati-

- on mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell*. 143 : 212—224.
- Georgiev P., Kozycina M.* 1996. Interaction between mutations in the suppressor of Hairy wing and modifier of mdg4 genes of *Drosophila melanogaster* affecting the phenotype of gypsy-induced mutations. *Genetics*. 142 : 425—436.
- Gerasimova T. I., Gdula D. A., Gerasimov D. V., Simonova O., Corces V. G.* 1995. A *Drosophila* protein that imparts directionality on a chromatin insulator is an enhancer of position-effect variegation. *Cell*. 82 : 587—597.
- Gross D. S., Garrard W. T.* 1988. Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* 57 : 159—197.
- Hassan A. H., Neely K. E., Vignali M., Rees J. C., Workman J. L.* 2001. Promoter targeting of chromatin-modifying complexes. *Frontiers Biosci. J. Virtual Library*. 6 : D1054—1064.
- Huang S., Li X., Yusufzai T. M., Qiu Y., Felsenfeld G.* 2007. USF1 recruits histone modification complexes and is critical for maintenance of a chromatin barrier. *Mol. Cell. Biol.* 27 : 7991—8002.
- Kim J. C., Nordman J., Xie F., Kashevsky H., Eng T., Li S., Macalpine D. M., Orr-Weaver T. L.* 2011. Integrative analysis of gene amplification in *Drosophila* follicle cells: parameters of origin activation and repression. *Genes Develop.* 25 : 1384—1398.
- Koutelou E., Hirsch C. L., Dent S. Y.* 2010. Multiple faces of the SAGA complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22 : 374—382.
- Kurshakova M. M., Krasnov A. N., Kopytova D. V., Shidlovskii Y. V., Nikolenko J. V., Nabirochkin E. N., Spehner D., Schultz P., Tora L., Georgieva S. G.* 2007a. SAGA and a novel *Drosophila* ex-
- port complex anchor efficient transcription and mRNA export to NPC. *EMBO J.* 26 : 4956—4965.
- Kurshakova M., Maksimenko O., Golovnin A., Pulina M., Georgieva S., Georgiev P., Krasnov A.* 2007b. Evolutionarily conserved E(y)2/Sus1 protein is essential for the barrier activity of Su(Hw)-dependent insulators in *Drosophila*. *Mol. Cell.* 27 : 332—338.
- Li B., Carey M., Workman J. L.* 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell*. 128 : 707—719.
- MacAlpine D. M., Rodriguez H. K., Bell S. P.* 2004. Coordination of replication and transcription along a *Drosophila* chromosome. *Genes Develop.* 18 : 3094—3105.
- MacAlpine H. K., Gordan R., Powell S. K., Hartemink A. J., MacAlpine D. M.* 2010. *Drosophila* ORC localizes to open chromatin and marks sites of cohesin complex loading. *Gen. Res.* 20 : 201—211.
- Mitra D., Parnell E. J., Landon J. W., Yu Y., Stillman D. J.* 2006. SWI/SNF binding to the HO promoter requires histone acetylation and stimulates TATA-binding protein recruitment. *Mol. Cell. Biol.* 26 : 4095—4110.
- Negre N., Brown C. D., Shah P. K., Kheradpour P., Morriseon C. A., Henikoff J. G., Feng X., Ahmad K., Russell S., White R. A., Stein L., Henikoff S., Kellis M., White K. P.* 2010. A comprehensive map of insulator elements for the *Drosophila* genome. *PLoS Gen.* 6 : e1000814.
- Pai C. Y., Lei E. P., Ghosh D., Corces V. G.* 2004. The centromosomal protein CP190 is a component of the gypsy chromatin insulator. *Mol. Cell.* 16 : 737—748.

Поступила 26 XI 2012

## ABILITY OF Su(Hw) TO CREATE A PLATFORM FOR ORC BINDING DOES NOT DEPEND ON THE TYPE OF SURROUNDING CHROMATIN

*M. Yu. Mazina, N. E. Vorobyeva, A. N. Krasnov*

Institute of Gene Biology RAS, Moscow; e-mail: krasnov@genebiology.ru

DNA replication begins from multiple sites distributed throughout the genome and named replication origins. Despite the increasing amount of data on the properties of replication origins, it is still unknown what factor(s) is the primary determinant of ORC localization. Su(Hw) is a zinc-finger protein that is responsible for the activity of the best-studied *Drosophila* insulators. Here, we show that insulator protein Su(Hw) recruits histone acetyltransferase complex SAGA and chromatin remodeler dSWI/SNF to Su(Hw)-dependent insulators and creates platform for ORC binding. We have found that Su(Hw) is necessary for chromatin remodeling and ORC recruitment regardless of type of surrounding chromatin. Thus, global chromatin state does not influence molecular mechanism underlying ORC positioning in the genome, rather DNA-binding proteins are key determinants that create proper chromatin structure for ORC binding. Su(Hw) is the first example of such a protein.

**Key words:** Su(Hw) protein, replication origins, ORC, dSWI/SNF, SAGA.