

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНА *Chd1*, КОДИРУЮЩЕГО ФАКТОР СБОРКИ И РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОМАТИНА, НА ОРГАНИЗАЦИЮ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ ДРОЗОФИЛЫ

© А. Ю. Конев,¹ А. А. Тютюнник, И. Л. Барановская

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Ленинградская обл., 188300;
¹электронный адрес: konev.alexander@gmail.com

Естественным носителем генетической информации в эукариотической клетке является хроматин. Исследования *in vitro* свидетельствуют о том, что для эффективной сборки хроматина необходимо взаимодействие факторов, относящихся к двум различным классам белков — гистоновым шаперонам и АТФ-зависимым хроматинремоделирующим факторам. Белок CHD1 (Chromo-ATPase/Helicase-DNA-binding protein 1) вовлечен в контроль таких клеточных процессов, как сборка хроматина и обмен гистонов; детерминация плюрипотентного состояния стволовых клеток; регуляция инициации, элонгации и терминации транскрипции; предотвращение транскрипции с криптических промоторов внутри гена; реорганизация хроматина мужского пронуклеуса. Его мутации связаны с развитием раковых заболеваний человека. Исследование политенных хромосом нуль-мутантных по гену *Chd1* личинок дрозофилы показало, что, в то время как самки имеют нормальную структуру хромосом, X-хромосома самцов становится деформированной, укороченной и утолщенной. Продукт гена *Chd1* материнского происхождения концентрируется у самцов в X-хромосоме, вызывая ее специфическое окрашивание. Выявлено усиление влияния мутаций *Chd1* на структуру X-хромосомы самцов в отсутствие одного из двух генов, кодирующих вариантный гистон H3.3. Таким образом, нами впервые обнаружена роль фактора CHD1 в регуляции структуры X-хромосомы самцов, возможно опосредованная его участием в обмене гистона H3.3.

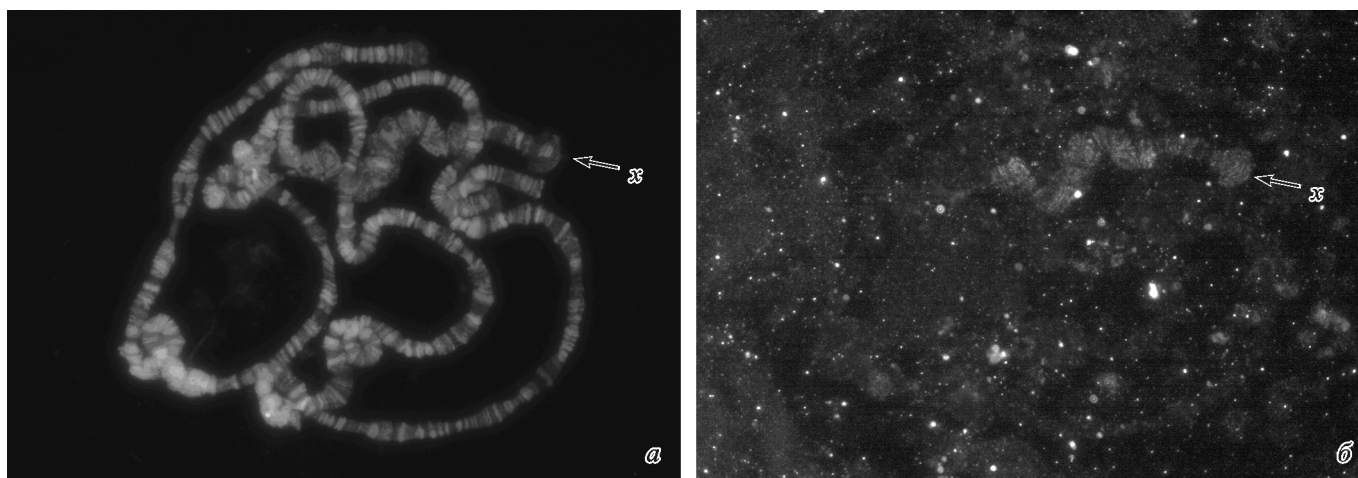
К л ю ч е в ы е с л о в а: хроматин, сборка хроматина, хроматинремоделирующий фактор CHD1, варианты гистоны, политенные хромосомы, дозовая компенсация.

Естественным носителем генетической информации в эукариотической клетке является хроматин — нуклео-протеиновый комплекс, состоящий из ДНК, гистонов и негистоновых белков. Важнейшими компонентами регуляторной сети, контролирующей продвижение клеток по клеточному циклу и процессы, происходящие в ходе реализации генетической информации, являются сборка и ремоделирование хроматина. Природой используются различные стратегии для модулирования хроматиновой архитектуры, необходимой в ходе транскрипции, рекомбинации или репарации. Посттрансляционные ковалентные модификации гистонов создают эпигенетические изменения, которые определяют функциональное состояние различных участков генома (Turner 2000; Jenuwein, Allis 2001; Imhof, 2003). АТФ-зависимые ремоделирующие белки модифицируют структуру хроматина, изменяя ДНК-гистоновые контакты и приводя к перемещению или удалению нуклеосом (Varga-Weisz, 2001; Becker, Horz, 2002; Lusser, Kadonaga, 2003; Morettini et al., 2008; Becker, Workman, 2013). Наконец, важную роль в динамике изменений хроматина играет включение вариантных гистонов в состав хроматина (Kusch, Workman, 2007). Между тем сведения о факторах, вовлеченных в этот процесс, весьма ограничены. Малоизученным остается и вопрос о взаимосвязи двух механизмов эпигенетической регуляции — инкорпорирования замещаю-

щих гистонов в хроматин и ковалентной модификации гистонов.

Показано, что для эффективной сборки хроматина необходимо взаимодействие факторов, относящихся к двум различным классам, гистоновых шаперонов и АТФ-зависимых SWI/SNF-подобных хроматинремоделирующих факторов (Tyler, 2002; Haushalter, Kadonaga, 2003; Polo, Almouzni, 2006; Конев и др., 2013). Способность к сборке протяженных повторов нуклеосом *in vitro* при взаимодействии с гистоновыми шаперонами продемонстрирована для АТФ-зависимых факторов дрозофилы ACF и CHRAC (Ito et al., 1997; Kukimoto et al., 2004), фактора дрозофилы TORC (Emelyanov et al., 2012), а также комплекса RSF человека (Loyola et al., 2003). Все эти факторы включают в себя хроматинремоделирующий белок ISWI в качестве каталитической субъединицы. Активность в реакции АТФ-зависимой сборки хроматина *in vitro* показана также для белков CHD1 дрозофилы и дрожжей (Lusser, Kadonaga, 2003; Robinson, Schultz, 2003), Chd2 и ATRX человека (Lewis et al., 2010; Liu et al., 2015).

Среди АТФ-зависимых факторов сборки хроматина эволюционно-консервативный CHD1 (Chromo-ATPase/Helicase-DNA-binding protein 1) особенно интересен, поскольку он вовлечен в контроль таких различных клеточных процессов, как сборка хроматина, обмен гистонов, детерминация плюрипотентного состояния стволовых



Морфология политенных хромосом и локализация белка CHD1 у самцов, несущих нуль-мутацию по гену *Chd1*.

Микрофотографии окрашенных красителем DAPI (а) и с помощью антител к белку CHD1 (б) политенных хромосом слюнных желез, полученных из самцов генотипа *Chd1[1]/Df(2L)Exel7014*. X-хромосома (X) показана стрелкой. 600×.

клеток, регуляция инициации, элонгации и терминации транскрипции, предотвращение транскрипции с крипто-ческих промоторов внутри гена. Нарушения в его работе связывают с развитием ряда тяжелых заболеваний человека. Белок CHD1 регулирует различия между плюрипотентным и мультипотентным состояниями эмбриональных стволовых клеток у мышей (Gaspar-Maia et al., 2009). CHD1 человека является раковым супрессором, играющим ключевую роль в развитии рака простаты и определяющим метастазирование (Grasso et al., 2012; Huang et al., 2012). Фактор CHD1 и взаимодействующие с ним гистоновые шапероны HIRA, Asf1 и Spt6 контролируют «молчание» копий вирусов, интегрированных в активно-транскрибирующиеся участки генома человека (Vanti et al., 2009; Gallastegui et al., 2011). Таким образом, CHD1 рассматривается как потенциальная мишень для разработки новых фармакологических препаратов для терапии ВИЧ-инфекции и раковых заболеваний. В то же время этот фактор участвует в самых фундаментальных клеточных процессах, и для использования его в качестве терапевтической мишени необходимо детальное исследование механизмов работы и биологических функций этого высококонсервативного белка.

CHD1 относится к подсемейству CHD SNF2-подобных АТФаз, родственному подсемейству ISWI, и характеризуется наличием трех мотивов — тандемного хромодомена, SNF-подобного АТФазного домена и ДНК-связывающего домена (Delmas et al., 1993; Stokes, Perry, 1995). Изучение кристаллической структуры ДНК-связывающих доменов выявило наличие структурной гомологии с доменами ISWI, характерными для белков семейства ISWI (Ryan et al., 2011). Сходство в доменной организации ДНК-связывающих доменов Chd1 и ISWI может объяснять похожее поведение этих белков в реакциях сборки и ремоделирования хроматина и частичное переключение функций этих двух белков.

Ранее нами показано, что CHD1 необходим для происходящей на уровне всего генома, независимой от репликации, сборки хроматина, содержащего гистон H3.3, в мужском pronucleuse *Drosophila* (Konev et al. 2007). Данное исследование впервые продемонстрировало необходимость АТФ-зависимых факторов для сборки хроматина *in vivo*. На модели *Drosophila* выявлено, что CHD1 влияет

и на введение гистона H3.3 в состав хроматина на более поздних стадиях развития, возможно в ходе процессов, ассоциированных с транскрипцией (Konev et al., 2007; Radman-Livaja et al., 2012), однако детальная роль CHD1 в сборке хроматина на этих стадиях остается невыясненной.

Самцы и самки генотипа *Chd1[1]/Df(2L)Exel7014*, нуль-мутантные по гену *Chd1*, являются жизнеспособными, но стерильными (Konev et al., 2007). При исследовании морфологии политенных хромосом нуль-мутантных личинок мы обнаружили, что, в то время как самки имеют в целом нормальную структуру хромосом, X-хромосома самцов становится укороченной и утолщенной, дисковый рисунок становится менее четким (см. рисунок, а). Такое проявление мутации гена *Chd1* сходно с деконденсацией X-хромосомы самцов, вызываемой мутациями гена *iswi* (Deuring et al., 2000), хотя и выражено в меньшей степени. CHD1 изначально охарактеризован как хроматинремоделирующий белок, связывающийся с регионами активной транскрипции — пуффами и междисками в политенных хромосомах личинок третьего возраста *Drosophila* (Stokes et al., 1996). Как и в случае мутаций *iswi*, в политенных хромосомах нуль-мутантных по гену *Chd1* особей, происходящих от гетерозиготных родителей, выявляется сниженное, но хорошо обнаруживаемое методом непрямой иммунофлуоресценции количество белка CHD1 материнского происхождения. При этом у мутантных самцов продукт гена *Chd1* материнского происхождения концентрируется в X-хромосоме, вызывая ее специфическое окрашивание антителами к белку CHD1 (см. рисунок, б). У самок специфического накопления материнского продукта гена *Chd1* в X-хромосоме не наблюдается. Окрашивание X-хромосомы самцов нуль-мутантных особей наблюдалось при использовании двух различных антител к белку CHD1, полученных против разных эпитопов этого белка, что свидетельствует о том, что такое окрашивание является специфичным. Такое же изменение структуры X-хромосомы у самцов и специфическое ее окрашивание с помощью антител к белку CHD1 мы наблюдали и при инактивации гена *Chd1* с помощью индукции интерферирующей РНК к гену *Chd1* в клетках слюнных желез. Таким образом, нами впервые показана роль Chd1 в регуляции структуры X-хромосомы самцов,

гены которой в процессе дозовой компенсации проявляют удвоенную транскрипционную активность по сравнению с генами каждой из X-хромосом самок. Обмен вариантного гистона H3.3 в подвергающейся дозовой компенсации X-хромосоме самцов происходит активнее, чем в геноме в целом (Mito et al., 2005). Чтобы проанализировать, не связано ли влияние мутаций гена *Chd1* на структуру X-хромосомы самцов с ролью этого фактора во включении вариантного гистона H3.3 в состав хроматина, мы получили особей *D. melanogaster*, несущих мутацию в гене *Chd1* (*Chd1[1]/Df(2L)Exel7014*) и делецию одного из двух генов, кодирующих вариантный гистон H3.3 — *His3.3B* (*His3.3B⁰* (Sakai et al., 2009)). Чтобы охарактеризовать степень изменения X-хромосомы, ее морфологию «вслепую» оценивали на закодированных микрофотографиях политепных хромосом по 4-балльной шкале (от 1 — хромосома нормальной структуры до 4 — X-хромосома укорочена, утолщена и деконденсирована). Сама по себе делеция гена *His3.3B* не приводит к изменению структуры X-хромосом самцов, однако у самцов генотипа *His3.3B⁰; Chd1[1]/Df(2L)Exel7014* морфология X-хромосомы изменена существенно сильнее (средняя оценка — 3.45) по сравнению с особями, несущими только мутации *Chd1* (средняя оценка — 2.26, $p < 0.05$, сравнение медиан по критерию Манна—Уитни). Усиление влияния *Chd1* при отсутствии одного из двух генов, кодирующих вариантный гистон H3.3, свидетельствует о том, что роль фактора CHD1 в контроле структуры X-хромосомы самцов может быть связана с его участием в обмене гистона H3.3. Феномен дозовой компенсации представляет уникальную возможность для изучения механизма корегуляции генетической активности.

Выявление неожиданной роли фактора CHD1 в контроле структуры X-хромосомы самцов дрозофилы открывает новые возможности для изучения регуляции активности генов и структуры хроматина на уровне целой хромосомы и исследования взаимодействия процессов включения вариантных гистонов в хроматин и ковалентной модификации гистонов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-99583 А).

Список литературы

- Конев А. Ю., Макасе А. А., Покровский Д. К., Игнатьева М. А., Ильина Ю. А., Котлованова Л. В. 2013. Изучение АТФ-зависимых факторов сборки и ремоделирования хроматина дрозофилы. Цитология. 55 (3) : 194—197. (Konov A. Yu., Makase A. A., Pokrovsky D. K., Ignatieva M. A., Ilyina Yu. A., Kotlovanova L. V. 2013. Studies of *Drosophila* ATP-dependent chromatin assembly and remodeling factors. Tsitologiya. 55 (3) : 194—197.)
- Becker P. B., Horz W. 2002. ATP-dependent nucleosome remodeling. Annu. Rev. Biochem. 71 : 247—273.
- Becker P. B., Workman J. L. 2013. Nucleosome remodeling and epigenetics. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 5 : a017905.
- Bone J. R., Lavender J., Richman R., Palmer M. J., Turner B. M., Kuroda M. I. 1994. Acetylated histone H4 on the male X chromosome is associated with dosage compensation in *Drosophila*. Genes Develop. 8 : 96—104.
- Delmas V., Stokes D. G., Perry R. P. 1993. A mammalian DNA-binding protein that contains a chromodomain and an SNF2/SWI2-like helicase domain. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 90 : 2414—2418.
- 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., Ignatyeva 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.
- Gallastegui E., Millan-Zambrano G., Terme J. M., Chavez S., Jordan A. 2011. Chromatin reassembly factors are involved in transcriptional interference promoting HIV latency. J. Virol. 85 : 3187—3202.
- Gaspar-Maia A., Alajem A., Polesso F., Sridharan R., Mason M. J., Heidersbach A., Ramalho-Santos J., McManus M. T., Plath K., Meshorer E., Ramalho-Santos M. 2009. Chd1 regulates open chromatin and pluripotency of embryonic stem cells. Nature. 460 : 863—868.
- Grasso C. S., Wu Y. M., Robinson D. R., Cao X., Dhanasekaran S. M., Khan A. P., Quist M. J., Jing X., Lonigro R. J., Brenner J. C., Asangani I. A., Ateeq B., Chun S. Y., Siddiqui J., Sam L., Anstett M., Mehra R., Prensner J. R., Palanisamy N., Ryslik G. A., Vandin F., Raphael B. J., Kunju L. P., Rhodes D. R., Pienta K. J., Chinnaiyan A. M., Tomlins S. A. 2012. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. Nature. 487 : 239—243.
- Haushalter K. A., Kadonaga J. T. 2003. Chromatin assembly by DNA-translocating motors. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4 : 613—620.
- Huang S., Gulzar Z. G., Salari K., Lapointe J., Brooks J. D., Pollack J. R. 2012. Recurrent deletion of CHD1 in prostate cancer with relevance to cell invasiveness. Oncogene. 31 : 4164—4170.
- Imhof A. 2003. Histone modifications — marks for gene expression? Adv. Exp. Med. Biol. 544 : 169—180.
- 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.
- Jenuwein T., Allis C. D. 2001. Translating the histone code. Science. 293 : 1074—1080.
- 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. CHD1 motor protein is required for deposition of histone variant H3.3 into chromatin *in vivo*. Science. 317 : 1087—1090.
- 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.
- Kusch 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.
- Liu J. C., Ferreira C. G., Yusufzai T. 2015. Human CHD2 is a chromatin assembly ATPase regulated by its chromo- and DNA-binding domains. J. Biol. Chem. 290 : 25—34.
- 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 analysis of the subunits of the chromatin assembly factor RSF. Mol. Cell. Biol. 23 : 6759—6768.
- Lusser A., Kadonaga J. T. 2003. Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. Bioessays. 25 : 1192—1200.
- Mito Y., Henikoff J. G., Henikoff S. 2005. Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. Nat. Genet. 37 : 1090—1097.
- Moretini S., Podhraski V., Lusser A. 2008. ATP-dependent chromatin remodeling enzymes and their various roles in cell cycle control. Front. Biosci. 13 : 5522—5532.

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

Radman-Livaja M., Quan T. K., Valenzuela L., Armstrong J. A., van Welsem T., Kim T., Lee L. J., Buratowski S., van Leeuwen F., Rando O. J., Hartzog G. A. 2012. A key role for Chd1 in histone H3 dynamics at the 3' ends of long genes in yeast. *PLoS Genet.* 8 : e1002811.

Robinson K. M., Schultz M. C. 2003. Replication-independent assembly of nucleosome arrays in a novel yeast chromatin reconstitution system involves antisilencing factor Asf1p and chromodomain protein Chd1p. *Mol. Cell. Biol.* 23 : 7937—7946.

Ryan D. P., Sundaramoorthy R., Martin D., Singh V., Owen-Hughes T. 2011. The DNA-binding domain of the Chd1 chromatin-remodelling enzyme contains SANT and SLIDE domains. *EMBO J.* 30 : 2596—2609.

Sakai A., Schwartz B. E., Goldstein S., Ahmad K. 2009. Transcriptional and developmental functions of the H3.3 histone variant in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 19 : 1816—1820.

Stokes D. G., Perry R. P. 1995. DNA-binding and chromatin localization properties of CHD1. *Mol. Cell. Biol.* 15 : 2745—2753.

Stokes D. G., Tartof K. D., Perry R. P. 1996. CHD1 is concentrated in interbands and puffed regions of *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93 : 7137—7142.

Turner B. M. 2000. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays.* 22 : 836—845.

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

Vanti M., Gallastegui E., Respalda I., Rodriguez-Gil A., Gomez-Herrerros F., Jimeno-Gonzalez S., Jordan A., Chavez S. 2009. Yeast genetic analysis reveals the involvement of chromatin reassembly factors in repressing HIV-1 basal transcription. *PLoS Genet.* 5 : e1000339.

Varga-Weisz P. 2001. ATP-dependent chromatin remodeling factors: nucleosome shufflers with many missions. *Oncogene.* 20 : 3076—3085.

Поступила 1 XII 2015

THE INFLUENCE OF THE *Chd1* CHROMATIN ASSEMBLY AND REMODELING FACTOR MUTATIONS ON *DROSOPHILA* POLYTHENE CHROMOSOME ORGANIZATION

A. Yu. Konev,¹ A. A. Tiutiunnik, I. L. Baranovskaya

Petersburg Nuclear Physics Institute National Research Center «Kurchatov Institute», Gatchina, 188300;

¹ e-mail: konev.alexander@gmail.com

Chromatin assembly is a fundamental 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. ATP-dependent chromatin assembly and remodeling factor CHD1 (Chromo-ATPase/Helicase-DNA-binding protein 1) is involved in multiple cellular processes, such as the replication independent assembly of nucleosomes containing the variant histone H3.3, regulation of transcription initiation, elongation and termination; determination of stem cell pluripotency and in cancer development. We have shown that mutations in *Drosophila Chd1* gene induce a decondensation of the male X chromosome, similar to that induced by mutations in the *iswi* nucleosome remodeling factor. An effect of *Chd1* null mutation can be increased by deficiency of one of the genes, encoding variant histone H3.3, *His 3.3 B*, suggesting that the role of CHD1 in the control of male X chromosome organization can be mediated by CHD1 activity in H3.3 histone deposition and exchange.

Key words: chromatin, chromatin assembly, chromatin-remodeling factor CHD1, variant histones, polytene chromosome, dosage compensation.