

Т. Ю. Старкова^{1,2}, *А. М. Полянничко*^{1,2}, *Т. О. Артамонова*³, *М. А. Ходорковский*³,
Е. В. Чихиржина^{1,2}, *А. Н. Томлин*¹

АНАЛИЗ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ ПОДТИПОВ ГИСТОНА H1 МЫШИ МЕТОДОМ МАЛДИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ*

¹ Институт цитологии Российской академии наук,

Российская Федерация, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4

² Санкт-Петербургский государственный университет,

Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

³ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,

Российская Федерация, Санкт-Петербург, 194064, Политехническая ул., 20

Методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) масс-спектрометрии изучены посттрансляционные модификации подтипов линкерного гистона H1 тимуса мыши. В работе показано, что среди шести выявленных подтипов гистона H1 (H1.0, H1.1, H1.2, H1.3, H1.4 и H1.5), экстрагированных из ткани зобной железы мыши, H1.1 подтип является доминирующим. Анализ полученных результатов позволил сделать заключение, что характер и расположение модификаций в области глобулярных доменов подтипов H1.2–H1.4 высоко консервативны. Большинство идентифицированных положений метилирования и ацетилирования подтипов гистона H1, расположенных в области глобулярных доменов белков, таких как K34, K52, K64, K85 и K97, согласуются с данными литературных источников. Впервые показано метилирование лизина в положении 34 в H1.4 (meK34–mH1.4) и H1.1 (meK34–mH1.4) подтипах. Библиогр. 39 назв. Ил. 1. Табл. 2.

Ключевые слова: линкерный гистон H1, посттрансляционные модификации, 2D-электрофорез, МАЛДИ масс-спектрометрия.

T. Yu. Starkova^{1,2}, *A. M. Polyanichko*^{1,2}, *T. O. Artamonova*³,
*M. A. Khodorkovskii*³, *E. V. Chikhirzhina*^{1,2}, *A. N. Tomilin*¹

THE ANALYSIS OF POST-TRANSLATIONAL MODIFICATION OF MOUSE H1 VARIANTS BY MALDI MASS SPECTROMETRY

¹ Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences,

4, Tikhoretskiy pr., St. Petersburg, 194064, Russian Federation

² St. Petersburg State University,

7–9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation

³ Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University,

20, Politekhicheskaya ul., St. Petersburg, 194064, Russian Federation

The post-translational modifications of linker histone H1 variants from mouse thymus have been studied by MALDI mass spectrometry (matrix-assisted laser desorption/ionization). We have identified six subtypes of histone H1, extracted from the mouse thymus, such as H1.0, H1.1, H1.2, H1.3, H1.4 and H1.5. We have shown that the H1.1 variant is dominant. Analysis of the MS results led us to the conclusion that the types and positions of the posttranslational modifications in H1.2–H1.4 variants within the globular domain are highly conserved. The majority of the identified methylation and acetylation sites of the linker histone H1 subtypes occur in the globular domains of the proteins, e. g. K34, K52, K64, K85 and K97. We have revealed for the first time

* По материалам IV конференции «Современные проблемы молекулярной биофизики», посвящённой 50-летию специализации «Молекулярная биофизика» на физическом факультете и 105-летию со дня рождения профессора Э.В. Фрисман, 14–15 июня 2016 г., СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия, URL: <http://molbioph.niif.spbu.ru/conference>.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (16-34-60174, 15-04-06993).

© Санкт-Петербургский государственный университет, 2016

methylation site of lysine at position 34 in H1.4 (meK34–mH1.4) and H1.1 (meK34–mH1.4) variants. Refs 39. Figs 1. Tables 2.

Keywords: linker histone H1, post-translational modifications, 2D electrophoresis, MALDI mass spectrometry.

Введение. Хроматин эукариотических клеток представляет собой высоко динамичный ДНК-белковый комплекс. Его фундаментальной структурной единицей является нуклеосома, образованная белковой сердцевиной, состоящей из тетрамера (H3-H4)₂ и двух димеров H2A-H2B, вокруг которой уложено по спирали 146 п. о. ДНК. Линкерный гистон H1, взаимодействуя с ДНК на входе/выходе из нуклеосомы, принимает активное участие в формировании следующего уровня структурной организации хроматина — 30-нм фибриллы [1–8].

В клетках млекопитающих насчитывается 11 подтипов гистона H1, каждый из них кодируется своим геном [9]. Гистоны H1t, H1T2, H1oo и H1LS1 характерны для спермий-специфических клеток. Остальные семь — H1.0, H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5 и H1x — присутствуют в соматических клетках млекопитающих.

Несмотря на значимую роль линкерного гистона H1 в структурной организации [3–8] и функционировании хроматина [10–13], модификации подтипов H1 мало изучены. В своей работе мы проанализировали модификации подтипов гистона H1 мыши методом МАЛДИ масс-спектрометрии и предприняли попытку описать их потенциальную роль в структурно-функциональной организации хроматина.

Материалы и методы.

Выделение гистона H1. Гистон H1 выделяли из вилочковой железы (известной также как зубная железа, или тимус) мыши. Отобранный непосредственно после забоя животного тимус быстро замораживали в жидком азоте и в дальнейшем хранили при температуре –70°C. Экстракцию белка проводили 5% перхлорной кислотой с последующим осаждением (–20°C, в течение ночи), подкисленным до 0,2% (v/v) HCl ацетоном, согласно описанной ранее методике [14–17].

2D-электрофорез. Подтипы гистонов H1 мыши разделяли с помощью двумерного электрофореза в ПААГ, согласно ранее описанному протоколу [18], используя электрофоретическую систему PROTEAN II xi (Bio Rad, США) с размером геля 16 см × 20 см × 1,5 мм. Разделение в первом направлении проводили в геле, содержащем 5М мочевины (15% акриламид, 0,5% N,N-метилен-бис-акриламид, 5М мочевины, 0,9N уксусная кислота) в растворе 0,9N уксусной кислоты в течение 24 ч при напряжении 50 В. После чего полученный гель, содержащий белок, инкубировали в буфере для проб (100мМ Tris-HCl (pH 6,8), 10% глицерин, 2,1% ДДС-Na и 2% 2-меркаптоэтанол) в течение 2 ч при комнатной температуре. Второе направление электрофореза проводили в трис-глицериновом буфере (pH 8,34) в течение 22 ч при силе тока, равной 30 мА, согласно стандартному протоколу ступенчатого денатурирующего электрофореза по методу Лэммли [19–22].

Белковые зоны окрашивали с помощью красителя Кумасси G250 (Bio-Rad, США).

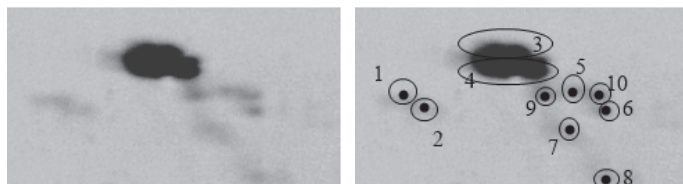
МАЛДИ масс-спектрометрия. Полученные после двумерного разделения белковые зоны, содержащие гистон H1, вырезали из геля и обрабатывали раствором 40% ацетонитрила в 0,1М бикарбонате аммония при температуре 37°C в течение 15 мин, после чего проводили ферментативный гидролиз трипсином (4 ч, 37°C) непосредственно в геле. Реакцию трипсинолиза останавливали добавляя в реакционную смесь трифторуксусную кислоту и ацетонитрил до концентрации 0,5 и 10% соответственно (полученную после остановки трипсинолиза смесь для удобства обозначим «Mix»). Для масс-спектрометрического анализа непосредственно на мишени смешивали 0,6 мкл «Mix»

с 0,3 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (20 мг/мл в 50% ацетонитриле, 0,1% трифторуксусной кислоты) и высушивали смесь на воздухе.

Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре FT(ICR)MS Varian 902-MS MALDI. Полученные масс-спектры обрабатывали с использованием программных пакетов ProteinProspector и Mascot (<http://prospector.ucsf.edu>; <http://www.matrix-science.com>).

Результаты и обсуждение. К настоящему времени посттрансляционные модификации коровых гистонов и их роль в структурной организации и функционировании хроматина описаны достаточно подробно [10–11], тогда как модификации линкерного гистона H1 мало изучены.

Согласно литературным данным, быстрое замораживание ткани в жидком азоте непосредственно после забоя животного и использование протокола «прямой» экстракции белка, минуя стадию выделения ядер, приводит к сохранению местоположения и характера большинства посттрансляционных модификаций белковых молекул [9, 14–17].



Двумерный гель-электрофорез H1-обогащённой фракции тимуса мыши:

1 — HMGB1; 2 — HMGB2; 3 — H1.3, H1.4; 4 — H1.1; 5 — H1.4, H1.5; 6 — H1.5; 8 — H1.0; однозначно идентифицировать белки, составляющие фракции № 7, 9 и 10 не удалось

В результате разделения подтипов гистона H1 было получено 10 белковых зон, в пяти из которых (№ 3–6, 8) методом МАЛДИ масс-спектрометрии были обнаружены подтипы гистона H1 (см. рисунок). Две зоны содержали белки HMGB1 (зона № 1) и HMGB2 (зона № 2). Зоны № 7, 9 и 10 также были подвергнуты спектральному анализу (результаты не представлены), однако в этом случае однозначно соотнести белки в составе этих зон с определенными подтипами H1 не удалось. Данные регистрации масс-спектров подтипов гистона H1 тимуса мыши представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты анализа подтипов гистона H1 тимуса мыши методом МАЛДИ масс-спектрометрии

H1 t	m/z	I	M/z теор.	dm/z	Модификация	N (I)	N (II)	Последовательность
H1.2	627,39346	12,646	627,3937	0,0002		27	32	(K)KPAGVR(R)
H1.1	627,39346		627,3937	0,0002	1Methyl	30	35	(K)AAAPRK(K)
H1.1	845,50922	4,123	845,5091	–0,0001		57	65	(R)SGVSLAALK(K)
H1.2	845,50922	4,123	845,5091	–0,0001		55	63	(R)SGVSLAALK(K)
H1.3	845,50922	4,123	845,5091	–0,0001		56	64	(R)SGVSLAALK(K)
H1.4	845,50922	4,123	845,5091	–0,0001		55	63	(R)SGVSLAALK(K)
H1.4	845,50922	4,123	845,5091	–0,0001	1Acetyl 1Methyl	150	156	(K)STKKT PK(K)
H1.1	973,60349	22,471	973,6041	0,0006	1Acetyl 1Methyl	57	66	(R)SGVSLAALKK(S)

H1 t	m/z	I	M/z теор.	dm/z	Модификация	N (I)	N (II)	Последовательность
H1.2	973,60349	22,471	973,6041	0,0006		55	64	(R)SGVSLAALKK(A)
H1.3	973,60349	22,471	973,6041	0,0006		56	65	(R)SGVSLAALKK(A)
H1.4	973,60349	22,471	973,6041	0,0006		55	64	(R)SGVSLAALKK(A)
H1.4	973,60349	22,471	973,6041	0,0006		149	156	(K)KSTKKTTPK(K)
H1.4	973,60349	22,471	973,6041	0,0006	1Acetyl 1Methyl	150	157	(K)STKKTTPK(K)
H1.2	1198,6681	14,211	1198,668	-0,0003	1Acetyl 1Methyl	35	46	(K)ASGPPVSELITK(A)
H1.3	1198,6681	14,211	1198,668	-0,0003		36	47	(K)ASGPPVSELITK(A)
H1.3	1198,6691	25,372	1198,668	-0,0013		36	47	(K)ASGPPVSELITK(A)
H1.4	1198,6691	25,372	1198,668	-0,0013		35	46	(K)ASGPPVSELITK(A)
H1.2	1198,6691	25,372	1198,668	-0,0013		35	46	(K)ASGPPVSELITK(A)
H1.4	1198,6679	20,744	1198,6678	-0,0001		34	46	(K)ASGPPVSELITK(A)
H1.3	1198,6679	20,74	1198,6678	-0,0001		36	47	(K)ASGPPVSELITK(A)
H1.2	1198,6679	20,744	1198,6678	-0,0001		35	46	(K)ASGPPVSELITK(A)
H1.5	1212,6838	4,055	1212,683	-0,0004		38	49	(K)ATGPPVSELITK(A)
H1.4	1212,6838	4,055	1212,683	-0,0004	1Methyl	35	46	(K)ASGPPVSELITK(A)
H1.3	1212,6838	4,055	1212,683	-0,0004	1Methyl	36	47	(K)ASGPPVSELITK(A)
H1.2	1212,6838	4,055	1212,683	-0,0004	1Methyl	35	46	(K)ASGPPVSELITK(A)
H1.5	1212,6826	8,12	1212,6834	0,0008		38	49	(K)ATGPPVSELITK(A)
H1.4	1212,6826	8,118	1212,6834	0,0008	1Methyl	35	46	(K)ASGPPVSELITK(A)
H1.2	1212,6826	8,118	1212,6834	0,0008	1Methyl	35	46	(K)ASGPPVSELITK(A)
H1.2	1220,6538	4,694	1220,651	-0,0027	1Acetyl 1Methyl 1Phospho	23	33	(K)KAAKKAGGTPR(K)
H1.2	1220,6538	4,694	1220,651	-0,0027	1Acetyl 1Methyl 1Phospho	24	34	(K)AAKKAGGTPRK(A)
H1.4	1235,6681	5,077	1235,663	-0,0051		64	75	(K)KALAAA-GYDVEK(N)
H1.3	1235,6681	5,077	1235,663	-0,0051		65	76	(K)KALAAA-GYDVEK(N)
H1.2	1235,6681	5,077	1235,663	-0,0051		64	75	(K)KALAAA-GYDVEK(N)
H1.5	1235,6681	5,077	1235,663	-0,0051	1Methyl	67	78	(K)KALAAAG-GYDVEK(N)
H1.1	1235,6681	5,077	1235,663	-0,0051		67	78	(K)KALAAA-GYDVEK(N)
H1.0	1235,6687	4,77	1235,6630	-0,0057		98	108	(K)SDEPK-KSVAFK(K)
H1.5	1235,6687	4,77	1235,6631	-0,0056	2Acetyl 1Methyl 1Phospho	114	124	(K)AASGEAKPKAK(K)
H1.5	1235,6687	4,77	1235,6630	-0,0057	1Methyl	67	78	(K)KALAA-GYDVEK(N)
H1.4	1235,6687	4,77	1235,6630	-0,0057		64	75	(K)KALAAA-GYDVEK(N)

H1 t	m/z	I	M/z геор.	dm/z	Модификация	N (I)	N (II)	Последовательность
H1.3	1235,6687	4,77	1235,6630	-0,0057		65	76	(K)KALAAA- GYDVEK(N)
H1.1	1235,6687	4,77	1235,6630	-0,0057		67	78	(K)KALAAA- GYDVEK(N)
H1.4	1257,6377	7,38	1257,637	-0,0009	4Methyl 2Phospho	200	209	(K)ASKPKASKPK(A)
H1.4	1257,6377	7,38	1257,637	-0,0009	3Methyl 2Phospho	203	212	(K)TSKPKAAKPK(K)
H1.4	1257,6377	7,38	1257,637	-0,0009	3Methyl 2Phospho	198	207	(K)AAKPKTSKPK(A)
H1.1	1258,7493	3,689	1258,748	-0,0015		55	66	(K)ERSGVSLAALKK(S)
H1.2	1258,7493	3,689	1258,748	-0,0015		53	64	(K)ERSGVSLAALKK(A)
H1.3	1258,7493	3,689	1258,748	-0,0015		54	65	(K)ERSGVSLAALKK(A)
H1.4	1258,7493	3,689	1258,748	-0,0015		53	64	(K)ERSGVSLAALKK(A)
H1.1	1320,5817	3,892	1320,585	0,0031	2Acetyl 2Phospho	112	121	(K)KAESKAITTK(V)
H1.2	1326,7632	28,988	1326,763	-0,0005		34	46	(R)KASGPP- VSELITK(A)
H1.3	1326,7632	28,988	1326,763	-0,0005		35	47	(R)KASGPP- VSELITK(A)
H1.2	1399,6798	1,809	1399,675	-0,0052	1Acetyl 2Phospho	137	148	(K)KPKKAT- GAATPK(K)
H1.3	1399,6798	1,809	1399,675	-0,0052	1Acetyl 2Phospho	138	149	(K)KPKKAT- GAATPK(K)
H1.1	1441,76	3,342	1441,766	0,0062	1Phospho	113	125	(K)AESKAI- TTKVSVK(A)
H1.2	1578,7875	38,925	1578,787	-0,0004		65	79	(K)ALAAAGY- DVEKNSR(I)
H1.3	1578,7875	38,925	1578,787	-0,0004		66	80	(K)ALAAAGY- DVEKNSR(I)
H1.4	1578,7875	38,925	1578,787	-0,0004		65	79	(K)ALAAAGY- DVEKNSR(I)
H1.5	1578,7875	38,925	1578,787	-0,0004	1Methyl	65	79	(K)ALAAGGY- DVEKNSR(I)
H1.3	1594,783	12,085	1594,782	-0,0010		67	81	(K)SLAAAGY- DVEKNSR(I)
H1.3	1706,8829	5,0000	1706,882	-0,0009		65	80	(K)KALAAAGY- DVEKNSR(I)
H1.4	1706,8829	5,0000	1706,882	-0,0009		64	79	(K)KALAAAGY- DVEKNSR(I)
H1.5	1706,8829	5,0000	1706,882	-0,0009	1Methyl	64	79	(K)KALAAGGY- DVEKNSR(I)
H1.3	2012,1385	9,755	2012,139	0,0001		35	54	(R)KKPAGPSVSE- LIVQAVSSSK(E)
H1.2	2042,0397	64,076	2042,043	0,0033	1Methyl 1Phospho	64	81	(K)KALAAAGYD- VEKNSRIK(L)

С помощью МАЛДИ масс-спектрометрии мы идентифицировали 6 подтипов гистона Н1 (Н1.0, Н1.1, Н1.2, Н1.3, Н1.4 и Н1.5), выделенных из зобной железы мыши. В связи с низким содержанием Н1.0 в пробе провести детальный анализ его посттрансляционных модификаций не удалось. Согласно полученным данным, содержание гистона Н1.1 в исследуемом типе ткани является доминирующим по сравнению с остальными подтипами, что согласуется с ранее опубликованными данными [23].

Выявленные посттрансляционные модификации подтипов гистона Н1 тимуса мыши представлены в табл. 2.

Таблица 2

Посттрансляционные модификации гистона Н1 тимуса мыши

Подтип Н1	Модификации	Положение модификации
mН1.1	Ацетилирование	K17; K116; K131
	Метилирование	K35
	Фосфорилирование	S115; S119
mН1.2	Ацетилирование	K17; K122; K127; K137; K186; K189
	Метилирование	K34; K46; K64; K129; K148/or 149/or 152
	Фосфорилирование	T142; T146; T154
mН1.3	Ацетилирование	K17; K26; K122; K126; K139; K143/or 145; K188
	Метилирование	K35; K47
	Фосфорилирование	S147; S149
mН1.4	Ацетилирование	K17; K26; K151
	Метилирование	K34; K46; K152; K 202/or 205/or 206; K210
	Фосфорилирование	S27; T203/or S204
mН1.5	Ацетилирование	K17; K150/or 151/or 154
	Метилирование	K34; K64
	Фосфорилирование	T152; S195; S197

На сегодняшний день фосфорилирование является наиболее изученной модификацией линкерного гистона Н1 [24–27]. В зависимости от фазы клеточного цикла фосфорилирование гистона Н1 можно разбить на две стадии [24, 26–27]. Первым в интерфазе происходит частичное фосфорилирование подтипов Н1.2 и Н1.4 по остаткам серина в положениях S173 и S187 соответственно, приводящее к релаксации хроматина и активированию транскрипции. После этого на стадии митоза наблюдается тотальное фосфорилирование в S/ТРХК мотивах (Х-любая аминокислота) [24, 26–28], способствующее конденсации ДНК и разделению хромосомы на дочерние хроматиды [29].

В результате анализа данных масс-спектрометрии нам также удалось идентифицировать ряд сайтов фосфорилирования гистона Н1 мыши, а именно: рТ146-Н1.2, рТ154-Н1.2, рТ147-Н1.3, рТ152-Н1.5. Все выявленные участки фосфорилирования подтипов линкерного гистона Н1 расположены в области S/ТРХК мотивов. Данное обстоятельство свидетельствует о том, что хроматин находится в частично конденсированном состоянии.

Большинство идентифицированных участков метилирования и ацетилирования подтипов гистона Н1, расположенных в области глобулярных доменов белков, такие как K34, K52, K64, K85 и K97, согласуются с описанными ранее данными [23]. В то же

время метилирование лизина в положении 34 в гистонах H1.4 (meK34-mH1.4) и ацетилирование лизина в положении 26 в гистоне H1.4 (acK26-mH1.4) было нами выявлено впервые.

Биологическая роль большинства модификаций глобулярного домена белка H1 остается до конца не изученной. Согласно литературным данным, он характеризуется наличием ацетилирования гистона H1.4 в положении K34 [30], которое является необходимым условием взаимодействия фактора транскрипции TFIID (от англ. Transcription Factor II D) с ДНК. Данное обстоятельство может объясняться тем, что формирование дополнительного отрицательного заряда в белке при ацетилировании способствует ослаблению его взаимодействия с ДНК, что, в свою очередь, облегчает связывание транскрипционных факторов с промоторной областью.

Полученные данные позволили впервые выявить метилированное состояние остатка лизина K34 гистона H1.4 зубной железы мыши. Деацетилирование K34-mH1.4, вероятно, должно приводить к нарушению связывания фактора транскрипции TFIID с промоторными областями транскрипционно активных генов и, как следствие, к снижению уровня транскрипционной активности клеток.

Совпадение положения сайтов метилирования и ацетилирования в позиции K34 в области глобулярного домена белка показывает, что K34 является бивалентным сайтом «ацетилирования/метилирования». Таким образом, характер модификации в данной области может определять «активное/неактивное» состояния хроматина.

Впервые нами показано, что гистон H1.4 может быть ацетилирован в положении K26. Согласно литературным данным метилирование гистона H1.4 в данном сайте (meK26-H1.4) является необходимым условием распознавания и связывания с H1.4 гетерохроматинового белка HP1 [31], что обуславливает формирование областей хроматина с пониженным уровнем транскрипции. Деметилирование K26-H1.4 приводит к блокированию белок-белкового взаимодействия и, следовательно, к активации транскрипционной активности [31]. В связи с этим ацетилирование K26 можно рассматривать как способ деметилирования, что, согласно литературным данным, свидетельствует об увеличении уровня транскрипционной активности клеток по сравнению с метилированным состоянием. По-видимому, K26 гистона H1.4 является вторым идентифицированным нами бивалентным сайтом типа «ацетилирование/метилирование», с помощью которого может осуществляться регулирование состояния хроматина — «активное/неактивное».

Кроме того, вследствие фосфорилирования серина в положении S27 лизин 26 гистона H1.4 может входить в состав так называемой «methyl/phos switch» области. Подобные «methyl/phos switch» домены гистона H1 были идентифицированы в клетках HeLa человека [32] и свойственны для коровых гистонов, например K9/S10 гистона H3 [33]. Механизм функционирования данной регуляторной области гистона H1 пока до конца не изучен. Известно, что метилирование K9 является условием связывания гистона H3 с гетерохроматиновым белком HP1, что, в свою очередь, способствует конденсации хроматина [34–35]. При этом фосфорилирование H3 в позиции S10 на стадии митоза приводит к высвобождению HP1 и увеличению уровня транскрипции [25].

Помимо сайтов «ацетилирования/метилирования» в области глобулярного домена подтипов линкерного гистона H1 мы впервые идентифицировали ещё две области ацетилирования — K17 и K139–K150, расположенные в N- и C-концевых участках белков. Мы предполагаем, что экранировка положительного заряда остатков лизина в данных областях полипептидной цепи может приводить к ослаблению связывания гистона H1 с ДНК и, как следствие, взаимодействию его N- и C-концевых сегментов с другими

ядерными белками, в том числе с негистоновыми хромосомными белками семейства HMGB (от англ. High Mobility group Box) [36–39].

В связи с тем, что биологическая роль большинства идентифицированных модификаций ядерных белков хроматина неясна, исследование посттрансляционных модификаций линкерного гистона H1, выполняющего структурно-регуляторные функции в хроматине, представляется, на наш взгляд, перспективным. Мы надеемся, что полученные нами результаты помогут объяснить особенности регуляции состояний хроматина, корректируемых посттрансляционными модификациями подтипов линкерного гистона H1 млекопитающих.

* * *

Работа выполнена на базе лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук.

Масс-спектры белков H1 получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий СПбГПУ» на базе ФГАОУ ВО СПбПУ.

Литература

1. Luger K., Dechassa M. L., Tremethick D. J. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2012. Vol. 13. P. 436–447.
2. Wood C. M., Nicholson J. M., Lambert S. J., Chantalat L., Reynolds C. D., Baldwin J. P. High-resolution structure of the native histone octamer // *Acta Cryst. (F)*. 2015. Vol. 61. P. 541–545.
3. Harp J. M., Hanson B. L., Timm D. E., Bunick G. J. Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5 Å resolution // *Acta Cryst. (D)*. 2000. Vol. 56. P. 1513–1534.
4. White A. E., Hieb A. R., Luger K. A quantitative investigation of linker histone interactions with nucleosomes and chromatin // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. P. 19122.
5. Чихиржина Е. В., Костылева Е. И., Рамм Е. И., Воробьев В. И. Исследование компактизации хроматина с использованием модельной системы ДНК-белковых комплексов // *Цитология*. 1998. Т. 40, № 10. С. 883–888.
6. Поляничко А. М., Чихиржина Е. В., Андрущенко В. В., Визер Г., Воробьев В. И. Спектральные исследования структуры комплексов ДНК с ионами Mn^{2+} в УФ- и ИК-диапазонах // *Биофизика*. 2005. Т. 50. С. 810–817.
7. Поляничко А. М., Леоненко З. В., Крамб Д., Визер Г., Воробьев В. И., Чихиржина Е. В. Структурная организация комплексов ДНК с белками HMGB1 и HMGB1-(A+B) // *Биофизика*. 2008. Т. 53. С. 407–416.
8. Polyanychko A., Chikhirzhina E. Interaction between nonhistone protein HMGB1 and linker histone H1 facilitates the formation of structurally ordered DNA-protein complexes // *Spectroscopy*. 2012. Vol. 27. P. 393–398.
9. Zougman A., Wisniewski J. R. Beyond linker histones and high mobility group proteins: global profiling of perchloric acid soluble protein // *J. Proteome Res.* 2006. Vol. 5. P. 925–934.
10. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function // *Cell*. 2007. Vol. 128. P. 693–705.
11. Histone modifications // *Encyclopedia of molecular cell biology and molecular medicine* / ed. by B. Xhemalce, M. A. Dawson, A. J. Bannister. John Wiley and Sons, 2011.
12. Heintzman N. D., Stuart R. K., Hon G., Fu Y., Ching C. W., Hawkins R. D., Barrera L. O., Van Calcar S., Qu C., Ching K. A., Wang W., Weng Z., Green R. D., Crawford G. E., Ren B. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome // *Nat. Genet.* 2007. Vol. 39. P. 311–318.
13. Wisniewski J. R., Zougman A., Krüger S., Mann M. Mass spectrometric mapping of linker histone H1 variants reveals multiple acetylations, methylations, and phosphorylation as well as differences between cell culture and tissue // *Mol. Cell Proteomics*. 2007. Vol. 6. P. 72–87.
14. Chikhirzhina E. V., Starkova T. Y., Kostyleva E. I., Chikhirzhina G. I., Vorobiev V. I., Polyanychko A. M. Interaction of DNA with sperm-specific histones of the H1 family // *Cell and Tissue Biol.* 2011. Vol. 5. P. 536–542.

15. Chikhirzhina E., Starkova T., Kostyleva E., Polyanichko A. Spectroscopic study of the interaction of DNA with the linker histone H1 from starfish sperm reveals mechanisms of the formation of supercondensed sperm chromatin // Spectroscopy: Int. J. 2012. Vol. 27. P. 433–440.
16. Ramm E. I., Chikhirzhina E. V., Kostyleva E. I., Vorob'ev V. I. Conformational features of linker proteins of supercompact chromatin from marine invertebrate sperm // Biokhimiia. 1995. Vol. 60. P. 150–158.
17. Chikhirzhina E. V., Kostyleva E. I., Ramm E. I., Vorob'ev V. I. Chromatin compactization in DNA-protein complexes model system // Tsitologiya. 1998. Vol. 40. P. 883–888.
18. Kowalski A., Palyga J. High-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: A tool for identification of polymorphic and modified linker histone // Components Gel Electrophoresis — Principles and Basics. 2012. P. 117–136.
19. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227, N 5259. P. 680–685.
20. Поляничко А. М., Чихиржина Е. В., Андрущенко В. В., Костылева Е. И., Визер Г., Воробьев В. И. Влияние ионов Ca^{2+} на компактизацию ДНК в комплексе с негистоновым хромосомным белком HMGB1 // Молек. биология. 2004. Т. 38. С. 701–712.
21. Чихиржина Е. В., Поляничко А. М., Скворцов А. Н., Костылева Е. И., Уссье К., Воробьев В. И. HMGB1-домены: заложники обстоятельств // Молек. биология. 2002. Т. 36. С. 525–531.
22. Chikhirzhina E., Starkova T., Kostyleva E., Polyanichko A. Spectroscopic study of the interaction of DNA with the linker histone H1 from starfish sperm reveals mechanisms of the formation of supercondensed sperm chromatin // Spectroscopy. 2012. Vol. 27. P. 433–440.
23. Happel N., Doenecke D. Histone H1 and its isoforms: Contribution to chromatin structure and function // Gene. 2009. Vol. 431. P. 1–12.
24. Talasz H., Sapojnikova N., Helliger W., Lindner H., Puschendorf B. In vitro binding of H1 histone variants to nucleosomal organized mouse mammary tumor virus long terminal repeat promoter // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 32236–32243.
25. Berger S. L. Histone modifications in transcriptional regulation // Curr. Opin. Genet. Dev. 2002. Vol. 12. P. 142–148.
26. Harshman S. W., Young N. L., Parthun M. R., Freitas M. A. H1 histones: current perspectives and challenges // Nucl. Acids Res. 2013. Vol. 41. P. 9593–9609.
27. Alexandrow M. G., Hamlin J. L. Chromatin decondensation in S-phase involves recruitment of Cdk2 by Cdc45 and histone H1 phosphorylation // JCB. 2005. Vol. 168. P. 875–886.
28. Bharath M. M., Ramesh S., Chandra N. R., Rao M. R. Identification of a 34 amino acid stretch within the C-terminus of histone H1 as the DNA-condensing domain by site-directed mutagenesis // Biochemistry. 2002. Vol. 41. P. 7617–7627.
29. Sarg B., Helliger W., Talasz H., Forg B., Lindner H. H. Histone H1 phosphorylation occurs site-specifically during interphase and mitosis: identification of a novel phosphorylation site on histone H1 // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281. P. 6573–6580.
30. Goytisolo F. A., Gerchman S. E., Yu X., Rees C., Graziano V., Ramakrishnan V., Thomas J. O. Identification of two DNA-binding sites on the globular domain of histone H5 // EMBO J. 1996. Vol. 15. P. 3421–3429.
31. Trojer P., Zhang J., Yonezawa M., Schmidt A., Zheng H., Jenuwein T., Reinberg D. Dynamic histone H1 isotype 4 methylation and demethylation by histone lysine methyltransferase G9a/KMT1C and the jumonji domain-containing JMJD2/KDM4 proteins // J. Biol. Chem. 2009. Vol. 284. P. 8395–8405.
32. Dawjat S., Zeissler U., Waldmann T., Happel N., Schneider R. HP1 binds specifically to lys26-methylated histone H1.4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation block HP1 binding // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280. P. 38090–38095.
33. Lachner M., Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation // Curr. Opin. Cell Biol. 2002. Vol. 14. P. 286–298.
34. Li Y., Danzer J. R., Alvarez P., Belmont A. S., Wallrath L. L. Effects of tethering HP1 to euchromatic regions of the Drosophila genome // Development. 2003. Vol. 130. P. 1817–1824.
35. Ayyanathan K., Lechner M. S., Bell P., Maul G. G., Schultz D. C., Yamada Y., Tanaka K., Tori-goe K., Rauscher F. J. III. Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation // Genes Dev. 2003. Vol. 17. P. 1855–1869.
36. Cato L., Stott K., Watson M., Thomas J. O. The Interaction of HMGB1 and Linker Histones Occurs Through their Acidic and Basic Tails // J. Mol. Biol. 2008. Vol. 384. P. 1262–1272.

37. Polyanichko A. M., Chikhirzhina E. V. Interaction between DNA and chromosomal proteins HMGB1 and H1 studied by IR/VCD spectroscopy // *J. Mol. Struct.* 2013. Vol. 1044. P. 167–172.
38. Chikhirzhina E. V., Polyanichko A. M., Kostyleva E. I., Vorobyev V. I. Structure of DNA complexes with chromosomal protein HMGB1 and histone H1 in the presence of manganese ions: I. circular dichroism spectroscopy // *Mol. Biol.* 2011. Vol. 45. P. 318–326.
39. Polyanichko A. M., Vorob'ev V. I., Chikhirzhina E. V. Structure of DNA complexes with chromosomal protein HMGB1 and histone H1 in the presence of manganese ions: 2. vibrational circular dichroism spectroscopy // *Mol. Biol.* 2013. Vol. 47. P. 299–306.

References

- Luger K., Dechassa M. L., Tremethick D. J. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2012, vol. 13, pp. 436–447.
- Wood C. M., Nicholson J. M., Lambert S. J., Chantalat L., Reynolds C. D., Baldwin J. P. High-resolution structure of the native histone octamer. *Acta Cryst. (F)*, 2015, vol. 61, pp. 541–545.
- Harp J. M., Hanson B. L., Timm D. E., Bunick G. J. Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5 Å resolution. *Acta Cryst. (D)*, 2000, vol. 56, pp. 1513–1534.
- White A. E., Hieb A. R., Luger K. A quantitative investigation of linker histone interactions with nucleosomes and chromatin. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6, pp. 19122.
- Chikhirzhina E. V., Kostyleva E. I., Ramm E. I., Vorob'ev V. I. Issledovanie kompaktizatsii khromatina s ispol'zovaniem model'noi sistemy DNK-belkovykh kompleksov [Chromatin compactification using a model system of DNA-protein complexes]. *Tsitologiya*, 1998, vol. 40, no. 10, pp. 883–888. (In Russian)
- Polianichko A. M., Chikhirzhina E. V., Andrushchenko V. V., Vizer G., Vorob'ev V. I. Spektral'nye issledovaniia struktury kompleksov DNK s ionami Mn^{2+} v UF- i IK-diapazonakh [Spectroscopic investigations of the structure of DNA complexes with Mn^{2+} in UV and IR regions]. *Biofizika [Biophysics]*, 2005, vol. 50, pp. 810–817. (In Russian)
- Polianichko A. M., Leonenko Z. V., Kramb D., Vizer G., Vorob'ev V. I., Chikhirzhina E. V. Strukturalnaia organizatsiia kompleksov DNK s belkami HMGB1 i HMGB1-(A + B) [Visualization of DNA complexes with HMGB1 and its C-truncated form HMGB1-(A + B)]. *Biofizika [Biophysics]*, 2008, vol. 53, pp. 407–416. (In Russian)
- Polyanichko A., Chikhirzhina E. Interaction between nonhistone protein HMGB1 and linker histone H1 facilitates the formation of structurally ordered DNA-protein complexes. *Spectroscopy*, 2012, vol. 27, pp. 393–398.
- Zougman A., Wisniewski J. R. Beyond linker histones and high mobility group proteins: global profiling of perchloric acid soluble protein. *J. Proteome Res.*, 2006, vol. 5, pp. 925–934.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 2007, vol. 128, pp. 693–705.
- Histone modifications. Encyclopedia of molecular cell biology and molecular medicine.* Ed. by B. Xhemalce, M. A. Dawson, A. J. Bannister. John Wiley and Sons, 2011.
- Heintzman N. D., Stuart R. K., Hon G., Fu Y., Ching C. W., Hawkins R. D., Barrera L. O., Van Calcar S., Qu C., Ching K. A., Wang W., Weng Z., Green R. D., Crawford G. E., Ren B. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat. Genet.*, 2007, vol. 39, pp. 311–318.
- Wisniewski J. R., Zougman A., Krüger S., Mann M. Mass spectrometric mapping of linker histone H1 variants reveals multiple acetylations, methylations, and phosphorylation as well as differences between cell culture and tissue. *Mol. Cell Proteomics*, 2007, vol. 6, pp. 72–87.
- Chikhirzhina E. V., Starkova T. Y., Kostyleva E. I., Chikhirzhina G. I., Vorobiev V. I., Polyanichko A. M. Interaction of DNA with sperm-specific histones of the H1 family. *Cell and Tissue Biol.*, 2011, vol. 5, pp. 536–542.
- Chikhirzhina E., Starkova T., Kostyleva E., Polyanichko A. Spectroscopic study of the interaction of DNA with the linker histone H1 from starfish sperm reveals mechanisms of the formation of supercondensed sperm chromatin. *Spectroscopy: Int. J.*, 2012, vol. 27, pp. 433–440.
- Ramm E. I., Chikhirzhina E. V., Kostyleva E. I., Vorob'ev V. I. Conformational features of linker proteins of supercompact chromatin from marine invertebrate sperm. *Biokhimiia*, 1995, vol. 60, pp. 150–158.
- Chikhirzhina E. V., Kostyleva E. I., Ramm E. I., Vorob'ev V. I. Chromatin compactization in DNA-protein complexes model system. *Tsitologiya*, 1998, vol. 40, pp. 883–888.
- Kowalski A., Palyga J. High-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: A tool for identification of polymorphic and modified linker histone. *Components Gel Electrophoresis — Principles and Basics*, 2012, pp. 117–136.

19. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685.
20. Polianichko A. M., Chikhirzhina E. V., Andrushchenko V. V., Kostyleva E. I., Vizer G., Vorob'ev V. I. Vliianie ionov Ca^{2+} na kompaktizatsiiu DNK v komplekse s negistonovym khromosomnym belkom HMGB1 [The effect of Ca^{2+} ions on DNA compaction in the complex with non-histone chromosomal protein HMGB1]. *Molek. biologii* [*Mol. Biol.*], 2004, vol. 38, pp. 701–712. (In Russian)
21. Chikhirzhina E. V., Polianichko A. M., Skvortsov A. N., Kostyleva E. I., Uss'e K., Vorob'ev V. I. HMG1-domeny: zalozhniki obstoiatel'stv [HMG1 domains: the victims of the circumstances]. *Molek. biologii* [*Mol. Biol.*], 2002, vol. 36, pp. 525–531. (In Russian)
22. Chikhirzhina E., Starkova T., Kostyleva E., Polyanichko A. Spectroscopic study of the interaction of DNA with the linker histone H1 from starfish sperm reveals mechanisms of the formation of supercondensed sperm chromatin. *Spectroscopy*, 2012, vol. 27, pp. 433–440.
23. Happel N., Doenecke D. Histone H1 and its isoforms: Contribution to chromatin structure and function. *Gene*, 2009, vol. 431, pp. 1–12.
24. Talasz H., Sapojnikova N., Helliger W., Lindner H., Puschendorf B. *In vitro* binding of H1 histone variants to nucleosomal organized mouse mammary tumor virus long terminal repeat promoter. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, pp. 32236–32243.
25. Berger S. L. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2002, vol. 12, pp. 142–148.
26. Harshman S. W., Young N. L., Parthun M. R., Freitas M. A. H1 histones: current perspectives and challenges. *Nucl. Acids Res.*, 2013, vol. 41, pp. 9593–9609.
27. Alexandrow M. G., Hamlin J. L. Chromatin decondensation in S-phase involves recruitment of Cdk2 by Cdc45 and histone H1 phosphorylation. *JCB*, 2005, vol. 168, pp. 875–886.
28. Bharath M. M., Ramesh S., Chandra N. R., Rao M. R. Identification of a 34 amino acid stretch within the C-terminus of histone H1 as the DNA-condensing domain by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 2002, vol. 41, pp. 7617–7627.
29. Sarg B., Helliger W., Talasz H., Forg B., Lindner H. H. Histone H1 phosphorylation occurs site-specifically during interphase and mitosis: identification of a novel phosphorylation site on histone H1. *J. Biol. Chem.*, 2006, vol. 281, pp. 6573–6580.
30. Goytisolo F. A., Gerchman S. E., Yu X., Rees C., Graziano V., Ramakrishnan V., Thomas J. O. Identification of two DNA-binding sites on the globular domain of histone H5. *EMBO J.*, 1996, vol. 15, pp. 3421–3429.
31. Trojer P., Zhang J., Yonezawa M., Schmidt A., Zheng H., Jenuwein T., Reinberg D. Dynamic histone H1 isotype 4 methylation and demethylation by histone lysine methyltransferase G9a/KMT1C and the jumoni domain-containing JMJD2/KDM4 proteins. *J. Biol. Chem.*, 2009, vol. 284, pp. 8395–8405.
32. Daujat S., Zeissler U., Waldmann T., Happel N., Schneider R. HP1 binds specifically to lys26-methylated histone H1.4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation block HP1 binding. *J. Biol. Chem.*, 2005, vol. 280, pp. 38090–38095.
33. Lachner M., Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2002, vol. 14, pp. 286–298.
34. Li Y., Danzer J. R., Alvarez P., Belmont A. S., Wallrath L. L. Effects of tethering HP1 to euchromatic regions of the *Drosophila* genome. *Development*, 2003, vol. 130, pp. 1817–1824.
35. Ayyanathan K., Lechner M. S., Bell P., Maul G. G., Schultz D. C., Yamada Y., Tanaka K., Torigoe K., Rauscher F. J. III. Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes Dev.*, 2003, vol. 17, pp. 1855–1869.
36. Cato L., Stott K., Watson M., Thomas J. O. The interaction of HMGB1 and Linker histones occurs through their acidic and basic tails. *J. Mol. Biol.*, 2008, vol. 384, pp. 1262–1272.
37. Polyanichko A. M., Chikhirzhina E. V. Interaction between DNA and chromosomal proteins HMGB1 and H1 studied by IR/VCD spectroscopy. *J. Mol. Struct.*, 2013, vol. 1044, pp. 167–172.
38. Chikhirzhina E. V., Polyanichko A. M., Kostyleva E. I., Vorobyev V. I. Structure of DNA complexes with chromosomal protein HMGB1 and histone H1 in the presence of manganese ions: I. circular dichroism spectroscopy. *Mol. Biol.*, 2011, vol. 45, pp. 318–326.
39. Polyanichko A. M., Vorob'ev V. I., Chikhirzhina E. V. Structure of DNA complexes with chromosomal protein HMGB1 and histone H1 in the presence of manganese ions: 2. vibrational circular dichroism spectroscopy. *Mol. Biol.*, 2013, vol. 47, pp. 299–306.

Статья поступила в редакцию 30 июня 2016 г.

Контактная информация

Старкова Татьяна Юрьевна — кандидат биологических наук; e-mail: t.starkova@incras.ru

Поляничко Александр Михайлович — кандидат физико-математических наук, доцент;
e-mail: a.polyanichko@spbu.ru

Артамонова Татьяна Олеговна — сотрудник; e-mail: nanobio@nanobio.spbstu.ru

Ходорковский Михаил Алексеевич — кандидат физико-математических наук;
e-mail: nanobio@nanobio.spbstu.ru

Чихиржина Елена Всеволодовна — кандидат биологических наук; e-mail: e.chikhirzhina@incras.ru

Томилин Алексей Николаевич — доктор биологических наук; e-mail: a.tomilin@incras.ru

Starkova Tatiana Yu. — PhD; e-mail: t.starkova@incras.ru

Polyanichko Alexander M. — PhD, Associate Professor; e-mail: a.polyanichko@spbu.ru

Artamonova Tatiana O. — worker; e-mail: nanobio@nanobio.spbstu.ru

Khodorkovskii Mikhail A. — PhD; e-mail: nanobio@nanobio.spbstu.ru

Chikhirzhina Elena V. — PhD; e-mail: e.chikhirzhina@incras.ru

Tomilin Alexey N. — Doctor of Biology; e-mail: a.tomilin@incras.ru