

УДК 577.2

Профиль посттрансляционных модификаций гистона H1 в хроматине эмбриональных стволовых клеток МЫШИ

Т. Ю. Старкова^{1*}, Т. О. Артамонова², В. В. Ермакова¹, Е. В. Чихиржина¹,
М. А. Ходорковский³, А. Н. Томилин^{1,3*}

¹Институт цитологии РАН, лаборатория молекулярной биологии стволовых клеток, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4, Россия

²Санкт-Петербургский государственный политехнический университет имени Петра Великого, Аналитический центр нано- и биотехнологий СПбГПУ, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29, Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9, Россия

*E-mail: t.starkova@incras.ru, a.tomilin@incras.ru

Поступила в редакцию 01.03.2019

Принята к печати 29.04.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-82-91

РЕФЕРАТ Линкерный гистон H1 – один из основных ядерных белков, принимающих участие в структурно-регуляторной организации хроматина. Ряд данных указывает на то, что посттрансляционные модификации H1 способны модулировать активность хроматина. С помощью масс-спектрометрии высокого разрешения (MALDI-FT-ICR-MS) мы обнаружили существенные различия в природе и положениях посттрансляционных модификаций в некоторых вариантах гистона H1 (H1.3–H1.5) из эмбриональных стволовых клеток и дифференцированных клеток – иммортализованных фибробластов линии NIH/3T3 и эмбриональных фибробластов (МЭФ). Так, метилирование K75 в вариантах H1.2–1.4, метилирование K108, K148, K151, K152, K154, K155, K160, K161, K179 и K185 в H1.1, а также K168 в H1.2, фосфорилирование S129, T146, T149, S159, S163 и S180 в H1.1, T180 в H1.2 и T155 в H1.3 идентифицированы исключительно в эмбриональных стволовых клетках. Большинство сайтов ацетилирования вариантов H1.0 и H1.2 в эмбриональных стволовых клетках расположены в С-концевых доменах, известных своим участием в стабилизации конденсированного хроматина. Полученные данные могут послужить основой для дальнейших исследований, направленных на анализ функциональной значимости посттрансляционной модификации гистона H1 для процессов самообновления и дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА двумерный электрофорез, линкерный гистон H1, масс-спектрометрия, посттрансляционные модификации, эмбриональные стволовые клетки мыши.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ MALDI-FT-ICR-MS – масс-спектрометрия ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием; ПТМ – посттрансляционные модификации; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; МЭФ – эмбриональные фибробласты мыши; AU-PAGE – полиакриламидный гель, содержащий мочевины; SDS-PAGE – полиакриламидный гель, содержащий додецилсульфат натрия; meK – метилирование лизина; acK – ацетилирование лизина; pS/T – фосфорилирование серина/треонина; MetO – метионинсульфоксид.

ВВЕДЕНИЕ

Архитектурные белки хроматина, такие, как гистон H1, взаимодействуют с нуклеосомами без явной специфичности к последовательности ДНК, способствуя формированию локально и/или глобально измененной архитектуры хроматина [1–8]. Белки семейства гистонов H1 человека и мыши представлены

семью соматическими подтипами (от H1.0 до H1.5 и H1X) и четырьмя уникальными вариантами (H1t, H1T2m, H1LS1 и H1oo), характерными для половых клеток [9–13]. Несмотря на высокую структурную консервативность, подтипы H1 различаются эволюционной стабильностью, распределением в эухроматине/гетерохроматине и аффинностью связывания

хроматина, что может быть результатом посттрансляционных модификаций (ПТМ) [14–17].

Хроматин эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и индуцированных плюрипотентных клеток активно изучается в течение последних нескольких десятилетий в связи с огромным потенциалом использования ЭСК в биомедицине. За это время показано, что гетерохроматин ЭСК более «открыт», чем в дифференцированных клетках [18], и это свойство, приводящее к глобально повышенной транскрипции, может быть результатом снижения экспрессии белков H1 [19] и ПТМ ядерных белков [18–20].

В рамках нашего исследования с помощью сочетания физико-химических и биологических подходов выявлены новые ПТМ гистона H1, специфически присутствующие в хроматине ЭСК, но не в дифференцированных клетках мыши. Обсуждается возможная роль выявленных модификаций в структурно-регуляторной организации хроматина этих клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все процедуры на животных выполняли в соответствии с принципами гуманного использования лабораторных животных по стандартам, предписанным Американским физиологическим обществом. Работа с мышами выполнялась строго в соответствии с законодательными актами Российской Федерации о защите животных и была одобрена Советом по этике Института как гуманное использование лабораторных животных.

Эмбриональные фибробласты мыши (МЭФ) выделены из 13,5-дневных зародышей мыши после естественного спаривания животных. ЭСК мыши линии E14Tg2A приобретены в BayGenomics. Клеточная линия NIH/3T3 получена из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия).

Культивирование клеточных линий

Клетки NIH/3T3 и МЭФ культивировали в DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, L-глутамина и 1% пенициллина/ стрептомицина [21, 22]. ЭСК культивировали в DMEM/F12 с добавлением 15% фетальной бычьей сыворотки, 1% пенициллина/стрептомицина, L-глутамина, незаменимых аминокислот и лейкоингибирующего фактора (LIF) на обработанных желатином культуральных чашках. Клетки промывали PBS (pH 7.5), обрабатывали 0.05% трипсином (10 мин при 37°C) и собирали центрифугированием при 2000 g в течение 5 мин. Клеточный осадок с 6–8 чашек (d = 10 см) замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C.

Экстракция и разделение вариантов гистона H1

Для сохранения интактных ПТМ белки H1 выделяли из клеток напрямую (минуя стадию выделения ядер) с помощью 5% хлорной кислоты с последующим осаждением подкисленным ацетоном [7]. Варианты H1 разделяли методом двухмерного гелеэлектрофореза в полиакриламидном геле [7, 8].

Ферментативный гидролиз и анализ MALDI-FT-ICR-MS

После проведения 2D-электрофореза фрагменты геля, содержащие ядерные белки, вырезали, измельчали и обрабатывали 40% ацетонитрилом в 0.1 M бикарбонате аммония при 37°C в течение 15 мин как описано ранее [7]. Биологические образцы анализировали в двух биологических и двух-

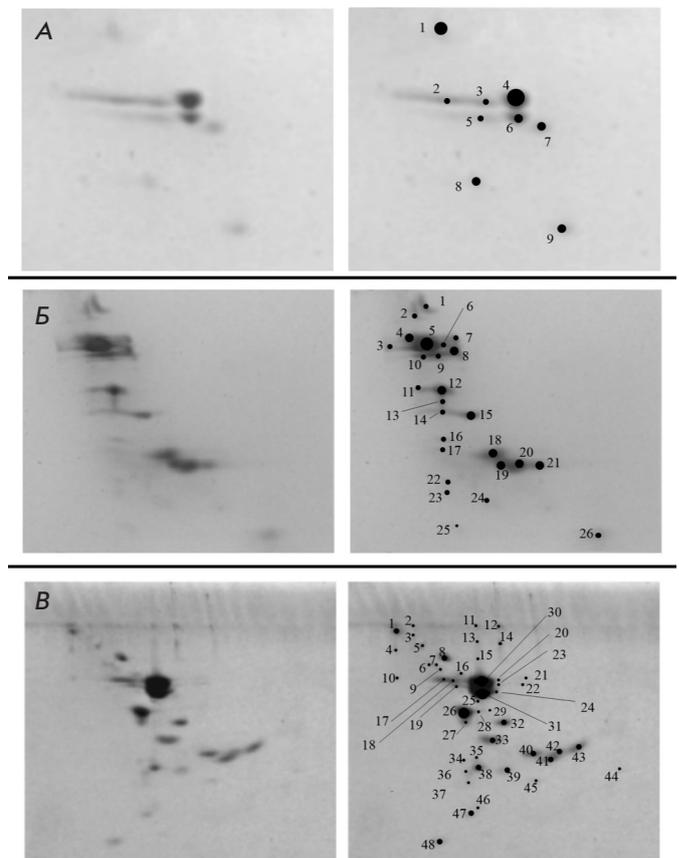


Рис. 1. 2D-электрофорез обогащенных H1 экстрактов клеток NIH/3T3 (A), МЭФ (Б) и ЭСК (B). Варианты H1 идентифицированы в пяти фракциях (обозначены 2–4, 6–7 в A), семи фракциях (4–10 в Б) и восьми фракциями (15–18, 20–21, 30–31 в B) клеток NIH/3T3, МЭФ и ЭСК соответственно. Остальные белковые фракции описаны в табл. S1 [25]

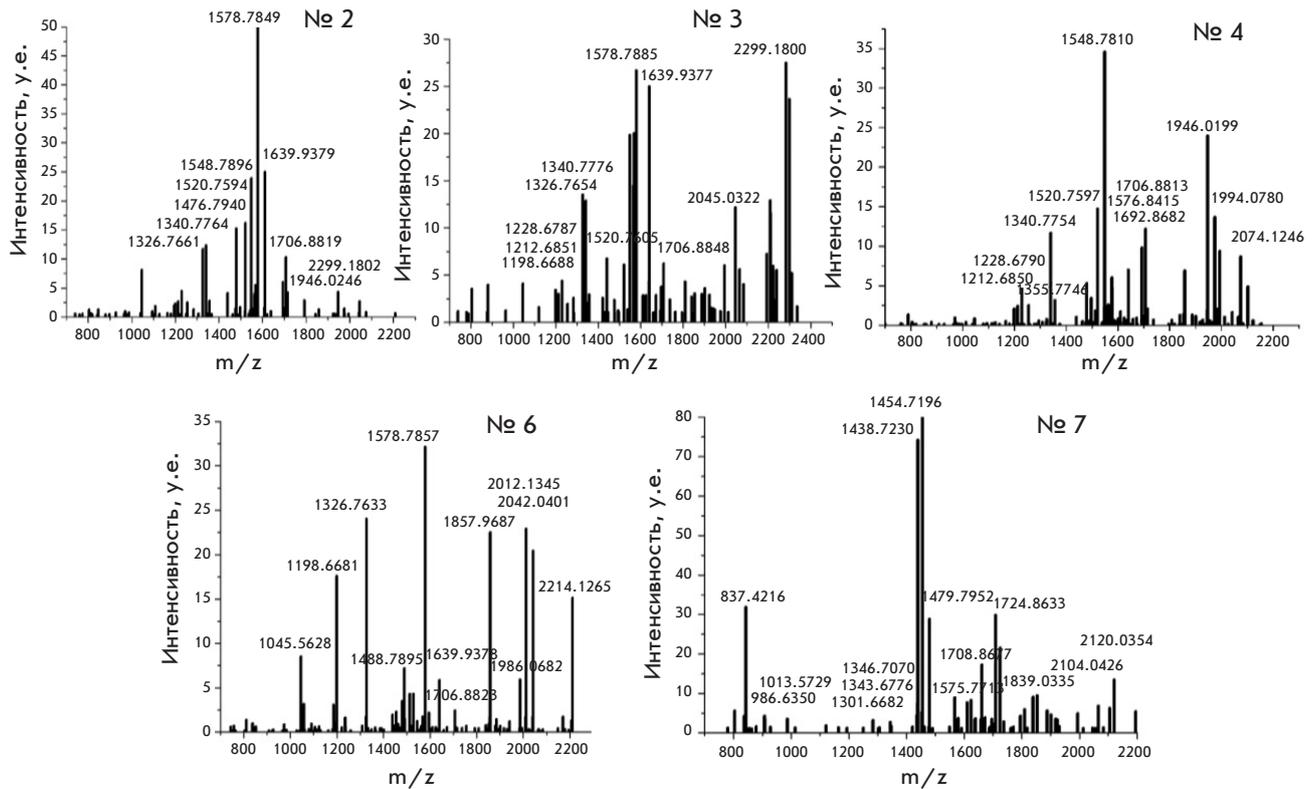


Рис. 2. Масс-спектры подтипов гистона Н1 хроматина клеток NIH/3T3. Номер спектров соответствует номеру пятна на 2D-электрофореграмме. Подробное описание содержания белков в каждом пятне приведено в табл. 1S [25]

трех аналитических повторностях. Масс-спектры регистрировали в режиме положительных ионов в диапазоне 500–3000 m/z с использованием масс-спектрометра MALDI-FT-ICR (Varian 902-MS), оснащенного сверхпроводящим магнитом 9.4 Тл и УФ-лазером (Nd: YAG) [7]. Спектры анализировали с использованием программных пакетов Mascot (www.matrixscience.com; Matrix Science, Лондон, Великобритания) и Protein Prospector MS-Fit (http://prospector.ucsf.edu) как описано ранее [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Целью нашей работы было сравнение ПТМ линкерных гистонов Н1 из дифференцированных и эмбриональных стволовых клеток мыши. Варианты гистона Н1 мы разделяли с использованием сочетания AU-PAGE с SDS-PAGE, что особенно оправдано в случае идентификации заряженных кислотно-растворимых белков, включая гистоны [7, 8, 23, 24]. На рис. 1 представлены результаты 2D-электрофоретического разделения вариантов Н1 хроматина из двух типов дифференцированных клеток, иммортализованных

фибробластов мыши линии NIH/3T3 и первичных эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ), а также плюрипотентных клеток мыши (ЭСК линии E14Tg2A). В результате анализа электрофореграмм мы идентифицировали в клетках NIH/3T3 пять фракций, содержащих варианты Н1 (рис. 1А), семь фракций в МЭФ (рис. 1Б) и восемь в ЭСК (рис. 1В). Оставшиеся фракции включают белки семейства HMG (High Mobility Group) и другие ядерные белки (табл. S1 [25]). Результаты MS-анализа Н1 представлены в табл. S2 [25] и на рис. 2–4. Обнаружены и проанализированы шесть изоформ Н1 (Н1.0–Н1.5). Идентифицированные ПТМ подтипов Н1 из NIH/3T3, МЭФ и ЭСК представлены в таблице и на рис. 5. На рис. 5 дополнительно представлены ранее идентифицированные ПТМ гистона Н1 из тимуса мыши [7].

Метилирование

Гистоны Н1 – одна из основных групп ядерных белков хроматина, которые участвуют в продольном уплотнении реплицирующейся хромосомы [24]. В хроматине ЭСК на одну нуклеосому приходится

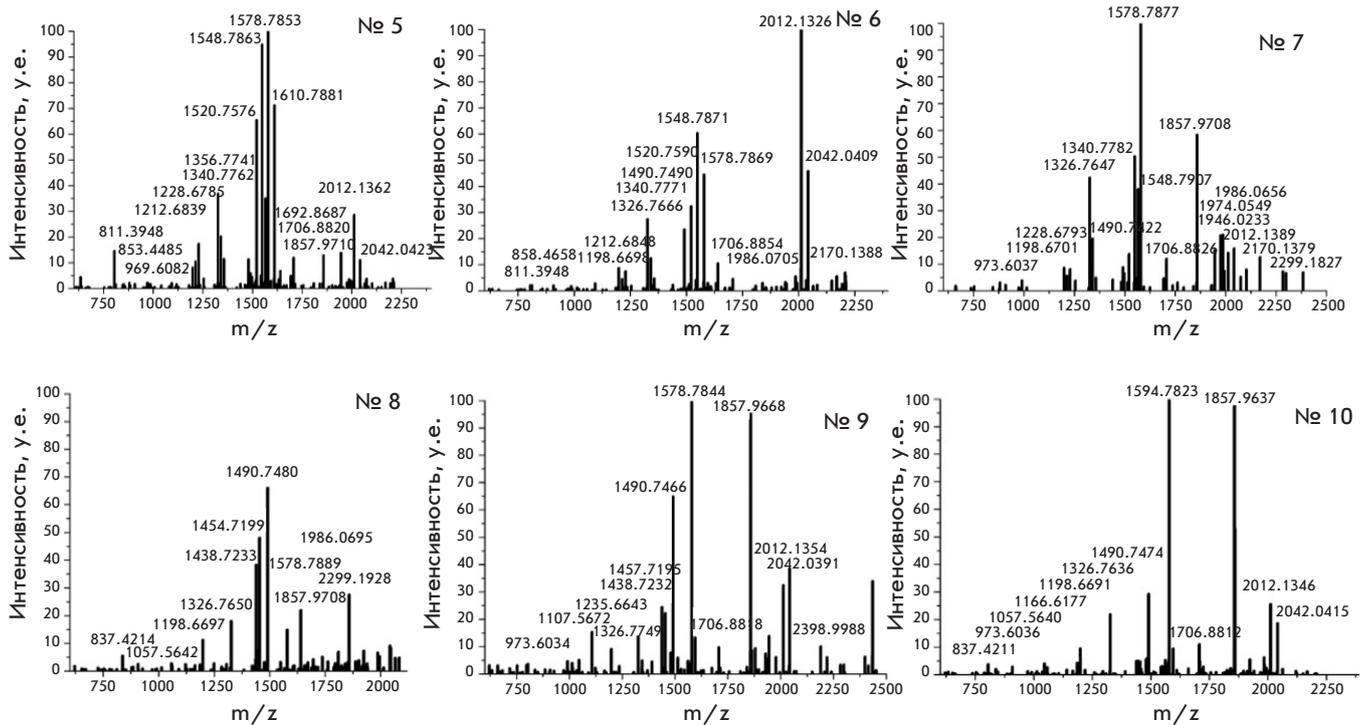


Рис. 3. Масс-спектры подтипов гистона Н1 хроматина клеток МЭФ. Номер спектров соответствует номеру пятна на 2D-электрофореграмме. Подробное описание содержания белков в каждом пятне приведено в табл. S1 [25]

0.5 молекулы Н1 (суммарно всех подтипов), что примерно в 2 раза ниже, чем в хроматине дифференцированных клеток [26]. Истощение линкерного гистона Н1 приводит к снижению степени компактизации хроматина, уменьшению глобального расстояния между нуклеосомами и снижению степени ПТМ некоторых гистонов, таких, как метилирование [26].

Сравнительный анализ ПТМ вариантов Н1 из клеток НИН/ЗТЗ, МЭФ и ЭСК выявил снижение степени метилирования вариантов Н1.4 и Н1.5 в ЭСК по сравнению с дифференцированными клетками (рис. 5). Идентифицированные сайты метилирования белков Н1 расположены, в основном, в области глобулярного домена в положениях К34/К35, К63/65 и К73/75 в зависимости от варианта Н1 (таблица).

Большинство выявленных нами таких ПТМ, как meK63/64, в вариантах Н1.2–Н1.4, meK47 в Н1.3, meK97 в Н1.2, meK117 в Н1.2 и meK27 в Н1.5 уже описаны ранее [7, 8, 10–12]. Считается, что метилирование в этих положениях защищает аминокислоты лизинов, вызывая увеличение сродства гистона к ДНК и облегчение перехода хроматина в локально репрессированное состояние [7, 8]. Помимо описанных выше ПТМ, мы идентифицировали метилиро-

вание К75 вариантов Н1.2–1.4 исключительно в ЭСК (рис. 5, табл. S2 [25]), расположенное в глобулярном домене Н1, которое также может приводить к защите аминокислоты лизина в этих клетках.

Потенциальные сайты метилирования К108, К148, К151, К152, К154, К155, К160, К161, К179 и К185 в Н1.1, К168 в Н1.2 также идентифицированы исключительно в клетках ЭСК, тогда как метилирование К202 и К204 в Н1.4 – только в дифференцированных клетках НИН/ЗТЗ и МЭФ. Большинство из этих ПТМ расположены в мотивах (S/T)РХК или (S/T)РХZ (где Х – любой аминокислотный остаток) вблизи фосфорилированных серинов и треонинов Н1. Потенциальная роль этих модификаций рассмотрена в разделе «Фосфорилирование».

Ацетилирование

Согласно нашим данным, общий уровень ацетилирования Н1 в ЭСК оказался выше, чем в дифференцированных клетках (рис. 5). Как и ожидалось, мы идентифицировали несколько сайтов ацетилирования в N-концевом и глобулярном доменах Н1 (таблица). В большинстве случаев точная биологическая роль этих модификаций не установ-

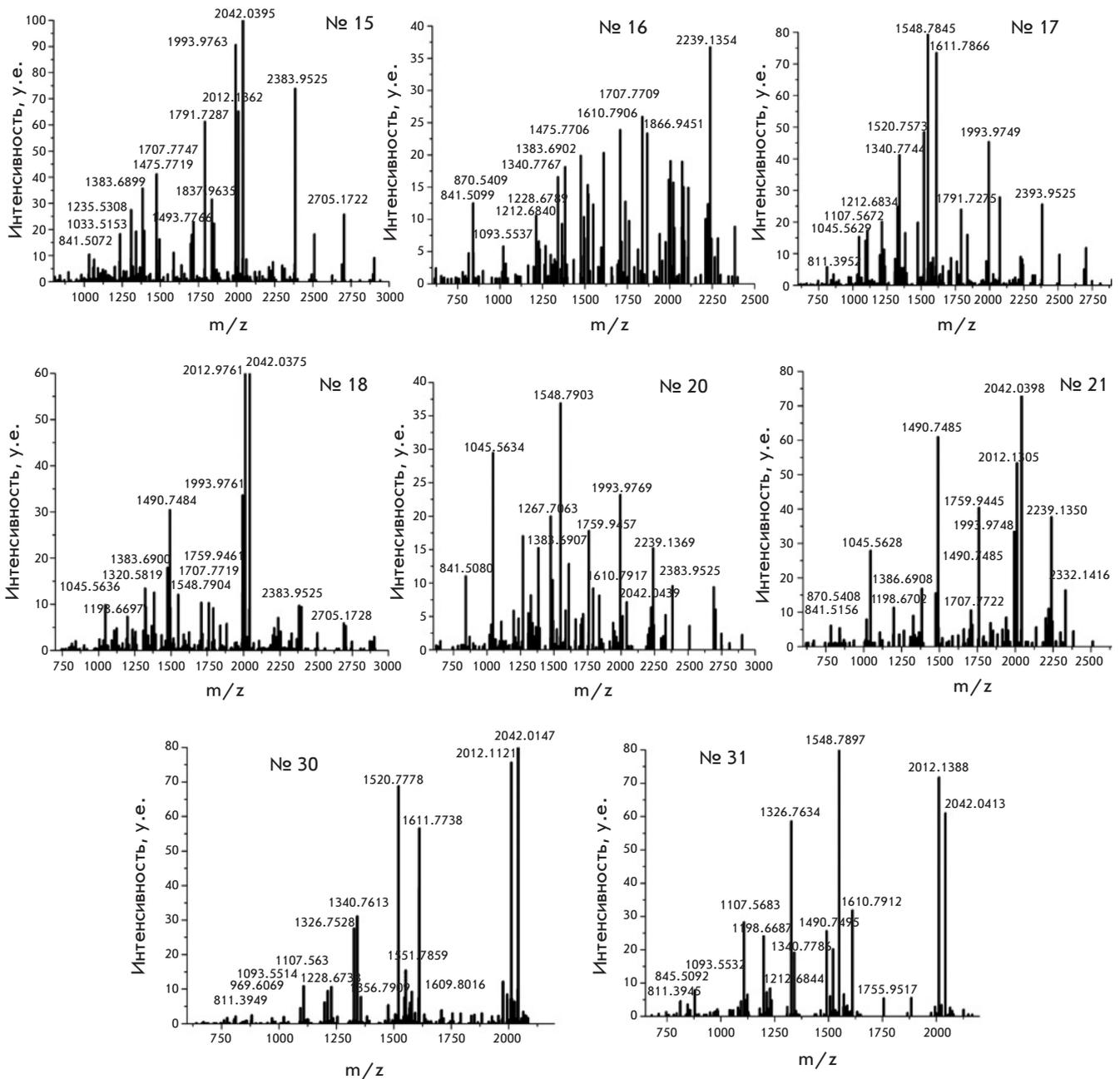


Рис. 4. Масс-спектры подтипов гистона Н1 хроматина ЭСК. Номер спектров соответствует номеру пятна на 2D-электрофореграмме. Подробное описание содержания белков в каждом пятне приведено в табл. S1 [25]

лена. Ацетилирование одного из наиболее изученных сайтов – асК34-Н1.4, является отличительным признаком промоторов транскрипционно активных генов и помогает привлекать к промоторам комплекс инициации транскрипции TFIID [27]. Однако мы не обнаружили асК34-Н1.4 ни в одном из исследованных типов клеток. В то же время мы наблюдали

дали метилирование в этой позиции варианта Н1.4 в НИН/ЗТЗ и МЭФ, но не в ЭСК. Мы предполагаем, что деметилирование К34-Н1.4 ЭСК может способствовать ацетилированию в этом сайте и облегчать рекрутирование транскрипционного фактора TFIID к промоторным областям. Кроме того, согласно нашим данным, Н1 ЭСК характеризуется наличием

Потенциальные ПТМ вариантов гистона H1 хроматина NH/3T3, МЭФ и ЭСК. Модификации, выделенные жирным шрифтом, описаны ранее [8]

| Клетки | H1 | Модификации | Положение сайта модификации |
|------------------|------------------|---|--|
| NH/3T3 | H1.0 | ацетилование | K12 , K132, K136, K137, K149 |
| | | метилование | K139, K155, K156 |
| | | фосфорилирование | S135, T153 |
| | H1.1 | ацетилование | K17 |
| | | метилование | K116, K121, K125 |
| | | фосфорилирование | S2 , S115 , T120 |
| | H1.2 | ацетилование | K17 |
| | | метилование | K46 , K63 , K90, K97 , K117 , K121 |
| | | фосфорилирование | S2 , S41, S89, T96, S113 |
| | H1.3 | ацетилование | K17 |
| | | метилование | K47 , K64 |
| | H1.4 | ацетилование | K17 |
| | | метилование | K34 , K46 , K63 , K195, K197, K200, K202 , K205 |
| | | фосфорилирование | T18, S36, S41, T45 |
| | H1.5 | ацетилование | K17 , K26, K12, K180 |
| метилование | | K27 , K31, K51, K62, K63 , K74 | |
| фосфорилирование | | S18 , T25, S40, S57, S111, T121, T132 | |
| МЭФ | H1.0 | ацетилование | K12 , K180, K182, K184, K188 |
| | | метилование | K14, K69, K73 |
| | | фосфорилирование | S66, T84, S185 |
| | H1.1 | ацетилование | K17 , K22 , K23, K29 |
| | | метилование | K35 , K116, K121, K125 |
| | | фосфорилирование | T24, S115 , T120, S123 |
| | H1.2 | ацетилование | K17 , K153, K156, K157, K159, K206, K210 |
| | | метилование | K21, K22, K46 , K106 , K117 , K121, K148 |
| | | фосфорилирование | S2 , S41, T154 , T173 |
| | H1.3 | ацетилование | K17 |
| | | метилование | K47 , K64 |
| | | фосфорилирование | T18 |
| | H1.4 | ацетилование | K17 |
| | | метилование | K34 , K46 , K63 , K195, K197, K200, K202 , K205 |
| | | фосфорилирование | S36 , S41 , T45, S204 |
| H1.5 | ацетилование | K17 , K26, K143 | |
| | метилование | K27 , K31, K45 , K62, K74, K134, K144, K147, K191, K193 | |
| | фосфорилирование | S111, T132, T149, S192 | |
| ЭСК | H1.0 | ацетилование | K12 , K17, K20, K121, K122, K125, K127, K136, K137, K147, K148, K149, K155, K184, K188 |
| | H1.1 | ацетилование | K17 , K83, K87 , K133, K134, K136, K137, K144, K167, K168, K183 |
| | | метилование | K108, K116, K148, K151, K152, K154, K155, K160, K161, K179, K185 |
| | | фосфорилирование | T24, S88, S115 , T120, S123, S129, T146, T149, S159, S163, S180 |
| | H1.2 | ацетилование | K17 , K81, K122 , K127 , K130, K149, K153, K156, K157, K172, K175, K176, K178 |
| | | метилование | K46 , K63 , K75, K121, K148 , K168 |
| | | фосфорилирование | T154 , S173 , T180 |
| | H1.3 | ацетилование | K17 , K154, K157, K158 |
| | | метилование | K47 , K64 , K75 |
| | | фосфорилирование | T155 |
| | H1.4 | ацетилование | K17 |
| | | метилование | K46 , K63 , K75 |
| | H1.5 | ацетилование | K17 |
| | | метилование | K45, K74 |

асK83 и асK87 в Н1.1 и асK81 в Н1.2. Снижение положительного заряда в этой области вследствие ацетилирования аминокислотных остатков лизина может привести к дестабилизации взаимодействий Н1 с ДНК и, в свою очередь, способствовать образованию локально релаксированного состояния хроматина.

Образование «открытого» хроматина также может облегчаться ацетилированием остатков лизина в С-концевых областях вариантов Н1.1–Н1.3. Более того, большинство из этих С-концевых ЭСК-специфичных сайтов ацетилирования и метилирования вариантов Н1.1–Н1.3 расположены в мотивах (S/T)PXK или (S/T)PXZ вблизи фосфорилированных остатков серина и треонина. Их потенциальная биологическая роль и механизм регуляции взаимодействия Н1–ДНК, опосредуемый ацетилированием/метилованием лизинов в мотивах (S/T)PXK или (S/T)PXZ, более подробно обсуждаются в разделе «Фосфорилирование».

Фосфорилирование

Нами идентифицирован ряд сайтов фосфорилирования гистонов Н1, таких, как Т24, S115, Т120 и S123 в Н1.1, S2, S41, Т154 и Т173 в Н1.2, характерных как для дифференцированных клеток, так и для ЭСК. В то же время несколько потенциальных сайтов фосфорилирования подтипов Н1 выявлено исключительно в ЭСК: S129, Т146, Т149, S159, S163 и S180 в Н1.1, Т180 в Н1.2 и Т155 в Н1.3 (рис. 5, табл. S2 [25]). Идентифицированные сайты фосфорилирования расположены в основном в С-концевых доменах Н1, в том числе в мотивах (S/T)PXK и (S/T)PXZ (рис. 5), которые фосфорилируются во время митоза и модулируют тем самым состояние хроматина [15, 28–34]. Вопрос о функциональной связи фосфорилирования и/или его отсутствия в ряде сайтов других подтипов Н1 с поддержанием плюрипотентности ЭСК и способностью дифференцировки этих клеток остается пока открытым.

Известно, что фосфорилирование S173 (Н1.2) и S187 (Н1.4), происходящее во время интерфазы, необходимо для релаксации хроматина и активации транскрипции [15, 30–32]. Принимая во внимание тот факт, что эти остатки серина лежат в пределах областей, структурно напоминающих так называемые участки с механизмом двоичного метилирования/фосфорилирования (methyl-phospho switch regions) коровых гистонов, метилирование K172 Н1.2 в ЭСК может способствовать фосфорилированию соседнего S173. В свою очередь, pS173 может стимулировать ацетилирование K172, приводящее к активации транскрипции.

Мы идентифицировали несколько спаренных ПТМ, таких, как meK148/pT149–Н1.1

и meK179/pS180 (Н1.1 в ЭСК), meK191/pS192 (Н1.5 в МЭФ), которые расположены в основном в С-концевых областях белков (рис. 5). Их структурная организация также напоминает области methyl-phospho switch regions основных гистонов. Один из примеров данного типа регуляции – сайт K9/S10 в гистоне H3 [35–38]. Регуляторное состояние сайта K9/S10 характеризуется стабильным meK и динамическим фосфорилированием остатка S/T, который находится вблизи К. Фосфорилирование S10 и S28 в H3 приводит к ацетилированию в K9 и K27 соответственно, что способствует активации транскрипции [39].

Кроме того, мы также идентифицировали ряд сайтов ацетилирования/фосфорилирования, включая асK17/pT18 (Н1.4 и Н1.5 в клетках NIH/3T3), асK17/pT18 (Н1.3 в МЭФ), асK23/pT24 (Н1.1 в МЭФ), асK184/pS185 (Н1.0 в МЭФ), асK153/pT154 (Н1.2 в МЭФ и ЭСК), асK154/pT155 (Н1.3 в ЭСК) и асK172/pS173 (Н1.2 в ЭСК). Эти области ацетилирования/фосфорилирования характерны как для ЭСК, так и для дифференцированных клеток. Их структурная организация также напоминает области methyl-phospho switch regions за исключением того, что метилирование изменяется на ацетилирование. Возможно, что и в данном случае мы имеем дело с участками methyl-acetyl-phospho switch-регуляции, рассмотренными выше [40, 41], и ацетилирование этих сайтов также может приводить к активации транскрипции. Однако эта гипотеза требует дальнейшей экспериментальной проверки.

Цитруллирование

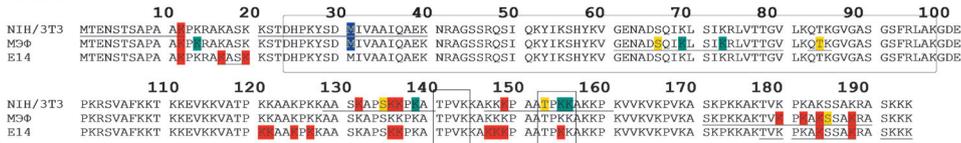
Ранее было показано, что цитруллирование Н1.2–Н1.4 в R54 способствует приобретению и поддержанию состояния плюрипотентности клеток [42]. Фактически это проявляется в нарушении связывания Н1 с хроматином, что вызывает формирование «открытого» состояния хроматина. Цитруллирование – это процесс замены аргинина на цитруллин, которое приводит к смещению пика пептида ERSGVSLAALK на 0.9844 м/z в масс-спектрах. Мы наблюдали смещенный пик низкой интенсивности в области 1131.64 м/z, однако вероятность его правильного отнесения составляет 9.8 ppm. При анализе спектров мы не учитывали пики свыше 3.0 ppm. Таким образом, мы не можем точно показать, имеет ли место цитруллирование R54 в наших образцах Н1.2–Н1.4 из ЭСК.

Формилирование

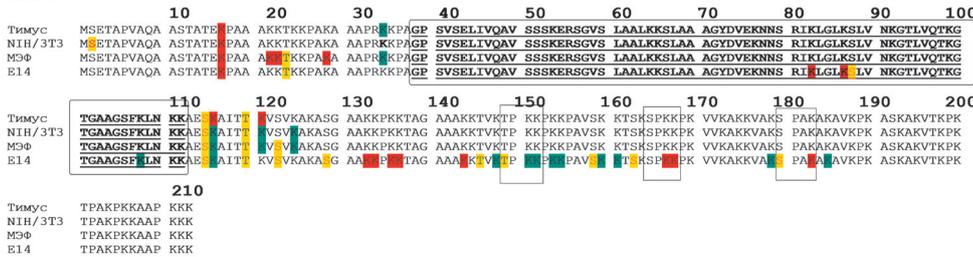
Известно, что Н1.2 в положениях K63–K85 и K97 в тканях мышцы, но не в хроматине иммортализованных клеточных линий, может подвергаться фор-

Рис. 5. Потенциальные ПТМ вариантов Н1 из клеток NIH/3T3, МЭФ и E14

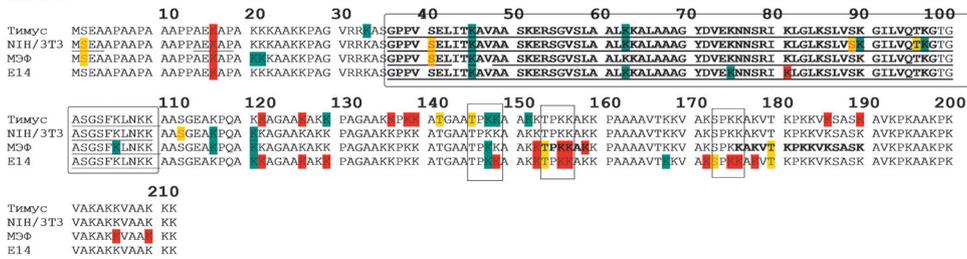
H1.0



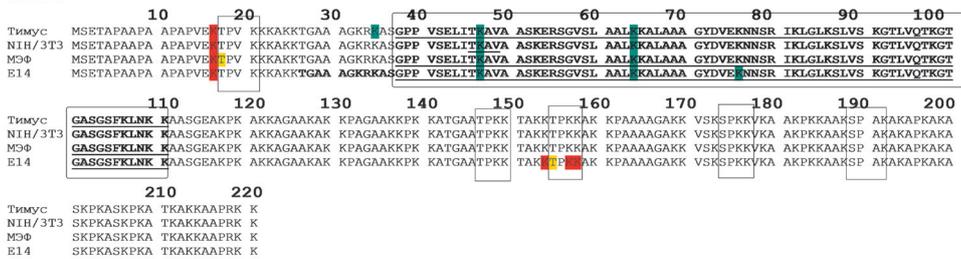
H1.1



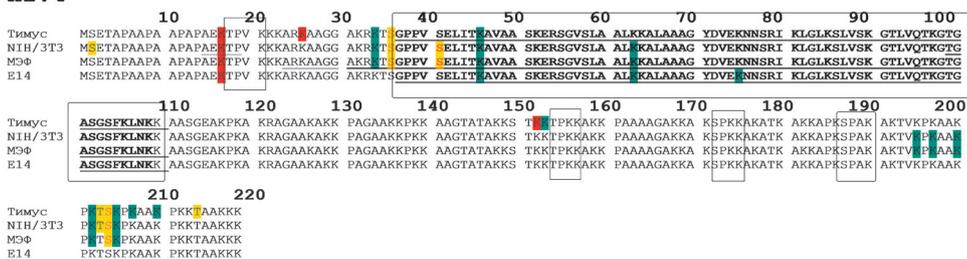
H1.2



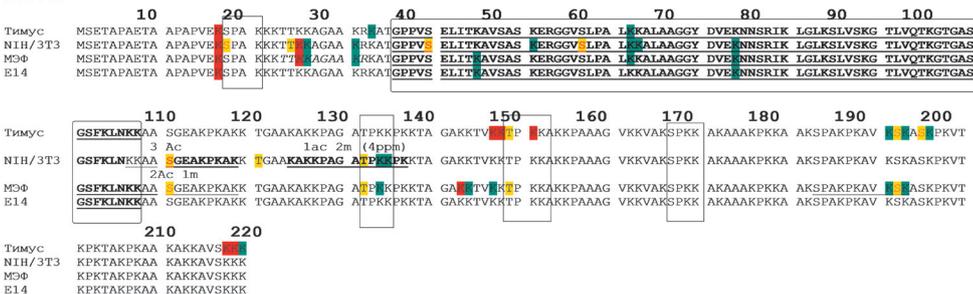
H1.3



H1.4



H1.5



- █ – ацетилирование лизина
- █ – метилирование лизина/аргинина
- █ – фосфорилирование треонина
- █ – фосфорилирование серина
- █ – окисление метионина
- Глобулярный домен белка
- S/PTXK-мотив

милированию [43]. Мы также не идентифицировали сайты формилирования H1 в изученных нами клеточных линиях. Роль данной ПТМ неизвестна, но предполагается, что формилирование может катализироваться неким специфическим ферментом во время деметилирования остатков лизина аминоксидазой LSD1 [44].

Окисление

Нами идентифицирован сайт окисления метионина до метионинсульфоксида MetO [45] в положении M31 гистона H1.0 дифференцированных клеток, но не в ЭСК (табл. 2S [25]). Положение остатков M в белках часто способствует образованию гидрофобных связей между их атомами серы и кольцами ароматических остатков триптофана, фенилаланина или тирозина [46]. Эти гидрофобные серно-кольцевые связи создают структурную стабильность белков, примерно равную стабильности ионного солевого мостика [46]. Взаимодействие с M устанавливает оптимальное положение, необходимое для обеспечения антиоксидантной защиты ароматических аминокислот. Окисление метионина до MetO разрушает эту гидрофобную связь и может влиять на формирование нормальной трехмерной структуры белка. Окисленные белки характеризуются повышенной гидрофобностью поверхности [47], что коррелирует с возрастным увеличением содержания MetO [45]. Отсутствие сайтов окисления H1 в ЭСК согласуется с неограниченным потенциалом самообновления этих клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном исследовании проведено сравнение потенциальных сайтов ПТМ гистона H1 в дифференцированных и эмбриональных стволовых клетках мыши. Выявлено сходство общих уровней метилирования/ацетилирования H1.3–H1.5, природы и положения посттрансляционных модификаций гистонов H1.3–H1.5 в ЭСК и дифференцированных клетках. При этом уровни ацетилирования H1.0 и H1.2 в ЭСК (в дополнение к ранее известным фактам о снижении уровня их экспрессии в хроматине ЭСК [20]) в целом выше, чем в гистонах дифференцированных

клеток (рис. 5). Большинство потенциальных сайтов ацетилирования H1.0 и H1.2 в ЭСК расположены в С-концевых доменах белков, а именно в областях 97–121 и 145–169. Эти области локализованы в двух известных субдоменах С-концевого фрагмента, участвующих в стабилизации конденсированного хроматина [20, 48]. Уменьшение положительного заряда N- и С-концевых областей белков H1 может ослабить взаимодействие H1–ДНК на входе/выходе ДНК из коровой частицы и предотвратить взаимодействие H1 с регуляторными белками хроматина, такими, как HMGN и HMGBl/2 [49, 50]. Известно, что белки HMGBl/2 способны вытеснять гистон H1 из ДНК-белкового комплекса и тем самым облегчать ремоделирование нуклеосомы, обеспечивая доступность ДНК для факторов транскрипции [51]. Смещение H1 из нуклеосомы должно привести к образованию «открытой» структуры хроматина, что свойственно стволовым клеткам.

Таким образом, открытая структура хроматина плюрипотентных стволовых клеток может формироваться как путем снижения общего уровня экспрессии H1, так и в результате посттрансляционных модификаций вариантов H1.0 и H1.2, приводящих к нарушению их связывания с ДНК и, как следствие, к образованию хроматина с более рыхлой структурой. Биологическая роль наиболее известных в настоящее время модификаций H1 пока не ясна. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы определить индивидуальные и совокупные роли этих ПТМ. Эти знания помогут нам глубже понять молекулярные процессы, лежащие в основе функционирования хроматина плюрипотентных клеток. ●

Исследования поддержаны Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 18-04-01199). MALDI-масс-спектрометрический анализ белков H1 проводили с использованием научного оборудования ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий СПбПУ» на базе ФГАОУ ВО «СПбПУ» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- White A.E., Hieb A.R., Luger K. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. № 19122. P. 1–14.
- Ausió J. // *Bioessays.* 2015. V. 37. P. 46–51.
- Crane-Robinson C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1859. № 3. P. 431–435.
- Song F., Chen P., Sun D., Wang M., Dong L., Liang D., Xu R.M., Zhu P., Li G. // *Science.* 2014. V. 344. № 6182. P. 376–380.
- Zhou B.R., Jiang J., Feng H., Ghirlando R., Xiao T.S., Bai Y. // *Mol. Cell.* 2015. V. 59. № 4. P. 628–638.
- Chikhirzhina E., Starkova T., Polyanchko A. // *Biophysics.* 2018. V. 63. № 6. P. 858–865.
- Starkova T.Y., Polyanchko A.M., Artamonova T.O., Khodorkovskii M.A., Kostyleva E.I., Chikhirzhina E.V., Tomilin A.N. // *Phys. Biol.* 2017. V. 14. P. 016005.
- Kowalski A., Pałyga J. // *Gel Electrophoresis – Principles and Basics.* 2012. V. 8. P. 117–136.
- Parseghian M.H., Newcomb R.L., Hamkalo B.A. // *J. Cell.*

- Biochem. 2001. V. 83. P. 643–659.
10. Happel N., Doenecke D. // *Gene*. 2009. V. 431. P. 1–12.
 11. Izzo A., Kamieniarz K., Schneider R. // *Biol. Chem.* 2008. V. 389. P. 333–343.
 12. Fyodorov D.V., Zhou B.R., Skoultchi A.I., Bai Y. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2018. V. 19. P. 192–206.
 13. Millán-Arino L., Izquierdo-Bouldstridge A., Jordan A. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. V. 1859. P. 510–519.
 14. Khochbin S. // *Gene*. 2001. V. 271. P. 1–12.
 15. Talasz H., Sapojnikova N., Helliger W., Lindner H., Puschen-dorf B. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 32236–32243.
 16. Ponte I., Vidal-Taboada J.M., Suau P. // *Mol. Biol. Evol.* 1998. V. 15. P. 702–708.
 17. Th'ng J.P., Sung R., Ye M., Hendzel M.J. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 27809–27814.
 18. Serrano L., Vazquez B.N., Tischfield J. // *Exp. Biol. Med.* 2013. V. 238. P. 259–270.
 19. Meshorer E., Yellajoshula D., George E., Scambler P.J., Brown D.T., Misteli T. // *Dev. Cell*. 2006. V. 10. № 1. P. 105–116.
 20. Terme J.M., Sesé B., Millán-Ariño L., Mayor R., Izpisúa Belmonte J.C., Barrero M.J., Jordan A. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 35347–35357.
 21. Liskovych M., Chuykin I., Ranjan A., Safina D., Popova E., Tolkunova E., Mosienko V., Minina J., Zhdanova N., Mullins J., et al. // *PLoS One*. 2011. V. 11. P. e27345.
 22. Liskovych M., Ponomartsev S., Popova E., Bader M., Kouprina N., Larionov V., Alenina N., Tomilin A. // *Cell Cycle*. 2015. V. 4. № 8. P. 1268–1273.
 23. Goldknopf I.L., Busch H. // *Physiol. Chem. Phys.* 1975. V. 7. P. 23–30.
 24. Maresca T.J., Heald R. // *Cell Cycle*. 2006. V. 5. P. 589–591.
 25. <https://drive.google.com/open?id=15hmp5ku-JHzy3PXW8vAtHk13jYt97Fty>
 26. Fan Y., Nikitina T., Zhao J., Fleury T.J., Bhattacharyya R., Bouhassira E.E., Stein A., Woodcock C.L., Skoultchi A.I. // *Cell*. 2005. V. 123. № 7. P. 1199–1212.
 27. Kamieniarz K., Izzo A., Dunder M., Tropberger P., Ozretic L., Kirfel J., Scheer E., Tropel P., Wisniewski J.R., Tora L., et al. // *Genes Dev*. 2012. V. 26. № 8. P. 797–802.
 28. Dou Y., Gorovsky M.A. // *Mol. Cell*. 2000. V. 6. P. 225–231.
 29. Chadee D.N., Taylor W.R., Hurta R.A., Allis D., Wright J., Davie J. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 20098–20105.
 30. Sarg B., Helliger W., Talasz H., Forg B., Lindner H. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 6573–6580.
 31. Harshman S.W., Young N.L., Parthun M.R., Freitas M.A. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 21. P. 9593–9609.
 32. Liao R., Mizzen C.A. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. V. 1859. P. 476–485.
 33. Alexandrow M.G., Hamlin J.L. // *J. Cell Biol.* 2005. V. 168. P. 875–886.
 34. Strunnikov A.V., Hogan E., Koshland D. // *Genes Dev*. 1995. V. 9. P. 587–599.
 35. Daujat S., Zeissler U., Waldmann T., Happel N., Schneider R. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 38090–38095.
 36. Lachner M., Jenuwein T. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2002. V. 14. P. 286–298.
 37. Li Y., Danzer J.R., Alvarez P., Belmont A.S., Wallrath L.L. // *Development*. 2003. V. 130. P. 1817–1824.
 38. Ayyanathan K., Lechner M.S., Bell P., Maul G.G., Schultz D.C., Yamada Y., Tanaka K., Torigoe K., Rauscher F.J. III // *Genes Dev*. 2003. V. 17. № 15. P. 1855–1869.
 39. Rossetto D., Avvakumov N., Cote J. // *Epigenetics*. 2012. V. 10. P. 1098–1108.
 40. Cheung P., Tanner K.G., Cheung W.L., Sassone-Corsi P., Denu J.M., Allis C.D. // *Mol. Cell*. 2000. V. 5. № 6. P. 905–915.
 41. Chadee D.N., Hendzel M.J., Tylopski C.P., Allis C.D., Bazett-Jones D.P., Wright J.A., Davie J.R. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 24914–24920.
 42. Christophorou M.A., Castelo-Branco G., Halley-Stott R.P., Oliveira C.S., Loos R., Radzishewska A., Mowen K.A., Bertone P., Silva J.C., Zernicka-Goetz M., et al. // *Nature*. 2014. V. 507. № 7490. P. 104–108.
 43. Wisniewski J.R., Zougman A., Krüger S., Mann M. // *Mol. Cell. Proteomics*. 2007. V. 6. № 1. P. 72–87.
 44. Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstone J.R., Cole P.A., Casero R.A., Shi Y. // *Cell*. 2004. V. 119. P. 941–953.
 45. Kim G., Weiss S.J., Levine R.L. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1840. P. 901–905.
 46. Valley C.C., Cembran A., Perlmutter J.D., Lewis A.K., Labello N.P., Gao J., Sachs J.N. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 42. P. 34979–34991.
 47. Chao C.C., Ma Y.S., Stadtman E.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 2969–2974.
 48. Lu X., Hansen J.C. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 8701–8707.
 49. Roque A., Ponte I., Suau P. // *Chromosoma*. 2016. V. 1859. P. 510–519.
 50. Murphy K.J., Cutter A.R., Fang H., Postnikov Y.V., Bustin M., Hayes J.J. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. P. 9917–9930.
 51. Stros M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. V. 799. P. 101–113.