ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.21

ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ГИСТОНА H4 НА ДИСТАНЦИОННЫЕ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ХРОМАТИНЕЕ.В. Низовцева¹, Н.С. Герасимова², В.М. Студитский^{1, 2, *}¹*Cancer Epigenetics Team, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA;*²*Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu*

Дистанционные взаимодействия ДНК играют важную роль в регуляции генов эукариот. Структура хроматина участвует в этом процессе, но влияние модификаций гистонов детально не изучено. В настоящей работе исследована роль ацетилирования гистона H4 по остатку лизина в положении 16 (H4K16-Ац) в энхансер-промоторном взаимодействии (ЭПВ). Данная модификация ассоциирована с эухроматином и участвует в декомпактизации хроматиновой фибриллы. Нами показано, что влияние H4K16-Ац на ЭПВ *in vitro* зависит от степени упаковки ДНК. Так, при неполном насыщении ДНК октамерами гистонов транскрипция ингибируется в присутствии этой модификации, а в случае, если нуклеосомы занимают все доступные положения на ДНК, ЭПВ несколько стимулируется.

Ключевые слова: хроматин, транскрипция, регуляция, энхансеры, гистоны, модификации, ацетилирование

Транскрипция большинства генов эукариот регулируется с помощью энхансеров — последовательностей ДНК, связывающих транскрипционные факторы и активирующих транскрипцию на различно удалённых промоторах [1, 2]. Для того чтобы активироваться, гены должны быть локализованы внутри участка так называемого «открытого» хроматина, или эухроматина [3] — ДНК-гистонового комплекса, характеризующегося менее компактной структурой и определенными гистоновыми модификациями (например, H4K16-Ац и H3K27-Ац) [4]. Также известно, что подавляющее большинство энхансеров активируют свои целевые промоторы *in cis*, при этом разделяющий их участок ДНК образует петлю [4]. Эти и другие работы [2, 5] свидетельствуют о важной роли структуры хроматина в поддержании взаимодействия между энхансером и промотором. Кроме того, было показано, что компактизация ДНК при формировании хроматина, а следовательно, и уменьшение среднего расстояния между энхансером и промотором, не является единственной причиной, по которой хроматин стимулирует взаимодействия между участками генома [6].

Чтобы понять, как именно отдельные компоненты хроматина влияют на его пластичность и динамику, а также на возможность поддерживать эффективное энхансер-промоторное взаимодействие (ЭПВ), нами была разработана система транскрипции *in vitro*, позволяющая количественно оценить скорость ЭПВ. Была получена матрица, содержащая промотор и удаленный от него энхансер. Продолжительный участок ДНК между ними включал 13 расположенных друг за другом синтетических последовательностей «601», имеющих высокое сродство к гистонам и обеспечивающих сборку точно расположенных на ДНК нуклеосом и спонтанное образование хроматиновой фибриллы [7, 8]. Используя эту экспериментальную систему, мы продемонстрировали важную роль концевых участков («хвостов») сердцевинных гистонов, а также свободных участков ДНК [9] в поддержании эффективного ЭПВ [10].

В настоящей работе было определено действие ковалентной модификации одного из гистонов — H4K16-Ац — на ЭПВ в хроматине. Ранее было показано, что данная модификация ассоциирована с эухроматином [11] и влияет на

его структуру путем декомпактизации хроматиновой фибриллы [12].

Материалы и методы

Белки. Все белки транскрипционного комплекса были очищены, как описано ранее [13].

Сборка хроматиновых матриц. Октамеры гистонов без модификаций и с ацетилизацией гистона H4 по лизину в 16-м положении были получены методом, использованным ранее [14], хроматин с удаленными концевыми доменами гистонов – в результате трипсинолиза очищенного хроматина, выделенного из эритроцитов кур [15].

Сборка нуклеосом на линейизованной плазмиде pYP05 была проведена при различных соотношениях октамеров гистонов и матрицы (0,9:1; 1:1) с использованием градиентного диализа против буферного раствора, содержащего NaCl в концентрации от 2 М до 10 мМ [16].

Проверка качества сборки хроматиновых матриц. Проверка ожидаемого позиционирования нуклеосом на используемых матрицах была проведена с использованием метода анализа чувствительности к ферментативному расщеплению. Собранный хроматин был проинкубирован с рестрикционными эндонуклеазами *AluI* и *ScaI* (New England Biolabs, США). ДНК была очищена и использована как матрица для полимеразной цепной реакции с одним радиоактивно меченым праймером (метод удлинения праймера) с использованием ДНК-полимеразы Taq (New England Biolabs, США). Праймер отжигался непосредственно перед промотором [7].

Транскрипция. Условия для транскрипции *in vitro* были оптимизированы для максимального использования хроматиновой матрицы. Транскрипция была проведена, как описано ранее [13]. Во всех экспериментах использовалась одинаковая концентрация матрицы.

На матрице был собран закрытый инициаторный комплекс (ИКЗ). Один раунд транскрипции был проведен в реакционной смеси объемом 50 мкл в трис-ацетатном буфере (50 мМ, pH 8,0), содержащем 100 мМ ацетат калия, 8 мМ ацетат магния, 27 мМ ацетат аммония, 0,7% ПЭГ-8000 и 0,2 мМ дитиотреитол при концентрации ДНК или хроматина 1 нМ, а также 10 нМ РНК-полимеразы, 300 нМ сигма-фактора 54 и белковых факторов регуляции азотного обмена NtrC и NtrB в концентрациях 120 и 400 нМ соответственно. Сначала все компоненты были смешаны вместе в транскрипционном буфере (общий объем 40 мкл), инкубировались 15 мин при 37 °C для формирования закрытого комплекса. Далее 5 мкл 40 мМ АТФ, разведенного в транскрипци-

онном буфере, было добавлено к реакционной смеси до конечной концентрации 4 мМ. Реакция проводилась в течение 2 мин при 37 °C для формирования открытого инициаторного комплекса (ИКо). Затем смесь из четырех рибонуклеотидтрифосфатов (4 мМ каждого) в транскрипционном буфере с 2,5 мкКи [α - 32 P]-ГТФ (3000 Ки/мМ) и 2 мг/мл гепарина была добавлена к реакции для инициации элонгации и ограничения циклов транскрипции до одного раунда. Реакция проводилась при 37 °C в течение 15 мин и была остановлена смесью фенол:хлороформ (1:1). Радиоактивно меченая РНК была очищена и проанализирована в денатурирующем полиакриламидном геле. Гель был высушен, перенесен на радиочувствительный экран, который далее был отсканирован. Данные были проанализированы с помощью программы OptiQuant (PerkinElmer, США). Эксперименты выполнены в трех повторениях, определено среднее значение эффективности транскрипции и стандартное отклонение для выборки данных.

Результаты и обсуждение

В настоящей работе нами была использована экспериментальная система *in vitro*, позволяющая проводить количественный анализ эффективности ЭПВ в физиологических условиях на полинуклеосомных матрицах (рисунок, А) с точно позиционированными нуклеосомами, спонтанно формирующими хроматиновые фибриллы [7, 8]. При этом использовались либо матрицы, на которых нуклеосомы занимали все доступные положения на ДНК (рисунок, А и Д, 13), либо те, на которых отсутствовала одна нуклеосома в различных случайных положениях на ДНК (рисунок, Д, 13-1). Эти матрицы содержали либо интактные гистоны, либо гистон H4, ацетилированный по лизину в положении 16. Степень сборки нуклеосом оценивали с помощью анализа чувствительности участков ДНК, связанных и не связанных с белками, к рестрикционной эндонуклеазе *AluI* (рисунок, Б и В). Наличие и положения разрывов в ДНК определяли методом удлинения праймера.

С использованием разработанной нами ранее транскрипционной системы *in vitro*, позволяющей количественно оценить скорость ЭПВ на хроматиновой матрице (рисунок, Г), было показано, что при неполном насыщении ДНК нуклеосомами (рисунок, Д, матрица 13-1 – отсутствует один гистоновый октамер из тринадцати), наблюдается ингибирующее действие H4K16-Ац на ЭПВ (рисунок, Д и Е, 13-1). Поскольку H4K16-Ац приводит к нарушению контактов положительно заряженного N-концевого участ-

Рисунок. Влияние ацетилирования лизина в 16-м положении гистона H4 (H4K16-Ac) на энхансер-промоторное взаимодействие (ЭПВ) в хроматине. **А** – схема полинуклеосомной транскрипционной матрицы, содержащей энхансер и промотор. **Б** – схема эксперимента по определению качества сборки хроматиновых матриц. Полинуклеосомная матрица, содержащая 13 повторяющихся участков длиной 177 п.н., включающих высокоаффинную к гистонам последовательность 601 (601(177)х13), была собрана на линейаризованной плазмиде и проинкубирована с рестрикционной эндонуклеазой *AluI*. Очищенная ДНК была использована как матрица для удлинения радиоактивно меченого праймера. **В** – характеристика насыщенных нуклеосомных матриц (13) и матриц, в которых отсутствует одна нуклеосома в случайном положении (13-1), методом анализа защиты от эндонуклеазного расщепления рестрикционным ферментом *AluI*. Анализ продуктов реакции удлинения праймера методом электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле. Детекция радиоактивного сигнала с помощью радиочувствительного экрана и системы считывания флуоресценции. **Г** – экспериментальная схема измерения скорости ЭПВ в хроматине *in vitro*. ИКз и ИКо – закрытый и открытый инициаторные комплексы соответственно. **Д** – Действие H4K16-Ac на ЭПВ в хроматине зависит от насыщенности ДНК нуклеосомами. **Е** – количественный анализ транскриптов, показанных на панели Д. Приведены результаты обобщения данных трех независимых экспериментов с указанием стандартного отклонения.

ка H4 с отрицательно заряженным участком H2A/H2B соседней нуклеосомы, происходит нарушение компактной структуры хроматиновой фибриллы. При этом менее выраженное активирующее действие наблюдается на матрицах с более высоким уровнем сборки нуклеосом (рисунок, Д и Е, 13). Полученные результаты согласуются с данными о роли концевых доменов гистонов в поддержании ЭПВ [10].

Свободные от нуклеосом участки ДНК выполняют роль «сустава» и обеспечивают компактной фибрилле хроматина возможность сгибаться, образуя петлю, для поддержания эффективной ЭПВ [9]. Таким образом, структура имеет оптимальные динамические параметры и остается компактной. При ацетилировании H4K16 компактизация хроматина уменьшается, и это ведет к уменьшению скорости ЭПВ (рисунок, Е, 13-1).

При более высоком уровне сборки (рисунок, матрица 13) хроматиновая фибрилла более жесткая, имеет неоптимальные динамические параметры и характеризуется высокой степенью компактизации. При ацетилировании H4K16 степень компактизации нарушается, но вместе с этим, вероятнее всего, увеличивается гибкость фибриллы за счет открывания участков свободной ДНК. Все это приводит к не-

большому активирующему действию H4K16-Ац на ЭПВ при насыщенном уровне сборки хроматина (рисунок, Д и Е, 13). Напомним, что в случае удаления N-концевых участков гистонов на матрице 13 (рисунок, А и Д) ранее наблюдалось ослабление эффективности ЭПВ [2]. При этом теряется не только компактность, но и ряд электростатических взаимодействий внутри фибриллы хроматина, которые, по всей видимости, влияют на поддержание эффективного ЭПВ. Таким образом, H4K16-Ац на матрице 13 вызывает эффект, противоположный тому, который наблюдается при удалении N-концевых участков гистонов.

Полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что H4K16-Ац оказывает различное действие на ЭПВ в хроматине в зависимости от степени его сборки. Это согласуется с данными *in vivo* [17], показывающими, что H4K16-Ац

локализуется внутри относительно небольших участков активного хроматина, по-видимому, открывая доступ транскрипционным факторам к участкам их связывания, а также придавая хроматиновой фибрилле гибкость, подобную «гибкости сустава», для эффективного ЭПВ. Таким образом, скорость ЭПВ в хроматине может увеличиваться двумя способами — с помощью удаления отдельных нуклеосом [9] и с помощью ацетилирования H4K16-Ац, как показано в настоящей работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-30003).

Исследование выполнено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wasylyk B., Wasylyk C., Chambon P. Short and long range activation by the SV40 enhancer // *Nucleic Acids Res.* 1984. Vol. 12. N 14. P. 5589–5608.
2. Kulaeva O.I., Nizovtseva E.V., Polikanov Y.S., Ulianov S.V., Studitsky V.M. Distant activation of transcription: mechanisms of enhancer action // *Mol. Cell. Biol.* 2012. Vol. 32. N 24. P. 4892–4897.
3. Gilbert N., Boyle S., Fiegler H., Woodfine K., Carter N.P., Bickmore W.A. Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers // *Cell.* 2004. Vol. 118. N 5. P. 555–566.
4. Spitz F. Gene regulation at a distance: From remote enhancers to 3D regulatory ensembles // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2016. Vol. 57. P. 57–67.
5. Nizovtseva E.V., Todolli S., Olson W.K., Studitsky V.M. Towards quantitative analysis of gene regulation by enhancers // *Epigenomics.* 2017. Vol. 9. N 9. P. 1219–1231.
6. Rubtsov M.A., Polikanov Y.S., Bondarenko V.A., Wang Y.H., Studitsky V.M. Chromatin structure can strongly facilitate enhancer action over a distance // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006. Vol. 103. N 47. P. 17690–17695.
7. Polikanov Y.S., Studitsky V.M. Analysis of distant communication on defined chromatin templates *in vitro* // *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 543. P. 563–576.
8. Maeshima K., Rogge R., Tamura S., Joti Y., Hikima T., Szerlong H., Krause C., Herman J., Seidel E., DeLuca J., Ishikawa T., Hansen J.C. Nucleosomal arrays self-assemble into supramolecular globular structures lacking 30-nm fibers // *EMBO J.* 2016. Vol. 35. N 10. P. 1115–1132.
9. Nizovtseva E.V., Clauvelin N., Todolli S., Polikanov Y.S., Kulaeva O.I., Wengrzynek S., Olson W.K., Studitsky V.M. Nucleosome-free DNA regions differentially affect distant communication in chromatin // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45. N 6. P. 3059–3067.
10. Kulaeva O.I., Zheng G., Polikanov Y.S., Colasanti A.V., Clauvelin N., Mukhopadhyay S., Sengupta A.M., Studitsky V.M., Olson W.K. Internucleosomal interactions mediated by histone tails allow distant communication in chromatin // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287. N 24. P. 20248–20257.
11. Bone J.R., Lavender J., Richman R., Palmer M.J., Turner B.M., Kuroda M.I. Acetylated histone H4 on the male X chromosome is associated with dosage compensation in *Drosophila* // *Genes Dev.* 1994. Vol. 8. N 1. P. 96–104.
12. Shogren-Knaak M., Ishii H., Sun J.M., Pazin M.J., Davie J.R., Peterson C.L. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions // *Science.* 2006. Vol. 311. N 5762. P. 844–847.
13. Polikanov Y.S., Rubtsov M.A., Studitsky V.M. Biochemical analysis of enhancer-promoter communication in chromatin // *Methods.* 2007. Vol. 41. N 3. P. 250–258.
14. Dann G.P., Liszczak G.P., Bagert J.D., Muller M.M., Nguyen U.T.T., Wojcik F., Brown Z.Z., Bos J., Panchenko T., Pihl R., Pollock S.B., Diehl K.L., Allis C.D., Muir T.W. ISWI chromatin remodellers sense nucleosome modifications to determine substrate preference // *Nature.* 2017. Vol. 548. N 7669. P. 607–611.

15. Polach K.J., Lowary P.T., Widom J. Effects of core histone tail domains on the equilibrium constants for dynamic DNA site accessibility in nucleosomes // *J. Mol. Biol.* 2000. Vol. 298. N 2. P. 211–223.

16. Walter W., Studitsky V.M. Construction, analysis, and transcription of model nucleosomal

templates // *Methods.* 2004. Vol. 33. N 1. P. 18–24.

17. Taylor G.C., Eskeland R., Hekimoglu-Balkan B., Pradeepa M.M., Bickmore W.A. H4K16 acetylation marks active genes and enhancers of embryonic stem cells, but does not alter chromatin compaction // *Genome Res.* 2013. Vol. 23. N 12. P. 2053–2065.

Поступила в редакцию 22.05.2019 г.

После доработки 03.08.2019 г.

Принята в печать 02.09.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

EFFECT OF ACETYLATION OF HISTONE H4 ON COMMUNICATION IN CHROMATIN

E.V. Nizovtseva¹, N.S. Gerasimova², V.M. Studitsky^{1, 2, *}

¹*Cancer Epigenetics Team, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA;*

²*Bioengineering Department, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia*

*e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Long-distance interaction plays an important role in the regulation of eukaryotic genes. Chromatin structure is involved in the process, but the role of histone modifications has not been studied. In the present work the role of acetylation H4K16 (H4K16-Ac) to enhancer-promoter communication (EPC) was analyzed. This modification is associated with euchromatin and is involved in the decompaction of chromatin fibers. We have shown that the effect of H4K16-Ac on EPC *in vitro* depends on the level of chromatin assembly. EPC in chromatin, which lacks nucleosomes at random positions on DNA, is inhibited in the presence of H4K16-Ac. At the same time, EPC in chromatin, in which nucleosomes occupy all available positions on DNA, is somewhat stimulated in the presence of H4K16-Ac.

Keywords: *chromatin, transcription, regulation, enhancers, histones, modifications, acetylation*

Сведения об авторах

Низовцева Екатерина Вячеславовна — канд. биол. наук, науч. сотр. Центра исследований рака Фокс Чейз (Филадельфия, США). Тел. +1-215-728-7405; e-mail: katrinaniz@gmail.com

Герасимова Надежда Сергеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. 8-495-938-22-91; e-mail: gerasimova@mail.bio.msu.ru

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ; руководитель лаборатории эпигенетики рака Центра исследований рака Фокс Чейз (Филадельфия, США). Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu