

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.21

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ НАТРИЯ И КАЛИЯ НА КОНФОРМАЦИЮ
ЛИНКЕРНЫХ УЧАСТКОВ НУКЛЕОСОМА.В. Любителев¹, В.М. Студитский^{1,2}, А.В. Феофанов^{1,3,*}, М.П. Кирпичников^{1,3}¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Fox Chase Cancer Center, Cottman avenue 333, Philadelphia, 19111 Pennsylvania, USA;³Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

*e-mail: avfeofanov@yandex.ru

Структура хроматина и доступность ДНК для белков зависят от структуры “линкерной” ДНК, расположенной на входе в нуклеосому и выходе из неё. Поскольку ДНК является отрицательно заряженным полимером, конформация линкерной ДНК, в свою очередь, зависит от ионного микроокружения. В настоящей работе методом флуоресцентной микроскопии одиночных комплексов исследовано влияние ионов Na^+ и K^+ на структуру линкерной ДНК моонуклеосом. Выявлено, что нуклеосомы находятся в одном из двух конформационных состояний, заселённость которых существенно меняется после замены ионов K^+ на Na^+ . Эти изменения, вероятно, обусловлены различным взаимодействием Na^+ и K^+ с ДНК в областях входа ДНК в нуклеосому и выхода из неё. Катион-зависимые изменения конформации линкерной ДНК могут менять топологические барьеры в нуклеосоме, структуру полинуклеосомного хроматина и влиять на взаимодействия с различными белковыми факторами.

Ключевые слова: хроматин, нуклеосома, линкеры, ионы натрия, ионы калия, флуоресценция, микроскопия, одиночная молекула

Хроматин представляет собой сложную, тонко регулируемую ДНК-белковую структуру, единицей которой является нуклеосома. Функционирование хроматина во многом обеспечивается за счёт контролируемых конформационных перестроек, которые происходят на разных структурных уровнях: 30-нанометровой фибриллы, нуклеосомы и ДНК. При этом линкерная область нуклеосом является местом взаимодействия многочисленных структурных и регуляторных белков, включая линкерный гистон H1, факторы транскрипции и её регуляции, такие, как РНК-полимераза и PARP1 (Poly (ADP-ribose) polymerase 1). Структура и динамика линкерной области нуклеосом представляют большой интерес, но лишь немногие методы обеспечивают возможность таких исследований. В качестве экспериментальной системы для решения подобного рода задач могут быть использованы моонуклеосомы, собранные на октамере гистонов с применением короткой строго позиционируемой ДНК (например, последовательности ДНК-матрицы 601 или 603 длиной 147 пар нуклеотидов — п.н.), удлиненной с обеих сторон для формирования линкеров [1, 2]. Если в линкеры ввести две флуоресцентные метки, взаимодействующие по механизму Фёрстеровского резонансного переноса энергии (Forster Resonance Energy Transfer, FRET), то для структурных исследований таких моонуклеосом применим метод флуоресцентной микроскопии одиночных комплексов [2–4].

Согласно результатам экспериментальных [3–5] и расчётных [6, 7] работ, структура и динамика нуклеосом зависят от ионного окружения, которое является существенным компонентом, стабилизирующим и модулирующим взаимодействия полианионной ДНК с поликатионными гистонами в составе компактной нуклеосомной частицы. Линкеры и прилегающие к ним участки нуклеосомной ДНК наименее прочно взаимодействуют с гистонами нуклеосомного ядра и несут большой нескомпенсированный заряд, нейтрализуют который, в первую очередь, противоионы. При этом даже близкие по своим свойствам моновалентные катионы натрия и калия существенно отличаются как по характеру связывания с ДНК и нуклеосомой, так и по времени жизни связанного состояния [5–7].

В настоящей работе впервые получены данные об изменении конформации линкеров при замене ионов калия на ионы натрия, что, по-видимому, связано с катион-зависимой модуляцией взаимодействий ДНК с гистонами в областях входа в нуклеосому и выхода из неё. Такая модуляция может менять топологические барьеры в нуклеосоме, структуру полинуклеосомного хроматина и влиять на взаимодействия с различными белковыми факторами.

Материалы и методы

Реагенты, использованные в работе, описаны ранее [8, 9]. При сборке нуклеосом в качестве источника гистонов использовали хроматин без гистона

H1, который выделяли из эритроцитов цыплят по ранее описанной методике [8]. ДНК-матрица включала в себя позиционирующую последовательность 603 длиной 147 п.н., удлинённую с обоих концов на 40 п.н. для формирования линкеров. Матрицу получали по методике, описанной в предыдущее работе [10]. При получении ДНК-матрицы, флуоресцентно-меченой в области линкеров, использовали следующие праймеры (“Синтол”, Россия; флуоресцентно-меченые тимидины подчеркнуты; названия меток, Cy3 и Cy5, указаны надстрочным знаком):

5'– TAAGGCGAATTCACAAC^{Cy5}TTT^{Cy5}TGGCAAG
AAAATGAGCt –3'

5' ACACGGCGCACTGCCAACCCAA^{Cy3}T^{Cy3}CGACA
CCGGCACGAG 3'.

Присутствие меток в составе ДНК подтверждено электрофорезом в 4,5%-ном полиакриламидном геле (ПААГ; соотношение акриламид : бисакриламид – 39:1) в нативных условиях с последующим флуоресцентным анализом геля с помощью сканера Typhoon (GE Healthcare) и методом флуоресцентной микроскопии одиночных молекул (рисунок, А). Нуклеосомы собирали методом диализа против растворов с последовательно уменьшающейся концентрацией хлорида натрия, как описано ранее [8]. Эффективность сборки нуклеосом проверяли методом электрофореза в 4,5%-ном ПААГ (неденатурирующие условия, 0,5-кратный буфер TBE состава 44,5 мМ Трис, 44,5 мМ борной кислоты, 1 мМ ЭДТА) по флуоресценции Cy3 в составе ДНК.

Для измерений под микроскопом нуклеосомы разбавляли до концентрации 0,4–0,8 нМ в буфере

следующего состава: 10 мМ Трис (pH 8,0), 1 мМ β-меркаптоэтанола, 0,5 мМ ЭДТА с добавлением 150 мМ KCl или 150 мМ NaCl; затем переносили в лунку камеры flexiPERM (Greiner Bio-One, Германия), закрепленной на покровном стекле.

Измерения одиночных нуклеосом проводили, используя лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM710-Confocor3 (Carl Zeiss, Йена), по ранее описанной методике [9]. Флуоресценцию возбуждали при 514,5 нм (0,12 мВт на образце), а регистрировали в диапазонах 530–635 нм (Cy3) и 635–800 нм (Cy5) с временем интегрирования 3 мс.

Для одиночных нуклеосом, свободно диффундирующих через фокус лазерного луча, измеряли интенсивности флуоресценции Cy3 (I_3) и Cy5 (I_5) и рассчитывали эффективность FRET (E):

$$E = (I_5 - 0,19 \times I_3) / (I_5 + 0,81 \times I_3) \quad (1),$$

где коэффициенты 0,19 и 0,81 обеспечивают коррекцию на перекрывание спектров флуоресценции Cy3 и Cy5 в области 635–800 нм.

Для каждого образца нуклеосом измерения выполняли в течение двух последовательных интервалов времени по 10 мин при величине выборки в каждом интервале 1000–3000 нуклеосом. Наборы значений E графически представляли в виде гистограмм относительной частоты распределения величины E. Результаты последовательных измерений сравнивали, чтобы подтвердить стабильность структуры нуклеосом во времени. Измерения нуклеосом проводили в трёх независимых повторях. Частотные гистограммы величины E усредняли по трём измерениям и описывали в виде суперпозиции полос Гауссовой формы. Суммарный размер выборок – 9000–14 000 нуклеосом.

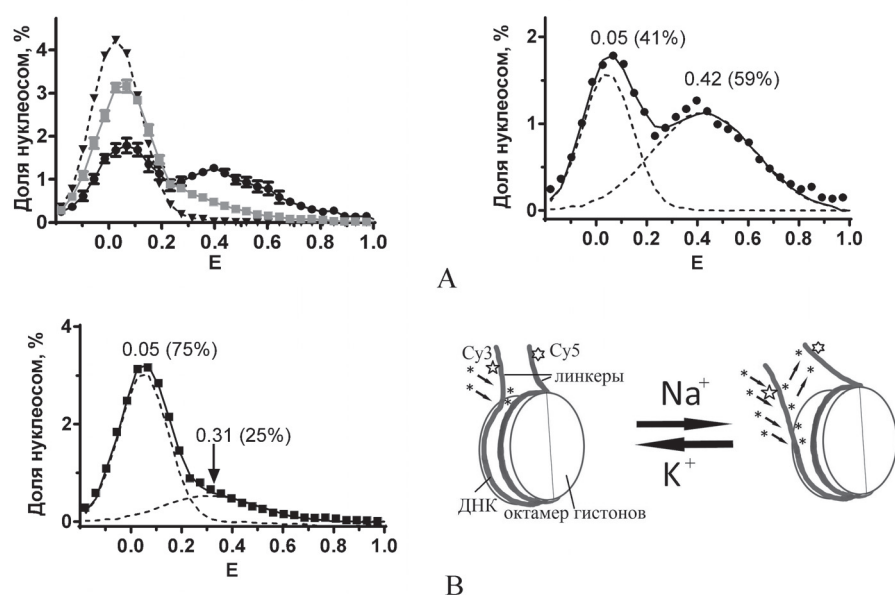


Рисунок. Влияние ионов натрия и калия на структуру линкерной области нуклеосом по данным флуоресцентной микроскопии одиночных комплексов. А – Сравнение гистограмм относительной частоты распределения величины E для свободной флуоресцентно-меченой ДНК (треугольники, прерывистая линия) и нуклеосом в буфере, содержащем 150 мМ KCl (круги, чёрная линия) или 150 мМ NaCl (квадраты, серая линия). Б, В – Результаты разложения частотных распределений величины E на сумму Гауссовых полос

(прерывистые линии) для нуклеосом в буфере со 150 мМ KCl (Б) или 150 мМ NaCl (В). Цифрами указаны максимумы этих полос и доля нуклеосом (в скобках), соответствующих каждой полосе. Г – Схема возможных конформаций нуклеосомы. Ионы Na^+ связываются с ДНК значительно сильнее, чем ионы K^+ , препятствуя реассоциации ДНК с нуклеосомным ядром в области, подверженной нуклеосомному “дыханию”. Символом “*” обозначены ионы соответствующих металлов

Результаты и обсуждение

Для проведения исследований нами разработана нуклеосомная матрица, в которой метка Су3 была размещена на расстоянии 18 п.н. до первого нуклеотида, а Су5 — на расстоянии 20 п.н. после последнего нуклеотида позиционирующей последовательности ДНК-матрицы 603. Удалённое от нуклеосомного ядра расположение меток позволяет избежать возможного ограничения подвижности флуорофоров и тушения флуоресценции, влияющих на эффективность FRET. При этом расстояние от нуклеосомной позиционирующей последовательности до меток лишь немного больше персистентной длины молекулы ДНК (около 50 нм или 15 п.н. [11]), что позволяет приблизительно считать участок линкера от нуклеосомы до метки линейным.

Измерения свободно диффундирующих одиночных нуклеосом в растворе, содержащем 150 мМ KCl, выявили, что распределение нуклеосом по величине E неоднородно (рисунок, А) и характеризуется наличием двух состояний с максимумами $E_1 = 0,05$ и $E_2 = 0,42$, к которым относятся соответственно 41 и 59% нуклеосом (рисунок, Б). Это распределение не меняется в течение 40 мин измерений, что подтверждает отмечавшуюся нами ранее стабильность структуры нуклеосом в используемых экспериментальных условиях [8–10, 12]. В случае свободной ДНК величина E имеет нормальное (Гауссово) распределение с одним максимумом вблизи нуля (рисунок, А). Как установлено нами ранее [10] и подтверждено данными электрофореза для изучаемых нуклеосом (данные не показаны), в образце присутствует не более 3% свободной ДНК-матрицы, которая, очевидно, не может быть причиной пика $E_1 = 0,05$ с низкой величиной FRET. В электрофореграмме наблюдается лишь одна полоса, соответствующая нуклеосомам, что исключает их неполную сборку как причину появления двух пиков в распределении нуклеосом по величине E . Возможный вклад фотообесцвечивания акцептора (Су5) в интенсивный пик $E_1 = 0,05$ можно также исключить, так как распределение E не меняется со временем и при 2–3 кратном увеличении мощности возбуждающего флуоресценцию света. Высокую фотостабильность меток в наших экспериментальных условиях подтверждают и проведенные ранее исследования на нуклеосомах с различным положением флуоресцентных меток [8–10, 12, 13]. Таким образом, для нуклеосом в присутствии 150 мМ KCl характерны две конформации, отличающиеся расстоянием между линкерами в области положения меток, на что указывают разные величины E_1 (большое расстояние) и E_2 (меньшее расстояние). Предположительно эти конформации имеют времена жизни значительно больше 3 мс (среднее время диффузии нуклеосомы через фокус лазерного луча), и нуклеосомы могут переходить из одной конформации в другую. Наличие двух

конформаций в присутствии 150 мМ KCl было показано нами и для нуклеосом с иным положением меток на линкерах (Су3 — 10 п.н. до первого нуклеотида, Су5 — 15 п.н. после последнего нуклеотида позиционирующей последовательности ДНК-матрицы) [10]. Таким образом, вывод о наличии двух конформаций у нуклеосомы не связан с индивидуальными особенностями расположения меток на линкерах.

При замене в растворе ионов калия на ионы натрия распределение нуклеосом по величине E достоверно изменяется (рисунок, А): сохраняется состояние с $E_1 = 0,05$ при возрастании доли нуклеосом в нём до 75%, а максимум второго состояния наблюдается при $E_2 = 0,31$ (25% нуклеосом) (рисунок, Б). Такое распределение нуклеосом по величине E , формирующееся в присутствии ионов натрия, стабильно в течение 40 мин измерений. Полученные данные свидетельствуют о том, что катионы натрия заметно уменьшают стабильность конформации с $E_2 = 0,42$: значительная часть нуклеосом переходит в состояние с $E_1 = 0,05$, а у оставшихся в альтернативной конформации нуклеосом увеличивается расстояние между линкерами, что регистрируется как сдвиг максимума второго пика к 0,31 по шкале E .

Изменения в структуре нуклеосом, вероятно, вызваны тем, что ионы Na^+ удерживаются на ДНК намного прочнее, чем ионы K^+ [5–7]. Основной причиной этого является меньший по сравнению с K^+ диаметр внешней электронной оболочки Na^+ , позволяющий ему глубже погружаться в двухцепочечную ДНК [6]. Эти особенности взаимодействия с Na^+ могли бы приводить к сближению линкеров за счет более полной нейтрализации отрицательного заряда ДНК и уменьшению их взаимного отталкивания. Однако данные микроскопии одиночных комплексов (рисунок) свидетельствуют об обратном: расстояние между линкерами увеличивается. Это противоречие устраняется, если предположить, что структурные изменения вызваны особенностями взаимодействия ионов в областях входа ДНК в нуклеосому и выхода из неё. Считается, что в этих областях могут происходить конформационные переходы, называемые “дыханием” нуклеосом: спонтанные и обратимые отворачивания ДНК от нуклеосомного ядра. В пользу существования такого рода переходов говорят как результаты экспериментов *in vitro* [2, 14–16], так и данные компьютерного моделирования [17, 18]. Согласно этим данным, потеря связей с гистоновым ядром при отворачивании ДНК возможна для 20 нуклеотидов на границе нуклеосомного ядра. За пределами этих 20 нуклеотидов эффективность взаимодействия ДНК с гистонами значительно возрастает, резко увеличивая затраты энергии на отворачивание и уменьшая его вероятность [17, 19]. Усиленное связывание Na^+ с ДНК в области этих 20 нуклеотидов может затруднять восстановление контактов ДНК с гистонами и способствовать ста-

билизации конформации с отвёрнутой ДНК и соответственно увеличенным расстоянием между линкерами (рисунок, *Г*). При этом как расчёты, так и экспериментальные данные показывают, что отворачивание ДНК с одной стороны нуклеосомы резко затрудняет её диссоциацию с другой стороны [1].

Наиболее вероятной моделью состояний с $E_2 = 0,42$ и $E_3 = 0,31$ является конформация, при которой оба линкера в областях входа ДНК в нуклеосомное ядро и выхода из него связаны с гистонами нуклеосомы (сильнее в присутствии K^+ и слабее в присутствии Na^+ ; рисунок, *Г*). Тогда состоянию $E_1 = 0,05$ соответствует конформация, при которой один из линкеров отвернут от гистонного кора (рисунок, *Г*). Отметим, что возможно существование ряда конформационных состояний линкерных фрагментов [17], не различимых по величине E .

Представленные результаты свидетельствуют о том, что тип катионов, присутствующих в микроокружении нуклеосомы, существенным образом

влияет на её структуру. Ассоциация ДНК с гистонным ядром в области входа ДНК в нуклеосомное ядро и выхода из него способствует сохранению нуклеосомы и создаёт дополнительный барьер для ферментов и других молекул, функционирование которых связано с отворачиванием ДНК от гистонов нуклеосомы.

В клеточном ядре преобладают ионы K^+ , которые отличаются от ионов Na^+ по взаимодействию со свободной ДНК и с нуклеосомой [5–7], а также по влиянию на структуру нуклеосом (рисунок). В то же время многие исследования методом микроскопии одиночных частиц традиционно проводят в присутствии ионов Na^+ [3, 15, 16]. Полученные нами результаты указывают на необходимость оптимизации ионного состава растворов при проведении как структурных, так и функциональных исследований на нуклеосомах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00031, соглашение № 14-24-00031-П).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ngo T.T., Zhang Q., Zhou R., Yodh J.G., Ha T. Asymmetric unwrapping of nucleosomes under tension directed by DNA local flexibility // *Cell*. 2015. Vol. 160 N 6. P. 1135–1144.
2. Li G., Levitus M., Bustamante C., Widom J. Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005. Vol. 12. N 1. P. 46–53.
3. Gansen A., Toth K., Schwarz N., Langowski J. Structural variability of nucleosomes detected by single-pair Förster resonance energy transfer: histone acetylation, sequence variation, and salt effects // *J. Phys. Chem. B*. 2009. Vol. 113. N 9. P. 2604–2613.
4. Gansen A., Valeri A., Hauger F., Felekyan S., Kalinin S., Toth K., Langowski J., Seidel C.A. Nucleosome disassembly intermediates characterized by single-molecule FRET // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009. Vol. 106. N 36. P. 15308–15313.
5. Zinchenko A.A., Yoshikawa K. Na^+ shows a markedly higher potential than K^+ in DNA compaction in a crowded environment // *Biophys. J.* 2005. Vol. 88. N 6. P. 4118–4123.
6. Savelyev A., Papoian G.A. Electrostatic, steric, and hydration interactions favor Na^+ condensation around DNA compared with K^+ // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. Vol. 128. N 45. P. 14506–14518.
7. Materese C.K., Savelyev A., Papoian G.A. Counterion atmosphere and hydration patterns near a nucleosome core particle // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. Vol. 131. N 41. P. 15005–15013.
8. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Chromatin Protocols. Methods Mol. Biol.* Vol. 523 / Ed. S.P. Chellappan. Humana Press, 2009. P. 109–123.
9. Kudryashova K.S., Chertkov O.V., Nikitin D.V., Pestov N.A., Kulaeva O.I., Efremenko A.V., Solonin A.S., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Preparation of mononucleosomal templates for analysis of transcription with RNA polymerase using spFRET // *Chromatin Protocols. Methods Mol. Biol.* Vol. 1288 / Ed. S.P. Chellappan. N.Y.: Springer, 2015. P. 395–412.
10. Lyubitelev A.V., Kudryashova K.S., Mikhaylova M.S., Malyuchenko N.V., Chertkov O.V., Studitsky V.M., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P. Change in conformation of linker DNA upon binding of histone H1.5 to nucleosome: fluorescent microscopy of single complexes // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 2. P. 108–113.
11. Manning G.S. The persistence length of DNA is reached from the persistence length of its null isomer through an internal electrostatic stretching force // *Biophys. J.* 2006. Vol. 91. N 10. P. 3607–3616.
12. Valieva M.E., Armeev G.A., Kudryashova K.S., Gerasimova N.S., Shaytan A.K., Kulaeva O.I., McCullough L.L., Formosa T., Georgiev P.G., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Large-scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. Vol. 23. N 12. P. 1111–1116.
13. Sultanov D., Gerasimova N., Kudryashova K., Maluchenko N., Kotova E., Langelier M.F., Pascal J., Kirpichnikov M., Feofanov A., Studitsky V. Unfolding of core nucleosomes by PARP-1 revealed by spFRET microscopy // *AIMS Genetics*. 2017. Vol. 4. N 1. P. 21–31.
14. Choy J.S., Lee T.H. Structural dynamics of nucleosomes at single-molecule resolution // *Trends Biochem. Sci.* 2012. Vol. 37. N 10. P. 425–435.
15. Wei S., Falk S.J., Black B.E., Lee T.H. A novel hybrid single molecule approach reveals spontaneous DNA motion in the nucleosome // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43. N 17. e111.
16. Koopmans W.J., Brehm A., Logie C., Schmidt T., van Noort J. Single-pair FRET microscopy reveals mononucleosome dynamics // *J. Fluoresc.* 2007. Vol. 17. N 6. P. 785–795.

17. *Kenzaki H., Takada S.* Partial unwrapping and histone tail dynamics in nucleosome revealed by coarse-grained molecular simulations // *PLoS Comput. Biol.* 2015. Vol. 11. N 8. e1004443.

18. *Li Z., Kono H.* Distinct roles of histone H3 and H2A tails in nucleosome stability // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. 31437.

19. *Forties R.A., North J.A., Javaid S., Tabbaa O.P., Fishel R., Poirier M.G., Bundschuh R.* A quantitative model of nucleosome dynamics // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol. 39. N 19. P. 8306–8313.

Поступила в редакцию

12.05.2017

Принята в печать

15.06.2017

MOLECULAR BIOLOGY

INFLUENCE OF SODIUM AND POTASSIUM IONS ON CONFORMATION OF LINKER PARTS OF NUCLEOSOMES

A.V. Lyubitelev¹, V.M. Studitsky^{1,2}, A.V. Feofanov^{1,3,}, M.P. Kirpichnikov^{1,3}*

¹*Bioengineering Department, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

²*Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman avenue, Philadelphia, Pennsylvania 19111, USA;*

³*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya ul. 16/10, 117997, Moscow, Russia*

**e-mail: avfeofanov@yandex.ru*

The structure of chromatin and DNA accessibility to proteins depend on the structure of DNA “linkers” entering and exiting the nucleosome. Since DNA is negatively charged, conformation of the DNA linkers, in turn, is likely affected by ionic microenvironment. Here method of fluorescence microscopy of single complexes was used to study the effect of Na⁺ and K⁺ ions on the structure of the DNA linkers. It was revealed that nucleosomes adopt one of two conformational states, and occupancy of these states is considerably changed after substitution of K⁺ ions by Na⁺. These changes are likely caused by different interaction of Na⁺ and K⁺ ions with DNA in the regions of entry and exit of DNA from the nucleosome. Cation-dependent changes in conformation of the DNA linkers can affect topological barriers in nucleosomes, structure of polynucleosome chromatin and interactions of DNA with different protein factors.

Keywords: *chromatin, nucleosome, linkers, sodium ions, potassium ions, fluorescence, microscopy, single molecule*

Сведения об авторах

Любителиев Александр Викторович — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел 8 495-938-22-91, e-mail: varanus-salvator@yandex.ru

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Тел. 8-495-336-64-55; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Кирпичников Михаил Петрович — акад. РАН, проф., докт. биол. наук, зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ, зав. отделом биоинженерии ИБХ РАН. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru