

УДК 577.322.7+577.323.7+535.56+543.422.8

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ИК/ВКД ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ¹

Поляничко А.М.^{1,2}, Чихиржина Е.В.²

¹*Физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета и* ²*Институт цитологии РАН. polyanichko@gmail.com*

Исследование крупных надмолекулярных комплексов ДНК и белков классическими спектральными методами, такими как круговой дихроизм (КД), обусловлено рядом методических сложностей. Например, рассеяние света в УФ-диапазоне, вызванное большими размерами комплексов, может быть столь велико, что спектры УФ–КД становятся неинформативными со структурной точки зрения, приобретая характерную неконсервативную форму, известную как ψ -тип спектра КД [1, 2]. Для преодоления подобных сложностей было предложено применить метод КД в инфракрасной (ИК) области спектра (ВКД от англ. *VCD – Vibrational Circular Dichroism*). Растворы, рассеивающие свет в УФ- и видимой областях, оказываются прозрачными для длинноволнового ИК-излучения.

Обладая всеми преимуществами УФ–КД, ВКД по своей природе является несравненно более информативным спектральным методом [3–5]. Колебания отдельных связей в молекулах приводят к возникновению характерных полос поглощения в спектрах ДНК и белков, некоторые из которых принадлежат оптически активным переходам, и соответствующие им полосы могут также наблюдаться и в спектрах ВКД. Как и в случае УФ–КД, спектры ВКД белков и ДНК чувствительны к изменениям вторичной структуры. Однако они содержат также информацию об ориентации отдельных химических групп в составе молекул и их взаимодействиях [1].

Для иллюстрации возможностей метода были выбраны с точки зрения КД достаточно «неудобные» системы на основе комплексов ДНК с негистоновым белком хроматина HMGB1 и гистоном H1. Каждый из этих белков является наиболее распространенным в своем классе. Они оба играют важную роль в структурной организации хроматина

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 07-04-01072, Гранта Президента РФ (МК-2126.2007.4), Программы "Ведущие научные школы России" (грант НШ-1961.2008.4).

[6, 7]. Установлено, что связывание каждого из белков способно приводить к появлению ψ -спектров КД [8]. Действуя совместно, они стимулируют образование надмолекулярных ДНК-белковых комплексов на более ранних этапах взаимодействия [9].

Для приготовления ДНК-белковых комплексов были использованы гистон Н1 и негистоновый белок НМGB1, выделенные из тимуса телят по методике [8]. ДНК тимуса телят фирмы «Сигма» (Sigma) была обработана ультразвуком, как описано ранее [10]. Все водные растворы были приготовлены с использованием дважды дистиллированной воды. Для приготовления образцов в ИК-экспериментах применялась тяжелая вода фирмы «Сигма» (99,9% D₂O). Содержание белка в пробе описано в терминах весового отношения белка к ДНК (r). Спектральные исследования проводились в соответствии с методикой из работы [10].

Спектры ИК-поглощения и КД ДНК и белков представлены на рис. 1. Отнесение полос в спектре свободной ДНК было проведено и описано ранее [10–13]. Спектры комплексов ДНК–НМGB1–Н1 приведены на рис. 2 для различных значений r . В спектрах белков выделяются две основные полосы, соответствующие колебаниям связей в группах C=O (Амид I) и ND₂ (Амид II) [11], которые наблюдаются соответственно в окрестности 1645 и 1460 см⁻¹ в спектрах поглощения (рис. 1, а) и 1676(+)/1635(-) и 1440(-) см⁻¹ в спектрах ВКД (рис. 1, б). Для того чтобы исключить вклад отдельно белков и ДНК из спектров комплекса, были проанализиро-

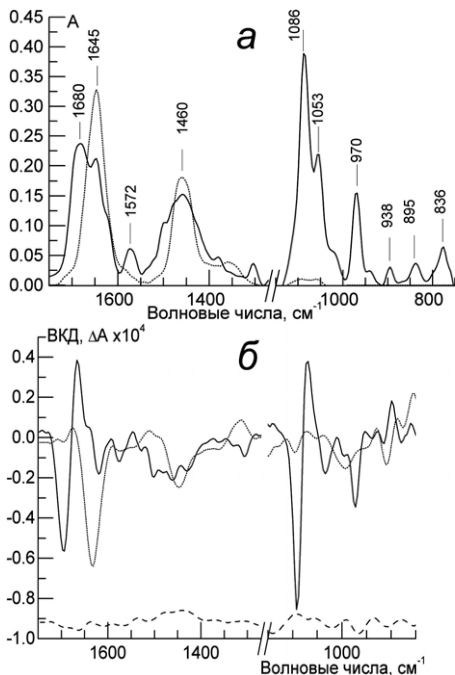


Рис. 1. Спектры ИК поглощения (а) и КД (б) ДНК (тёмная линия) и белков (светлая линия). Пунктиром обозначен масштаб шума в спектрах ВКД.

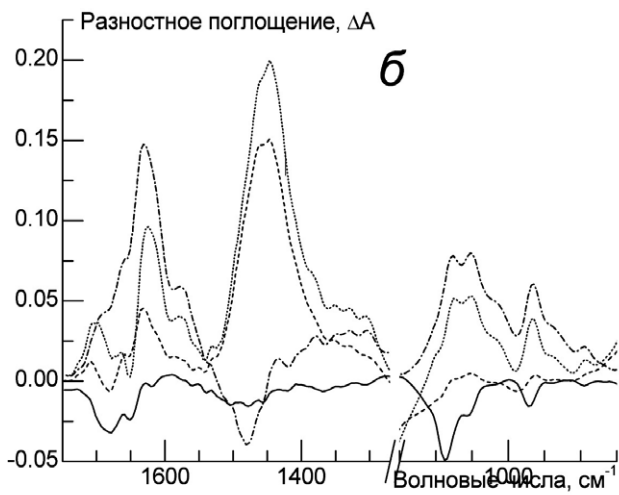
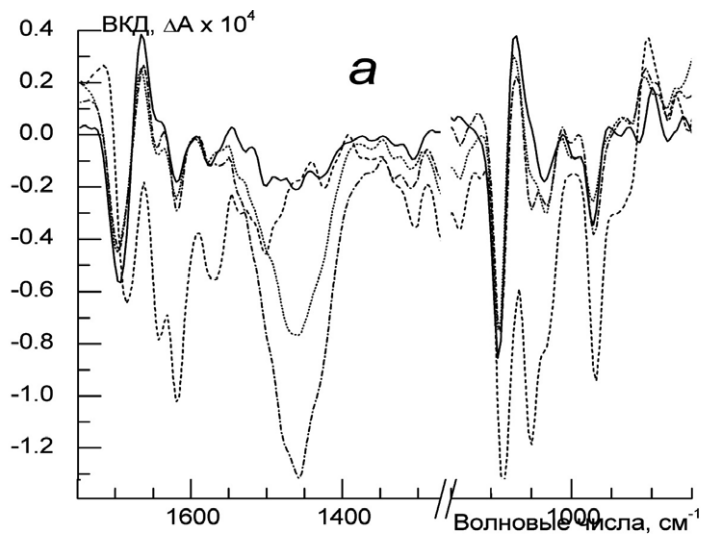


Рис. 2. Круговой дихроизм (а) и изменение в поглощении (б) комплексов ДНК (тёмная сплошная линия) с гистоном H1 и белком HMGB1 при $r = 0.3$ (длинное тире); 0.6 (короткое тире) и 0.9 (точка-тире)

ваны разностные спектры, полученные путем вычитания спектров белков, а также белков и ДНК в соответствующих концентрациях. Несмотря на все предосторожности, спектры поглощения комплексов из-за сильного поглощения белков и молекул Н–О–D менее информативны в области 1500–1400 см⁻¹.

После добавления белков широкая полоса в спектре поглощения ДНК с максимумом на 1680 см⁻¹, соответствующая суперпозиции колебаний в связях С2=O2 тимина (1688 см⁻¹) и С=O гуанина и цитозина (1678 см⁻¹), расщепляется на два максимума: на 1690 и 1678 см⁻¹. Это происходит благодаря сдвигу частоты колебаний в связи С2=O2 тимина на 1693 см⁻¹ и увеличению интенсивности соответствующей полосы при $r > 0,3$. В спектрах ВКД, напротив, интенсивность соответствующей полосы на 1697(-) и 1666(+) (рис. 2, *a*) несколько уменьшается после добавления белков, несмотря на заметный фоновый рост интенсивности в этой области спектра. Последний обусловлен колебаниями в боковых цепях остатков аспарагиновой и глутаминовой аминокислот [11] в составе белка НМGB1, которые наблюдаются на 1705 см⁻¹. Увеличение интенсивности поглощения в интервале 1660–1620 см⁻¹, вероятно, связано (иначе потерян глагол) с появлением сильного вклада в области Амид-I со стороны карбоксильных групп, принимающих участие в образовании пептидных связей. Изменение поглощения в области 1150–750 см⁻¹ соответствует симметричным колебаниям связей в группе О=P=O (рис. 2, *b*).

Приведенные данные указывают на взаимодействие белков с основаниями ДНК в большой бороздке. Поскольку белок НМGB1 связывается с ДНК по малой бороздке, можно сделать вывод, что гистон Н1 в составе комплекса взаимодействует не только с сахарофосфатным остовом, но и с основаниями ДНК.

Данные ИК-спектроскопии для комплексов $r > 0,3$ свидетельствуют о существенных различиях между спектрами ДНК и ее комплексов с белками в области как колебаний связей в основаниях, так и сахарофосфатного остова ДНК, указывая на взаимодействия белков и с основаниями и с фосфатными группами ДНК. Изменения в спектрах оснований ДНК (рис. 2) говорят о заметных взаимодействиях ДНК и белков в области малой бороздки ДНК.

При малых концентрациях белков в растворе идут два параллельных процесса: молекулы НМGB1 и Н1 независимо связываются с ДНК по малой и большой бороздкам соответственно, однако гистон Н1 также взаимодействует и с отрицательно заряженными группами С-концевого домена НМGB1 и фосфатными группами ДНК. При увеличе-

нии содержания белка в пробе последний тип взаимодействия становится основным для молекул Н1, что приводит к образованию гистоновой «шубы» вокруг комплекса ДНК–НМGB1. Таким образом, совместное действие на ДНК гистона Н1 и негистонового белка НМGB1 не может быть описано в виде простой суммы действий каждого из белков в отдельности. Опираясь на полученные данные, можно также заключить, что в присутствии обоих белков их связывание с ДНК не носит конкурентного характера. Напротив, экранировка отрицательно заряженных групп гистонем Н1 стимулирует связывание НМGB1 с ДНК и ведет к образованию надмолекулярных комплексов.

Полученные нами данные позволяют заключить, что применение ИК/ВКД-спектроскопии для изучения больших надмолекулярных комплексов расширяет применимость спектральных подходов для анализа структуры макромолекул. К ограничениям метода следует отнести необходимость использования растворов высоких концентраций, достигающих 10–20 мг/мл, а также длительное время эксперимента, которое может составлять несколько часов. Как традиционная ИК-спектроскопия, метод ВКД также весьма информативен для изучения взаимодействий макромолекул с малыми лигандами, такими как антибиотики и ионы металлов. Таким образом, он может стать хорошим дополнением к другим экспериментальным подходам, например, традиционной УФ-спектроскопии и атомной силовой микроскопии.

Список литературы.

1. Jordan C. F., Lerman L. S., Venable J. H. Structure and circular dichroism of DNA in concentrated polymer solutions. // *Nat. New. Biol.* 1972. Vol. 236. P. 67–70.
2. Tinoco I. Jr., Mickols W., Maestre M. F., Bustamante C. Absorption, scattering, and imaging of biomolecular structures with polarized light. // *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1987. Vol. 16. P. 319–49.
3. Polavarapu P. L., Zhao C. Vibrational circular dichroism: a new spectroscopic tool for biomolecular structural determination. // *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000. Vol. 366. P. 727–734.
4. Keiderling T. A. Protein and peptide secondary structure and conformational determination with vibrational circular dichroism. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002. Vol. 6. P. 682–688.
5. Andrushchenko V., Tsankov D., Wieser H. Vibrational circular dichroism spectroscopy and the effects of metal ions on DNA structure. // *J. Molecular Structure.* 2003. Vol. 661-662. P. 541–560.
6. Bustin M., Reeves R. High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. // *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 1996. Vol. 54. P. 35–100.

7. Чихиржина Е. В., Воробьев В. И. Линкерные гистоны: конформационные превращения и роль в организации структуры хроматина // Цитология. 2002. Т. 44. С. 721–736.
8. Чихиржина Е. В., Полянничко А. М., Скворцов А. Н., Костылева Е.И., Усье К., Воробьев В.И. HMG1-домены: заложники обстоятельств // Молекулярная Биология. 2002. Т. 36, № 3. С. 525–531.
9. Kohlstaedt L. A., Sung E. C., Fujishige A., Cole R.D. Non-histone chromosomal protein HMG1 modulates the histone H1-induced condensation of DNA. // J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262. P. 524–526.
10. Polyanichko A. M., Andrushchenko V. V., Chikhirzhina E. V., Vorob'ev V.I., Wieser H. The effect of manganese(II) on DNA structure: electronic and vibrational circular dichroism studies. // Nucl. Acids Res. 2004. Vol. 32. P. 989–996.
11. Barth A. The infrared absorption of amino acid side chains // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2000. Vol. 74. P. 141–173.
12. Polyanichko A. M., Chikhirzhina E. V., Andrushchenko V. V., Vorob'ev V.I., Wieser H. The effect of manganese(II) on the structure of DNA/HMGB1/H1 complexes: electronic and vibrational circular dichroism studies. // Biopolymers. 2006. Vol. 83. P. 182-192.
13. Полянничко А. М., Чихиржина Е. В., Андрущенко В. В., Костылева Е.И., Визер Г., Воробьев В.И. Структура комплексов ДНК с негистоновым хромосомным белком HMGB1 в присутствии ионов марганца // Молекулярная Биология. 2004. Т. 38. С. 701–712.