

УДК 577.322.7, 577.323.7, 535.56, 543.422.8

## **СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КОМПЛЕКСОВ ДНК С ЛИНКЕРНЫМ ГИСТОНОМ H1 В ПРИСУТСТВИИ НЕГИСТОНОВОГО ХРОМОСОМНОГО БЕЛКА HMGB1 И ИОНОВ МЕТАЛЛОВ<sup>1</sup>**

Чихиржина Е.<sup>1\*</sup>, Поляничко А.<sup>1,2\*</sup>, Кипенко И.<sup>2</sup>, Костылева Е.<sup>1</sup>,  
Воробьев В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>2</sup>Физический факультет  
СПбГУ, Санкт-Петербург, E-mail: [chikhir@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:chikhir@mail.cytspb.rssi.ru)

\*Авторы внесли равный вклад при подготовке работы.

Белок HMGB1 (представитель белков *High Mobility Group*), обнаруженный во всех исследованных эукариотах, принимает активное участие в процессах транскрипции, репликации, рекомбинации и репарации ДНК. HMGB1, также как и гистон H1 связывается с линкерным участком ДНК в точке входа/выхода из нуклеосомы. В литературе представлено много данных о взаимодействии этих двух белков с ДНК по отдельности. Однако вопрос о взаимоотношениях между ними остается открытым. Некоторые авторы предполагают, возможную конкуренцию между H1 и HMGB1 за связывание с отдельными участками ДНК. По мнению других и по данным, полученным нами ранее, эти белки скорее выполняют общую функцию.

**Круговой дихроизм (КД).** ДНК-белковые комплексы были приготовлены в растворе 15 мМ NaCl исходя из отношения суммы весов белковых компонентов к весу ДНК -  $g$ . На рис. 1 представлены спектры КД системы ДНК-H1-HMGB1 в 15 мМ NaCl. Из рисунка видно, что все рассмотренные ДНК-белковые системы могут быть разделены на две группы в зависимости от  $g$ . (1) Комплексы с предельно малым соотношением белок/ДНК  $g < 0.075$  (рис. 1а). Для таких комплексов характерно отсутствие изменений в спектре КД ДНК, и с достаточно высокой степенью точности эти спектры можно аппроксимировать суммой спектров отдельных компонентов комплекса. (2) Увеличение  $g$  приводит к изменению спектра ДНК в комплексе во всем исследуемом диапазоне (рис. 2б). В интервале  $0.075 < g < 0.2$  положительная полоса с

---

<sup>1</sup> Авторы выражают благодарность за финансовую поддержку РФФИ № 07-04-01072 и Гранта Президента РФ (МК-2126.2007.4), Программы "Ведущие научные школы России" (грант НШ-1961.2008.4).

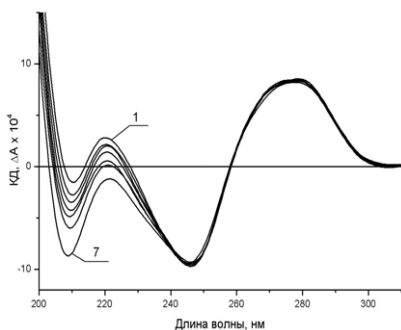


Рис.1. КД комплексов ДНК с белками Н1 и НМГВ1 в растворе 15 мМ в зависимости от весового соотношения белок/ДНК  $\gamma$ : 1- ДНК; 2- 0,015; 3- 0,023; 4 – 0,031; 5 – 0,038; 6 – 0,046; 7 – 0,061

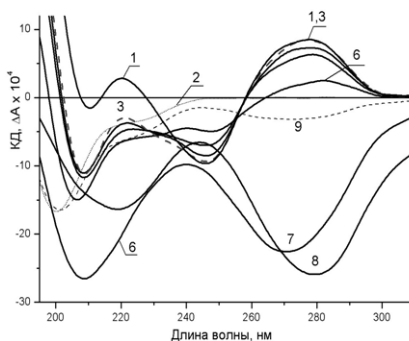


Рис.2. КД комплексов ДНК с белками Н1 и НМГВ1 в растворе 15 мМ NaCl в зависимости от весового соотношения белок/ДНК  $\gamma$ : 1- ДНК; 2- белки; 3- 0,075; 4 – 0,085; 5 – 0,1; 6 – 0,2; 7 – 0,25; 8 – 0,5; 9 – 3,3

максимумом на 276 нм постепенно уменьшает свою интенсивность и смещается в длинноволновую область. Интенсивность отрицательной полосы в спектре КД ДНК с минимумом на 245 нм увеличивается. При  $\gamma = 0.12$  наблюдается изменение формы полосы: исходно единая полоса расщепляется на две составляющих приблизительно равной интенсивности. Одна из них соответствует оптической активности ДНК, а вторая в интервале 215-240 нм складывается из оптической активности ДНК и белка. Такие изменения указывают на то, что в этом случае происходят серьезные конформационные нарушения двойной спирали. При  $\gamma > 0.2$  мы наблюдаем более сильные спектральные изменения: спектр ДНК полностью переходит в область отрицательных значений и приобретает признаки классического  $\psi(-)$ -спектра КД (*Polymer Salt Induced*). Растворы характеризуются высоким рассеянием, наблюдаемым визуально в виде сильной мутности. В спектре КД появляется вытянутое плечо в красной области исследуемого диапазона. Интенсивность сигнала растет вплоть до значений  $\gamma \sim 0.75$ , после чего начинается понижение интенсивности этой полосы. Однако, вплоть до максимальных значений  $\gamma = 3.3$  спектры сохраняют  $\psi$ -форму. Однако несмотря на очевидные межмолекулярные взаимодействия, образующиеся комплексы не склонны к самопроизвольному осаждению.

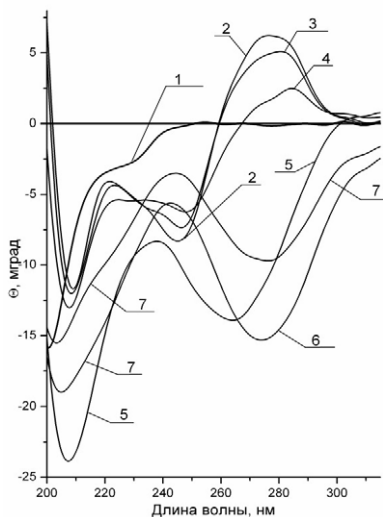


Рис.3. КД комплексов ДНК с белками Н1 и НМГВ1 в растворе 15 мМ NaCl в присутствии 0.1 мМ  $MnCl_2$  в зависимости от весового соотношения белок/ДНК г: 1 – белки; 2 – 0.08; 3 – 0.1; 4 – 0.15; 5 – 0.19; 6 – 0.68; 7 – 1.0

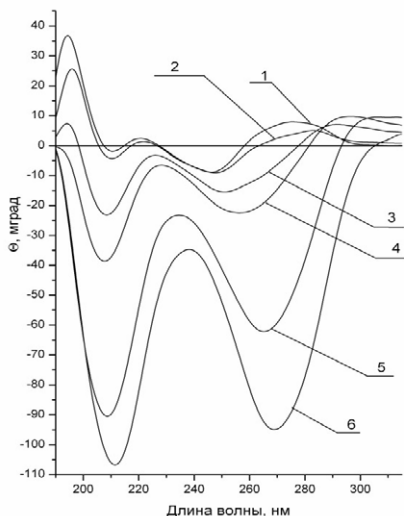


Рис.4. КД комплексов ДНК с белками Н1 и НМГВ1 в растворе 15 мМ NaCl в присутствии 6 мМ  $MnCl_2$  в зависимости от весового соотношения белок/ДНК г: 1 – ДНК; 2 – 0.02; 3 – 0.03; 4 – 0.04; 5 – 0.05; 6 – 0.07

На рис. 3 и 4 представлены спектры КД системы ДНК-Н1-НМГВ1 в присутствии ионов марганца и кальция. При малых концентрациях ионов марганца  $R=[Mn]/[P]<0.1$  (данные не представлены) характер формирования ДНК-белкового комплекса в целом не отличается от такового для систем без ионов марганца. Увеличение концентрации  $Mn^{2+}$  способствует усилению межмолекулярных взаимодействий и формированию надмолекулярных ассоциатов. Уже при соотношении  $R = 0.1$  (рис. 3) в спектрах перестает проявляться сколько-нибудь заметное влияние белков на электронную структуру оснований. Ослабление ДНК-белковых взаимодействий, в тоже время, сопровождается усилением белок-белковых взаимодействий, существенно более сильных, чем в случае взаимодействия ДНК только с одним из белков. Эти взаимодействия приводят к сборке упорядоченных надмолекулярных структур, что проявляется в изменении формы спектров КД и ростом их интенсивности уже при малом г. При

дальнейшем увеличении количества ионов марганца вплоть до  $R = 6$  (рис. 4) качественные изменения спектра незначительны, но существенные количественные изменения. Сильное изменение интенсивности сигнала КД происходит в интервале  $0.02 < r < 0.08$ . Однако несмотря на ярко выраженный  $\psi$ -тип спектра КД, осаждения молекул комплекса не наблюдается даже при высоком  $R$ .

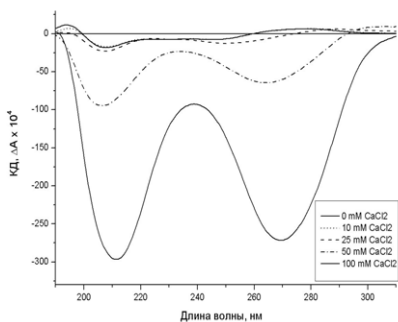


Рис.5. КД комплексов ДНК с белками H1 и HMGB1 в растворе 15 mM NaCl в присутствии  $\text{CaCl}_2$

Косвенным подтверждением последней гипотезы служат спектры УФ поглощения и КД той же системы в присутствии ионов кальция (рис. 5). Если взаимодействие ионов  $\text{Mn}^{2+}$  с отрицательно заряженными группами белка вызывает повышение сродства HMGB1 к ДНК, то добавление другого двухвалентного катиона должно приводить к аналогичным последствиям. Действительно, в системе  $\text{Ca}^{2+}$ -ДНК-белки, формируются надмолекулярные образования, спектрально похожие на комплексы ДНК/HMGB1-(A+B). Примечательно, что в спектрах данных систем не наблюдается столь сильного увеличения мутности растворов, как это было в  $\text{Mn}^{2+}$ -содержащих системах. Сам же характер спектральных изменений напоминает процессы, происходившие под влиянием ионов марганца.

**ИК-спектроскопия.** Анализ спектров КД в ИК-области, представленных на рис. 6 и 7 показывает, что после добавления белков к ДНК поглощение комплекса несколько возрастает, в то время как его оптическая активность в этой области слабо уменьшается. Последующее добавление ионов марганца практически не влияет на интенсивность полос поглощения, но заметно усиливает оптическую активность соответствующих колебаний. Спектры ДНК-белковых систем в области  $1450\text{--}1750\text{ см}^{-1}$  помимо полос, соответствующих колебаниям оснований ДНК, содержат интенсивную спектральную полосу, соответствующую колебанию Амид-I. Это приводит к увеличению интенсивности полосы на  $1643\text{ см}^{-1}$  в спектрах ДНК-белковых систем. После добавления ионов  $\text{Mn}^{2+}$  максимум этой полосы смещается к отметке  $1644\text{ см}^{-1}$ . Возможно, увеличение поглощения карбонильных групп гуанина на  $1678\text{ см}^{-1}$

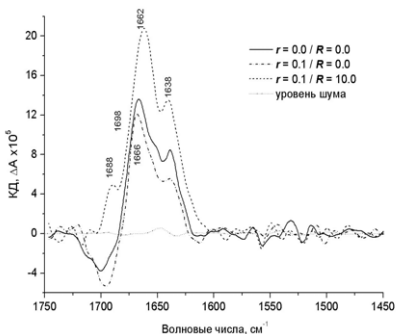


Рис. 6. Зависимости ВКД в ИК области комплекса ДНК с белками НМGB1 и Н1 от концентрации ионов марганца в области оснований.

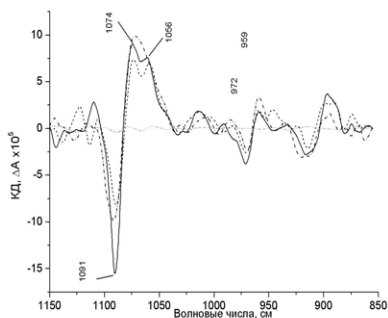


Рис. 7. Зависимости ВКД в ИК области комплекса ДНК с белками НМGB1 и Н1 от концентрации ионов марганца в области фосфатных групп ДНК.

отражает нарушения в геометрии двойной спирали и уменьшение расстояния между основаниями со стороны большой бороздки. Полоса валентных колебаний тимина на  $1693 \text{ см}^{-1}$  не меняет своего положения при взаимодействии с белком. После добавления  $\text{Mn}^{2+}$ , поглощение на этой частоте существенно падает. Соответствующая полоса в спектре ВКД практически не изменяется, но при увеличении концентрации  $\text{Mn}^{2+}$  меняет свой знак: с отрицательного в спектрах ДНК и ДНК-белкового комплекса, на положительный в спектре  $\text{Mn}^{2+}$ -содержащих систем с максимумом на  $1688 \text{ см}^{-1}$ . В спектрах тройного комплекса в присутствии  $\text{Mn}^{2+}$  нет полос на  $1638$  и  $1619 \text{ см}^{-1}$ , что указывает на отсутствие взаимодействий с атомами N3(цитозин), то есть нативная структура ДНК сохраняется даже при высоких концентрациях ионов марганца. При добавлении  $\text{Mn}^{2+}$  уменьшаются интенсивности обеих полос дублета на  $1091(-)/1074(+)$   $\text{см}^{-1}$  в области колебаний сахарофосфатного остова. Это указывает на изменения взаимной ориентации фосфатных групп ДНК, что является следствием частичного раскручивания двойной спирали и появления на ней изгибов. Одновременное присутствие белков и  $\text{Mn}^{2+}$  приводит к уменьшению интенсивности полосы поглощения симметричного валентного колебания группы  $\text{O}=\text{P}=\text{O}$  и уменьшению интенсивности соответствующего ВКД дублета, что вероятнее всего отражает изменения в структуре сахарофосфатного остова при изгибе ДНК. В то же время, пик на  $1057 \text{ см}^{-1}$  остается неизменным, и окончательные интенсивности обеих полос оказываются равными. Эти изменения не оказывают существенного влияния на конфигурацию сахара. Присутствие в системе отрицательно заряженного С-концевого

домена белка HMGB1 влияет на поведение фосфатных групп ДНК, также заряженных отрицательно. В результате происходит перераспределение ионов металла в гидратных оболочках ДНК и их миграция к облаку противоионов вокруг последовательности дикарбоновых кислот.

Падение поглощения связи C=O гуанина на  $1668\text{ см}^{-1}$  и одновременный рост пика на  $1678\text{ см}^{-1}$  (C=O цитозина) в системе  $\text{Mn}^{2+}$ -ДНК-белки означает, что связывание с основаниями ДНК происходит со стороны малой бороздки, а взаимодействия в большой бороздке ослабляются. Вероятно присутствие ионов  $\text{Mn}^{2+}$  препятствует тесному контакту молекулы Н1 с основаниями. Такое поведение может отражать участие ионов  $\text{Mn}^{2+}$  в достаточно сильных взаимодействиях с основаниями в малой бороздке. Возмущения в структуре ДНК, приводящие к доступности оснований ДНК для ионов  $\text{Mn}^{2+}$  со стороны большой бороздки, индуцируются связыванием с белковыми молекулами. Рост в  $\sim 2$  раза полосы на  $1662\text{ см}^{-1}$  указывает на то, что взаимодействие заканчивается не просто хелатацией ионов марганца, а существенными структурными перестройками в этой области. В спектре комплекса  $\text{Mn}^{2+}$ -ДНК-белки появляется сильный положительный пик на  $1688\text{ см}^{-1}$ . Поскольку в спектрах комплексов  $\text{Mn}^{2+}$ -ДНК подобных изменений не наблюдалось, можно предположить, что они вызваны присутствием в системе белков. Возможно, HMGB-домены не только способствуют взаимодействию ионов  $\text{Mn}^{2+}$  с основаниями ДНК в малой бороздке, но и способны узнавать места таких взаимодействий.

### **Заключение.**

Отличие двух систем может быть обусловлено различиями в действии ионов данных металлов на ДНК и белки. Оказывая сходное действие на С-концевой домен молекулы HMGB1, ионы  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  могут приводить и к сходному увеличению ДНК-связывающей активности этого белка. Гистон Н1, взаимодействуя с ДНК, подготавливает места удобной посадки для HMGB1, что также приводит к повышению сродства белка к ДНК. В случае же с марганцем ситуация осложняется активным взаимодействием самих ионов  $\text{Mn}^{2+}$  с основаниями ДНК, что вызывает ослабление ДНК-белковых взаимодействий с одной стороны, и усиление агрегационных процессов с другой. Таким образом, ионы кальция, взаимодействуя с ДНК-связывающими доменами HMGB1, препятствуют формированию структурно упорядоченных комплексов, стимулируя агрегацию макромолекул. Ионы марганца, напротив, образуя хелатные комплексы с отрицательно заряженными группами ДНК и белков, способны вызывать образование упорядоченных надмолекулярных структур.