

УДК 577.322.7, 577.323.7, 535.56, 543.422.8

СТРУКТУРИЗАЦИЯ БЕЛКА НМGB1 В ОТВЕТ НА СВЯЗЫВАНИЕ С ДНК.¹

Поляничко А. М.^{1,2}, Родионова Т.Ю.¹, Чихиржина Е.В.², Воробьев В.И.²

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

За последние годы было описано большое число белков, не имеющих определённой структуры в нативном состоянии, однако способных структурироваться при взаимодействии со специфическим лигандом, что является необходимым условием для участия этих белков в биологических процессах. Несмотря на обилие экспериментальных данных, природа данных структурных преобразований у белков этого класса остаётся невыясненной. Есть основания полагать, что сходные механизмы лежат в основе функционирования и большого числа других белков, способных выполнять различные функции за счёт изменений своей структуры.

Одним из примеров таких белков может служить негистоновый белок хроматина НМGB1, известный благодаря своей распространённости и необычным ДНК-связывающим свойствам. Есть основания полагать, что разнообразие функций, выполняемых НМGB-доменным белками, может быть связано с изменением пространственной структуры самого белка в зависимости от мишени связывания. Структурные особенности взаимодействия НМGB1 с ДНК важны для понимания их функции в хроматине.

Белок НМGB1 и близкий к нему НМGB2 присутствуют в хроматине всех эукариот в значительных количествах [1]. Эти два белка очень схожи по строению и отличаются только длиной С-концевого участка: НМGB1 (≈30 аминокислотных остатков), НМGB2 (≈20 аминокислотных остатков) [2]. Белки НМGB1/2 присутствуют как в ядре, так и в цитоплазме клетки. Наибольшее количество белка обнаружено в активно делящихся клетках. Установлено также, что после дифференциации его концентрация уменьшается [3].

Сравнение белков, принадлежащих семейству НМG, которые были выделены из тканей разных видов животных, свидетельствует о

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

консервативности их первичных структур. Основные отличия в их первичной структуре состоят в замене Asp на Glu на С'-концевом участке белка. Однако, для белков, принадлежащих к группе НМГВ, важной является структурная консервативность. И именно пространственная структура ДНК-связывающих доменов является одним из критериев проверки принадлежности белков к этой группе. В третичной структуре НМГВ1 выделяют три области. Первые две носят название НМГВ-доменов А (1-79 аминокислотные остатки) и В (90-163 аминокислотные остатки) [4]. Именно эти домены определяют принадлежность белков к семейству НМГВ. Они богаты заряженными аминокислотными остатками и в сумме несут положительный заряд +20. Третья область молекулы, начиная с 164 остатка, не обладает определенной структурной организацией. Её первые 20 аминокислотных остатков несут суммарный положительный заряд +8 за счет заряженных Lys, а последние 29 – составляют непрерывную последовательность Asp и Glu дикарбоновых аминокислот. Таким образом, распределение по цепи молекулы крайне неоднородно, но её большая часть несёт положительный заряд, за исключением отрицательно заряженного С'-концевого участка

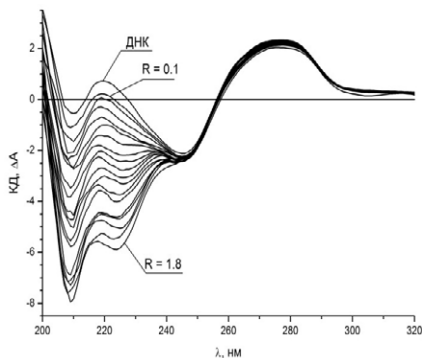


Рис. 1. Спектры КД комплексов ДНК-НМГВ1 при $0 < R < 1,8$ с шагом 0,1 в растворе 5 мМ NaCl.

куветях с длиной оптического пути 5 мм. Были получены серии спектров КД комплексов ДНК-НМГВ1 в разных ионных силах (0,03-150 мМ NaCl) при постепенном увеличении весового соотношения R белок/ДНК в пробе от R=0 до R=2 с шагом 0,1 (Рис. 1).

В работе были использованы белки, выделенные из тимуса теленка путем экстракции 5% хлорной кислотой с последующим осаждением белков из раствора подкисленным ацетоном при -20°C . Концентрация ДНК (тимуса телёнка, Sigma) в растворе составляла 50 мкг/мл. Изменения вторичной структуры комплекса ДНК-НМГВ1 изучались с помощью метода кругового дихроизма (КД) в УФ области. Измерения проводили на дихрографе Mark V (Jobin Ivon, Франция) в кварцевых

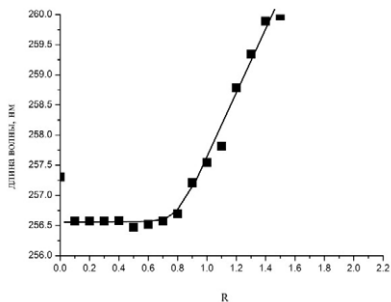


Рис. 2. Зависимость положения точки перехода через ноль в спектрах КД ДНК от R в растворах 25 мМ NaCl.

характерна зависимость представленная на рисунке 3. При увеличении весового соотношения до $R=0,8$ α -спиральность престаёт меняться и выходит на насыщение, что свидетельствует о прекращении изменений в структуре белка при связывании. Оба этих факта указывают на прекращении активного связывания белка с ДНК к $R = 0,8$ и о начале межмолекулярных взаимодействий в системе при более высоких значениях R.

Для оценки термостабильности ДНК в комплексах использовался метод спектрофотометрического плавления, основанный на росте поглощения ДНК при денатурации. Чтобы свести влияние ионной силы к минимуму, кроме выше описанных систем, была исследована серия в 0,25мМ ЭДТА. В рамках каждой серии было проведено исследование зависимости сдвига температуры плавления при увеличении весового

соотношения белок/ДНК в пробе. Температура плавления определялась как точка максимума первой производной от S-образной функции, описывающей процесс плавления. Зависимость температуры плавления от весового соотношения в системе представлена на рисунке 4. При увеличении концентрации белка в пробе наблюдается смещение точки плавления

Интересной особенностью систем является тот факт, что до $R=0,8$ никаких изменений в структуре молекулы ДНК не происходит. Однако, дальнейшее увеличение белка в пробе приводит к смещению точки перехода через ноль в спектре КД ДНК (Рис. 2). Была также получена зависимость изменения степени α -спиральности белка в комплексе при увеличении R. Для систем, начиная с 25 мМ NaCl, харак-

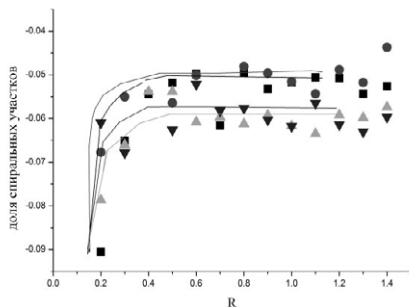


Рис. 3. Относительное изменение доли спиральных участков от R. ■ – 25 мМ NaCl; ● – 50 мМ NaCl; ▲ – 100 мМ NaCl; ▼ – 150 мМ NaCl.

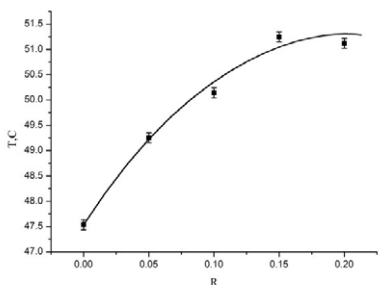


Рис. 4. Зависимость температуры плавления ДНК в комплексе с белком HMGB1 от R в растворе 0,25 мМ ЭДТА булка в комплексе, тем устойчивее двойная спираль к температурному воздействию. Возможно, это связано с тем, что добавление белка в пробу вызывает процесс компактизации молекулы, ведущий к образованию более устойчивых структур.

ления в область высоких температур, что свидетельствует о том, что при связывании HMGB1 стабилизирует ДНК. Этот результат представляет большой интерес, ведь, казалось бы, белок при связывании изгибает молекулу ДНК, приводя к возмущениям в структуре двойной спирали. В такой ситуации было бы естественно ожидать уменьшения стабильности молекулы. Однако происходит обратный процесс: чем больше

Список литературы.

1. Zlatanova J. and Leuba S.H (2004) «Chromatin Structure and Dynamics», Chaper 5. State-of-the-Art.
2. Bustin M., Reeves R. (1996) High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 54, 35-100.
3. Mosevitsky M.I., Novitskaya V.A., Iogannsen M.G., Zabezhinsky M.A. (1989), "Tissue specificity of nucleocytoplasmic distribution of HMG1 and HMG2 proteins and their probable funtions", Eur. J. Biochem., 185, 303-310.
4. Read C.M., Cary P.D., Crane-Robinson C., Driscalle P.C., Norman D.G. (1993) Solution structure of a DNA-binding domain from HMG-1. Nuc. Acids Res., 21, 3427-3436.