

УДК 577.322.7:577.323.7:535.56:543.422.8

ИЗМЕНЕНИЕ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА НМGB1 ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С ДНК© 2009 Т.Ю. Родионова^{1,2}, Е.В. Чихиржина², В.И. Воробьев^{1,2}, А.М. Поляничко^{1,2*}¹Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Статья поступила 21 июня 2008 г.

С помощью спектроскопических методов и гель-ретардации исследована стадия некооперативного взаимодействия негистонового хромосомного белка НМGB1 с ДНК. Установлено, что комплексообразование сопровождается компактизацией молекулы ДНК в достаточно широком диапазоне отношений белок/ДНК в комплексе. Методом кругового дихроизма было показано, что при связывании с ДНК изменяется вторичная структура белка НМGB1. Установлено, что изменения в структуре белка происходят в условиях избытка мест связывания белка на ДНК и завершаются при соотношении ~40—50 пар оснований на молекулу белка, при этом степень α -спиральности НМGB1 в комплексе увеличивается на 20 % по сравнению со свободным состоянием. Предполагается, что изменение вторичной структуры НМGB1 при связывании с ДНК лежит в основе механизмов многообразных функций, выполняемых этим белком в клетке.

Ключевые слова: НМGB1, ДНК, ДНК-белковые взаимодействия, круговой дихроизм.

ВВЕДЕНИЕ

Негистоновый белок хроматина НМGB1, принадлежащий к семейству НМG белков (High Mobility Group), присутствует в клетках всех эукариот в значительных количествах. В состав молекулы НМGB1 входят два практически идентичных ДНК-связывающих домена А и В и неупорядоченный С-концевой фрагмент, состоящий из непрерывной последовательности дикарбоновых аминокислот [1]. НМGB-домены, входящие в состав белков различных организмов, отличаются высокой консервативностью не только по своим первичным структурам [2], но и по пространственной организации [1]. НМGB-домен, состоящий из вытянутого N-концевого участка и трех α -спиралей, имеет необычную Г-образную форму. В его структуре можно выделить два плеча, одно из которых (~31 Å) немного короче другого (~36 Å), с углом при вершине между ними ~70—80° [3, 4]. Домены в молекуле белка соединены линкерным участком, состоящим из 10 аминокислотных остатков [5]. Он представляет собой одну из высоко консервативных областей в молекуле белка.

Несмотря на большое количество экспериментальных данных, биологическая роль белка остается пока до конца не выясненной. Из многочисленных экспериментов следует, что белки НМGB1/2 вовлечены в формирование структуры хроматина [1, 6—9], а также принимают участие в различных регуляторных процессах, в том числе репликации [10, 11], транскрипции [5, 9] и репарации ДНК [7]. Однако не вызывает сомнения, что главную роль в функционировании НМGB-доменных белков играют особенности их взаимодействия с ДНК.

* E-mail: polyanichko@gmail.com

Все представители НМGB-доменных белков взаимодействуют с ДНК по малой бороздке [1, 7, 8, 12], и в структуре белков этого семейства не было выявлено ни одного ДНК-связывающего мотива, кроме НМGB-доменов [1, 7]. При связывании белок приводит к сильнейшим изменениям в структуре двойной спирали ДНК: в месте взаимодействия ось спирали может изгибаться по данным разных авторов под углом от 80 до 140° [7, 9]. Кроме того, НМGB-доменные белки обладают также способностью узнавать различные изгибы ДНК [1, 7].

На сегодняшний день общепризнана архитектурная роль НМGB-доменных белков при функционировании различных ДНК-белковых комплексов хроматина [1, 6, 7, 9, 12], однако пока нет однозначного объяснения механизмов, лежащих в основе многообразных функций, выполняемых НМGB-доменными белками. Мы предполагаем, что в зависимости от мишени связывания НМGB-домен способен изменять свою пространственную структуру и, как следствие, свои ДНК-связывающие свойства. В этой работе с помощью физико-химических методов мы попытались проследить за изменениями в структурах белка и ДНК в ходе их взаимодействия в зависимости от соотношения белок/ДНК и от ионной силы раствора.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методика. В работе использовали негистоновый хромосомный белок НМGB1 (мол. вес 26500 Да), выделенный из тимуса теленка по стандартной методике [13]. Чистоту белка проверяли с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия с использованием ступенчатой буферной системы [14]. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по коэффициенту экстинкции на длине волны 280 нм, рассчитанному согласно методике, предложенной Пейсом и соавторами [15], который для белка НМGB1 составил $\epsilon_{280} = 21805 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

В работе использовали коммерческий препарат высокомолекулярной ДНК тимуса теленка фирмы Sigma (Туре II). Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически по методу Спирина [16]. Нативность препарата контролировали по величине гиперхромного эффекта при денатурации в присутствии 6 % хлорной кислоты. Молярные коэффициенты экстинкции ДНК, использованной в работе, находились в пределах $6000 < E(P) < 7000$ [16].

ДНК-белковые комплексы готовили в растворах 5, 15, 25, 50, 75, 100 и 150 мМ NaCl. Концентрация ДНК в комплексе составляла 60 мкг/мл. Весовое соотношение белок/ДНК в пробе, r , выбирали в интервале от 0,05 до 1,00.

Электрофорез ДНК и ее комплексов с белком НМGB1 проводили в 0,5%-м агарозном геле с использованием ТАЕ (*трис*-уксусная кислота—ЭДТА) буфера при комнатной температуре. Для достижения лучшего электрофоретического разделения перед добавлением буфера для проб концентрацию NaCl в растворах комплексов понижали до значений, не превышающих 0,2 мМ.

Круговой дихроизм. Круговой дихроизм (КД) комплексов ДНК/НМGB1 регистрировали на дихрографе Mark V (Jobin Ivon, Франция) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 0,5 см. Измерения проводили в растворах с ионной силой в интервале 5—150 мМ NaCl. Спектры снимали в диапазоне от 195 до 320 нм с шагом в 1 нм. На каждой длине волны проводили усреднение сигнала КД по 1000 измерениям. Для устранения влияния низкочастотных случайных процессов спектры образца записывали 3 раза с последующим усреднением. Сглаживание спектров проводили методом Савитского—Голея с рамкой сглаживания 5 точек.

Спектры КД представлены в работе в виде разницы поглощений лево- и правополяризованного света, $\Delta A = A_L - A_R$.

Долю α -спиральных участков белка оценивали с помощью соотношения [17]

$$\alpha = \frac{-[\theta_{222}] + 3000}{39000}, \quad (1)$$

где $[\theta_{222}]$ — молярная эллиптичность на длине волны 222 нм, связанная с разницей ΔA следующим выражением [18]:

$$[\theta] = 3298 \frac{\Delta A}{cl}, \quad (2)$$

где c — молярная концентрация (моль/л); l — оптический путь (см).

Спектрофотометрическое плавление. Изучение термостабильности ДНК в комплексе проводили методом спектрофотометрического плавления. Спектры поглощения в УФ диапазоне были получены на двухлучевом сканирующем спектрофотометре Specord-M40, оснащенный пельтье-приставкой TSE1 (Karl Zeiss, Германия). Минимальная достижимая ошибка измерения пропускания составила $\pm 0,01\%$. Измерения проводили в кварцевых прямоугольных кюветах с длиной оптического пути в 1 см. Температуру плавления ДНК в комплексе определяли как точку экстремума дифференциальной кривой плавления.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первичный анализ системы НМГВ1/ДНК проводили методом электрофореза в агарозном геле, позволяющем быстро провести качественную оценку характера изменения размеров комплекса при увеличении весового соотношения белок/ДНК в пробе.

По результатам экспериментов нами была рассчитана подвижность комплексов относительно подвижности свободной ДНК в том же геле:

$$U = L_k/L_{\text{ДНК}},$$

где L_k — длина пробега комплекса; $L_{\text{ДНК}}$ — длина пробега ДНК.

Средние значения полученных величин представлены на графике (рис. 1). Экспериментальная зависимость может быть с хорошей точностью аппроксимирована экспоненциальной кривой $U \sim e^{-\frac{r}{0,64}}$ вплоть до значений $r = 0,7$.

Дальнейшее увеличение содержания белка в пробе приводит к резкому увеличению подвижности пробы, что соответствует компактизации ДНК в комплексе при $r > 0,8$. Во избежание агрегации комплексов в условиях более высоких ионных сил на основе данных электрофореза нами были подготовлены пробы для КД с соотношением r , не превышающим 0,7.

Для анализа вторичной структуры белка в комплексе был выбран метод кругового дихроизма в УФ диапазоне. Получены серии спектров КД комплексов НМГВ1/ДНК в растворах с разной ионной силой при увеличении весового соотношения белок/ДНК в интервале $0 < r < 0,7$ с шагом 0,05 с использованием метода титрования белком. Анализ спектров всех систем

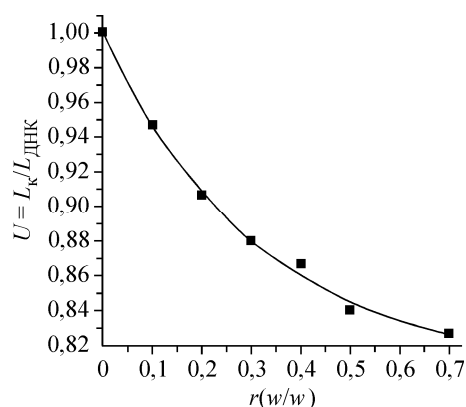


Рис. 1. Зависимость относительного пробега U комплексов в геле от весового соотношения r белок/ДНК в пробе. L_k — длина пробега комплекса, $L_{\text{ДНК}}$ — длина пробега ДНК

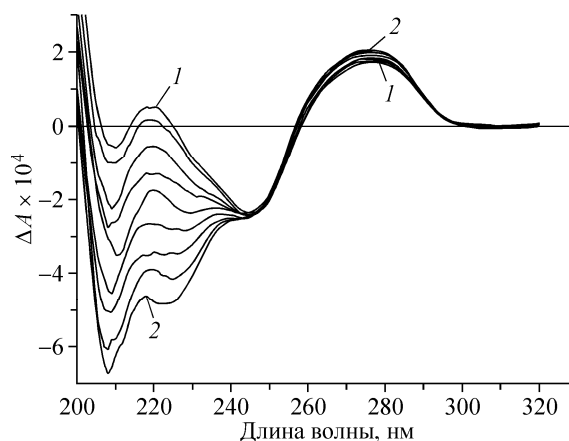


Рис. 2. Спектры КД комплексов НМГВ1/ДНК в 25 мМ NaCl при разных весовых соотношениях r (w/w) НМГВ1/ДНК в пробе в интервале от $r = 0$ (кривая 1) до $r = 0,7$ (кривая 2) с шагом 0,1. Концентрация ДНК в пробах составляет 60 мкг/мл

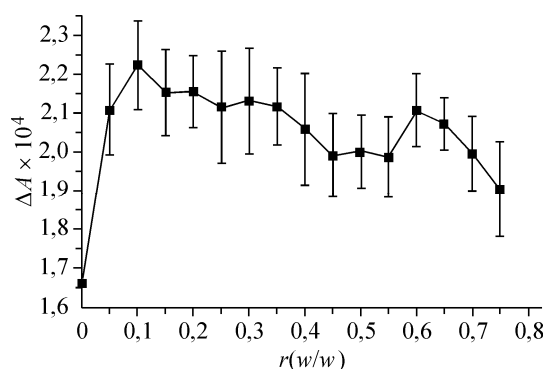


Рис. 3. Зависимость КД (ΔA) комплексов на длине волны 270 нм от весового соотношения $r(w/w)$ НМGB1/ДНК в пробе

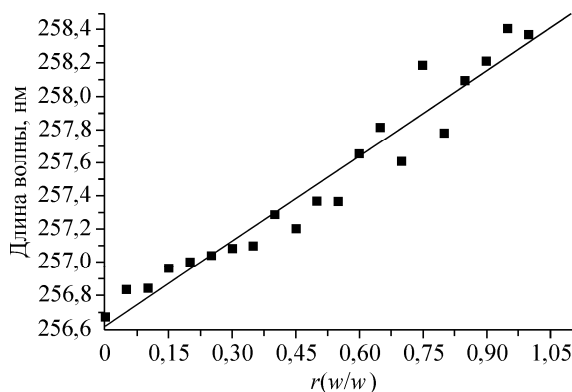


Рис. 4. Зависимость положения точки перехода через ноль (нм) спектров КД от весового соотношения $r(w/w)$ НМGB1/ДНК в пробе в системе, приготовленной методом титрования

проводили в двух спектральных диапазонах: в области КД ДНК в интервале 270—290 нм и в белковой области спектра 200—230 нм.

Изучение изменения структуры ДНК при взаимодействии с НМGB1 проводили на длине волны 270 нм. Этой длине волны соответствует положительный максимум в спектре КД ДНК, а спектры белка и ДНК в этой области не перекрываются. Характерный спектр КД комплексов представлен на рис. 2. Изменения в спектре в окрестности 270 нм минимальны, что свидетельствует о незначительных возмущениях электронной структуры оснований ДНК. Для удобства анализа малых изменений в этой области нами была построена зависимость КД ДНК от r на длине волны 270 нм (рис. 3). Отчетливо видно, что даже небольшое содержание НМGB1 в комплексе приводит к заметному увеличению интенсивности положительного максимума ДНК, однако дальнейшее постепенное увеличение количества белка до $r = 0,7$ не приводит к видимым изменениям в спектре (все изменения лежат в пределах погрешности измерений). В то же время в этом спектральном диапазоне во всех исследованных системах, приготовленных путем титрования, наблюдалось смещение точки перехода через ноль спектров КД ДНК на 2—3 нм в длинноволновую область (рис. 4).

Об изменениях во вторичной структуре белка НМGB1 при взаимодействии с ДНК можно судить по изменениям интенсивности полосы КД на 222 нм. При интерпретации спектров КД белков в измеряемой нами области (195—320 нм) одновременно оценить вклад всех возможных конформаций полипептидной цепи, таких как α -спирали, β -слои и неупорядоченные структуры, очень трудно. На длине волны 222 нм наблюдается минимум в спектре КД, характерный для α -спиральной конформации, превышающий по интенсивности вклад остальных компонент на порядок. Поэтому при оценке процента α -спиральных участков в белках часто пользуются полуэмпирическим соотношением (1). В нашем случае в области 200—230 нм наблюдается частичное перекрывание полос в спектрах КД ДНК и белка, что осложняет их интерпретацию. В то же время КД ДНК на длине волны 222 нм близок к нулю, а присутствие белка в комплексе не привело к видимым изменениям гораздо более интенсивной полосы ДНК на 270 нм. Поскольку сам спектр ДНК носит консервативный характер, то вклад КД ДНК в спектр комплексов на 222 нм можно считать постоянным в пределах погрешности измерений, и он может быть вычтен из спектров комплексов. Нами были рассчитаны величины молярной эллиптичности белка в комплексах (рис. 5), которая пропорциональна степени α -спиральности белка (1). Видно, что при малых значениях r молярная эллиптичность белка в комплексе достигает минимальных значений. С ростом содержания белка в комплексе наблюдается увеличение молярной эллиптичности, которое прекращается к $r = 0,4$. При дальнейшем добавлении белка до $r = 0,8$ молярная эллиптичность комплекса остается неизменной, достигая предельного значения на

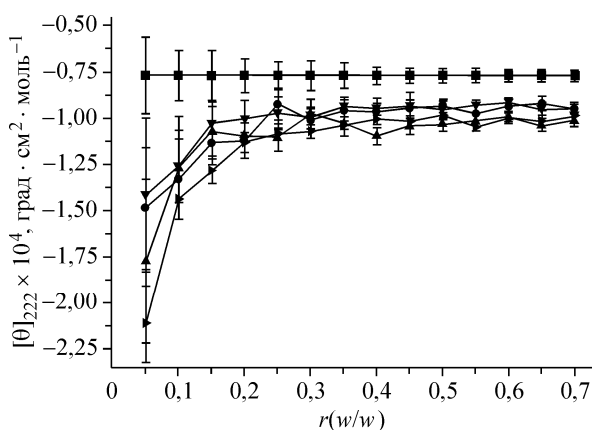


Рис. 5. Зависимость молярной эллиптичности $[\theta]_{222}$ на длине волны 222 нм от весового соотношения r (w/w) HMGB1/ДНК в пробе в растворах разных ионных сил: \blacksquare — HMGB1 в свободном состоянии, \blacktriangleright — HMGB1 в комплексе в 15 мМ NaCl, \blacktriangle — HMGB1 в комплексе в 50 мМ NaCl, \bullet — HMGB1 в комплексе в 100 мМ NaCl, \blacktriangledown — HMGB1 в комплексе в 150 мМ NaCl

уровне $[\theta] = -1100$ (град · см²/моль), что примерно в 1,4 раза превосходит молярную эллиптичность свободного белка. Таким образом, при связывании молекулы HMGB1 с ДНК наблюдаются регистрируемые изменения вторичной структуры белка HMGB1 в области $r < 0,3$. Анализ спектров КД показал, что наибольшие изменения в структуре белка в составе комплексов по сравнению со структурой свободного белка наблюдается в области $r < 0,1$ (см. рис. 5). На этот же интервал соотношений белок/ДНК приходятся основные изменения в структуре ДНК, регистрируемые при помощи КД (см. рис. 3). Для того чтобы более подробно проанализировать влияние белка на структуру ДНК в области малых значений r , мы использовали метод спектрофотометрического плавления ДНК для комплексов с $r < 0,1$. С этой целью нами были получены кривые плавления ДНК в комплексе с белком HMGB1 при различных значениях r и ионной силы растворов.

Молекула ДНК в физиологических условиях является полианионом. Сахарофосфатный остов ДНК содержит остатки фосфорной кислоты, группа OH которых в физиологических условиях полностью диссоциирована. Уменьшение ионной силы раствора приводит к дестабилизации двойной спирали из-за возрастания роли ближних электростатических взаимодействий в ДНК вследствие уменьшения экранирующего эффекта противоионов. Таким образом, температура плавления ДНК не может не зависеть от концентрации соли в растворе, и эта зависимость носит логарифмический характер [19]. Чтобы свести влияние ионной силы к минимуму и исключить влияние возможных примесей двухвалентных ионов, была исследована серия комплексов в растворе 0,25 мМ ЭДТА при концентрации NaCl, не превышающей 0,2 мМ.

Как и ожидалось, увеличение ионной силы раствора приводит к повышению температуры плавления ДНК (рис. 6). При каждой ионной силе были получены кривые плавления комплексов HMGB1/ДНК и проанализирована зависимость сдвига температуры плавления ДНК в ком-

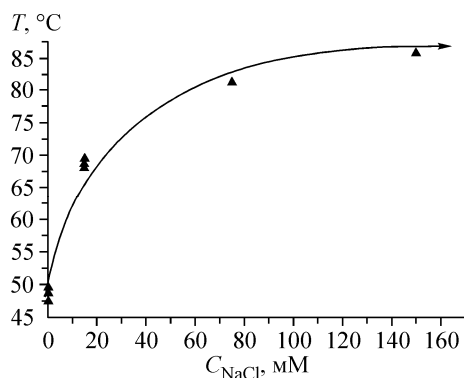


Рис. 6. Зависимость температуры плавления ДНК (°C) от ионной силы раствора (мМ NaCl)

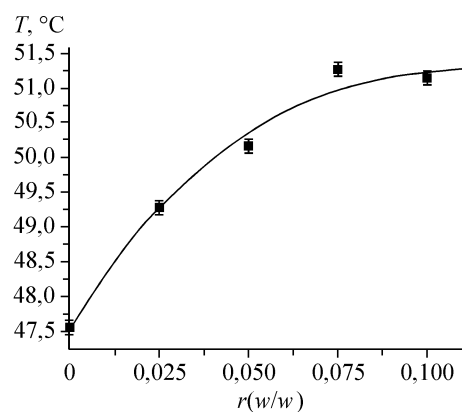


Рис. 7. Зависимость температуры плавления ДНК (°C) в комплексах от весового соотношения r (w/w) HMGB1/ДНК в пробе в присутствии 0,25 мМ ЭДТА и концентрации NaCl, не превышающей 0,2 мМ

плексе при увеличении весового соотношения белок/ДНК r (рис. 7). При увеличении концентрации белка наблюдается смещение точки плавления в область более высоких температур. Это обстоятельство свидетельствует о том, что при связывании с ДНК белок НМGB1 стабилизирует двойную спираль.

Ранее было показано, что связывание белка НМGB1 с ДНК происходит двумя способами в зависимости от соотношения белок/ДНК в системе [20]. Первый способ реализуется при малых значениях r и соответствует связыванию одиночных молекул белка с ДНК. При втором способе, с увеличением содержания белка в пробе, доминируют белок-белковые взаимодействия, в результате которых начинается образование достаточно крупных надмолекулярных комплексов. Было также показано, что степень структурной упорядоченности комплексов зависит от ионной силы раствора и от свойств заряженного С-концевого участка белка НМGB1 [21, 22]. В данной работе более подробно исследована область малых значений r , соответствующая первому этапу взаимодействия. Согласно полученным нами данным (см. рис. 5), связывание белка с ДНК приводит к изменениям в его структуре, что отражается в изменении его степени α -спиральности. Изменения в структуре белка завершаются к $r = 0,4$, что соответствует 40—50 парам азотистых оснований на молекулу ДНК. К этому моменту степень α -спиральности белка в комплексе достигает 47 % (у свободного белка — 30 %). Однако, как упоминалось выше, наиболее сильные изменения молярной эллиптичности белка, а следовательно, и α -спиральности наблюдаются в области $r < 0,1$. Это соответствует избытку мест связывания молекул НМGB1 на ДНК (на каждую молекулу белка приходится приблизительно 150 пар оснований). Можно полагать, что в этих условиях взаимодействие каждой белковой молекулы с ДНК происходит независимо от других молекул белка [21, 22]. Это означает, что если связывание молекул белка с ДНК сопровождается изменением его структуры, то в данных условиях таковые структурные изменения проявятся наиболее ярко. По всей видимости, именно это и наблюдается при малых значениях r . Дальнейшее увеличение содержания НМGB1 в пробе приводит к появлению взаимодействий между белковыми молекулами, что, как было показано ранее [21, 22], приводит к компактизации ДНК и образованию надмолекулярных комплексов. Это предположение подтверждается и данными анализа электрофоретической подвижности (см. рис. 1), а также кривыми плавления ДНК, согласно которым стабилизация ДНК в комплексе завершается к $r = 0,075$, о чем свидетельствует сдвиг температуры плавления ДНК в этом интервале в область высоких температур (см. рис. 7). В то же время дальнейшее изменение размеров ДНК-белкового комплекса обусловлено, по всей видимости, компактизацией ДНК за счет белок-белковых взаимодействий.

Таким образом, нами было установлено, что размер участка связывания НМGB1 на ДНК может быть оценен в 40 пар оснований. Связывание белка приводит к увеличению степени его α -спиральности в комплексе, которая по достижении насыщения связывания увеличивается примерно на 20 % по сравнению со свободным белком. Полученный результат подтверждает нашу гипотезу о способности белка НМGB1 изменять свою структуру в ответ на связывание с ДНК. Мы предполагаем, что этот механизм может лежать в основе многообразных функций белка НМGB1, выполняемых им в клетке.

Авторы признательны Администрации Санкт-Петербурга за финансовую поддержку своих исследований (Поляничко, Родионова, Чихиржина), а также президенту РФ (МК-2126.2007.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bustin M., Reeves R.* // *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* – 1996. – **54**. – P.35.
2. *Lee K.L.D., Pentecost B.T., D'Anna J.A. et al.* // *Nucl. Acids Res.* – 1987. – **15**. – P. 5051.
3. *Read C.M., Cary P.D., Crane-Robinson C. et al.* // *Ibid.* – 1993. – **21**. – P. 3427.
4. *Cary P.D., Turner C.H., Mayer E. et al.* // *Eur. J. Biochem.* – 1983. – **131**. – P. 367.
5. *Teo S.-H., Grasser K.D., Hardman C.H. et al.* // *EMBO J.* – 1995. – **14**. – P. 3844.
6. *Bianchi M.E., Beltrame M., Paonessa G.* // *Science.* – 1989. – **243**. – P. 1056.
7. *Travers A.A., Thomas J.O.* In: *Chomatin Struture and Dynamics: State-of-the-Art* / Eds. J. Zlatanova, S.H. Leuba – UK.: Elsevier, 2004. – P. 103 – 133.

8. *Zlatanova J., van Holde K.* // *BioEssays.* – 1998. – **20.** – P. 584.
9. *Grosschedl R., Giese K., Pagel J.* // *Trends Genet.* – 1994. – **10.** – P. 94.
10. *Topalova D., Ugrinova I., Pashev I.G. et al.* // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2008. – **40,** N 8. – P. 1536.
11. *Nowak P., Barqasho B., Treutiger C.J. et al.* // *Cytokine.* – 2006. – **34,** N 1-2. – P. – 17.
12. *Love J.J., Li X., Case D.A. et al.* // *Nature.* – 1995. – **376.** – P. 791.
13. *Johns E.W.* The HMG chromosomal proteins. – L.: Academic Press Inc., 1982.
14. *Laemmli U.K.* // *Nature.* – 1970. – **227,** N 5952. – P. 680.
15. *Pace C.N., Vajdos F., Fee L. et al.* // *Protein Sci.* – 1995. – **4.** – P. 2411.
16. *Спирин А.С.* // *Биохимия.* – 1958. – **3,** № 5. – С. 656.
17. *Morrow J.A., Segal M.L., Lund-Katz S. et al.* // *Biochem.* – 2000. – **39.** – P. 11657.
18. *Велюз А., Легран М., Грожан М.* Оптический круговой дихроизм. – М.: Мир, 1967.
19. *Веденов А.А., Дыхне А.М., Франк-Каменецкий М.Д.* // *Успехи физ. наук.* – 1971. – **105,** № 3. – С. 479.
20. *Чихиржина Е.В., Поляничко А.М., Скворцов А.Н. и др.* // *Мол. биол.* – 2002. – **36,** № 3. – С. 525.
21. *Polyanichko A.M., Chikhirzhina E.V., Skvortsov A.N. et al.* // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2002. – **19,** N 6. – P. 1053.
22. *Поляничко А.М., Леоненко З.В., Визер Г. и др.* // *Биофизика.* – 2008. – **53,** № 3. – С. 407.