Федеральное агенство научных организаций (ФАНО России) Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

СТАРКОВА

Татьяна Юрьевна

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ «ЛИНКЕРНЫХ» БЕЛКОВ ХРОМАТИНА НМGB1 И Н1

03.01.03 - молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук

член-корреспондент РАН

Томилин А.Н.

кандидат биологических наук, доцент

Е.В. Чихиржина

Санкт-Петербург 2015

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. СТРУКТУРА ХРОМАТИНА	9
1.1.1. Первый уровень организации хроматина.	9
Формирование нуклеосомы	9
1.1.2. 30-нм фибрилла	13
1.1.3. Петельный уровень организации хроматина	15
1.2. ЛИНКЕРНЫЙ ГИСТОН Н1	18
1.2.1. Структура гистона Н1	18
1.2.2. Взаимодействие гистона Н1 с ДНК	21
1.3. НЕГИСТОНОВЫЙ ХРОМОСОМНЫЙ БЕЛОК НМGB1	24
1.3.1. Структура НМGB1	25
1.3.2. Взаимодействие HMGB1 с ДНК	29
1.3.3. Функции HMGB1 в клетке	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	35
2.1. ВЫДЕЛЕНИЕ «ЛИНКЕРНЫХ» БЕЛКОВ ХРОМАТИНА Н1, НМ	IGB1
И НМGB2	35
2.1.1. Первая экстракция H1, HMGB1 и HMGB2	35
2.1.2. Вторая экстракция H1, HMGB1, HMGB2	36
2.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ	
КЛЕТОК МЕТОДОМ ЩЕЛОЧНОГО ЛИЗИСА	37
2.3.1. Электрофорез в агарозном геле	39
2.3.2. Денатурирующий электрофорез в ПААГ по методу Лэммли	41
2.3.3. Двухмерный электрофорез	44
2.4. МАЛДИ (MALDI) МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ	46
2.5.СПЕКТРОСКОПИЯ КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА	48
2.5.1. Теория кругового дихроизма	48
2.5.2. Круговой дихроизм белков и пептидов	50
2.5.3. Круговой дихроизм нуклеиновых кислот	52

2.6. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ПЛАВЛЕНИЕ ДНК 53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ 58
3.1. Исследование вторичной структуры и термодинамической
стабильности полноразмерного природного белка HMGB1 в свободном
состоянии
3.2. Анализ вторичной структуры белка HMGB1 в свободном состоянии и
при взаимодействии с ДНК61
3.3. Исследование термостабильности высокомолекулярной ДНК тимуса
теленка в комплексе с негистоновым белком хроматина HMGB1 68
3.4. Сравнительный анализ вторичной структуры белка HMGB1 в
свободном состоянии и при взаимодействии с гистоном Н1
3.5. Выявление посттрансляционных модификаций подтипов линкерного
гистона H176
3.6. Сравнительный анализ посттрансляционных модификаций
негистоновых белков хроматина HMGB1 и HMGB2 87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ
ВЫВОДЫ
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ 102
Список публикаций по теме диссертации 104
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 107
БЛАГОДАРНОСТИ

введение

Актуальность темы. Хроматин эукариотических клеток представляет собой сложный высоко динамичный ДНК-белковый комплекс, структурная организация и функционирование которого напрямую связано с взаимодействием между его структурными элементами: ДНК и белками. При этом регуляция ДНК-белкового и белок-белкового взаимодействия до конца не изучена. С одной стороны, она может включать изменение характера связывания между молекулами путем изменения заряда взаимодействующих участков, например, с помощью введения клеточной системой пост-трансляционных модификаций в белках. С другой — включать структурно-адаптивные механизмы, когда в зависимости от объекта связывания, биологические макромолекулы, в частности белки, для перехода в функционально-активное состояние способны изменять свою пространственную структуру.

Данная работа посвящена исследованию механизмов взаимодействия негистонового хромосомного белка HMGB1 с ДНК и взаимодействующими с ним белковыми молекулами, в частности гистоном H1.

Белок HMGB1 относится к большому семейству белков HMG (от англ. High Mobility Group). Отличительной особенностью всех белков HMGB группы является наличие в их структуре одного и более ДНК-связывающего «HMGB-домена» структурного элемента размером порядка 80 аминокислотных остатка, обладающего высокой консервативностью, как аминокислотной последовательности, так и пространственной организации. Белок HMGB1 и схожий с ним HMGB2 относятся к группе двух-доменных белков. Основным отличием в их структуре является длина С-концевого фрагмента, в связи с этим, эти два белка очень часто исследуются в тандеме, предполагая, что взаимодействие HMGB-доменов белков с ДНК носит схожий характер. Однако, длина С-концевого участка молекул HMGB1 и HMGB2 может оказывать влияние на их пространственную укладку. В литературе предполагается возможность формирования 2-х типов пространственной укладки молекулы HMGB1: в свернутом (при взаимодействии С-концевого участка белка с ДНК-связывающими доменами) и развернутом состоянии (при нарушении данного взаимодействия, например, изменением заряда контактирующих областей белка), между которыми существует динамическое равновесие. При этом активное для

связывания с ДНК и белковыми молекулами состояние соотносят именно с развернутой конформацией. Таким образом, структура белков HMGB1 и HMGB2 может являться определяющей при связывании с ДНК и «линкерными» белками хроматина.

Общепринятым считается, что белки HMGB1 и HMGB2 принимают участие, как в структурной организации хроматина, так и в регуляции основных генетических процессов, в частности, транскрипции, репликации, рекомбинации и репарации ДНК. В связи с тем, что HMGB1 и гистон Н1 взаимодействуют с ДНК на линкерном участке в непосредственной близости друг от друга, в последнее время в формирование H1-HMGB1 литературе активно обсуждается структурнорегуляторного комплекса. При этом детальные механизмы взаимодействия данных «линкерных» белков HMGB1 и H1 с ДНК и между собой до конца не изучены. Они могут включать как изменение заряда полипептидной цепи белковых молекул посредством посттрансляционных модификаций, так и изменение структуры HMGB1, HMGB2 и H1 при взаимодействии с ДНК и между собой.

Цель работы: анализ структурных характеристик белка HMGB1 в свободном состоянии и в составе комплексов с ДНК и с гистоном H1, выявление посттрансляционных модификаций «линкерных» белков хроматина HMGB1, HMGB2 и гистона H1.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие задачи:

 Определить вторичную структуру полноразмерного природного белка HMGB1 в условиях эксперимента и охарактеризовать ее термодинамическую стабильность
Провести сравнительный анализ вторичной структуры белка HMGB1 в свободном

состоянии и при взаимодействии с ДНК и гистоном Н1

3. Определить влияние HMGB1 на структурные и термодинамические параметры ДНК при взаимодействии

4. Провести сравнительный анализ посттрансляционных модификаций негистоновых белков хроматина HMGB1 и HMGB2

5. Охарактеризовать посттрансляционные модификации подтипов линкерного гистона H1

Научная новизна работы. В работе впервые показано, что HMGB1 способен изменять свою структуру в зависимости от мишени связывания. В процессе взаимодействия HMGB1 с высокомолекулярной ДНК тимуса теленка происходит увеличение на 20 % содержания аминокислотных остатков, находящихся в αспиральной конформации, в то время как связывание HMGB1 с плазмидной ДНК pUC19 проходит без изменений вторичной структуры белка. Взаимодействие белка HMGB1 с гистоном H1 приводит к изменениям вторичной структуры как минимум ИЗ белков. В работе впервые выявлены сайты следующих одного посттрансляционных модификаций белка HMGB1: AcK50, AcK59, AcK65, AcK68, AcK81, AcK86-88, AcK90, AcK162, MetR70 или MetR73, MetK76, MetK154, MetK157, МеtК167, МеtК171 (вместо метилирования МеtК167 и МеtК171 возможно диметилирование в одном из этих двух положений); сайты фосфорилирования в положениях РТ51 или PS53, РТ77 или РУ78, РУ155. Подтверждено наличие сайта HMGB1 K81. ацетилирования В положении оказывающего влияние на пространственную укладку белковой молекулы. Впервые показано, что положение посттрансляционных модификаций белков HMGB1 и HMGB2 различно. Большая часть найденных в белках модификаций идентичны, в то время как модификации AcK57, AcK76, AcK85, AcK152, AcK154, MetK82, PY78 характерны только для белка HMGB2.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные существенны для понимания как роли негистонового хромосомного белка HMGB1 в структурной организации хроматина, так и его участия в регуляторных клеточных процессах. Новые знания о структурных особенностях белка HMGB1 в комплексе с ДНК и с линкерным гистоном H1 могут быть полезны при создании фармакологических подходов при разработке новых терапевтических средств. Это связано с тем, что HMGB-доменные белки могут выступать как посредники при переносе в ядро клетки (Bruhn et al., 1993; Park, Lippard, 2011; 2012) широко используемого в клинической практике противоопухолевого препарата цисплатина. Полученные данные могут быть использованы при подготовке специалистов в области молекулярной биологии и биофизики.

Обоснованность и достоверность основных результатов и выводов работы обеспечивается использованием современного оборудования, отработанных методик

6

выделения биологического материала, методов обработки и анализа данных, высокой воспроизводимостью полученных результатов.

Апробация работы. Результаты работы докладывались и обсуждались на конференциях: международных И российских научных 12-ая И 13-ая Международные Пущинские школы-конференции молодых ученых «Биология наука XXI века» (Пущино, 2008; 2009); European Biophysics Congress (Италия 2009); IV Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Казань, 2009); V, VII Saint-Petersburg Young Scientists Conference «Modern problems of polymer science» (Санкт-Петербург, 2009; 2011); XVI и XVII Всероссийские симпозиумы "Структура и функции клеточного ядра" (Санкт-Петербург, 2010; 2014); II Конференция молодых ученых Института цитологии РАН (2010); XV Симпозиум по межмолекулярному взаимодействию и конформации молекул (Петрозаводск, 2010); III Конференция "Современные проблемы молекулярной биофизики" (Санкт-Петербург, 2011); XXIV Зимняя научная школа "Перспективные направления молодежная физикохимической биологии и биотехнологии» (Москва. 2012); FEBS (Санкт-Петербург, 2013).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 18 печатных работ: 7 статей в рецензируемых журналах (из них 3 в изданиях Web of Science и 5 — Scopus), в том числе 5 — в журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций, и 11 тезисов докладов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Негистоновый хромосомный белок HMGB1 способен изменять свою вторичную структуру при связывании как с ДНК, так и с гистоном H1.

2. Посттрансляционные модификации негистоновых хромосомных белков HMGB1 и HMGB2 различны. Большая часть найденных в белках модификаций идентичны, в то время как модификации AcK57, AcK76, AcK85, AcK152, AcK154, MetK82, PY78 характерны только для белка HMGB2.

3. Среди посттрансляционных модификаций гистона H1 доминируют модификации положительно заряженных остатков лизина в различных положениях, что приводит к уменьшению положительного заряда полипептидной цепи белковых молекул и может оказывать влияние на связывание гистона H1 и HMGB1 между собой и с ДНК.

Личный вклад автора. Большинство экспериментальных данных получено автором лично. Автор принимала участие в постановке и решении задач, обработке и обсуждении полученных результатов Масс-спектры белков HMGB1, HMGB2 и H1 получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий «СПбГПУ» на базе ФГАОУ ВО «СПбПУ» с участием н.с. Артамоновой Т.О. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научными руководителями.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. СТРУКТУРА ХРОМАТИНА

1.1.1. Первый уровень организации хроматина.

Формирование нуклеосомы

Генетический материал клеток высших организмов (хроматин) представляет собой ДНК-белковый комплекс, характеризующийся сложной многоуровневой структурной организацией.

Гистоновые белки, или гистоны, являются представителями одной из основных групп ядерных белков, принимающих участие в формировании структуры хроматина. Они характеризуются высоким содержанием положительно заряженных аминокислотных остатков лизина и аргинина, что способствует их связыванию с отрицательно заряженной ДНК в независимости от ее нуклеотидной последовательности (Alberts et al., 2014).

Выделяют две основные группы гистонов: коровые гистоны и линкерные гистоны семейства Н1.

Коровые гистоны H2A, H2B, H3 и H4 представляют собой небольшие (102 — 135 аминокислотных остатков) высоко консервативные белки молекулярной массой около 11 — 16 кДа. В их структуре можно выделить три спиральных участка, формирующих глобулярный домен. N- и C- концевые участки белковых молекул не обладают определенной структурной организацией (Luger et al., 1997; Luger, Richmond 1998; Davey et al, 2002; Peterson, Laniel, 2004; Zlatanova, Leuba, 2004; Luger et al, 2012).

При формировании коровой частицы глобулярные домены гистонов ассоциируют друг с другом с образованием гистонового октамера, содержащего по две молекулы каждого из четырех гистонов. В работе Сакамото с соавторами (Sakamoto et al., 2009) методами GLASP (от англ. Global analysis of surfaces by point mutation) и GLAMP (от англ. Global analysis of mutual interaction surfaces of multipoint mutation) проведен подробный анализ возможных белок-белковых и ДНКбелковых взаимодействий в гистоновом октамере. На рисунке 1 представлены основные возможные белок-белковые контакты между гистонами H2A, H2B, H3 и Н4. Поскольку в состав октамера входит по два типа каждого гистона, для удобства интерпретации данных авторы ввели обозначения: H2A, H2A', H2B, H2B', H3, H3', H4 и H4'. При этом подразумевается, что гетеродимеры образуются по следующему принципу: H2A-H2B, H2A'-H2B', H3-H4 и H3'-H4'(Sakamoto et al., 2009).



Рисунок 1. Основные белок-белковые контакты между гистонами H2A, H2B, H3 и H4 при формировании гистонового октамера (Sakamoto et al., 2009).

Согласно данным других авторов (Kalashnikova et al., 2012), при связывании гистонов H2A и H2B восемь отрицательно заряженных аминокислотных остатков белков H2A и H2B (глютаминовой кислоты E56, E61, E64, E91, E92 и аспарагиновой кислоты D90 белка H2A и глютаминовой кислоты E102, E110 белка H2B) образуют кластер, что способствует формированию на поверхности H2A-H2B комплекса узкой бороздки (желоба). Взаимодействие тирозина Y50, Y57 и валина V54 гистона H2A с аминокислотными остатки этого кластера приводит к образованию гидрофобного кармана в нижней части желоба (Kalashnikova et al., 2012).

Данные молекулярного моделирования (Allahverdi et al., 2011; Yang, Arya, 2011) свидетельствуют о том, что пространственные характеристики спирали гистона H4, образованной с 16 по 22 аминокислотными остатками, оптимальны для ее расположения в узкой бороздке комплекса H2A-H2B. При этом аминокислотные

остатки лизина K16, K20 и аргинина R19, R23 на поверхности спирали гистона H4 способны образовывать нековалентные взаимодействия с отрицательно аминокислотными желоба. заряженными остатками, входящими В состав Отмечается также вероятность формирования солевого мостика между лизином К16 гистона Н4 и аспарагиновой кислотой Е61 гистона Н2А, который, согласно предложенной модели, разрушается при ацетилировании лизина в данном положении (Yang, Arya, 2011). Помимо этого не исключено взаимодействие аргинина R19, R23 и лизина K20 гистона H4 с остатками аспарагиновой кислоты Е56 гистона Н2А, Е110 гистона Н2В, Е56 гистона Н2А и Е110 гистона Н2В соответственно.

Гистоновый октамер служит основой, вокруг которой в 1,67 оборота закручивается двойная спираль ДНК. По литературным данным, с поверхностью октамерной частицы непосредственно связаны 121 п.н. из 146 п.н. ДНК, намотанной вокруг гистонового кора. Остальные 25 п.н. взаимодействуют с отстоящими участками гистонов H2A, H2B, H3 и H4 на входе/выходе коровой частицы (комплекса ДНК с гистоновым октамером) (Arents et al., 1991; Luger et al., 1997; Нагр et al., 2000; Davey et al., 2002; Wood et al., 2005). Основные контакты ДНК с коровыми гистонами представлены на рисунке 2.

Взаимодействие Н2А-Н2В с ДНК

Взаимодействие НЗ-Н4 с ДНК



Рисунок 2. Основные контакты коровых гистонов с ДНК при формировании коровой частицы (Sakamoto et al., 2009).

Образование коровой частицы связано с существенной деформацией (изгибом) двойной спирали. Необходимым условием данного процесса является сжатие малой бороздки ДНК. Вследствие легкой деформации АТ-богатых последовательностей (в сравнении с ГЦ-богатыми областями) возникает ориентация малых бороздок АТ-пар к гистоновому октамеру. В то же время малые бороздки ГЦ-

пар предпочтительно обращены наружу. Дополнительная стабильность нуклеосомной частицы осуществляется благодаря выходу на поверхность частицы N-концевых участков коровых гистонов (сквозь витки ДНК через каждые 20 п.н.), при этом сильно основные аминокислоты гистона H2A связываются с ДНК по малой бороздке с внешней стороны частицы (Luger et al., 1997; Zlatanova, Leuba, 2004).

По сравнению с коровыми гистонами линкерный гистон H1 (или его аналог гистон H5 в хроматине птиц) немного больше (порядка 220 аминокислотных остатков) и менее эволюционно консервативен. Гистон H1 связывается с ДНК на входе/выходе коровой частицы, закрывая собой около 20 п.н. линкерного участка (An et al., 1998; Travers, 1999; Zlatanova, Leuba, 2004). Вместе, коровая частица, линкерный участок ДНК и гистон H1 образуют нуклеосому — первый уровень структурной организации хроматина. Нуклеосомный повтор (фрагмент молекулы ДНК, входящий в состав одной нуклеосомы) является характеристикой каждого типа хроматина: для соматических тканей млекопитающих нуклеосомный повтор составляет 195±5 нуклеотидных пар, в то время как транскрипционно неактивный хроматин спермиев морского ежа характеризуется длиной нуклеосомного повтора в 273±5 нукдеотидных пар (Чихиржина, Воробьев, 2002; Chikhirzhina et al, 2014).

В литературе рассматриваются три модели расположения глобулярного домена белка H1 на нуклеосоме.

Согласно первой модели (Allan et al., 1980) глобула H1 располагается на внешней стороне суперскрученного витка ДНК в центре нуклеосомы, симметрично взаимодействуя с нуклеосомной ДНК (рис. 3а). При этом участки ДНК порядка 10 п.н. с каждой стороны от входа/входа из нуклеосомы защищены С-и N-концевыми участками гистона H1 от воздействия микрококовой нуклеазы.

Согласно ассиметричной модели (Zhou et al., 1998) расположение глобулярного домена H1 смещено на 70 п.н. относительно оси симметрии, таким образом, что H1 соединяет два витка ДНК (рис. 3b).

Согласно третий модели (Hayes 1996; Pruss et al., 1996) глобулярный домен H1 не может контактировать с нуклеосомой в области оси симметрии в связи с ассиметричным его расположением с внутренней стороны двойной спирали ДНК (рис. 3с).

На сегодняшний день самой реалистичной и общепризнанной является ассиметричная модель расположения H1 (Zhou et al., 1998).



Рисунок 3. Схематическое представление моделей возможной локализации глобулярного домена H1 на нуклеосоме. (Travers, Thomas, 2004) а) симметричная модель Аллана (Allan et al., 1980); в) ассиметричная модель Зоу (Zhou et al., 1998); с) модель Прасса (Pruss et al., 1996).

1.1.2. 30-нм фибрилла

Взаимодействуя с ДНК на входе/выходе коровой частицы, Н1 связывается вытянутыми С- и N-концевыми участками с линкерным участком ДНК между соседними коровыми частицами, стягивая их в массивы и формируя при этом фибриллу, диаметром 30 нм (Luger et al., 1997; Bartolome et al., 1994, Carruthers, Hansen, 2000; Wu, Grunstein, 2000).

До недавнего времени в литературе были описаны две принципиально разные модели такой фибриллы. Они отличаются по ориентации нуклеосомы к оси спирали, расположению линкерного гистона H1, степени изгиба линкерной ДНК и их способности объяснить различную длину нуклеосомного повтора.

Согласно классической соленоидальной модели, впервые предложенной Финчем и Клугом (Finch, Klug, 1976), нуклеосомная нить, содержащая гистоны H1, сворачивается в соленоид диаметром 30 нм. Позже было показано (Thoma et al., 1979), что при повышении ионной силы раствора соленоидальная фибрилла может самоорганизовываться и в отсутствии гистона H1, однако в этом случае она обладает меньшей плотностью и менее регулярна. Важнейшей особенностью этой модели является то, что при формировании фибриллы взаимодействие, происходящее между соседними нуклеосомами, требует возникновения изгиба линкерной ДНК. Формированию изгиба, вероятно, способствует связывание гистона Н1 на данном участке (Widom, 1989). Однако, изгиб линкерной ДНК является энергетически невыгодным и существует ряд предпосылок в пользу сохранения прямого линкерного участка (Van Holde, Zlatanova, 1996).

Согласно другой модели (Woodcock et al., 1993), соседние нуклеосомы ориентированы по разные стороны от хроматинового волокна таким образом, что линкерный участок между ними сохраняет линейность. Тем самым формируется зигзагообразная структура, параметры которой могут несколько варьироваться в пределах 30 нм. Зигзагообразная модель подтверждается рентгеноструктурным анализом тетрануклеосомных фрагментов (Rydberg et al., 1998; Schalch et al., 2005).



Рисунок 4. Зигзагообразная модель 30-нм фибриллы (Rippe et al., 2008).

Данное обстоятельство не исключает возможности наличия разных типов структурной организации фибриллы in vivo. Несмотря на большое число экспериментальных данных, на сегодняшний день так и не было получено результатов, указывающих точное положение линкерного гистона ни в соленоидальной, ни в зигзагообразной модели.

В настоящее время использование физических методов (Polyanichko, Wieser, 2005; Schalch et al., 2005; Klug, 2010; Luger et al., 2012), таких как спектроскопия поглощения в УФ и ИК областях спектра, круговой дихроизм, флуоресцентная спектроскопия, рассеяние света, электронная и силовая микроскопия, электрофоретический анализ и т.д., в исследовании структурной организации хроматина открывает перед учеными новые возможности анализа полученных

данных и поднимает все новые и новые вопросы, стимулируя уточнение более ранних моделей.

В частности, некоторые последние данные о структуре хроматина ставят под сомнение само существование 30-нм фибриллы (Fussner et al., 2011). В качестве альтернативной модели в литературе предлагается модель метафазных хромосом в виде расплавленной глобулы «molten globule».

Методом EMANIC (от англ. electron microscopy-assisted nucleosome capture) было показано, что структура хроматиновых волокон в значительной степени зависит от длины линкера ДНК (Fussner et al., 2011). В случае коротких и средних длин линкерных участков ДНК (173-209 п.н.) между нуклеосомами образуется регулярная зигзагообразная структура «two-start helix». Однако, большая длина линкера (218-226 п.н.) приводит к образованию соленоида. Таким образом, механизмы лежащие в основе формирование более высоких уровней структурной организации хроматина сложнее, чем это считалось ранее, и ждут дальнейших тщательных исследований.

1.1.3. Петельный уровень организации хроматина

Согласно литературным данным следующим этапом упаковки хроматина является выпетливание фибриллы, которое может образовываться вследствие специфического взаимодействия негистоновых белков, удерживающих вместе ее удалённые участки.

Экспериментальные данные о расстоянии между определенными геномными последовательностями, основанные на результатах флуоресцентной гибридизации in situ, были использованы для построения количественной модели (random-walk/giant loop model) общей геометрической структуры хромосомы человека (Sachs et al., 1995). Согласно этой модели происходит формирование больших петель хроматинового волокна размером порядка 300 тыс.п.н., уложенных на некотором белковом остове. В литературе так же упоминается о возможном формировании петель размером до 100 000 п.н. в форме розетки (радиально-петлевая модель) (Hamkalo, Rattner, 1980; Pienta, Coffey 1984; Paul, Ferl, 1999) и спиральной структуры (Sedat, Manuelidis, 1978; Belmont, Bruce, 1994). На рисунке 5 представлены три

гипотетических модели выпетливания хроматиновой фибриллы. Во всех описанных случаях предполагается, что объединенные в петли участки хроматина функционально связаны. Помимо этого известно, что в клетке объединенные области конденсируются как единое целое (Dworetzky et al., 1992).

Плотность упаковки ДНК в хроматине определяется множественными посттрансляционными модификациями коровых гистонов, включая ацетилирование, фосфорилирование, метилирование, убиквитинирование и сумоилирование.



Рисунок 5. Гипотетические модели укладки 30-нм фибриллы(Rippe et al., 2008). a) радиально-петлевая модель (radial-loop model); b) модель произвольного выпетливания (random-walk model); c) модель спиральной структуры (chromonema model).

Методами электронной (Oliva et al., 1990) и атомно-силовой микроскопии (Dunker et al., 2001) было показано, что гиперацетилированные нуклеосомы обладают менее компактной структурой, напоминающей состояние «расплавленной

глобулы». Установлено, что ацетилирование гистонов уменьшает сопротивление нуклеосомы к механическому разворачиванию, что свидетельствует о менее компактной укладке хроматина (Brower-Toland et al., 2005). «Рыхлая» структура хроматина является следствием присоединения ацетильного остатка, что приводит к уменьшению положительного заряда аминогруппы белка и влечет за собой уменьшение сродства коровых гистонов к ДНК. Было показано, что уровень ацетилирования гистонов НЗ и Н4 выше в области промоторов (последовательности нуклеотидов ДНК, которая распознается РНК-полимеразой) и энхансеров (небольших участков ДНК, с которыми связываются транскрипционные факторы, увеличивая уровень транскрипции гена или группы генов) (Heintzman et al., 2007).

На сегодняшний день самыми изученными модификациями, оказывающими влияние на состояние хроматина, являются метилирование (Met) и ацетилирование (Ac) по лизину (K) аминокислотных остатков гистонов H3 и H4, а именно такие как H3K9Ac (ацетилирование H3 в положении K9), H3K9Met2–3 (ди- и триметилирование H3 в положении K9), H3K4Met3 (триметилирование H3 в положении K4), H3K27Met3 (триметилирование H3 в положении K27) и H3K36Met3 (триметилирование H3 в положении K36) (Serrano et al., 2013). Согласно литературным данным, моно-, ди- и три-метилирование оказывает влияние на протекание таких регуляторных процессов как транскрипция, репликация и репарация ДНК (Kouzarides, 2007).

Фосфорилирование гистонов также высоко динамично. Модификации данного типа подвергаются, в основном, аминокислотные остатки серина, треонина и тирозина преимущественно на N-концевых участках белков (Xhemalce et al., 2011). Показано, что фосфорилирование играет решающую роль в ремоделировании хроматина. Например, фосфорилирование гистона НЗ в положениях ТЗ, S10; T11 и S28, согласно литературным данным, приводит к конденсации хромосом (Xhemalce et al., 2011). Тем не менее, до сих пор неясно, являются ли эти модификации функционально взаимосвязанными.

1.2. ЛИНКЕРНЫЙ ГИСТОН Н1

В отличие от коровых гистонов линкерный белок Н1 видо- и ткане-специфичен. В клетках млекопитающих обнаружено 11 подтипов гистона Н1, каждый из которых кодируется своим геном (Happel et al., 2009). Гистоны H1t, H1T2, H1oo и HILS1, встречаются только в половых клетках, в то время как остальные семь (H1.0, H1.1, H1.5 H1x) присутствуют H1.2. H1.3, H1.4, И В соматических клетках млекопитающих. Согласно литературным данным (Zlatanova, Doenecke, 1994; Happel et al., 2005) белки H1.1, H1.0 и H1х тканеспецифичны. В частности, H1.1 встречается в клетках тимусной железы, яичников, селезенке, лимфотической и нервной ткани в значительном количестве, а гистон H1x был обнаружен только в культивируемых клетках, несмотря на то, что экспрессия гена H1FX, кодирующего белок H1x, наблюдается в большинстве тканей.

1.2.1. Структура гистона Н1

Подтипы гистона H1, встречающихся в соматических клетках млекопитающих, характеризуются высокой консервативностью первичных структур как в пределах одного организма, так и при сравнении белков, выделенных из ткани разных видов животных (рис. 7 и 8). Каждый из семи подтипов H1 характеризуется высоким содержанием положительно заряженных аминокислотных остатков лизина и аргинина, что способствует их связыванию с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК при формировании нуклеосомы. Как можно убедиться, глобулярный домен белка H1 характеризуется высокой консервативностью аминокислотного состава, в то время как на N- и C- концевых участках наблюдается ряд гомологичных замен.

H1.1	MSETAPVAQAASTATEKPAAAKKTKKPAKAAAPRKKPAGPSVSELIVQAVSSSKERSGVS
Н1.2	MSEAAPAAPAAAPPAEKAPAKKKAAKKPAGVRRKASGPPVSELITKAVAASKERSGVS
H1.3	MSETAPAAPAAPAPVEKTPVKKKAKK-TGAAAGKRKASGPPVSELITKAVAASKERSGVS
H1.4	MSETAPAAPAAPAPAEKTPVKKKARKAAGGAKRKTSGPPVSELITKAVAASKERSGVS
H1.5	MSETAPAETAAPAPVEKSPAKKKTTKKAGAAKRKATGPPVSELITKAVSASKERGGVS
H1.1	(LAALKKSLAAAGYDVEKNNSRIKLGLKSLVNKGTLVQTKGTGAAGSFKLNKKAES
H1.2	LAALKKALAAAGYDVEKNNSRIKLGLKSLVSKGILVQTKGTGASGSFKLNKKAASGEAKP
H1.3	LAALKKALAAAGYDVEKNNSRIKLGLKSLVSKGTLVQTKGTGASGSFKLNKKAASGEAKP
H1.4	LAALKKALAAAGYDVEKNNSRIKLGLKSLVSKGTLVQTKGTGASGSFKLNKKAASGEAKP
H1.5	LPALKKALAAGGYDVEKNNSRIKLGLKSLVSKGTLVQTKGTGASGSFKLNKKAASGEAKP
H1.1	KAITTKVSVKAKASGAA-KKPKKTAGAA-AKKTVKTPKKPKKPAVSKKTSKSPKKPK
H1.2	QAKKAGAAKAKKPAGAA-KKPKKATGAATPKKAAKKTPKKAKKPAAAAVTKKVAKSPKKA
Н1.3	KAKKAGAAKAKKPAGAA-KKPKKATGAATPKKTAKKTPKKAKKPAAAAGAKKVSKSPKKV
H1.4	KAKRAGAAKAKKPAGAA-KKPKKAAGTATAKKSTKKTPKKAKKPAAAAGAKK-AKSPKKA
H1.5	KAKKTGAAKAKKPAGATPKKPKKTAGAKKTVKKTPKKAKKPAA-AGVKKVAKSPKKA
H1.1	V-VKAKKVAKSPAKAKAVKPKASKAKVTKPKTPAKPKKAAPKKK
H1.2	KVTKPKKVKSASKAVKPKAAKPKV-AKAKKVAAKKK
H1.3	KAAKPKKAAKSPAKAKAPKAKASKPKASKPKA-TKAKKAAPRKK
H1.4	KATKAKKAPKSPAKAKTVKPKAAKPKTSKPKA-AKPKKTAAKKK
Н1.5	KAAKPKKAAKSPAKPKAVKSKASKPKVTKPKTAKPKA-AKAKKAVSKKK

Рисунок 7. Сравнение белков H1.1, H1.2, H1.3, H1.4 и H1.5 мыши построено в программном пакете Standard Protein BLAST, доступном в сети интернет. Серым цветом отмечены отличающиеся аминокислотные остатки, прямоугольником — входящие в глобулярный домен белка.

Теленок Крыса Человек Мышь	MSEVALPAPAASTSPEKFSAGKKAKKPAKAAAAAKKKPAGPSVSELIVQAVSSSKERSGV MSETAPVPQPASVAPEKPAATKKTRKPAKAAV-PRKKPAGPSVSELIVQAVSSSKERSGV MSETVPPAPAASAAPEKPLAGKKAKKPAKAAAASKKKPAGPSVSELIVQAASSSKERGGV MSETAPVAQAASTATEKPAAAKKTKKPAKAAA-PRKKPAGPSVSELIVQAVSSSKERSGV	ļ
Теленок Крыса Человек Мышь	SLAALKKALAAAGYDVEKNNSRIKLGLKSLVGKGTLVQTKGTGASGSFKLNKKVASVDAK SLAALKKSLAAAGYDVEKNNSRIKLGLKSLVNKGTLVQTKGTGAAGSFKLNKKAESKAST SLAALKKALAAAGYDVEKNNSRIKLGIKSLVSKGTLVQTKGTGASGSFKLNKKASSVETK SLAALKKSLAAAGYDVEKNNSRIKLGLKSLVNKGTLVQTKGTGAAGSFKLNKKAESKAIT	
Теленок Крыса Человек Мышь	PTATKVATKTKVTSASKKPKKASGAAAAKKSVKTPKKARKSVLT-KK-SSKSPKKPKAVK TKV-TVKAKASGAAKKPKKTAGAAA-KKTVKTPKKPKKPAVS-KKTSSKSPKKPKVVK PGASKVATKTKATGASKKLKKATGASKKSVKTPKKAKKPAATRKSSKNPKKPKTVK TKV-SVKAKASGAAKKPKKTAGAAA-KKTVKTPKKPKKPAVS-KKT-SKSPKKPKVVK	
Теленок Крыса Человек Мышь	PKKVAKSPAKAKAVKPKGAKVKVTKPKTAAKPKKAAPKKK AKKVAKSPAKAKAVKPKAAKVKVTKPKTPAKPKKAAPKKK PKKVAKSPAKAKAVKPKAAKARVTKPKT AKKVAKSPAKAKAVKPKASKAKVTKPKTPAKPKKAAPKKK	

Рисунок 8. Сравнение белков H1.1 теленка, крысы, мыши и человека построено в программном пакете Standard Protein BLAST, доступном в сети интернет. Серым цветом отмечены отличающиеся аминокислотные остатки, прямоугольником — входящие в глобулярный домен белка.

В структуре гистона H1 выделяют три области: неполярный центральный глобулярный домен (порядка ~75 аминокислотных остатка) и положительно заряженные N- и C-концевые участки (~45 и ~100 аминокислотных остатка соответственно), в водном растворе не обладающие определенной пространственной организацией (Kasinsky et al., 2001).

Центральный участок белка (примерно 75 аминокислотных остатка) — глобулярный домен, отличается высокой межвидовой консервативностью. В его составе выделяют три α-спиральных участка (I (5-16), II (24-34), III (42-56)) и три β-поворота (S1, S2, S3) (рис.9). Спираль I соединена со спиралью II через β-поворот S1. S2 и S3, образующие β-шпильку, совместно с S1 формируют β-структуру из трех анти-параллельных слоев. Крыло, на рисунке 9 обозначенное как W (от англ. «wing»), представляет собой вытянутую петлю, которая образуется при взаимодействии S2 и S3 (Cerf et al., 1994).



Рисунок 9. Пространственная организация глобулярного домена белка H5 (Jerzmanowski, 2004)

1.2.2. Взаимодействие гистона Н1 с ДНК

Основываясь на данных рентгеноструктурного анализа и данных, полученных для белка САР (bacterial Catabolite Activator Protein), Шультц и соавторы (Schultz et al., 1991) предположили, что основной ролью спирали Ш глобулярного домена H1 (H5 у птиц) является распознавание последовательности ДНК и взаимодействие с ней по большой бороздке. Связывание белка с ДНК в данной области происходит посредством формирования водородных связей между сахарофосфатным остовом ДНК и лизином в положении 69 (К 69), аргинином в 73 положении (R 73).



Рисунок 10. Модель взаимодействия глобулярного домена белка H5 с ДНК (Jerzmanowski, 2004).

При этом лизин в положении 85 (К 85), расположенный между β-поворотами S2 и S3 глобулярного домена гистона H5 взаимодействует с двойной спиралью ДНК со стороны малой бороздки. Согласно литературным данным (Buckle et al., 1992) замена лизина в положении 85 на глютамин или глютаминовую кислоту приводит к потере способности H1 дополнительной защиты участка в 20 п.о. в месте связывания на ДНК от воздействия рестрикционных ферментов, в частности, микрококколевой нуклеазы.

Данные кристаллографии домена H5 предполагают также наличие второго сайта связывания (сайт II) (Ramakrishnan et al., 1993). Сайт II находится с обратной стороны домена H5 на расстоянии 25 Å от спирали III и содержит два консервативных аминокислотных остатка Lys 40 и Arg 42, расположенных на петле между спиралью I и III, Lys 52 в спирали III и Arg 94 в S3 β-повороте. В пользу присутствия второго сайта связывания глобулярного домена H1 (H5 у птиц) с ДНК свидетельствуют и данные других авторов (Thomas, Wilson,1986; Thomas et al., 1992), которыми было показано, что глобулярный домен белка H1 может связывать одновременно две молекулы ДНК, стягивая их в комплексы, напоминающие тяжи.

Присутствием двух сайтов связывания, вероятно, можно объяснить наличие некооперативного и кооперативного типов взаимодействия гистона H1 с ДНК (Фрисман и др., 1969; 1973; Clark, Thomas, 1986; De Bernardin et al., 1986; Чихиржина и др., 1998; Yoshikawa et al., 2001; Чихиржина, Воробьев, 2002; Chikhirzhina et al, 2014).

Первый тип (в условиях малых значений соотношении белок/ДНК при ионов Na⁺ ниже 20 мМ) характеризуется концентрации формированием растворимого комплекса, в котором молекулы Н1 равномерно распределены по двойной ДНК. Второй (в случае высокой ионной силы (20 до 50 мМ)) формированием нерастворимых похожих на тяжи агрегатов (Böttger et al., 1981), которые присутствуют в растворе наряду со свободной ДНК. В этом случае предполагается, что гистон H1 способен взаимодействовать с несколькими молекулами ДНК одновременно, что вероятно, и приводит к образованию тяжей. При этом, характер связывания молекулы Н1 с ДНК напрямую зависит не только от ионной силы раствора, соотношения белок/ДНК, но и от размера ДНК. Согласно литературным данным (Renz, Day, 1976), гистон Н1 предпочитает связываться с более длинными фрагментами ДНК. Отмечается так же возможность формирования комплексов по кооперативному механизму и в случае меньшей ионной силы при достаточно высоком соотношении белок/ДНК (Фрисман и др., 1969; 1973; Clark, Thomas, 1986; De Bernardin et al., 1986; Чихиржина и др., 1998; Yoshikawa et al., 2001; Чихиржина, Воробьев, 2002; Chikhirzhina et al, 2014).

Биологическое значение кооперативного механизма связывания остается до сих пор неясным. Возможно, формирование тяжеподобных структур ДНК необходимо

для образования высоких уровней организации хроматиновой фибриллы (Zlatanova, 1990; Zlatanova, Yaneva, 1991). Согласно литературным данным, хроматиновые структуры более высокого порядка образуются при наличии шести подряд расположенных H1-содержащих нуклеосом (Bates et al., 1981; McGhee et al., 1983). Так же есть предположение, что за кооперативное связывание с молекулой ДНК, приводящее к формированию тяжей, могут отвечать молекулы H1 определенного типа (Lennox, 1984).

Неясным остается и значение предпочтительного связывания гистона H1 с суперскрученной формой ДНК. Предполагается, что плотность супервитков ДНК напрямую связана с возможностью H1 принимать участие в регуляции экспрессии генов (Singer, Singer, 1978). Согласно литературным данным, связывание H1 с ДНК является селективным. Было показано (Renz, Day, 1976; Blumenfeld et al., 1978; Izaurralde et al., 1989; Kas et al., 1989), что белок предпочтительно взаимодействует с AT-богатыми yчастками ДНК, в том числе AT-обогащенными SAR- областями (scaffold-attachment regions) (Izaurralde et al., 1989; Kas et al., 1989). Предполагается, что SARs сегменты способны контролировать конформацию хроматиновых доменов. Предпочтительное связывание H1 с AT-богатыми yчастками ДНК, возможно, также является важным элементом механизма уплотнения хроматина и, следовательно, транскрипционной инактивации гетерохроматина (Blumenfeld et al., 1978).

1.3. НЕГИСТОНОВЫЙ ХРОМОСОМНЫЙ БЕЛОК НМСВ1

Среди всего многообразия негистоновых белков хроматина, принимающих участие в его структурной организации и играющих важную роль в протекании регуляторных процессов в клетке, самыми многочисленными и хорошо изученными являются белки семейства HMGB (от англ. High Mobility Group Box protein). Отличительной особенностью всех представителей НМGВ семейства является наличие в их структуре так называемого «HMGB-домена» — структурного элемента 80 размером порядка аминокислотных остатка. обладающего высокой консервативностью аминокислотной последовательности, как так И пространственной организации.

Согласно количеству HMGB-доменов в составе белка, выполняемых функций в клетке и специфичности к последовательности ДНК HMGB-доменные белки млекопитающих можно разделить на две группы. Первая группа HMGB-доменных белков состоит из менее распространенных в хроматине белков таких как TCF/LEF-1, TOX, пол-определяющий фактор SRY, белки подсемейства SOX, хроматин моделирующие факторы BAF57 и PB1, имеющих в своем составе один HMGB-домен. Однодоменные белки характеризуются специфичностью к последовательности ДНК в месте связывания, которая в процессе их взаимодействия с ДНК опосредована ограниченным числом формирования водородных связей в малой бороздке двойной спирали (Stros, 2007; 2010).

Ко второй относятся белки, содержащие два и более HMGB-домена такие как HMGB1/2, HMGB3, HMGB4, митохондриальные факторы mtTF1, ABF2, белок DSP1 дрозофилы, белки HMO1/2, выделенные из дрожжей, и транскрипционный фактор PHK-полимеразы I UBF, имеющий в своем составе от 4 до 6 HMGB-доменов (Stros 2007; 2010). Мультидоменные HMGB-белки характеризуются отсутствием специфичности к последовательности ДНК в месте связывания (Thomas, Travers, 2001; Grasser et al., 2007).

Негистоновые двухдоменные HMGB1 и HMGB2 были открыты примерно 35 лет назад как широко распространенные в хроматине ДНК-связывающие белки (в среднем 1 молекула белка приходится на 10 — 15 нуклеосом) (Stros, 2010). Их локализация и количество сильно зависят от типа ткани (Seyedin et al., 1981; Bustin, Reeves, 1996). Высокое содержание HMGB1 в ядре отмечается в активно делящихся

клетках. Тимусная железа, селезенка, семенники характеризуются высоким содержанием белка как в ядре клетки, так и в цитоплазме, в то время как в печени и мозге большая часть белка сосредоточена в цитоплазме (Mosevitsky et al., 1989). Было также показано, что слабо растущие клетки характеризуются локализацией белка в цитоплазме (Bonne-Andrea et al., 1986).

1.3.1. Структура НМСВ1

Белок HMGB1 и близкий к нему белок HMGB2 являются наиболее распространенными среди негистоновых белков хроматина. Эти два белка очень схожи по строению и отличаются только длиной С-концевого участка: HMGB1 (≈30 аминокислотных остатков), HMGB2 (≈20 аминокислотных остатков).

НМGB1 теленка состоит из 215 аминокислотных остатков, его молекулярная масса составляет примерно 26.5 кДа (Walker et al., 1980). Сравнение первичных последовательностей HMGB1, выделенных из разных организмов (рис. 11), свидетельствует о высокой консервативности (95-99%) их первичных структур (Leeet al., 1987; Tsuda et al., 1988; Pentecost, Dixon, 1984).

	1-60					1
теленок	MGKGDPKKPR	GKMSSYAFFV	QTCREEHKKK	HPDASVNFSE	FSKKCSERWK	TMSAKEKGKF
крыса	MGKGDPKKPR	GKMSSYAFFV	QTCREEHKKK	HPDASVNFSE	FSKKCSERWK	TMSAKEKGKF
мышь	MGKGDPKKPR	GKMSSYAFFV	QTCREEHKKK	HPDASVNFSE	FSKKCSERWK	TMSAKEKGKF
человек	MGKGDPKKPR	GKMSSYAFFV	QTCREEHKKK	HPDASVNFSE	FSKKCSERWK	TMSAKEKGKF
свинья	MGKGDPKKPR	GKMSSYAFFV	QTCREEHKKK	HPDASVNFSE	FSKKCSERWK	TMSAKEKGKF
	61-120					
теленок	EDMAKADKAR	YEREMKTYIP	PKGETKKKFK	DPNAPKRPPS	AFFLFCSEYR	PKIKGEHPGL
крыса	EDMAKADKAR	YEREMKTYIP	PKGETKKKFK	DPNAPKRPPS	AFFLFCSEYR	PKIKGEHPGL
мышь	EDMAKADKAR	YEREMKTYIP	PKGETKKKFK	DPNAPKRPPL	AFFLFCSEYR	PKIKGEHPGL
человек	EDMAKADKAR	YEREMKTYIP	PKGETKKKFK	DPNAPKRPPS	AFFLFCSEYR	PKIKGEHPGL
свинья	EDMAKADKAR	YEREMKTYIP	PKGETKKKFK	DPNAPKRPPS	AFFLFCSEYR	PKIKGEHPGL
	121-180					
теленок	SIGDVAKKLG	EMWNNTAADD	KQPYEKKAAK	LKEKYEKDIA	AYRAKGKPDA	AKKGVVKAEK
теленок крыса	SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG	EMWNNTAADD EMWNNTAADD	KQPYEKKAAK KQPYEKKAAK	LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA	AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA	AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK
теленок крыса мышь	SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG	EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD	KQPYEKKAAK KQPYEKKAAK KQPYEKKAAK	LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA	AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA	AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK
теленок крыса мышь человек	SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG	EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD	KQPYEKKAAK KQPYEKKAAK KQPYEKKAAK	LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA	AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA	AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK
теленок крыса мышь человек свинья	SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG	EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD	KQPYEKKAAK KQPYEKKAAK KQPYEKKAAK KHPYEKKAAK	LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA	AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA	AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK
теленок крыса мышь человек свинья	SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG 181-215	EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD	KOPYEKKAAK KOPYEKKAAK KOPYEKKAAK KHPYEKKAAK	LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA	AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA <u>AYR</u> AKGKPDA	AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK
теленок крыса мышь человек свинья теленок	SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG 181-215 SKKKKEEEED	EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD EEDEEDEEEE	KOPYEKKAAK KOPYEKKAAK KOPYEKKAAK KOPYEKKAAK KHPYEKKAAK	LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA	AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA <u>AYR</u> AKGKPDA	AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK
теленок крыса мышь человек свинья теленок крыса	SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG 181-215 SKKKKEEEED SKKKKEEEED	EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD EEDEEDEEEE EEDEEDEEEE	KOPYEKKAAK KOPYEKKAAK KOPYEKKAAK KOPYEKKAAK KHPYEKKAAK EDEEDEEEEE EEEEDEDEEEE	LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA DDDDE DDDDE	AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA <u>AYR</u> AKGKPDA	AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK
теленок крыса мышь человек свинья теленок крыса мышь	SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG 181-215 SKKKKEEEDD SKKKKEEEDD SKKKKEEEDD	EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD EEDEEDEEEE EEDEEDEEEE EEDEEDEEEE EEDEED	KOPYEKKAAK KOPYEKKAAK KOPYEKKAAK KOPYEKKAAK KHPYEKKAAK EDEEDEEEE EEEEDEDEEE EEEEDEDEEE	LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA DDDDE DDDDE DDDDE	AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA <u>AYR</u> AKGKPDA	AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK
теленок крыса мышь человек свинья теленок крыса мышь человек	SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG SIGDVAKKLG 181-215 SKKKKEEEDD SKKKKEEEDD SKKKKEEEDD SKKKKEEEDD	EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD EMWNNTAADD EEDEEDEEEE EEDEEDEEEE EEDEEDEEEE EEDEED	KOPYEKKAAK KOPYEKKAAK KOPYEKKAAK KOPYEKKAAK KHPYEKKAAK EDEEDEEEEE EEEEDEDEEE EEEEDEDEEE EDEEDE	LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA LKEKYEKDIA DDDDE DDDDE DDDDE DDDDE DDDDE	AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA AYRAKGKPDA <u>AYR</u> AKGKPDA	AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK AKKGVVKAEK

Рисунок 11. Аминокислотное выравнивание белков HMGB1 теленка, крысы, мыши, свиньи и человека, построенное, основываясь на данных UniProt. Серым цветом отмечены различающиеся аминокислотные остатки, в прямоугольник заключены аминокислотные остатки, входящие в состав HMGB-доменов (9—79; 95—163) и С-концевого участка (186—215).

Основные отличия в первичной структуре этих белков состоят в замене Asp на Glu на C-концевом участке. Как можно убедиться из рисунка 11, HMGB-домены белка (9 — 79; 95 — 163) богаты положительно заряженными аминокислотными остатками и при нейтральных pH в сумме несут заряд +20. С-концевой участок (186 — 215) белка представляет собой непрерывную последовательность Asp и Glu дикарбоновых аминокислот и при физиологических условиях заряжен отрицательно. Таким образом, распределение заряда по цепи белковой молекулы крайне неоднородно (Read et al., 1993).

Как уже упоминалось выше, в третичной структуре HMGB1 можно выделить короткий N-концевой участок, два ДНК-связывающих HMGB-домена (9 — 79, 95 — 163), соединенных между собой небольшим линкером, и С-концевой участок (186 — 215) (Reeck et al., 1982).

Методами ЯМР и рентгеноструктурного анализа отдельных НМGВ-доменов было установлено, что доля α -спиральных участков домена не превышает 80 % (Read et al., 1993; Weir et al., 1993; Hardman et al., 1995; Yingqi et al., 2002). Пространственная организация доменов А и В белка НМGВ1 очень схожа. В структуре каждого из них можно выделить три α -спиральных участка I, II и III, образующих короткое (31 Å) и длинное (36 Å) плечи, расположенные друг относительно друга под углом ~70° — 80° (рис. 12) (Hardman et al., 1995).



Рисунок 12. Схема третичной структуры HMGB-домена белка HMGB1 теленка (Hardman et al., 1995)

Ориентация двух плеч фиксируется с помощью сильных гидрофобных взаимодействий между аминокислотными остатками, расположенными в вершине угла. Дополнительная стабилизация осуществляется при помощи взаимодействий между тремя остатками пролина на N-концевом участке и внутренней поверхности спирали III.

Согласно литературным данным, С-концевой участок белка располагается в полости между двумя ДНК-связывающими доменами (рис. 13), при этом его взаимодействие с аминокислотными остатками аргинина R 72, R 162, лизина K 81, K 164 и изолейцин Ile 158 (Knapp et al., 2004) приводит к стабилизации белковой молекулы (Watson et al., 2007).



Рисунок 13. Пространственная организация белка HMGB1 (Watson et al., 2007).

Наличие взаимодействия С-концевого участка белка с линкером, соединяющим А и В ДНК-связывающие домены, подтверждается экспериментами группы Пашевой с соавторами (Pasheva et al., 2004), изучающей различные посттрансляционные модификации белков, в частности, процесса ацетилирования HMGB1. Было показано, что в случае полноразмерного HMGB1 ацетилирование характеризуется наличием одного сайта в положении лизин К2 на N-конце Адомена, в то время как белок, лишенный С-концевого участка имеет дополнительный сайт ацетилирования лизина К81, расположенный на линкерном участке. Данные о пространственной организации HMGB1, полученные методами рентгеноструктурного анализа и ЯМР несколько разнятся с термодинамическими характеристиками белковой молекулы. При исследовании термодинамического поведения отдельного HMGB-домена (Crane-Robinson et al., 1998), а также термодинамических параметров сиквенс-специфичного взаимодействия HMGBдомена с ДНК на примере белка SOX-5 (Jelesarov et al., 1999; Privalov et al., 1999), было показано, что большое и малое плечи в структуре Г-образного домена ведут себя как две термодинамически различные субъединицы. В результате проведения детальных экспериментов, авторы пришли к выводу, что HMGB-домен данного белка сохраняет целостность третичной структуры только при температурах ниже + 5° С. При более высоких температурах малое плечо домена в значительной степени разупорядочено.

По данным других авторов (Ramstein et al., 1999), изолированные A и B домены белка HMGB1 практически идентичны с точки зрения термодинамики. Они характеризуются одинаковой температурой плавления ~ 42°C и одинаковой шириной перехода «нативное/денатурированное» состояние в 15°C. Однако в полноразмерной молекуле HMGB1 тепловая денатурация доменов A и B происходит неодновременно. При физиологической температуре 37°C A домен белка находится в частично разупорядоченном состоянии, в то время как второй, взаимодействуя с С-концевым участком белка, сохраняет характерную третичную структуру.

1.3.2. Взаимодействие НМGВ1 с ДНК

Положительный заряд НМGВ-домена белка способствует его связыванию как с двунитевой, так и с однонитевой ДНК, различая её структурные особенности (Bustin, 1999; 2001; Travers, Thomas, 2004; Stros 2010). Белок избирательно связывается с отрицательно закрученной суперспиральной ДНК (Sheflin, Spaulding, 1989), раскручивая ее в процессе взаимодействия. По литературным данным за раскручивание двойной спирали ДНК ответственным является неупорядоченный Сконцевой участок белка (Yoshida, Shimura, 1984; Yoshida, 1987). В присутствии обратный топоизомеразы Ι происходит процесс: НМGВ-домен способен стимулировать формирование новых витков в суперспиральной ДНК (Bustin, Reevers, 1996).

Некоторые эксперименты свидетельствуют о предпочтении HMGB-доменов взаимодействовать с AT-богатыми последовательностями (Muller et al., 2001). Основываясь на термодинамических исследованиях, Мюллер с соавторами предложили модель взаимодействия HMGB1 с ДНК, согласно которой в случае ГЦ богатых участков белок связывается с ДНК посредством только B-домена (домен A блокируется C-концевым участком), в то время как в случае взаимодействия HMGB1 с AT-богатыми участками ДНК преобладает кооперативный механизм связывания посредством двух доменов.

Так же было показано, что белки HMGB1/2 предпочтительно связываются с крестообразными структурами (Bianchi et al., 1989; Jung, Lippard, 2003; Wang Q. et al., 2007; Totsingan, Bell, 2013) и необычными структурами ДНК типа 4H (Pohler et al., 1998), являющимися аналогом природных структур типа хиазмы Холлидея. В случае связывания HMGB-домена с 4H ДНК константа диссоциации лежит в пределах между 10^{-8} и 10^{-9} M⁻¹ (Pohler et al., 1998), что на два порядка ниже по сравнению с константой диссоциации 10^{-6} M⁻¹ в случае взаимодействия HMGB1 с ДНК, выделенной из эритроцитов цыплят (Shepelev et al., 1990).

Рассмотрим особенности взаимодействия HMGB-домена с ДНК на примере комплекса с LEF-1 (рис.14), одного из наиболее охарактеризованных ДНК-белковых комплексов данного типа (Read et al., 1995; Murphy et al., 1999; Murphy et al., 2001; Love et al., 1995).



Рисунок 14. Структура комплекса LEF-1/ДНК, полученная методом ЯМР (Love et al., 1995).

В данном комплексе белок изгибает ДНК на угол ~70 — 80° в направлении большой бороздки. Причиной изгиба двойной спирали ДНК в месте связывания является наличие двух сайтов интеркаляции — метионина в положении 11 и частичной интеркаляции аланина в положении 31. Следствием интеркаляции является некоторое раскручивание двойной спирали в месте взаимодействия, что приводит к изменению глубины (становится менее глубокой) и уширению малой бороздки ДНК.

Детальные механизмы изгиба ДНК при взаимодействии с мульти-доменными белками, в том числе и HMGB1/2, с ДНК, пока до конца не изучены. Они может включать как интеркаляцию аминокислотных остатков белков в двойную спираль ДНК, так и что-то другое, например, несимметричное экранирование заряда нуклеиновой кислоты в месте связывания (Bustin, Reevers, 1996).

1.3.3. Функции HMGB1 в клетке

Общепринятым является тот факт, что белки HMGB1 и HMGB2 вовлечены в формирование структуры хроматина, а также принимают участие в различных регуляторных процессах (Bustin, Reevers, 1996; Stros 2007; 2010; Ito et. al., 2014).

На рисунке 16 представлена модель регуляции транскрипции посредством белка HMGB1.



Рисунок 16. Модель регуляции транскрипции посредством HMGB1 белка. А: Взаимодействие HMGB1 с транскрипционным фактором TF1. В: формирование тройного комплекса TF1–HMGB–ДНК. С: Формирование комплекса TF1-TF2-ДНК с высвобождением HMGB1. D: Альтернативный механизм присоединения факторов транскрипции без прямого участия HMGB1 (Stros, 2010).

Согласно этой модели регуляция транскрипции посредством белка HMGB1 проходит в четыре этапа. Первоначально (рис. 16, А) белок HMGB1 связывается своим А-доменом с транскрипционным фактором TF1, а В-доменом с ДНК, изгибая двойную спираль макромолекулы в месте взаимодействия. При этом наблюдается формирование тройного комплекса TF1-HMGB-ДНК (рис. 16, В), который является сигналом присоединения второго фактора транскрипции TF2. Вследствие связывания TF2 и формирования транскрипционного комплекса TF1-TF2-ДНК происходит высвобождение HMGB1 (рис. 16, С). Помимо этого предполагается, что изгиб ДНК в месте связывания HMGB1 сам по себе является мишенью для присоединения транскрипционных факторов без прямого взаимодействия с самим белком (Stros 2010).

Модель функционирования HMGB1 как фактора, оказывающего влияние на доступность конкретных участков ДНК для транскрипционных факторов, представлена на рисунке 17 (Stros, 2010). Линкерный участок между нуклеосомами является местом связывания не только белка HMGB1, но и линкерного гистона H1. Согласно данной модели на первом этапе происходит взаимодействие HMGB1 с H1.

Вероятно, отрицательно заряженный С-конец HMGB1 связывается с положительно заряженным N-концевым участком гистона H1. Вследствие этого нарушается взаимодействие H1 с ДНК и линкерный гистон высвобождается (рис.17).



Рисунок 17. Модель взаимодействия HMGB1 с факторами транскрипции (Stros, 2010).

Связывание HMGB1 с ДНК приводит к изгибу двойной спирали макромолекулы с формированием петельки. Данный вид пространственной укладки ДНК в свою очередь представляет собой сайт связывания ремоделирующего комплекса, осуществляющего передвижение нуклеосомы до тех пор, пока транскрибируемый участок ДНК не станет доступным для транскрипционных факторов. В дальнейшем происходит HMGB1-зависимое связывание факторов транскрипции TF1 и TF2, как описано выше.

Помимо участия в транскрипции, HMGB1/2 играют важную роль в процессах репарации ДНК. Одним из репарационных механизмов клетки является узнавание белками HMGB1/2 изменений структуре В двойной спирали (например, однонитевых И двухнитевых разрывов, межмолекулярных сшивок) И взаимодействие белков с ДНК в области поврежденных участков, что является сигналом для инициации формирования и работы репарационной машины (Lange, Vasques, 2009).

Однако есть экспериментальные данные, которые не укладываются в рамки существующих представлений об архитектурной роли белка в хроматине. Согласно

литературным данным, HMGB1 присутствует как в ядре клетки, так и является внеядерным белком, выполняя при этом функции цитокина (Sobajima et al., 1999; Agnello et al., 2002). Причины высвобождения HMGB1 из ядерного пространства различны. Они могут включать (i) наличие посттрансляционных модификаций, (ii) связывание белка с рецепторами, отвечающими за транспорт белков из ядра в цитоплазму (Bonaldi et al., 2003), (iii) нарушение целостности клетки вследствие пироптоза (Kang, Tang, 2012), апоптоза (Scaffidi et al., 2002) или некроза (Bell et al., 2006). Внеядерный HMGB1 взаимодействует с рядом клеточных рецепторов (например, рецептор конечных продуктов гликозилирования RAGE, Toll-like рецепторы TLR2, TLR4, и TLR9, отвечающие за распознавание консервативных структур микроорганизмов, и др. (Chen et al., 2009; Chiba et al., 2012)) и играет роль сигнальной молекулы, вызывая активацию клеток иммунного ответа. Согласно литературным данным, именно RAGE является основным партнером внеядерного HMGB1 при передаче сигнала к инициации воспалительных реакций и иммунного ответа (Tian et al., 2007; Orlova et al., 2007; Yang et al., 2010).

Ингибирование взаимодействия HMGB1 с рецептором конечных продуктов гликозилирования RAGE подавляет рост опухоли и распространения метастаз в животных моделях рака (Taguchi et al., 2000; Huttunen et al., 2002). Помимо этого негистоновые белки группы HMGB способны известно, что влиять на биологическую активность противоопухолевых препаратов, созданных на основе координационных соединений платины (Jamieson, Lippard, 1999; Jung, Lippard, 2003; Park, Lippard, 2011; 2012). Цисплатин (цис-диаминодихлорплатина (II), цис-ДДП) является одним из самых распространенных и применяемых на сегодняшний день лекарственных препаратов. Считается, что серосодержащие ДНК-связывающие белки являются наиболее вероятными кандидатами на роль переносчика цисплатина и его аналогов к ДНК. Помимо этого известно, HMGB1 взаимодействует с ДНК в местах сшивок, образованных цисплатином (Bruhn et al., 1993; Park, Lippard, 2011; 2012), что приводит к ингибированию репарации аддукта (Chao et al., 1996; Park, Lippard, 2012) и может оказывать влияние на восприимчивость опухоли к химиотерапии.

Кроме того, HMGB1 обладает иммунной активностью, в том числе он был выделен как антибактериальный секрет аденоидов человека (Carrozza, Deluca, 1998).

Согласно исследованиям, антибактериальная активность связана с наличием строго определенной последовательности аминокислотных остатков 201-205 на С-концевом участке белка (Gong et al., 2009).

Многообразие выполняемых белком функций может быть опосредовано несколькими регуляторными механизмами. С одной стороны, функционирование и локализация HMGB1 могут зависеть от введения клеточной системой в структуру белка тех или иных пост-трансляционных модификаций, вследствие чего происходит локальное изменение свойств модифицированных областей полипептидной цепи белка и может оказывать влияние на характер связывания HMGB1 с ДНК и белковыми молекулами.

С другой стороны, некоторые представители HMGB семейства были отнесены к группе «natively unfolded protein» (Uversky, 2002). К этой группе относятся белки, не имеющие определенной структуры в свободном состоянии, но способные структурироваться при связывании с биологическими молекулами. И одной из причин многообразия выполняемых белком функций может являться способность HMGB1 изменять свою структуру в зависимости от объекта связывания.

Данная работа является частью исследования, посвященного изучению взаимосвязи между структурой негистонового хромосомного белка HMGB1 и выполняемыми им функциями. В связи с тем, что в основе могообразия выполняемых белком функций могут лежать как посттрансляционные модификации белка, так и структурные преобразования белковой молекулы в ходе ее взаимодействия с ДНК и белками, целью работы, с одной стороны, являлось выявление пост-трансляционных модификаций схожих по строению «линкерных» белков хроматина HMGB1 и HMGB2, и взаимодействующего с ними гистона H1. С другой – анализ структурных характеристик белка HMGB1 в свободном состоянии и в составе комплексов с ДНК и гистоном H1.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. ВЫДЕЛЕНИЕ «ЛИНКЕРНЫХ» БЕЛКОВ ХРОМАТИНА Н1, НМGВ1 И НМGВ2 2.1.1. Первая экстракция Н1, НМGВ1 и НМGВ2

Тимус вырезали у теленка (мыши, крысы) сразу после забоя, замораживали, по возможности в жидком азоте, и хранили при температуре -20°С.

Все последующие операции с материалом проводили на холоду в охлаждаемом помещении при температуре не выше +4 °C. Изначально осуществляли первичную очистку мяса от излишков жиров и соединительных тканей. После чего его помещали в гомогенизатор, заливали охлажденным до +4 °C раствором 5% хлорной кислоты, точно фиксируя добавленный объем. Объем кислоты выбирали из соображений, чтобы в гомогенизаторе все ножи были закрыты раствором. Чем меньше объем кислоты, тем более концентрированная надосадочная жидкость (в данном случае, раствор белков в $HCIO_4$) получится в итоге. Гомогенизация, в ходе которой происходит разрушение клеточных мембран и высвобождение ядер, проводили в течение 3 минут при скорости 15 000 g.

С целью удаления соединительной ткани и остатков жира полученную массу процеживали через стерильный марлевый фильтр, после чего весь отфильтрованный раствор подвергали центрифугированию в течение 15 минут при +4 °C со скоростью 2000 g. Осевший после центрифугирования осадок (для удобства назовем его «*осадок 1*») сохраняли и использовали в дальнейшем для получения второй экстракции белков H1, HMGB1 и HMGB2. Надосадочный раствор для более тщательной очистки попускали через фильтр-Шотта под давлением, создаваемым водоструйным насосом, собирали и помещали на ночь в морозильную камеру при - 20°C с добавлением тройного объема ацетона, подкисленного до 0,35 М HCl. В этих условиях линкерный гистон H1 выпадает в осадок. На утро надосадочный раствор после центрифугирования (4 500g 20 мин 4 °C) собирали и использовали в дальнейшем для осаждения HMGB1 и HMGB2, а осевший H1 несколько раз промывали от кислоты чистым ацетоном и высушивали.

К слитому после осаждения гистона H1 надосадочному раствору добавляли тройной объем ацетона и помещали в морозильную камеру при температуре -20 °C

ещё на сутки, где происходило осаждение белков HMGB1 и HMGB2. Осевший после центрифугирования (4 500g 20 мин 4 °C) осадок несколько раз промывали от кислоты чистым ацетоном и высушивали - это белки HMGB1/2.

2.1.2. Вторая экстракция H1, HMGB1, HMGB2

К *осадку1* добавляли раствор 5% хлорной кислоты в соотношении примерно 1:1 и инкубировали при + 4 °C при постоянном помешивании до полной экстракции. После чего центрифугировали со скоростью 4 500 g в течение 20 минут. Осевший осадок, назовем его «*осадок 2*» сохраняли и использовали для выделения коровых гистонов. Отфильтрованный раствор содержит белки H1 и HMGB1 и HMGB2 уже в меньшем количестве, чем раствор от первой экстракции. Для осаждения ядерных белков H1, HMGB1 и HMGB2 повторяли вышеописанную в 2.1.1. процедуру.

Разделение близких по аминокислотному составу белков HMGB1 и HMGB2 проводили с помощью FPLC системы. Раствор белков нанесли на колонку 300х20 мм Sephadex C25, предварительно уравновешенную буфером, содержащим 7.5 мМ бората натрия pH 8.8 и 10 мМ меркаптоэтанол. Скорость 1 мл/мин. Для элюции HMGB1 использовали один объем раствора 0.15 M NaCl в том же буфере.

Идентификацию белков и контроль чистоты выделения осуществляли с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии ДДС-Na с использованием ступенчатой буферной системы.
2.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК МЕТОДОМ ЩЕЛОЧНОГО ЛИЗИСА

Выделение плазмидной ДНК pUC19 проводилось методом щелочного лизиса согласно стандартной методике (Мазин, 1990).

Бактериальную колонию, содержащую плазмидную ДНК с селективным геном (геном устойчивости к антибиотику) и хранившуюся на чашках не более 2-3 суток, переносили в 10 мл селективной питательной среды LB (Luria-Bertani) и, интенсивно встряхивая, инкубировали всю ночь при 37° С. Ночную культуру переносили в больший объем селективной питательной среды LB (при разбавлении 1:100) и инкубировали при вышеописанных условиях до достижения величины оптической плотности D₆₀₀ = 0,8 на длине волны 600 нм при 1 см оптического пути. Амплификацию плазмидной ДНК проводили в течение 2—3 часов при 37 °C введением в культуру клеток хлорамфеникола до конечной концентрации 170 мкг/мл. Сбор клеток осуществляли центрифугированием при 2000 g в течение 10 мин при 4° С. На этой стадии, при необходимости, осадок бактериальных клеток можно заморозить при -20 °С и хранить до востребования. Перед лизированием клеток собранный осадок промывали от остатков питательной среды LB путем ресуспендирования в 100-200 мл охлажденного во льду буфера STE с последующим переосаждением клеток центрифугированием (3000 g в течение 10 мин при 4° С). Полученный после промывки осадок ресуспендировали в растворе I, содержащем 50 мМ глюкозы, 25 мМ Tris-HCl (рН 8.0), 10 мМ ЭДТА (рН 8.0), лизоцим в концентрации 5 мг/мл, и инкубировали при комнатной температуре 5—10 минут. Лизис бактериальных клеток осуществляли при помощи обработки клеточной суспензии двойным объемом от объема используемого раствора I (в дальнейшем будем использовать следующее обозначение 2 х V(раствора I)) свежеприготовленного раствора II (0, 2 Н NaOH, 1% ДДС-Na). Инкубирование данной смеси на льду проводили до полного растворения тяжей (порядка 30-50 минут). При последующим добавлении 1,5 х V (раствора I) мл охлажденного во льду 3М ацетата натрия и выдерживании смеси в течение 30 минут при 4° С из раствора клеточного лизата удаляли хромосомную бактериальную ДНК и «обломки» клеток. Надосадочный раствор после центрифугирования (4 000 g в течение 20 минут при 4°

C) содержит плазмидную ДНК, осаждение которой осуществляется 2,5 объемами 96% этанола в течение ночи при -20° С.

Для очистки плазмидной ДНК от РНК осадок после центрифугирования (4 000 g в течение 30 мин при + 4° C) растворяли в мерном количестве дистиллированной воды, после чего добавляли равное количество 9 М LiCl, хорошо перемешивали и оставляли на 16 часов при +4° C. В данных условиях РНК выпадет в осадок. Для осаждения солей лития надосадочную жидкость прогревали при 56° C в течение 10-15 минут с последующим центрифугированием при 8 000 g в течение 30 мин при + 4 °C. После обработки плазмиды хлоридом лития с целью переосаждения выдерживали ДНК в течение ночи при -20 °C в 2,5 объема (от раствора плазмидной ДНК после обработки хлоридом лития) 96 % холодного этанола с 0,1 объема (от раствора плазмидной ДНК после обработки хлоридом лития) 3 М ацетата натрия. К осадку ДНК, полученному после центрифугирования при 4000 g в течение 30 мин при + 4° C, добавляли 1 мл 0,14 М NaCl и 5 мкл РНК-азы в концентрации 10 мг/мл и инкубировалив термостате 1 ч при 37° C.

Для очистки ДНК от белков к полученному раствору добавляли 1 мл фенола и, переворачивали пробирку несколько раз вверх дном, перемешивая ее содержимое. К верхней фракции, полученной после центрифугирования (2000 g, 5 мин при комнатной температуре) добавляли1 ΜЛ смеси фенол-хлороформ (1:1).Перемешивали смесь, переворачивая пробирку несколько раз вверх дном. Для примеси фенола к верхней фракции, полученной очистки ОТ после центрифугирования (2000 g, 5 мин при комнатной температуре) добавляли 1 мл хлороформа. Перемешивали смесь, переворачивая пробирку несколько раз вверх дном. Далее центрифугировали при 2000g 5 мин при комнатной температуре. В случае, если в растворе остался фенол (если ДНК не достаточно хорошо очищена от фенола, на поверхности раствора можно наблюдать образование «маслянистых» пятен), обработку раствором хлороформа проводили повторно.

Переосаждение ДНК из раствора осуществляется ли 2,5 объемами 96% этанола в течение ночи при -20° С с последующим центрифугированием при 4000 g в течение 30 минут при 4° С. После чего осадок ДНК растворяли в ТЕ (10 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 1 мМ ЭДТА (pH 8.0)) и проводили очистку выделенной ДНК на колонке, содержащей Sephadex G50, с последующим переосаждением ДНК раствором 2,5 объемами 96% этанола с 0,1 V объемами 3 М ацетатом натрия при -20° С. Хранение ДНК осуществляли в данном спиртовом растворе при -20° С.

2.3. МЕТОД ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

В составе биополимеров, таких как нуклеиновые кислоты и белки, присутствуют химические группы, несущие в водном растворе электрический заряд. Величина суммарного заряда макромолекулы зависит от ее химического состава и условий окружения, например, кислотности раствора (pH). В зависимости от знака заряда под воздействием электрического поля молекула может перемещаться к катоду или аноду. При этом скорость ее движения в поле единичной напряжённости называется электрофоретической подвижностью и является важной характеристикой вещества.

Большое распространение получил метод разделения макромолекул в гелях. Варьируя внешние условия (пористость и структуру геля, кислотность раствора, введение денатуратов или детергентов) можно разделять молекулы по размерам, пространственной конфигурации и заряду, что делает данный метод одним из основных для качественного и количественного анализа макромолекул (Галь и др., 1982).

2.3.1. Электрофорез в агарозном геле

Агароза является природным линейным полисахаридом, выделенным из морских водорослей. Образование геля после растворения агарозы в электродном буфере происходит за счет формирования сетки водородных связей при ассоциации нитей полисахарида в процессе остывания раствора. Благодаря легкости и быстроте в приготовлении, своей механической прочности, достаточно большому размеру пор и возможности быстрой нативной экстракции материала из агарозных волокон, гели данного типа нашли широкое применение при разделении крупных макромолекул, таких как ДНК.

Важным для оптимального разделения ДНК в агарозном геле является подбор условий, в частности, варьирование концентрации агарозы, влияющей на размер пор, при которых макромолекулы смогут свободно перемещаться в геле. Изменение эффективного радиуса пор в зависимости от концентрации агарозного геля показано на рисунке 18.



Рисунок 18. Изменение эффективного радиуса пор в зависимости от концентрации агарозного геля (Галь и др., 1982). о радиусы, рассчитанные на основании опытов с гемоглобином, а = 3.08 нм; • радиусы, рассчитанные на основании опытов с вирусом южной мозаики фасоли, а = 14.0 нм.

В нашем случае, концентрация агарозы в геле варьировалась от 0,5 до 1 % в зависимости от поставленных задач. В качестве электродного буфера использовался однократный раствор ТАЕ (40 мМ трис (pH=7.6), 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА). Величина напряженности поля составила примерно 5 В/см.

Перед нанесением ДНК-проб в гель, их смешивали с 6-ти кратным буфером для проб, содержащем 50% глицерин и лидирующие красители бромфеноловый синий и ксиленцианол. Рабочая концентрация буфера для проб в готовом для нанесения на гель образце должна быть однократной.

Для проведения гель-электрофореза использовалась как стандартная горизонтальная камера BioRad Mini-Sub Cell GT System, так и камера для вертикального белкового гель-электрофореза BioRad Mini-Protean Tetra Cell с размером спейсоров 1,5 мм с целью достижения лучшего разрешения при документировании полученных результатов.

Для анализа результатов электрофореза, после его завершения, визуализация распределения полос ДНК осуществлялась при помощи обработки геля раствором

бромистого этидия с рабочей концентрацией 1 мкг/мл в течении 20 минут. Данное соединение интеркалирует между парами оснований ДНК, что приводит к возникновению наведенной флуоресценции бромистого этидия в области 290-330 нм. После окрашивания гель помещали в трансиллюминатор ETX-F36.М, где и наблюдали оранжевую флюоресценцию в УФ свете. На этом этапе гель фотографировали при помощи гель-документирующей системы Gel-Imager-2. Анализ полученных фотографий производили в программном пакете, поставляемом с Gel-Imager-2.

2.3.2. Денатурирующий электрофорез в ПААГ по методу Лэммли

Электрофорез в ПААГ (полиакриламидном геле) является наиболее распространенным способом электрофоретического разделения белков. Данный вид геля образован двумя типами мономеров: акриламидом и N'N-метилен-бисакриламидом- которые при воздействии инициатора полимеризации персульфат аммония и катализатора ТЕМЕД-а (N,N,N',N'-тетраэтилметилендиамин) формируют продольные и поперечные сшивки соответственно. Варьируя концентрации гель формирующих реагентов, можно добиться оптимальных размеров пор для решения конкретных экспериментальных задач.

Зависимость среднего размера пор в ПААГ от полной концентрации акриламида Т при различной концентрации N'N-метилен-бис-акриламида С представлена на рис. 19.

Путём изменения состава геля и буферных систем можно осуществлять разделение макромолекул по массе, заряду или по соотношению между их массой и зарядом (Галь и др., 1982).



Рисунок 19. Зависимость среднего размера пор в ПААГ от полной концентрации акриламида Т при различной концентрации N'N-метилен-бис-акриламида С (Галь и др., 1982).

В работе использовался денатурирующий электрофорез в ПААГ в присутствии ДДС-Na с применением двухступенчатой буферной системы (Laemmli, 1970). Характерной особенностью метода является полимеризация сразу двух гелей (концентрирующего и разделяющего) в одной системе, что позволяет добиться лучшего разрешения. Эти гели сильно различаются по pH, молярности буферов, в которых они полимеризуются, и размерам образующихся пор.

Протокол приготовления гелей представлен в таблице 1.

% T	H ₂ Od (мл)	АА/МБА (мл)	*Буфер (мл)	10% ДДС-Na (мл)	10%ПСА (мкл)	ТЕМЕД (мкл)
5%	5,7	1,7	2,5	0,1	30	15
12%	3,4	4,0	2,5	0,1	40	20

* Буфер разделяющего геля 1.5 М Трис-НСІ буфер (рН 8.8)

* Буфер концентрирующего геля 0.5 М Трис-HCl буфер (pH 6.8)

При связывании белковой молекулы с ДДС-Na, содержащем отрицательно заряженный остаток серной кислоты, на каждую пептидную связь приходится 1 молекула детергента, тем самым, собственный заряд белка, по сравнению с приобретенным избыточным отрицательным зарядом, уже не имеет существенного значения. Электростатическое отталкивание плотно расположенных отрицательных групп ДДС-Na приводит к выпрямлению полипептидной цепи, и белковая молекула форму приобретает Таким жёсткого эллипсоида вращения. образом, электрофоретическая подвижность белка в геле (U) в присутствии ДДС-Na становится пропорциональна логарифму молекулярной массы белка (M_r) и описывается следующем уравнением:

$$U = A - B \lg M_r \tag{2}$$

Коэффициенты А и В зависят от условий эксперимента, в том числе от пористости геля и температуры.

Электрофорез проводился в камере BioRad Mini-Protean Tetra Cell для вертикального разделения при стабилизирующей силе тока в 8—10 мА. Толщина геля составляла 1,5 мм. В присутствии ДДС-Na выбор электродного буфера не является критическим параметром, поскольку заряды белковых молекул определяются связанным с ними ДДС-Na. В работе использовался 1х Трисглициновый буфер.

По окончанию электрофореза, чтобы предотвратить диффузию белковых зон и отмыть белок от избытка ДДС-Na, гель помещался в фиксирующий раствор на 40 минут, который представляет из себя смесь спирта и уксусной кислоты (4,5 части H₂O, 4,5 части спирта, 1 часть ЛУК (ледяной уксусной кислоты)). Окрашивание белковых зон в геле производилось с помощью красителя кумасси G250, связывается с положительно заряженными аминокислотными остатками, преимущественно с аргинином. Рабочая концентрация красителя составляла 0,05–0,25 %.

После окрашивания гель помещали в раствор 0,9 Н уксусной кислоты, где в течение нескольких часов проводили отмывание красителя, сорбированного на волокнах геля. При этом, для ускорения процесса, раствор уксусной кислоты

немного подогревали и периодически заменяли на свежий. Чувствительность метода составляет от долей микрограмма до нескольких микрограмм на полосу.

2.3.3. Двухмерный электрофорез

Вследствие перекрывания белковых зон методом одномерного гельэлектрофореза, описанного ранее, практически невозможно фракционировать сложные белковые смеси, полученные, например, при лизировании клеток или представляющие собой биологические жидкости. Для решения данной проблемы используют двумерный электрофорез 2D, в котором белки разделяют по двум различным физико-химическим свойствам. В качестве первого направления обычно используют электрофорез по методу Чокли (Panyim, Chalkley, 1969) в присутствии мочевины или изоэлектрическое фокусирование. Оба этих способа основаны на разделении белков по заряду в ПААГ. Полученный гель без фиксирования и окрашивания используют как начальную точку для второго направления, перпендикулярного первому. Второе направление представляет собой разделение белков в ПААГ согласно их молекулярного веса в присутствии ДДС-Na, как описано выше. Результатом двумерного гель-электрофореза является электрофореграмма, на которой представлено много пятен белков. Идентификация белков, как правило, проводится методом масс-спектрометрии.

2.3.3.1. Первое направление

B работе использовалась методика двумерного электрофореза, адаптированная Ковальским с соавторами (Kowalski, Pałyga, 2012) для разделения качестве первого подфракций гистона Н1. В направления использовался электрофорез в ПААГ в присутствии мочевины при постоянном значении рН геля. В данном случае разделение белков основано на различии в заряде индивидуальных компонентов при конкретных заданных заранее условиях кислотности (pH). Протокол приготовления геля представлен в таблице 2.

40%AA/1.34%MБА	ЛУК	мочевина	10%ПСА	ТЕМЕД
(мл)	(мл)	(г)	(мл)	(мл)
41.25	5.71	52.8	1.34	

Таблица 2. Протокол приготовления геля для первого направления 2D- фореза

Для приготовления геля необходимо смешать АА/МБА, ЛУК, мочевину в пропорциях, указанных в таблице 2. После растворения мочевины довести объем до 110 мл водой и добавить ТЕМЕД и ПСА.

В работе использовалась камера для вертикального электрофореза BioRad PROTEAN II xi Cell 20 с внешним водным контуром для охлаждения. Размер рабочих стекол составлял 16см x20 см с толщиной спейсоров 1,5 мм. Гель после полимеризации, время которой составляло около часа, подвергался префорезу в течение 16-20 часов при величине напряжения, равной 60V. В качестве электродного 0.9H буфера использовалась уксусная кислота. При подключении электрофоретической камеры к работе необходимо учесть тот факт, что заряженные при низких рН белки, такие как гистоны, в положительно электрическом поле мигрируют к катоду. Для приготовления проб раствор, содержащий интересующий белок, смешивали с буфером для проб (8М мочевина, 0.9М уксусная кислота, 10% 28-меркаптоэтанол) и инкубировали при комнатной температуре в течение 8—10 часов. Перед нанесением белковых проб в гель электродный буфер заменялся на свежий.

Гель-электрофорез проводили при рабочем напряжении 100-120V в течение 24 часов, по окончанию которого из геля вырезалась полоска, содержащая интересующий белок и обрабатывалась буфером (100мМ трис-HCl pH=6.8, 10% глицерин, 2,1% ДДС-NA и 2% 2β-меркаптоэтанол) в течение двух часов.

2.3.3.2. Второе направление

Разделение белков во втором направлении осуществлялось в ПААГ в присутствии ДДС-Na согласно методике, описанной выше (см. п. 2.3.2.). Протокол приготовления разделяющего и концентрирующего гелей представлен в таблице 3. **Таблица 3.** Протокол приготовления разделяющего 13,5% и концентрирующего 6% гелей для второго направления 2D- фореза

% T	H ₂ Od	30%АА/0.8%МБА	*Буфер	1% ДДС-	10%ПСА	2% ТЕМЕД	$V_{\rm koh}$
	(мл)	(мл)	(мл)	Na	(мкл)	(мл)	(мл)
				(мл)			
13,5%	22.75	58.5	32,5	13	455	3,25	130,455
6%	8	4,0	5	2	60	1	20.06

* Буфер разделяющего геля 1.5 М Трис-НСІ буфер (рН 8.8)

* Буфер концентрирующего геля 0.5 М Трис-HCl буфер (pH 6.8)

В работе использовалась камера для вертикального электрофореза BioRad PROTEAN II xi Cell 20 с размером рабочих стекол 16см x 20 см и толщиной спейсоров 1,5 мм. После полимеризации системы встык на концентрирующий гель помещалась вырезанная после первого направления и обработанная буфером (100мМ трис-HCl pH=6,8, 10% глицерин, 2,1% ДДС-NA и 2% 2β-меркаптоэтанол) полоска, содержащая интересующий белок. Электрофорез проводился в течение 20 часов при напряжении равном 80V. Окрашивание белковых зон в геле осуществлялось с помощью красителя кумасси G250. Отмывание красителя, сорбированного на волокнах геля, проводили раствором 0,9 Н уксусной кислоты в течение нескольких часов. Документирование полученной электрофореграммы осуществляли при помощи гель-документирующей системы Gel-Imager-2. Анализ пятен, полученных после 2D-фореза, осуществляли методом МАЛДИ массспектрометрии.

2.4. МАЛДИ (MALDI) МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

Одним из наиболее «щадящих» методов ионизации макромолекулы считается способ матрично активированной лазерной десорбции/ионизации МАЛДИ (Karas, Hillenkamp, 1988). Основной принцип данного метода состоит в следующем. Образец, представляющий собой исследуемое вещество в органической матрице, подвергается воздействию лазерного излучения, длина волны которого лежит в диапазоне поглощения используемой матрицы. В процессе изменения внутренней энергии образца происходит разрушение кристаллической решетки матрицы и частичное «испарение» молекул с его поверхности. В этом «газовом облаке» кроме соединений и ионов самой матрицы присутствуют молекулы исследуемого соединения. В следствие особенностей используемого лазерного излучения (длина волны в области поглощения матрицы) молекулы анализируемого соединения переходят в газообразное состояние почти без изменения внутренней энергии, т.е. без изменения их первоначальной структуры. При этом возможно формирование как положительной (при потере электрона, захвата протона или другого положительного иона, например, Na⁺), так и отрицательной (при захвате электрона или потере протона) ионизации. Нейтральные молекулы откачиваются с помощью насосов, а заряженные ионы разгоняются в поле с высоким потенциалом по направлению к детектору. После достижения самым тяжелым ионом анализатора производится новый лазерный импульс, и весь процесс повторяется. Детектор регистрирует время прибытия иона, которое пропорционально отношению его массы (в атомных единицах массы) к заряду (m/z), и интенсивность сигнала от данной группы ионов (Karas, Hillenkamp, 1988).

Случаем графического изображения полученных результатов является массспектр, где по оси абсцисс откладывается величина m/z ионов, а по оси ординат их интенсивности, т.е. их относительное количество.

Метод МАЛДИ используется в основном для определения точного значения молекулярной массы соединения, что в случае тяжелых веществ, например, крупных белков, достаточно трудно в связи с низким разрешением. Однако, получив набор пептидов в ходе ферментативного гидролиза исследуемого соединения (часто трипсинолиза), можно идентифицировать белок, используя базы данных в Интернете. Недостатком такого подхода является сложность анализа белковых смесей (Karas, Hillenkamp, 1988).

В данной работе метод МАЛДИ масс-спектрометрии использовался с целью выявления пост-трансляционных модификаций «линкерных» белков хроматина H1 и HMGB1/2.

Подготовка образцов для масс-спектрометрии осуществлялась следующим образом. Первоначально проводился ферментативный гидролиз белкового препарата трипсином. В случае анализа белкового пятна после гель-электрофореза измельченный на мелкие кусочки фрагмент геля, содержащий интересующий белок, с целью удаления красителя обрабатывался 40% раствором ацетонитрила в 0.1 М NH4HCO3 в течение 15 мин при 37°С. Затем кусочки геля инкубировали на льду в буфере с трипсином (модифицированный трипсин (Promega) в 0.05М NH4HCO3 с концентрацией 15 мкг/мл) в течение 5-10 минут с целью гидратации геля. Гидролиз проводили в течение 4 ч при 37°С. Для остановки реакции гидролиза к раствору добавляли 0.5 % ТФУ в 10 % растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали для получения МАЛДИ-массспектров.

В случае использования сухого белкового препарата (в порошке), белок изначально растворялся в небольшом количестве воды, после чего подвергался ферментативному гидролизу трипсином. Условия гидролиза аналогичны описанным выше.

Для приготовления матрицы, содержащей анализируемое соединение, смешивали 0,6 мкл раствора гидролизованного трипсином белка и 0.3 мкл раствора 2,5-дигидроксибензойной кислоты (Aldrich, 20 мг/мл в 30 % водном ацетонитриле, 0.1% ТФУ). Полученную смесь высушивали на воздухе.

Для регистрации масс-спектров использовался Varian 902-MS MALDI массспектрометр со сверхпроводящим магнитом 9.4 Тесла, оснащенный УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов. Спектры получали в диапазоне масс 500-3000 m/z. Мощность лазерного излучения подбиралась оптимальной для достижения наилучшего разрешения.

Обработка полученных масс-спектров проводилась с помощью программных пакетов ProteinProspector и Mascot, находящихся в свободном доступе в сети интернет (http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest; http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=SQ).

Преимуществом пакета Mascot является быстрый скрининг белков, наиболее соответствующих введенному масс-спектру, из базы данных Human_EST, SwissProt, NCBInr и др. Однако, данной программой сложно анализировать белковые смеси. ProteinProspector по заданной аминокислотной последовательности при выбранных гидролизующего фермента и видах возможных модификаций рассчитывает теоретическое расположение пиков в масс-спектре и более удобна, на наш взгляд, для анализа сложных белковых соединений.

2.5.СПЕКТРОСКОПИЯ КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА

2.5.1. Теория кругового дихроизма

Явление кругового дихроизма (КД) обусловлено различным поглощением лево- и право- поляризованного света в растворах оптически активных веществ. Свет линейной поляризации можно представить как суперпозицию правого и левого лучей круговой поляризации и равной амплитуды. При прохождении среды, имеющей для левого и правого поляризованных лучей одинаковые коэффициенты преломления, но

разные коэффициенты поглощения, эти они будут сохранять единство фаз, но приобретут различные амплитуды. На выходе при суперпозиции прошедших сквозь среду право- и лево- поляризованных лучей мы получаем свет эллиптической поляризации.

Величину кругового дихроизма Δε представляют в виде разницы поглощения лево- и право поляризованного света, которая изменяется в зависимости от длины волны (Велюз и др., 1967):

$$\Delta \mathcal{E} = \mathcal{E}_l - \mathcal{E}_r \,, \tag{3}$$

где индексы *l* и *r* соответствуют лево- и право-поляризованному свету.

Удельной характеристикой КД образца, является молярная эллиптичность [θ], рассчитанная на 1 моль хромофора. Разница поглощений лево-поляризованного и право-поляризованого света связана с молярной эллиптичностью [θ] соотношением:

$$[\theta] = 3298 \cdot \Delta \varepsilon \tag{4}$$

Использование удельных величин, таких как молярная эллиптичность, является предпочтительным и наиболее удобным способом представления спектров КД однокомпонентных растворов, поскольку позволяет напрямую следить за оптической активностью исследуемого хромофора. Задача представляется относительно несложной в том случае, когда спектральные вклады отдельных хромофоров не перекрываются. Тогда на каждом интервале, соответствующем КД отдельного хромофора, спектр КД в пределах данного интервала длин волн можно представить в терминах молярной эллиптичности. В случае, когда наблюдается перекрывание полос КД хромофоров разного типа, задача усложняется. Прежде, чем мы сможем перейти к терминам молярной эллиптичности, необходимо разделить спектральные вклады каждого типа хромофора. Поэтому в данной ситуации построение исходных спектров КД в терминах ΔA представляется единственно достоверным.

Обычно, при прохождении света через оптически активное вещество, кроме кругового дихроизма наблюдается и явление двойного лучепреломления. В основе

этого явления лежит тот факт, что вещество обладает разными коэффициентами преломления для лево- поляризованного и право-поляризованного света, что соответствует распространению в среде этих двух компонент света с разными скоростями. Это различие может быть описано с помощью соотношения Френеля, связывающего угол поворота плоскости поляризации с разностью коэффициентов преломления (Велюз и др., 1967):

$$\alpha = \frac{\pi}{\lambda} \cdot (n_l - n_r), \qquad (5)$$

где α - угол поворота плоскости поляризации, λ – длина волны, проходящего через вещество света, n_l и n_r показатели преломления для лево-поляризованного и право-поляризованного лучей.

2.5.2. Круговой дихроизм белков и пептидов

Различие в поглощении лево- и право- поляризованного света биологическими молекулами обусловлено наличием оптически активных переходов электронов в области собственного поглощения. В спектре КД белков и пептидов выделяют три доступные для наблюдения УФ-области спектра: сильные по интенсивности полосы на 150 нм и 190 нм и слабая полоса на 225 нм. Все они обусловлены возбуждением частично сопряженных π-электронов пептидной связи, однако третий характеризуется меньшей интенсивностью того, является вследствие что разрешенным переходом магнитного диполя. Взаимодействие только для идентичных групп в молекуле может являться причиной расщепления полосы, соответствующей данному переходу. В случае спирального полипептида это приводит к разделению полосы 190-240 нм три пика: на 190, 205 и 225 нм (Рубин, 1999).



Рисунок 20. Реперные спектры КД белков. Зависимость молярной эллиптичности от длины волны. Красная кривая - спектр α-спирали, синяя – β-слоя, желтая – неупорядоченной структуры (Miles, Vallase 2005).

Для анализа спектров КД однокомпонентных растворов белка на практике применяют ряд программ, таких как K2D, DICHRO, CDpro, CONTIN и др., основанных на сравнении получаемых зависимостей с набором реперных спектров, отвечающих той или иной известной структуре белка (рис. 20). Программный анализ по реперным спектрам КД существенно сокращает процедуру обработки и экономит время. В качестве недостатков данного способа анализа данных является то, что база КД белков реперных спектров известной структуры (по методам рентгеноструктурного анализа и ЯМР), используемых программами, невелика порядка 30. Для ряда белков, в частности для гистона H1, в составе которых есть αспиральные, β-складчатые участки и участки неупорядоченной конформации, дает возможность лишь качественно оценить вклад каждой из упомянутых типов укладки полипептидной цепи. Альтернативным методом оценки степени α-спиральности белковых молекул является использование эмпирических формул. Обычно для расчета степени α-спиральности исследуемого белка/пептида, которая связана с молярной эллиптичностью на длине волны 222 нм, можно пользоваться следующим соотношением (Morrow et al., 2000):

$$\%\alpha = \frac{-[\theta]_{222} + 3000}{39000},\tag{6}$$

где [θ]-молярная эллиптичность на длине волны 222 нм.

Сочетание способов обработки при использовании эмпирических формул и программного анализа можно получить более точную оценку вклада каждой из типов структур.

2.5.3. Круговой дихроизм нуклеиновых кислот

Основными особенностями спектров КД ДНК являются электронные переходы в азотистых основаниях. На рисунке 21 представлены спектры КД ДНК, характеризующие А-, В-, С-формы ДНК. Формы ДНК отличаются различной степенью закрученности ее двойной спирали (например, В-форме ДНК на один виток приходится порядка 10 пар нуклеотидов, в А-форме - 11 п.н.) (Зенгер, 1987).

В спектре КД ДНК в В-форме в области более 220 нм наблюдаются два пика, примерно одинаковых по интенсивности. Оба они обусловлены $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами в азотистых основаниях и дают положительную полосу в области 272 нм и отрицательную в области 245 нм. По мере увеличения ионной силы раствора идет "непрерывный" внутри семейственный структурный переход от канонической В-формы к С; когда концентрация соли достигает определенной величины, наблюдается резкий переход С в А или В в А. Такие переходы наблюдаются также при изменении полярности среды (80% этанол).

Изменение конформации двойной спирали ДНК приводит к перераспределению интенсивностей положительной полосы в области 272 нм I₂₇₂ и отрицательной в области 245 нм I₂₄₅. Анализ отношения I₂₇₂ /I₂₄₅ может дать информацию о характере изменения вторичной структуры ДНК.



Рисунок 21. Реперные спектры КД ДНК (Зенгер, 1987)

Изменение ориентации пар нуклеотидов вследствие взаимодействия с белками, например, или другими лигандами, влечет за собой изменение характера $\pi \rightarrow \pi$ перехода в азотистых основаниях, что приводит к изменению интенсивности или смешению максимумов полос КД ДНК.

Условия регистрации спектров КД

Спектры кругового дихроизма ДНК-белковых комплексов в УФ-диапазоне регистрировались на дихрографе Mark V (Jobin Yvon Франция). Использовались цилиндрические кварцевые кюветы с длиной оптического пути 0.5 см и 1 см. Термостатирование кюветы осуществлялось при помощи жидкостного термостата с внешним контуром. Измерение проводилось в диапазоне от 195 до 320 нм с шагом в На каждой длине волны проводилось усреднение сигнала КД по 1 000 1 нм. интегрирования 1 с. измерениям, константой Для устранения С влияния низкочастотных случайных процессов спектры образца записывались 3 раза с последующим усреднением. Сглаживание спектров производилось по методу Савитского-Голея с рамкой сглаживания 15 точек. Анализ данных проводился с помощью пакета Origin 8.1. Калибровку прибора осуществляли с помощью D-10камфосульфоновой кислоты.

Спектры кругового дихроизма белковых комплексов в УФ-диапазоне регистрировались на спектрофотометре кругового дихроизма Jasco J-518 (Япония) в режиме шагового сканирования. Использовали цилиндрические кварцевые кюветы с длиной оптического пути 0.5 см и 1 см. Для устранения влияния низкочастотных случайных процессов использовали тот же подход, как и в предыдущем случае. Сглаживание спектров производилось с использованием программного обеспечения, поставляемого с прибором.

2.6. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ПЛАВЛЕНИЕ ДНК

Процесс денатурации и ренатурации молекулы ДНК в научной среде всегда вызывал большой интерес. Наиболее часто раскручивание нитей ДНК достигается путем термической денатурации молекулы. Однако этот процесс может быть вызван резким изменением кислотности раствора (pH), снижением диэлектрической проницаемости в водной среде с помощью спирта, кетонов и т.п., воздействием на молекулу амидов, мочевины и других денатурирующих соединений (Nishigaki et al., 1984; Wada et al., 1980) и механическим растяжением (Rouzina Bloomfield, 2001). Поскольку в работе использовался метод термической денатурации, остановимся на нем более подробно.

Эксперименты (Saenger, 1984; Stryer, 1995) на разбавленных растворах ДНК свидетельствуют о наличии S-образного перехода от нативного состояния молекулы в денатурированное, который обусловлен разрушением водородной связи между парами оснований ДНК при достижении температуры плавления T_m. Этапы плавление молекулы ДНК в зависимости от изменения температуры представлены на рисунке 22.



Рисунок 22. а) полностью спиральное состояние (низкая температура), б) частично расплавленное состояние (температура в области перехода) в) полностью расплавленное состояние с разошедшимися нитями (Веденов и др., 1971)

Температура плавления, обычно определяемая в максимуме дифференциальной кривой плавления, напрямую зависит от нуклеотидного состава ДНК (зависимость T_m от содержания ГЦ пар в молекуле носит линейный характер ((рис.23)), кислотности среды (pH) (значительно снижается при значениях pH ниже 5 и выше 9), ионного окружения молекулы (Веденов и др., 1971).



Рисунок 23. Зависимость температуры плавления ДНК от ее ГЦ-состава (Веденов и др., 1971)

Обычно ДНК находится в солевом растворе, причем, как правило, используются соли натрия. При снижении ионной силы раствора вследствие уменьшения эффекта экранирующих ионов происходит дестабилизация двойной спирали ДНК из-за возрастания роли ближних электростатических взаимодействий. Зависимость температуры плавления ДНК от ионной силы раствора согласно литературным данным (Веденов и др., 1971) носит логарифмический характер:

$$T_m = 176,0-(2,60-C_{ru}/100)(36,0-7,04 \text{ lg }[\text{Na}^+]),$$
 (7)

где T_m - температура плавления в ⁰С, С_{гц}-содержание ГЦ пар в молекуле в %, [Na⁺] - молекулярная концентрация ионов Na.

В случае изучения плавления ДНК и ДНК белковых комплексов на практике наибольшее распространение получил метод измерения поглощения раствора ДНК в ближней ультрафиолетовой области (в районе 260 нм), основанный на гиперхромном эффекте – увеличении поглощения ДНК при переходе из нативного состояния в денатурированное. Изменение поглощения (в данном случае, его увеличение) отражает изменение электронной конфигурации азотистых оснований вследствие нарушения укладки двойной спирали ДНК.

Пусть А – это наблюдаемый параметр, который меняется в ходе тепловой денатурации, А_{min} и А_{max} его значения, отвечающие полностью спиральному (начальному) и полностью клубкообразному (расплавленному) состояниям ДНК, то величина f, определяемая соотношением (8), дает долю звеньев, находящихся в расплавленном состоянии.

$$f = \frac{\left(A - A_{\min}\right)}{\left(A_{\max} - A_{\min}\right)} \tag{8}$$

Следовательно, доля звеньев, соответствующих спиральному состоянию ДНК, определяется как (1-f).

Чтобы свести влияние ионной силы к минимуму и исключить влияние возможных примесей двухвалентных ионов, в работе была исследована серия комплексов в растворе 0,25 мМ ЭДТА при концентрации NaCl не превышающей 0,2 мМ.

Спектры поглощения в УФ-диапазоне регистрировались на двулучевом Specord-M40 («Karl сканирующем спектрофотометре Zeiss», Германия). Минимальная ошибка измерения пропускания ±0,01%T. достижимая Использовались прямоугольные кварцевые кюветы с оптическим путем в 1 см. Specord-M40 оснащен пельтье-приставкой TSE1 (Karl Zeiss, Германия) для спектрофотометрического плавления. Термостатирование холодного спая элемента Пельтье осуществлялось при помощи водяного термостата ТЖ-ТС-01 (Россия) с внешним контуром. Измерения проводились в кварцевых прямоугольных кюветах с длиной оптического пути в 1см.

Спектры кругового дихроизма в УФ-диапазоне регистрировались на дихрографе Mark V (Jobin Yvon Франция). Для измерения спектров КД ДНКбелковых комплексов и свободных компонентов использовалась цилиндрическая кварцевая кювета с длиной оптического пути 1 см. Термостатирование кюветы осуществлялось при помощи жидкостного термостата с внешним контуром. Измерение проводилось в диапазоне от 195 до 320 нм с шагом в 1 нм. На каждой длине волны проводилось усреднение сигнала КД по 1000 измерениям, с константой интегрирования 1 с. Для устранения влияния низкочастотных случайных процессов спектры образца записывались 3 раза с последующим усреднением. Сглаживание спектров производилось по методу Савитского-Голея с рамкой сглаживания 15 точек. Анализ данных проводился с помощью пакета Origin 8.1.

МАТЕРИАЛЫ

В работе использовали негистоновый хромосомный белок HMGB1 и линкерный гистон H1, выделенные из тимуса теленка согласно описанной выше методике и коммерческий препарат высокомолекулярной ДНК тимуса теленка Sigma (Туре II) без дополнительной очистки. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически по разнице поглощения на 270 нм и 290 нм (A_{270} - A_{290}) после гидролиза в 6% хлорной кислоте. Нативность препарата контролировали по величине гиперхромного эффекта при денатурации (Spirin, 1958). Молярные коэффициенты экстинкции ДНК, использованной в работе находились в пределах 6000 < $\varepsilon_{260}(P)$ < 7000.

Плазмидная ДНК pUC19 (2686 п.о.), используемая в работе, была выделена по описанной выше методике из бактериальных клеток *E.coli* HB 101, содержащих данную плазмиду. Качество выделенной ДНК определяли спектрофотометрически: количество белковых примесей определяли с помощью отношения D_{260}/D_{230} , которое не должно превышать 2,3-2,5 и отношения D_{260}/D_{280} , предельные значения которого 1,8-2,0. Концентрация pUC19 определяли спектрофотометрически с использованием спектрофотометра NanoDrop No.

Концентрацию белков определяли спектрофотометрически по коэффициенту экстинкции на длине волны 280 нм, рассчитанному согласно методике, предложенной Пейсом с соавторами (Расе et al., 1995). Растворы ДНК-белковых и белок-белковых комплексов готовили прямым смешиванием путем сливания исходных компонентов в равных объемах. Ионная сила раствора для белковых систем составляла 3 мМ NaCl. Исследование структуры ДНК-белковых комплексов производили в растворах различных ионных сил, для чего были выбраны концентрации от 3 мМ до 150 мМ NaCl с шагом в 20 мМ. Весовое соотношение г (W/W) белок/ДНК выбирали в диапазоне $0 \le r \le 1$.

глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Проверку чистоты выделенных белковых препаратов (белков HMGB1 и H1) проводили методом гель-электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфат натрия с использованием буферной ступенчатой системы (Laemmli, 1970). В качестве маркера использовался 4H: смесь коровых гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Полученная электрофореграмма представлена на рисунке 24, А.



Рисунок 24. А: Гель-электрофорез белков в ПААГ в присутствии ДДС-Na. На дорожках представлены: 1 – белок HMGB1, 2 – гистон H1, 3 – маркер 4H. Б: Гель-электрофорез в агарозе плазмидной ДНК pUC19 на разных стадиях очистки. На

В. Гель-электрофорез в агарозе плазмидной ДНК рОС19 на разных стадиях очистки. На дорожках представлены: 1 – маркер GenRuler DNA 1kb, 2 – пустая, 3 – рUC19 без очистки, 4 – рUC19 после обработки LiCl, 5 – после очистки от солей LiCl, 6 – после очистки на колонке Sepxadex G 50, 7 – рUC19, использованная в работе, 8 – рUC19, обработанная рестриктазой HindIII.

На рисунке 24, А представлен результат гель-электрофореза белков HMGB1 и H1 в ПААГ в присутствии ДДС-Na. Белок HMGB1 и линкерный гистон H1 на в геле характеризуются четкой узкой полосой и не содержат примеси коровых гистонов, которая могла присутствовать при выделении белков. Эти данные свидетельствует о достаточной для нашего эксперимента чистоте белка.

Выделенная плазмидная ДНК pUC19 (рис. 24, Б: дорожка 7) находится преимущественно с суперскрученном состоянии и не содержит примеси РНК. Присутствие примесей белкового характера проверяли спектрофотометрически по

отношениям D₂₆₀/D₂₃₀ и D₂₆₀/D₂₈₀, значения которых попали в допустимый интервал (см. раздел Материалы и Методы).

3.1. Исследование вторичной структуры и термодинамической стабильности полноразмерного природного белка HMGB1 в свободном состоянии.

Согласно ЯМР в растворе отдельных HMGB1 (Read et al., 1993). теоретическое значение доли α-спиральных участков HMGB-домена составляет 80%, таким образом в пересчете на полноразмерную молекулу белка — 60-70% В то же время согласно данным термодинамики, при физиологических температурах доля α-спиральных участков HMGB1 должна быть в двое меньше, порядка 30-35% (Privalov et al., 1999). Как можно убедиться, литературные данные о пространственной организации HMGB1, основанные на результатах рентгеноструктурного анализа и ЯМР, несколько разнятся с данными термодинамики. Используя метод кругового дихроизма мы проследили за изменениями вторичной структуры полноразмерной молекулы HMGB1 в зависимости от температуры.

Спектр HMGB1 (рис. 25, A) при температуре 20 °C в растворе 3мМ NaCl представляет собой две перекрывающиеся отрицательные полосы с максимумами в области 205 и 222 нм, вызванные электронными переходами $\pi \rightarrow \pi^*$ и $n \rightarrow \pi^*$ в пептидной связи. Образующийся при перекрывании полос профиль спектра КД характерен для полипептидов, находящихся в частично α -спиральной конформации (Greenfield, Fasman, 1969). Степень α -спиральности белка HMGB1 в данных условиях может быть оценена как 25 ± 5 %, где погрешность определяется оценкой дисперсии величины КД на длине волны 222 нм.

Кривая плавления f HMGB1 и ее первая производная df/dT, построенные на основе зависимости KД HMGB1 от температуры на 222 нм, представлены на вкладке рисунка 25, А. Согласно полученным нами данным, температура плавления молекулы HMGB1 составляет (42,0 ±0,5) °C, ширина интервала плавления – порядка 20 °C (Chikhirzhina, Starkova et al., 2014).



Рисунок 25. А: Спектры КД и кривые плавления f и df/dT HMGB1 в 3мM NaCl. Б: Зависимость оптической плотности раствора HMGB1 от длины волны. * отмечены спектры, соответствующие пробам после тепловой денатурации. 1 - 20 мкг/мл, 2 – 25 мкг/мл, 3–30 мкг/мл, 4 – 40 мкг/мл, 5 – 60 мкг/мл.

Увеличение оптической плотности раствора HMGB1 после термической денатурации в области отсутствия полос собственного поглощения (300 нм) (рис. 25, Б) свидетельствует о возникновении в системе рассеяния. Причиной появления рассеяния в процессе термического разворачивания белковой молекулы, вероятно, является формирование белковых агрегатов вследствие «ошибочных» межбелковых взаимодействий (Jaenicke, 1995). По все видимости, именно агрегация HMGB1 при высоких температурах является причиной того, что в условиях эксперимента, конформационный переход HMGB1 из нативного в неупорядоченное состояние является необратимым (рис. 25, А).

При увеличении концентрации растворов HMGB1 вследствие возрастания вероятности межмолекулярных взаимодействий агрегация белка в ходе тепловой денатурации начинается при более низких температурах.

В дальнейшем, чтобы исключить вклад белок-белковых взаимодействий в спектр поглощения ДНК-белкового комплекса, при исследовании термодинамических характеристик мы ограничились областью концентраций HMGB1, не превышающих 20 мкг/мл. В выбранном диапазоне концентраций не наблюдается ни проявления в спектре поглощения HMGB1 структурных изменений белка, ни появления рассеяния. Таким образом, при CHMGB1 ≤ 20 мкг/мл на 260 нм мы сможем разделить вклады ДНК и белка в кривую плавления комплекса и следить за изменением термодинамических характеристик ДНК при связывании с HMGB1.

3.2. Анализ вторичной структуры белка HMGB1 в свободном состоянии и при взаимодействии с ДНК.

Методом первичного анализа системы HMGB1-ДНК был выбран метод электрофореза в агарозном геле, позволяющий быстро провести качественную оценку характера изменения размеров комплекса при увеличении весового соотношения *r* (W/W) белок/ДНК в пробе. В случае исследования комплекса HMGB1 с высокомолекулярной ДНК тимуса теленка концентрация агарозы составляла 0,5% на 1х ТАЕ. Использовалась стандартная горизонтальная камера BioRad Sub cell GT. В случае исследования комплекса HMGB1 с плазмидной ДНК концентрация агарозы составляла 1% на 1х ТАЕ. Использовалась вертикальная камера BioRad Mini-protaen Tetra с толщиной спейсоров 1,5 мм. Полученные электрофореграммы представлены на рисунке 26.

А

1 2 3 4 5 6 7 8



Б

Рисунок 26. Гель-ретардация комплексов HMGB1 с ДНК.

А: Гель-ретардация комплексов HMGB1 с высокомолекулярной ДНК тимуса теленка. 1 – ДНК, 2-8 – комплексы ДНК тимуса теленка с HMGB1 шаг по *r* в 0,1. Б: Гель-ретардация комплексов HMGB1pUC19 (от r = 0, до r = 0,6) 1 – pUC19, 2-7 - комплексы pUC19-HMGB1 шаг по r в 0,05, с 7-10 - комплексы pUC19-HMGB1 шаг по r = 0,1.

По результатам экспериментов нами были рассчитаны относительные подвижности U ДНК в комплексе:

$$U = L_{\kappa}/L_{\text{ДHK}},\tag{8}$$

где L_{κ} – длина пробега ДНК в комплексе, $L_{\text{ДНК}}$ – длина пробега свободной ДНК в том же геле.

Средние значения полученных величин представлены на рисунке 27. Анализ электрофоретической подвижности ДНК-белковых комплексов показал, что наибольшей подвижностью в геле характеризуются комплексы с суперспиральной и релаксированной формами ДНК. Зависимость электрофоретической подвижности комплексов HMGB1 с линейной формой pUC19 и с ДНК, выделенной из тимуса теленка, носит схожий характер.



Рисунок 27. Зависимость электрофоретической подвижности U плазмидной и высокомолекулярной ДНК в комплексе с HMGB1 относительно подвижности свободной ДНК от r (W/W).

Стоит отметить, что электрофоретическая подвижность комплекса белка с любой из исследованных нами форм ДНК при r > 0,4 практически перестает изменяться, что может свидетельствовать либо о прекращении процесса связывания HMGB1 с ДНК, либо об изменении характера связывания (Родионова (Старкова) Т.Ю. и др., 2010).

При исследовании ДНК-НМGB1 комплекса спектральными методами особое внимание уделялось изучению изменений вторичной структуры молекул белка и ДНК при их взаимодействии. Были получены спектры КД и поглощения в ультрафиолетовой (УФ) области ДНК-НМGB1 комплекса в зависимости от весового соотношения белок/ДНК *r*. На рис. 28, А представлены характерные спектры КД ДНК тимуса теленка (кривая 1), КД белка (кривая 2), и их комплексов (кривые 3— 17) в растворах 15 мМ NaCl.

Спектр КД свободного HMGB1, как уже упоминалось ранее, представляет собой две перекрывающиеся отрицательные полосы с максимумами в области 205 и 222 нм. Профиль спектра характерен для белков, находящихся в частично α -спиральной конформации. Согласно соотношению (6) степень α -спиральности белка HMGB1 в данных условиях может быть оценена как 30 ± 5 %, где погрешность определяется оценкой дисперсии величины КД на длине волны 222 нм (КД₂₂₂) (Родионова (Старкова) и др., 2010; Chikhirzhina, Starkova (Rodionova) et al., 2014).

Спектр КД ДНК, как в случае высокомолекулярной ДНК тимуса теленка (рис.28, А, *кривая 1*), так и в случае плазмидной ДНК pUC19 (рис. 28, Б), представлен двумя интенсивными (275(+)/245(-)) нм и двумя малоинтенсивными (220(+)/210(-) нм полосами разного знака. Образующийся профиль спектра КД характерен для ДНК в В-форме.



Рисунок 28. Спектры КД комплексов HMGB1 с ДНК. А: Спектры кругового дихроизма комплексов HMGB1 с высокомолекулярной ДНК тимуса теленка в 15мM NaCl. 1 – ДНК, $C_{днк} = 60$ мкг/мл; 2 – HMGB1, $C_{HMGB1} = 48$ мкг/мл, 3 – 17 ДНК-белковые комплексы от r = 0,05 до r = 0,8 с шагом 0,05. Б: Спектры кругового дихроизма комплексов HMGB1 с плазмидной ДНК рUC19.

Одновременное присутствие в растворе ДНК и белка HMGB1 приводит к увеличению интенсивности белковой полосы в интервале 200—240 нм и изменению КД ДНК в области 275 нм. Как можно заметить из рисунка, полоса регистрируемого КД белка HMGB1 в коротковолновой части спектра (λ < 250 нм) частично перекрывается со спектром ДНК. Для анализа спектров КД ДНК-белкового

комплекса изначально необходимо разделить спектральные вклады каждого типа хромофоров.

Поскольку спектр КД комплекса ДНК-НМGВ1 в области 260—300 нм, вследствие отсутствия белковой полосы в этой области, обусловлен вкладом хромофоров только одного вида (азотистых оснований ДНК), спектральные изменения в данном диапазоне могут быть соотнесены с изменениями конформации ДНК при связывании с белком (Родионова (Старкова) и др., 2009).

На рис. 29 представлена зависимость ΔA_{270} от r (W/W). Экспериментальную кривую можно разбить на два участка. Первый при достаточно низком содержанием белка в растворе (r < 0,4) характеризуется незначительными изменениями в структуре ДНК.



Рисунок 29. Зависимость ΔA_{270} от *r* (W/W). С_{днк теленка} = 60 мкг/мл, С_{рUC19} = 60 мкг/мл. Длина оптического пути составляла 0,5 см. Концентрация ДНК в растворе поддерживалась постоянной.

Условие избытка возможных мест связывания HMGB1 на ДНК дает право предположить, что белок при r < 0,4 находится преимущественно в связанном состоянии. Согласно литературным данным (Masse et al., 2002) в месте связывания HMGB1 происходит локальное изменение в структуре лишь трех азотистых оснований. При r = 0,4 при условии полного связывания молекул белка в растворе, одна молекула белка приходится на 80 - 100 п.о. ДНК, и, следовательно, только 3 из этих 80 - 100 п.о. (т.е. не более 4%) изменят свою структуру. Эти редкие локальные изменения, конечно, вносят свой вклад в спектр, однако на фоне суммарного эффекта

проявляются незначительно (Родионова (Старкова) и др., 2009). Дальнейшее увеличение содержания белка (r > 0,4) приводит к резкому изменению интенсивности КД ДНК в обоих случаях, что, по-видимому, связано с появлением белок-белковых взаимодействий близко расположенных HMGB1 молекул (Чихиржина и др., 1998; Чихиржина и др. 2002; Chikhirzhina et al., 2010; 2012). Однако стоит отметить, что в диапазоне $0 \le r \le 0,6$ спектральные изменения в структуре ДНК не превышают 10%.

В коротковолновой части спектра из-за перекрывания интенсивной αспиральной полосы КД HMGB1 и пары малоинтенсивных полос КД ДНК спектральные изменения уже нельзя отождествить с изменениями в структуре только белка или только ДНК. В связи с тем, что регистрируемые изменения в структуре ДНК при связывании с HMGB1 в области 275 нм не превышают 10% (рис. 30), при оценке α-спиральности белка в комплексе с ДНК на длине волны 222 нм ими можно пренебречь в силу близости КД ДНК к нулю.

Количественный анализ спектров комплексов КД в области длин волн $\lambda < 210$ нм затруднительный в связи с быстрым ростом спектрального шума в коротковолновой области, который обусловлен увеличением оптической плотности растворов с ростом концентрации белка в пробе. Тем не менее, пользуясь соотношением (6) можно оценить изменения вторичной структуры белка при связывании с ДНК. Для этого необходимо вычесть из спектров комплексов спектральный вклад ДНК, пользуясь допущением малости его изменения. После чего, оценить молярную эллиптичность [θ]₂₂₂ и, как следствие, процент α -спиральности (рис. 30). В связи с полным совпадением зависимости доли α -спиральных участков в молекуле HMGB1 в комплексе с рUC19 с аналогичной зависимостью для белка в свободном состоянии, можно сделать вывод об отсутствии регистрируемых структурных изменений HMGB1 в данной системе.

Зависимость α -спиральности HMGB1 от r в комплексе с высокомолекулярной ДНК тимуса теленка демонстрирует достаточно быстрое падение до уровня ~35 % при увеличении r от 0 до 0,3, после чего асимптотически приближается к величине около 30 %, соответствующей степени α -спиральности свободного белка в данных условиях. Величина α -спиральности белка полностью в связанном состоянии

получена путём экстраполяции зависимости α(r) к нулевым значениям r и оцененная как ~54 %.



Рисунок 30. Зависимость доли α -спиральных участков в молекуле HMGB1 от r (W/W).

Рассчитанная по описанному выше алгоритму (соотношение 6) степень αспиральности HMGB1 в комплексе с высокомолекулярной ДНК представляет собой долю пептидных связей, принимающих участие в формировании α-спиральных участков белков и может быть выражена следующим соотношением:

$$\alpha = \frac{N_{\alpha}}{N_{T}}, \qquad (9)$$

где N_{α} — число пептидных связей, в составе α -спиралей, а N_T — полное число пептидных связей, имеющихся в растворе.

Поскольку связывание HMGB1 с ДНК носит равновесный характер, можно предположить, что в растворе одновременно присутствуют как свободные, так и связанные с ДНК белковые молекулы. Согласно полученным данным, эти два типа белковых молекул структурно отличаются друг от друга. Долю связанных в растворе молекул белка v можно представить следующим выражением:

$$\nu = \frac{\alpha - \alpha^0}{\alpha^* - \alpha^0} \tag{10}$$

где α – экспериментальные значения степени α -спиральности HMGB1 в комплексе с высокомолекулярной ДНК тимуса теленка, α^0 – величина α -спиральности, полученная по спектрам КД растворов свободного белка; α^* - величина α -спиральности белка полностью в связанном состоянии, оцененная как ~54 % путём экстраполяции зависимости $\alpha(\mathbf{r})$ к нулевым значениям \mathbf{r} . Подробный вывод формулы для расчета v представлен в статье Поляничко с соавторами (Поляничко, Родионова (Старкова) и др., 2011)

Пользуясь приведённым выше соотношением (10), мы оценили долю связанного белка при различных соотношениях белок/ДНК в пробе. Результаты вычислений приведены в таблице 4.

Таблица 4. Наблюдаемая степень α -спиральности (α) и доля связанного белка HMGB1 в растворе (ν), соответствующие различным весовым соотношениям белок/ДНК в системе (r).

<i>r</i> , w/w	α, %	ν, %
0.12	39	39
0.16	39	38
0.22	38	22
0.25	35	19
0.29	35	13
0.34	34	10
0.39	32	9
0.45	32	6
0.52	31	5
0.56	29	3
0.6	28	5
0.64	29	4

В силу ограничений, упомянутых выше, данная оценка носит лишь приблизительный характер. Нельзя исключать возможность того, что в растворе

помимо ДНК-белковых взаимодействий возможны взаимодействия и между молекулами белка. Однако, наблюдаемая α-спиральность (конформация) участвующих во взаимодействии белковых молекул не изменяется по сравнению с тем, что мы наблюдаем в отсутствие ДНК, где белок-белковые взаимодействия также могут иметь место, что и дает нам возможность данную оценку проводить.

Аналогичный анализ спектров КД ДНК-белковых комплексов в области 210-240 нм был проведен для комплексов ДНК-НМGВ1 в условиях различных ионных сил (от 5 мМ NaCl до 150 мМ NaCl с шагом в 20 мМ). При увеличении ионной силы раствора изменение вторичной структуры «связанного» с высокомолекулярной ДНК тимуса теленка HMGB1 прекращается вплоть до практически полного исчезновения при достижении ионной силы 150 мМ NaCl. Принимая во внимание тот факт, что взаимодействие белка с ДНК сопровождается изменением вторичной структуры HMGB1, его отсутствие свидетельствует либо об отсутствии процесса связывания с ДНК, либо об изменении характера взаимодействия в условиях высокой ионной силы, не сопровождающегося изменением вторичной структуры (Родионова (Старкова) и др., 2009).

3.3. Исследование термостабильности высокомолекулярной ДНК тимуса теленка в комплексе с негистоновым белком хроматина HMGB1

Зависимость температуры плавления ДНК от ионной силы раствора согласно литературным данным (Веденов и др., 1971) и данным, полученным нами (Родионова (Старкова) и др., 2009) носит логарифмический характер. Уменьшение ионной силы раствора приводит к дестабилизации двойной спирали, что на кривых плавления проявляется в сдвиге температуры плавления ДНК в область низких температур (рис. 31).



Рисунок 31. Зависимость температуры плавления ДНК от ионной силы раствора.

Плавление участков ДНК, связанных с белком, согласно литературным данным, так же характеризуется смещением температуры плавления в область высоких температур. Для того, чтобы проанализировать термодинамические параметры ДНК, как в свободном, так и связанном с HMGB1 состоянии, ионная сила раствора сводилась к минимуму. Чтобы исключить воздействие возможных примесей двухвалентных ионов, при изучении термодинамических характеристик связывания HMGB1 с ДНК нами была исследована серия комплексов в растворе 0,25 мМ ЭДТА при концентрации NaC1 не превышающей 0,2 мМ.

В случае изучения плавления ДНК и ДНК белковых комплексов на практике наибольшее распространение получил метод измерения поглощения раствора ДНК в ближней ультрафиолетовой области (260 нм), основанный на гиперхромном эффекте – увеличении поглощения ДНК при переходе из нативного в денатурированное состояние.

Конформационный переход из нативного в денатурированное ДНК как в свободном состоянии, так и при взаимодействии HMGB1, регистрировали при 260 нм спектрофотометрическим методом. Показано, что дифференциальная кривая плавления ДНК df/dT в свободном состоянии характеризуется наличием одного

максимума Т'_m = (45,0 ± 0,5)°С (рис.32, *кривая 1*), что соответствует температуре плавления свободной ДНК в растворе.



Рисунок 32. Кривая плавления комплекса и ее первая производная комплексов ДНК-НМGВ1 от температуры. Концентрация ДНК в пробе составляет 30 мкг/мл. Длина оптического пути 1 см. 1 - ДНК; 2 - r = 0,15; 3 - r = 0,5.

Особенностью дифференциальной кривой комплекса ДНК-НМGВ1 является наличием двух максимумов. Положение первого максимума на оси температуры совпадает с областью плавления ДНК в свободном состоянии $T'_m = (45,0 \pm 0,5)^{\circ}$ С и соответствует плавлению участков макромолекулы, не связанных с белком. Тогда как второй максимум в области $T''_m = (62,0 \pm 0,5)^{\circ}$ соотносится с плавлением участков ДНК, связанных с белком (Chikhirzhina, Starkova (Rodionova) et al., 2014).

Суммарная площадь под дифференциальной кривой плавления комплексов остается неизменной при всех исследованных соотношениях белок/ДНК в растворе. В связи с этим, наблюдаемое перераспределение интенсивности пиков, на наш взгляд, характеризует уменьшение количества свободной ДНК и увеличение - ДНК, связанной с белком.

На основе полученных данных мы рассчитали долю п.о., вовлечённых в связывание с белком, размер участка связывания на ДНК, оценили молярное соотношение R белок/ДНК_{связ} в растворе (табл. 5). Согласно проведенным, расчетам размер участка связывания HMGB1 на ДНК при r = 0,15 составил 13 п.о, что неплохо согласуется с литературными данными.

Таблица 5. Термодинамические параметры комплекса ДНК-НМGВ1 в зависимости от *r* в растворе 0,25 мМ ЭДТА

r	Гиперхромный	Суммарная	Доля	R	Участок
(w/w)	эффект, %	площадь под	связанной	(моль/моль)	связывания,
		кривой	ДНК, %		П.О.
0,00	26±0,5	1,00±0,01	0,1±0,1	0,00±0,01	
0,15	24±0,5	0,99±0,01	4,7±0,1	0,08±0,01	13
0,25	22±0,5	0,99±0,01	6,9±0,1	0,09±0,01	11
0,40	20±0,5	0,99±0,01	10,1±0,1	0,10±0,01	10
0,50	19±0,5	0,97±0,01	12,3±0,1	0,10±0,01	9

Таким образом нами показано, что несмотря на деформацию двойной спирали в месте связывания HMGB1, взаимодействие данного белка с ДНК приводит к смещению ее температуры плавления в составе комплекса на 20° С в область высоких температур. Образование в составе ДНК при взаимодействия с HMGB1 участков с $T''_m = (62,5 \pm 0,5)^{\circ}$ С, указывает на стабилизацию ДНК в комплексе.

3.4. Сравнительный анализ вторичной структуры белка HMGB1 в свободном состоянии и при взаимодействии с гистоном H1

В связи с тем, что участок ДНК между нуклеосомами является местом связывания как гистона H1, так и негистонового хромосомного белка HMGB1 в литературе еще с 1980-х годов обсуждается вопрос о существовании комплекса между этими белками (Kohlstaedt et al., 1987). Авторами было показано, что при физиологических условиях (150мМ NaCl, pH 7) белок HMGB1 оказывает влияние на формирование комплекса линкерного гистона H1 с ДНК, из чего сделан вывод о возможном взаимодействии между белками. Несколько позже этим же коллективом авторов (Kohlstaedt, Cole, 1994) были исследованы параметры образующегося комплекса. Было показано, что при pH 6,0 с 1 молекулой H1 взаимодействует 4

молекулы HMGB1 с константой диссоциации 3,4 х 10⁻⁸ М. Однако при рН 7.5 с 1 молекулой гистона Н1 связывается уже 1 молекула HMGB1 при этом константа диссоциации меньше чем 10⁻⁹ М.

Вероятность формирования H1-HMGB1 комплекса in vitro обсуждается и другими авторами (Zlatanova, Leuba 2004., Фонин и др., 2010, Polyanichko, Chikhirzina, 2013; Polyanichko et al., 2013). Некоторые их них полагают, что H1 и HMGB1 при связывании с ДНК действуют сообща, тогда, как другие исключают возможность совместного одновременного связывания двух белков на ДНК.

Согласно полученным в нашей лаборатории данным, частичная экранировка фосфатных групп двойной спирали ДНК при связывании макромолекулы с линкерным гистоном H1 может способствовать взаимодействию HMGB1 с ДНК. Анализ структуры ДНК-H1-HMGB1 комплекса свидетельствует в пользу наличия взаимодействия H1 с отрицательно заряженным С-концевым участком HMGB1 (Polyanichko, Chikhirzina, 2013; Polyanichko et al., 2013). Методом атомно-силовой микроскопии было показано, что при совместном воздействии на ДНК гистона H1 и HMGB1 формируются тяжеподобные надмолекулярные структуры (Polyanichko, Chikhirzina, 2012; Chikhirzina et al., 2012; Polyanichko, Chikhirzina, 2013; Polyanichko et al., 2013).

Первичный анализ системы H1-HMGB1 проводился методом нативного электрофореза в ПААГ. Приготовление системы для нативного электрофореза (pH 6,8) осуществляли согласно методике, описанной в главе Материалы и методы, за исключением присутствия во всех используемых растворах ДДС-Na. В данной системе ДДС-Na заменялся эквивалентным по объему количеством воды.

В связи с тем, что при данном значении pH белки HMGB1 и H1 несут заряд разного знака (-4,5 и +54 соответственно), разделение HMGB1-H1 комплексов осуществлялось одновременно в двух одинаковых электрофоретических камерах при разном направлении электрического тока. Полученная электрофореграмма представлена на рисунке 33.


Рисунок 33. Электрофореграмма комплексов HMGB1-H1 в нативных условиях. при обратном направлении тока (А) и прямом (Б). 1-чистый H1, 2 – R=9, 3-R=4, 4-R=3.2, 5-R=1, 5, 6-R=1, 7-R=0.7, 8-R=0,4, 9-R=0,25, 10-R=0.1, 11-чистый HMGB1.

Согласно полученным данным, электрофоретическая подвижность комплексов разных соотношениях R HMGB1/H1 отличается при OT электрофоретической подвижности свободных компонентов. Данное обстоятельство свидетельствует в пользу возможности формирования H1-HMGB1 комплекса без введения химических межмолекулярных сшивок. Поскольку разделение проводилось в нативных условиях без использования денатурирующих реагентов, в данной системе количественную оценку проводить крайне сложно. Связано это с тем, что величина электрофоретической подвижности, как комплекса, так и белков в свободном состоянии, зависит от размера пор геля, заряда, конфигурации макромолекулы одновременно.

Ланные. характеризующие структурную организацию H1-HMGB1 комплекса, в литературе практически отсутствуют. В работе Като с соавторами (Cato et al., 2008) с использованием химических сшивок было показано, что in vitro взаимодействие HMGB1 с H1 при молярном соотношении белков 1:1 наиболее вероятно через С-концевой и N-концевой участки белков соответственно (рис. 34), что согласуется с исследованиями других авторов (Polyanichko, Chikhirzina, 2013; Polyanichko et al., 2013). Поскольку для исследования возможных участков взаимодействия между белками была введена ковалентная межмолекулярная сшивка, то предложенный вариант пространственной ориентации H1 и HMGB1 взаимодействия. рассматривать только как некую модель Однако, можно полученные Като с соавторами данные можно использовать как стартовую точку

выборе направления исследования, в частности, при поиска механизмов взаимодействия между белками, которые могут включать как различные посттрансляционные модификации белков H1 и HMGB1 на N- и C- участках соответственно, структуре белковых так И изменения В молекул при комплексообразовании.



Рисунок 34. Модель взаимодействия линкерного гистона H1 (и H5 у птиц) с негистоновым гистоном HMGB1 (Cato et al., 2008).

Согласно описанной выше модели взаимодействие HMGB1 с H1, как в с случае формирования ДНК-HMGB1 комплекса, требует перехода белка из свернутого в активно-функциональное (развернутое) состояние, что может сопровождаться изменением его вторичной структуры.

Исследование вторичной структуры белков H1 и HMGB1 в свобдном состоянии и в составе H1-HMGB1 комплекса проводили методом кругового дихроизма в УФ-диапазоне на спектрофотометре кругового дихроизма Jasco J- 518 (Япония) в режиме шагового сканирования. В работе использовали цилиндрические кварцевые кюветы с длиной оптического пути 0,5 см и 1 см.

При исследовании вторичной структуры HMGB1 в комплексе с линкерным гистоном H1 количественную оценку провести крайне сложно. Поскольку спектры КД HMGB1 и H1 (рис. 35) обусловлены вкладом хромофоров одного типа. В данном случае регистрируемые изменения в структуре белков при комплексообразовании мы не можем соотнести с конкретным белком.

В данной ситуации мы можем провести качественно сравнительный анализ вклада общего числа хромофоров в спектр КД комплекса при отсутствии взаимодействия (теоретическая кривая, полученная путем алгебраической суммы спектров исходных компонентов) (рис. 35, *кривая* 3) с реальным спектром КД комплекса HMGB1-H1. Показано, что теоретическая и экспериментальная кривые (при молярном соотношении белков HMGB1/H1 1:1,15) в области 220-230 нм различимы в пределах погрешности. Данное обстоятельство свидетельствует об изменении в структуре как минимум одного из белков. Однако, помимо предполагаемого H1-HMGB1 комплекса, мы не можем исключать вероятность формирования комплексов по типу H1-H1 и HMGB1-HMGB1.



Рисунок 35. Спектры КД НМGB1, Н1 и НМGB1-Н1 комплекса в 3мМ NaCl. 1 – спектр КД Н1 в свободном состоянии, 2 – спектр КД НМGB1 в свободном состоянии, 3 – алгебраическая сумма спектров КД белков в свободном состоянии, 4 – экспериментальная зависимость эллиптичности комплекса HMGB1 с Н1 от длины волны.

Для характеристики состава образующихся в условиях эксперимента комплексов использовался метод динамического светорассеяния. Согласно полученным сотрудниками нашей лаборатории данным (Starkova (Rodionova) et al., 2013), гидродинамические радиусы HMGB1 и H1 в свободных состояниях составляют 5,8 нм и 3 нм соответственно. В водном растворе помимо частиц, характеризующих белки в свободном состоянии, при молярном соотношении белков 1:1 формируются частицы с гидродинамическим радиусом 9,1 нм. Последнее

обстоятельство свидетельствует в пользу того, что в условиях данного эксперимента при молярном соотношении 1:1 происходит формирование H1-HMGB1 по типу гетеродимера.

3.5. Выявление посттрансляционных модификаций подтипов линкерного гистона H1

Поскольку в водном растворе белка H1 теленка одновременно присутствуют 7 близких по аминокислотному составу подтипов, подготовка образца для анализа методом масс-спектрометрии включала этап подбора условий и разделение подтипов белков методом двумерного гель-электрофореза. Условия подготовки препаратов и разделения белков в системе электрофореза были подробно описаны в главе Материалы и методы. Полученная в процессе эксперимента электрофореграмма представлена на рисунке 36.





Рисунок 36. Двумерный гельэлектрофорез Н1-обогощенной фракции тимуса теленка.

Рисунок 37. Масс-спектр Н1-обогащенной подфракции. Зона № 3. На спектре отмечены наиболее интенсивные линии.

В результате двумерного гель-электрофореза было получено 9 белковых зон, в пяти из которых (№№ 3-6, 8) методом МАЛДИ масс-спектрометрии был обнаружен гистон Н1. В двух – белки HMGB1 (зона № 1) и HMGB2 (зона № 2). Зоны № 7 и №9 также были подвержены спектральному анализу (результаты не представлены),

<i>m/z</i> ,	Ι	Tun H1	∆m/z	модификации	N _{Hay}	N _{кон}	n			
Масс-спектр зоны № 3										
746,4398	0,833	H1,2	-0,0009		91	97	0			
811,3945	10,655	H1,2	0,0000		98	106	0			
811,3945	10,655	H1,3	0,0000		99	107	0			
845,5081	3,135	H1,2	-0,0010		55	63	0			
845,5081	3,135	H1,3	-0,0010		56	64	0			
872,4835	2,181	H1,2	-0,0001		111	119	0			
872,4835	2,181	H1,3	-0,0001		112	120	0			
1107,5673	43,167	H1,2	-0,0008		65	75	0			
1107,5673	43,167	H1,3	-0,0008		66	76	0			
1172,6664	1,523	H1,2	0,0030	1Acetyl	53	63	1			
1198,6673	54,056	H1,2	-0,0005		35	46	0			
1198,6673	54,056	H1,3	-0,0005		36	47	0			
1212,6823	14,525	H1,2	-0,0011	1Methyl	35	46	0			
1212,6823	14,525	H1,3	-0,0011	1Methyl	36	47	0			
1308,6587	2,929	H1,2	0,0028	2Acetyl 1Phospho	141	152	2			
1308,6587	2,929	H1,3	0,0028	2Acetyl 1Methyl 1Phospho	142	153	2			

Таблица 6. Расшифрованные линии масс-спектров Н1.

1326,7630	49,25	H1,2	0,0003		34	46	1			
1326,7630	49,25	H1,3	0,0003		35	47	1			
1340,7758	21,788	H1,2	-0,0026	1Methyl	34	46	1			
1340,7758	21,788	H1,3	-0,0026	1Methyl	35	47	1			
1478,7478	15,037	H1,2	-0,0007	1Met-loss	1	17	0			
1506,7792	9,26	H1,3	-0,0006	1Met-loss	1	17	0			
1520,7575	100	H1,2	-0,0016	1Met- loss+Acetyl	1	17	0			
1548,7886	68,785	H1,3	-0,0018	1Met- loss+Acetyl	1	17	0			
Масс-спектр зоны № 4										
811,3948	3,4760	H1,1	0,0003		101	109	0			
845,5086	0,9170	H1,1	-0,0005	1Acetyl 1Oxidation	148	154	2			
845,5086	0,9170	H1,1	-0,0005	1Acetyl 1Oxidation	149	155	2			
1107,5675	20,6880	H1.1	-0,0006		68	78	0			
1198,6675	34,6480	H1,2	-0,0003		35	46	0			
1326,7632	37,6200	H1,2	0,0005		34	46	1			
1340,7763	5,2810	H1,2	-0,0021	1Methyl	34	46	1			
1520,7567	100,0000	H1,2	-0,0024	1Met-	1	17	0			
1548,7891	33,3100	H1,3	-0,0013	1Met-	1	17	0			
2012,1380	10,0730	H1,1	-0,0006	2Methyl	36	55	1			
2239,1370	11,3660	H1,1	0,0000	1Met- loss+Acetyl 1Phospho	1	23	1			

2691,2999	20,4920	H1,1	0,0052	2Acetyl 5Oxidation 1Phospho	1	25	2			
I				11 nospito						
Macc-chekth 20461 NO 5										
Matt-therip sondi 512 S										
811,3953	13,149	H1,5	0,0008		101	109	0			
811,3953	13,149	H1.4	0,0008		98	106	0			
872,4843	6,953	H1,5	0,0007	1Methyl	114	122	0			
872,4843	6,953	H1.4	0,0007	1Methyl	111	119	0			
973,6045	2,351	H1.4	0,0004		55	64	1			
1000,5809	3,13	H1,5	0,0023	1Methyl	113	122	1			
1000,5809	3,13	H1,4	0,0023	1Methyl	110	119	1			
1093.5541	11.309	H1.5	0.0017		68	78	0			
10,0,00 11	11,007	111,0	0,0017		00	, 0	0			
1107,5682	38,609	H1,5	0,0001	1Methyl	68	78	0			
1107.5682	38,609	H1 4	0.0001		65	75	0			
1107,5002	50,007		0,0001		05	10	0			
1172,6678	1,333	H1.4	0,0044	1Acetyl	53	63	1			
1198,6684	72,091	H1.4	0,0006		35	46	0			
1212 6834	23 001	H1 5	0.0000		38	49	0			
1212,0031	23,001		0,0000		50		0			
1300,7602	1,769	H1,4	0,0019	1Acetyl	140	152	3			
				2Acetyl						
1308,6588	6,769	H1,4	0,0029	1Phospho	141	152	2			
1326,7638	79,2	H1,4	0,0011		34	46	1			
1340.7767	37.85	H1.5	-0.0017		37	49	1			
		,_	3,0017				-			
1340,7767	37,85	H1.4	-0,0017	1Methyl	34	46	1			
				1Met-						
1520,7599	30,787	H1,4	0,0008	loss+Acetyl	1	17	0			

1548 7909	17 602	Н1 3	0.0005	1Met-	1	17	0		
1540,7707	17,002	111,5	0,0005	1055+Acctyr	1	17	0		
Масс-спектр зоны № 6									
811 3949	4 961	H1 5	0.0004		101	109	0		
011,3717	1,501	111.0	0,0001		101	109	Ŭ		
872,4831	1,563	H1.5	-0,0005	1Methyl	114	122	0		
1093,5532	7,661	H1.5	0,0008		68	78	0		
1107,5675	21,975	H1.5	-0,0006	1Methyl	68	78	0		
1133,5956	0,812	H1.5	-0,0010	4Acetyl 1Phospho	169	176	3		
1198,6684	23,654	H1.2	0,0006		35	46	0		
1212,6828	8,446	H1.5	-0,0006		38	49	0		
1220,6522	2,427	H1.oo	0,0041		258	269	1		
1263,6925	2,023	H1.0	-0,0018	2Methyl	98	108	2		
1308,6622	10,489	H1.2	0,0063	2Acetyl 1Phospho	141	152	2		
1326,7645	19,313	H1.2	0,0018		34	46	1		
1340,7767	11,072	H1.5	-0,0017		37	49	1		
1361,6934	1,658	H1.oo	-0,0003	1Methyl 1Phospho	286	298	2		
1460,8010	2,002	H1.5	0,0025	1Methyl 1Phospho	126	140	2		
1477,7775	6,409	H1.5	0,0001	1Acetyl 1Methyl 1Phospho	110	122	2		
1605,8870	2,865	H1.oo	-0,0006	2Methyl 1Phospho	120	133	3		
1858,9656	5,405	H1.oo	-0,0018	4Methyl 1Phospho	159	174	2		

1993,0409	4,515	H1.x	0,0030	2Acetyl 1Methyl 1Phospho	128	146	3			
Масс-спектр зоны № 8										
1107,56751	23,702	H1.1	-0,0006		68	78	0			
1107,56751	23,702	H1.5	-0,0006	1Methyl	68	78	0			
1198,66813	23,763	H1.2	0,0003		35	46	0			
1220,65176	10,392	H1oo	0,0037		258	269	1			
1263,69227	1,006	H1.0	-0,0020	2Methyl	98	108	2			
1326,76486	21,444	H1.2	0,0022		34	46	1			
1478,74879	17,24	H1.2	0,0003	1Met-loss	1	17	0			
1506,77996	5,599	H1.3	0,0002	1Met-loss	1	17	0			
1520,75768	52,792	H1.2	-0,0014	1Met- loss+Acetyl	1	17	0			
1548,78942	23,375	H1.3	-0,0010	1Met- loss+Acetyl	1	17	0			
1584,71959	3,62	H1.t	-0,0003	1Acetyl 2Methyl 3Phospho	132	142	3			
2239,13507	7,204	H1oo	-0,0019	3Acetyl 2Methyl 1Phospho	156	174	3			

Согласно полученным данным, по количественной оценке линкерный гистон H1.1 является доминантным в тканях зобной железы. Подтипы гистона H1.2 и H1.3 находятся в тимусе в меньшем количестве, в то время как остальные подтипы H1 практически отсутствуют. В связи с низким уровнем сигнала из-за малого содержания подтипов H1.5, H1.x, H1.00 и H1.t в белковой пробе проанализировать наличие пост-трансляционных модификаций в данных белках нам не удалось.

Большинство найденных в работе пост-трансляционных модификаций подтипов гистона H1 выявлено впервые (Sitnikova, Starkova (Rodionova) et al., 2013;

Старкова (Родионова) и др. 2014). Полученные результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7. Пост-трансляционные модификации подтипов гистона H1. Жирным шрифтом отмечены модификации, согласующиеся с литературными данными (Wisniewski et al., 2007).

Подтип гистона Н1	Модификация	Сайт модификации
	Ацетилирование	AcK85; AcK128; AcK137; cK139
H1.0	Метилирование	MetK52; MetK55 ; MetK82; MetK102; MetK108; MetK132; MetK136
	Фосфорилирование	РЅ45; РЅ46; РЅ49; РҰ53; 2Р из Т77, Т78, Т84, Ѕ90 и Ѕ92; РЅ131; РЅ135; РТ162
	Ацетилирование	АсК17 , 1 Ас из К22, К23 и К24
H1.1	Метилирование	1 Met из К36, К37; MetК55
	Фосфорилирование	1Р из S2 , S12, T13, S14, S19
	Ацетилирование	АсК17 ; АсК63; 2Ас из К149, К149, К152
H1.2	Метилирование	MetK46
	Фосфорилирование	Р1 из Т141, Т146 и Т150
	Ацетилирование	AcK17 ; AcK64; AcK149; cK150
H1.3	Метилирование	MetK47 ; MetK153
	Фосфорилирование	1Р из S142, T143, T147
	Ацетилирование	AcK17 ; AcK147; AcK148
H1.4	Метилирование	MetK46 ; 1Met из K117, K119; MetK152
	Фосфорилирование	1Р из Т144, Т146, S150 или T151

В области лизин-богатых участков белков при расшифровке данных часто возникают сложности в связи с особенностями подготовки белкового препарата к исследованию, а именно, проведением ферментативного гидролиза трипсином. Как уже упоминалось ранее, трипсин разрезает белок по лизину и аргинину. В области лизин-богатых участков белка при длительном времени обработки данным ферментом образуются пептиды, молекулярная масса которых 500 Да и ниже. Идентификация таких пептидов невозможна в связи с приборным ограничением масс-спектрометра. Для анализа таких участков белка время обработки трипсином снижали, вследствие чего образовывались пептиды с 1 и более (до 3) лизином в последовательности. Поэтому, в некоторых случаях, нельзя определить по какому именно лизину произошла модификация. Следует отметить, что даже и при использовании трипсина в качестве расщепляющего белок фермента, области модификаций белков определяются довольно четко с высокой воспроизводимостью полученных результатов.

Для удобства анализа полученных данных, сайты выявленных нами модификаций подтипов Н1 были отмечены на аминокислотной последовательности белков (рис. 39).

Несмотря на сложности расшифровки масс-спектров Н1 из-за высокого содержания лизина в его аминокислотной последовательности, при сравнении экспериментальных результатов с литературными данными (рис. 38), полученными с помощью электроспрей-масс-спектрометрии (Wisniewski et al., 2007), было несколько идентичных сайтов пост-трансляционных модификаций. выявлено Полное соответствие результатов невозможно в силу использования разных типов ионизации белка, что является причиной появления в масс-спектре сигнала от разных участков аминокислотной последовательности. Однако, несмотря на разные методы исследования, стоит отметить высокий уровень соответствия полученных области N-концевого результатов литературным данным В фрагмента И глобулярного домена белка.

	0	()	~	1			\cap
H1.1	MSETAPVAQA	ASTATEKI	PAAAKKIKKPA	KAAAPRKK	PAGPSVSELIV	QAVSSSKERSGVS.	LAALKKSLAAAGYD
H1.2	MSEAAPAAPA	AAPPAEK	APAKKKAAK	KPAGVRR	ASGPPVSEL11	AVAASKERSGVS	LAALKALAAAGYD
H1.3	MSETAPAAPA	APAPVEK	PVKKKAKK-T	GAAAGKR	ASGPPVSEL11	KAVAASKERSGVS	LAALKKALAAAGYD
H1.4	MSETAPAAPA	APAPAEK	PVKKKARK	AAGGAKRK	TSGPPVSELI1	KAVAASKERSGVS	LAALKKALAAAGYD
H1.5	MSETAPAETA	APAPVEK	PAKKKTTK	KAGAAK	ATGPPVSEL11	TKAVSASKERGGVS	LPALKKALAAGGYD
H1.1	VE NNSRIKI	LGLKSLVN	GTLVQTKGTG	AAGSFKLN	KKAES	AITTKVSVKAKAS	GAA-KKPKKTAGAA
H1.2	VE NNSRIKI	LGLKSLVS	GILVQTKGTG	ASGSEKLN	KKAASGEAKPO	AKKAGAAKAKKPA	GAA-KKPKKATGAA
H1.3	VENNSRIKI	LGLKSLVS	GTLVQTKGTG	ASGSFKLN	KKAASGEAKPI	KAKKAGAAKAKKPA	GAA-KKPKKATGAA
H1.4	VE NNSRIKI	LGLKSLVS	GTLVQTKGTG	ASGSFKLN	KKAASGEAKPI	KAKRAGAAKAKKPA	GAA-KKPKKAAGTA
H1.5	VEKNNSRIKI	LGLKSLVS	GTLVQTKGTG	ASGSFKLN	KKAASGEAKPI	KAKKTGAAKAKKPA	GATPKKPKKTAGA-
H1.1	AKKTVKTI	PKKPKKPA	/SKKTSKS	PKKPKV-V	KAKKVAKSPAH	KAKAVKPKA	SKAKVTKPKTPAKP
H1.2	TPKKAAKKTI	PKKAKKPA	AAVTKKVAKS	PKKAKV-T	KPKKVKS	ASKA	VKPKAAKPKV-AKA
H1.3	TPKKTAKKTI	PKKAKKPA	AAGAKKVSKS	PKKVKA-A	KPKKAAKSPAR	KAKAPKAKA	SKPKASKPKA-TKA
H1.4	TAKKSTKKTI	PKKAKKPA	AAGAKK-AKS	PKKAKA-T	KAKKAPKSPAR	KAKTVKPKA	AKPKTSKPKA-AKP
H1.5	KKTVKKTI	PKKAKKPA	A-AGVKKVAKS	PKKAKAAA	KPKKAAKSPAR	VPKAVKSKASKPKV	ТКРКТАКРКА-АКА
H1.1	KKAAPKKK-						
H1.2	KKVAAKKK-						
H1.3	KKAAPRKK-						
H1.4	KKTAAKKK-						
H1.5	KKAVSKKK-						

Рисунок 38. Посттрансляционные модификации линкерного гистона H1. Выделение красным цветом — ацетилирование (Ac), зеленым — метилирование (Met), желтым — фосфорилирование (P). Прямоугольником отмечены аминокислотные остатки, входящие в глобулярный домен белков. Сайты модификаций, вызывающие сомнение, отмечены на рисунке подписью.

Найденные в работе сайты ацетилирования подтипа Н1.1 в положении К17 и К23, метилирования К55 и фосфорилирования S2 совпадают с описанными в литературе (Wisniewski et al., 2007). Сайты ацетилирования гистона H1.2 на Nконцевом фрагменте белка в положении К17, метилирования и ацетилирования в глобулярном домене в положении К46 и К63 соответственно, фосфорилирования в положении Т146 совпадают полностью. Сайт ацетилирования в положении К17 белка Н1.3 также совпадает с литературными данными полностью. Расположение сайтов модификации гистона Н1.3 К47 и К64 тоже находятся в согласии с литературными данными, однако тип модификации несколько разнится. Нами показано, что Н1.3 подвержен ацетилированию в К64 (по литературным данным – метилированию) и метилированию К47 (по В литературным данным – ацетилированию). Сайт монометилирования К46 гистона H1.4 полностью совпадает с литературными данными.

	10	20	30	40	50	60
H1.1	MSETAFVAQA	ASTATERPAA	AKKTKKPAKA	AAPRKKPAGP	SVSELIVQAV	SSSKERSGVS
H1.2	MSEAAPAAPA	AAPPAE	KKKAAKKPAG	VRRKASGPPV	SELITKAVAA	SKERSGVSLA
H1.3	MSETAPAAPA	APAPVERTPV	KKKAKKTGAA	AGKRKASGPP	VSELITKAVA	ASKERSGVSL
H1.4	MSETAPAAPA	APAPAE	KKKARKAAGG	AKRKTSGPPV	SELITKAVAA	SKERSGVSLA
H1.0	MTENSTSTPA	AKPKRAKASK	KSTDHPKYSD	MIVAAIQAEK	NRAG <mark>SS</mark> RQSI	QKYIKSHYKV
	70	80	90	100	110	120
H1.1	LAALKKSLAA	AGYDVEKNNS	RIKLGLKSLV	NKGTLVQTKG	TGAAGSFKLN	KKAESKAITT
H1.2	ALKALAAAG	YDVEKNNSRI	KLGLKSLVSK	GILVQTKGTG	ASGSFKLNKK	AASGEAKPQA
H1.3	AALKALAAA	GYDVEKNNSR	IKLGLKSLVS	KGTLVQTKGT	GASGSFKLNK	KAASGEAKPK
						1Met
H1.4	ALKALAAAG	YDVEKNNSRI	KLGLKSLVSK	GTLVQTKGTG	ASGSFKLNKK	AASGEA <mark>K</mark> P <mark>K</mark> A
	19655 1970 - De	and the state of the state	2P			
H1.0	GENADSQIKL	SIKRLV <mark>TT</mark> GV	LKQTKGVGAS	GSFRLAKSDE	PKRSVAFKKT	KKEVKKVATP
U1 1	130	140	150	160	170 VTSVSDVVDV	180
п	KAPANA CANA	AARRENRIAG	1D 23	TREATERVSK	RIDKDEKKEK	VVAAAAAAAA
U1 2	VULCIAVIV	DACANERDER	ATCAATDURA	ARTDREARE	DAAAUTUUU	AVCDVVAVUT
п1.2	KRAGAARARK	PAGAARAPAR	1P	AMALIFARAR	PAAAAVIKKV	AKSPKKAKVI
H1.3	AKKAGAAKAK	KPAGAAKKPK	KSTGAATPEK	AAKKTPKKAK	KPAAAAGAKK	VSKSPKKVKA
			1P			
H1.4	KRAGAAKAKK	PAGAAKKPKK	AAGTATAKKS	TKKTPKKAKK	PAAAAGAKKA	KSPKKAKATK
H1.0	KKAAKPK <mark>K</mark> AA	SKAPSKKPKA	TPVKKAKKKP	AATPKKTKKP	K <mark>T</mark> VKAKPVKA	SKPKKTKPVK
H1.1	190 PAKAKAVKPK	200 ASKAKVTKPK	210 TPAKPKKAAP	KKK		7.5
H1.2	NDAMANG Y CA	AAKAKYYKAK	VAKAKKVAAK	KK		
	APARVADADA	UATTICHTTL IV				
H1.3	AKPKKAAKSP	AKAKAPKAKA	SKPKASKPKA	TKAKKAAPRK	K	
H1.3 H1.4	AKPKKAAKSP AKKAPKSPAK	AKAKAPKAKA AKTVKPKAAK	SKPKASKPKA PKTSKPKAAK	TKAKKAAPRK PKKTAAKKK	K	

H1.0 PKAKSSAKRT GKKK

Рисунок 39. Пост-трансляционные модификации для пяти типов гистона H1 мыши. Синим цветом шрифта выделено - фосфорилирование; красным - ацетилирование; розовым - монометилирование; зеленым - диметилирование; оранжевым ацетелирование или/и метилирование; заливка зеленым - убиквитинирование; заливка желтым – Na-концевое ацетилирование. Серым цветом выделен центральный глобулярный домен (Wisniewski et al., 2007). Овалом отмечены сайты выявленных нами модификаций, соответствующие литературным данным.

Сравнение белков, выделенных из разных видов животных (рис. 40), свидетельствует о высокой межвидовой консервативности характера и положения пост-трансляционных модификаций подтипов гистона H1.

Однако внутри одного организма пост-трансляционные модификации подтипов гистона H1 различны. Глобулярный домен подтипов H1.1, H1.2, H1.3 и H1.4 гистона H1 характеризуется наличием нескольких сайтов метилирования, что может приводить к увеличению положительного заряда полипептидной цепи в областях модификаций и, как следствие, увеличения силы его взаимодействия с ДНК.

Гистон Н1.2

Мышь	MSEAAPAAPA	AAPPAE	KKKAAKHPAG	VRRKASGPPV	SELITKAVAA
Теленок	MSEAAPAAPA	AAPPAEKAPA	KKKAAKKPAG	VRRKASGPPV	SELITKAVAA
K562	MSETAPAAPA	AAPPAEKAPV	KKKAAKKAGG	TPRKASGPPV	SELITKAVAA
			-		
Мышь	SKERSGVSLA	ALKKALAAAG	YDVEKNNSRI	KLGLKSLVSK	GILVQTKGTG
Теленок	SKERSGVSLA	ALKKALAAAG	YDVEKNNSRI	KLGLKSLVSK	GILVQTKGTG
K562	SKERSGVSLA	ALKRALAAAG	YDVEKNNSRI	KLGLKSLVSK	GTLVQTKGTG
		·			······
Мышь	ASGSFKLNKK	AASGEAKPQA	K AGAA AKK	PAGAAK	ATGAATPKKA
Теленок	ASGSFKLNKK	AASGEAKPQA	KKAGAAKAKK	PAGAAKKPKK	ATGAATPKKA
K562	ASGSFKLNKK	AASGEAKPKV	KKAGGT KPKK	PVGAAKKPKK	AAGGATPKKE
	····				·
Мышь	AKKIPKKAKK	PAAAAVTKKV	AKSPKKAKVT	KPKKVKSASK	AVKPKAAKPK
Теленок	AKKIPKKAKK	PAAAAVTKKV	AKSPKKAKVT	KPKKVKSASK	AVKPKAAKPK
K562	AKKTPKKAKK	PAAATVTKKV	AKSPKKAKVA	KPKKAAKSAA	KAVKPKAAKP
Мышь	VAKAKKVAAK	KK			
Теленок	VAKAKKVAAK	KK			
K562	KVVKPKKAAP	KKK			

Рисунок 40. Пост-трансляционные модификации подтипа гистона H1.2 миши, теленка и человека. Выделение кранным цветом — ацетилирование (Ac), зеленым — метилирование (Met), желтым — фосфорилирование (P). Прямоугольником отмечены аминокислотные остатки, входящие в глобулярный домен белков, пунктиром – высоко консервативные области модификаций.

В отличие от выше описанных подтипов H1, пост-трансляционные модификации гистона H1.0 расположены, в основном, в глобулярном домене белка и С-концевом участке. Модифицированные области H1.0 характеризуются высокой степенью фосфорилирования, что приводит к введению дополнительного отрицательного заряда в полипептидной цепи белковой молекулы и может способствовать ослаблению взаимодействия с ДНК.

С-концевой участок всех исследованных подтипов Н1 характеризуется наличием обогащенной пост-трансляционными модификациями (в большей степени ацетилирования и фосфорилирования) области, начиная примерно с 140 а.к.о, продолжительностью порядка 15 а.к.о. N-концевые участки подтипов Н1.1, Н1.2, Н1.3 и Н1.4 гистона Н1 характеризуются наличием сайта ацетилирования в положении К17. Введение клеточной системой в N- и С-концевые домены белков дополнительного отрицательного заряда может способствовать ослаблению взаимодействия с ДНК данных участков полипептидной цепи белковых молекул. Согласно литературным данным, N- и C- концевые домены гистона Н1, стягивая

между собой нуклеосомы, принимают непосредственное участие в формировании 30-ти нанометровой фибриллы. Нарушение связывания H1 с ДНК в области N- и Cдоменов, вероятно, приводит к формированию фибриллы с меньшей плотностью упаковки, что в свою очередь может оказывать влияние на доступ к ДНК структурно-регуляторных белков, в частности HMGB1, и транскрипционных факторов.

3.6. Сравнительный анализ посттрансляционных модификаций негистоновых белков хроматина HMGB1 и HMGB2

Помимо способности HMGB1 изменять вторичную структуру при связывании с биологическими молекулами, одним из механизмов регуляции функциональной активности белка в клетке может быть введение клеточной системой посттрансляционных модификаций.

К сожалению, на сегодняшний день данных, посвященных посттрансляционным модификациям HMGB1 и HMGB2, не так много. Из литературных источников известно (Stros, 2010), что HMGB1 подвержен таким фосфорилирование, модификациям как ацетилирование, метилирование, гликозилирование и поли-АДФ-рибозилирование. Сайты расположения данных модификаций указаны на рисунке 41.

Большинство показанных в литературе модификаций HMGB1 (рис. 41) присутствуют в А-домене белка. Пашевой с соавторами (Pasheva et al., 2004) было показано, что ацетилирование HMGB1 характеризуется наличием одного сайта в положении К2 на N-конце А- домена, в то время как белок, лишенный С-концевого участка имеет дополнительный сайт ацетилирования K81, расположенный на линкерном участке. Другим коллективом авторов (Bonaldi et. al., 2003) методом MALDI-TOF масс-спектрометрии были обнаружены следующие сайты ацетилирования HMGB1 тимуса теленка: K27-29, K179, K181-184, при этом упоминалось, что ацетилирование в положении K2/11 наблюдается гораздо реже.



Рисунок 41. Посттрансляционные модификации HMGB1. С-концевой участок белка отмечен овалом, А и В домены - черным и серым цветами соответственно. Рамкой отмечены аминокислотные остатки, взаимодействующие между собой при формировании третичной структуры. Ас—ацетилирование, Р—фосфорилирование, Met—метилирование (Stros, 2010).

Согласно литературным данным ацетилирование HMGB1 на K2 приводит к преимущественному связыванию HMGB1 на концах ДНК. Установлена так же важность ацетилирования остатков K2 и K11 при взаимодействии HMGB1 с суперскрученными участками ДНК и разветвленными ДНК-структурами типа Хиазмы Холидея. Помимо этого показано, что метилирование по K42 вызывает локализацию HMGB1 в цитоплазме клетки, а фосфорилирование HMGB1 растений по серину приводит к перемещению белка из ядра в цитоплазму и секреции белка в межклеточное пространство (Youn et al., 2006; Stros, 2010). Как можно заметить, данные полученные разными коллективами авторов несколько разнятся.

Методом МАЛДИ масс-спектрометрии нами были получены масс-спектры HMGB1 (рис. 42). Пробы были приготовлены согласно методике, описанной в главе Материалы и методы. Результаты расшифровки масс-спектра белка HMGB1 представлены в таблице 8. В таблице представлены значения отношения массы пептида к его заряду m/z, интенсивность полосы в спектре I, отклонение экспериментального значения m/z от рассчитанного теоретического $\Delta m/z$, найденные пост-трансляционные модификации, начальное N_{нач} и конечное N_{кон}

положение данного пептида в аминокислотной последовательности белка и, наконец, аминокислотную последовательность данного пептида. Достоверность расшифровки спектра оценивали по величине $\Delta m/z$, которое показывает отклонение реального спектра от теоретического. Чем меньше это отклонение, тем более вероятно правильное соотнесение пиков в масс-спектре.



Рисунок 42. Масс-спектр белков НМGВ1 и НМGВ2 тимуса теленка.

Таблица 8. Расшифрованные линии масс-спектра для белка HMGB1 теленка и крысы. Данные получены в результате обработки спектра в программе ProteinProspector.

m/z	Ι	$\Delta m/z$	Модификации	$N_{\rm Hay}$	$N_{\rm koh}$			
тимус теленка								
842,5094	6,195	0,0000	1Dimethyl	166	173			
842,5094	6,195	0,0000	2Methyl	166	173			
916,4890	4,045	-0,0003		89	96			
925,4448	2,45	0,0000		58	65			
1044,5820	1,24	0,0017		88	96			
1080,5967		0,0058	1Amidated+ iTRAQ8plex 1Ammonia- loss	51	57			
1080,5967	1,254	0,0048	2Acetyl 1Acetyl:2H(3)+Methyl	151	157			
1115,5369	2,062	0,0015	2Acetyl 1Methyl 1Phospho	151	157			
1133,6195	7,479	0,0006	4Acetyl	83	90			
1133,6195	7,479	0,0006		77	86			
1230,5630	1,101	-0,0042	1Acetyl 1Phospho	49	57			
1365,6386	0,879	-0,0031	3Acetyl	58	68			
1366,6387	0,915	0,0060	1Dimethyl 1Dioxidation 1Disuccinyl	74	82			
1383,6894	2,038	0,0026	1Acetyl 1Phospho	77	87			
1439,6428	17,22	0,0018		13	24			
1446,6614	2,765	0,0034	1Amidated 1Ammonia-loss	31	43			
1464,6739	21,869	0,0015		31	43			
1467,6383	22,006	0,0084	1Methyl 2Phospho	49	59			
1493,7320	0,916	0,0023	3Carbamidomethyl 1Carbamyl	115	127			
1502,8324	0,853	-0,0058	1Acetyl 1Acetyl+ Oxidation 1Acetyl:2H(3)	1	12			

			1Acetyl:2H(3)+Methyl		
1502,8324	2,328	-0,0058	1Amidated 1Ammonia-loss	113	127
1520,8417	29,338	0,0014		113	127
1537,7165	3,753	0,0038	2Dimethyl 1Disuccinyl	60	70
1542,8255	2,315	-0,0004	1Cation:Na	113	127
1552,8318	2,535	-0,0054	1Biotin 3Carbamyl	166	177
1592,7686	91,395	0,0017		30	43
1592,7686	91,395	0,0017		31	44
1614,7504	9,28	0,0019	1Cation:Na	30	43
1657,7895	2,084	0,0012	1Acetyl 1Methyl 1Phospho	74	86
1743,8481	0,819	0,0002	1 Methyl	60	73
1944,9731	2,268	0,0058		97	112
2109,9518	22,666	0,0028		129	146
2238,0457	34,188	0,0039		129	147
2238,0457	34,188	0,0039		128	146
2270,0366	4,151	0,0028	1Dioxidation	128	146
		тиму	с крысы		
708,3674	0,106	0,0001		158	163
842,5094	1,639	0,0000	2Methyl	166	173
916,4898	2,206	0,0011		89	96
925,4441	1,197	0,0007		58	65
1115,5372	3,725	-0,0012	2Acetyl 1Methyl 1Phospho	151	157
1133,6214	2,806	0,0013		77	86
1133,6214	2,806	0,0013	4Acetyl	83	90
1365,6396	1,613	0,0041	3Acetyl	58	68

1383,6902	0,769	-0,0018	1Acetyl 1Phospho	77	87
1439,6428	22,879	-0,0018		13	24
1455,7136	1,47	0,0005	4Acetyl 1Phospho	148	157
1464,6753	29,847	-0,0001		31	43
1520,8415	58,508	-0,0016		113	127
1648,9393	3,037	0,0012		113	128
1720,8624	41,47	-0,0029		29	43
1720,8624	41,47	-0,0029		30	44
1724,8627	0,808	0,0008	2Acetyl 1Methyl 1Phospho	140	152
1724,8627	0,808	0,0008	2Acetyl 1Phospho	142	154
1944,9786	1,471	-0,0003		97	112
1962,8829	13,423	-0,0008		13	28
2238,0479	32,799	-0,0017		128	146
2238,0479	32,799	-0,0017		129	147

Поскольку способы ионизации молекулы белка, описанные в литературе (Stros, 2010) и используемые нами, различны, в масс-спектре будут проявляться сигналы от пептидов разных участков белка, и полное соответствие результатов невозможно. Для удобства восприятия полученных данных нами были отмечены сайты наиболее достоверных на наш взгляд найденных в ходе эксперимента модификаций (рис. 43, 44). В таблице 8 приведены все данные, полученные в ходе эксперимента.

Большинство найденных нами модификаций HMGB1 расположены на внешней поверхности α-спиральных участков ДНК-связывающих доменов белка и линкерном участке между ними (рис. 44). Полученные результаты, относительно

92

«областей» модификаций HMGB1 согласуются с литературными данными (Stros, 2010). В работе выявлены сайты следующих пост-трансляционных модификаций белка HMGB1: AcK50, AcK59, AcK65, AcK68, AcK81, AcK86-88, AcK90, AcK162, MetR70 или MetR73, MetK76, MetK154, MetK157, MetK167, MetK171: вместо метилирования MetK167 и MetK171, возможно диметилирование в одном из этих двух положений; сайты фосфорилирования PT51 или PS53, PT77 или PY78, PY155. Здесь и ниже по тексту жирным шрифтом отмечены сайты модификаций, согласующиеся с литературными данными. Как было сказано ранее, оценкой корректности полученных данных в нашем случае является отклонение измеренных масс от теоретических значений не превышает 0.0030 а.е.м. (Sitnikova, Starkova (Rodionova) et al., 2013; Старкова (Родионова) и др. 2014).



Рисунок 43. Посттрансляционные модификации HMGB1. Обозначения: Ас ацетилирование, Met—метилирование, P—фосфорилирование, dimetyl—диметилирование. Спорные сайты модификаций отмечены знаком «?». Желтым цветом выделены аминокислотные остатки, входящие в NLS (от англ. Nuclear localization sequences), красным — p53 трансактиваторная последовательность, зеленым — TLR4-связывающий домен, синим — RAGE-связывающий домен. Прямоугольником отмечены аминокислотные остатки входящие в A и B HMGB-домены белка.



Рисунок 44. Расположение посттрансляционных модификаций в ДНК-связывающих доменах HMGB1 теленка. Обозначения: Ас—ацетилирование, Меt—метилирование, Р— фосфорилирование.

Обнаружены сайты пост-трансляционных модификаций HMGB2 в следующих положениях: AcK49 или AcK55, AcK57, AcK59, AcK65, AcK76, AcK85, AcK86, AcK88, AcK89, AcK152, AcK154, MetK82, MetK157, MetK167, MetK172, PT51, PT53, PY78, PY155 (рис.45) (данные расшифровки спектров HMGB2 не представлены). Большая часть найденных в HMGB1 и HMGB2 модификаций идентичны, в то время как модификации AcK57, AcK76, AcK85, AcK152, AcK154, MetK82, PY78 характерны только для белка HMGB2.



Обозначения: Пост-трансляционные модификации HMGB2. Рисунок 45. Acацетилирование, Met-метилирование, Р-фосфорилирование. Спорные сайты модификаций отмечены знаком «?». Желтым цветом выделены аминокислотные остатки, входящие в NLS sequences), (от англ. Nuclear localization красным p53 трансактиваторная последовательность, зеленым – TLR4-связывающий домен, синим – RAGE-связывающий домен. Прямоугольником отмечены аминокислотные остатки входящие в А и В HMGBломены белка.

При сравнении белков, выделенных из разных видов животных, нами было показано, что характер и положение посттрансляционных модификаций в HMGB1 и HMGB2 отличаются высокой межвидовой консервативностью (рис. 46).



Рисунок 46. Посттрансляционные модификации HMGB1 крысы и теленка. Выделение кранным цветом - ацетилирование (Ac), зеленым – метилирование (Met), желтым – фосфорилирование (P). Прямоугольником отмечены аминокислотные остатки входящие в A и B HMGB-домены белков. Сайты модификаций, вызывающие сомнение, отмечены на рисунке подписью.

Под ацетилированием (Ac) белка понимают ковалентное присоединение к аминокислотной последовательности ацетильной группы (CH3CO), несущей отрицательный заряд. В зависимости от атома, к которому присоединяется ацетильный остаток, выделяют С-, N- и О-ацетилирование. В нашем случае, все найденные модификации попадают в одну группу: N-ацетилирование по лизинам (K). Среди найденных нами модификаций данного типа первые 4 (K50, K59, K65, K68) расположены в А-домене белка, в то время как последующие 5 (K81, K86-88, K90, K162) - на линкерном участке, соединяющим А и В домены.

Отсутствие ацетилирования в областях NLS1 и NLS2 (от англ. Nuclear Localization Sequences) свидетельствует о ядерной локализации используемых в работе HMGB1 и HMGB2 (Kang et.al. 2013). Данное обстоятельство согласуется с условиями экстракции белков из зобной железы теленка и крысы. Согласно литературным данным, тимус характеризуется высоким содержанием HMGB1 и HMGB2 именно в ядре клетки (Mosevitsky et al., 1989).

Функционирование HMGB1 и HMGB2 напрямую связано с конформацией белковых молекул. В литературе предполагается возможность формирования 2-х типов пространственной укладки молекулы HMGB1: в свернутом и развернутом состоянии, между которыми существует динамическое равновесие. Свернутое неактивное состояние характеризуется взаимодействием отрицательно заряженного С-концевого участка белковой молекулы с аминокислотными остатками R72, K81, 1158, R162, K164, что обуславливает его расположение в полости между двумя положительно заряженными ДНК-связывающими доменами и стабилизацию белковой молекулы (Watson et al., 2007). Переход в функционально-активное состояние сопровождается нарушеним данного взаимодействия, и как следствие, разворачиванием белка HMGB1. Регуляция данного конформационного перехода может включать как структурно-адаптивные механизмы, когда в зависимости от объекта связывания, белок способен изменять свою структуру, так и наличие посттрансляционных модификаций. Согласно полученным нами данным, линкерный участок между ДНК-связывающими доменами белка характеризуется высокой степенью ацетилирования, в том числе и в положении К81. Дополнительный отрицательный заряд на данном участке полипептидной цепи белковой молекулы может способствовать нарушению взаимодействия С-концевого участка белка с

линкером и переходу HMGB1 в активное для связывания с ДНК и белками состояние.

В отличие от HMGB1 в белке HMGB2 в данном положении происходит К82. метилирование Поскольку белок HMGB2 10 остатка лизина на С-концевом аминокислотных остатка В домене короче своего гомолога, аминокислотными остатками С-концевого участка взаимодействие линкера с белковой молекулы, может быть ослаблено или нарушено изначально. В этом случае, HMGB2 будет находиться в развернутом, как следствие активном для связывания с биологическими молекулами состоянии.

HMGB1/2 ДНК Согласно литературным взаимодействие с данным, осуществляется посредством однодаменного (В-доменом) и в случае АТ-богатых двухдоменного связывания (Muller et al., 2001). B участков ДНК ДНК эукариотических клеток АТ-богатыми последовательностями характеризуются промоторные области генов (Smale, Kadonaga, 2003) примерно на 30 нуклеотидов транскрипции (Barrett al., 2013). выше сайта инициации et Посадка транскрипционных факторов на ДНК, как упоминалось выше, осуществляется путем формирования промежуточного тройного комплекса «фактор транскрипции-НМСВ1-ДНК», при этом за связывание транскрипционных факторов с HMGB1 отвечает А-домен белка. Согласно полученным нами данным, экранирование ДНК-связывающего домена HMGB1/2положительного заряда вследствие ацетилирования аминокислотных остатков лизина в положениях К50-К80 может способствовать ослаблению взаимодействия А-домена с ДНК в промоторной области генов, что в свою очередь является предпосылкой для связывания с HMGB1 фактора транскрипции с образованием промежуточного тройного комплекса. В качестве примера, на рисунках 30 и 40 в области А-домена белков отмечена полипептидная последовательность, отвечающая за связывание транскрипционного фактора р53.

Анализ расположения модификаций аминокислотной последовательности Вдомена белков показал, что большинство сайтов метилирования находятся в области связывания HMGB1 и HMGB2 с рецептором конечных продуктов гликозилирования (RAGE), что ограничивает доступ RAGE к сайту связывания белка HMGB1. Это происходит из-за увеличения положительного заряда В-домена при метилировании, что, вероятно, приводит к более сильному взаимодействию белков HMGB с ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди выявленных в работе модификаций подтипов гистонов H1.1-H1.4 доминируют модификации положительно заряженных остатков лизина в области Nи C-концевых участках. Появление дополнительного отрицательного заряда в процессе ацетилирования вне ДНК-связывающего глобулярного домена белка, может привести к нарушению связывания H1 с ДНК и способствовать формированию фибриллы с меньшей плотностью упаковки. Уменьшение степени компактизации ДНК оказывает непосредственное влияние на доступ к ДНК структурно-регуляторных белков, в частности HMGB1, и транскрипционных факторов.

Согласно полученным нами данным, функционирование негистонового хромосомного белка HMGB1 опосредовано наличием как минимум двух видов регуляции: введением клеточной системой посттрансляционных модификаций и наличием структурно-адаптивного механизма белка к объекту связывания.





Белок HMGB1, используемый в работе, характеризуется отсутствием ацетилирования в NLS областях полипептидной цепи, что свидетельствует о его ядерной локализации в клетке. Связывание HMGB1 с ДНК в межнуклеосомной области может происходить за счет вытеснения гистона H1, поскольку взаимодействие N- и C-концевых доменов H1 ослаблено вследствие ацетилирования и фосфорилирования в данных областях белковой молекулы (рис. 46). При этом возможно образование промежуточного HMGB1-H1 комплекса по типу гетеродимера.

А-домен белка характеризуется наличием сайтов ацетилирования, что вследствие экранировки положительного заряда данной области белка, способствует ослаблению взаимодействия домена с ДНК и формированию промежуточного регуляторного комплекса «ТГ/НМСВ1/ДНК». При этом функционально-значимые для выполнения внеклеточных функций участки В-домена белка, в частности, RAGE область связывания рецептора, сильно метилированы. Внесение дополнительного положительного заряда в данный участок полипептидной цепи белка в этом случае способствует увеличению силы связывания В-домена белка с ДНК, и как следствие, уменьшения вероятности связывания HMGB1 с RAGE рецептором.

Хромосомный белок HMGB1 способен по-разному изменять свою вторичную структуру при связывании с биологическими молекулами. В процессе взаимодействия HMGB1 с высокомолекулярной ДНК тимуса теленка происходит увеличение на 20% содержания аминокислотных остатков, находящихся в αспиральной конформации, в то время как связывание HMGB1 с плазмидной ДНК рUC19 проходит без изменений вторичной структуры белка. Взаимодействие белка HMGB1 с гистоном H1 так же приводит к изменениям вторичной структуры как минимум одного из белков.

выводы

1. Белок HMGB1 способен изменять свою вторичную структуру в зависимости от объекта связывания.

а) В процессе взаимодействия HMGB1 с высокомолекулярной ДНК тимуса теленка происходит увеличение на 20 % содержания аминокислотных остатков, находящихся в α-спиральной конформации, в то время как связывание HMGB1 с плазмидной ДНК pUC19 проходит без изменений вторичной структуры белка.

б) Взаимодействие белка HMGB1 с гистоном H1 приводит к изменениям вторичной структуры как минимум одного из белков.

2. Несмотря на деформацию двойной спирали в месте связывания HMGB1, взаимодействие данного белка с ДНК приводит к увеличению термостабильности двойной спирали ДНК, что выражается в увеличении ее температуры плавления в составе комплекса на 20 °C.

3. Большая часть найденных в белках HMGB1 и HMGB2 модификаций идентичны, в то время как модификации AcK57, AcK76, AcK85, AcK152, AcK154, MetK82, PY78 характерны только для белка HMGB2.

4. Основная часть найденных посттрансляционных модификаций белков HMGB1 и HMGB2 располагается в области А-домена, линкерного участка между двумя HMGB-доменами и RAGE-связывающей последовательности белка, что может оказывать влияние на связывание с белками факторов транскрипции, на пространственную укладку белковой молекулы и выполнение белками внеядерных функций соответственно.

5. Глобулярный домен и С-концевой участок белка H1.0 характеризуются высокой степенью фосфорилирования и метилирования, что может оказывать влияние на связывание белка с ДНК.

6. Среди выявленных в работе модификаций подтипов гистонов H1.1-H1.4 доминируют модификации положительно заряженных остатков лизина в области Nи С-концевых участков, что приводит к уменьшению положительного заряда полипептидной цепи вне ДНК-связывающего глобулярного домена белка.

7. Характер и расположение посттрансляционных модификаций белка НМGВ1 и гистона Н1отличаюся высокой межвидовой консервативностью.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АА акриламид
- а.к.о. аминокислотные остатки
- ДДС-Na додецилсульфат натрия
- ДНК дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИК инфракрасная область спеткра
- КД круговой дихроизм
- ЛУК ледяная уксусная кислота
- МАЛДИ-масс-спектрометрия матрично-активированная матричная
- десорбция/ионизация
- МБА N,N'-метиленбисакриламид
- ПААГ полиакриламидный гель
- ПСА персульфат аммония
- п.о. пара азотистых оснований ДНК
- РНК рибонуклеиновая кислота
- ТЕМЕД N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
- Трис трис-(оксиметил)-аминометан (2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиол)
- ТФУ трифторуксусная кислота
- УФ ультрафиолетовая область спектра
- Цисплатин цис-диаминодихлорплатина (II), цис-ДДП
- ЭДТА этилендиаминтетрауксусная кислота
- ЯМР ядерно-магнитный резонанс
- Ас ацетилирование
- D (Asp) аспарагиновая кислота
- DMS диметил суперимедиат
- Е (Glu) глютаминовая кислота
- HCl соляная кислота
- HClO₄ хлорная кислота
- I (Ile) изолейцин
- К (Lys) лизин
- Met метилирование

 NH_4HCO_3 – гидрокарбонат аммония

Р- фосфорилирование

R (Arg) – аргинин

S (Ser) – серин

ТАЕ – трис-уксусная кислота-ЭДТА

Т (Thr) – треонин

ТF – транскрипционный фактор

Y (Tyr) – тирозин

V(Val) – валин

Список публикаций по теме диссертации

Статьи

 Поляничко А.М., Родионова (Старкова) Т.Ю., Чихиржина Е.В., Воробьев В.И. 2008. Структуризация белка HMGB1 в ответ на связывание с ДНК. Электронный журнал «Структура и динамика молекулярных систем», № 4 А: 38-41

http://www.ksu.ru/sdms/4b_2008.pdf

- Родионова (Старкова) Т.Ю., Чихиржина Е.В., Воробьев В.И., Поляничко А.М. 2009. Изменение вторичной структуры белка HMGB1 при связывании с ДНК. Журнал структурной химии. 50(5): 1014 – 1020.
- 3. Родионова (Старкова) Т.Ю., Чихиржина Е.В., Курилов Р.В., Скворцова Е.В., Поляничко А.М. 2010. Изменение вторичной структуры HMGB-домена при связывании с ДНК. Электронный журнал «Структура и динамика молекулярных систем». № 8, А: 14-19 http://www.ksu.ru/sdms/sdms 8 2010.pdf

 Поляничко А.М., Родионова (Старкова) Т. Ю., Воробьев В. И., Чихиржина Е.В. 2011. Конформационные особенности ядерного белка HMGB1 и специфика его взаимодействия с ДНК. Цитология. 53 (1): 55-60.

- Чихиржина Е.В., Старкова Т.Ю., Костылева Е.И., Чихиржина Г.И., Воробьев В.И., Поляничко А.М. 2011. Взаимодействие ДНК со спермийспецифическими гистонами семейства Н1. Цитология. 53(10): 70-75.
- Chikhirzhina E., Starkova T., Kostyleva E., Polyanichko A. 2012. Spectroscopic Study of the Interaction of DNA with the Linker Histone H1 from Starfish Sperm Reveals Mechanisms of the Formation of Supercondensed Sperm Chromatin. Spectroscopy: An International Journal. 27 (5-6): 433–440. doi:10.1155/2012/250489
- Chikhirzhina E., Starkova (Rodionova) T., Polyanichko A. 2014. Interaction between Chromosomal Protein HMGB1 and DNA Studied by DNA-Melting Analysis. Journal of Spectroscopy. ID 387138 http://dx.doi.org/10.1155/2014/387138

Тезисы докладов

- Родионова (Старкова) Т.Ю., Поляничко А.М., Воробьёв В.И. 2008. Структурная организация комплексов ДНК с белком HMGB1 в растворах различных ионных сил. XIV Симпозиум по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул. 15-21 июня 2008 г., Челябинск. Сборник тезисов, 138.
- Rodionova (Starkova) T.U., Polianitchko A.M., Chikhirzhina E.V., Vorob'ev V.I. 2009. Structural changes of HMGB1 chromosomal protein upon binding to DNA. European Biophysics Congress Genoa. July 11-15, Genoa, Italy. 2009. European Biophysics Journal 38 (Suppl 1): S44.
- Родионова (Старкова) Т.Ю., Курилов Р.В., Скворцова Е.В., Поляничко А.М. 2009. Взаимодействие негистонового хромосомного белка HMGB1 с высокомолекулярной и плазмидной ДНК. 13-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология наука XXI века». 28 сентября – 2 октября 2009 г, Пущино, Россия. Сборник тезисов, 41.
- 4. Родионова (Старкова) Т.Ю., Скворцова Е.В., Поляничко А.М. 2010. Особенности взаимодействия негистонового белка хроматина HMGB1 с плазмидной и высокомолекулярной ДНК. Тезисы докладов XV симпозиума по межмолекулярному взаимодействию и конформации макромолекул. Петрозаводск, 14-18 июня 2010 г., 176.
- 5. Родионова (Старкова) Т.Ю., Поляничко А.М., Чихиржина Е.В., Воробьев В.И. 2010. Конформационные особенности ядерного белка HMGB1 и специфика его взаимодействия с ДНК. Тезисы докладов и сообщений II конференции молодых ученых Института цитологии РАН. Цитология. 52(6): 503
- Srarkova (Rodionova) T.J., Chikhirzhina E.V., Polyanichko A.M. 2011. Thermodinamical and structural properties of HMGB1 chromosomal protein. Two mechanisms of DNA-HMGB1 interaction. 7-th Saint-Petersburg Young Scientists Conference "Modern problems of polymer science", October 17-20, 2011. Abstract Book: 44.

- Родионова (Старкова) Т.Ю., Чихиржина Е.В., Поляничко А.М. 2011. Изменение структуры хромосомного белка HMGB1 как основа многообразия выполняемых им функций. V Всероссийский симпозиум «Белки и пептиды», Петрозаводск, 8-12 августа 2011 г. Сборник тезисов: 380. (ISBN 978-5-9274-0475-9).
- Старкова (Родионова) Т.Ю., Поляничко А.М., Костылева Е.И., Чихиржина Е.В. 2012. Механизм структурной адаптации негистонового хромосомного белка HMGB1 к участку связывания на ДНК. IV Съезд биофизиков России. Нижний Новгород, 20-26 августа 2012. Сборник тезисов. 1: 279.
- Starkova (Rodionova) T., Mikhailov N., Kostyleva E., Chikhirzhina E., Polyanichko A. 2013. Interaction between linker histone H1 and non-histone protein HMGB1 in vitro. FEBS Journal. 280 (Suppl. 1): 129.
- 10. Sitnikova A., Starkova (Rodionova) T., Artamonova T., Karpenko V., Polyanichko A., Chikhirzhina E., Kostyleva E., Tomilin A. 2013. Application of mass spectrometry to thecharacterization of post-translational modifications of chromosomal proteins. FEBS Journal. 280 (Suppl. 1): 131.
- 11. Старкова (Родионова) Т.Ю., Бабич А.В., Костылева Е.И., Скворцова Е.В., Поляничко А.М., Чихиржина Е.В., Томилин А.Н. 2014. Исследование посттрансляционных модификаций ядерных белков хроматина Н1 и HMGB1/2 методами МАЛДИ- и электроспрей- масс-спектрометрии. Тезисы докладов и сообщений XVII Всероссийского симпозиума «Структура и функции клеточного ядра». Цитология. 56(9): 682

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Веденов А.А., Дыхне А.М., Франк-Каменецкий М.Д. 1971. Переход спиральклубок в ДНК. Успехи физических наук. 105(3): 479-519
- Велюз А., Легран М., Грожан М. 1967. Оптический круговой дихроизм. М.: Мир. 105С.
- 3. Галь Э., Мадьеши Г., Верецкеи Л. 1982. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир. 784 С.
- 4. Жоли М. 1968. Физическая химия денатурации. М.: Мир.С. 153-170.
- Зайцев С. В. 2000. Негистоновые белки хроматина HMG1, HMG2, HMG17 и линкерный гистон H1-эффективные носители ДНК в процессе трансфекции: Дис. кандидата биологических наук. Спб.102 С.
- Зенгер В. 1987. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.- М.: Мир. 584С.
- 7. Мазин А.В., Кузнеделов К.Д., Краев А.С. и др. 1990. Методы молекулярной генетики и генной инженерии. Наука. СО РАН. 248С.
- Поляничко А.М., Чихиржина Е.В., Андрющенко В.В. Костылева Е.И., Wieser Н., Воробьев В.И. 2004. Влияние ионов Ca²⁺ на компактизацию ДНК в комплексе с негистоновым хромосомным белком HMGB1. Мол. биол. 38(4): 701-712.
- Поляничко А.М., Родионова Т.Ю., Воробьев В.И., Чихиржина Е.В. 2011. Конформационные особенности ядерного белка HMGB1 и специфика его взаимодействия с ДНК. Цитология. 53(1): 55-60.
- Рамм Е.И., Бирштейн Т.М., Болотина И.А., Волькенштейн М.В., Воробьев В.И., Дмитренко Л.М., Некрасова Т.Н. 1970. Исследование структуры гистонов. Мол. биол. 4 (1): 118-127.
- 11. Рубин А.Б. 1999. Биофизика. М.: Наука. 1: 448 С.
- Фрисман Э.В., Сибилева М.А., Пинаев Г.П., Воробьев В.И., Бодницка Б., Пиотровский Ю., Нгуен Тхи Дэ, Голикова А.И., Сергеева Н.И. 1969. Изучение влияния концентрации гистона на оптическое и гидродинамическое поведение его комплексов с ДНК. Мол. Биол. 3(2): 182-189.

- Чихиржина Е.В., Костылева Е.И., Рамм Е.И., Воробьев В.И. 1998.
 Исследование компактизации хроматина с использованием модельной системы ДНК-белковых комплексов. Цитология. 40 (10): 883-888.
- Чихиржина Е. В., Поляничко А. М., Скворцов А. Н., Костылева Е.И., Уссье К., Воробьев В.И. 2002. НМG1-домены: заложники обстоятельств. Мол. Биол. 36(3): 525 -531.
- Чихиржина Е.В., Воробьев В.И. 2002. Линкерные гистоны: конформационные особенности и роль в структурной организации хроматина. Цитология 44 (8) 721-736.
- Agnello D, Wang H, Yang H., Tracey K.J., Ghezzi P. 2002. HMGB-1 a DNAbinding protein with cytokine activity, induces brain the and IL-6 production, and mediates anorexia and taste aversion. Cytokine.18(4): 231-236.
- Alberts B., Alexander J., Julian L., David M., Martin R., Keith R.Peter W. 2014. Molecular Biology of the Cell. Garland Science. 1464 P.
- 18. Allan J., Hartman P.G., Crane-Robinson C., Aviles F.X. 1980. The structure of histone H1 and its location in the nucleosome. Nature 288: 675-679.
- Allahverdi A, Yang R, Korolev N, Fan Y, Davey CA, Liu C-F, Nordenskiold L.
 2011. The effects of histone H4 tail acetylations on cation-induced chromatin folding and self-association. NAR. 39: 1680–1691.
- 20. An W, Leuba SH, van Holde K, Zlatanova J.1995. Linker histone protects linker DNA on only one side of the core particle and in a sequence-dependent manner. Proc Natl Acad Sci U S A. 95(7): 3396-3401.
- Arena S., Benvenuti S., and Bardelli A. 2005. Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer. Cell Mol Life Sci 62: 2092—2099.
- Arents G., Burlingame R. W., Wang B.C., Love W. E., Moudrianakis E. N. 1991. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 A resolution: A triparatite protein assembly and a left-handed superhelix. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10148–10152.
- Bates D.L., Butler P.J.G., Pearson E.C., Thomas J.O. 1981. Stability of the higherorder structure of chicken erythrocyte chromatin in solution. Eur. J. Biochem.119: 469-476.
- 24. Bartolome S., Bermudez A., Daban J.R. 1994. Internal structure of the 30 nm chromatin fiber. J Cell Sci. 107(11): 2983-2992.
- Bell C.W., Jiang W., Reich C.F. 3rd, Pisetsky D.S. 2006. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. Am J Physiol Cell Physiol. 291:1318-1325.
- Belmont A. S., Bruce K. 1994. Visualization of G1 chromosomes: A folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure. J. Cell Biol. 127:287–302.
- Bianchi M.E., Beltrame M., Paonessa G. 1989. Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMG1. Science. 243: 1056-1059.
- Blumenfeld M., Orf J.W., Sina B.J., Kreber R.A., Callahan M.A., Mullins J.I., Snyder L.A. 1978. Correlation between phosphorylated H1 histones and satellite DNAs in Drosophila virilis. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 866-870.
- Bonaldi T., Talamo F., Scaffidi P., Ferrera D., Porto A., Bachi A., Rubartelli A., Agresti A., Bianchi M.E. 2003. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. Embo J. 22: 5551-5560.
- Bonne-Andrea C., Harper F., Puvion E., Delpech M., De Rcondo A.M. 1986. Nuclear accumulation of HMG1 protein is correlated to DNA synthesis. Biol. Cell. 58: 185-192.
- Böttger M., von Mickwitz C.-U., Scherneck S., Grade K., Lindigkeit R., 1981. Interaction of histone H1 with superhelical DNA. Sedimentation and electron microscopical studies at low-salt concentration. NAR. 9: 5253-5268.
- Brower-Toland B., Wacker D.A., Fulbright R.M., Lis J.T., Kraus W.L., Wang M.D.
 2005. Specific contributions of histone tails and their acetylation to the mechanical stability of nucleosomes. J Mol Biol. 346(1): 135–146.
- 33. Bruhn S.L., Phil P.M., Eissigman J.M., Houseman D.E., Lippard S.J. 1993. Isolation and characterization of human cDNA clones encoding a high mobility group box protein that recognizes structural distortions to DNA caused by binding of the anticancer agent cisplatinProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 2307-2311.
- Buckle R.S., Maman J.D., Allan J. 1992. Site-directed mutagenesis studies on the binding of the globular domain of linker histone H5 to the nucleosome. J. Mol. Biol. 223: 651–65916.
- Bustin M. 2001. Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. Trends Biochem Sci. 26(3): 152-153.

- 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.
- Bustin M. 1999. Regulation of DNA-Dependent Activities by the Functional Motifs of the High-Mobility-Group Chromosomal Proteins. Mol. Cell. Biol. 19(8) 5237– 5246.
- Bustin M., Lehn D.A., Landsman D. 1990. Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. Biochim. Biophys. Acta. 1049: 231-243
- Cato L., Katherine Stott K., Watson M., Thomas J.O. 2008. The Interaction of HMGB1 and Linker Histones Occurs Through their Acidic and Basic Tails. J. Mol. Biol. 384: 1262–1272.
- 40. Carrozza M.J., Deluca N. 1998. The High Mobility Group Protein 1 Is a Coactivator of Herpes Simplex Virus ICP4 In Vitro. J. of Virology. 72(8): 6752–6757.
- Carruthers L.M., Hansen J. C. 2000. The core histone N termini function independently of linker histones during chromatin condensation. J Biol Chem. 275(47): 37285-37290.
- 42. Cerf C., Lippens G., Ramakrishnan V., Muyldermans S., Segers A., Wyns L., Wodak S.J., Hallenga K. 1994. Homo- and heteronuclear two-dimensional NMR studies of the globular domain of histone H1: full assignment, tertiary structure, and comparison with the globular domain of histone H5. Biochem. 33(37): 11079-11086.
- Chao J.C., Wan X.S., Engelsberg B.N., Rothblum L.I., Billings P.C. 1996. Intracellular distribution of HMG1, HMG2 and UBF change following treatment with cisplatin. Biochim. Biophys. Acta.7(2): 213-219.
- 44. Chen G.Y., Tang J., Zheng P., Liu Y. 2009. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damageinduced immune responses. Science. 323: 1722-1725.
- 45. Chiba S., Baghdadi M., Akiba H., Yoshiyama H., Kinoshita I., Dosaka-Akita H., Fujioka Y., Ohba Y., Gorman J.V., Colgan J.D., Hirashima M., Uede T., Takaoka A., Yagita H., Jinushi M. 2012. Tumorinfiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. Nat Immunol. 13: 832-842.
- 46. Chikhirzhina E.V., Polyanichko A.M., Kostyleva E.I., Vorobyev V.I. 2011. Structure of DNA complexes with chromosomal protein HMGB1 and histone H1 in the

presence of manganese ions: I. circular dichroism spectroscopy. Mol. Biol. 45: 318–326.

- Chikhirzhina E.V., Starkova T.Ju., Kostyleva E.I., Chikhirzhina G.I., Vorob'ev V.I., Polyanichko A.M. 2011. The interaction of DNA with sperm-specific histones of the H1 family. Cell and Tissue Biology. 5: 536-542.
- 48. Chikhirzhina E.V., Starkova T.Ju., Kostyleva E.I., Polyanichko A.M. 2012. Spectroscopic study of the interaction of DNA with the linker histone H1 from starfish sperm reveals mechanisms of the formation of supercondensed sperm chromatin. Spectroscopy. 27: 433-440.
- 49. Chikhirzhina E., Chikhirzhina G., Polyanichko A. 2014. Chromatin structure: The role of "linker" Proteins. Biomedical Spectroscopy and Imaging. 3: 345–358.
- 50. Clark D.J., Thomas J.O. 1986. Salt-dependent cooperative interaction of histone H1 with linear DNA. J. Mol. Biol. 187: 569-580.
- 51. Crane-Robinson C., Staynov D.Z., Baldvin J.P. 1984. Histone H1 and its role in chromatin. Comm. Mol. Cell. Biophys. 2: 219-265.
- Crane-Robinson C., Read C.M., Cary P.D., Driscoll P.C., Dragan A.I., Privalov P.L. 1998. The Energetics of HMG Box Interactions with DNA. Thermodynamic Description of the Box from Mouse Sox-5. Journal of Molecular Biology. 281(4): 705-717.
- Cremer M., Kupper K., Wagler B., Wizelman L., von Hase J., Weiland Y., Kreja L., Diebold J., Speicher M.R., Cremer T. 2003. Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. J Cell Biol. 162: 809–820.
- 54. Cremer T., Cremer C. 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. Nat Rev Genet. 2: 292–301.
- 55. Davey C. A., Sargent D. F., Luger K., Maeder A. W., Richmond T. J. 2002. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 A resolution. J. Mol. Biol. 319: 1097–1113.
- 56. De Bernardin W., Losa R., Koller T. 1986. Formation and characterization of soluble complexes of histone H1 with supercoiled DNA. J. Mol. Biol. 189: 503-517.
- 57. De Young L.R., Fink A.L., Dill K.A. 1993. Aggregation of globular proteins. Accounts Chem. Res. 26: 614–620.

- Drew H.R., Wing R.M., Takano T., Broka C., Tanaka S., Itakura K., Dickerson R.E. 1981. Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 78: 2179-2183.
- Dworetzky A., Wright F.M., Fey E.G., Penman S., Lian J.B., Stein J.L., Stein G.S. 1992. Sequence-specific DNA are components of a nuclear matrix-attachment site. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 4178-4182.
- Dunker A.K., Lawson J.D., Brown C.J, Williams R.M., Romero P., Oh J.S., Oldfield C.J., Campen A.M., Ratliff C.M., Hipps K.W., Ausio J., Nissen M.S., Reeves R., Kang C., Kissinger C.R., Bailey R.W., Griswold M.D., Chiu W., Garner E.C., Obradovic Z. 2001. Intrinsically disordered protein. J Mol Graph Model. 19(1): 26– 59.
- 61. Einck L., Bustin M. 1985. The intracellular distribution and function of the high mobility group chromosomal proteins. Exp Cell Res. 156: 295-310.
- 62. Finch J.T., Klug A. 1976. Solenoidal model for superstructure in chromatin. ProcNatl Acad Sci USA. 73: 1897-1901.
- 63. Fields G.B., Alonso D.O.V., Stigter D., Dill K.A. 1992. Theory for the Aggregation of Protein Copolymers. J. Phys. Chem. 96: 3974–3981.
- Fussner E., Ching R., Bazett-Jones D. 2011. Living without 30 nm chromatin fibers. Trends Biochem. Sci. 36 : 1—6.
- Gong W., Li Y., Chao F., Huang G., He F. 2009. Amino acid residues 201-205 in Cterminal acidic tail region plays a crucial role in antibacterial activity of HMGB1. Journal of Biomedical Science. This article is available from: <u>http://www.jbiomedsci.com/content/16/1/83</u>.
- Grasser K.D, Launholt D., Grasser M. 2007. High mobility group proteins of the plant HMGB family: dynamic chromatin modulators. Biochim. Biophys. Acta 1769: 346–357.
- 67. Greenfield N., Fasman G. D. 1969. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. Biochem..8: 4108-4116.
- 68. Grunstein M. 1992. Histones as regulators of genes. Sci. Am. 267(4): 68-74.
- 69. Smith M.M. 1991. Histone structure and function. Curr. Opin. Cell Biol. 3: 429-437.
- Hamkalo B. A., Rattner J. B. 1980. Folding up genes and chromosomes. Q. Rev. Biol. 55: 409–417.

- Happel N., Schulze E., Doenecke D. 2005. Characterisation of human histone H1x. Biol. Chem. 386: 541–551.
- 72. Happel N., Doenecke D. 2009. Histone H1 and its isoforms: Contribution to chromatin struture and function. Gene. 431: 1-12.
- Hardman C.H., Broadhurst R.W., Raine A.R., Grasser K.D., Thomas J.O., Laue E.D. 1995. Structure of the A-domain of HMG1 and its interaction with DNA as studied by heteronuclear three- and four-dimensional NMR spectroscopy. Biochem. 34: 16596 16607.
- Harp J. M., Hanson B. L., Timm D. E., Bunick G. J. 2000. Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5 A resolution. Acta Cryst. D Biol. Cryst. 56: 1513– 1534.
- Hayes J. 1996. Site-directed cleavage of DNA by linker histone-Fe(II) EDTA conjugate: localization of a globular domain binding site within a nucleosome. Biochem. 35: 11931-11937.
- 76. Heintzman N.D., Stuart R.K., Hon G., Fu Y., Ching C.W., Hawkins R.D., Barrera L.O., Van Calcar S., Qu C., Ching K.A., WangW., Weng Z., Green R.D., Crawford G.E., Ren B. 2007. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. NatGenet. 39: 311–318.
- 77. Hindmarsh P., Ridky T., Reeves R., Andrake M., Skalka A.M., Leis J. 1999. HMG Protein Family Members Stimulate Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Avian Sarcoma Virus Concerted DNA Integration In Vitro. J. of Virology. 73(4): 2994–3003.
- Hurd P.J., Bannister A.J., Halls K., Dawson M.A., Vermeulen M., Olsen J.V., Ismail H., Somers J., Mann M., Owen-Hughes T., Gout I., Kouzarides T. 2009. Phosphorylation of histone H3 Thr-45 is linked to apoptosis. Journal of Biological Chemistry. 284(24): 16575-16583.
- Huttunen H.J., Fages C., Kuja-Panula J., Ridley A.J., Rauvala H. 2002. Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis. Cancer Res. 62: 4805-4811.
- Ivanov V. I., Minchenkova L. E., Schyolkina A. K., Poletayev A.I. 1973. Different conformations of double-stranded nucleic acid in solution as revealed by circular dichroism. Biopolymers. 12: 89—110.

- Ito H., Fujita K., Tagawa K., Chen X., Homma H., Sasabe T., Shimizu J., Shimizu S., Tamura T., Muramatsu S., Okazawa H. 2014. HMGB1 facilitates repair of mitochondrial DNA damage and extends the lifespan of mutant ataxin-1 knock-in mice. EMBO Mol Med. 7(1): 78-101.
- Izaurralde E., Kas E., Laemmli U.K. 1989. Highly preferential nucleation of histone H1 assembly on scaffold-associated regions. J. MOL. Biol. 210: 573-585.
- Jaenicke R. 1995. Folding and association versus misfolding and aggregation of proteins. Phil. Trans. R. Soc. 348: 97–105.
- Jaenicke R. 1967. Intermolecular forces in the process of heat aggregation of globular proteins and the problem of correlation between aggregation and denaturation phenomena. J. Polym. Sci. 16: 2143–2160.
- 85. Jamieson E.R., Lippard S.J. 1999. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. Chem. Rev. 99: 2467-2498.
- Jelesarov I., Crane-Robinson C., Privalov P.L. 1999. The Energetics of HMG Box Interactions with DNA: Thermodynamic Description of the Target DNA Duplexes. Journal of Molecular Biology. 294(4): 981-995.
- 87. Jerzmanowski A. 2004. The linker histones. In: Chomatin Struture and Dynamics: State-of-the-Art / Eds. Zlatanova J., Leuba S.H. UK.: Elsevier: 75-102.
- Jung Y., Lippard S.J. 2003. Nature of full-length HMGB1 binding to cisplatinmodified DNA. Biochem. 42 (9): 2664-2671.
- Kalashnikova A., Porter-Goff M., Muthurajan U., Luger K., Hansen J. 2012. The role of the nucleosome acidic patch in modulating higher order chromatin structure. J R Soc Interface. 10(82): 20121022
- Kang R, Zhang Q., Zeh H.J., Lotze M, Tang D. HMGB1 in Cancer: Good, Bad, or Both? Clin. Cancer Res. 19(15): 4046-4057.
- 91. Kang R, Tang D. 2012. PKR-dependent inflammatory signals. Sci Signal. 5(247): pe
 47.
- Karas M, Hillenkamp F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal. Chem. 60: 2299–2301.
- 93. Kas E., Izaurralde E., Laemmli U.K. 1989. Specific inhibition of DNA binding to nuclear scaffolds and histone H1 by distamycin. The role of oligo(dA)-oligo(dT) tracts. J. Mol. Biol. 210: 587-599.

- Kasinsky H.E., Lewis J.D., Dacks J.B., Ausio J. 2001. Origin of H1 linker histones. FASEB J. 15: 34–42.
- 95. Knapp S., Muller S., Digilio G. et al. 2004. The Long Acidic Tail of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Protein Forms an Extended and Flexible Structure That Interacts with Specific Residues within and between the HMG Boxes. Biochem. 43: 11992-11997.
- Kohlstaedt E.A., Sung E.C., Fujishige A., Cole R.D. 1987. Non-histone chromosomal protein HMG1 modulates the histone H1-induced condensation of DNA. J Biol Chem. 262: 524-526.
- Kohlstaedt L.A., Cole R.D. 1994. Specific interaction between H1 histone and high mobility protein HMG1. Biochem. 33: 570-575.
- 98. Kohlstaedt E.A., Cole R.D. 1994. Effect of pH on interactions between DNA and high-mobility group protein HMG1. Biochem.33: 12702-12707.
- 99. Kouzarides T. 2007. Chromatin modifications and their function. Cell. 128: 693–705.
- 100. Kowalski A., Pałyga J. 2012. High-Resolution Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis: A Tool for Identification of Polymorphic and Modified Linker Histone Components. Gel Electrophoresis – Principles and Basics: 117-136.
- 101. Kuniyasu H., Oue N., Wakikawa A., Shigeishi H., Matsutani N., Kuraoka K., Ito R., Yokozaki H., Yasui W. 2002. Expression of receptors for advanced glycation endproducts (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer. J Pathol. 196: 163-170.
- 102. Lange S.S., Vasquez K.M. 2009. HMGB1: the jack-of-all-trades protein is a master DNA repair mechanic. Mol Carcinog. 48: 571-580.
- Lambert S., Muyldermans S., Baldwin J., Kilner J., Ibel K., Wijns L. 1991. Neutron scattering studies of chromatosomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 179: 810-816.
- 104. Lee K.L.D., Pentecost B.T., D'Anna J.A., Tobey R.A., Gurley L.R., Dixon G.H. 1987. Characterization of cDNA sequences corresponding to three distinct HMG-1 mRNA species in line CHO Chinese hamster cells and cell cycle expression of the HMG-1 gene. Nucleic Acids Res. 15: 5051-5068.
- 105. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. Nature.227(5259): 680-685.

- 106. Lennox R.W. 1984. Differences in evolutionary stability among mammalian H1 subtypes. J. Biol. Chem. 259: 669-672.
- 107. Lotze M.T., Tracey K.J. 2005. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. Nat Rev Immunol. 5: 331-342.
- Love J.J., Li X., Case D. A., Giese K., Grosschedl R., Wright P.E. 1995. Structural basis for DNA bending by architectural transcription factor LEF-1. Nature. 376: 791-795.
- 109. Luger K., M€ader A. W., Richmond R. K., Sargent D. F., Richmond T. J. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature. 389: 251–260.
- 110. Luger K., Richmond T. J. 1998. The histone tails of the nucleosome. Curr Opin Genet Dev.8(2): 140-146.
- 111. Luger K., Dechassa M.L., Tremethick D.J. 2012. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 13: 436–447.
- 112. Masse J.E., Wong B., Yen Y.M., Allain F.H., Johnson R.C., Feigon J. 2002. The S. cerevisiae architectural HMGB protein NHP6A complexed with DNA: DNA and protein conformational changes upon binding. J.Mol.Biol. 323: 263-284.
- 113. McGhee J.D., Nickole J.D., Felsenfeld G., Rau D.C. 1983. Higher order structure of chromatin: orientation of nucleosomes within the 30nm chromatin solenoid is independent of species and linker length. Cell 22: 87-96.
- 114. Miles A.J., Wallase B. A. 2006. Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics. Cham. Soc. Rev. 35: 39 – 51.
- 115. Mitraki A., King J. 1989. Protein folding intermediates and inclusion body formation. BioTechnology. 7: 690–697.
- 116. Morrow J. A., Segall M. L., Lund-Katz S., Phillips M. C., Knapp M., Rupp B., Weisgraber K.H. 2000. Differences in Stability among the Human Apolipoprotein E Isoforms Determined by the Amino-Terminal Domain. Biochem. 39(38): 11657 – 11666.

- 117. Mosevitsky M.I., Novitskaya V.A., Iogannsen M.G., Zabezhinsky M.A. 1989. Tissue specificity of nucleocytoplasmic distibution of HMG1 and HMG2 proteins and their probable functions. Eur. J. Biochem.185: 303-310.
- 118. Muller S., Bianchi M. E., Knapp S. 2001. Thermodynamics of HMGB1 Interaction with Duplex DNA. Biochem. 40: 10254-10261.
- 119. Murphy 4th. F.V., Sweet R.M., Churchill M.E. 1999. The structure of a chromosomal high mobility group protein-DNA complex reveals sequence-neutral mechanisms important for non-sequence-specific DNA recognition. EMBO J. 18: 6610-6618.
- 120. Murphy E.C., Zhurkin V.B., Louis J.M , Cornilescu G., Clore G.M.. Structural basis for SRY-dependent 46-X,Y sex reversal: modulation of DNA bending by a naturally occurring point mutation. J.Mol.Biol. 312: 481-499.
- 121. Nishigaki N., Husumi Y., Masauda M., Kaneko K., Tanaka T. 1984. Strand dissociation and cooperative melting of double-stranded DNAs detected by denaturant gradient gel electrophoresis. J Biochem. 95: 627-635.
- 122. Oliva R., Bazett-Jones D.P., Locklear L., Dixon G.H. 1990. Histone hyperacetylation can induce unfolding of the nucleosome core particle. Nucleic Aids Res. 18(9): 2739–2747.
- 123. Orlova V.V., Choi E.Y., Xie C., Chavakis E., Bierhaus A., Ihanus E., Ballantyne C.M., Gahmberg C.G., Bianchi M.E., Nawroth P.P., Chavakis T. 2007. A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. Embo J. 26: 1129-1139.
- 124. Pace C.N., Vajodos F., Fee L., Grimsley G., Gray T. 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. Protein Sci.4: 2411-2416.
- 125. Panyim S., Chalkley R. 1969. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. Arch Biochem Biophys. 130(1): 337-346.
- 126. Pasheva E., Sarov M., Bidjekov K. Ugrinova I., Sarg B., Lindner H., Pashev I.G. 2004. In Vitro Acetylation of HMGB-1 and -2 Proteins by CBP: the Role of the Acidic Tail. Biochem. 43: 2935-2940.
- 127. Paul A. L., Ferl R. J. 1999. Higher-order chromatin structure: Looping long molecules. Plant. Mol. Biol. 41: 713–720.

- 128. Pentecost D., Dixon G.H. 1984. Isolation and partial sequence of bovine cDNA clones for the high-mobility-group protein (HMG-I). Bioscience Reports. 49-57.
- Peterson C.L., Laniel M.A. Histories and histone modifications. Curr Biol. 14(14): R546–R551.
- 130. Pienta K. J., Coffey D. S. 1984. A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome. J. Cell. Sci. 1, Suppl: 123–135.
- Pohler J., Norman D.J., Bramham J., Bianchi M.E., Lilley D.M. 1998. HMG box protein bind to four-way DNA junctions in their open conformation. EMBO. 17(3): 817-826.
- 132. Polyanichko A.M., Chikhirzhina E.V. 2013. Interaction between DNA and chromosomal proteins HMGB1 and H1 studied by IR/VCD spectroscopy. J. Mol. Struct. 1044: 167-172.
- 133. Polyanichko A.M., Vorob'ev V.I., Chikhirzhina E.V. 2013. Structure of DNA complexes with chromosomal protein HMGB1 and histone H1 in the presence of manganese Ions: II. vibrational circular dichroism spectroscopy, Mol. Biol. 47: 338-346.
- 134. Polyanichko A., Wieser H. 2005. The FTIR/VCD spectroscopy as an informative tool for the investigation of large supramolecular complexes of biological macromolecules. Biopolymers. 78: 329–339.
- 135. Privalov P.L., Jelesarov I., Read C.M., Dragan A.I., Crane-Robinson C. 1999. The Energetics of HMG Box Interactions with DNA: Thermodynamics of the DNA Binding of the HMG Box from Mouse Sox-5. Journal of Molecular Biology. 294(4): 997-1013.
- 136. Pruss D., Bartholomew B., Persinger J., Hayes J., Arents G., Moundrianakis E., Wolffe A. 1996. An asymmetric model for the nucleosome: a binding site for linker histones inside the DNA gyres. Science. 274: 614-617.
- 137. Ramakrishnan V., Fich J.T., Graziano V., Lee P.L., Sweet R.M. 1993. Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. Nature. 362: 219–223.
- 138. Ramstein J., Locker D., Bianchi M. E., Leng M. 1999. Domain-domain interactions in high mobility group 1 protein (HMG1). Eur. J. Biochem. 260(3): 692 -700.

- Read C.M., Cary P.D., Crane-Robinson C., Driscoll P.C., Norman D.G. 1993.
 Solution structure of a DNA-binding domain from HMG-1. Nuc. Acids Res. 21: 3427-3436.
- 140. Read C.M., Cary P.D., Crane-Robinson C. et al. 1995. The Structure of the HMG Box and its Interaction with DNA. Nuc. Acids Mol. Biol. 9: 222-231.
- 141. Reeck G.R., Isackson P.J., Teller D.C. 1982. Domain structure in high molecular mass high mobility group nonhistone chomatin proteins. Nature. 300: 675-676.
- 142. Renugopalakrishnan V., Lakshminarayanan A., Sasisekharan V. 1971. Stereochemistry of nucleic acids and polynucleotides III. Electronic charge distribution. Biopolymers 10: 1159-1167.
- 143. Renz M., Day L.A. 1976. Transition from noncooperative and selective binding of histone H1 to DNA. Biochemistry. 15: 3220-3228.
- 144. Rippe K., Mazurkiewicz J., Kepper N. 2008. Interactions of Histones with DNA: Nucleosome Assembly, Stability, Dynamics, and Higher Order Structure. Chapter 6 of DNA Interactions with Polymers and Surfactants. Edited by R. Dias and B. Lindman. John Wiley and Sons, Inc. 135-172.
- Rouzina I., Bloomfield V. A. 2001. Force-induced melting of the DNA double helix. Biophys J 80: 882-900.
- 146. Rydberg B., Holley W. R., Mian I. S., Chatterjee A. 1998. Chromatin conformation in living cells: Support for a zig-zag model of the 30nm chromatin fiber. J. Mol. Biol. 284: 71–84.
- 147. Sachs R. K., van den Engh G., Trask B., Yokota H., Hearst J. E. 1995. A randomwalk/giantloop model for interphase chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 2710–2714.
- Saenger W. 1984. Principle of Nucleic Acid Structures. Springer-Verlag, New York. 201-219.
- 149. Sakamoto M., Noguchi S., Kawashima S., Okada Y., Enomoto T., Seki M., Horikoshi M. 2009. Global analysis of mutual interaction surfaces of nucleosomes with comprehensive point mutants. Genes to Cells. 14: 1271–1330.
- 150. Sasahira T., Akama Y., Fujii K., Kuniyasu H. 2005. Expression of receptor for advanced glycation end products and HMGB1/amphoterin in colorectal adenomas. Virchows Arch. 446: 411-415.

- 151. Scaffidi P., Misteli T., Bianchi M.E. 2002. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. Nature. 418: 191-195.
- 152. Schalch T., Duda S., Sargent D. F., Richmond T. J. 2005. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. Nature. 436: 138–141.
- 153. Schultz S.C., Shields G.C., Steitz T.A. 1991. Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90 degrees. Science. 253: 1001–1007.
- 154. Seyedin S.M., Pehrson J.R., Cole D. 1981. Loss of chromosomal high-mobilitygroup proteins HMG1 and HMG2 when mouse neuroblastoma and Friend erytholeukemia cell become committed to differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 5988-5992.
- 155. Sedat J., Manuelidis L. 1978. A direct approach to the structure of eukaryotic chromosomes.Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 42: 331–350.
- 156. Serrano L., Vazquez B., Tischfield J. 2013. Chromatin structure, pluripotency and differentiation. Exp Biol Med. 238: 259-270.
- 157. Sheflin L.G., Spaulding S.W. 1989. High mobility group protein 1 preferentially conserves torsion in negatively supercoiled DNA. Biochem. 28: 5658-5664.
- 158. Shepelev V.A., Kosaganov Yu.N., Lazurkin Yu.S. 1989. Interaction of the HMGl protein with nucleic acids. FEBS. 172(2): 1984 1990.
- 159. Singer D.S., Singer M.F. 1978. Characterization of complexes of superhelical and relaxed closed circular DNA with H1 and phosphorylated H1 histones. Biochem. 17: 2086-2095.
- 160. Somejima J., Ozaki S., Uesugi H., Osakada F., Inoue M., Fukuda Y., Shirakawa H., Yoshida M., Rokuhara A., Imai H., Kiyosawa K., Nakao K. 1999. High mobility group (HMG) non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG2 are significant target antigens of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune hepatitis. Gut. 44(6): 867-873.
- 161. Spilianakis C.G., Lalioti M.D., Town T., Lee G.R., Flavell R.A. 2005. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. Nature. 435 (7042): 637–645.
- 162. Spirin A. S. 1958. Spectrophotometric determination of total nucleic acids. Biokhimiia. 23(5): 656–662.

- 163. Stros M., Stokova J., Thomas J.O. 1994. DNA looping by the HMG-box domains of HMG1 and modulation of DNA binding by the acidic C-terminal domain. Nuc. Acids Res. 22: 1044-1051.
- 164. Stros M., Launholt D., Grasser K.D. 2007. The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. Cell. Mol. Life Sci. 64: 2590– 2606.
- Stros M. 2010. HMGB proteins: Interactions with DNA and chromatin. Biochim. et Biophys. Acta. 1799: 101–113.
- 166. Stryer L. 1995. Biochemistry. 4th ed, chapter 4: 83-87.
- 167. Struhl, K. 1998. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms Genes Dev, 12: 599-606.
- 168. Tang D., Kang R., Coyne C.B., Zeh H.J., Lotze M.T. 2012. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. Immunol Rev. 249: 158-175.
- 169. Taguchi A., Blood D.C., del Toro G., Canet A., Lee D.C., Qu W., Tanji N., Lu Y., Lalla E., Fu C., Hofmann M.A., Kislinger T., Ingram M., Lu A., Tanaka H., Hori O., Ogawa S., Stern D.M., Schmidt A.M. 2000. Blockade of RAGE amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. Nature. 405: 354-360.
- 170. Teo S.-H., Grasser K.D., Hardman C.H., Broadhurst R.W., Laue E.D., Thomas J.O. 1995. Two mutations in the HMGB-box with very different structural consequences provide insights into the nature of binding to four-way junction DNA. EMBO J. 14: 3844-3853.
- 171. Thoma F., Koller T., Klug A. 1979. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. J. Cell Biol. 83: 403–427.
- 172. Thomas J.O., Rees C., Finch J.T. 1992. Cooperative binding of the globular domains of histones H1 and H5 to DNA. Nucleic Acids Res. 20: 187–194.
- 173. Thomas J.O., Wilson C.M. 1986. Selective radiolabelling and identification of a strong nucleosome binding site on the globular domain of histone H5. EMBO J. 5: 3531–3537.
- 174. Thomas J.O., Travers A.A. 2001. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNAbinding proteins. Trends Biochem. Sci. 26: 167–174.

- 175. Tian J., Avalos A.M., Mao S.Y., Chen B., Senthil K., Wu H., et al. 2007. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. Nat Immunol. 8: 487-496.
- 176. Totsingan F., Bell AJ Jr. 2013. Interaction of HMG proteins and H1 with hybrid PNA-DNA junctions. Protein Sci. 22 (11): 1552-1562.
- 177. Travers A.A., Thomas J. O. 2004. In: Chomatin Struture and Dynamics: State-of-the-Art / Eds. Zlatanova J., and Leuba S.H. UK.: Elsevier.: 103-133.
- 178. Travers AA. 2003. Priming the nucleosome: a role for HMGB proteins? EMBO Rep.4: 131-136.
- 179. Tsuda K., Kikichi M., Mori K., Waga S, Yoshida M. 1988. Pimari structure of nonhistone protein HMG1 revealed by the nucleotide sequence. Biochem. 27: 6159-6153.
- 180. Uversky V.N. 2002. What does it mean to be natively unfolded? Eur. J. Biochem. 269: 2-12.
- 181. Wada A., Yubuki S., Husumi Y. 1980. Fine structure in the thermal denaturation of DNA: high temperature-resolution spectrophotometric studies. CRC Crit Rev Biochem. 9: 87-144.
- Walker J.M., Gooderham K., Hastings J.R., Mayes E., Johns E.W. 1980. The primary structures of non-histone chromosomal proteins HMG 1 and 2. FEBS Lett. 122: 264-270.
- 183. Wang Q., Zeng M., Wang W., Tang J. 2007. The HMGB1 acidic tail regulates HMGB1 DNA binding specificity by a unique mechanism. Biochem Biophys Res Commun. 360(1): 14-19.
- 184. Watson M., Stott K., J. O. Thomas. 2007. Mapping Intramolecular Interaction between Domains in HMGB1 using Tail-truncation Approah. J. Mol. Biol. 374: 1286-1297.
- 185. Weir H.M., Kraulis P.J., Hill C.S., Raine A.R., Laue E.D., Thomas J.O. 1993. Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG. EMBO J. 12: 1311 – 1319.
- Widom J. 1989. Toward a unified model of chromatin folding. An. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 18: 365–395.
- 187. Wisniewski J.R., Zougman A., Krüger S., Mann M. 2007. Mass spectrometric

mapping of linker histone H1 variants reveals multiple acetylations, methylations, and phosphorylation as well as differences between cell culture and tissue. Mol. Cell. Proteomics. 6: 72–87.

- Wood C. M., Nicholson J. M., Lambert S. J., Chantalat L., Reynolds C. D., Baldwin J. P. 2005. High-resolution structure of the native histone octamer. Acta Cryst. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Comm. 61: 541–545.
- 189. Woodcock C. L., Grigoryev S. A., Horowitz R. A., Whitaker N. 1993. A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 9021–9025.
- 190. Wu J., Grunstein M. 2000. 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. Trends Biochem Sci. 25(12): 619-623.
- 191. van Holde K., Zlatanova J. 1996. What determines the folding of the chromatin fiber. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 93: 10548–10555.
- 192. Xhemalce B., Dawson M.A., Bannister A.J. 2011. Histone modifications. In: Meyers R, ed. Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine. John Wiley and Sons, 2011: In Press.
- 193. Yang D., Arya G. 2011. Structure and binding of the H4 histone tail and the effects of lysine 16 acetylation. Phys. Chem. Chem. Phys. 13: 2911–2921.
- 194. Yang H., Hreggvidsdottir H.S., Palmblad K., Wang H., Ochani M., Li J., Lu B., Chavan S., Rosas-Ballina M., Al-Abed Y., Akira S., Bierhaus A., Erlandsson-Harris H., Andersson U., Tracey K.J. 2010. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. Proc Natl Acad Sci U S A. 107: 11942-11947.
- 195. Yingqi Xu, Wulin Yang, Jihui Wu., Shi Y. 2002. Solution Structure of the First HMG Box Domain in Human Upstream Binding Factor. Biochem. 41(17): 5415 – 5420.
- 196. Youn J.H., Shin J.S., Immunol J. 2006. Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion J. Immunol. 177: 7889-7897.
- 197. Yoshida M. 1987. High glutamic and aspartic region in nonhistone protein HMG(1+2) unwinds DNA double helical structure. J Biochem. 101: 175-180.

- 198. Yoshida M., Shimura K. 1984. Unwinding of DNA by nonhistone chromosomal protein HMG(1+2) from pig thimus as determined with endonuclease. J. Biochem.-95: 117-124.
- 199. Yoshikawa Y., Velichko Y., Ichiba Y., Yoshikawa K. 2001. Self-assembled pearling structure of long duplex DNA with histone H1. Eur. J. Biochem. 268: 2593-2599.
- 200. Zhou Y., Gershman S., Ramakrishnan V., Travers A., Muyldermans S. 1998. Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. Nature. 395: 402-405.
- 201. Zlatanova, J., Doenecke, D. 1994. Histone H1 zero: a major player in cell differentiation. FASEB J. 8: 1260–1268.
- 202. Zlatanova J. 1990. Histone H1 and the regulation of transcription of eukaryotic genes. Trends Biochem. Sci. 15: 273-276.
- 203. Zlatanova J., Yaneva J. 1991. Histone H1-DNA interactions and their relation to chromatin structure and function. DNA Cell Biol. 10: 239-248.
- 204. Zlatanova J., Leuba, S. H., Eds. .2004. Chromatin Structure and Dynamics: Stateof-the-Art. Elsevier New Comprehensive Biochemistry. 39: 507P. ISBN: 0-444-515941

БЛАГОДАРНОСТИ:

Работа была выполнена на базе лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук.

Масс-спектры белков HMGB1, HMGB2 и H1 получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий «СПбГПУ» на базе ФГАОУ ВО «СПбПУ» с участием н.с. Артамоновой Т.О.

Автор выражает глубокую благодарность сотрудникам лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток ИНЦ РАН Поляничко Александру Михайловичу, Костылевой Елене Ивановне, Скворцовой Елене Вячеславовне, Чихиржиной Елене Всеволодовне, Томилину Алексею Николаевичу за помощь в интерпритации и обсуждении полученных данных, моральную поддержку в процессе выполнения и написания работы.

Автор выражает глубокую благодарность дир. ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий «СПбГПУ» на базе ФГАОУ ВО «СПбПУ» к.ф.-м.н. Ходорковскому Михаилу Алексеевичу за предоставленную возможность использования оборудования центра в процессе выполнения работы.

Автор выражает глубокую благодарность научному сторуднику ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий «СПбГПУ» на базе ФГАОУ ВО «СПбПУ» Артамоновой Татьяне Олеговне за помощь в регистрации и анализе масс-спектров используемых в работе «линкерных» белков хроматина.