На правах рукописи

СТАРКОВА

Татьяна Юрьевна

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

03.01.03 - молекулярная биология

ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии Российской академии наук

Научные руководители:	Томилин Алексей Николаевич член-корр. РАН зав. лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток ФГБУН «Институт цитологии РАН», г. Санкт-Петербург		
	Чихиржина Елена Всеволодовна кандидат биологических наук, доцент старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток ФГБУН «Институт цитологии РАН», г. Санкт-Петербург		
Официальные оппоненты	Паткин Евгений Львович доктор биологических наук, профессор зав. лаборатории молекулярной цитогенетики развития млекопитающих Отдела Молекулярной генетики ФГБУН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург		
	Конев Александр Юрьевич кандидат биологических наук старший научный сотрудник лаборатории генетики эукариот Отдел молекулярной и радиационной биофизики ФГБУ «ПИЯФ» НИЦ КИ, г. Гатчина, Ленинградской обл.		
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва		

Защита состоится «<u>19 июня</u>» 2015 года в <u>12.00</u> часов на заседании диссертационного совета Д 002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу:

194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д .4 Сайт института: www.cytspb.rssi.ru Адрес электронной почты института: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru Факс института (812) 297-03-41 С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института цитологии РАН www.cytspb.rssi.ru

Реферат разослан «_____» 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Хроматин эукариотических клеток представляет собой сложный высоко динамичный ДНК-белковый комплекс, структурная организация и функционирование которого напрямую связаны с взаимодействием между его структурными элементами: ДНК и белками. При этом регуляция ДНК-белкового и белокбелкового 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 посттрансляционных 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 «НМGВ-домена» структурного элемента размером порядка 80 аминокислотных остатка, обладающего как аминокислотной высокой консервативностью последовательности, так И пространственной организации. Белок HMGB1 и схожий с ним HMGB2 относятся к группе двухдоменных белков. Основным отличием в их структуре является длина Сконцевого фрагмента; в связи с этим, эти два белка очень часто исследуются в тандеме, в предположении, что взаимодействие HMGB-доменов белков с ДНК носит схожий характер. Однако длина С-концевого участка молекул НМGВ1 и НМGВ2 может оказывать влияние на их пространственную укладку. В литературе предполагается возможность формирования двух 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 другими 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 H1 взаимодействуют с ДНК на линкерном участке в непосредственной близости друг от друга, в последнее время в литературе активно обсуждается формирование H1-HMGB1 структурно-регуляторного 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:

1. Определить вторичную структуру полноразмерного природного белка HMGB1 в условиях эксперимента и охарактеризовать ее термодинамическую стабильность

2. 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 Н1

Материал и методы исследования:

Негистоновый хромосомный белок НМGВ1 и линкерный гистон Н1

Белки экстрагировали из зобной железы теленка 5%-ной хлорной кислотой с последующим осаждением охлажденным подкисленным ацетоном при -20 °C. Белок HMGB1 осаждали 5 объемами ацетона, а гистон H1 – тремя. Дальнейшая очистка белков была проведена в системе FPLC. Идентификацию и чистоту выделенных препаратов проводили методом денатурирующего гель-электрофореза по методу Лэммли [1].

Плазмидная ДНК рUC19

Плазмидную ДНК выделяли из трансформированных ранее плазмидой pUC19 бактериальных клеток HB101 методом щелочного лизиса [2].

Высокомолекулярная ДНК тимуса теленка

Использовали коммерческий препарат ДНК тимуса теленка Sigma (Type II) без дополнительной очистки.

Спектрометрия кругового дихроизма

Спектры кругового дихроизма ДНК-белковых и белковых комплексов в УФ диапазоне регистрировали на приборах Mark V (Jobin Yvon, Франция) и Jasco J-518 (Япония) соответственно. Калибровку осуществляли с помощью D-10-камфорсульфоновой кислоты. Использовали цилиндрические кварцевые кюветы с длиной оптического пути L 0,5 см и 1 см в диапазоне от 195 до 320 нм с шагом в 1 нм. На каждой длине волны проводили усреднение сигнала КД по 1000 измерениям, с константой интегрирования 1 с. Сглаживание спектров производили по методу Савитского-Голея с рамкой сглаживания 15 точек. Анализ данных проводили с помощью пакета Origin 8,1. Для анализа спектров КД белков в свободном состоянии и в комплексе с ДНК использовали программы CDNN, K_2D и эмпирическую формулу [3].

Спектрофотометрическое плавление

Спектры поглощения в УФ диапазоне регистрировали на двулучевом сканирующем спектрофотометре Specord-M40 («Karl Zeiss», Германия), оснащенном Пельтьеприставкой TSE1 для плавления. Термостатирование холодного спая элемента Пельтье осуществляли при помощи водяного термостата ТЖ-ТС-01 (Россия) с внешним контуром. Измерения проводили в кварцевых прямоугольных кюветах с L = 1 см.

Двухмерный гель-электрофорез

Для разделения подфракций гистона H1 использовали методику двухмерного электрофореза, адаптированную Ковальским с соавт. [4]. В качестве *первого направления* использовали электрофорез в 15%-ном полиакриламидном геле в системе уксусная кислота/мочевина. Разделение белков *во втором направлении* осуществляли в ПААГ в присутствии ДДС-Na с использованием двухступенчатой системы. Документирование полученной электрофореграммы осуществляли при помощи гель-документирующей системы Gel-Imager-2

МАЛДИ масс-спектрометрия

Подготовка образцов: Ферментативный гидролиз белкового препарата трипсином проводили непосредственно в геле в течение 4 ч при 37 °C. Гидролиз останавливали с помощью 0,5 % ТФУ в 10 %-ном растворе водного ацетонитрила. Надгелевый раствор

использовали для получения МАЛДИ масс- спектров на Varian 902-MS MALDI массспектрометре со сверхпроводящим магнитом 9,4 Тесла, оснащенным УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов в диапазоне масс 500-3000 m/z.

Обработку полученных масс-спектров проводили 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).

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 α-спиральной 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 одного из белков. В работе впервые выявлены сайты следующих посттрансляционных 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 в положениях РТ51 или PS53, РТ77 или РУ78, РУ155. Подтверждено наличие сайта ацетилирования HMGB1 в положении K81, 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 АсК57, 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 [5-7] широко используемого в клинической практике противоопухолевого препарата цисплатина. Полученные данные могут быть использованы при подготовке специалистов в области молекулярной биологии и биофизики.

6

Обоснованность и достоверность основных результатов и выводов работы обеспечивается использованием современного оборудования, отработанных методик выделения биологического материала, методов обработки и анализа данных, высокой воспроизводимостью полученных результатов.

Апробация работы. Результаты работы докладывались и обсуждались на международных и российских научных конференциях: 13-ая и 12-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 молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической 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 на базе Научно-исследовательского комплекса «Нанобио» ФГАОУ ВО СПбПУ с участием н.с. Артамоновой Т.О. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научными руководителями.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов, обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 204 ссылки. Диссертация изложена на 125 страницах с 47 рисунками и 8 таблицами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Исследование вторичной структуры и термодинамической стабильности белка HMGB1 в свободном состоянии проводили методом кругового дихроизма в УФ диапазоне. Спектр КД белка HMGB1 (рис.1) при температуре 20 °C в растворе 3 мМ 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 частично в α -спиральной конформации [8]. 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 [A1-A4, A7].

Кривая плавления f HMGB1, построенная на основе зависимости КД HMGB1 от температуры на 222 нм, представлена на вставке рисунка 1, А. Согласно полученным нами данным, температура плавления молекулы HMGB1 составляет (42,0 ±0,5) °C, ширина интервала плавления – порядка 20 °C.



Рисунок 1. А: Спектры КД и кривые плавления f и df/dT HMGB1 в 0.25 мМ ЭДТА. 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.1, Б) свидетельствует о возникновении в системе рассеяния. Причиной появления рассеяния в процессе термического разворачивания белковой молекулы, вероятно, является формирование белковых агрегатов вследствие хаотичных межбелковых взаимодействий [9]. 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.1, А). В дальнейшем, чтобы исключить вклад белок-белковых взаимодействий в спектр поглощения ДНКкомплекса, при исследовании термодинамических характеристик мы белкового ограничились областью концентраций HMGB1, не превышающих 20 мкг/мл. При такой концентрации не происходят структурные изменения белка, которые могут быть зафиксированы в наших условиях, и нет рассеяния в системе. Таким образом, при СНМGB1 ≤ 20 мкг/мл на 260 нм мы сможем разделить вклады ДНК и белка в кривую плавления комплекса и проследить за изменением термодинамических характеристик ДНК при связывании с HMGB1.

Анализ вторичной структуры белка НМСВ1 при взаимодействии с ДНК

Как было отмечено выше, спектр КД свободного HMGB1 (рис.2, А, кривая 2) представляет собой две перекрывающиеся отрицательные полосы с максимумами в области 205 и 222 нм; профиль спектра характерен для белков, находящихся частично в α-спиральной конформации. 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 [A1-A4, A7].



Рисунок 2. Спектры КД комплексов HMGB1 с ДНК. А: Спектры кругового дихроизма комплексов HMGB1 с высокомолекулярной ДНК тимуса теленка в 15 мМ NaCl. На дорожках представлены: 1 – ДНК, Сднк = 60 мкг/мл; 2 – HMGB1, С_{НМGB1} = 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 pUC19.

Спектр КД ДНК, как в случае высокомолекулярной ДНК тимуса теленка (рис.2, A, кривая 1), так и в случае плазмидной ДНК pUC19 (рис.2, 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 3. А: Зависимость ΔA_{270} от г (W/W). Сднк теленка = 60 мкг/мл, $C_{pUC19} = 60$ мкг/мл. Длина оптического пути составляла 0,5 см. Концентрация ДНК в растворе поддерживалась постоянной. ДНКбелковые комплексы приготавливались прямым смешением. Б: Зависимость доли аминокислотных остатков, находящихся в α -спиральной конформации, от весового соотношения *r* белок/ДНК в растворе.

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. В связи с тем, что регистрируемые изменения в структуре ДНК при связывании с HMGB1 в области 275 нм не превышают 10 % (рис.3, А), при оценке α-спиральности белка в комплексе с ДНК на длине волны 222 нм ими можно пренебречь в силу близости КД ДНК к нулю.

В связи с совпадением зависимости доли α -спиральных участков в молекуле HMGB1 в комплексе с pUC19 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 г в комплексе с высокомолекулярной ДНК тимуса теленка демонстрирует достаточно быстрое падение до уровня ~35 % при увеличении г 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 $\alpha(r)$ к нулевым значениям г и оценена как ~54 % [A3].

Анализ вторичной структуры белка HMGB1 при взаимодействии с ДНК

При исследовании вторичной структуры HMGB1 в комплексе с линкерным гистоном H1 количественную оценку провести крайне сложно, поскольку спектры КД HMGB1 и H1 (рис. 4) обусловлены вкладом хромофоров одного типа. В данном случае регистрируемые изменения в структуре белков при комплексообразовании мы не можем соотнести с конкретным белком. Однако мы можем провести качественно сравнительный анализ вклада общего числа хромофоров в спектр КД комплекса при отсутствии взаимодействия (теоретическая кривая, полученная путем суммирования спектров исходных компонентов) (рис.4, 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.



Рисунок 4. Спектры КД HMGB1, H1 и HMGB1-H1 комплекса в 3 мМ NaCl. 1 – спектр КД H1 в свободном состоянии, 2 – спектр КД HMGB1 в свободном состоянии, 3 – алгебраическая сумма спектров КД белков в свободном состоянии, 4 – экспериментальная зависимость эллиптичности комплекса HMGB1 с H1 от длины волны.

Согласно данным динамического светорассеяния [A16], гидродинамические радиусы HMGB1 и H1 в свободных состояниях составляют 5,8 нм и 3 нм соответственно. В водном растворе при молярном соотношении белков 1:1 формируется комплекс HMGB1-H1 с гидродинамическим радиусом 9,1 нм. Согласно полученным данным, одна молекула HMGB1 взаимодействует с одной молекулой H1 с образованием комплекса по типу гетеродимера.

Исследование термостабильности ДНК в комплексе с HMGB1

Конформационный переход из нативного в денатурированное состояние ДНК, как в свободном состоянии, так и при взаимодействии с HMGB1, регистрировали при 260 нм методом термической денатурации. Показано, что дифференциальная кривая плавления ДНК df/dT в свободном состоянии характеризуется наличием одного максимума $T'_m = (45,0 \pm 0,5)$ °C (рис.5, кривая 1), что соответствует температуре плавления свободной ДНК в растворе.

Особенностью дифференциальной кривой плавления ДНК-белкового комплекса является наличие двух максимумов [A5, A6]. Положение первого максимума на оси температуры совпадает с областью плавления ДНК в свободном состоянии $T'_m = (45,0 \pm 0,5)$ °C и соответствует плавлению участков макромолекулы, не связанных с белком. Второй максимум в области $T''_m = (62,0 \pm 0,5)$ °C соотносится с плавлением участков ДНК, связанных с белком [A7].



Рисунок 5. Кривая плавления f комплекса и ее первая производная df/dT комплексов ДHK-HMGB1 от температуры. Концентрация ДHK в пробе составляет 30 мкг/мл. Длина оптического пути 1 см. 1 – ДHK; 2 – r = 0.15; 3 – r = 0.5.

Перераспределение интенсивности пиков характеризует уменьшение количества свободной ДНК и увеличение ДНК, связанной с белком. На основе полученных данных мы рассчитали долю пар оснований, вовлечённых в связывание с HMGB1, размер участка связывания на ДНК, и оценили молярное соотношение R белок/ДНК_{связ} в растворе. Согласно проведенным расчетам, размер участка связывания HMGB1 на ДНК при r = 0,15 составил 13 пар оснований, что неплохо согласуется с литературными данными. Смещение пика, соответствующего плавлению участков ДНК, связанных с HMGB1, указывает на стабилизацию ДНК в составе комплекса.

Посттрансляционные модификации подтипов линкерного гистона Н1

В водном растворе белка Н1 одновременно присутствуют 7 близких по аминокислотному составу подтипов. В связи с этим первоначально подтипы Н1 разделяли методом двухмерного гель-электрофореза. В результате двухмерного гель-электрофореза было получено 9 белковых зон, в пяти из которых (№№ 3–6, 8) методом МАЛДИ массспектрометрии были обнаружены подтипы гистона Н1. В двух – белки HMGB1 (зона № 1) и HMGB2 (зона № 2). Зоны № 7 и № 9 также были подвергнуты спектральному анализу (результаты не представлены), однако в этом случае четко соотнести их белковую природу с определенным подтипом Н1 не удалось. Выявленные после анализа массспектров посттрансляционные модификации гистона Н1 представлены в таблице.





Рисунок 6. Двухмерный гель-электрофорез Н1-обогащенной фракции тимуса теленка.

Рисунок 7. Масс-спектр Н1-обогащенной подфракции. Зона № 3. На спектре отмечены наиболее интенсивные линии.

Таблица.	Посттрансляционные	модификации	гистона	H1	теленка.	Жирным	шрифтом
отмечены	модификации, согласу	ющиеся с литер	оатурным	и да	нными [1	0].	

Подтип гистона Н1	Модификация	Сайт модификации			
	Δυστυπικορομικο	A 2K85: A 2K128: A 2K127: 2K120			
	Ацетилирование	MotV52: MotV55: MotV92: MotV102:			
H1.0	Метилирование	MetK102, MetK132, MetK102, MetK108; MetK132; MetK136			
		PS45; PS46; PS49; PY53; 2P из T77, T78,			
	Фосфорилирование	Т84, S90 и S92; PS131; PS135; PT162			
	Ацетилирование	АсК17 , 1 Ас из К22, К23 и К24			
H1.1	Метилирование	1 Met из K36, K37; MetK55			
	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	МеtК46; 1Меt из К117, К119; МеtК152			
	Фосфорилирование	1Р из Т144, Т146, S150 или Т151			

Сравнение белков, выделенных из тимуса теленка, мыши и крысы (данные представлены частично), свидетельствует о высокой межвидовой консервативности характера и положения посттрансляционных модификаций подтипов гистона H1. Однако внутри одного организма модификации подтипов H1 различны.

14

Посттрансляционные модификации гистона H1.0 расположены, в основном, в глобулярном домене и С-концевом участке белка. 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.

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 [A17, A18]. N-концевые и С-концевые участки подтипов H1.1, H1.2, H1.3 и H1.4 гистона H1 характеризуются наличием сайта ацетилирования в положении K17 и обогащенной посттрансляционными модификациями (в большей степени ацетилированием и фосфорилированием) области, начиная примерно с 140 а.к.о, продолжительностью порядка 15 а.к.о. соответственно (рис. 8).

	Ρ	10	Ac 20	30	Met 40	50	Met 60
H1.1	MSETAP	/AQA	ASTATE	AKKTKKPAKA	AAPRKKPAGP	SVSELIVQAV	SSSKERSGVS
H1.2	MSEAAPA	AAPA	Ac AAPPAE APA	KKKAAKKPAG	VRRKASGPPV	Met SELITKAVAA	SKERSGVSLA
H1.3	MSETAP	AAPA	AC APAPVE TPV	KKKAKKTGAA	AGKRKASGPP	Met VSELITKAVA	ASKERSGVSL
H1.4	MSETAP	AAPA	Ac APAPAE T TPV	KKKARKAAGG	AKRKTSGEPV	Met SELITKAVAA	SKERSGVSLA
H1.0	MTENST	STPA	AKPKRAKASK	KSTDHPKYSD	MIVAAIQAEK	NRAGSSRQSI	QKYIKSHYKV
CALLS IN THE	_	70	80	90	100	110	120
H1.1	LAALKK	SLAA	AGYDVEKNNS	RIKLGLKSLV	NKGTLVQTKG	TGAAGSFKLN	KKAESKAITT
H1.2	ALKAL	AAAG	YDVEKNNSRI	KLGLKSLVSK	GILVQTKGTG	ASGSFKLNKK	AASGEAKPQA
H1.3	AAL K KA Ac	LAAA	GYDVEKNNSR	IKLGLKSLVS	KGTLVQTKGT	GASGSFKLNK	KAASGEAKPK 1Met
H1.4	ALKAL	AAAG	YDVEKNNSRI	KLGLKSLVSK	GTLVQTKGTG	ASGSFKLNKK	AASGEAKPKA
				2P P	Р	Met Met	
H1.0	GENADS	ÕIKT	SIKRLVTTGV	LKQTKGVGAS	GSFRLAKSDE	PKRSVAFKKT	KKEVKKVATP
H1.1	KVSVKA	130 KASG	140 AAKKPKKTAG	AAAKKTVKTP	160 KKPKKPAVSK	170 KTSKSPKKPK	VVKAKKVAKS
U1 0	WWA CA AL	~~~~	DACAAVUDUU	IP, ZA	C	DAAAUTUUU	AVCDUVAVUT
п1.2	KKAGAA	NANN	PAGAARAPAR		AMATPARAR	PAAAAVINN	AKSPKKAKVI
H1.3	AKKAGA	AKAK	KPAGAAKKPK	KSTGAATP	AAKKTPKKAK	KPAAAAGAKK	VSKSPKKVKA
				1P AcAd	P Met		
H1.4	KRAGAA	KAKK	PAGAAKKPKK	AAGTATA S	TKKTPKKAKK	PAAAAGAKKA	KSPKKAKATK
H1.0	KKAAKP	Ac I K K AA	Met PMetAcAc SKAPSKAPKA	TPVKKAKKKP	AATPKKTKKP	P KTVKAKPVKA	SKPKKTKPVK
H1.1	PAKAKA	190 VKPK	200 ASKAKVTKPK	210 TPAKPKKAAP	KKK		<u></u>
H1.2	KEKKAK	SASK	AVKPKAAKPK	VAKAKKVAAK	KK		
H1.3	AKEKKA	AKSP	AKAKAPKAKA	SKPKASKPKA	TKAKKAAPPK	ĸ	
H1.4	AKKAPK	SPAK	AKTVKPKAAK	PKTSKPKAAK	PKKTAAKKK		
H1.0	PKAKSS	AKRT	GKKK				

Рисунок 8. Посттрансляционные модификации линкерного гистона H1. Выделение черным – ацетилирование по лизину (Ac), серым – метилирование (Met), светло-серым – фосфорилирование (P). Прямоугольником отмечены аминокислотные остатки, входящие в глобулярный домен белков.

Введение клеточной системой в N- и С-концевые домены белков отрицательного заряда может способствовать ослаблению взаимодействия с ДНК данных участков полипептидной цепи белковых молекул.

Согласно литературным данным [11], N- и C- концевые домены гистона H1, стягивая между собой нуклеосомы, принимают непосредственное участие в формировании 30-ти нанометровой фибриллы. Нарушение связывания H1 с ДНК в области N- и C-конца, 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.

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. Методом МАЛДИ масс-спектрометрии нами были обнаружены следующие посттрансляционные модификации HMGB1: AcK50, AcK59, AcK65, AcK68, AcK81, AcK86-88, AcK90, AcK162, MetR70 или MetR73, MetK76, MetK154, МеtК157, МеtК167, МеtК171. Вместо метилирования МеtК167 и МеtК171 возможно диметилирование в одном из этих двух положений. Обнаружены три области фосфорилирования: РТ51 или **PS53**, РТ77 или PY78, PY155. Здесь и ниже по тексту жирным шрифтом отмечены сайты модификаций, согласующиеся с литературными данными [12]. Для удобства восприятия полученных данных выявленные в работе сайты посттрансляционных модификаций HMGB1 отмечены на аминокислотной последовательности белка (рис.9).

Обнаружены сайты посттрансляционных 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. 10). 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.

Отсутствие ацетилирования в областях NLS1 и NLS2 (от англ. Nuclear localization sequences) свидетельствует о ядерной локализации исследуемых в работе HMGB1 и

НМGB2 [13]. При этом функционирование HMGB1 и HMGB2 напрямую связано с конформацией белковых молекул. Свернутое, неактивное, состояние характеризуется взаимодействием отрицательно заряженного С-концевого участка белковой молекулы с аминокислотными остатками R72, K81, I158, R162, K164, что приводит к его расположению в полости между двумя положительно заряженными ДНК-связывающими доменами и стабилизации белковой молекулы [14].



Рисунок 9. Посттрансляционные модификации белка HMGB1. Обозначения: Ас — ацетилирование, Met — метилирование, Р — фосфорилирование, dimetyl-диметилирование. Спорные сайты модификаций отмечены знаком «?». Серым выделены аминокислотные остатки, входящие в NLS (от англ. Nuclear localization sequences) и функционально важные области аминокислотной последовательности белка. Прямоугольником отмечены аминокислотные остатки, входящие в A и B HMGB-домены белка.



Рисунок 10. Посттрансляционные модификации HMGB2. Обозначения: Ас — ацетилирование, Met — метилирование, Р — фосфорилирование. Спорные сайты модификаций отмечены знаком «?».Серым выделены аминокислотные остатки, входящие в NLS (от англ. Nuclear localization sequences) и функционально важные области аминокислотной последовательности белка. Прямоугольником отмечены аминокислотные остатки, входящие в A и B HMGB-домены белка.

Переход в функционально-активное состояние сопровождается нарушением 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 K81 [A17, A18]. 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 метилирование остатка лизина K82. Поскольку белок HMGB2 на 10 аминокислотных остатка в С-концевом домене короче своего гомолога, взаимодействие линкера с аминокислотными остатками этого участка 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.

Согласно литературным данным, взаимодействие белков HMGB1 и HMGB2 с ДНК осуществляется посредством однодоменного (В-доменом) и, в случае АТ-богатых участков ДНК, двухдоменного связывания. В ДНК эукариотических клеток АТ-богатыми последовательностями зачастую характеризуются промоторные области генов [15] примерно на 30 нуклеотидов выше сайта инициации транскрипции [16]. Посадка транскрипционных факторов на ДНК осуществляется путем формирования промежуточного тройного комплекса «фактор транскрипции/HMGB1/ДНК» [12], при этом за связывание транскрипционных факторов с HMGB1 отвечает А-домен белка. Согласно полученным нами данным, экранирование положительного заряда ДНК-связывающих доменов белков HMGB1 и HMGB2 вследствие ацетилирования аминокислотных остатков лизина в положениях АсК50-К80 может способствовать ослаблению взаимодействия Адомена 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 9 и 10 в области А-домена белков полипептидная отмечена последовательность, отвечающая связывание за транскрипционного фактора р53.

Анализ расположения модификаций аминокислотной последовательности Вдомена белков показал, что большинство сайтов метилирования находятся в области

18

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 HMGB белков с ДНК.

При сравнении белков, выделенных из тимуса теленка и крысы, нами было показано, что характер и положение посттрансляционных модификаций в HMGB1 и HMGB2 отличаются высокой межвидовой консервативностью [A17, A18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди выявленных в работе модификаций подтипов гистонов H1.1-H1.4 доминируют модификации положительно заряженных остатков лизина в области N- и Cконцевых 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 (рис. 11).



Рисунок 11. Модель функционирования НМGВ1 в ядре клетки.

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. 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 «TF/HMGB1/ДНК». При этом функционально-значимые для выполнения внеклеточных функций участки В-домена белка, в частности, область связывания RAGE 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 α-спиральной конформации, в то время как связывание HMGB1 с плазмидной ДНК pUC19 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 подтипов гистонов H1.1-H1.4 доминируют модификации положительно заряженных остатков лизина в области N- и C-концевых участков, что приводит к уменьшению положительного заряда полипептидной цепи вне ДНК-связывающего глобулярного домена белка.

7. Характер и расположение посттрансляционных модификаций белка HMGB1 и гистона H1отличаюся высокой межвидовой консервативностью.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ Статьи

А1. 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

А2. 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.

А3. 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

А4. 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.

А5. Чихиржина Е.В., **Старкова Т.Ю.**, Костылева Е.И., Чихиржина Г.И., Воробьев В.И., Поляничко А.М. 2011. Взаимодействие ДНК со спермий-специфическими гистонами семейства Н1. Цитология. 53(10): 70–75.

A6. 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

A7. 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

А8. 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.

A9. 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.

А10. 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-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология наука XXI века». 28 сентября – 2 октября 2009 г, Пущино, Россия. Сборник тезисов, 41.

А11. 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.

А12. 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

A13. 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. 7th Saint-Petersburg Young Scientists Conference "Modern problems of polymer science", October 17-20, 2011. Abstract Book: 44.

А14. 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).

А15. 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.

A16. 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.

A17. Sitnikova A., **Starkova (Rodionova)** T., Artamonova T., Karpenko V., Polyanichko A., Chikhirzhina E., Kostyleva E., Tomilin A. 2013. Application of mass spectrometry to the characterization of post-translational modifications of chromosomal proteins. FEBS Journal. 280 (Suppl. 1): 131.

А18. 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

 Laemmli U.K. 1970. Nature. 227(5259): 680–685; 2. Мазин А.В., Кузнеделов К.Д., Краев А.С. и др. 1990. Наука. СО РАН. 248С.; 3. Morrow J. A., Segall M. L., Lund-Katz S., Phillips M. C., Knapp M., Rupp B., Weisgraber K.H. 2000. Biochem. 39(38): 11657–11666; 4. Kowalski A., Pałyga J. 2012. Gel Electrophoresis – Principles and Basics. 117–136; 5. Bruhn S.L., Phil P.M., Eissigman J.M., Houseman D.E., Lippard S.J. 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 2307–2311; 6. Park S., Lippard S.J. 2011. Biochem. 50: 2567–2574; 7. Park S., Lippard S.J. 2012. Biochem. 51: 6728–6737; 8. Greenfield N., Fasman G. D. 1969. Biochem. 8: 4108–4116.
Knapp S., Muller S., Digilio G. et al. 2004. Biochem. 43: 11992–11997; 10.Wisniewski J.R., Zougman A., Krüger S., Mann M. 2007. Mol. Cell. Proteomics. 6: 72–87. 11. Jerzmanowski A. The linker histones. In: Chomatin Struture and Dynamics: State-of-the-Art / Eds. Zlatanova J.,and Leuba S.H. UK.: Elsevier, 2004.- P. 75–102. 12. Stros M. 2010. Biochim. Biophys. Acta. 1799: 101–113. 13. Kang R., Zhang Q., Zeh H.J., Lotze M., Tang D. 2013. Clin. Cancer Res. 19(15): 4046–4057. 14. Watson M., Stott K., Thomas J.O. 2007. J. Mol. Biol. 374: 1286-1297; 15. Smale S.T., Kadonaga J.T. 2003. Annu Rev. Biochem. 72: 449–479; 16. Barrett L.W., Fletcher S., Wilton S.D. 2013. SpringerBriefs in Biochem. and Mol. Biol. 57 p.