

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.322.7, 577.323.7, 535.56, 543.422.8

### СТРУКТУРА КОМПЛЕКСОВ ДНК С ХРОМОСОМНЫМ БЕЛКОМ HMGB1 И ГИСТОНОМ H1 В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ МАРГАНЦА.

#### 1. СПЕКТРОСКОПИЯ КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА

© 2011 г. Е. В. Чихиржина<sup>1#\*</sup>, А. М. Поляничко<sup>1, 2#</sup>, Е. И. Костылева<sup>1</sup>, В. И. Воробьев<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064

<sup>2</sup>Физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, 198504

Поступила в редакцию 11.06.2010 г.

Принята к печати 07.07.2010 г.

Работа посвящена исследованию механизмов взаимодействия с ДНК негистонового белка HMGB1 и линкерного гистона H1 – белков хроматина, расположенных в его межнуклеосомных участках. Методами кругового дихроизма и абсорбционной спектроскопии в УФ-области спектра показано, что свойства образующихся ДНК-белковых комплексов зависят от содержания в них белкового компонента и не являются результатом простого суммирования эффектов, возникающих при взаимодействии с ДНК каждого из этих белков в отдельности. Связывание белка HMGB1 и гистона H1 с ДНК не носит конкурентный характер, а напротив, обладает признаками кооперативного взаимодействия. Богатый лизином гистон H1 облегчает связывание HMGB1 с ДНК, предположительно путем экранирования отрицательно заряженных групп сахаро-фосфатного остова ДНК и остатков дикарбоновых аминокислот в С-концевом домене белка HMGB1. Совместное действие белков HMGB1 и H1 стимулирует конденсацию ДНК с образованием анизотропных ДНК-белковых комплексов, характеризующихся  $\psi$ -типом спектра КД ДНК. Структурная организация этих комплексов зависит не только от характера ДНК-белковых взаимодействий, но в значительной степени также и от взаимодействия связанных с ДНК молекул белка HMGB1 и H1 между собой. Ионы марганца существенно модифицируют характер взаимодействия компонентов в сложном тройном комплексе ДНК-HMGB1-H1. Связывание ионов  $Mn^{2+}$  приводит к ослаблению ДНК-белковых взаимодействий, но сопровождается усилением белок-белковых взаимодействий, способствующих конденсации ДНК и образованию ассоциатов.

**Ключевые слова:** ДНК, ДНК-белковые взаимодействия, ионы марганца, круговой дихроизм, линкерный гистон H1, негистоновый белок HMGB1.

THE STRUCTURE OF THE COMPLEXES OF DNA WITH CHROMOSOMAL PROTEIN HMGB1 AND HISTONE H1 IN THE PRESENCE OF MANGANESE IONS. I. CIRCULAR DICHOISM SPECTROSCOPY, by E. V. Chikhirzhina<sup>1#\*</sup>, A. M. Polyanchiko<sup>1, 2#</sup>, E. I. Kostyleva<sup>1</sup>, V. I. Vorobyev<sup>1, 2</sup> (<sup>1</sup>Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg, 194064 Russia, \*e-mail: chikhir@gmail.com; <sup>2</sup>Department of Physics, St.-Petersburg State University, St.-Petersburg, 198905 Russia). The mechanisms of interaction of the non-histone chromosomal protein HMGB1 and linker histone H1 with DNA have been studied using circular dichroism and absorption spectroscopy. Both of the proteins are located in the inter-nucleosomal regions of the chromatin. It was demonstrated that properties of the DNA-protein complexes depend on the protein content and cannot be considered as a simple summing up of the effects of individual protein components. Interaction of HMGB1 and H1 proteins is shown to be co-operative rather than competitive. Lysine-rich histone H1 facilitates the binding of the HMGB1 with DNA by screening the negatively charged groups of the sugar-phosphate backbone of DNA and dicarboxylic amino-acid residues in the C-terminal domain of the HMGB1 protein. The observed joint action of the HMGB1 and H1 proteins stimulates DNA condensation with formation of the anisotropic DNA-protein complexes with typical  $\psi$ -type CD spectra. Structural organization of the complexes depends not only on the DNA-protein interactions, but also on the interaction between HMGB1 and H1 protein molecules bound to DNA. Manganese ions significantly modify the character of interactions between the components in the triple DNA-HMGB1-H1 complex. Binding of  $Mn^{2+}$  ions causes the weakening of the DNA-protein interactions and strengthening the protein-protein interactions, which promote DNA condensation and formation of large DNA-protein particles in solution.

**Keywords:** CD spectroscopy, DNA, DNA-protein interactions, linker histone H1, manganese ions, nonhistone protein HMGB1.

# Авторы внесли равный вклад при подготовке работы.

\* Эл. почта: chikhir@gmail.com

## ВВЕДЕНИЕ

Работа посвящена изучению механизмов взаимодействия ДНК с такими ключевыми белками хроматина как линкерный гистон Н1 и негистоновый хромосомный белок НМГВ1. Эти белки расположены в межнуклеосомных участках хроматина. Однако структурные и функциональные отношения между ними до сих пор неизвестны.

Белок НМГВ1, принадлежащий к негистоновым белкам хроматина с высокой электрофоретической подвижностью (High Mobility Group protein В1), присутствует в ядрах клеток высших эукариот в значительных количествах (1 молекула на каждые 8–10 нуклеосом). Он имеет молекулярную массу 26.5 кДа и обладает четко выраженной доменной организацией. Белок НМГВ1 состоит из трех главных элементов: двух гомологичных ДНК-связывающих участков (НМГВ-доменов) и С-концевого отрицательно заряженного участка, который несет непрерывную последовательность из 30 остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот [1]. Отличительная особенность НМГВ1 – присутствие в его составе характерного структурного мотива – ДНК-связывающего НМГВ-домена. Этот структурный элемент, дважды повторяющийся в белке НМГВ1, также обнаружен во многих важных регуляторных белках [2]. Белок НМГВ1, связываясь с нативной ДНК по ее узкой бороздке, может индуцировать в ней значительные изгибы [3–5]. Детали этого взаимодействия и его специфичность до сих пор до конца не изучены. Хотя биологическая роль белка НМГВ1 в хроматине пока неизвестна, предполагают, что он может играть роль “архитектурного” фактора транскрипции, осуществляющего свои функции путем сборки на ДНК транскрипционно-активного многокомпонентного ДНК-белкового комплекса [4]. Присутствие гистона Н1 может препятствовать образованию такого комплекса.

Богатый лизинном гистон Н1 имеет молекулярную массу около 21 кДа. Его центральный глобулярный домен фланкирован коротким N-концевым и длинным С-концевым доменами. В среднем одна молекула гистона Н1 приходится на одну нуклеосому в хроматине. Связываясь своим глобулярным доменом с линкерной ДНК на входе/выходе из нуклеосомной частицы, гистон Н1 стабилизирует нуклеосому и определяет характер конденсации хроматина в клеточном ядре [5, 6].

Гистон Н1 и белок НМГВ1 расположены на противоположных концах нуклеосомы [7]. Тем не менее, возможно частичное перекрывание сайтов взаимодействия этих белков в межнуклеосомных участках хроматина, что может найти отражение в конкурентном характере взаимодействия этих белков с ДНК. Результаты настоящей работы, однако, показывают, что связывание с ДНК белков НМГВ1 и Н1 не носит конкурентный характер, а скорее проявляет черты кооперативного взаимодействия.

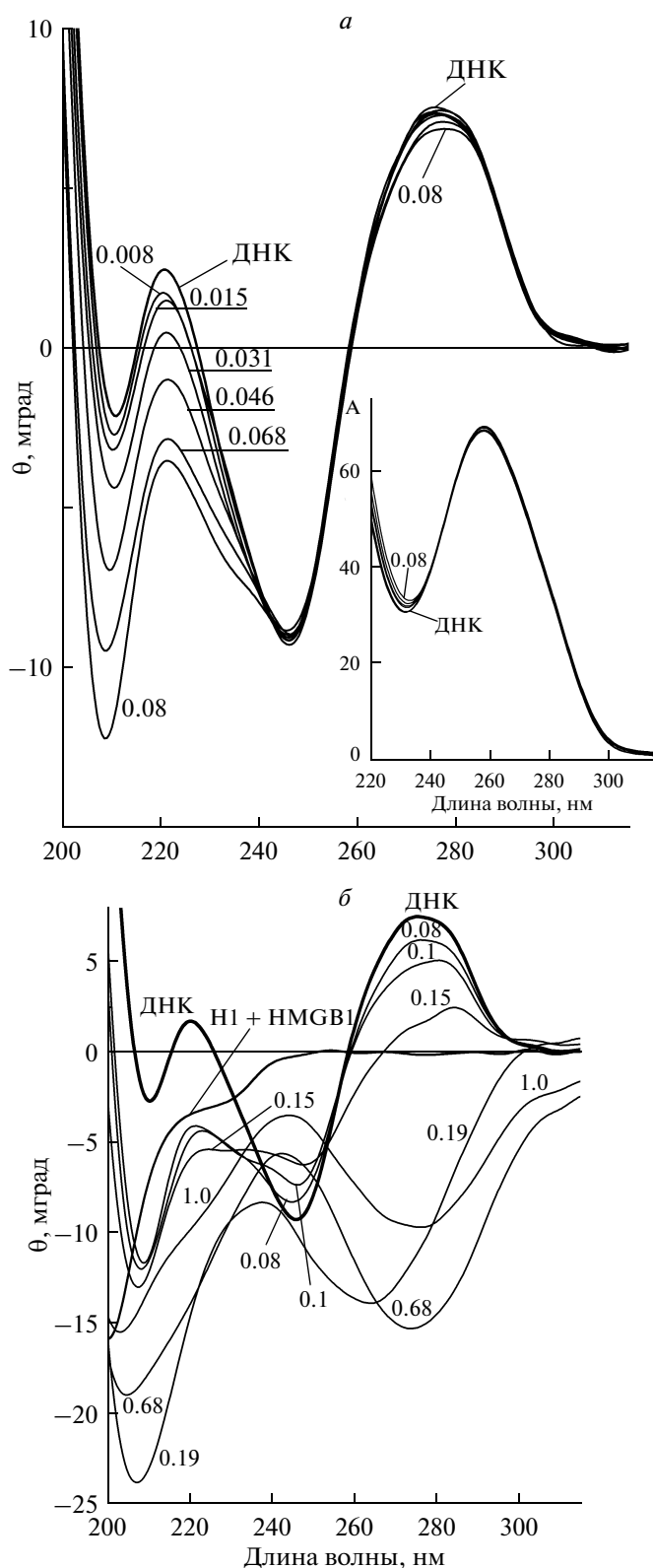
Известно, что многие процессы в клетке проходят при непосредственном участии двухвалентных катионов, в том числе и ионов марганца. Присутствие ионов марганца необходимо для функционирования многих ферментных систем [8–13] и реализации сложных ДНК-белковых взаимодействий [11, 12], проходящих и при участии НМГВ-доменных белков. К ним относят, например, некоторые процессы рекомбинации в клетках иммунной системы [14–16].

Ранее нами показано, что ионы двухвалентных металлов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  оказывают существенное влияние на ход взаимодействия белка НМГВ1 с ДНК [17, 18]. Несмотря на различный характер взаимодействия этих ионов с компонентами комплекса, их действие в целом вызывает локальные изменения структуры ДНК-белковых комплексов и приводит к изменению характера кооперативных взаимодействий между молекулами НМГВ1. При взаимодействии с ДНК ионы марганца оказывают заметное влияние на ее структуру, изменяя свойства участков связывания с белком НМГВ1. Присутствие ионов  $\text{Mn}^{2+}$  препятствует сборке конденсированных структур в комплексе ДНК с НМГВ1. Полученные в настоящей работе результаты показывают, что ионы марганца существенно модифицируют характер взаимодействия компонентов также и в сложном тройном комплексе ДНК–НМГВ1–Н1.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Линкерный гистон Н1** ( $M_r = 21$  кДа) и негистоновый хромосомный белок НМГВ1 ( $M_r = 26.5$  кДа) получены ранее описанными методами [19, 20]. Чтобы получить ДНК-белковые комплексы, приготовлен препарат, состоящий из смеси гистона Н1 и негистонового белка НМГВ1 тимуса теленка в весовом соотношении 3 : 1. Концентрация белков рассчитана по коэффициентам экстинкции: для Н1  $\epsilon_{230} = 41000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  и для НМГВ1  $\epsilon_{280} = 33000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  [21].

**ДНК-белковые комплексы.** Использована высокомолекулярная ДНК тимуса теленка (“Sigma”). Искусственные комплексы готовили методом медленного прямого смешивания равных объемов растворов ДНК и смеси белков Н1 и НМГВ1 в растворе 15 мМ NaCl. Концентрация ДНК в растворе комплекса составляла 300 мкг/мл. ДНК-белковые комплексы получали, исходя из весового соотношения белок/ДНК ( $r$ ) в растворе 0–2.0. После образования комплекса в систему добавляли раствор хлорида марганца в необходимой концентрации. Поведение комплексов ДНК–НМГВ1–Н1 в присутствии ионов марганца изучали в диапазоне концентраций  $\text{MnCl}_2$  от 0.1–10 мМ, что соответствует изменению молярного соотношения ионов  $\text{Mn}^{2+}$  к фосфатам ДНК  $[\text{Mn}]/[\text{P}]$  в интервале 0.1–11.



**Рис. 1.** Спектры КД (*a*, *b*) и спектры поглощения (врезка на *a*) комплексов ДНК с белками H1 и HMGB1 в растворе 15 мМ NaCl в присутствии 0.1 мМ  $MnCl_2$  в зависимости от весового соотношения  $r$  белок/ДНК (указано на рисунке). *a* –  $0.008 \leq r \leq 0.08$ , *b* –  $0.08 \leq r \leq 1.0$ . Значения поглощения указаны в условных единицах.

Спектры кругового дихроизма (КД) представлены в виде эллиптичности  $\theta$  [мград]. Измерения проводили в круглых кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 мм на спектрополяриметре “Jasco J-715” (Япония) в интервале 190–320 нм. При обработке спектров использовали стандартное программное обеспечение, поставляемое с прибором.

Применяли спектрально чистые препараты неорганических солей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании взаимодействия ДНК с линкерным гистоном H1 и негистоновым хромосомным белком HMGB1 мы использовали метод кругового дихроизма в УФ-области спектра, который чувствителен к конформации макромолекул и дает возможность фиксировать структурные изменения белков и ДНК при их взаимодействии. Этот метод особенно удобен для изучения белково-нуклеиновых комплексов, поскольку характерные спектры оптической активности белков и нуклеиновых кислот имеют различный вид и практически не перекрываются, что позволяет одновременно судить о структурных изменениях каждого компонента в отдельности.

Структурные изменения в полученных нами комплексах с белками HMGB1 и H1 изучали в 15 мМ растворе NaCl в зависимости от весового соотношения белок/ДНК  $r$ , одновременно регистрируя круговой дихроизм и УФ-поглощение в интервале 190–320 нм. Концентрацию ионов марганца изменяли в диапазоне 0.1–10 мМ.

Ионы марганца не вызывают заметных изменений спектров кругового дихроизма в растворах исследованных белков. Согласно полученным нами данным оптическая активность белка HMGB1 [17] и гистона H1 (данные не представлены) постоянна во всем исследованном диапазоне концентраций ионов  $Mn^{2+}$ . Это означает, что взаимодействие ионов марганца с белками HMGB1 и H1 не приводит к заметному изменению структуры этих белков.

Взаимодействие ионов марганца с ДНК, напротив, вызывает существенные изменения ее оптической активности в области 260–290 нм, что было подробно исследовано нами ранее [22, 23]. Интенсивность положительной полосы КД ДНК с максимумом около 275 нм постепенно падает с ростом концентрации ионов  $Mn^{2+}$ , что сопровождается небольшим сдвигом максимума до 283 нм. Отрицательная полоса спектра КД ДНК с минимумом при 245 нм не проявляет заметных спектральных изменений. Не обнаружены также изменения в коротковолновой области спектра при 205–230 нм.

Характерные спектры КД и спектры УФ-поглощения растворов комплексов ДНК с белками HMGB1 и H1 в присутствии 0.1 мМ  $MnCl_2$  представлены на рис. 1. Более низкие концентрации ионов

$Mn^{2+}$  не оказывают влияния на спектры КД ДНК-белковых комплексов. В зависимости от весового соотношения между белками и ДНК в комплексах (рис. 1) спектры КД и спектры УФ-поглощения можно разделить на две группы. Первая группа (рис. 1а) включает спектры комплексов с низким содержанием белка ( $0.008 \leq r \leq 0.08$ ), вторая группа (рис. 1б) – с более высоким ( $0.08 \leq r \leq 1.0$ ).

С ростом содержания белка в ДНК-белковых комплексах до  $r = 0.08$  в присутствии  $0.1 \text{ mM } MnCl_2$  происходит лишь незначительное уменьшение интенсивности положительной полосы КД ДНК с максимумом при 275 нм (рис. 1а). При этом практически не изменяются и спектры УФ-поглощения ДНК в комплексах с белками (рис. 1а, врезка). В то же время, в области длин волн меньше 225 нм с увеличением количества белка в ДНК-белковых комплексах монотонно возрастает интенсивность отрицательной полосы КД, отражающей конформационное состояние присутствующих в комплексе белков НМGB1 и Н1, связанное в определенной мере с увеличением их  $\alpha$ -спиральности при взаимодействии с ДНК (рис. 1а). По мере дальнейшего возрастания содержания белка в комплексах до  $r = 0.15$  (рис. 1б) обнаружены существенные структурные изменения ДНК, проявляющиеся в постепенном снижении интенсивности положительной полосы КД ДНК при 275 нм и смещении ее максимума в длинноволновую сторону до 285 нм. Уменьшается также интенсивность отрицательной полосы КД ДНК в области 240–245 нм и происходит ее расширение в коротковолновую сторону. При этом длинноволновая часть этой полосы продолжает соответствовать оптической активности ДНК, в то время как ее коротковолновая часть в интервале 215–235 нм представляет собой комбинацию КД ДНК и белков НМGB1 и Н1 и отражает их взаимодействие между собой и с ДНК в комплексе.

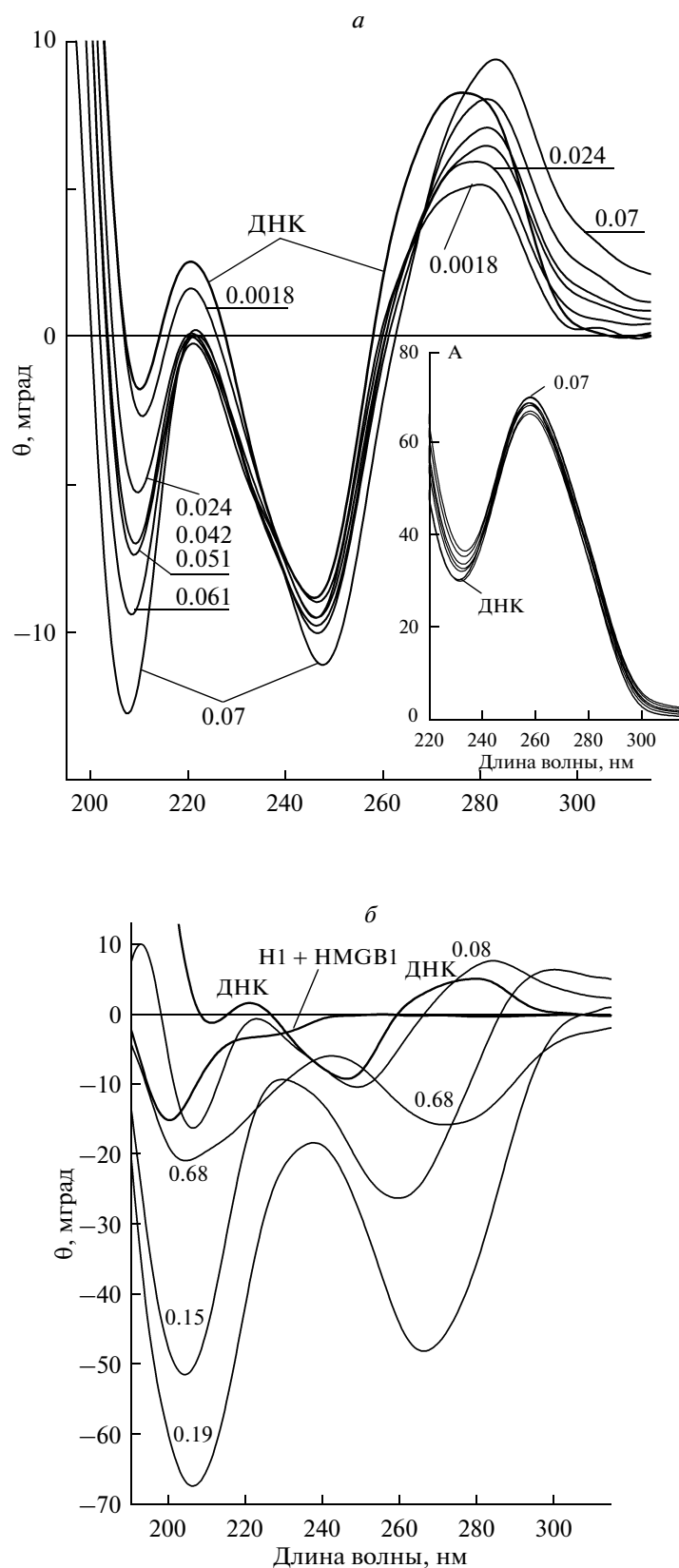
Можно отметить, что принципиально подобные спектральные изменения с ростом содержания белкового компонента в ДНК-белковых комплексах наблюдаются в растворах с более высокой концентрацией ионов марганца: в  $0.8 \text{ mM } Mn^{2+}$  (рис. 2а) и даже в  $10 \text{ mM } Mn^{2+}$  (рис. 3), но, однако, при значительно меньших значениях  $r$ .

Изменения спектра КД ДНК в области положительной полосы около 275–280 нм обычно связывают с изменением распределения электронной плотности в азотистых основаниях ДНК. Эти изменения подобны затрагивающим  $N_7$  гуанина при его взаимодействии с различными лигандами [22, 23]. Поскольку  $N_7$  гуанина, как известно, экспонирован в большую бороздку двойной спирали ДНК, полученные нами данные позволяют сделать вывод о существенных структурных преобразованиях со стороны большой бороздки, которые претерпевает двойная спираль ДНК при образовании комплексов с белками НМGB1 и Н1 (при  $r \geq 0.08$ ). Известно, что гистон

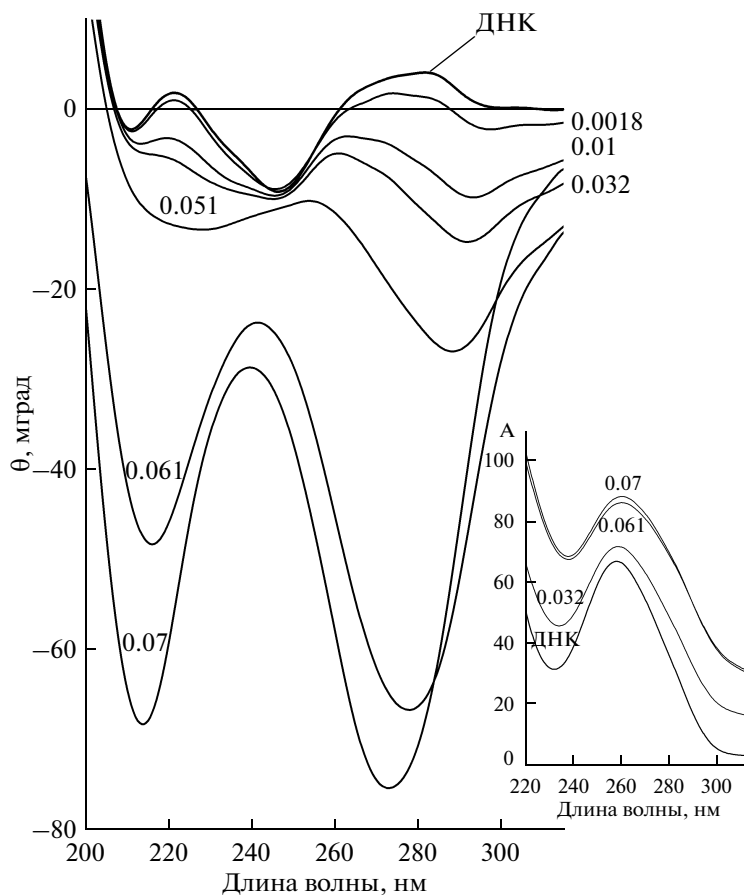
Н1, как показано ранее, взаимодействует с ДНК своим глобулярным доменом именно по большой бороздке [24]. Это означает, что гистон Н1 в наших комплексах при небольших значениях  $r$  способен взаимодействовать не только с сахаро-фосфатным остовом, но и с азотистыми основаниями ДНК, оказывая влияние на распределение электронной плотности в азотистых основаниях двойной спирали ДНК даже в присутствии белка НМGB1. Следовательно, гистон Н1 не входит в конкурентные отношения с белком НМGB1. Более того, белок НМGB1, связываясь с ДНК по узкой бороздке [25], изгибает двойную спираль ДНК, изменяя геометрию большой бороздки, и тем самым может способствовать взаимодействию Н1 с ДНК. Действительно, указанные выше изменения положительной полосы КД ДНК в нашем случае вызваны увеличением содержания белка в исследуемом нами тройном комплексе в интервале  $r 0.08–0.15$  (рис. 1б), в то время как подобные же изменения в комплексах ДНК–Н1 возникают только при значительно большем содержании белка (при отношении Н1/ДНК = 0.5) [19].

Существенные изменения спектральных свойств ДНК-белковых комплексов происходят при дальнейшем увеличении в них содержания белка (рис. 1б), когда система приближается к критическому состоянию ( $r > 0.15$ ), проявляющемуся в переходе к спектру КД ДНК  $\psi$ -типа (от англ. PSI – Polymer and Salt Induced). Такой спектр КД, характеризующийся наличием глубокой отрицательной полосы в области 260–300 нм, впервые получен при исследовании ДНК в растворах нейтрального полимера полиэтиленоксида в присутствии соли [26, 27]. Позднее показано, что спектр КД  $\psi$ -типа, обусловленный специфическим эффектом рассеяния, возникающим в полосе поглощения ДНК в результате формирования конденсированных анизотропных структур, возникает также при взаимодействии ДНК с катионными полипептидами и линкерными гистонами [19, 28–30]. В то же время вторичная структура ДНК в целом при таких преобразованиях остается неизменной – ДНК продолжает находиться в В-форме, как это следует из данных по рентгеновскому рассеянию [31].

Сравнительно небольшое увеличение содержания белков НМGB1 и Н1 от  $r = 0.15$  до  $r = 0.19$  ведет к резкому переходу их комплексов с ДНК в состояние, характеризующееся  $\psi$ -типом спектра КД (рис. 1б) с глубокой отрицательной полосой в области 250–300 нм, смещающейся в длинноволновую сторону с увеличением количества белка в комплексе. При этом происходит инверсия отрицательной полосы КД ДНК с минимумом при 240–245 нм: она преобразуется в полосу, продолжающую лежать в области отрицательных значений эллиптичности, но с максимумом при 235–245 нм (рис. 1б). Уменьшается также отрицательный круговой дихроизм в коротковолновой белковой полосе при 200–215 нм в



**Рис. 2.** Спектры КД (а, б) и спектры поглощения (врезка на а) комплексов ДНК с белками Н1 и НМГВ1 в растворе 15 мМ NaCl в присутствии 0.8 мМ  $MnCl_2$  в зависимости от весового соотношения  $r$  белок/ДНК (указано на рисунке). а –  $0.0018 \leq r \leq 0.07$ , б –  $0.08 \leq r \leq 0.68$ . Значения поглощения указаны в условных единицах.



**Рис. 3.** Спектры КД и спектры поглощения (врезка на *a*) комплексов ДНК с белками Н1 и HMGB1 в растворе 15 мМ NaCl в присутствии 10 мМ  $MnCl_2$  в зависимости от весового соотношения  $r$  белок/ДНК (указано на рисунке).  $0.0018 \leq r \leq 0.07$ . Значения поглощения указаны в условных единицах.

комплексах с  $r > 0.19$ , что указывает на изменение характера ДНК-белковых и особенно белок-белковых взаимодействий при образовании конденсированных анизотропных ДНК-белковых структур  $\psi$ -типа.

Мы предполагаем, что при низких соотношениях белок/ДНК молекулы белка HMGB1 и гистона Н1 связаны с ДНК относительно независимо по малой и большой бороздке ДНК соответственно, вызывая характерные для каждого из этих белков локальные нарушения структуры ДНК [25, 32]. По мере увеличения содержания белка в комплексе происходит накопление точечных деформаций двойной спирали ДНК, увеличивающих ее гибкость, и усиливаются кооперативные белок-белковые взаимодействия между фиксированными на ДНК белковыми молекулами, что способствует конденсации ДНК с образованием склонных к агрегации анизотропных ДНК-белковых структур, которые проявляются при исследовании КД в виде  $\psi$ -формы ДНК.

Следует отметить, что в этом отношении исследуемые нами комплексы ДНК с белками HMGB1 и Н1 существенно отличны от комплексов ДНК, полученных с каждым из этих белков в отдельности.

Спектры  $\psi$ -типа в комплексах ДНК с гистоном Н1 можно получить только в присутствии физиологической концентрации соли (150 мМ NaCl) и при более высоком содержании белка. В наших условиях, т. е. при низкой концентрации соли (15 мМ NaCl), как показано нами ранее [29], комплексы ДНК с гистоном Н1 не переходят в  $\psi$ -форму даже при высоком содержании белка. Следовательно, присутствие белка HMGB1 в исследуемых нами тройных комплексах ДНК с гистоном Н1 и белком HMGB1 стимулирует образование анизотропных конденсированных ДНК-белковых структур, характеризующихся  $\psi$ -типом спектра КД. В то же время сам белок HMGB1 при взаимодействии с ДНК образует комплексы, которые с повышением содержания белка не переходят в  $\psi$ -форму ни при каких исследованных нами условиях. Однако они при этом образуют упорядоченные надмолекулярные комплексы другого типа, для которых характерно аномальное поведение оптической активности, проявляющееся в резком увеличении интенсивности положительной полосы КД ДНК в интервале 260–300 нм со сдвигом максимума этой широкой полосы в коротковолновую сторону до 273 нм [19, 33].

Гистон Н1 в исследованных нами тройных комплексах подавляет сборку таких надмолекулярных ДНК-белковых структур, характерных для комплексов ДНК с белком НМGB1, облегчая связывание НМGB1 с ДНК предположительно путем экранирования своими лизиновыми остатками отрицательно заряженных остатков дикарбоновых аминокислот в С-концевом домене белка НМGB1.

Таким образом, совместное влияние белка НМGB1 и гистона Н1 на структуру образующихся комплексов с ДНК не ограничено простым суммированием эффектов, возникающих от присутствия в комплексе каждого из этих белков в отдельности, и не является следствием конкурентных отношений между этими белками, а вызвано их взаимно обусловленными кооперативными взаимодействиями с ДНК и между собой, облегчающими связывание каждого из этих белков с ДНК.

Ионы марганца существенно модифицируют характер взаимодействия компонентов в этом сложном тройном комплексе ДНК с белками НМGB1 и Н1, хотя основные тенденции, определяющие особенности взаимодействия этих белков с ДНК, сохраняются. Повышение концентрации ионов  $Mn^{2+}$  оказывает заметное влияние на структуру образующихся комплексов, что находит отражение в изменении их оптических свойств — спектров КД и УФ-поглощения (рис. 2 и 3).

В присутствии 0.8 мМ  $MnCl_2$  (рис. 2а и б) в коротковолновой области спектра ДНК-белковых комплексов с увеличением содержания белка интенсивность отрицательной (белковой) полосы КД при 205–215 нм сначала возрастает, а затем при  $r > 0.19$  (рис. 2б) начинает падать при переходе к  $\psi$ -типу спектра КД, как это наблюдали также в растворах 0.1 мМ  $MnCl_2$  (рис. 1б). Этот результат означает, что взаимодействие с ионами марганца не оказывает заметного влияния на конформационное состояние не только свободных [17], но и связанных с ДНК белков НМGB1 и Н1.

Однако ионы  $Mn^{2+}$  оказывают сильное влияние на структуру ДНК в комплексах с белками НМGB1 и Н1. Это влияние ощутимо уже в коротковолновой части спектра КД комплексов при 215–230 нм, где имеет место суперпозиция КД ДНК и белков. В присутствии 0.1 мМ  $MnCl_2$  с увеличением количества белка  $r$  в комплексах постепенно уменьшается высота коротковолновой полосы КД ДНК при 220–230 нм от 0.008 до 0.08 (рис. 1а). В растворах 0.8 мМ  $MnCl_2$  увеличение содержания белка  $r$  от 0.024 до 0.07 не вызывает соответствующие изменения КД: высота коротковолновой полосы с максимумом при 223 нм остается неизменной (рис. 2а), что можно объяснить компенсацией отрицательного КД белков повышающимся положительным КД ДНК в этой части спектра.

В присутствии 0.8 мМ  $MnCl_2$  (рис. 2а) интенсивность положительной полосы КД ДНК с максимумом на 275 нм в комплексах с очень низким содержанием белка ( $r = 0.0018$ ) меньше на одну треть и ее максимум смещен в длинноволновую сторону до 285 нм. Подобные изменения происходят также в ДНК-белковых комплексах в присутствии 0.1 мМ  $MnCl_2$ , как при низком (рис. 1а), так и при более высоком содержании белка в интервале  $0.08 \leq r \leq 0.15$  (рис. 1б). Это обстоятельство свидетельствует, как указано выше, о существенном вкладе связывающегося по большой бороздке ДНК гистона Н1 в изменение конформации ДНК при образовании ДНК-белковых комплексов. Дальнейшее увеличение содержания белка  $r$  в комплексах от 0.024 до 0.07 (рис. 2а) в присутствии 0.8 мМ  $MnCl_2$  приводит к структурным изменениям ДНК иного типа (увеличение интенсивности отрицательной полосы КД ДНК в области 240–250 нм и рост оптической активности положительной полосы КД ДНК со смещением ее максимума в длинноволновую сторону). Эти спектральные изменения в значительной степени определены ассоциацией образующихся комплексов: в положительной области спектра КД ДНК при 300–320 нм. При этом формируется длинноволновый “хвост”, соответствующий появлению дифференциальной круговой экстинкции за пределами полосы поглощения ДНК, что свидетельствует об образовании в этих условиях рассеивающих частиц (рис. 2а). Параллельно несколько возрастает УФ-поглощение соответствующих ДНК-белковых комплексов, что также указывает на тенденцию к увеличению агрегации комплексов с ростом в них содержания белка в присутствии 0.8 мМ  $MnCl_2$  (рис. 2а, врезка).

При дальнейшем увеличении содержания белка в комплексах в присутствии 0.8 мМ  $MnCl_2$  спектр КД ДНК искажается — происходит сдвиг всей полосы КД в длинноволновую сторону с уменьшением положительной составляющей в спектре КД ДНК в области 275–300 нм, которая полностью исчезает при  $r = 0.19$  (рис. 2б). Растет также интенсивность КД в интервале 300–320 нм, связанная с ростом светорассеяния и агрегацией при переходе из этого промежуточного состояния к образованию анизотропных конденсированных ДНК-белковых структур со спектром КД ДНК  $\psi$ -типа (рис. 2б).

Увеличение концентрации ионов  $Mn^{2+}$  способствует переходу ДНК-белковых комплексов в критическое состояние, связанное с образованием таких анизотропных конденсированных ДНК-белковых структур, характеризующихся  $\psi$ -типом спектра КД ДНК. Если в растворах 0.1 мМ  $MnCl_2$  комплексы переходят в  $\psi$ -форму, начиная с  $r = 0.19$ , то в присутствии 0.8 мМ  $MnCl_2$  переход к  $\psi$ -форме происходит уже для комплекса с  $r = 0.15$  (рис. 2б).

Описанные выше особенности  $\psi$ -типа спектров КД ДНК для ДНК-белковых комплексов в раство-

рах 0.1 мМ  $MnCl_2$  видны в полной мере при увеличении концентрации ионов марганца. В присутствии 0.8 мМ  $MnCl_2$  увеличение содержания белка в комплексах выше  $r = 0.08$  ведет к значительному возрастанию интенсивности отрицательных полос КД, характерных для  $\psi$ -формы ДНК (рис. 2б). В то же время многократно возрастает интенсивность отрицательной белковой полосы в коротковолновой части спектра при 200–215 нм, что является важным свидетельством, указывающим на участие связанных с ДНК белков, гистона Н1 и белка НМGB1, в образовании конденсированных анизотропных структур, определяющих спектр КД ДНК  $\psi$ -типа.

Эти характерные спектральные черты  $\psi$ -формы ДНК особенно ярко выражены в комплексах, образующихся при еще более высокой концентрации  $MnCl_2$  (до 10 мМ). При этом в состоянии, характеризующееся сильным светорассеянием и  $\psi$ -типом спектра КД ДНК, переходят комплексы даже с очень низким содержанием белка ( $r = 0.01$ ) (рис. 3).

В этих условиях с увеличением содержания белка существенно возрастает УФ-поглощение образующихся комплексов как в полосе поглощения ДНК, так и в длинноволновой области при 290–300 нм, что свидетельствует о формировании сильно рассеивающих частиц (рис. 3, врезка). Увеличение концентрации ионов марганца не только способствует образованию анизотропных ассоциатов, определяющих возникновение  $\psi$ -формы ДНК, но и стимулирует их агрегацию.

Таким образом, ионы марганца оказывают существенное влияние на процесс образования комплексов ДНК с белком НМGB1 и гистоном Н1, их структуру и свойства. Как указано выше, присутствие ионов марганца не вызывает заметных изменений структуры белка НМGB1 и гистона Н1, поэтому можно ожидать, что ДНК-связывающие свойства основных функциональных доменов этих белков в присутствии ионов  $Mn^{2+}$  не затронуты, и оба белка, НМGB1 и гистон Н1, по-прежнему способны изменять специфическим для каждого из них образом структуру двойной спирали ДНК в местах их связывания. Однако присутствие избытка двухвалентных катионов  $Mn^{2+}$  в растворе неизбежно будет оказывать влияние на состояние С-концевого домена белка НМGB1, обогащенного дикарбоновыми аминокислотами, снижая эффективность суммарного отрицательного заряда белка. Возможность такого рода взаимодействий ионов марганца показана при исследовании их участия в механизме действия некоторых ДНК-узнающих белков, в ходе которых обнаружено, что ионы  $Mn^{2+}$  легко образуют хелатные связи с остатками аспарагиновой и глутаминовой кислоты [13, 17, 34]. Поэтому они могут эффективно взаимодействовать с С-концевым доменом белка НМGB1, состоящим из непрерывной последовательности аспарагиновой и глутаминовой аминокислот, снижая его суммарный отрицательный за-

ряд и тем самым, способствуя взаимодействию белка НМGB1 с ДНК.

Проведенное нами ранее исследование взаимодействия ионов марганца с ДНК методами абсорбционной спектроскопии и КД в УФ- и ИК-диапазонах показало, что характер взаимодействия существенно зависит от концентрации ионов марганца [22, 23]. При сравнительно небольшой концентрации ионы марганца, прежде всего, связываются с фосфатными группами ДНК, частично экранируя их отрицательный заряд и тем самым стабилизируя двуспиральную структуру ДНК.

С повышением концентрации ионов  $Mn^{2+}$  до 0.5–1 мМ начинает проявляться их взаимодействие также с азотистыми основаниями ДНК. При этом возможна координация иона марганца одновременно к атому кислорода фосфатной группы и к соседнему по цепи основанию ДНК. Ионы  $Mn^{2+}$  преимущественно связаны с  $N_7$  гуанина, который обладает высоким сродством к ионам металла и легко доступен в большой бороздке двойной спирали ДНК. Возникающие при этом локальные нарушения структуры двойной спирали ДНК, как показали наши исследования комплексов ДНК с белком НМGB1 в присутствии ионов марганца [17], способствуют связыванию белка НМGB1, который проявляет повышенное сродство к отличающимся необычной конформацией участкам ДНК.

Как указано выше, в исследуемых нами комплексах ДНК с белком НМGB1 и гистоном Н1 при низких значениях  $r$  гистон Н1 может взаимодействовать своим глобулярным доменом с азотистыми основаниями по большой бороздке двойной спирали ДНК. Однако ионы марганца, проникая в большую бороздку и связываясь с  $N_7$  гуанина, могут вступить в конкурентные отношения с гистоном Н1, вытесняя его глобулярный домен на периферию двойной спирали ДНК. С увеличением концентрации ионов  $Mn^{2+}$  эта тенденция усиливается, что может привести к ослаблению взаимодействий гистона Н1 с ДНК и, напротив, к усилению белок-белковых контактов в комплексе, способствующих компактизации ДНК. Одновременно многократно возрастают межмолекулярные белок-белковые взаимодействия, сопровождающиеся ассоциацией комплексов с образованием надмолекулярных анизотропных ДНК-белковых структур с  $\psi$ -типом спектра КД ДНК и сильной агрегацией образующихся в этих условиях комплексов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Структурные изменения ДНК, полученные нами методом КД в УФ-области спектра, при взаимодействии с негистоновым хромосомным белком НМGB1 и линкерным гистоном Н1 отличны от вызванных каждым из этих белков в отдельности. Свойства образующихся ДНК-белковых комплек-



сов в существенной степени зависят от содержания в них белкового компонента и не являются результатом простого суммирования эффектов, возникающих от присутствия этих белков, или следствием конкурентных отношений между ними. Напротив, гистон H1 способствует связыванию белка HMGB1 с ДНК путем экранирования отрицательно заряженных групп сахаро-фосфатного остова ДНК и остатков дикарбоновых аминокислот в С-концевом домене белка HMGB1. С другой стороны, белок HMGB1, взаимодействуя с двойной спиралью ДНК по ее малой бороздке, изгибает ДНК и несколько расширяет ее большую бороздку, способствуя связыванию гистона H1. Совместное действие HMGB1 и H1 стимулирует конденсацию ДНК с образованием анизотропных ДНК-белковых структур, характеризующихся  $\psi$ -типом спектра КД ДНК. Структурная организация этих комплексов зависит не только от характера ДНК-белковых взаимодействий, но и в значительной степени также от взаимодействий связанных с ДНК молекул белка HMGB1 и гистона H1 между собой. Некоторые авторы считают, что спектр КД ДНК  $\psi$ -типа, возникающий при компактизации ДНК с образованием анизотропных структур, отвечает конденсированному состоянию ДНК в хромосоме [26, 27, 31].

Ионы марганца существенно модифицируют характер взаимодействия компонентов в сложном тройном комплексе ДНК–HMGB1–H1. Повышение концентрации ионов  $Mn^{2+}$  оказывает заметное влияние на структуру образующихся комплексов, способствуя их компактизации и образованию межмолекулярных анизотропных конденсированных ДНК-белковых структур, характеризующихся  $\psi$ -типом спектра КД ДНК. Можно предположить, что этот эффект в существенной степени зависит от связывания ионов марганца с  $N_7$  гуанина в большой бороздке ДНК с последующим вытеснением отсюда глобулярного домена гистона H1. Это может быть причиной активизации интенсивного образования межмолекулярных ассоциатов. Возникновение сильного светорассеяния при образовании тройных комплексов ДНК с белком HMGB1 и гистоном H1, проявляющегося с увеличением содержания белков в комплексе, и особенно в присутствии ионов марганца, искажает вид спектров КД в УФ-области и делает их неинформативными и мало пригодными для структурной интерпретации. Преодолеть это принципиальное затруднение можно с помощью спектроскопии в ИК-области спектра, поскольку растворы, рассеивающие свет в УФ- и видимом спектральном диапазоне, оказываются прозрачными для длинноволнового излучения в ИК-области. Результатам исследования комплексов ДНК с белками HMGB1 и гистоном H1 в присутствии ионов марганца методами абсорбционной спектроскопии и КД в ИК-области будет посвящена отдельная статья.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-00092 и 09-08-01119), грантов Правительства Санкт-Петербурга. Часть работ проводили в рамках реализации ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reeck G.R., Isackson P.J., Teller D.C. 1982. Domain structure in high molecular weight high mobility group nonhistone chromatin proteins. *Nature*. **300**, 76–78.
2. Grosschedl R. 1995. Higher-order nucleoprotein complexes in transcription: analogies with site-specific recombination. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 362–370.
3. Crothers D.M. 1993. Architectural elements in nucleoprotein complexes. *Curr. Biol.* **3**, 675–676.
4. Thomas J.O., Travers A.A. 2001. HMG1 and 2, and related ‘architectural’ DNA-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 167–174.
5. Thomas J.O. 1999. Histone H1: location and role. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 312–317.
6. Zlatanova J., Yaneva J. 1991. Histone H1-DNA interactions and their relation to chromatin structure and function. *DNA Cell Biol.* **10**, 239–248.
7. An W., van Holde K., Zlatanova J. 1998. The non-histone chromatin protein HMG1 protects linker DNA on the side opposite to that protected by linker histones. *J. Biol. Chem.* **273**, 26289–26291.
8. Silva J.J.R.F.D., Williams R.J.P. 1991. *Biological chemistry of the elements*. Oxford: Clarendon Press.
9. Glusker J.R. 1991. Structural aspects of metal liganding to functional groups in proteins. *Adv. Protein Chem.* **42**, 1–76.
10. *Metal ions in biological systems: manganese and its role in biological processes*. Eds Sigel S., Sigel H. N.Y.: Marsel Dekker, 2000. **37**.
11. Noble C.G., Maxwell A. 2002. The role of GyrB in the DNA cleavage-religation reaction of DNA gyrase: a proposed two metal-ion mechanism. *J. Mol. Biol.* **318**, 361–371.
12. Hays H., Berdis A. 2002. Manganese substantially alters the dynamics of translesion DNA synthesis. *J. Biochemistry.* **41**, 4771–4778.
13. Yamagata A., Kakuta Y., Masui R., Fukuyama K. 2002. The crystal structure of exonuclease RecJ bound to  $Mn^{2+}$  ion suggests how its characteristic motifs are involved in exonuclease activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 5908–5912.
14. Santagata S., Aidinis V., Spanopoulou E. 1998. The effect of  $Me^{2+}$  cofactors at the initial stages of V(D)J recombination. *J. Biol. Chem.* **273**, 16325–16331.
15. Shockett P.E., Schatz D.G. 1999. DNA hairpin opening mediated by the RAG1 and RAG2 proteins. *Mol. Cell Biol.* **19**, 4159–4166.
16. Swanson P.C. 2002. A RAG-1/RAG-2 tetramer supports 12/23-regulated synapsis, cleavage, and transposition of V(D)J recombination signals. *Mol. Cell Biol.* **22**, 7790–7801.

17. Поляничко А.М., Чихиржина Е.В., Костылева Е.И., Воробьев В.И. 2004. Структура комплексов ДНК с негистоновым хромосомным белком HMG1 в присутствии ионов марганца. *Молекуляр. биология.* **38**, 1041–1049.
18. Поляничко А.М., Чихиржина Е.В., Андрущенко В.В., Костылева Е.И., Wieser H., Воробьев В.И. 2004. Влияние ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на компактизацию ДНК в комплексе с негистоновым хромосомным белком HMG1. *Молекуляр. биология.* **38**, 701–712.
19. Чихиржина Е.В., Поляничко А.М., Скворцов А.Н., Костылева Е.И., Уссье К., Воробьев В.И. 2002. HMG1-домены: заложники обстоятельств. *Молекуляр. биология.* **36**, 525–531.
20. Johns E.W. 1982. *The HMG chromosomal proteins.* London, N.Y.: Academic Press.
21. Kohlstaedt L.A., Cole R.D. 1994. Specific interaction between H1 histone and high mobility protein HMG1. *Biochemistry.* **33**, 570–575.
22. Polyanichko A., Andrushchenko V., Chikhirzhina E., Vorob'ev V., Wieser H. 2004. The effect of manganese(II) on DNA structure: electronic and vibrational circular dichroism studies. *Nucl. Acids Res.* **32**, 989–996.
23. Поляничко А.М., Чихиржина Е.В., Андрущенко В.В., Wieser H., Воробьев В.И. 2005. Спектральные исследования структуры комплексов ДНК с ионами  $\text{Mn}^{2+}$  в УФ- и ИК-диапазонах. *Биофизика.* **50**, 810–817.
24. 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.
25. Travers A., Thomas J.O. 2004. Chromosomal HMG-box proteins. In: *Chromatin structure and dynamics: State-of-the-Art.* Eds Zlatanova J., Leuba S.H. N.Y.: Elsevier B.V., 103–126.
26. Lerman L.S. 1971. A transition to a compact form of DNA in polymer solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **68**, 1886–1890.
27. Jordan C.F., Lerman L.S., Venable J.H. 1972. Structure and circular dichroism of DNA in concentrated polymer solutions. *Nat. New Biol.* **236**, 67–70.
28. Чихиржина Е.В., Воробьев В.И. 2002. Линкерные гистоны; конформационные превращения и роль в организации структуры хроматина. *Цитология.* **44**, 721–736.
29. 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**, 883–888.
30. Fasman G.D., Valenzuela M.S., Adler A.L. 1971. Complexes of deoxyribonucleic acid with fragments of lysine-rich histone (f-1). Circular dichroism studies. *Biochemistry.* **10**, 3795–3801.
31. Maniatis T., Venable J.H. Jr., Lerman L.S. 1974. The structure of psi DNA. *J. Mol. Biol.* **84**, 37–64.
32. Jerzmanowski A. 2004. The linker histones. In: *Chromatin structure and dynamics: State-of-the-Art.* Eds Zlatanova J., Leuba S.H. N.Y.: Elsevier B.V., 75–102.
33. Polyanichko A.M., Chikhirzhina E.V., Skvortsov A.N., Kostyleva E.I., Colson P., Houssier C., Vorob'ev V.I. 2002. The HMG1 Ta(i)le. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **19**, 1053–1062.
34. Hadden J.M., Declais A.-C., Phillips S.E.V., Lilley M.J. 2002. Metal ions bound at the active site of the junction resolving enzyme T7 endonuclease. *EMBO J.* **21**, 3505–3515.