

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 НМGB1 И ГИСТОНОМ H1 В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ МАРГАНЦА. II. СПЕКТРОСКОПИЯ КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА В ИК ОБЛАСТИ

© 2013 г. А. М. Поляничко^{1, 2*}, В. И. Воробьев^{1, 2}, Е. В. Чихиржина²

¹Физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета,
Санкт-Петербург, Старый Петергоф, 198504

²Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064

Поступила в редакцию 07.10.2012 г.

Принята к печати 26.10.2012 г.

Методами спектроскопии поглощения и кругового дихроизма в инфракрасной области исследованы комплексы ДНК с негистоновым белком хроматина НМGB1 и гистоном H1 в присутствии ионов марганца. Показано, что метод дает хорошие результаты даже для растворов, содержащих крупные частицы, вызывающие рассеяние в УФ-диапазоне. Установлено, что ионы марганца в комплексе способны координироваться не только к различным химическим группам в составе ДНК, но и к остаткам дикарбоновых аминокислот белка НМGB1, стимулируя конденсацию ДНК и несколько ослабляя ДНК-белковые взаимодействия в комплексе.

Ключевые слова: ДНК, ДНК-белковые взаимодействия, ИК/ВКД-спектроскопия, ионы марганца, негистоновый белок НМGB1, линкерный гистон H1.

THE STRUCTURE OF THE COMPLEXES OF DNA WITH NONHISTONE CHROMOSOMAL PROTEIN HMGB1 AND THE HISTONE H1 IN THE PRESENCE OF MANGANESE IONS. II. VIBRATIONAL CIRCULAR DICHROISM SPECTROSCOPY, by A. M. Polyanychko^{1, 2}, V. I. Vorobyev^{1, 2}, E. V. Chikhirzhina² (Department of Physics, St.-Petersburg State University, St.-Petersburg, 198504 Russia, *e-mail: a.polyanychko@pobox.spbu.ru; ²Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg, 194064 Russia). Complexes of DNA with nonhistone chromosomal protein HMGB1 and histone H1 in the presence of manganese ions were studied using absorption and circular dichroism spectroscopy in infrared region. It was shown that the approach provides good results for solutions containing large particles, which cause light scattering in UV region. It was also shown that the manganese ions are able to coordinate to the chemical groups of DNA as well as to the carboxylic amino acid residues of the protein HMGB1. The latter stimulates DNA condensation and slightly weakens DNA-protein interactions in the complex.

Keywords: DNA, DNA-protein interactions, IR/VCD-spectroscopy, manganese ions, nonhistone protein HMGB1, linker histone H1.

DOI: 10.7868/S0026898413020110

ВВЕДЕНИЕ

Белки семейства НМGB1/2 – одни из наиболее многочисленных негистоновых белков хроматина [1]. По существу на сегодняшний день представлениям белки семейства НМGB1 взаимодействуют преимущественно с участками ДНК, не входящими в состав нуклеосом, в том числе с линкерными участками ДНК. Однако не секрет, что в силу своей доступности открытые участки ДНК являются мишенями и для множества других белков. Наиболее распространенным среди них является гистон H1, связывающийся с

линкерными участками ДНК на входе/выходе из нуклеосомной частицы [2–5]. Содержание гистона H1 в хроматине в несколько раз превышает количество белка НМGB1, а потому встает вопрос об их взаимном влиянии на связывание с ДНК. Вполне естественно ожидать, что одновременное присутствие этих двух белков изменит ход комплексообразования. Одна из важных особенностей взаимодействия НМGB1 и H1 с ДНК – изгиб молекулы ДНК в месте связывания белков в сторону большой бороздки [6, 7]. Само связывание белков при этом происходит по разным бороздкам двойной спирали: НМGB1 взаимодействует по малой [6], тогда как гистон H1 – по

* Эл. почта: a.polyanychko@pobox.spbu.ru

большой бороздке [7]. Опираясь на данные многочисленных исследований взаимодействия белков Н1 и НМGB1 с ДНК, наряду с гипотезами о конкурентной природе их связывания, возникли гипотезы и о совместном действии обоих белков на ДНК [8]. Не так давно высказано предположение о возможности одновременного совместного формирования единого комплекса с ДНК [9–11]. В частности, показано, что существенную роль при образовании тройного комплекса играют белок-белковые взаимодействия между молекулами Н1 и НМGB1.

Ранее нами установлено, что взаимодействие белков НМGB1 и Н1 с ДНК может быть разделено на несколько этапов в зависимости от соотношения белок/ДНК в пробе [12–18]. Также обнаружено, что при достижении некоторого порогового соотношения белок/ДНК в пробе связывание обоих белков с ДНК носит ярко выраженный кооперативный характер [13, 14, 16, 19–21]. Показано, что активность взаимодействия НМGB1 с ДНК, в особенности на кооперативной стадии, модулируется заряженным С-концевым доменом белка [14–16]. Экспериментально получена оценка размера участка связывания белка НМGB1 на ДНК, который, по данным разных авторов, составил 12–15 п.н. в расчете на каждый НМGB-домен белка, участвующий в связывании [15, 17, 22, 23]. Участок связывания для гистона Н1 составляет 15–20 п.н. [24].

Ранее установлено, что присутствие двухвалентных ионов металлов может существенно изменить характер взаимодействия белка НМGB1 с ДНК [25, 26]. Особый интерес представляют такие металлы как марганец, способные взаимодействовать как с фосфатными группами, так и с основаниями ДНК [27]. Образую достаточно сложные комплексы, ионы марганца изменяют характер взаимодействия НМGB1 с ДНК [25]. При формировании комплексов с участием других белков это может привести к изменению функционирования комплекса в целом. Так, например, образование одноцепочечного разрыва ДНК белками RAG1 и RAG2 может происходить при участии ионов Mn^{2+} и Mg^{2+} . Также известно, что в присутствии белков НМGB1/2 эффективность этого процесса возрастает на порядок [28–30]. Любопытно, однако, отметить, что в случае с ионами магния добавление НМGB1/2 повышает эффективность процесса не более чем в 1–2 раза. В то время как одновременное присутствие НМGB1/2 и ионов Mn^{2+} приводит не только к десятикратному повышению эффективности, но и локализует разрыв цепи ДНК вблизи вершины образующейся шпильки [31]. Существуют данные, указывающие на то, что ионы марганца в этом случае влияют на активность как ДНК-связывающего домена белка, так и его С-концевого

фрагмента [32]. Однако детальный механизм влияния ионов Mn^{2+} на связывание НМGB1 с ДНК в присутствии других белков остается неизвестным. Нами предпринята попытка выяснить характер этих взаимодействий на примере хорошо известной системы с участием линкерного гистона Н1. Ввиду сложности подобных систем до сих пор не удалось получить прямые структурные данные методами рентгеноструктурного анализа или ядерно-магнитного резонанса для комплексов ДНК с белками НМGB1 и Н1. Используя эти методы, удалось решить лишь структуры комплексов между достаточно короткими ДНК-связывающими фрагментами белков и олигонуклеотидными последовательностями ДНК.

На сегодняшний день одними из наиболее эффективных подходов к изучению структуры и конформации биологических макромолекул являются спектральные методы, в том числе круговой дихроизм (КД). Результаты, полученные на основе анализа данных КД для комплексов ДНК с белками НМGB1 и Н1, подробно описаны ранее [10]. Однако надмолекулярный характер образующихся комплексов приводит к возникновению в растворе заметного рассеяния, которое искажает вид спектров КД, что, в свою очередь, делает их неинформативными со структурной точки зрения [9–11]. Чтобы преодолеть эти сложности, мы применили метод КД в инфракрасной области. ИК-КД (ВКД от англ. VCD – Vibrational Circular Dichroism) известен достаточно давно, однако лишь в последние годы развитие инструментальной базы позволило добиться его успешного применения к изучению структуры белков и нуклеиновых кислот [33–37]. Настоящая работа основана на анализе данных, полученных в результате совместного применения КД и спектроскопии поглощения в ИК диапазоне.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использована натриевая соль ДНК тимуса телят ("Sigma"), обработанная ультразвуком согласно ранее описанной методике [27]. Процедура выделения и очистки белков, а также их характеристики описаны ранее [13]. Чтобы получить ДНК-белковые комплексы, приготовлен препарат, состоящий из смеси гистона Н1 ($M = 21$ кДа; 220 а.о.) и негистонового белка НМGB1 ($M = 26.5$ кДа; 215 а.о.) тимуса телят в весовом соотношении 3 : 1. Искусственные ДНК-белковые комплексы получали методом медленного прямого смешивания равных объемов растворов ДНК и смеси белков Н1 и НМGB1, как было описано ранее [10]. Концентрация ДНК в растворе для разных систем комплексов была в интервале 0.2–0.4 мг/мл. ДНК-белковые комплексы готовили, исходя из весового соотношения r белок/ДНК в растворе в диапазоне от 0 до

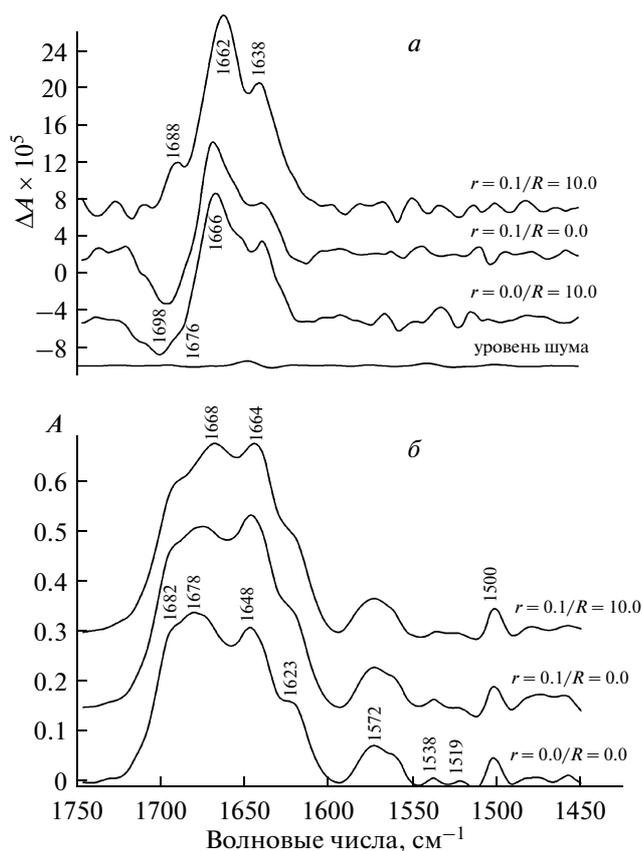


Рис. 1. Спектры ВКД (а) и ИК-поглощения (б) комплекса ДНК-НМГВ1-Н1 в области колебаний оснований при различных соотношениях $[\text{Mn}]/[\text{P}]$ (R) и весовых соотношениях белок/ДНК (r). Свободной ДНК соответствует $R = 0.0$, $r = 0.0$. Погрешность измерений представлена в виде спектра шума ("Уровень шума"). Концентрация ДНК в пробах составляла 40 мг/мл. Измерения проводили в растворе D_2O в разборных BaF_2 -кюветах с длиной оптического пути 50 мкм.

2.0. Молярное соотношение R $[\text{Mn}]/[\text{P}]$ изменяли в интервале от 0 до 10. Приготовленные комплексы концентрировали путем лиофилизации и последующего перерастворения в нужном объеме D_2O . Конечная концентрация ДНК в пробе составляла 40 мг/мл при концентрации противоионов Na^+ порядка 150 мМ. Изотопного замещения H_2O на D_2O достигали трехкратным перерастворением в тяжелой воде с промежуточной лиофилизацией.

Чтобы измерить спектры КД и поглощения в ИК-диапазоне использовали прибор оригинальной конструкции, описанной ранее [38], собранный на основе промышленного интерферометра Майкельсона (ВОМЕМ, Канада) с применением низкошумящего МСТ (HgCdTe) детектора, охлаждаемого жидким азотом. Измерения проводили в термостатируемой ячейке при 20°C в разборных кюветах на основе кристаллов BaF_2 с длиной оп-

тического пути 50 мкм. Спектры каждого образца регистрировались по результатам измерений в двух сериях с накоплением 500 спектров (поглощение) и 15000 спектров (ВКД) в каждой серии с их последующим усреднением. Стабильность образца оценивали путем сравнения спектров в двух последовательных сериях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы проанализировали спектры поглощения и оптической активности ДНК и ее комплексов с белками в присутствии ионов марганца как в области колебаний карбонильных групп в интервале $1750\text{--}1450\text{ см}^{-1}$ (рис. 1), так и в интервале $1150\text{--}800\text{ см}^{-1}$ (рис. 2), где представлены колебания сахарофосфатного остова. Эти данные обобщены с результатами, полученными ранее по отдельности для комплексов ДНК с ионами марганца [27] и для комплексов ДНК с белками НМГВ1 и Н1 [9, 11]. Результаты измерений с указанием основных спектральных отнесений сведены в таблицу (таблица). Данные разбиты на четыре группы, соответствующие колебаниям в белках и ДНК в свободном состоянии (1); комплексам ДНК- Mn^{2+} (2); комплексам ДНК-НМГВ1/Н1 (3); комплексам ДНК- Mn^{2+} -НМГВ1/Н1 (4). В каждой группе отдельно выделены колебания, наблюдающиеся в спектрах ИК поглощения (A) и соответствующие им оптически-активные переходы, наблюдающиеся в спектрах ВКД (ΔA). Полужирным шрифтом в таблице выделены волновые числа, соответствующие максимумам спектральных полос, увеличивающих свою интенсивность в комплексе по сравнению с аналогичными колебаниями ДНК или белка в свободном состоянии; курсивом — уменьшающих свою интенсивность. Для полос КД в скобках указан знак соответствующей полосы.

Область колебаний карбонильных групп ($1750\text{--}1450\text{ см}^{-1}$)

На рис. 1 представлены характерные спектры ВКД (рис. 1а) и поглощения (рис. 1б) в области $1750\text{--}1450\text{ см}^{-1}$. После добавления белков к ДНК поглощение комплекса в целом несколько возрастает, в то время как его оптическая активность в этой области слабо уменьшается. Последующее добавление ионов марганца практически не влияет на интенсивность полос поглощения, но заметно усиливает оптическую активность соответствующих колебаний. Большая часть спектральных элементов в интервале $1750\text{--}1450\text{ см}^{-1}$ может быть отнесена к колебаниям различных групп оснований ДНК [27, 39–41]. Однако те спектры, что представляют ДНК-белковые системы, содержат в этой области также интенсивную спектральную

полосу, соответствующую колебанию Амид-I [42, 43] (таблица). Это приводит к увеличению интенсивности полосы на 1648 см^{-1} в спектрах белок-содержащих систем. После добавления ионов Mn^{2+} интенсивность этой полосы практически не изменяется, а максимум смещается к отметке 1644 см^{-1} . Соответствующая полоса в спектре ВКД лежит в области отрицательных значений [42], что объясняет относительное падение интенсивности положительной полосы на 1638 см^{-1} (связанные колебания в кольцах аденина и тимина [39, 40]) по сравнению с полосой на 1666 см^{-1} (валентное колебание $\text{C}=\text{O}$ групп гуанина и цитозина [41]). Последняя в ходе взаимодействия с белком смещается к 1662 см^{-1} . Соответствующая полоса поглощения с максимумом на 1678 см^{-1} увеличивает свою интенсивность при добавлении к комплексу ионов Mn^{2+} (таблица) и становится столь же интенсивной, что и полоса на 1668 см^{-1} , относящаяся к валентным колебаниям карбонильной группы в гуанине [27, 41]. Иной характер носят валентные колебания тимина на 1693 см^{-1} [39–41]. Эта полоса не меняет своего положения при взаимодействии с белком, хотя ее интенсивность при этом несколько возрастает. Однако после добавления ионов марганца поглощение на этой частоте существенно падает. Соответствующая полоса в спектре ВКД практически не изменяется в ходе взаимодействия с белком, однако при увеличении концентрации ионов марганца меняет свой знак: с отрицательного в спектрах ДНК и ДНК-белкового комплекса (таблица), на положительный в спектре Mn^{2+} -содержащих систем с максимумом на 1688 см^{-1} . Небольшое плечо в спектре свободной ДНК, расположенное на том же месте, в спектре ДНК-белкового комплекса исчезает. Других существенных отклонений, по сравнению со спектрами комплексов ДНК- Mn^{2+} (таблица), в системе не обнаружено. Здесь важно отметить, что в отличие от системы Mn^{2+} -ДНК, в данном случае нет роста интенсивности полос поглощения на 1638 и 1619 см^{-1} . Оба колебания не регистрируются в конечных спектрах тройного комплекса в присутствии ионов марганца. Это указывает на отсутствие взаимодействий с атомами N3 цитозина [39, 40], что означает сохранение нативной структуры ДНК даже при высоких концентрациях ионов марганца.

Область колебаний сахарофосфатного остова ($1150\text{--}800\text{ см}^{-1}$)

Элементы спектров поглощения и ВКД в области $1150\text{--}800\text{ см}^{-1}$ могут быть отнесены к колебаниям сахарофосфатного остова ДНК. На рис. 2 представлены характерные спектры ВКД (рис. 2а) и поглощения (рис. 2б) в этой области

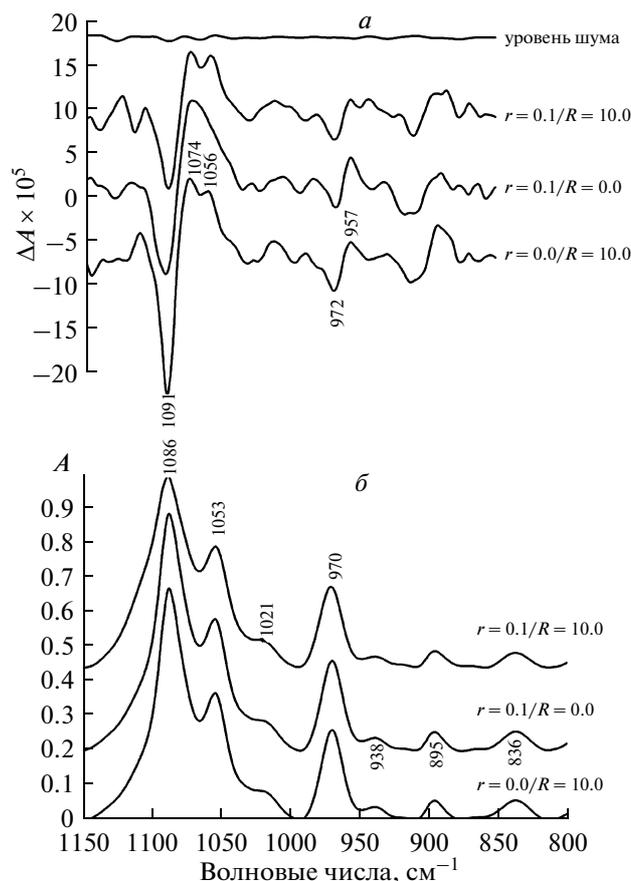


Рис. 2. Спектры ВКД (а) и ИК-поглощения (б) комплекса ДНК-НМГВ1-Н1 в области колебаний фосфатных групп при различных соотношениях $[\text{Mn}]/[\text{P}]$ (R) и весовых соотношениях белок/ДНК (r). Свободной ДНК соответствует $R = 0.0$, $r = 0.0$. Погрешность измерений представлена в виде спектра шума (“уровень шума”). Концентрация ДНК в пробах составляла 40 мг/мл . Измерения проводили в растворе D_2O в разборных BaF_2 кюветках с длиной оптического пути 50 мкм .

спектра. Добавление ионов Mn^{2+} вызывает уменьшение интенсивности обеих полос дублета на $1091(-)/1074(+)\text{ см}^{-1}$ в спектре ВКД, относящихся к симметричным колебаниям связей $\text{O}=\text{P}=\text{O}$ [44] (таблица). Такие изменения в спектре указывают на изменения взаимной ориентации фосфатных групп ДНК, что является следствием раскручивания двойной спирали и появления на ней изгибов.

Как показано ранее [10], спектральное поведение изучаемых комплексов в УФ-области характеризуется формированием большого числа рассеивающих центров, что приводит к появлению сильно мутных растворов. Характер рассеяния зависит от соотношения белок/ДНК в пробе и указывает на то, что с ростом r происходит постепенное увеличение размеров надмолекулярных образований в растворе.

Основные характеристики колебаний, наблюдаемых в спектрах ИК/ВКД ДНК, белков НМГВ1/Н1, комплексов ДНК-Мп²⁺, ДНК-НМГВ1/Н1 и ДНК-Мп²⁺-НМГВ1/Н1 в растворах D₂O

ДНК и белок в свободном состоянии		ДНК-Мп ²⁺		ДНК-НМГВ1/Н1		ДНК-Мп ²⁺ -НМГВ1/Н1		Предложенное отнесение спектральных полос
ИК, см ⁻¹	ВКД, см ⁻¹	ИК, см ⁻¹	ВКД, см ⁻¹	ИК, см ⁻¹	ВКД, см ⁻¹	ИК, см ⁻¹	ВКД, см ⁻¹	
~1770				1730	1716(+)	1730	1710(+)	Валентное колебание связи C=O в боковых цепях Asp
~1760				1705		1705		Валентное колебание связи C=O в боковых цепях Glu
1688	1700(-)	1692	1696(-)	1693	1686(-)	1693	1698(-)/1688(+)	Валентное колебание связей C2=O тимина
1678	1685(-)	1680	1682(-)	1678		1678	1662(+)	Валентное колебание связей C=O в гуанине и цитозине
	1665(+)	1670	1662(-)/ 1658(-)	1668				Плоские колебания кольца цитозина, валентное колебание связи C2=O цитозина и C4=O тимина
1646		1646		1643		1644		Амид I
1648	1676(+)/1635(-)			1648	1660(+)/1620(-)	1644	1660(+)/1620(-)	Колебания кольца аденина
1623	1638(+)/1619(-)	1623	1638(+)/1615(-)	1623	1636(+)/1620(-)	1623	1638(+)	Валентное колебание связи C=N гуанина
1590		1590		1590				Асимметричное валентное колебание в группе O=C-O ⁻ боковых цепей Asp/Glu аминокислотных остатков
~1585				~1575	1575(-)	~1575	1575(-)	Суперпозиция различных колебаний пуриновых колец, в т.ч. C-ND ₂ (1572 см ⁻¹) и C=N (1560 см ⁻¹)
1572		1572		1572		1572		Колебание связей сахарных колец
		1560		1560		1560		Валентное колебание связи C=N цитозина
1502		1502		1502	1504(-)	1502	1504(-)	Амид II
1460	1480(+)/1442(-)			1452	1454(-)	1452	1454(-)	Симметричное колебание связей O=P=O
1086	1091(-)/1074(+)	1086	1088(-)/1068(+)	1086	1084(-)/1064(+)	1086	1091(-)/1074(+)	Плоское деформационное колебание связи C-O-D а/к остатков Asp и Glu, участвующих в образовании водородной связи
1058				1058	1062(+)/1053(-)	1058	1053(-)	Валентное колебание связи C-O сахарных колец
1053		1053	1058(+)/1050(-)	1053		1053	1056(+)	Колебания кольца дезоксирибозы
1021		1021	1045(+)/1036(-)	1021	1034(-)	1021	1034(-)/1008(+)	Валентные колебания связей C-S сахарных колец
			1025(-)/1014(+)					Колебания сахарных колец, маркеры В-формы ДНК
970	972(-)/959(+)	970	972(-)/959(+)	970	972(-)	970	972(-)	Валентные колебания связей C-S сахарных колец
938	936(-)	938	936(-)	938	936(-)	938	936(-)	Колебания сахарных колец, маркеры В-формы ДНК
895	896(+)	895	896(+)	895	896(+)	895	896(+)	
837		837		836		836		

Примечание. Полужирным шрифтом выделены максимумы спектральных полос, увеличивающих свою интенсивность в комплексе по сравнению с аналогичными колебаниями ДНК или белка в свободном состоянии, курсивом – уменьшающих свою интенсивность. Для полос КД в скобках указан знак соответствующей полосы. Отнесение спектральных полос основано на работах [23, 29–31, 35–43] (см. в тексте).

В отсутствие белка ионы марганца вызывают существенное увеличение интенсивности практически всех полос в спектре ДНК в области колебаний фосфатных групп [27], что говорит о сильном взаимодействии ионов металла с сахарофосфатным остовом. Напротив, сам по себе белок практически не изменяет спектр ДНК в этой области [9]. Тем не менее, одновременное присутствие белков и ионов Mn^{2+} приводит к уменьшению интенсивности полосы поглощения симметричного валентного колебания группы $O=P=O$ (рис. 2б). Одновременно уменьшается интенсивность соответствующего ВКД дублета (рис. 2а), что, вероятнее всего, отражает изменения в структуре сахарофосфатного остова при изгибе ДНК [44]. В то же время, полоса с максимумом на 1058 см^{-1} остается неизменной, и окончательные интенсивности обеих полос оказываются равными. Полоса на 1058 см^{-1} в спектре ВКД соответствует колебаниям $C-O$ связей сахарного кольца, с поглощением на 1053 см^{-1} [45–47]. Такое поведение указывает на то, что происходящие изменения не оказывают существенного влияния на конформацию сахара. Этим данная система отличается от комплексов ДНК- Mn^{2+} [27], где не только поглощение, но и оптическая активность данного колебания существенно возросли.

Анализ и сопоставление полученных результатов

Наблюдаемое снижение интенсивности взаимодействия ионов металла с фосфатными группами ДНК, на наш взгляд, можно объяснить присутствием белка НМГВ1. Ранее нами показано, что С-концевой домен этого белка, состоящий из последовательности 30 дикарбоновых аминокислот, ответствен за модуляцию ДНК-связывающей активности белка [13–16]. Присутствие такой аминокислотной последовательности, обладающей высоким отрицательным зарядом, влияет и на колебания фосфатных групп ДНК, также заряженных отрицательно. Вполне возможно, что соседство значительного количества дикарбоновых кислот вызывает также перераспределение ионов металла в гидратных оболочках ДНК и их миграцию к облаку противоионов вокруг отрицательно заряженных боковых групп аминокислот.

Если немногочисленные изменения колебаний фосфатных групп ДНК допускают относительно простое толкование, то интерпретация спектральных изменений в области колебаний карбонильных групп представляют более сложную задачу (рис. 1). Поглощение ДНК в составе ДНК-белкового комплекса меняется незначительно (таблица). Одно из основных отличий состоит в увеличении поглощения карбонильных групп цитозина на 1678 см^{-1} . Возможно, такое поведение отражает нарушения в геометрии двойной

спирали и уменьшение расстояния между основаниями со стороны большой бороздки. Такое предположение подтверждает характер спектров оптической активности комплекса. Здесь обнаружено небольшое уменьшение интенсивности спектральных полос, отражающее нарушения стэкинг-взаимодействий.

Добавление ионов марганца к комплексу приводит к нескольким сильным изменениям. Поглощение связи $C=O$ гуанина на 1668 см^{-1} падает, в то время как рост интенсивности соседней полосы, относимой к колебаниям аналогичных групп цитозина, ведет к усилению пика на 1678 см^{-1} (таблица). Расположение этих двух $C=O$ групп различно: у гуанина они обращены к большой бороздке, тогда как у цитозина – к малой. Это означает, что взаимодействие с основаниями ДНК происходит со стороны малой бороздки, а взаимодействия в большой бороздке ослабляются. Взаимодействия в малой бороздке для столь значительных изменений в спектре должны существенно изменять дипольный момент связи $C=O$ [33, 48–51]. ДНК-связывающий домен белка НМГВ1, взаимодействующий по малой бороздке, не имеет в участке связывания заряженных аминокислотных остатков [6]. По всей видимости, такое поведение отражает участие ионов марганца в достаточно сильных взаимодействиях с основаниями в малой бороздке. В свою очередь, ослабление взаимодействий в большой бороздке при добавлении марганца к ДНК-белковому комплексу свидетельствует о том, что присутствие ионов Mn^{2+} препятствует тесному контакту молекулы гистона Н1 с основаниями, поскольку взаимодействия между Н1 и ДНК являлись единственными контактами в большой бороздке [7]. Возможность взаимодействия ионов Mn^{2+} с основаниями была установлена ранее нами и другими авторами [27, 48–51]. Однако в том случае нами показано, что взаимодействию по малой бороздке предшествует взаимодействие ионов Mn^{2+} одновременно с гуанином в большой бороздке и фосфатными группами сахарофосфатного остова. Такой ход процесса указывал на то, что необходимо появление определенных возмущений в структуре ДНК, прежде чем станет возможным взаимодействие ионов марганца с основаниями по ее малой бороздке. Тем не менее, в присутствии белков относительно слабое взаимодействие ионов металла с ДНК в большой бороздке не является основным возмущающим фактором. Более сильные возмущения в структуре ДНК, приводящие к доступности оснований ДНК для ионов Mn^{2+} со стороны малой бороздки, индуцируются связыванием ДНК с белковыми молекулами. Оптическая активность на 1662 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям группы $C=O$ цитозина [27], после добавле-

ния марганца к ДНК-белковому комплексу почти удвоила свою интенсивность. Столь сильный рост указывает на то, что взаимодействие заканчивается не просто связыванием этой группы с ионом металла, а существенным изменением ее ориентации, по отношению к соседним карбонильным группам [27, 33, 37, 45]. Иными словами, взаимодействия в системе сопровождаются заметными структурными перестройками. Такое толкование подтверждается и изменением оптической активности на частоте 1686 см^{-1} . Эта полоса относится к валентным колебаниям группы $\text{C}=\text{O}$ тимина [39–41]. Обычно, оптическая активность в этой области представлена слабым плечом в отрицательной полосе на 1700 см^{-1} [9, 27]. В спектре комплекса Mn^{2+} -ДНК-НМGB1/Н1 плечо превращается в сильный положительный пик на 1688 см^{-1} (рис. 1а). Поскольку в спектрах комплексов Mn^{2+} -ДНК подобных изменений не наблюдали [27], можно предположить, что они вызваны присутствием в системе белков. Данная группа $\text{C}=\text{O}$ не участвует в образовании уотсон-криковских водородных связей и экспонирована в малую бороздку ДНК. Серьезное изменение оптической активности при незначительном изменении поглощения соответствующей полосы указывает, прежде всего, на изменение ориентации колеблющейся группы по отношению к соседям [33, 37, 45]. В данном случае, это указывает на изменение во взаимном положении групп, экспонированных в малую бороздку ДНК, возникающее вследствие взаимодействия с белком. Взаимодействие гистона Н1, как известно, вызывает изгиб двойной спирали и расширение ее малой бороздки. Не исключено, что благодаря этим изменениям, основания ДНК оказываются более доступными со стороны малой бороздки для ионов марганца, которые связываясь с ДНК могут, если не зафиксировать, то несколько стабилизировать структурные изменения в двойной спирали. Те же самые нарушения в структуре ДНК – типичные мишени для белков семейства НМGB. Не исключено, что присутствие ионов Mn^{2+} приводит к более прочному связыванию НМGB1-доменов с ДНК. Это предположение, однако, требует дальнейшей проверки.

Ионы марганца расположены, по всей видимости, в обеих бороздках двойной спирали. При этом взаимодействие ионов металла с основаниями в малой бороздке носит прямой характер, сопровождающийся сильным изменением дипольных моментов отдельных карбонильных групп ДНК, экспонированных в малую бороздку. В то же время, в большой бороздке обнаружено опосредованное взаимодействие ионов Mn^{2+} через молекулы воды первой гидратной оболочки [27, 40]. Вероятнее всего, атом марганца координиру-

ется как с молекулами воды, так и с аминокислотными остатками в глобулярном домене гистона. Такой подход смог бы объяснить, почему присутствие ионов Mn^{2+} ослабляет взаимодействие гистона Н1 с ДНК, но при этом не вызывает заметных спектральных проявлений собственного взаимодействия.

Возможность взаимодействия ионов Mn^{2+} с белками подтверждается кристаллографическими исследованиями нескольких ДНК-связывающих белков [52, 53]. Каждый из изучавшихся белков для выполнения своей функции *in vivo* требует присутствия в среде ионов марганца. Эти эксперименты показали, что ионы Mn^{2+} с готовностью образуют комплексы с остатками аспарагиновой и глутаминовой кислот. Данный результат особенно интересен с точки зрения первичной структуры белка НМGB1. С-концевой участок этого белка состоит из последовательности именно этих аминокислотных остатков, что делает его вполне вероятной мишенью для ионов марганца.

Взаимодействие катионов металла с отрицательными зарядами С-концевого домена белка НМGB1 может иметь еще одно важное следствие. Вместе с уменьшением эффективного заряда этой части молекулы, уменьшается и его функция, как модулятора активности ДНК-белковых и белок-белковых взаимодействий. Взаимодействие отрицательно заряженной последовательности с двухвалентными катионами Mn^{2+} может привести к повышению сродства белка к ДНК, подобно тому, как это происходит в случае с белком НМGB1-(А + В), лишенным С-концевой последовательности [14–16]. Не исключено, что упорядоченный характер надмолекулярных комплексов есть следствие повышения структурирующей роли НМGB-доменов белка. Возможно, что благодаря этому обсуждавшиеся ранее спектры КД таких систем [10] иногда больше походят на спектры структурно упорядоченных комплексов ДНК-НМGB1-(А + В), чем на простой ψ -спектр КД ДНК, характерный для крупных неупорядоченных агрегатов.

Авторы выражают свою глубокую благодарность доктору Гельмуту Визеру (Helmut Wieser, Химический факультет университета г. Калгари, Канада) за предоставленное им оборудование, а также его помощь и поддержку при проведении данных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-00092, 12-08-01134) и Комитета по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга. Часть работ проведена в рамках реализации Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг., а также программы

Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ner S.S. 1992. HMGs everywhere. *Curr. Biol.* **2**, 208–210.
- Рамм Е.И., Чихиржина Е.В., Костылева Е.И., Воробьев В.И. 1995. Конформационные особенности линкерных белков суперкомпактного хроматина спермиев морских беспозвоночных. *Биохимия.* **60**, 150–158.
- Чихиржина Е.В., Воробьев В.И. 2002. Линкерные гистоны: конформационные превращения и роль в организации структуры хроматина. *Цитология.* **44**, 721–736.
- Travers A. 1999. The location of the linker histone on the nucleosome. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 4–7.
- 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.
- Read C.M., Cary P.D., Crane-Robinson C., Driscoll P.C., Norman D.G. 1993. Solution structure of a DNA-binding domain from HMG1. *Nucl. Acids Res.* **21**, 3427–3436.
- Ramakrishnan V., Fich J.T., Graziano V., Lee P.L., and Sweet R.M. 1993. Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature.* **362**, 219–223.
- Zlatanova J., van Holde K. 1998. Linker histones versus HMG1/2: a struggle for dominance? *BioEssays.* **20**, 584–588.
- Polyanichko A.M., 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.
- Чихиржина Е.В., Поляничко А.М., Костылева Е.И., Воробьев В.И. 2011. Структура комплексов ДНК с хромосомным белком HMGB1 и гистоном H1 в присутствии ионов марганца. I. Спектроскопия кругового дихроизма. *Молекуляр. биология.* **45**, 356–365.
- Polyanichko A., Wieser H. 2010. Structural organization of DNA–protein complexes of chromatin studied by vibrational and electronic circular dichroism. *Spectroscopy.* **24**, 239–244.
- Поляничко А.М., Давыденко С.Г., Чихиржина Е.В., Воробьев В.И. 2000. Взаимодействие суперспиральной ДНК с негистоновым белком HMG1. *Цитология.* **42**, 787–793.
- 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.
- 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.
- Chikhirzhina E., Polyanichko A., Leonenko Z., Wieser H., Vorobyev V. 2010. C-terminal domain of nonhistone protein HMGB1 as a modulator of HMGB1-DNA structural interactions. *Spectroscopy.* **24**, 361–366.
- Поляничко А.М., Леоненко З.В., Крамб Д., Визер Г., Воробьев В.И., Чихиржина Е.В. 2008. Структурная организация комплексов ДНК с белками HMGB1 и HMGB1-(A+V). *Биофизика.* **53**, 407–416.
- Родионова 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**, 1014–1020.
- 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**, 55–60.
- Kohlstaedt L.A., Cole R.D. 1994. Specific interaction between H1 histone and high mobility protein HMG1. *Biochemistry.* **33**, 570–575.
- Kohlstaedt L.A., Cole R.D. 1994. Effect of pH on interactions between DNA and high-mobility group protein HMG1. *Biochemistry.* **33**, 12702–12707.
- Polyanichko A., Chikhirzhina E. 2012. Interaction between nonhistone protein HMGB1 and linker histone H1 facilitates the formation of structurally ordered DNA–protein complexes. *Spectroscopy (Netherlands).* **27**, 393–398.
- Saito K., Kikuchi T., Shirakawa H., Yoshida M. 1999. The stabilized structural array of two HMG1/2-boxes endowed by a linker sequence between them is requisite for the effective binding of HMG1 with DNA. *J. Biochem.* **125**, 399–405.
- McCauley M.J., Zimmerman J., Maher L.J. 3rd, Williams M.C. 2007. HMGB binding to DNA: single and double box motifs. *J. Mol. Biol.* **374**, 993–1004.
- Khadake J.R., Rao M.R. 1995. DNA- and chromatin-condensing properties of rat testes H1a and H1t compared to those of rat liver H1bdec; H1t is a poor condenser of chromatin. *Biochemistry.* **34**, 15792–15801.
- Поляничко А.М., Чихиржина Е.В., Костылева Е.И., Воробьев В.И. 2004. Структура комплексов ДНК с негистоновым хромосомным белком HMGB1 в присутствии ионов марганца. *Молекуляр. биология.* **38**, 1041–1049.
- Поляничко А.М., Чихиржина Е.В., Андрущенко В.В., Костылева Е.И., Wieser H., Воробьев В.И. 2004. Влияние ионов Ca²⁺ на компактизацию ДНК в комплексе с негистоновым хромосомным белком HMGB1. *Молекуляр. биология.* **38**, 701–712.
- 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.
- Shockett P.E., Schatz D.G. 1999. DNA hairpin opening mediated by the RAG1 and RAG2 proteins. *Mol. Cell Biol.* **19**, 4159–4166.
- Kriatchko A.N., Bergeron S., Swanson P.C. 2008. HMG-box domain stimulation of RAG1/2 cleavage activity is metal ion dependent. *BMC Mol. Biol.* **9**, 32–42.
- Kim D.R., Oettinger M.A. 1998. Functional analysis of coordinated cleavage in V(D)J recombination. *Mol. Cell Biol.* **18**, 4679–4688.
- Fugmann S.D., Lee A.I., Shockett P.E., Villey I.J., Schatz D.G. 2000. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 495–527.

32. Bergeron S., Madathiparambil T., Swanson P.C. 2005. Both high mobility group (HMG)-boxes and the acidic tail of HMGB1 regulate recombination-activating gene (RAG)-mediated recombination signal synopsis and cleavage *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **280**, 31314–31324.
33. Nafie L.A. 1997. Infrared and Raman vibrational optical activity: theoretical and experimental aspects. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **48**, 357–376.
34. Keiderling T.A. 1996. Vibrational circular dichroism applications to conformational analysis of biomolecules. In: *Circular Dichroism and the Conformational analysis of biomolecules*. Ed. Fasman G.D. N.Y.: Plenum Press, 555–598.
35. Keiderling T.A. 2001. Vibrational circular dichroism of peptides and proteins: survey of techniques, qualitative and quantitative analyses, and applications. In: *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*. Eds Bing Yan, Gremlich H.-U. N.Y.: Marcel Dekker, **24**, 55–100.
36. Polyanchko A.M., Wieser H. 2007. Vibrational circular dichroism and its applications to protein studies. In: *Methods in Protein Structure and Stability Analysis: Vibrational Spectroscopy*. Eds Permyakov E., Uversky V. N.Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 267–302.
37. Polyanchko A.M., Andrushchenko V.V., Bouř P., Wieser H. 2012. Vibrational circular dichroism studies of biological macromolecules and their complexes. In: *Circular Dichroism: Theory and Spectroscopy*. Ed. Rodgers D.S. N.Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 67–126.
38. Tsankov D., Eggimann T., Wieser H. 1995. An alternative design for improved FTIR-VCD capabilities. *Appl. Spectrosc. Rev.* **49**, 132–138.
39. Andrushchenko V., Leonenko Z., Cramb D., van De S.H., Wieser H. 2001. Vibrational CD (VCD) and atomic force microscopy (AFM) study of DNA interaction with Cr^{3+} ions: VCD and AFM evidence of DNA condensation. *Biopolymers*. **61**, 243–260.
40. Andrushchenko V., van De S.H., Wieser H. 2003. DNA interaction with Mn^{2+} ions at elevated temperatures: VCD evidence of DNA aggregation. *Biopolymers*. **69**, 529–545.
41. Tsuboi M. 1969. Application of infrared spectroscopy to structural studies of nucleic acids. *Appl. Spectrosc. Rev.* **3**, 45–90.
42. Baumruk V., Keiderling T.A. 1993. Vibrational circular dichroism of proteins in H_2O solution. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6939–6942.
43. Barth A., Zscherp C. 2002. What vibrations tell us about proteins. *Q. Rev. Biophys.* **35**, 369–430.
44. Wang L., Yang L., Keiderling T.A. 1994. Vibrational circular dichroism of A-, B-, and Z-form nucleic acids in the PO_2 -stretching region. *Biophys. J.* **67**, 2460–2467.
45. Andrushchenko V., Wieser H., Bouř P. 2002. B-Z conformational transition of DNA monitored by vibrational circular dichroism. Ab initio interpretation of the experiment. *J. Physical Chemistry B.* **106**, 12623–12634.
46. Taillandier E., Liquier J., Taboury J.A. 1985. Infrared spectral studies of DNA conformations. In: *Advances in Infrared and Raman Spectroscopy*. Eds Clark R.J.H., Hester R.E. N.Y.: Wiley-Heyden, 65–114.
47. Taillandier E. 1990. Nucleic acid conformations studied by vibrational spectroscopy. In: *Structure and Methods*. Eds Sarma R.H., Sarma M.H. N.Y.: Adenine Press, V. 3, 73–78.
48. Sissoeff I., Grisvard J., Guille E. 1976. Studies on metal ions-DNA interactions: specific behaviour of reiterative DNA sequences. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **31**, 165–199.
49. Granot J., Feigon J., Kearns D.R. 1982. Interactions of DNA with divalent metal ions. I. ^{31}P -NMR studies. *Biopolymers*. **21**, 181–201.
50. Granot J., Kearns D.R. 1982. Interactions of DNA with divalent metal ions. II. Proton relaxation enhancement studies. *Biopolymers*. **21**, 203–218.
51. Granot J., Kearns D.R. 1982. Interactions of DNA with divalent metal ions. III. Extent of metal binding: experiment and theory. *Biopolymers*. **21**, 219–232.
52. 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.
53. 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.