

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ НЕГИСТОНОВЫМ БЕЛКОМ ХРОМАТИНА HMGB1 И ЛИНКЕРНЫМ ГИСТОНОМ H1

© А. В. Фонин,^{1, 2} Ольга В. Степаненко,¹ К. К. Туроверов,¹ В. И. Воробьев¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
и ² С.-Петербургский государственный политехнический университет;
¹ электронный адрес: alexfonin@gmail.com

Принципиальная возможность взаимодействия между негистоновым белком хроматина HMGB1 и линкерным гистоном H1 была исследована в растворах с различной ионной силой методами собственной УФ-флуоресценции, кругового дихроизма в дальней и ближней УФ-областях спектра и спектрофотометрии. Полученные данные позволили нам сделать вывод о том, что увеличение содержания гистона H1 в растворах HMGB1 с низкой ионной силой сопровождается разрушением ассоциатов HMGB1. Белок-белковое взаимодействие приводит к увеличению доли упорядоченных участков в структуре белков и небольшим изменениям третичной структуры белков.

Ключевые слова: негистоновый белок хроматина HMGB1, линкерный гистон H1, хроматин, фолдинг белков, нативно неупорядоченные белки.

Принятые сокращения: КД — круговой дихроизм, HMGB1 — high mobility group box1.

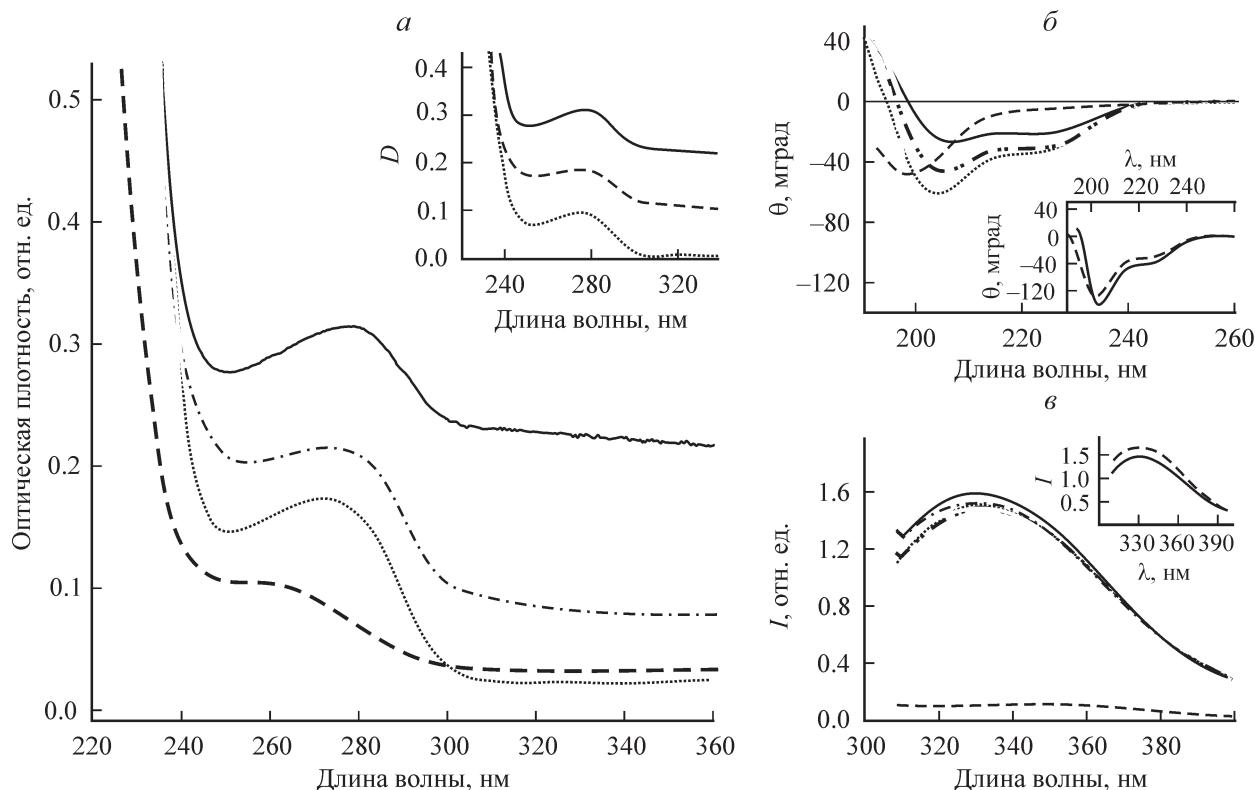
Известно, что многие белки могут формировать компактную, упорядоченную структуру только при взаимодействии со своими партнерами — молекулами ДНК и РНК, другими белками, ионами металлов и т. д. (Uversky et al., 2008). Такие нативные частично неупорядоченные белки, будучи способны и взаимодействовать с различными партнерами, играют значительную роль в клеточных процессах, включая регуляцию и контроль клеточных процессов (Туроверов и др., 2009; Turoverov et al., 2010), чем и обусловлен высокий интерес к этим белкам. Для понимания структуры и функций таких нативных неупорядоченных белков необходимо изучение процессов комплексообразования и структуры возникающих белковых комплексов. Негистоновый белок хроматина HMGB1 и линкерный гистон H1 принадлежат к таким белкам. Третичная структура HMGB1 содержит два ДНК-связывающих L-образных домена и С-концевой кислый неупорядоченный участок (Hardman et al., 1995). H1 состоит из центрального домена, связывающего нуклеосому и обрамленного N- и C-концевыми неупорядоченными племенами (Triber et al., 1989). Оба белка принимают участие в формировании высших уровней структурной организации хроматина. Существуют данные, согласно которым линкерный гистон и негистоновый белок хроматина HMGB1 могут оказывать противоположное влияние на структуру хроматина (An et al., 1998). Так, гистон H1 способствует стабилизации структуры хроматина как на нуклеосомном уровне, так и на более высоких уровнях структурной организации хроматина. В то же время HMGB1 может локально дестабилизировать структуру хроматина, так как он, обладая высокой внутриядерной подвижностью, способен замещать многие белки, в том числе H1 на входе (выходе) ДНК из нуклеосомы и привлекать дру-

гие белки, способствуя активации транскрипции (Ju et al., 2006). Сайты связывания H1 и HMGB1 на ДНК могут частично перекрываться, и потому связывание этих белков с ДНК может быть взаимоисключающим (An et al., 1998). Есть данные, свидетельствующие о том, что присутствие гистона H1 способно модулировать связывание HMGB1 с ДНК (Watson et al., 2007). Не исключено, что основные белки хроматина H1 и HMGB1 могут взаимодействовать не только с ДНК, но и друг с другом. Взаимодействие между белками HMGB1 и гистоном H1 может оказывать существенное влияние на конкурентное связывание этих белков с ДНК, вероятно изменяя аффинность H1 и HMGB1 к структурам ДНК.

Настоящая работа посвящена изучению взаимодействия между негистоновым белком хроматина HMGB1 и линкерным гистоном H1 в растворах с широким диапазоном изменения ионной силы раствора и при различных молярных соотношениях исследуемых белков.

Материал и методика

Негистоновый белок хроматина HMGB1 и линкерный гистон H1 из тимуса теленка были выделены и очищены согласно известным методикам (Polyanichko et al., 2002). H1 был выделен из ядра путем экстракции 5%-ной хлорной кислотой с последующим осаждением тремя объемами подкисленного ацетона при -20°C . Негистоновый белок хроматина HMGB1 был выделен из ядер путем экстракции раствором 350 mM NaCl (Johns et al., 1982). Контроль за чистотой препаратов осуществляли методом электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (Laemmli et al., 1970).



Взаимодействие между негистоновым белком хроматина и линкерным гистоном H1.

Спектры поглощения (а), спектры кругового дихроизма в дальней УФ-области (б), спектры флуоресценции при длине волны возбуждения 297 нм (в) растворов HMGB1 (черные сплошные кривые) и H1 (черные штриховые кривые); молярные соотношения H1 к HMGB1: 1/3.4 (черные штрих-пунктирные кривые), 1/2.6 (сплошные серые кривые), 1/1.7 (серые два штриха-пунктирные кривые), 1/1.2 (черные пунктирные кривые) и 2.3/1 (серые штриховые кривые). а, вставка — влияние ионной силы на спектры поглощения HMGB1 в растворе 10 мМ Трис-HCl, 15 мМ NaCl и 150 мМ NaCl представлены сплошной, штриховой и пунктирной кривыми соответственно. Сравнение экспериментально полученных (сплошные кривые) и вычисляемых в предположении об отсутствии белок-белкового взаимодействия (штриховые кривые) спектров КД в дальней УФ-области (б, вставка) и спектров триптофановой флуоресценции (в, вставка) растворов, содержащих H1 в соотношении к HMGB1, равном 2.3/1.

Концентрация HMGB1 составляла 0.3 мг/мл. Молярное отношение H1 к HMGB1 варьировало от 1 : 4 до 4 : 1. Измерения проводили в 10 мМ Трис-HCl-буфере, pH 7.0, а также в растворах с низкой ионной силой (15 мМ NaCl) и в физиологическом растворе NaCl (150 мМ). Концентрацию белков определяли спектрофотометрически. Коэффициент молярной экстинкции для HMGB1 при длине волны 280 нм (ϵ_{280}), полученный с помощью анализа количества ароматических аминокислотных остатков в первичной структуре белка, составлял 18 920 М⁻¹/см⁻¹ (Read et al., 1993; Hardman et al., 1995). Коэффициент молярной экстинкции для H1 при длине волны 230 нм (ϵ_{230}) равен 41 000 М⁻¹/см⁻¹ (Kohlstaedt et al., 1994).

Флуоресцентные измерения проводили с использованием спектрофлуориметра со стационарным возбуждением собственного изготовления (Туроверов и др., 1998). Флуоресценцию белков в большинстве случаев регистрировали при возбуждении на длинноволновом краю спектра поглощения белка (297 нм), т. е. в условиях, когда флуоресценция белка обусловлена исключительно триптофановыми остатками. Спектры флуоресценции измеряли при возбуждении светом с длинами волн 280 и 297 нм. Для характеристики положения и формы спектров флуоресценции использовали параметр $A = I_{320}/I_{365}$ (I_{320} и I_{365} — интенсивности флуоресценции, измеренные при длинах волн 320 и 365 нм соответственно) (Turoverov, Kuznetsova, 2003). Спектры флуоресценции и параметр A корректировали на спектральную чувствитель-

ность установки. Измерения были выполнены в микрокюветах 101.016-QS 5×5 мм (Hellma, Германия). Все эксперименты были выполнены при 23 °C. Перед измерением все белковые образцы были выдержаны при той же температуре.

Круговой дихроизм (КД). Спектры КД получали с использованием спектрополяризатора J-810 (Jasco, Япония). Измерение спектров КД в дальней УФ-области проводили в диапазоне от 260 до 190 нм с использованием кварцевых кювет с длиной оптического пути 1 мм. Спектры КД в ближней УФ-области регистрировали от 320 до 250 нм и использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см. Все спектры измеряли с шагом 0.1 нм. Для улучшения соотношения сигнал/шум каждый спектр регистрировали 2 раза и полученные данные усредняли. Спектры КД белков построены с учетом сигнала КД соответствующего буферного раствора.

Результаты и обсуждение

Сравнение спектров поглощения HMGB1 в растворах с низкой ионной силой со спектрами поглощения растворов HMGB1 с небольшим содержанием линкерного гистона H1 наиболее ярко иллюстрирует взаимодействие негистонового белка хроматина HMGB1 и линкерного гистона H1. При этих условиях спектры поглощения HMGB1 характеризуются заметным уровнем светорассеяния (см.

рисунок, а). Этот эффект можно объяснить формированием ассоциатов между молекулами HMGB1. Однако присутствие гистона H1 в растворах HMGB1 приводит к уменьшению светорассеяния, что может быть объяснено разрушением ассоциатов между молекулами HMGB1 из-за их электростатического взаимодействия с молекулами гистона H1. Снижение уровня светорассеяния в растворах HMGB1 с увеличением ионной силы раствора позволяет предположить также, что ассоциация молекул HMGB1 в растворах с низкой ионной силой определяется взаимодействиями, имеющими электростатическую природу (см. рисунок, а, вставка). Таким образом, существенное уменьшение светорассеяния HMGB1 в растворах с низкой ионной силой в присутствии гистона H1 можно считать основным доказательством белок-белкового взаимодействия между HMGB1 и H1.

Спектры кругового дихроизма были использованы для определения изменений во вторичной структуре обоих белков в процессе их взаимодействия. Спектр КД в дальней УФ-области растворов HMGB1 имеет два минимума при 208 и 222 нм, что характерно для белков с высоким уровнем содержания α -спиральных участков (см. рисунок, б). Такой спектр КД в дальней УФ-области HMGB1, вероятно, определяется наличием двух структурированных ДНК-связывающих доменов, содержащих по три α -спиральных участка (Read et al., 1993). В то же время спектр КД в дальней УФ-области гистона H1 соответствует белкам, имеющим неупорядоченную структуру. Линкерный гистон H1 имеет небольшое (порядка 80 аминокислотных остатков) глобулярное ядро (Triber et al., 1989). Было показано, что спектры КД в дальней УФ-области растворов HMGB1 в присутствии H1 становятся более выраженным при всех экспериментальных условиях (см. рисунок, б). Эти изменения в спектрах КД в дальней УФ-области позволяют предположить, что при взаимодействии HMGB1 с линкерным гистоном H1 наблюдается увеличение доли упорядоченных участков во вторичной структуре белков.

Так как гистон H1 не содержит триптофановых остатков, структурные данные, полученные методом триптофановой флуоресценции, могут характеризовать изменения в пространственной структуре HMGB1 при исследовании белок-белкового взаимодействия. Показано, что добавление гистона H1 к растворам HMGB1 приводит к тушению триптофановой флуоресценции HMGB1 при всех экспериментальных условиях (см. рисунок, в). Эти данные свидетельствуют о незначительных изменениях третичной структуры HMGB1 в присутствии H1. Данные КД в ближней УФ-области спектра согласуются с данными, полученными при анализе собственной УФ-флуоресценции этих белков.

Результаты, полученные нами, позволяют заключить, что негистоновый белок хроматина HMGB1 и линкерный гистон H1 способны к образованию комплексов между собой. Белок-белковое взаимодействие сопровождается увеличением упорядоченных участков во вторичной структуре белков и небольшими изменениями в третичной структуре HMGB1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00092).

Список литературы

- Turoverov K. K., Biktaev A. G., Doroфеюк A. B., Кузнецова И. М. 1998. Комплекс аппаратных и программных средств для измерения спектральных, поляризационных и кинетических характеристик флуоресценции в растворе. Цитология. 40 (8/9) : 806—817.
- Turoverov K. K., Уверский В. Н., Кузнецова И. М. 2009. Нативные глобулярные и нативные частично или полностью неупорядоченные белки. Фолдинг, образование надмолекулярных комплексов, агрегация. Цитология. 51 (3) : 190—203.
- An W., van Holde K., Zlatanova J. 1998. The nonhistone chromatin protein HMG1 protects linker DNA on the side opposite to that protected by linker histones. J. Biol. Chem. 273 : 26 289—26 291.
- Hardman C. H., Broadhurst R. W., Raine A. R. C., Grasser K. D., Thomas J. O., Laue E. D. 1995. Structure of the A-domain of HMG1 and its interaction with DNA as studied by heteronuclear three- and four-dimensional NMR spectroscopy. Biochemistry. 34 : 16 596—16 607.
- Johns E. W. 1982. The HMG chromosomal proteins. New York: Acad. Press. 251 p.
- Ju B. G., Lunyak V. V., Perissi V., Garcia-Bassets I., Rose D. W., Glass C. K., Rosenfeld M. G. 2006. A topoisomerase II β -mediated dsDNA break required for regulated transcription. Science. 312 : 1789—1902.
- Kohlstaedt L. A., Cole R. D. 1994. Specific interaction between H1 histone and high mobility protein HMG1. Biochemistry. 33 : 570—575.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
- Polyanichko A. M., Chikhirzhina E. V., Skvortsov A. N., Kostenyeva E. I., Colson P., Houssier C., Vorobyev V. I. 2002. The HMG1 ta(i)le. J. Biomol. Struct. & Dynamics. 19 : 1053—1062.
- Read C. M., Cary P. D., Crane-Robinson C., Driscoll P. C., Carillo M. O. M., Norman D. G. 1993. The structure of the HMG box and its interaction with DNA. Nucl. Acids Mol. Biol. 9 : 222.
- Triber H., Bar H., Walter A., Osipova T. N., Ramm E. I., Kostenyeva E. I., Vorobyev V. I. 1989. Structural differences between histone H1 molecules from sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*) sperm and calf thymus: hydrodynamic and CD studies. Int. J. Biol. Macromol. 11 : 153—158.
- Turoverov K. K., Kuznetsova I. M. 2003. Intrinsic fluorescence of actin. J. Fluorescence. 13 : 41—57.
- Turoverov K. K., Kuznetsova I. M., Uversky V. N. 2010. The protein kingdom extended: ordered and intrinsically disordered proteins, their folding, supramolecular complex formation, and aggregation. Prog. Biophys. Mol. Biol. PMID : 20097220. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2010.01.003.
- Uversky V. N., Oldfield C. J., Dunker A. K. 2008. Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. Annu. Rev. Biophys. 37 : 215—246.
- Watson M., Stott K., Thomas J. O. 2007. Mapping intramolecular interactions between domains in HMGB1 using a tail-truncation approach. J. Mol. Biol. 374 : 1286—1297.

Поступила 20 V 2010

INTERACTION BETWEEN NON-HISTONE CHROMATIN PROTEIN HMGB1
AND LINKER HISTONE H1

A. V. Fonin,^{1, 2,} Olga V. Stepanenko,¹ K. K. Turoverov,¹ V. I. Vorobyev¹*

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg,

and ² St. Petersburg State Polytechnical University

¹ e-mail: alexfonin@gmail.com

The fundamental possibility of interaction between non-histone chromatin protein HMGB1 and linker histone H1 was studied in the solutions with different ionic strength by intrinsic UV-fluorescence, far and near-UV CD and spectrophotometry. The obtained data allow us to assume that the increase of histone H1 content in the HMGB1 solutions in a low ionic strength is accompanied by the destruction of HMGB1 associates. The interaction between proteins of HMGB1 and H1 causes the increase in the number of ordered regions in the protein molecules and the minor changes in their tertiary structure.

Key words: non-histone protein HMGB1, linker histone H1, chromatin, protein folding, intrinsically disordered protein.