

АНАЛИЗ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ЛИНКЕРНОГО ГИСТОНА H1 ПО СПЕКТРАМ ИНФРАКРАСНОГО ПОГЛОЩЕНИЯ

© А. М. Поляничко,^{1, 2, *} Н. М. Романов,¹ Т. Ю. Старкова,^{1, 2}
Е. И. Костылева,² Е. В. Чихиржина²

¹ Физический факультет С.-Петербургского государственного университета и

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

* электронный адрес: a.polyanichko@spbu.ru

В работе проведено сравнение эффективности использования методов инфракрасной (ИК) спектроскопии в области колебаний полосы амид I, а также спектроскопии кругового дихроизма (КД) в дальнем ультрафиолетовом (УФ) диапазоне при анализе вторичной структуры белков на примере линкерного гистона H1 и бычьего сывороточного альбумина (БСА). Установлено, что использование алмазной ячейки НПВО дает количественную оценку доли α -спиралей и β -слоев в структуре белков, хорошо согласующуюся с результатами УФ КД. Показано, что гистон H1 способен к агрегации, в результате которой значительно изменяется его вторичная структура.

Ключевые слова: гистон H1, ИК-спектроскопия, структура белков.

Принятые сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, ИК — инфракрасный, КД — круговой дихроизм, НПВО — нарушенное полное внутреннее отражение, УФ — ультрафиолетовый.

Одним из ключевых белков хроматина является линкерный гистон H1 (Рамм и др., 1995; Jerzmanowski, 2004; Eirin-López, Ausió, 2009; Bannister, Kouzarides, 2011; Luger et al., 2012; Smolle, Workman, 2013). Он взаимодействует с межнуклеосомной областью ДНК и отвечает за образование высших уровней структурной организации хроматина (Рамм и др., 1995; Jerzmanowski, 2004; Luger et al., 2012; Smolle, Workman, 2013). H1 состоит из глобулярного домена, который окружен конформационно подвижными C- и N-концевыми участками (Чихиржина, Воробьев, 2002). Определение вторичной структуры этого белка обычными методами, такими как круговой дихроизм (КД) в ультрафиолетовом (УФ) диапазоне, затруднено, поскольку спектры КД других белков мало пригодны в качестве реперных для анализа УФ КД гистона H1. Гистон H1 отличается от других гистонов большей видо- и ткане-специфичностью (Чихиржина, Воробьев, 2002), и при расчетах вклада различных конформаций во вторичную структуру этого белка необходимо учитывать особенности его аминокислотной последовательности. Так, спермий-специфический гистон H1 в отличие от соматического имеет большую длину полипептидной цепи и молекулярную массу, обогащен аргинином в большей степени при приблизительно том же содержании лизина (Рамм и др., 1995; Чихиржина, Воробьев, 2002; Чихиржина и др., 2011; Chikhirzhina et al., 2012). И именно эти особенности структуры H1 определяют его функции в ядре и особенности его взаимодействия с молекулой ДНК.

При экспериментальной оценке параметров вторичной структуры белков наиболее распространен метод КД в дальнем УФ-диапазоне. В простейшем случае метод по-

зволяет определить степень α -спиральности по величине КД при длине волны 222 нм, используя эмпирическое соотношение (Polyanichko et al., 2011). Более детальный анализ, основанный на сравнении спектра КД белка с репрезентативным набором спектров белков с известной вторичной структурой (Sreerama, Woody, 2000), позволяет также оценить долю β -слоев в составе белковой молекулы. Относительно недавно получил развитие метод определения вторичной структуры белков, основанный на анализе спектров ИК-поглощения (Byler, Susi, 1986; Barth, Zscherp, 2002) и КД (Keiderling, 2002; Polyanichko, Wieser, 2007) в области колебаний пептидной связи. Однако до последнего времени метод имел лишь ограниченную применимость из-за трудностей в подготовке образцов, необходимости изотопного замещения при работе в растворах либо неоднозначности в интерпретации результатов при работе с пленками.

Ситуация несколько изменилась с появлением высокочувствительных детекторов и внедрением принципа нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Однако широкое использование метода НПВО поставило вопрос об оптимальном выборе материала, который используется при изготовлении рабочей поверхности ячейки НПВО. Оказалось, что многие материалы, удобные с точки зрения спектроскопии НПВО, вызывают повышенную сорбцию биомолекул, которая зачастую приводит к нарушениям их вторичной структуры.

В настоящей работе мы провели сравнение эффективности использования алмазной ячейки однократного НПВО и традиционной ячейки пропускания при анализе вторичной структуры белков на примере линкерного гистона H1 и бычьего сывороточного альбумина (БСА).

Материал и методика

Выделение белка и его характеристики. Для работы были использованы линкерный гистон H1 и коммерческий препарат бычьего сывороточного альбумина. Гистон H1 (с мол. массой 21 000 Да) был получен из хроматина тимуса теленка экстракцией 5%-ной хлорной кислотой с последующим осаждением белков из раствора подкисленным ацетоном при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Чихиржина и др., 1998). Контроль чистоты и идентификацию белковых препаратов осуществляли с помощью метода электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (Laemmly, 1970). При проведении спектроскопических экспериментов сухие препараты белков растворяли в водном растворе в концентрации примерно 1 мг/мл. Точное значение концентрации определяли спектрофотометрически, используя коэффициенты молярной экстинкции $\varepsilon_{279}(\text{BCA}) = 43\ 824\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $\varepsilon_{230}(\text{H1}) = 41\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Регистрацию спектров УФ КД осуществляли на спектрополяриметре Jasco-815 в режиме пошагового сканирования (Step Scan) со временем накопления сигнала 0.5 с. Измерения проводили в кварцевой круглой кювете с длиной оптического пути 0.5 см в диапазоне от 190 до 260 нм с шагом в 1 нм. Для устранения влияния низкочастотных случайных процессов спектры образца записывали 3 раза с последующим усреднением. Обработку полученных спектров проводили с использованием программного обеспечения, поставляемого с прибором. Спектры КД белков представлены в терминах молярной эллиптичности. Концентрация белков в пробах составляла 30 мкг/мл.

ИК-спектроскопия. Водные растворы белков высушивали, используя концентратор биомолекул (Eppendorf, Германия), после чего растворяли вновь в нужном объеме D_2O (Sigma, США, 99.9 %). Конечная концентрация белков в пробе составляла для БСА 26, для H1 — 30 мг/мл. Изотопное замещение H_2O на D_2O достигалось посредством трехкратного перерастворения белка в тяжелой воде с промежуточным высушиванием. Для регистрации спектров поглощения в среднем ИК-диапазоне использовали Фурье-спектрометр Tensor 27 (Bruker, Германия) в сочетании с разборной кюветой на основе кристаллов BaF_2 с длиной оптического пути 50 мкм. Оптические пути прибора продували газообразным азотом. Регистрацию спектров производили с применением низкошумящего МСТ-детектора (HgCdTe), охлаждаемого жидким азотом.

Для регистрации спектров поглощения с использованием НПВО использовали Фурье-спектрометр Nicolet 8700 (Thermo Scientific, США) и приставку однократного НПВО на основе алмаза. Оптические пути прибора продували сухим воздухом. Регистрацию спектров производили с помощью низкошумящего детектора МСТ (HgCdTe), охлаждаемого жидким азотом. Коррекцию спектров НПВО производили автоматически с использованием программного обеспечения, поставляемого с прибором. Спектры каждого образца регистрировали с разрешением $2\ \text{cm}^{-1}$, накапливали по 500 спектров.

Результаты и обсуждение

Поглощение электромагнитного излучения в среднем ИК-диапазоне обусловлено колебаниями атомов в молекуле, сопровождающимися изменением дипольного мо-

мента связи или химической группы. При этом характер колебаний и их частоты будут сходными для одинаковых химических групп даже в том случае, когда эти группы находятся в составе различных соединений. Последнее обстоятельство позволяет выделять в ИК-спектрах характерные области, соответствующие колебаниям определенных химических групп. Поглощение белковых молекул в среднем ИК-диапазоне обусловлено в первую очередь колебаниями в пептидной связи. Эти колебания проявляются в спектрах в виде нескольких широких полос, известных как полосы «амид». Колебания связей $\text{C}=\text{O}$ и $\text{N}-\text{H}$ оказались весьма чувствительными к изменению конформации полипептида, что позволяет использовать спектры поглощения белков для анализа их вторичной структуры. Наиболее информативным, с этой точки зрения, является анализ полосы амид I, которая обусловлена преимущественно колебаниями карбонильной группы и наблюдается в спектрах около $1650\ \text{cm}^{-1}$.

На практике регистрация ИК-спектров поглощения водных растворов белков сопряжена с несколькими методическими трудностями. Прежде всего измерения осложняются сильным поглощением воды (H_2O) в этой области спектра. Для получения спектров с удовлетворительным соотношением сигнал/шум требуется уменьшать длину оптического пути образца до 3—5 мкм, что неизбежно влечет за собой необходимость повышать концентрацию белка в пробе до 20—30 мг/мл. По этой причине традиционно используется иной подход, связанный с проведением измерений в тяжелой воде (D_2O) в качестве растворителя, у которой в области колебаний амид I имеется окно прозрачности. Это позволяет увеличивать толщину образца до 50—60 мкм, уменьшая пропорционально концентрацию белка в пробе. В последние годы получил широкое распространение метод НПВО. Метод основан на эффекте полного внутреннего отражения электромагнитной волны на границе раздела двух сред. Как известно, при таком отражении происходит частичное проникновение электромагнитной волны в приграничные области соседней среды на глубину около четверти длины волны излучения. В результате отраженное излучение содержит информацию о свойствах приграничного слоя соседней среды.

При правильном выборе геометрии кристалла и направления распространения луча отражение может происходить многократно, увеличивая полезный сигнал. При такой схеме проведения измерений влияние растворителя оказывается минимальным вследствие малой глубины проникновения луча в среду. На практике для создания полного внутреннего отражения используют прозрачные в ИК-области материалы с высоким показателем преломления, например кристаллы ZnSe , на «отражающую» поверхность которых наносят исследуемый образец. Однако сорбция материала на поверхности кристалла может исказить результаты по сравнению с измерениями в толще раствора. В частности, сорбция белковых молекул может сопровождаться изменением их вторичной структуры. Интенсивность процесса сорбции будет зависеть не только от свойств белка, но и от выбора кристалла. Среди используемых в ИК-спектроскопии материалов одним из наиболее инертных является алмаз. В настоящей работе мы провели анализ вторичной структуры линкерного гистона H1 при измерении образцов в одинаковой концентрации методом пропускания в стандартной ячейке BaF_2 и методом НПВО, используя алмазную ячейку однократного отражения.

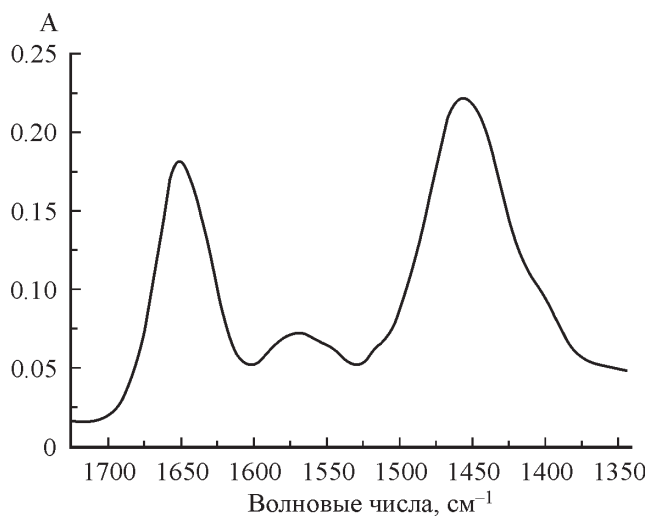


Рис. 1. Спектр ИК-поглощения бычьего сывороточного альбумина (БСА) в растворе D_2O в области полос амид I (1650 см^{-1}) и амид II (1450 см^{-1}).

A — поглощение. Спектр получен в ячейке пропускания с длиной оптического пути 50 мкм.

В качестве контрольного образца, т. е. белка с хорошо известной вторичной структурой, использовали БСА. Согласно данным рентгеноструктурного анализа (Вујасц, 2012; Majorek et al., 2012), вторичная структура молекулы БСА включает в себя 67 % α -спиральных участков, 16 % β -поворотов, около 3 % спиралей типа 3_{10} , 14 % составляют остальные, преимущественно неупорядоченные, участки. Нами был проведен анализ структуры молекул БСА в водно-солевом растворе в различных режимах регистрации ИК-спектров методом пропускания. Типичный спектр поглощения БСА в растворе D_2O представлен на рис. 1. В спектрах поглощения отчетливо выделяются две полосы: полоса амид I ($1700\text{—}1600\text{ см}^{-1}$), соответствующая валентным колебаниям карбонильной группы $C=O$ пептидной связи, а также полоса амид II ($1500\text{—}1400\text{ см}^{-1}$), соответствующая суперпозиции деформационных колебаний связи $N-D$, связанных с валентными колебаниями связи $C-N$. Как уже отмечалось выше, при определении вторичной структуры белков по спектрам ИК-поглощения наиболее достоверные результаты дает анализ суперпозиции колебаний, составляющих полосу амид I (рис. 2, а). Количество таких колебаний и положение соответствующих им полос в спектре поглощения определяли по числу и расположению минимумов на графике второй производной (рис. 2, б). Аппроксимацию исходного контура проводили суперпозицией полос, имеющих Гауссов профиль (рис. 2, в). Долю каждого типа вторичной структуры оценивали по вкладу соответствующего контура в разложение конкретного спектра. Далее этот результат усредняли по всем спектрам, полученным в ходе независимых измерений.

Результат усреднения приведен в табл. 1. Представленные в таблице данные в целом достаточно хорошо согласуются с данными рентгеноструктурного анализа. Однако наблюдается одно существенное отличие: доля β -слоев, по данным ИК-спектроскопии, колеблется в пределах 15—25 %, в то время как рентгеноструктурный анализ вовсе не выявил таких участков. Здесь следует отметить два обстоятельства. Во-первых, в водном растворе молекулы БСА могут «слипаться», образуя олигомеры.

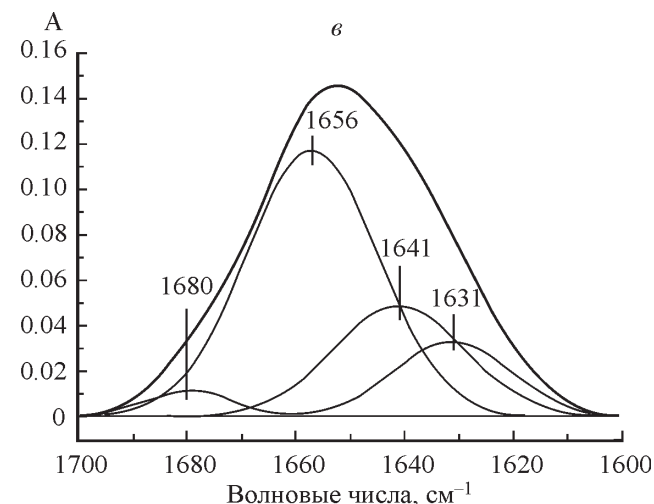
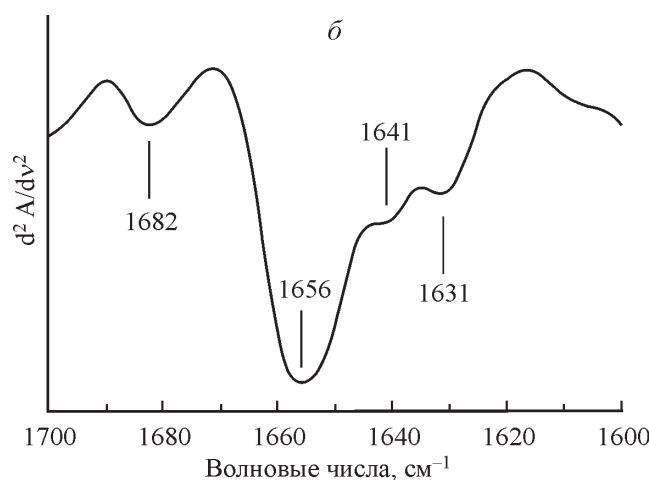
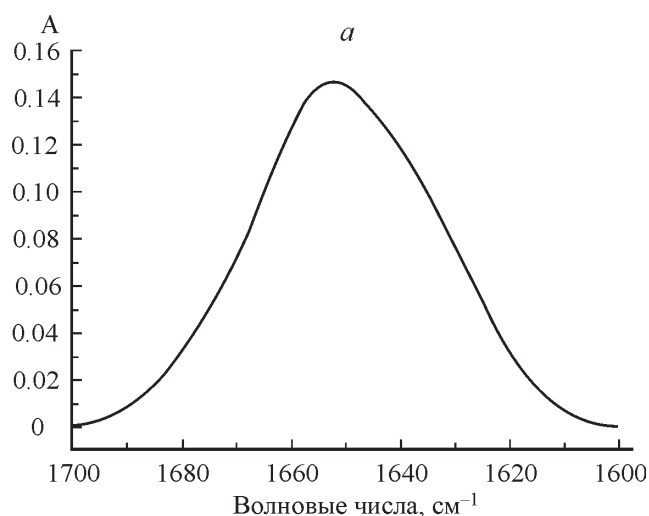


Рис. 2. Анализ спектра ИК-поглощения БСА в растворе D_2O .

а — полоса амид I; б — график второй производной полосы амид I; в — аппроксимация спектра суперпозицией Гауссовых полос.

Во-вторых, наблюдаемая в интервале $1615\text{—}1635\text{ см}^{-1}$ полоса может регистрироваться в ИК-спектрах белков при образовании межмолекулярных β -слоев, т. е. таких β -слоев, которые формируются при межмолекулярных взаимодействиях либо вследствие сорбции белка на поверхно-

Таблица 1

Вторичная структура БСА в растворе D₂O по данным ИК-спектроскопии

Тип вторичной структуры	Положение максимума полосы, см ⁻¹	Содержание, %
α-Спирали	1650—1658	60—70
Неупорядоченные фрагменты и спирали 3 ₁₀	1640—1648	10—20
β-Повороты	1660—1680	5—15
β-Слой	1615—1635	15—25

сти кюветы (Susi, Byler, 1986; Husband et al., 2001; Barth, Zscherp, 2002; Murayama, Tomida, 2004). Таким образом, наличие данной полосы в спектрах ИК-поглощения может служить индикатором взаимодействия между молекулами белка и (или) процессов сорбции, сопровождающихся образованием β-слоистых участков. Эти данные также хорошо согласуются с результатами анализа спектров КД в УФ-области (рис. 3). Для оценки степени α-спиральности белков можно пользоваться величиной КД в окрестности 222 нм (Polyanichko et al., 2011).

Для более детального анализа вторичной структуры ранее был предложен алгоритм, основанный на использовании метода нейронных сетей (Perez-Iratxeta, Andrade-Navarro, 2008). Последний подход позволяет получать более подробное описание вторичной структуры, однако для достижения наилучших результатов может потребоваться дополнительная настройка (обучение) программы в соответствии со спецификой изучаемого белка. По результатам анализа спектров КД средние показатели для элементов вторичной структуры БСА в растворе составили 50—70 % α-спиральных участков и 5—10 % структур типа β-слоя. Таким образом, степень α-спиральности БСА, определенная по спектрам КД в пределах статистического разброса, удовлетворительно согласуется с результатами измерений в ИК-области.

Для доли β-слоев данные ИК-спектроскопии дают значение приблизительно на 10 % выше, чем данные УФ КД. Можно предположить, что 10%-ное увеличение количества β-слоев отражает изменение конформации вследствие сорбции белка на поверхности кюветы. Следует также обратить внимание на высокую информативность ИК-спектроскопии в сравнении с традиционным анализом спектров УФ КД. КД позволяет достаточно достоверно оценить степень α-спиральности белков; несколько сложнее бывает получить достоверную оценку количества β-слоев. К остальным элементам вторичной структуры метод практически нечувствителен, и часто все аминокислотные остатки, не вошедшие в α-спирали и β-слои, отождествляют с неупорядоченными участками. Вместо этого ИК-спектроскопия позволяет оценить количественно не только долю неупорядоченных фрагментов, но различает по несколько видов β-слоев, поворотов и неканонических спиралей.

Для определения вторичной структуры линкерного гистона H1 мы получили спектры ИК-поглощения белка в растворах D₂O, зарегистрированные методами пропускания (рис. 4, а) и НПВО (рис. 4, б). В спектрах ИК-поглощения белков наблюдаются две доминирующие спектральные полосы — амид I (1700—1600 см⁻¹) и амид II (1500—1400 см⁻¹). Отсутствие в спектрах полосы амид II (1600—1500 см⁻¹) указывает на достижение полного изотопного замещения в пробе. Согласно описанной выше методике провели разложение спектральных полос по Гауссовым компонентам (рис. 5). Результаты анализа спектров представлены в табл. 2. Видно, что результаты измерений сильно разнятся между собой, в особенности при оценке доли неупорядоченных участков. Для сравнения полученных результатов с результатами традиционного анализа нами были получены спектры УФ КД того же белка в водном растворе (рис. 6). В спектрах КД доминирует отрицательная полоса с минимумом в области 198 нм, что указывает на преимущественно неупорядоченную укладку полипептидной цепи. Среднее содержание α-спиралей и β-структур по спектрам УФ КД для растворов H1 составило 8—16 и 28—32 % соответственно.

Аминокислотные остатки, входящие в неупорядоченные участки полипептидной цепи, по данным КД составляют 55—60 % от полного числа аминокислотных остатков в молекуле белка.

Сравнивая полученные результаты с данными, представленными в табл. 2, можно заметить хорошее согласие между данными, полученными методами НПВО и УФ КД. Единственным существенным различием между ними можно считать некоторый избыток β-слоев в структуре белка по оценке, полученной методом НПВО. Следует отметить, что измерения в УФ-области проводили при концентрациях белка 60 мг/л, тогда как в методе НПВО концентрация H1 в пробе составляла 26 г/л. Столь существенное различие обусловлено малой глубиной проникновения луча в образец в методе НПВО, что в сочетании с однократным отражением в использованной нами ячейке приводит к эффективной толщине образца в несколько микрометров. При высоких концентрациях белка молекулы гистона H1 могут взаимодействовать между собой, что приводит к небольшому изменению их вторичной структуры. В частности, этим обстоятельством могут быть обусловлены формирование межмолекулярных β-слоев и появление в спектре соответствующих им полос в области 1615—1635 см⁻¹. Важно, однако, отметить, что даже в этих условиях вклад β-агрегации в спектры ИК-поглощения не является доминирующим, чего можно было бы ожидать при сорбции белка на поверхности кристалла алмаза ячейки НПВО.

Совсем иную картину представляют результаты измерений в стандартной разборной кювете (табл. 2). Здесь наблюдается заметный рост содержания участков в со-

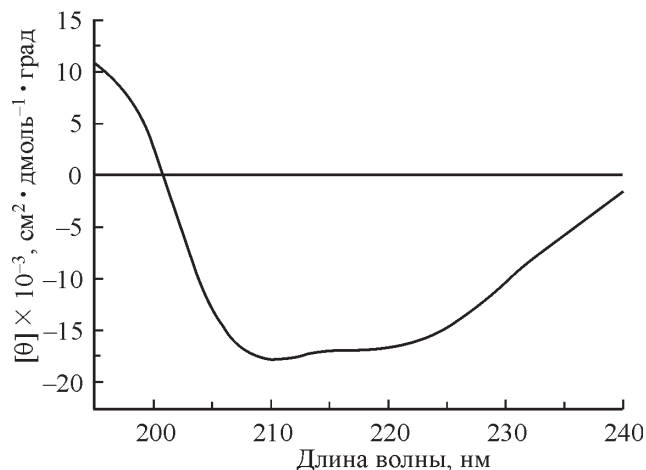


Рис. 3. Спектр УФ кругового дихроизма БСА в воде.

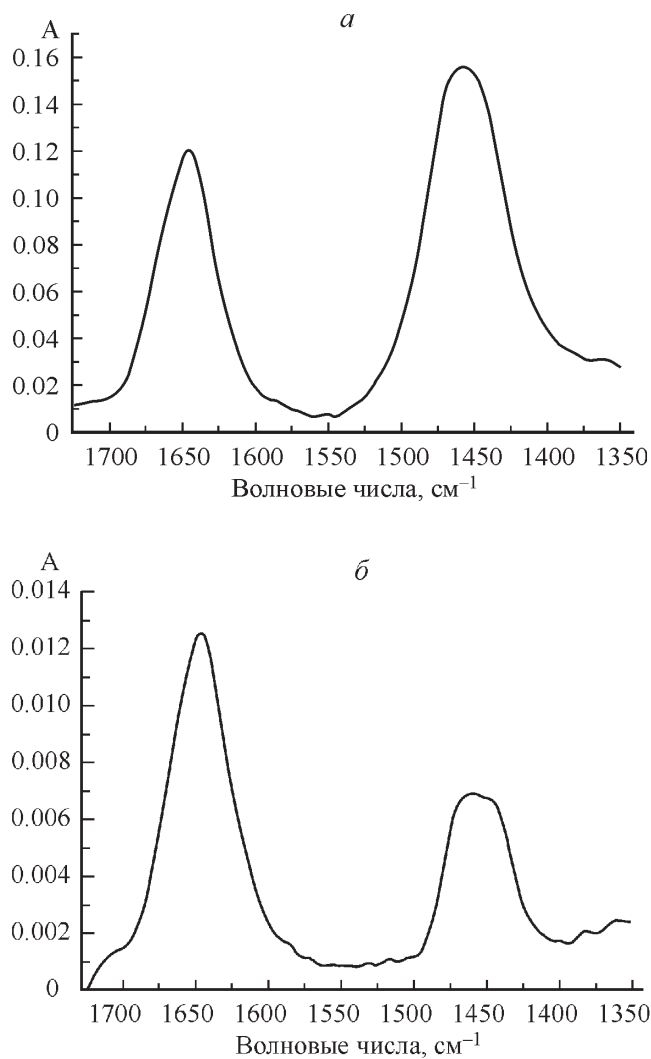


Рис. 4. Спектр ИК-поглощения линкерного гистона Н1 в растворе D_2O , зарегистрированный в ячейках пропускания (а), и нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) (б).

Т а б л и ц а 2

Вторичная структура белка Н1 в растворе D_2O по данным ИК-спектроскопии

Тип вторичной структуры	Максимум полосы, cm^{-1}	Содержание, %	
		ячейка НПВО	разборная кювета BaF_2
α -Спирали	1650—1658	5—6	19—20
Неупорядоченные фрагменты	1640—1648	56—58	13—15
β -Повороты	1660—1670	16—18	25—27
β -Слой	1615—1635	11—13	25—27
	1670—1690	7—8	7—12

ставе β -слоев за счет резкого сокращения доли неупорядоченных фрагментов. Наиболее сильный рост (порядка 10–15 %) отмечается для колебаний в интервале 1615–1635 см^{-1} , обусловленных формированием β -слоя на поверхности белка при его взаимодействии с другими молекулами или с поверхностью кюветы. Похожий результат был получен нами ранее для растворов БСА. Мы полагаем, что, как и в случае с БСА, дополнительные 10–15% β -слоев в структуре гистона Н1 являются следствием его частичной агрегации, которая могла быть спровоцирована не столько высокими концентрациями, сколько повышенной по сравнению с алмазом сорбцией белка на поверхности кюветы. Как было показано ранее, взаимодействие молекул гистона Н1 с другими макромолекулами приводит к увеличению доли α -спиральных участков в его вторичной структуре (Ramm et al., 1982; Chikhirzhina et al., 2011). В нашем случае межмолекулярные взаимодействия, спровоцированные агрегацией, также привели к образованию не только дополнительных β -слоев, но и к увеличению количества α -спиральных участков, что согласуется с полученными ранее данными (Ramm et al., 1982; Chikhirzhina, Vorob'ev, 2002; Chikhirzhina et al., 2011; Polyanchko, Chikhirzhina, 2012).

Таким образом, полученные нами результаты позволяют заключить, что анализ вторичной структуры белков с использованием ИК-спектров должен проводиться с известной степенью осторожности. Это в особенности относится к экспериментам с белками, склонными к агрегации, которая может сопровождаться значительным изменением вторичной структуры молекул. Для получения достоверных результатов необходимо использовать по возможности малые концентрации белка в растворе. В работе также показано, что использование алмазной ячейки при анализе вторичной структуры белков более предпочтительно, чем традиционно используемые материалы. Малая глубина проникновения луча в образец может быть в этом случае отчасти скомпенсирована использованием ячейки многократного отражения. Существенным преимуществом метода ИК-спектроскопии является его высокая информативность. Метод не только позволяет определить в структуре белков долю α -спиральных участков, но и способен различать разные типы β -слоев, такие элементы вторичной структуры, как спирали 3_{10} , а также различные типы β -поворотов. Последнее обстоятельство делает, на наш взгляд, ИК-спектроскопию весьма перспективным методом анализа вторичной структуры белковых молекул, несмотря на возможные экспериментальные трудности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России») и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-08-01134). Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсного центра «Оптические и лазерные методы исследования вещества» С.-Петербургского государственного университета.

Список литературы

Поляничко А. М., Родионова Т. Ю., Воробьев В. И., Чихиржина Е. В. 2011. Конформационные особенности ядерного белка НМГВ1 и специфика его взаимодействия с ДНК. Цитология. 53 (1) : 55–60. (Polyanchko A. M., Rodionova T. J., Vorob'ev V. I., Chikhirzhina E. V. 2011. Conformational properties of

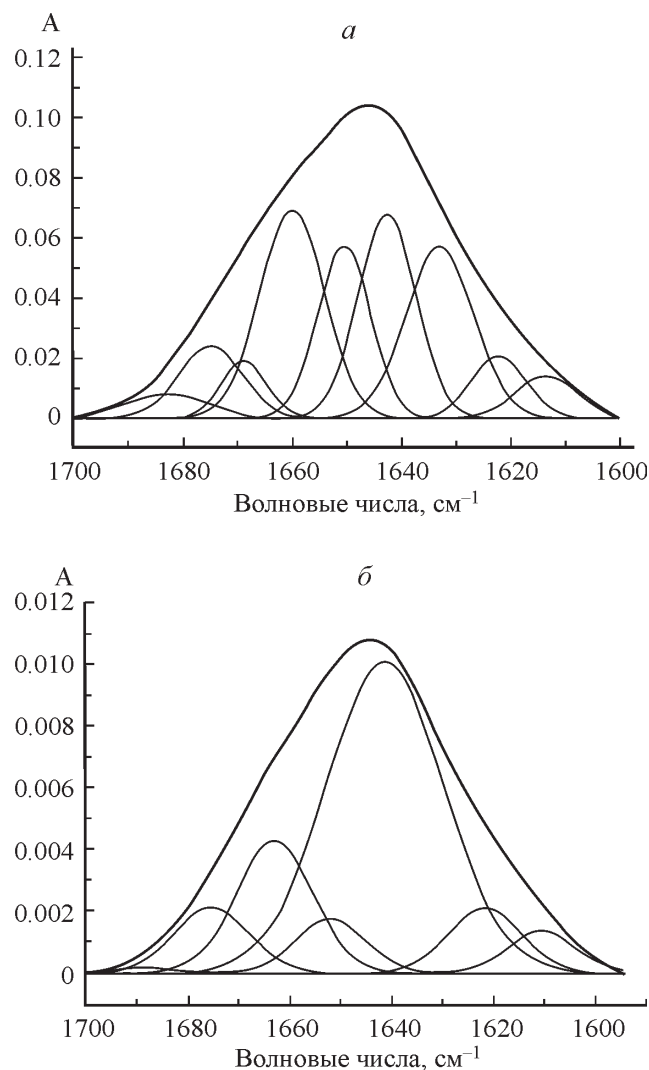


Рис. 5. Разложение полосы амид I по Гауссовым компонентам линкерного гистона Н1 в растворе D_2O для спектров ИК-поглощения, полученных в ячейке пропускания (а) и НПВО (б).

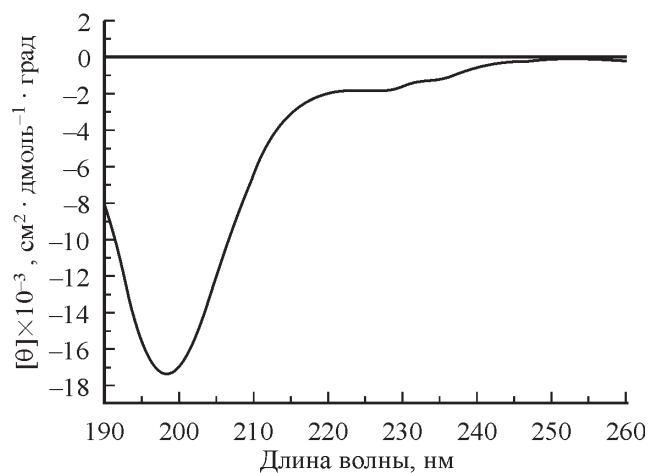


Рис. 6. Спектр кругового дихроизма в УФ-области линкерного гистона Н1 в воде.

nuclear protein HMGB1 and specificity of its interaction with DNA. *Cell Tissue. Biol. (Tsitolgiya)*. 5 : 114—119.)

Рамм Е. И., Осипова Т. Н., Воробьев В. И. 1982. Конформационные особенности гистонов H1 тимуса теленка и спермиев морского ежа. *Биофизика*. 27 : 154—156. (Ramm E. I., Osipova T. N., Vorob'ev V. I. 1982. Conformational peculiarity of H1 histones of calf thymus and sea urchin sperm. *Biofizika*. 27 : 154—156.)

Рамм Е. И., Чихиржина Е. В., Костылева Е. И., Воробьев В. И. 1995. Конформационные особенности линкерных белков суперкомпактного хроматина спермиев морских беспозвоночных. *Биохимия*. 60 (1) : 150—158. (Ramm E. I., Chikhirzhina E. V., Kostyleva E. I., Vorob'ev V. I. 1995. Conformational features of linker proteins of supercompact chromatin from marine invertebrate sperm. *Biokhimiya*. 60 : 150—158.)

Чихиржина Е. В., Воробьев В. И. 2002. Линкерные гистоны: конформационные особенности и роль в структурной организации хроматина. *Цитология*. 44 (8) : 721—736. (Chikhirzhina E. V., Vorob'ev V. I. 2002. Linker histones: conformational changes and the role in the structural organization of chromatin. *Tsitolgiya*. 44 (8) : 721—736.)

Чихиржина Е. В., Костылева Е. И., Рамм Е. И., Воробьев В. И. 1998. Исследование компактизации хроматина с использованием модельной системы ДНК-белковых комплексов. *Цитология*. 40 (10) : 883—888. (Chikhirzhina E. V., Kostyleva E. I., Ramm E. I., Vorob'ev V. I. 1998. Chromatin compactization in DNA-protein complexes model system. *Tsitolgiya*. 40 (10) : 883—888.)

Чихиржина Е. В., Старкова Т. Ю., Костылева Е. И., Чихиржина Г. И., Воробьев В. И., Поляничко А. М. 2011. Взаимодействие ДНК со спермий-специфическими гистонами семейства H1. *Цитология*. 53 (10) : 826—831. (Chikhirzhina E. V., Starkova T. Yu., Kostyleva E. I., Chikhirzhina G. I., Vorob'ev V. I., Polyanychko A. M. 2011. Interaction of DNA with sperm-specific histones of the H1 family. *Cell Tissue. Biol. (Tsitolgiya)*. 5 : 536—542.)

Bannister A. J., Kouzarides T. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 21 : 381—395.

Barth A., Zscherp C. 2002. What vibrations tell us about proteins. *Q. Rev. Biophys.* 35 : 369—430.

Bujacz A. 2012. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 68 : 1278—1289.

Byler D. M., Susi H. 1986. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*. 25 : 469—487.

Chikhirzhina E., Starkova T., Kostyleva E., Polyanychko A. M. 2012. Spectroscopic study of the interaction of DNA with the linker histone H1 from starfish sperm reveals mechanisms of the formation of supercondensed sperm chromatin. *Spectroscopy*. 27 : 433—440.

Eirin-López J. M., Ausió J. 2009. Origin and evolution of chromosomal sperm proteins. *Bioessays*. 31 : 1062—1070.

Husband F. A., Garrood M. J., Mackie A. R., Burnett G. R., Wilde P. J. 2001. Adsorbed protein secondary and tertiary structures by circular dichroism and infrared spectroscopy with refractive index matched emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 49 : 859—866.

Jerzmanowski A. 2004. The linker histones. In: *Chromatin structure and dynamics: state of the Art*. New York: Elsevier B. V. 75—102.

Keiderling T. A. 2002. Protein and peptide secondary structure and conformational determination with vibrational circular dichroism. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6 : 682—688.

Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (L.)*. 227 : 680—685.

Luger K., Dechassa M. L., Tremethick D. J. 2012. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 : 436—447.

Majorek K. A., Porebski P. J., Dayal A., Zimmerman M. D., Jablonska K., Stewart A. J., Chruszcz M., Minor W. 2012. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol. Immunol.* 52 : 174—182.

Murayama K., Tomida M. 2004. Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*. 43 : 11 526—11 532.

Perez-Iratxeta C., Andrade-Navarro M. A. 2008. K2D2 : estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC Struct. Biol.* 8 : 25.

Polyanychko 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.

Polyanychko A. M., Wieser H. 2007. Vibrational circular dichroism and its applications to Protein studies. In: *Methods in protein structure and stability analysis: vibrational spectroscopy*. New York: Nova Sci. Publ., Inc. 267—302.

Smolle M., Workman J. L. 2013. Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. *Biochim. biophys. acta*. 1829 : 84—97.

Sreerama N., Woody R. W. 2000. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* 287 : 252—260.

Susi H., Byler D. M. 1986. Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy of enzymes. *Methods Enzymol.* 130 : 290—311.

Поступила 15 XII 2013

ANALYSIS OF THE SECONDARY STRUCTURE OF LINKER HISTONE H1 BASED ON IR ABSORPTION SPECTRA

A. M. Polyanychko,^{1,2} * N. R. Romanov,¹ T. Yu. Starkova,^{1,2} E. I. Kostyleva,² E. V. Chikhirzhina²

¹ St. Petersburg State University and ² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

* e-mail: a.polyanychko@spbu.ru

This work was carried out to compare the effectiveness of the methods of infrared spectroscopy in the amide I region and UV circular dichroism to the analyze the protein secondary structure by the example of linker histone H1 and bovine serum albumin (BSA). It has been shown that the application of a diamond ATR cell quantifies the proportion of α -helices and β -structures in a good agreement with UV circular dichroism spectroscopy. It has been shown that histone H1 is able to aggregate, which results in considerable changes in its secondary structure.

Key words: histone H1, IR-spectroscopy, protein structure.