

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЯДЕРНОГО БЕЛКА HMGB1 И СПЕЦИФИКА ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ДНК

© А. М. Поляничко,^{1, 2, *} Т. Ю. Родионова,¹ В. И. Воробьев,² Е. В. Чихиржина²

¹ Кафедра молекулярной биофизики физического факультета
С.-Петербургского государственного университета
и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
* электронный адрес: polyanichko@gmail.com

Методами кругового дихроизма (КД) и УФ-спектроскопии изучали изменения вторичной структуры в молекулах ДНК и негистонового хромосомного белка HMGB1 в ходе комплексообразования. Показали, что белок HMGB1 способен изменять свою вторичную структуру при связывании с ДНК. Получили оценку доли связанного белка исходя из предположения о наличии двух спектрально различимых форм HMGB1 в растворе. Доля связанного белка уменьшается с ростом соотношения белок/ДНК в пробе r от 0.48 при $r = 0.13$ до 0.06 при $r = 2.43$. Установили, что HMGB1 способен существенно изменять структуру ДНК даже при незначительном количестве непосредственно связанного с ДНК белка.

Ключевые слова: хроматин, круговой дихроизм, негистоновый хромосомный белок HMGB1.

Основным архитектурным белком хроматина на над-нуклеосомном уровне его структурной организации считается линкерный гистон H1. Однако и многие другие белки, связанные с нуклеосомой неспецифическим образом, принимают активное участие в процессах изменения структуры хроматина. Среди них самые распространенные — белки большого семейства негистоновых хромосомных белков с высокой электрофоретической подвижностью (High Mobility Group). Такая подвижность связана с большим количеством заряженных аминокислотных остатков в составе молекул. К этому семейству принадлежит белок HMGB1, самый распространенный в ядре негистоновый белок (1 молекула HMGB1 приходится на 10 нуклеосом). Отличительной чертой HMGB-белков является наличие в их составе структурно консервативных ДНК-связывающих доменов (так называемых HMGB-доменов) (Bustin, Reeves, 1996; Travers, Thomas, 2004; Stros, 2010).

Многие регуляторные белки взаимодействуют с ДНК посредством доменов, гомологичных HMGB-домену, и других ДНК-связывающих мотивов у таких белков не найдено. Белки HMGB были обнаружены в хроматине всех исследованных эукариот, однако в настоящее время нет четкого представления об их роли в функционировании клетки. Считается, что HMGB1 выполняет прежде всего архитектурные функции при сборке различных ДНК-белковых комплексов, отвечающих за активацию транскрипции генов (Sutrias-Grau et al., 1999; Travers, Thomas, 2004; Stros, 2010). На это также указывают необычные ДНК-связывающие свойства HMGB-доменов. Белок HMGB1, связываясь с ДНК по ее малой бороздке, изгибает ДНК на угол до 140° (Bustin, Reeves, 1996). Кроме того, этот белок предпочтительно связывается с участками ДНК, обладающими различными структурными ано-

малиями, например с перекрестными структурами типа хиазмы Холлидея (Saito et al., 1999), или с участками, поврежденными некоторыми противоопухолевыми препаратами (цисплатином, карбоплатином и т. д.) (Jamieson, Lippard, 1999; Jamieson et al., 1999; Wang, Lippard, 2005). ДНК-связывающими мотивами в составе белка являются два гомологичных HMGB-домена.

Следует отметить, что в качестве регулятора взаимодействия белка с ДНК выступает его отрицательно заряженный С-концевой участок, состоящий из 30 аминокислотных остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот (Stros et al., 1994; Чихиржина и др., 2002; Polyanichko et al., 2002). Наряду с транскрипцией HMGB-доменные белки также вовлечены в репликацию, рекомбинацию и репарацию ДНК, причем, по разным данным, они могут выступать в этих процессах и как положительные, и как отрицательные факторы регуляции (Bustin, Reeves, 1996). В последние несколько лет была открыта совершенно новая роль белка HMGB1 как внеклеточного секретиремого белка, принимающего активное участие в передаче сигналов к делению различных клеток, их миграции, инициации воспалительных процессов и иммунного ответа (Bianchi, Manfredi, 2004; Palumbo et al., 2004).

Избирательность связывания HMGB1 с ДНК проявляется не столько в специфичности к определенной последовательности, сколько в предпочтении определенного типа структуры ДНК. При этом выбор мишени связывания всецело определяется структурой HMGB-доменов белка. Мы предполагаем, что HMGB-доменные белки способны изменять свою структуру, а вместе с ней и специфичность в связывании с теми или иными мишенями. Этим отчасти могло бы объясняться большое многообразие функций, выполняемых HMGB-доменными белками в клетке.

В связи с вышесказанным задача настоящей работы состояла в изучении структурных изменений в молекулах ДНК и белка в ходе комплексообразования методами кругового дихроизма (КД) и УФ-спектроскопии.

Материал и методика

Белок HMGB1 (мол. масса 26.5 кДа) экстрагировали из тимуса теленка 0.5%-ной хлорной кислотой с последующим осаждением из раствора 5 объемами охлажденного ацетона при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Чихиржина и др., 2002). Идентификацию и чистоту белкового препарата проверяли электрофоретически в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия (Laemmli, 1970). Концентрация HMGB1 была рассчитана по коэффициенту экстинкции $\epsilon_{230} = 33\ 000\ \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Kohlstaedt, Cole, 1994).

В работе использовали высокомолекулярную ДНК тимуса теленка (Sigma, США). Искусственные комплексы готовили методом медленного прямого смешивания равных объемов растворов ДНК и белка HMGB1, а также путем титрования раствора ДНК малыми объемами раствора белка в присутствии 15 мМ NaCl. Концентрация ДНК в комплексах составляла 60 мг/л. ДНК-белковые комплексы готовили исходя из весового соотношения белок/ДНК (r) в растворе в диапазоне от 0 до 2.5.

Измерения спектров КД проводили в круглых кварцевых кюветках с длиной оптического пути 0.5 см на дихрографе Mark V (Jobin Yvon, Франция) в интервале 200—320 нм. Спектры КД регистрировали в виде разности поглощения лево- (A_L) и правополяризованного (A_R) лучей: $\Delta A = A_L - A_R$. В тех случаях, когда нам удавалось разделить спектральные вклады компонентов комплекса, величину ΔA преобразовывали в молярную эллиптичность $[\theta]$ согласно соотношению

$$[\theta] = \frac{100 \cdot \Delta A}{C \cdot l}, \quad \frac{\text{л}}{\text{моль} \cdot \text{см}}, \quad (1)$$

где C — молярная концентрация исследуемого вещества, l — длина оптического пути в см. Степень α -спиральности в % рассчитывали по величине молярной эллиптичности при 222 нм $[\theta_{222}]$ (Morrow et al., 2000):

$$\alpha = \frac{-[\theta_{222}] + 3000}{39000}. \quad (2)$$

Использовали спектрально чистые препараты неорганических солей.

Результаты и обсуждение

Исследовали взаимодействие негистонового хромосомного белка HMGB1 с высокомолекулярной ДНК. Особое внимание уделяли изучению изменений вторичной структуры молекул белка и ДНК при их взаимодействии. С этой целью получили спектры КД в ультрафиолетовой (УФ) области в зависимости от весового соотношения белок/ДНК (r) в комплексе. На рис. 1 представлены характерные спектры КД белка (кривая 1), ДНК (кривая 2) и их комплексов (кривые 3—17) в растворах 15 мМ NaCl. Спектр КД белка представляет собой две перекрывающиеся отрицательные полосы с максимумами в области 205

и 222 нм, вызванные электронными переходами $\pi \rightarrow \pi^*$ и $n \rightarrow \pi^*$ в пептидной связи. Образующийся при перекрытии полос профиль спектра КД характерен для полипептидов, находящихся в частично α -спиральной конформации (Greenfield, Fasman, 1969; Miles, Wallase, 2006). Согласно соотношению (2), степень α -спиральности белка HMGB1 в данных условиях может быть оценена как $24 \pm 5\%$, где погрешность определяется оценкой дисперсии величины КД при длине волны 222 нм (КД_{222}). Полоса регистрируемого КД белка HMGB1 лежит в области длин волн $\lambda < 250$ нм и частично перекрывается со спектром ДНК. Спектр КД ДНК (рис. 1, кривая 2) представлен комбинацией из двух интенсивных и двух малоинтенсивных полос разного знака. Их спектральные максимумы расположены в окрестности 275(+)/245(-) и 220(+)/210(-) нм соответственно. Образующийся спектральный профиль характерен для В-формы ДНК (Ivanov et al., 1973; Зенгер, 1987).

Одновременное присутствие в растворе ДНК и белка HMGB1 приводит к увеличению интенсивности белковой полосы в интервале 200—240 нм и уменьшению интенсивности интенсивной положительной полосы КД ДНК с максимумом при 275 нм. При этом спектр КД ДНК в области от 260 до 300 нм не перекрывается с полосой КД белка, и, следовательно, спектральные изменения в этой области могут быть отождествлены с изменениями конформации ДНК при связывании с HMGB1. Поскольку спектр КД в этой области обусловлен спектральным вкладом только одного типа хромофоров — азотистых оснований ДНК, то в интервале 260—300 нм можно вычислить молярную эллиптичность $[\theta]$ в пересчете на пары оснований (п. о.) ДНК. На рис. 2 представлена зависимость изменения молярной эллиптичности ДНК при длине волны 275 нм ($\Delta[\theta_{275}]$) от соотношения r . Данная зависимость была получена путем вычитания КД свободной ДНК из КД ДНК в комплексе для всех исследованных значений r :

$$\Delta[\theta_{275}] = [\theta_{275}]r - [\theta_{275}]_{\text{ДНК}}. \quad (3)$$

Зависимость демонстрирует постепенное уменьшение молярной эллиптичности ДНК с ростом содержания белка в пробе. Начиная с $r \sim 1.3$ кривая выходит на насыщение и величина $[\theta_{275}]$ не изменяется вплоть до $r \sim 2.2$. Дальнейшее увеличение содержания белка приводит к резкому падению интенсивности КД ДНК в пробе, что связано, по всей видимости, с началом процесса агрегации комплексов (Чихиржина и др., 1998, 2002). Как было показано ранее, связывание белка HMGB1 с ДНК приводит к существенной деформации двойной спирали ДНК (Чихиржина, Воробьев, 2002; Чихиржина и др., 2002; Polyanchko et al., 2002). В то же время использованный нами в работе метод КД обладает высокой чувствительностью к изменениям локальной структуры макромолекул (Велюз и др., 1967; Ramm et al., 1972; Рамм и др., 1995). Оба этих обстоятельства в совокупности позволяют предположить, что наблюдаемое нами уменьшение $[\theta_{275}]$ обусловлено взаимодействием ДНК с белком HMGB1. В таком случае можно сделать вывод о том, что связывание HMGB1 приводит к регистрируемым изменениям в структуре двойной спирали ДНК при $r < 1.3$. В пересчете на молярное отношение получаем, что структура ДНК в комплексе перестает изменяться, когда количество белка в системе достигает 1 молекулы на ~ 30 п. о.

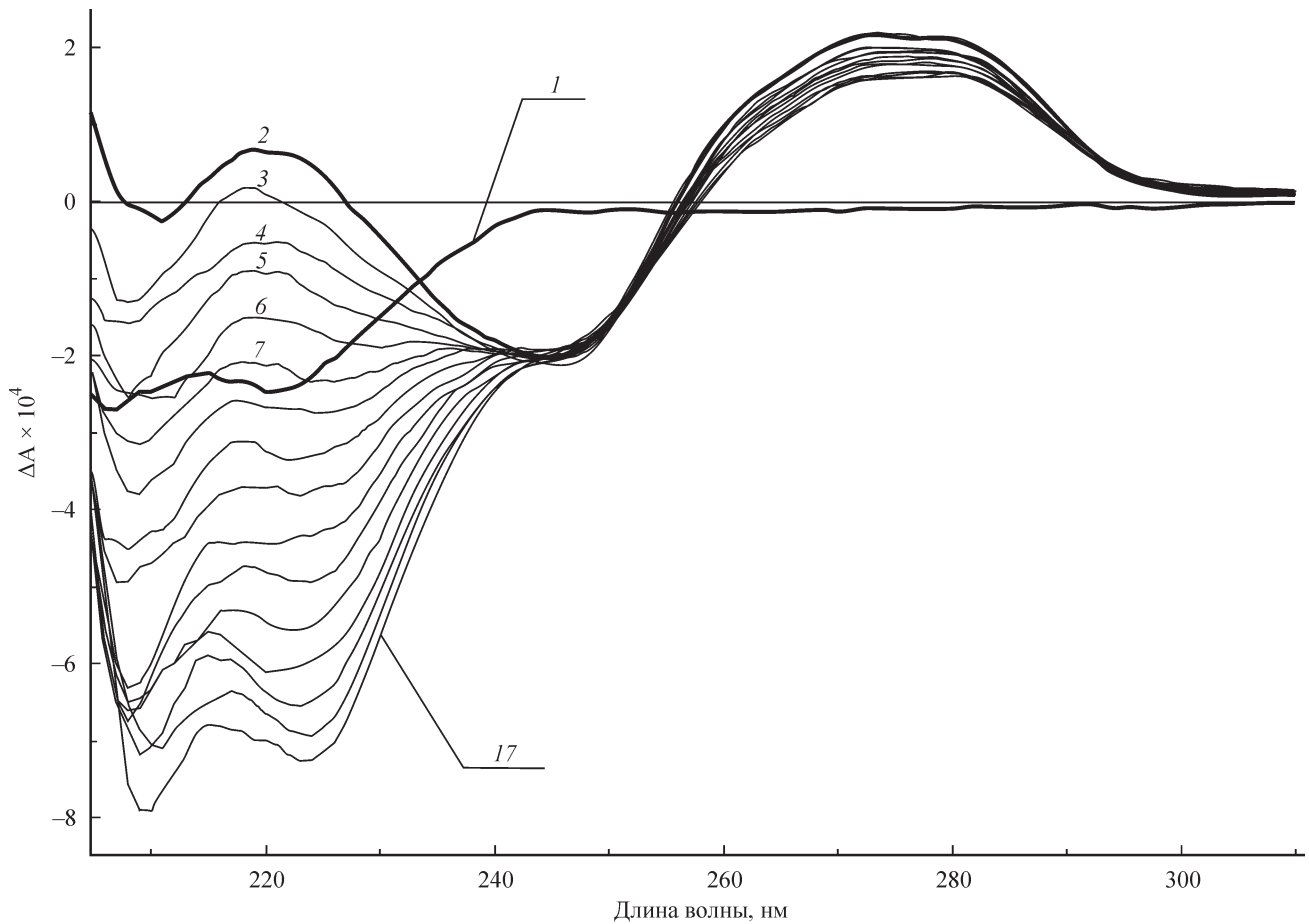


Рис. 1. Спектры кругового дихроизма комплекса ДНК-HMGB1 в растворе 15 мМ NaCl.

1 — белок HMGB1, 30 мкг/мл; 2 — ДНК, 60 мкг/мл; 3—17 комплексы ДНК—HMGB1 при различном весовом соотношении белок/ДНК (r): для кривой 3 $r = 0.13$, для кривой 17 $r = 1.82$.

Изменения в спектре КД белка не поддаются столь простому анализу. Это связано с двумя основными обстоятельствами. Во-первых, как отмечалось выше, в коротковолновой области спектра наблюдается перекрывание интенсивной α -спиральной полосы белка и пары малоинтенсивных полос КД ДНК, а потому спектральные изменения в этой области уже нельзя отождествить с изменениями в структуре только белка или только ДНК. Однако принимая во внимание, что изменения в спектре КД ДНК в длинноволновой области не превышают 20 %, можно утверждать, что аналогичные изменения малоинтенсивных полос ДНК окажутся сравнимыми с величиной погрешности регистрации КД в коротковолновой области спектра. Предположение о том, что значительные изменения КД ДНК в этой области отсутствуют, подтверждается формой спектров КД комплексов, которая вплоть до $r \sim 1.4$ остается подобной спектру КД чистого белка (рис. 1). Дальнейшее изменение формы спектров связано с быстрым ростом спектрального шума в коротковолновой области, который обусловлен увеличением оптической плотности растворов с ростом концентрации белка в пробе. По этой причине количественный анализ спектров КД в области длин волн $\lambda < 210$ нм становится затруднительным. Тем не менее, пользуясь соотношением (2), можно с известной степенью осторожности оценить изменения вторичной структуры белка при связывании с ДНК. Для этого необходимо вычлест из спектров комплексов спектральный вклад ДНК, пользуясь допущением мало-

сти его изменения, после чего оценить молярную эллиптичность $[\theta_{222}]$ и степень α -спиральности белка в каждой точке (рис. 3). Зависимость α -спиральности от r демонстрирует достаточно быстрое падение до уровня ~ 30 % при увеличении r от 0 до 0.5, после чего асимптотически приближается к величине около 25 %, соответствующей сте-

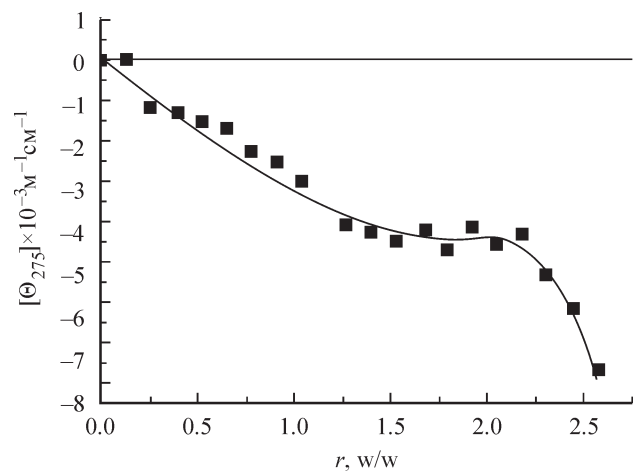


Рис. 2. Изменение молярной эллиптичности при 275 нм ($[\theta_{275}]$) в зависимости от весового соотношения белок/ДНК (r) по сравнению с ДНК.

Кривая получена согласно формуле (3).

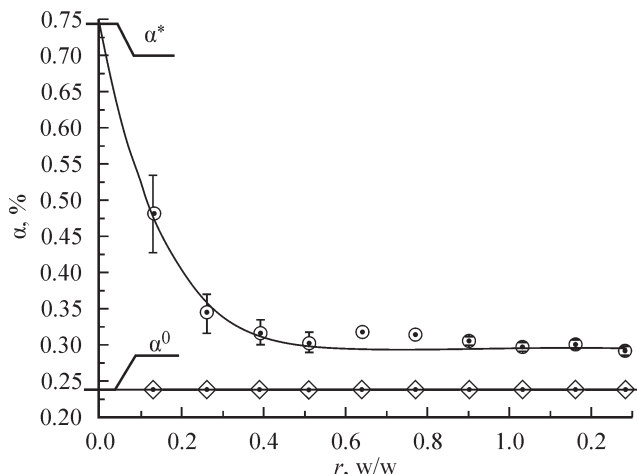


Рис. 3. Изменение степени α -спиральности белка NMGB1 при связывании с ДНК в зависимости от весового соотношения белок/ДНК (r).

Доля α -спиральности получена согласно формуле (2). α^0 — степень α -спиральности свободного белка (15 мм NaCl); α^* — оценка α -спиральности белка, полученная путем экстраполяции зависимости к $r=0$ (15 мм NaCl).

пени α -спиральности свободного белка в данных условиях.

Полученная таким образом степень α -спиральности (назовем ее «наблюдаемой») в сущности представляет собой среднюю долю пептидных связей, принимающих участие в формировании α -спиральных участков белков. При этом усреднение проводится по всему ансамблю белковых молекул, имеющих в растворе. Тогда аналитически наблюдаемая степень α -спиральности может быть выражена следующим простым соотношением:

$$\alpha = \frac{N_{\alpha}}{N_T} \cdot 100, \quad (4)$$

где N_{α} — число пептидных связей в составе α -спиралей, а N_T — полное число пептидных связей, имеющих в растворе.

Однако, как видно на рис. 3, наблюдаемая степень α -спиральности белка в растворе изменяется по мере связывания NMGB1 с ДНК. Это означает, что, связываясь с ДНК, молекула NMGB1 изменяет свою вторичную структуру, что и сопровождается изменением ее α -спиральности. Поскольку связывание носит равновесный характер, можно предположить, что в простейшем случае в растворе одновременно сосуществуют свободные и связанные с ДНК белковые молекулы. Помимо прочего, эти две группы молекул отличаются друг от друга своей вторичной структурой, а как следствие — и α -спиральностью. Пусть в растворе находится N^0 пептидных связей, принадлежащих свободным белковым молекулам, среди которых N_{α}^0 — число пептидных связей, входящих в состав α -спиральных участков. Обозначим аналогичные величины для связанных с ДНК молекул N^* и N_{α}^* соответственно. Тогда наблюдаемая степень α -спиральности раствора может быть выражена следующим образом:

$$\alpha = \frac{N_{\alpha}}{N_T} = \frac{N_{\alpha}^0 + N_{\alpha}^*}{N^0 + N^*} = \frac{N_{\alpha}^0 + N_{\alpha}^*}{N^0 + N^*} =$$

$$= \frac{N_{\alpha}^0}{N^0 + N^*} + \frac{N_{\alpha}^*}{N^0 + N^*} = \frac{\alpha^0 N^0}{N^0 + N^*} + \frac{\alpha^* N^*}{N^0 + N^*}, \quad (5)$$

где $\alpha^0 = N_{\alpha}^0/N^0$ и $\alpha^* = N_{\alpha}^*/N^*$ — степень α -спиральности белковых молекул в свободном и связанном состояниях соответственно. Поделив числитель и знаменатель дроби на число пептидных связей, приходящихся на одну молекулу белка, и учитывая, что доля связанных белковых молекул v выражается как отношение числа связанных молекул белка n^* к полному числу белковых молекул в растворе, которое равно сумме количества связанных и свободных молекул ($n^0 + n^*$), окончательно получаем:

$$\alpha = \frac{\alpha^0 n^0}{n^0 + n^*} + \frac{\alpha^* n^*}{n^0 + n^*} = \alpha^0 (1-v) + (\alpha^* \cdot v), \quad (6)$$

откуда выражаем долю связанных молекул белка v :

$$v = \frac{\alpha - \alpha^0}{\alpha^* - \alpha^0}. \quad (7)$$

Наблюдаемое значение α -спиральности в каждой точке можно напрямую оценить по величине молярной эллиптичности $[\theta_{222}]$ комплексов согласно соотношению (2); α^0 — величина α -спиральности, полученная по спектрам КД растворов свободного белка; α^* может быть оценена как $\sim 75\%$ путем экстраполяции зависимости $\alpha(r)$ к нулевым значениям r (рис. 3). Последнее соответствует случаю предельного избытка ДНК в растворе, когда весь белок находится в связанном состоянии. Пользуясь приведенным выше соотношением, мы оценили долю связанного белка при различных соотношениях белок/ДНК в пробе. Результаты вычислений приведены в таблице, в которой также дана оценка количества п.о., приходящихся на одну молекулу связанного белка (μ).

Из данных таблицы видно, что, несмотря на уменьшение доли связанного белка с ростом r , количество п.о., приходящихся на одну молекулу связанного белка μ , уменьшается, следовательно, число связанных белковых молекул продолжает возрастать за счет увеличения суммарного количества белка в растворе. К моменту насыщения связывания одна молекула связанного белка приходится на 250—300 п.о. В силу ограничений, упомянутых выше, данная оценка носит лишь приблизительный характер. Однако тот факт, что это значение на порядок превышает величину, полученную нами из анализа кон-

Наблюдаемая степень α -спиральности (α), доля связанного белка NMGB1 в растворе (v) и размер участка связывания белка с ДНК (μ), соответствующие различным весовым соотношениям белок/ДНК в системе (r)

$r, w/w$	$\alpha, \%$	$v, \%$	$\mu, \text{п. о.}$
0.13	48	48	—
0.26	34	20	780
0.39	31	15	700
0.52	30	12	650
1.24	29	10	390
1.92	28	8	280
2.43	27	6	275

формационных изменений ДНК, нам представляется весьма показательным. Подобное различие может быть вызвано не только малой долей реально связанных молекул белка, но и тем обстоятельством, что в растворе помимо ДНК-белковых взаимодействий возможны взаимодействия и между молекулами белка. При этом наблюдаемая α -спиральность (конформация) участвующих во взаимодействии белковых молекул не изменяется по сравнению с тем, что мы видим в отсутствие ДНК, где белок-белковые взаимодействия также могут иметь место. Особый интерес представляет ситуация, когда хотя бы одна из участвующих в белок-белковом взаимодействии молекул оказывается связана с ДНК. Не изменяя структуру белка, такое взаимодействие, тем не менее, вполне способно повлиять на структуру ДНК в комплексе. Последнее может быть вызвано дополнительным электростатическим взаимодействием заряженной белковой молекулы с сахарофосфатным остовом ДНК либо за счет образования перемычек как между удаленными частями одной молекулы, так и между различными молекулами ДНК.

Таким образом, в работе показано, что белок HMGB1 способен изменять свою вторичную структуру при связывании с ДНК. Получена оценка доли связанного белка исходя из предположения о наличии двух спектрально различимых форм HMGB1 в растворе. Установлено, что HMGB1 способен приводить к существенным изменениям в структуре ДНК даже при незначительном количестве непосредственно связанного с ДНК белка, что может служить подтверждением высказанной нами ранее гипотезы (Поляничко и др., 2008) о важной роли белок-белковых взаимодействий при образовании структурно-функциональных комплексов HMGB1 с ДНК. Мы также надеемся, что полученные нами данные помогут лучше понять молекулярные механизмы многообразия функций, выполняемых HMGB-доменными белками в клетке.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 10-04-00092 и 09-08-01119) и правительства Санкт-Петербурга. Часть работ проводилась в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг.

Список литературы

Веллюз Л., Легран М., Грожан М. 1967. Оптический круговой дихроизм. М.: Мир. 320 с.

Зенгер В. 1987. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир. 584 с.

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+B). Биофизика. 53(3) : 407—416.

Рамм Е. И., Бирштейн Т. М., Болотина И. А., Волькенштейн М. В., Воробьев В. И., Дмитренко Л. М., Некрасова Т. Н. 1970. Исследование структуры гистонов. Молекуляр. биол. 4(1) : 118—123.

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.

Чихиржина Е. В., Воробьев В. И. 2002. Линкерные гистоны: конформационные превращения и роль в организации структуры хроматина. Цитология. 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.

Чихиржина Е. В., Поляничко А. М., Скворцов А. Н., Костылева Е. И., Уссье К., Воробьев В. И. 2002. HMGB1-домены: заложники обстоятельств. Молекуляр. биол. 36(3) : 525—531.

Bianchi M. E., Manfredi A. 2004. Chromatin and cell death. Biochim. biophys. acta. 1677 : 181—186.

Bustin M., Reeves R. 1996. High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 54 : 35—100.

Greenfield N., Fasman G. D. 1969. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. Biochemistry. 8 : 4108—4116.

Ivanov V. I., Minchenkova L. E., Schyolkina A. K., Poletayev A. I. 1973. Different conformations of double-stranded nucleic acid in solution as revealed by circular dichroism. Biopolymers. 12 : 89—110.

Jamieson E. R., Jacobson M. P., Barnes C. M., Chow C. S., Lippard S. J. 1999. Structural and kinetic studies of a cisplatin-modified DNA icosamer binding to HMGB1 domain B. J. Biol. Chem. 274 : 12 346—12 354.

Jamieson E. R., Lippard S. J. 1999. Structure, recognition and processing of cisplatin-DNA adducts. Chem. Rev. 99 : 2467—2498.

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.

Miles A. J., Wallase B. A. 2006. Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics. Chem. Soc. Rev. 35 : 39—51.

Morrow J. A., Segall M. L., Lund-Katz S., Phillips M. C., Knapp M., Rupp B., Weisgraber K. H. 2000. Differences in stability among the human apolipoprotein E isoforms determined by the amino-terminal domain. Biochemistry. 39 : 11 657—11 666.

Palumbo R., Sampaolesi M., De Marchis F., Tonlorenzi R., Colombetti S., Mondino A., Cossu G., Bianchi M. E. 2004. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. J. Cell Biol. 164 : 441—449.

Polyanichko A. M., Chikhirzhina E. V., Skvortsov A. N., Kostyleva E. I., Colson P., Houssier C., Vorob'ev V. I. 2002. The HMGB1 Ta(i)le. J. Biomol. Struct. Dyn. 19 : 1053—1062.

Ramm E. I., Vorob'ev V. I., Birshtein T. M., Bolotina I. A., Volkenshtein M. V. 1972. Circular dichroism of DNA and histones in the free state and in deoxyribonucleoprotein. Eur. J. Biochem. 25 : 245—253.

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.

Stros M. 2010. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. Biochem. biophys. acta. 1799 : 101—113.

Stros M., Stokrova J., Thomas J. O. 1994. DNA looping by the HMG-box domains of HMGB1 and modulation of DNA binding by the acidic C-terminal domain. Nucl. Acids Res. 22 : 1044—1051.

Sutrias-Grau M., Bianchi M. E., Bernués J. 1999. High mobility group protein 1 interacts specifically with the core domain of human TATA box-binding protein and interferes with transcription factor IIB within the pre-initiation complex. J. Biol. Chem. 274 : 1628—1634.

Travers A., Thomas J. O. 2004. Chromosomal HMG-box proteins. In: Chromatin structure and dynamics: state-of-the-art. New York: Elsevier B.V. 103—126.

Wang D., Lippard S. J. 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs. Nat. Rev. Drug Discov. 4 : 307—320.

Поступила 2 VIII 2010

CONFORMATIONAL PECULIARITIES OF NUCLEAR PROTEIN HMGB1
AND SPECIFICITY OF ITS INTERACTION WITH DNA*A. M. Polyanchko,^{1,2,*} T. J. Rodionova,¹ V. I. Vorob'ev,² E. V. Chikhirzhina²*¹ Department of Molecular Biophysics, Faculty of Physics of St. Petersburg State University
and ² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

* e-mail: polyanchko@gmail.com

Changes in the secondary structure of DNA and non-histone chromosomal protein HMGB1 were studied by circular dichroism and UV spectroscopy. We have demonstrated that the HMGB1 protein is able to change its secondary structure upon binding to DNA. We estimated the proportion of bound protein on the assumption that there were two spectrally distinguishable forms of the HMGB1 in solution. The bound protein fraction decreases with increasing protein to DNA ratios (r) from 0.48 at $r = 0.13$ to 0.06 at $r = 2.43$. It has been shown that HMGB1 is able to induce considerable changes in DNA structure even when the amount of the protein directly associated with DNA is low.

Key words: chromatin, circular dichroism, non-histone chromosomal protein HMGB1.
