

ПРАВИТЕЛЬСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»
(СПбГУ)
Кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров
Направление «Физика»



Взаимодействие белков H1 и HMGB1 в растворе

Магистерская диссертация студента

_____ **Созоновой Александры
Александровны**

Научный руководитель:
_____ к. ф.-м. н., доц. **Поляничко А.М.**

Рецензент:
_____ к. ф.-м. н., м. н. с. **Старкова Т.Ю.**

Санкт-Петербург
2017

Список использованных сокращений и обозначений

а. к. - аминокислота

а.к.о. – аминокислотные остатки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПААГ – полиакриламидный гель

АА - акриламид

МБА - N,N'-метиленбисакриламид

ТЕМЕД - N,N,N',N'тетраметилэтилендиамид

Трис - трис(гидроксиметил)аминометан (2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиол)

Введение

Структурная организация хроматина до сих пор остается одним из наименее изученных аспектов, определяющих функционирование ДНК в живой клетке. Существует широкий класс белков содержащих домен HMGB, которые выполняют множество разнообразных функций. Один из представителей этого класса является белок HMGB1 и очень сходный с ним белок HMGB2, который считается одним из основных архитектурных факторов хроматина. Еще одним таким белком является гистон H1. Он участвует в образовании структуры хроматина и, благодаря своим модификациям, может также выполнять регуляторную функцию.

На данный момент существует много противоречивых данных, которые говорят о том, что гистон H1 может препятствовать взаимодействию негистонового белка хроматина HMGB1 с ДНК, а может наоборот, способствовать.

Чтобы понять, как происходят процессы регуляции необходимо изучить как взаимодействуют белки H1 и HMGB1.

Целью данной работы является изучение взаимодействия белков HMGB1 и H1 при помощи различных физико-химических методов.

Обзор литературы

Краткие сведения о полипептидах

Белки или полипептиды представляют широкий класс биологических молекул. Они выполняют множество различных функций в живых организмах и участвуют практически во всех биохимических процессах клетки. Полипептиды служат стандартными компоновочными блоками для клетки, выполняя строительную функцию, обладают каталитическими функциями, регуляторными, транспортными и многими другими.

Такое многообразие функций происходит из сложной химической структуры данного класса молекул.

Каждый белок состоит из альфа-аминокислот. Альфа-аминокислоты содержат карбоксильную, аминную и функциональную группы, которая придает различия аминокислотам. Всего 20 разных альфа-аминокислот используется для построения белковой молекулы. Некоторые из них содержат гидрофобные цепи, способные сформировать плотное внутреннее ядро, стабилизирующее структуру молекулы, некоторые аминокислоты содержат гидрофильные цепи, которые участвуют в образовании водородных связей, также существуют аминокислоты, содержащие ионогенные группы, которые ответственны за взаимодействия с ионами как внутри самого белка, так и вне его, а такая аминокислота как цистеин содержит в боковой группе атом серы, что делает возможным образование дисульфидных связей или мостиков в боковых цепях этих аминокислот. Однако такие белковые альфа-аминокислоты обладают не таким уж и большим химическим многообразием боковых групп, поэтому для решения некоторых задач к белковой молекуле присоединяются ионы металла, коферменты и т.п.

Таким образом, белок – структура, мономерными звеньями которой являются альфа-аминокислоты, соединенные пептидной или ковалентной связью между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой другой. Схема образования пептидной связи представлена ниже:

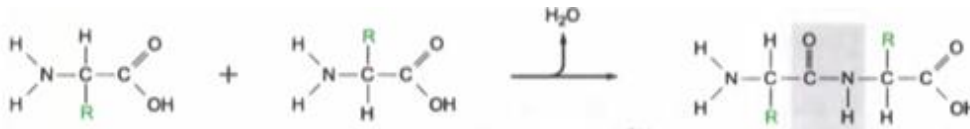


Рис 1. Схема образование пептидной связи

Такая последовательность аминокислот образует первичную структуру белка. Она содержит всю необходимую информацию, определяющую не только его конечную пространственную структуру, но и его функции. Цепочка из аминокислотной последовательности стремится занять такое пространственное положение, при котором она будет иметь минимум свободной энергии, при этом пространственное расположение атомов пептида называется конформацией. Каждый белок обычно принимает одну устойчивую конформацию, однако при взаимодействии с некоторыми лигандами его пространственная структура может несколько меняться, что напрямую отражается на его функциональности.

Краткие сведения о структуре хроматина

Белки могут быть сформированы в семейства, внутри которых они будут иметь схожие трехмерные структуры и схожие последовательности аминокислот. Их структура, в меньшей степени последовательность а. к. обладают достаточной степенью консервативности. При тождественности а. к. последовательности более, чем на 25% белки скорее всего будут обладать общей пространственной структурой. Одно из важных свойств белков – консервативность. Так, например, белок инсулин имеет достаточно консервативную последовательность а.м.к., которая прослеживается у всех позвоночных. Такое уникальное и необходимое для существования живых организмов свойство белков зашифровано в геноме. Геном – совокупность данных, необходимых для создания и функционирования нового организма. Он содержит в себе исчерпывающую информацию о признаках, передающихся по наследству. В нем содержится вся информация о белках, которые когда-либо синтезировались в организме. Геном представляет собой последовательность нуклеотидов. Нуклеотид - элемент, в который входят азотистое основание – пурин или пиримидин, сахарное кольцо (пентоза) и фосфат. Функциональной единицей генома является ген. В одном гене закодирована последовательность одного белка.



Рис. 2. Схема, иллюстрирующая принцип кодировки последовательности а. к. о. в двойной спирали ДНК.

Две комплементарные цепочки нуклеотидов образуют молекулу ДНК – дезоксирибонуклеиновую кислоту. Весь геном эукариотов представляет собой несколько молекул ДНК, каждая из которых сформирована в структуру, называемой хромосомой. Таким образом, геном организма составляет набор хромосом, несущих наследственную информацию о нем. Например, у человека в норме содержится 46 хромосом.

Хромосома – это очень сложная, высокоорганизованная структура. Она имеет несколько уровней организации. Первой базовой единицей укладки молекулы ДНК в хромосому является нуклеосома. На рисунке ниже представлены все пространственные уровни организации хромосомы.

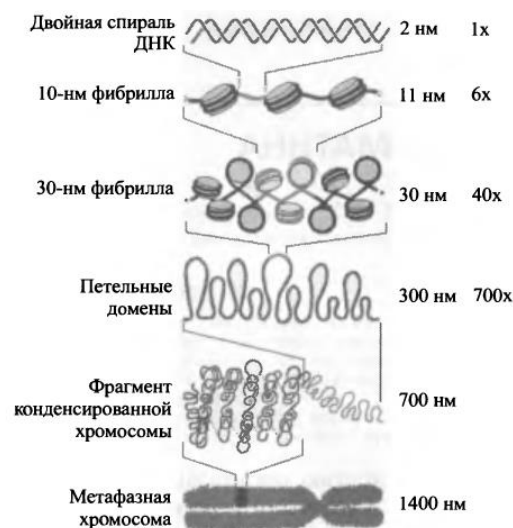


Рис. 3. Уровни организации хромосомы.

Нуклеосома представляет собой двуниевую ДНК, свернутую в петли и витки, внешне похожую на сплюснутый диск. Образование такой структуры происходит при участии белков, которые связываются с ДНК. Такие белки делятся на 2 класса: гистоновые и негистоновые. Этот сложный комплекс из ядерных белков обоих классов и ДНК называется хроматином.

Гистоновые белки

Гистоновые – это относительно небольшие белки, их молекулярный вес составляет около 15-20 кДа. Они содержат большое количество положительно-заряженных а.к.о., вследствие чего имеют большой положительный заряд. Для гистонов характерны короткие альфа-спиральные участки и неупорядоченная структура N-конца, что предполагает их большую гибкость.

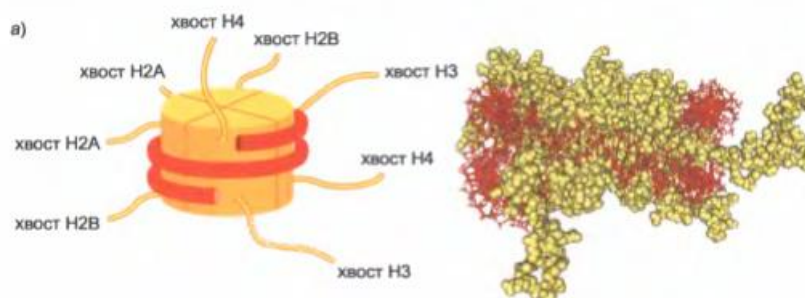


Рис.4. Принцип образование нуклеосомы: двойная спираль ДНК закручивается вокруг октамера из гистонов, правее изображена пространственная модель расположения атомов данной структуры.

Еще несколько десятилетий назад считалось, что гистоновые белки отвечают только за упаковку молекулы ДНК в ядро. Однако это не единственная роль этих белков. Хроматин имеет разную плотность упаковки в хромосоме, так гетерохроматин гораздо плотнее упакован, чем эухроматин. Гены, которые находятся в гетерохроматине заглушаются, становятся недоступными для экспрессии. Такое свойство хроматину придают гистоновые хромосомные белки. В зависимости от тех или иных обратимых модификаций, они способны разрыхлять или уплотнять структуру хроматина. Но при более глубоком изучении этого процесса можно говорить о том, что модификации гистонов

данного участка хроматина привлекают к себе другие белки, которые регулируют экспрессию генов.

Несколько особняком в этом классе белков находится белок H1. Его молекулярная вес составляет около 21кДа. Гистон H1 содержит глобулярный домен из 80 а.к.о. и С-разупорядоченный участок из 100 а.к.о.

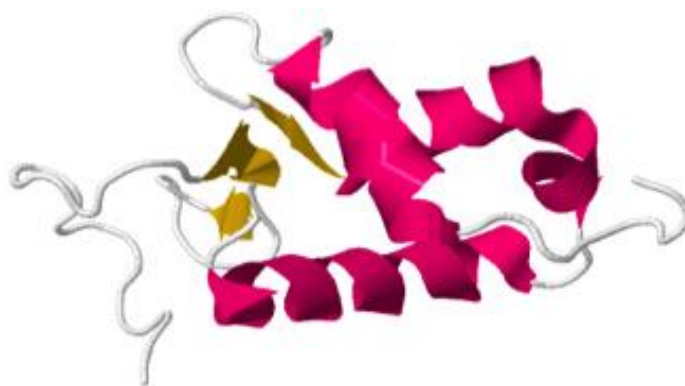


Рис. 5. Структура H1, PDB, 1UST, 39-130 а.к.о.

H1 связывается с молекулой ДНК на входе/выходе из нуклеосомы. Из литературных источников известно, что белок H1 может связываться с ДНК двумя сайтами связывания, что может приводить к «стягиванию» молекулы ДНК и образованию суперскрученной структуры ДНК.

Негистоновые белки

Из негистоновых хромосомных белков наиболее интересными и хорошо изученными являются белки семейства HMGB, принимающих участие во многих регуляторных процессах клетки. Белки этой группы были открыты еще в 1973 году и затем так названы благодаря их высокой электрофоретической



подвижности в полиакриламидном геле. Наиболее широко представленными являются HMGB1 и родственный ему HMGB2 белки. Молекулярный вес этих белков составляет примерно 26,5 кДа. Они содержат в себе два ДНК-связывающих домена HMG и С-концевой отрицательно-заряженный неупорядоченный участок.

Рис.6. Структура HMG-домена, PDB, 1HMF.

Неупорядоченный С-концевой участок играет важную роль в функционировании белка. Он стабилизирует пространственную структуру белка. При взаимодействии белка HMGB1 с ДНК его С-концевой участок помогает в частичном разворачивании ее структуры и декомпактизации хроматина, что усиливает его способность связываться с регуляторными белками. Однако существуют данные, в которых домен HMG ведет себя другим образом и способствует созданию супервитков ДНК.

Вопрос регуляции экспрессии генов в эукариотических клетках является очень сложным и точным. Как упоминалось выше, различные модификации гистона H1 могут уплотнять или разрыхлять структуру хроматина. Поэтому особый интерес представляет комплекс белков HMGB и H1, где HMGB выступает как регуляторный фактор. Специфически связываясь с H1, он может регулировать плотность упаковки хроматина.

Цели и задачи работы

При выполнении работы были поставлены следующие основные цели:

1. Охарактеризовать физико-химические свойства белков Н1 и НМGB1/2, их комплекса.
2. Установить возможность прямого наблюдения комплексов между белками НМGB1/2 и Н1.
3. Оценить количество фракций, образующихся при взаимодействии белков НМGB1 и Н1 в растворе.
4. Оценить радиус инерции белков НМGB1, Н1 и их комплексов в растворе методом малоуглового рентгеновского рассеяния.
5. Подобрать условия для разделения белков НМGB1 и НМGB2 методом хроматографии исключенного объема в препаративных масштабах.

Для достижения поставленных целей нам было необходимо решить следующие экспериментальные задачи:

1. Провести экстракцию гистонового белка Н1 и негистоновых хромосомных белков НМGB1 и НМGB2 из тимуса теленка.
2. Охарактеризовать чистоту и нативность исходных препаратов белков.
3. Приготовить растворы белков Н1 и НМGB1, а также их комплексов.
4. Получить кривые МУР на синхротронном источнике для исследуемых систем, охарактеризовать радиус инерции белков и их комплексов.
5. Получить и проанализировать кривые седиментации для образцов, содержащих чистые белки и их комплексы.
6. Подобрать условия и провести хроматографическое разделение белков.

Материалы и методы

Расчет коэффициента экстинкции

В данной работе использовалась формула для нахождения коэффициента экстинкции по Пэйсу[]:

$$\epsilon_{280} = \text{Trp}5500 + \text{Tyr}1490 + \text{Cys}125,$$

где Trp- кол-во триптофана, Tyr – кол-во тирозина и Cys – количество цистеина, для H1 и HMGB1 взята из ресурса <http://www.uniprot.org/uniprot> с номерами Q0I12 и P10103 соответственно,

Электрофорез

Электрофорез является очень полезным методом исследования белков. С его помощью можно разделить белки по их электрическому заряду, молекулярной массе и пространственной конфигурации, Все эти параметры могут выступать как порознь, так и в совокупности, Биологические макромолекулы такие как: белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды, находящиеся в растворе, несут определенный электрический заряд благодаря группам, способным к диссоциации, В зависимости от общего суммарного заряда молекулы она может двигаться под действием электрического поля к аноду или к катоду, Это явление и носит название электрофореза, Причем, молекула будет испытывать трение об окружающую среду, и в зависимости от этого будет меняться скорость миграции, В этом заключается основная суть этого метода,

Рассмотрим физику процесса, чтобы понять связь между подвижностью макромолекулы и такими параметрами как ее электрический заряд и коэффициент трения, Для этого рассмотрим отдельную частицу, взвешенную в идеальном диэлектрике, Приложим к этой частице электрическое поле E, тогда сила действующая на эту частицу будет QE, где Q – общий заряд этой частицы, Когда частица начнет двигаться под действием этого поля появится сила трения, направления против движения частицы с коэффициентом трения f,

То есть в первые моменты времени частица начинает ускоряться до того момента, пока электрическую силу не уравновесит сила трения, после этого она будет двигаться с постоянной скоростью,

Существуют различные виды электрофорезных установок. В данной работе использовался полиакриламидный гель, залитый между двух плоских стекол, помещенных в вертикальную камеру,

В качестве поддерживающей среды использовался полиакриламидный гель (ПААГ). В настоящее время очень часто в электрофорезах используют ПААГ для создания устойчивой и хорошо смачиваемой пространственной решетки,

Основные компоненты ПААГ,

Для получение ПААГ используют акриламид и вещество, которое может образовывать поперечные сшивки, В качестве этого вещества обычно используют N,N'-метиленакриламид или сокращенно бис-акриламид, Реакция проходит в присутствии инициатора и катализатора, Соотношение акриламида и бис-акриламида очень важно, так как влияет на механические и химические свойства геля, так, например, экспериментально было получено следующее правило: одновременное содержание обоих компонентов приводит к хрупкости и излишней жесткости геля, а одновременное убавление компонентов приводит к излишней эластичности и мягкости геля, В работе использовался 30% акриламид /бис-акриламид,

Реакция полимеризации геля идет по такой схеме:

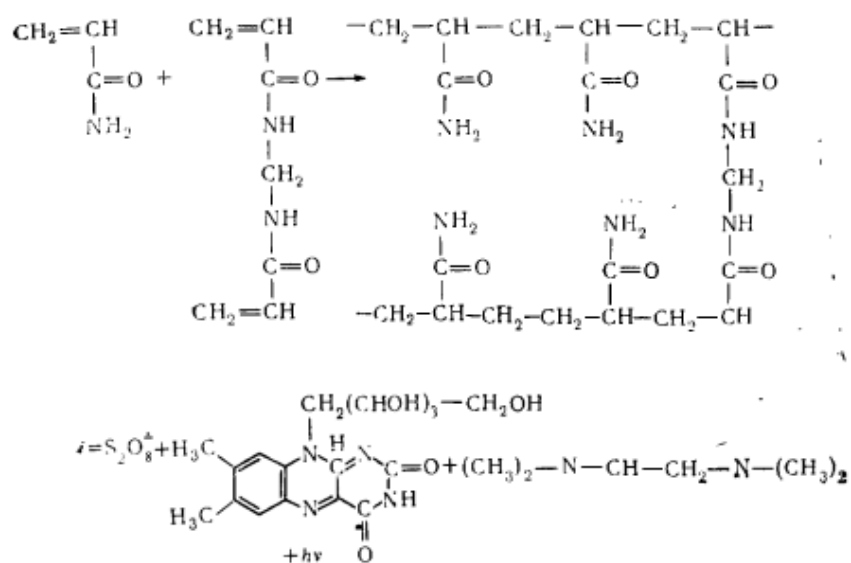


Рис7 Образование полиакриламидной сетки

На данной схеме катализатором реакции служит ТЕМЕД (тетраметилэтилендиамид), а инициаторами – персульфат аммония, рибофлавин и свет,

Процесс полимеризации требует свободных мономеров, который образуются под действием свободных радикалов кислорода, которые образуются из персульфата, Для реакции необходимо свободное основание, поэтому реакция полимеризации не идет при низких, кислых рН, Также на реакцию полимеризации очень плохо влияет (замедляет или вообще предотвращает) молекулярный кислород, Для получения воспроизводимых результатов нужно проводить дегазацию раствора,

Также важно отметить, что ПААГ является не только поддерживающей средой, но и сам активно участвует в разделении молекул, Он действует как молекулярное сито, В зависимости от того, сколько добавлено акриламида изменяется размер пор, Чем больше добавлено акриламида, тем меньшие поры по размеру, То есть чем больше размер молекулы, тем меньше должна быть концентрация акриламида в геле,

Денатурирующий форе́з по методу Laemmli,

Для оценки молекулярной массы использовался специальный маркер – Precision Plus Protein Standarts, BioRad

Использовались такие буферные системы:

Акриламид/Бисакриламид (30%),

Додецилсульфат натрия (10% к/мл),

Буфер для проб,

3,55 мл дистиллированная вода

1,25 мл 0,5 М Трис-Нсl, рН=6,8

2,5 мл глицерина

2,0 мл 10% (г/мл) ДДС-Na

0,2 мл 0,5% (г/мл) бромфеноловый синий

β-меркаптоэтанол, Для того что бы пробы не окислялись и не образовывали лишних дисульфидных мостиков, они подверглись кипячению с добавлением β-меркаптоэтанола,

Электродный буфер,

Электродный буфер с рН=8,8, BioRad,

ПСА (10% г/мл)

Растворы:

%T	H ₂ OSQ, мл	АА/МБА, мл	Буфер*, мл	10% ДДС-Na, мл	ТЕМЕД, мл	ПСА, мл
5%	5,7	1,7	2,5	0,1	10	20
15%	2,4	5,0	2,5	0,1	20	30

Таблица 2. Объем растворов, используемых для приготовления гелей 5% и 15%

Буфер разделяющего геля 1,5 Трис-НСl буфер (рН 8,8)

Буфер концентрирующего геля 0,5 Трис-НСl буфер (рН 6,8)

Условия проведения эксперимента:

Стабилизация по току - 15 мА, напряжение - 100 В, Длительность электрофореза составляла 120 минут, Использовался режим стабилизации по току,

Аналитическое ультрацентрифугирование

Любая внешняя сила, которая действует на взвешенные в растворе частицы, может вызывать перенос массы, В данном методе эта сила вызвана центробежным ускорением, и соответствующая сила называется центробежной, Особенность этого метода заключается в том, что гравитационная сила действует на все частицы и, таким образом, не зависит от заряда и химической формулы вещества, а только от массы частиц, Этот метод широко используется для исследования и разделения различных высокомолекулярных соединений,

Рассмотрим физику процесса, Как уже было сказано выше частица испытывает центробежную силу, которую можно описать формулой $F_c = M \omega^2 r$, где M – действующая масса частицы, ω – угловая скорость вращения и r – радиус вращения, Выталкивающая сила для частицы равна $F_b = (\rho - \rho_0) V g$, где ρ – плотности веществе и растворителя соответственно, Тогда для сферической частицы можно так записать центробежную силу: $F_c = \frac{\pi}{6} d^3 \rho \omega^2 r$, где d – диаметр частицы, При движении частицы возникает сила трения, пусть μ - коэффициент трения, тогда $F_t = \mu F_c$, где v – скорость движения частицы, Согласно закону Стокса коэффициент трения пропорционален вязкости среды и линейным размерам частицы, то, учитывая, что $\mu = 6 \pi \eta r$, можем записать $F_t = 6 \pi \eta r v$, где η – вязкость среды, Анализируя это уравнение можно сделать вывод о факторах, влияющих на скорость оседания частицы, Во-первых, частицы большего размера осаждаются быстрее, Во-вторых, скорость оседания также зависит и от плотности частицы, причем возможна такая ситуация, когда мелкие, но более плотные частицы будут осаждаться быстрее, чем частицы большего размера, Также она зависит от вязкости среды – чем она больше, тем медленнее оседают частицы, от скорости вращения ротора и расстояния до оси вращения ротора,

Поскольку при ультрацентрифугировании скорость вращения может достигаться порядка 70000 оборотов в минуту, то очень важно сделать такую систему, которая смогла бы выдерживать такие большие нагрузки, Для этого, если ротор разлетится от больших нагрузок, и чтобы его осколки не разлетелись, его помещают в специальные толстые стальные защитные цилиндры, Также важна его балансировка, поэтому в установке используется гибкий вал, Помимо этого, при движении ротора возникает большая сила трения с воздухом, вследствие чего он может сильно нагреваться, что является недопустимым, Поэтому в камере создают высокий вакуум,

Процессы переноса в ультрацентрифугировании описывает уравнение Ламма.

Коэффициент седиментации измеряется в сведбергах ($1S=10^{-13}c$), [5]

Уравнение Ламма имеет точное решение только для двух случаев:

1. Отсутствие диффузии
2. Отсутствие седиментации

Коэффициент седиментации пропорционален молекулярному весу, умноженному на парциальный удельный объем, и обратно пропорционально коэффициенту трения, Экспериментально определяется как отношение скорости к полю силы,

Что же происходит когда начинает действовать поле силы? Представим, что молекулы равномерно распределены по ячейке, Когда прикладывают поле силы, то все начинает вращаться и участок вблизи мениска полностью освобождается от раствора, Таким образом формируется подвижная граница, По скорости движения этой границы можно посчитать коэффициент седиментации,

Для того, что решать уравнение Ламма использовалась программа SEDFIT, Эта программа основывается на принципах описанных выше, хотя там и усовершенствованы некоторые детали: наложение дополнительных условий на решения и некоторые другие,



Рис,8 Схематическая установка для аналитического ультрацентрифугирования

Измерения проводилось в ресурсном центре «Диагностики функционирования материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники» научного парка СПбГУ,

Условия проведения эксперимента:

Эксперимент проводился на установке ProteomeLab™ XL-I Protein Characterization System фирмы Beckman, страна – производитель США, Температура проведения эксперимента - 10С, Скорость вращения ротора 42000 об/мин, Время проведения эксперимента – 24 часа, Измерения поглощения проводились на длине волны 220 (поглощение пептидной связи) и 270 нм Измерения проводились в секторальной ячейке,

В каждом эксперименте подготавливалось 3 пробы: чистый белок H1, чистый белок HMGB1 и комплекс белков в соотношении 1/1 по молярной массе,

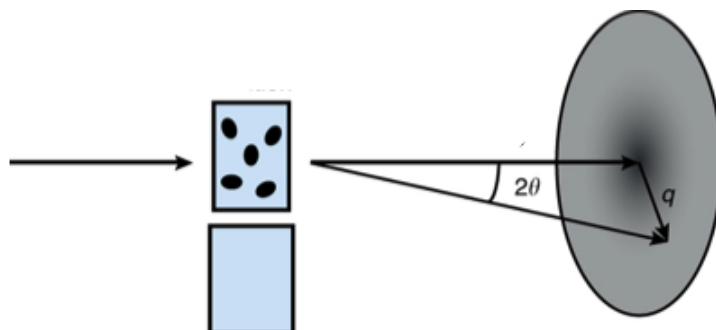
По изменению поглощения с течением времени при помощи решения уравнения Ламма можно найти относительное распределение коэффициента седиментации, Некоторые параметры, задаваемые в программе SEDFIT,

Коэффициент седиментации зависит от молекулярной массы образца, удельного парциального объема белка и его пространственной конфигурации, Удельное парциальное давление изменяется в очень узком диапазоне для всех белков, поэтому для него было принято среднее значение $0,73 \text{ см}^3/\text{г}$, Также, так как исследуемые белки глобулярны, то коэффициент Стокса равен 1,25-1,35,

Также нужно задать правильное положение мениска (красная линия) и положение дна ячейки (синяя граница),

Малоугловое рентгеновское рассеяние

Метод малоуглового рассеяния синхротронного излучения позволяет увидеть структурные особенности и форму, определить размер частиц в растворе, Этот метод основан на измерении интенсивности рассеянного света при малых углах, Принципиальная схема изображена на рисунке,



Рис, 9 Принципиальная схема установки по малоугловому рассеянию,

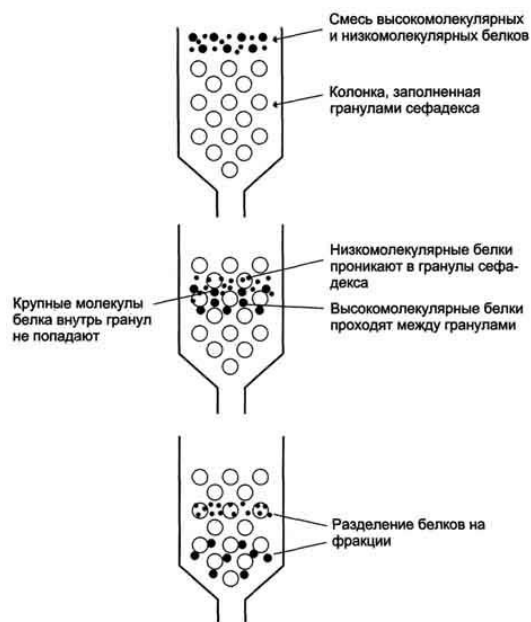
При этом интенсивность рассеянного света является преобразованием Фурье от корреляционной функции электронной плотности, Таким образом, зная эту функцию можно определить размер частицы, рассеивающей свет.

Эксперимент проводился на установке BioSAXS Европейского центра синхронных исследований.

Исследуемые белки были помещены в 10 мМ натрий-фосфатный буфер и 15 мМ NaCl, из которых затем была удалена влага, Последовательное разбавление получившихся порошков деионизованной водой производилось непосредственно перед измерениями,

Гель-фильтрационная хроматография

Гель-фильтрационная хроматография – метод разделения белков, основанный на разделении по размеру и геометрии молекулы, Для разделения молекул используются полимеры, имеющие трехмерную сетчатую структуру, придающие им свойства гранулированных гелей, Метод работает по принципу молекулярного сита, Такая структура является непроницаемой для крупных частиц (крупнее, чем поры), частично проницаемой для частиц сравнимых с размером пор геля и хорошо проницаемой для малых частиц, таких как молекулы солей, буферных растворов, Таким образом, в первую очередь в элюате наблюдаются крупные частицы, не прошедшие через гель, а затем уже частицы, которые могут проникать в поры,



Рис,10 Принцип разделения белков метод гель-фильтрационной хроматографии,

Разделение по геометрическим размерам белков данным методом лежит в основе этого метода, Частицы, которые имеют вытянутую форму будут дольше проходить через поры геля, чем частицы, имеющие сферическую форму, Таким образом, например, денатурированный белок будет иметь более позднее время элюции, так как его форма является разупорядоченным клубком, а не плотно-сформированной глобулой.

Метод детекции гель-фильтрационной хроматографии осуществляется спектрофотометрически, путем измерения поглощение элюента на длине волны 230 и 280 нм.

Результаты и их обсуждение

Методы экстракции белков H1, HMGB1/2

Данные белки выделялись из тимуса теленка. Сразу после забоя теленка его тимус был разделен на небольшие части и помещен в жидкий азот. После этого тимус теленка поместили в гомогенизатор, предварительно остудив все его части в жидком азоте, и в 5 циклов запустили процесс. Гомогенизатор в процессе работы также находился в контейнере с жидким азотом. После того, как ткани тимуса теленка примут порошкообразную консистенцию их расфасовали по емкостям и хранили в морозильной камере на -20С,

Далее проводили процедуру экстракции. Важным замечанием является то, что все работы проводились на холоде, при температуре не большей +4С,

Производим суспендизацию ткани тимуса теленка. Помещаем необходимое количество тимуса теленка в пробирку, а затем туда же помещаем 10% HClO₄ и 0,1M PMSF, чтобы хлористой кислоты по объему было примерно в 2 раза больше, чем ткани. Затем полученную смесь размешивают до однородности, затем фильтруют и центрифугируют 17 минут на скорости 2300g при температуре +4С (это стандартные условия для центрифуги при экстракции H1 и HMGB1/2) два раза, разделяя каждый раз надосадочную жидкость и осадок. После этого объединили надосадочные жидкости после каждого этапа друг с другом и осадки также объединили друг с другом. Затем пропустили надосадочную жидкость через фильтровальную бумагу и добавили к нему 3 объема ацетона, содержащего 0,35N HCl. Оставили на час в холодильнике, произошло высаживание белка. Далее при аналогичных условиях произвели центрифугирование (2300g, 17 минут, +4С) и собрали осадок – белок H1. Затем происходила его отмывка от кислоты путем добавления большого объема ацетона и дальнейшее высушивание полученного гистона. После сбора белка H1 его надосадочную жидкость используют для выделения негистонового хромосмного белка HMGB1/2. При этом к объему надосадочной жидкости добавляют примерно 0,7 объемов ацетона и ставят на -20С на ночь, после чего центрифугируют при стандартных условиях, собирают осадок, промывают и высушивают ацетоном. Полученный белок – HMGB1/2.

Так как белки HMGB1 и HMGB2 очень близкие по своей молекулярной массе и природе, то физически или химически их невозможно отделить друг от друга при экстракции. Для этого может быть использована гель-фильтрационная жидкостная хроматография,

В качестве первичной оценки белков HMGB1 и H1, их чистоты был выбран метод электрофореза,

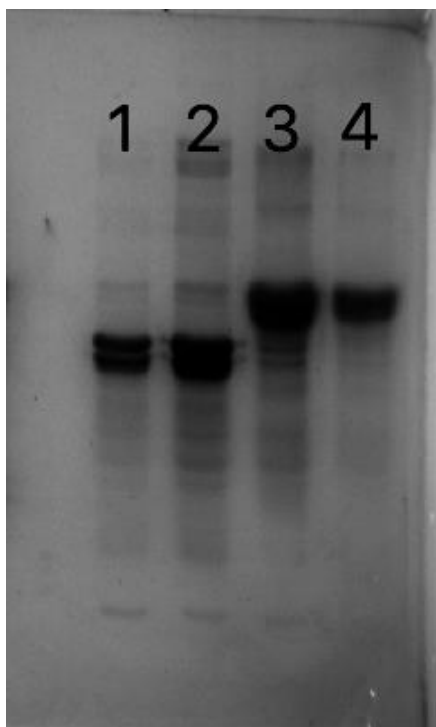


Рис.11 Денатурирующий электрофорез в ПААГ

На данном электрофорезе слева направо:

1. HMGB1 – 5 μ л в концентрации 1 мг/мл
2. HMGB1 – 10 μ л в концентрации 1 мг/мл
3. H1 – 10 μ л в концентрации 1 мг/мл
4. H1 – 5 μ л в концентрации 1 мг/мл

На данной электрофореграмме можно наблюдать незначительное количество примесей других гистоновых белков. Также для белка HMGB наблюдается 2 фракции: одна из них это HMGB1 и вторая – HMGB2, причем верхняя – HMGB1 и нижняя – HMGB2,

Хотя белок H1 и имеет меньшую молекулярную массу, но находится выше, чем HMGB1. Это связано с тем, что он имеет очень большой положительный заряд,

поэтому движется в поле медленнее, Две фракции этого белка могут говорить о присутствии какой-то его модификации.

Определение концентрации спектрофотометрическим методом

Условия проведения эксперимента:

Эксперимент проводился с помощью двулучевого спектрофотометра с расщеплением лучей Shimadzu UV-1800., в кварцевой кювете с длиной оптического пути 0,2 см.

Название образца	Оптическое поглощение образца					
	230 нм	260 нм	270 нм	280 нм	290 нм	320 нм
H ₂ O	0,057	0,047	0,046	0,045	0,043	0,040
H1	0,308	0,123	0,117	0,100	0,076	0,052
HMGB1	0,523	0,134	0,147	0,140	0,096	0,043

Таблица 1. Оптическое поглощение растворов на различных длинах волн.

Расчет по формуле:

$$C_{H1} = \frac{A_{230}(H1) - A_{230}(H_2O)M_{H1}}{0,2\varepsilon_{H1}}$$

M , – молярная масса, $M(\text{HMGB1}) = 26500$ моль/л, $M(\text{H1}) = 21000$ моль/л,

Тогда, используя экспериментальные данные, полученные Kohlstaedt: $\varepsilon=33000$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ – для HMGB1/2, а для H1 $\varepsilon=41000$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $C(\text{HMGB1}) = 0,76$ мг/мл и $C(\text{H1}) = 1,29$ мг/мл.

Гель-фильтрационная хроматография.

Для разделения белков HMGB1 и HMGB2 использовался метод гель-фильтрационной хроматографии. На хроматограмме ниже можно наблюдать небольшие пики, характеризующие агрегаты и высокомолекулярные соединения перед основным пиком. Однако этот пик не раздваивается, разрешающая способность данной колонки не позволяет разделить белки HMGB1 от HMGB2.

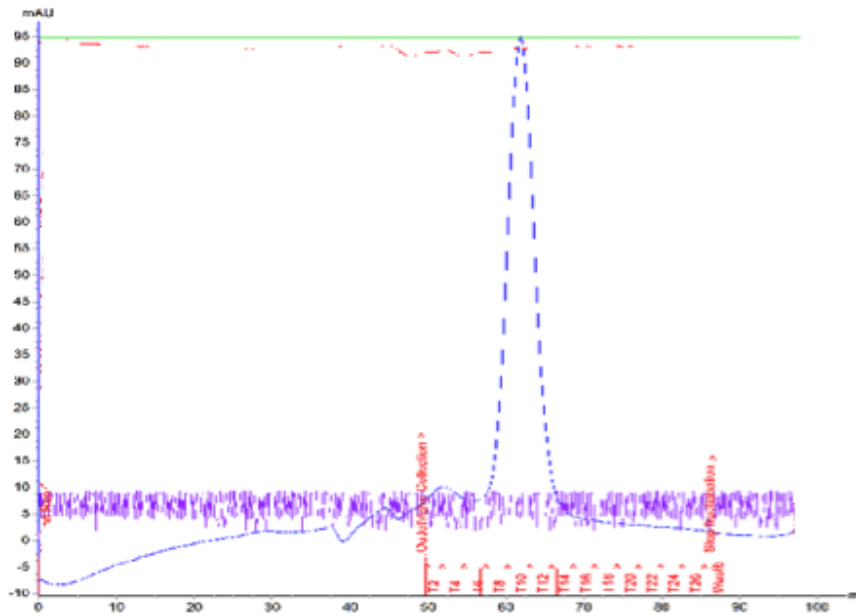


Рис. 12 Хроматограмма белка HMGB1/2,

Собрав фракции основного пика, провели проверку чистоты методом геле-электрофореза,

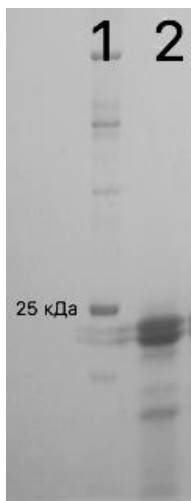


Рис. 13 Электрофореграмма белка HMGB1/2 после геле-фильтрационной хроматографии,

На данном электрофорезе слева направо:

1. Маркер Dual Color – 3 μ г
2. HMGB1 – 5 μ г

На электрофореграмме хорошо видны фракции белка HMGB1/2 и низкомолекулярные фракции, Высокомолекулярных фракций не наблюдается. При помощи гель-фильтрационной хроматографии не произошло разделение белков HMGB1 и HMGB2, но произошла эффективная очистка от гистона H1 и высокомолекулярных примесей.

Метод аналитического ультрацентрифугирования.

Исследуем гистон H1 и негстоновый хромосомный белок HMGB1/2 методом аналитического ультрацентрифугирования. На графиках ниже представлены интерференционные спектры белка H1, HMGB1/2 и их комплекса, Комплекс белков получен методом прямого смешивания с количественным отношением белков в растворе 1:1, Все белковые растворы находились в 20 мМ натрий-фосфатном буферном растворе.

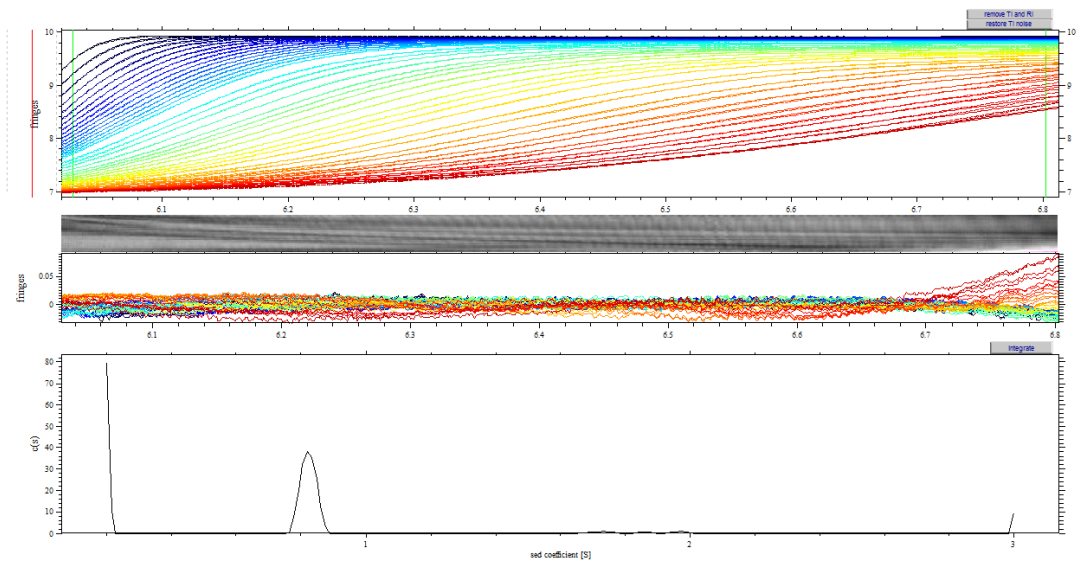


Рис. 14 Интерференция, шум, относительное распределение $c(s)$ для белка H1

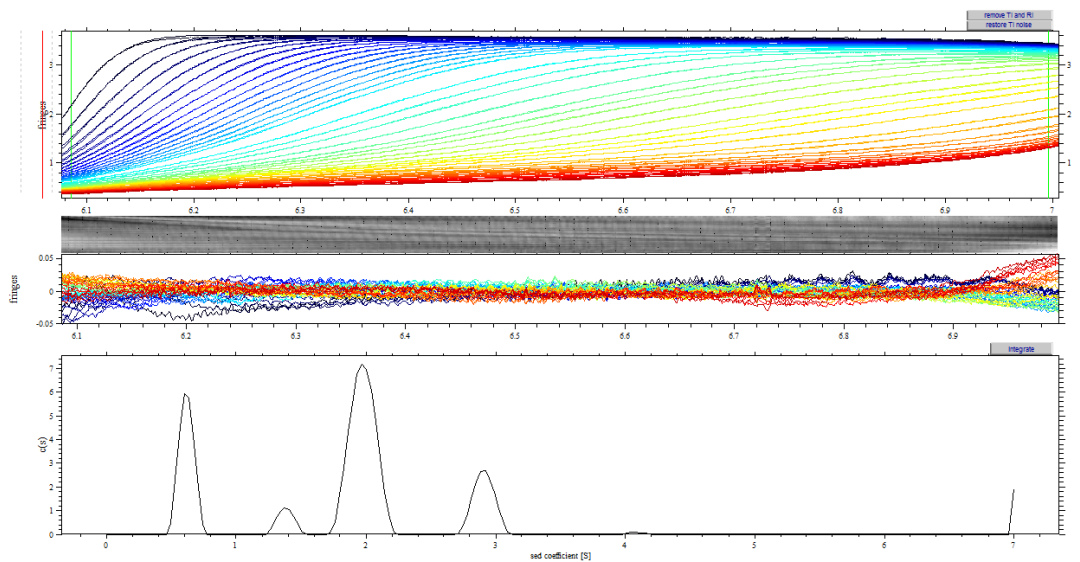


Рис. 15 Интерференция, шум, относительное распределение $c(s)$ для белка HMGB1/2

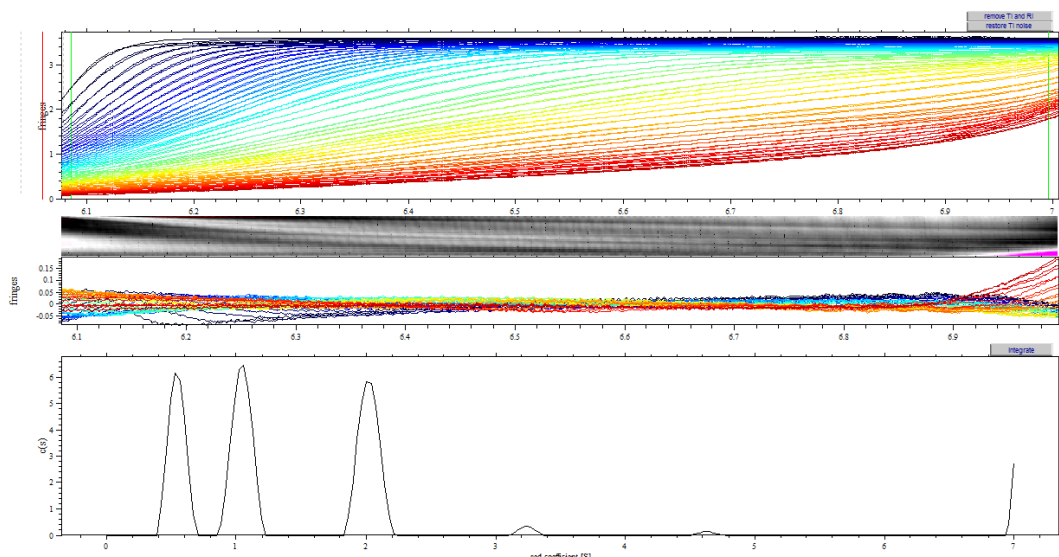


Рис. 16 Интерференция, шум, относительное распределение $c(s)$ для смеси белков $H1$ и $HMGB1/2$

Исследуя образцы данным методом, можно заметить, что для $H1$ характерна гомогенность, так в концентрационном распределении большую часть занимает один пик с константой седиментации, равной 1 Св. Для белка $HMGB1/2$ не наблюдается такой картины, напротив, этот образец гетерогенный, содержит несколько пиков. Основным пиком является пик с константой примерно 2 Св. Скорее всего, этот пик характеризует смесь мономера $HMGB1$ и $HMGB2$, Пик, характеризующий низкомолекулярную фракцию (меньше 1 Св) является артефактом, следствием краевых эффектов и шума. То есть, разделение близких друг к другу по молекулярной массе белков данным методом при данных условиях не представляется возможным. Для смеси белков наблюдаются пики, характеризующие мономеры каждого из белков смеси, а также некоторые высокомолекулярные структуры, которые могут говорить об образовании комплекса. К сожалению, неточность обработки данных не позволяет количественно оценить эти пики.

Оценить размер и наличие белкового комплекса можно при помощи метода малоуглового рассеяния. На сегодняшний день данные по этому методу находятся в обработке, поэтому ниже приводятся кривые рассеяния для белков $H1$, $HMGB1/2$ и их смеси в отношении 1:1 в диапазоне концентраций от 0,1 до 10 мг/мл. По виду кривых можно сказать, что при увеличении концентрации профиль кривой в области малых углов меняется, а значит изменяется и

количество, и конфигурация надмолекулярных частей в растворе.

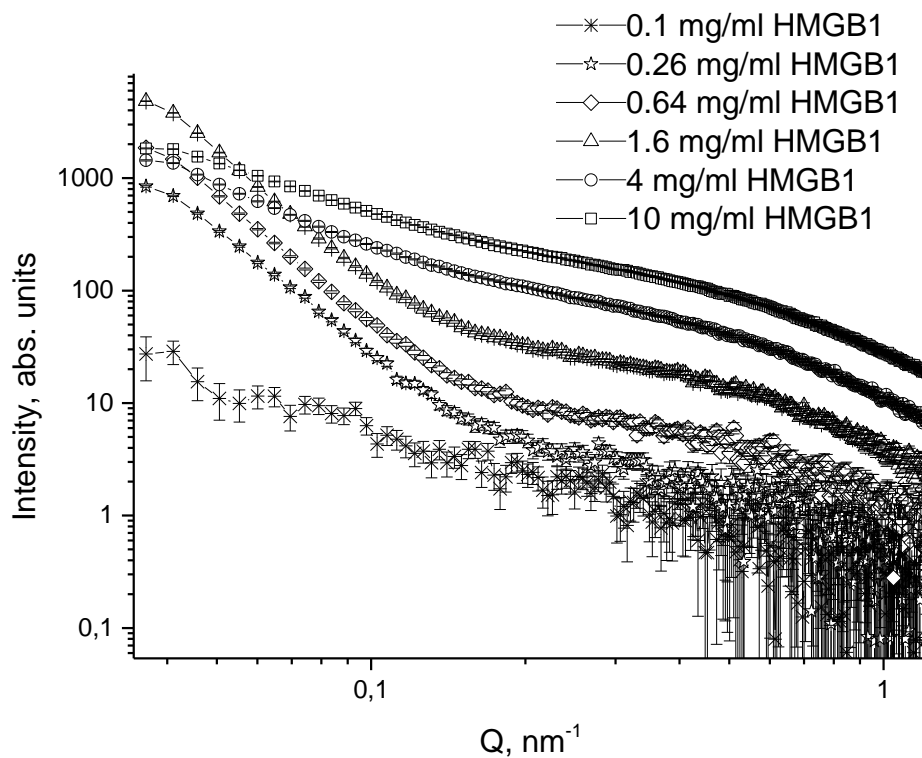
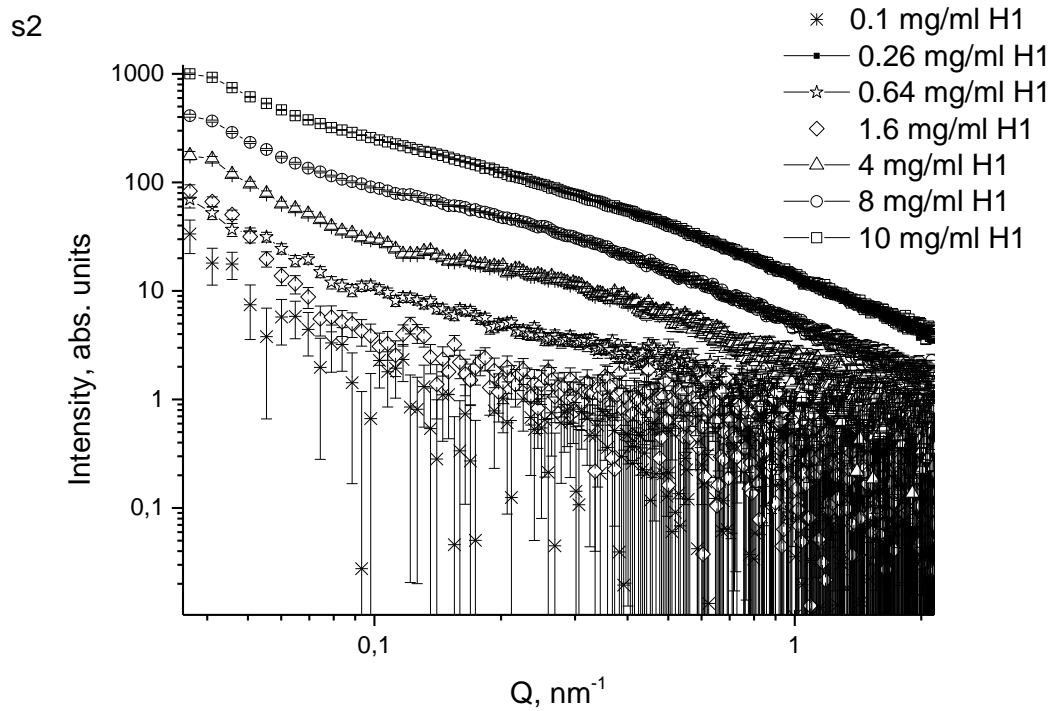


Рис.17 Интенсивность рассеянного света для комплекса белка H1



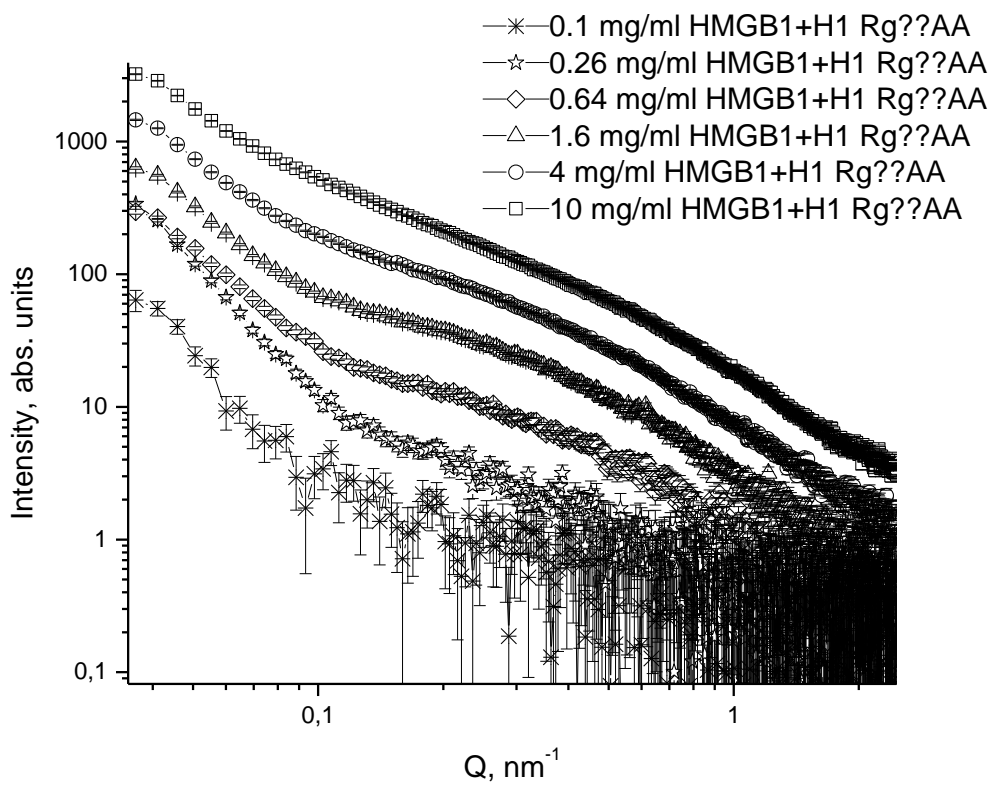


Рис.18 Интенсивность рассеянного света для комплекса белков Н1, HMGB1/2

Основные полученные результаты

1. Экстрагирован негистоновый хромосомный белок НМGB1 и гистоновый линкер Н1 из тимуса теленка. При помощи денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле идентифицированы их молекулярные массы, охарактеризована их чистота.
2. Белок НМGB1/2 очищен от высокомолекулярных примесей и гистона Н1.
3. Методом аналитического ультрацентрифугирования получены и проанализированы белки и их комплексы. Однако для точного определения этих величин требуется проведение эксперимента при более высоких оборотах ротора и более точная обработка кривых.
4. Получены спектры малоуглового рассеяния белков и их комплекса в различных концентрациях. Найдена концентрация, при которой значение сигнал/шум является предельно допустимой - 1,5 мг/мл. При увеличении концентрации профиль кривой в области малых углов меняется, а значит изменяется количество и конфигурация надмолекулярных частиц в растворе, что является подтверждением образования специфического взаимодействия между белками Н1 и НМGB1/2.

Выводы

1. Показано, что белок Н1 и НМGB1/2 взаимодействуют специфически;
2. Получены константы седиментации для Н1 - 1 ± 0.2 Св, для НМGB1/2 - 2 ± 0.2 Св.
3. Из кривых малоуглового рассеяния рентгеновского излучения получены радиусы инерции, для Н1 – 5,4 нм и для НМGB1/2 – 3 нм.

Список литературы:

1. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.Наука, 1981
2. Разин С.В. Быстрицкий С.В. Хроматин: упакованный генома. Москва: Биохим. Лаб. Знаний, 2012
3. Э.Гааль, Г.Медьеши, Л.Верецкен. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. Москва, «Мир», 1982
4. Ч. Кантор, П. Шиммел «Бифизическая химия», Москва, «Мир», 1985
5. M. Stros. HMGB proteins: Interactions with DNA and chromatin. 2009
6. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, 5555
7. Поляничко А.М. Электрофорез в ПААГ, методическое пособие, Санкт-Петербургский государственный университет, Физический факультет, 2007
8. Kohlstaedt L. A., R. D. Cole, Effect of pH on Interactions between DNA and High-Mobility Group Protein HMGB1, 1994, Biochemistry 33: 12702-12707
9. Kohlstaedt, D. Cole Specific interaction between H1 Histone and High Mobility Protein HMGB1, Biochemistry, 1994, 33, 570-575
10. C.Pace, How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, 1995, Protein Science, 4:2411-2423.