

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

**СТРУКТУРА
И ДИНАМИКА
МОЛЕКУЛЯРНЫХ
СИСТЕМ**

**№8 2010 год ЧАСТЬ А
(Статьи и обзоры)**

Казань, КГУ, 2010

**Издается Инженерным центром МР и
Казанским государственным университетом**

Электронный журнал зарегистрирован в федеральной службе по надзору в сфере массовых коммуникаций, связи и охраны культурного наследия (свидетельство ЭЛ № ФС 77-31123).

ISSN 2073-9443

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ ХРОМОСОМНЫМИ БЕЛКАМИ HMGB1 И H1 В РАСТВОРЕ *

А.М. Поляничко^{1,2}, Б.А. Дрибинский¹, И.Б. Кипенко¹, М.С. Феофилова¹,
Е.В. Чихиржина²

¹ Санкт-Петербургский государственный университет
198905, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, ул. Ульяновская, д. 1.
E-mail: polyanichko@gmail.com тел: (812)428-43-88

² Институт цитологии РАН
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.
E-mail: chikhir@gmail.com тел: (812)297-37-40

В работе с помощью методов кругового дихроизма (КД) в УФ области и динамического светорассеяния исследованы комплексы белков HMGB1 и H1 в зависимости от соотношения и ионной силы раствора негистоновым белком хроматина HMGB1 и линкерным гистонем H1. По спектрам КД проведена оценка суммарной доли α -спиральных участков в растворе. Кроме того, было установлено, что в растворе 15 мМ NaCl белки H1 и HMGB1 присутствуют в виде ассоциатов с гидродинамическими радиусами порядка 100 и 200 нм соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что оба белка в растворе склонны к образованию надмолекулярных ассоциатов.

Ключевые слова: негистоновый хромосомный белок HMGB1, гистон H1, белок-белковые взаимодействия, круговой дихроизм, динамическое светорассеяние.

Ключевая роль в организации структуры хроматина на наднуклеосомном уровне принадлежит гистону H1 и негистоновому белку HMGB1. На сегодняшний день, механизмы взаимодействия этих белков с ДНК и между собой остаются до конца не изученными. Каждый из белков HMGB1 и H1 способен связываться с линкерным участком ДНК [1] и образовывать сложные надмолекулярные комплексы. Существует предположение о том, что при одновременном связывании с ДНК белки HMGB1 и H1 могут конкурировать между собой за места связывания на ДНК [2, 3]. Кроме того, до сих пор остается не изученным вопрос о возможности и характере взаимодействия между белками HMGB1 и H1 в отсутствие молекулы ДНК. Между тем, белок-белковые взаимодействия могут оказывать ощутимое влияние не только на состояние белков в растворе, но и на ход их взаимодействия с ДНК.

Ранее уже высказывались предположения о возможности образования комплексов между негистоновым белком HMGB1 и гистонем H1 [4, 5]. Было показано, что HMGB1 и некоторые подфракции гистона H1 могут образовывать гетеродимеры, которые проявлялись при выпадении в осадок. Однако остался открытым вопрос о возможности существования таких комплексов в растворе.

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 09-08-01119), Комитета по науке и высшей школе Администрации г. Санкт-Петербурга, Программы "Ведущие научные школы России" (грант НШ-1961.2008.4).

В связи с этим, целью данной работы стало исследование взаимодействий между белками HMGB1 и H1 в растворе, а также оценка сопутствующих этому взаимодействию структурных изменений в молекулах белков. Для решения данной задачи в качестве основных были выбраны методы кругового дихроизма динамического светорассеяния.

Негистоновый хромосомный белок HMGB1(26 500 Да) и гистон H1 (21 000 Да) выделяли из тимуса телёнка по стандартной методике [7]. Контроль чистоты белков осуществляли при помощи электрофореза в ПААГ по методу Лэммли [8]. Концентрации белков определяли спектрофотометрически, используя, следующие коэффициенты экстинкции: $\varepsilon_{280}(\text{HMGB1}) = 33\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ и $\varepsilon_{230}(\text{H1}) = 41\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ [9].

Спектры кругового дихроизма были получены на дихрографе Mark V, сопряженном с компьютером. Измерения проводились в кварцевых цилиндрических кюветах с длиной оптического пути 0,5 см, в области 200-320 нм. Сглаживание спектров проводилось по методу Савицкого-Голея, рамка сглаживания составляла 10 нм.

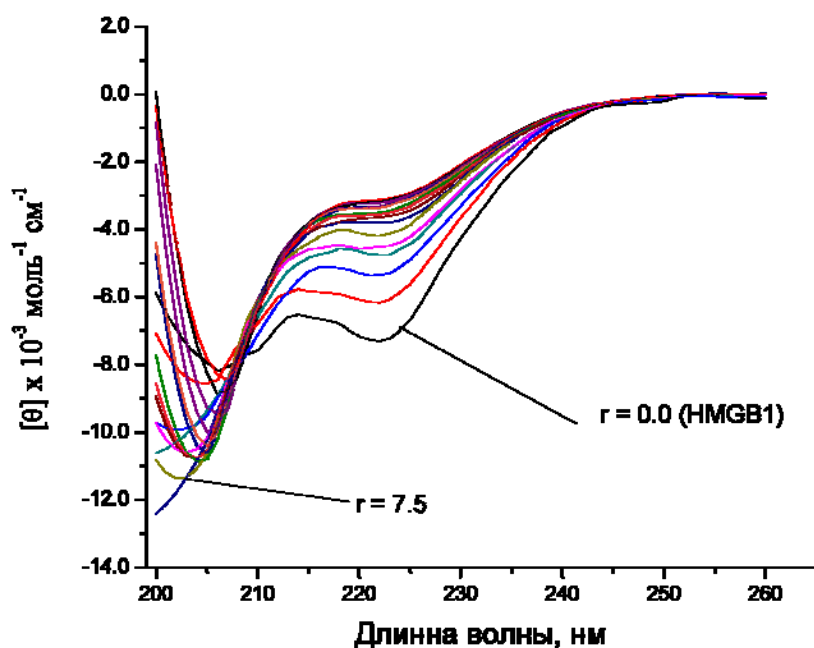


Рис. 1. Спектры кругового дихроизма растворов, содержащих смесь белков HMGB1 и H1 при весовых соотношениях γ H1/HMGB1 в интервале от 0,0 до 7,5. $\gamma = 0,0$ соответствует спектру чистого белка HMGB1 в отсутствие гистона H1.

Эксперименты по динамическому светорассеянию проводились на установке "PhotoCor complex" (Россия) с коррелятором реального времени Photocor

ФС (288 каналов), снабжённой гониметром и термостатом. В качестве источника использован He-Ne лазер (632,8 нм, 25 mV). Измерения светорассеяния проводились в интервале углов от 40° до 90°.

Для анализа структурных изменений в белках нами был применён метод кругового дихроизма, для растворов, содержащих различное весовое соотношение R гистона H1 к белку HMGB1. На рис. 1 представлены характерные спектры КД растворов, содержащих смесь белков при различных весовых соотношениях R H1/HMGB1. В отсутствие гистона H1 спектр белка HMGB1 имеет признаки, характерные для α -спиральной структуры. В частности наблюдается выраженный минимум в окрестности 222 нм. По интенсивности полосы КД на длине волны 222 нм можно оценить суммарную долю α -спиральных участков в растворе, пользуясь полуэмпирическим соотношением (1) [10].

$$\% \alpha = (-[\theta_{222}] + 3000) / 39000 \quad (1)$$

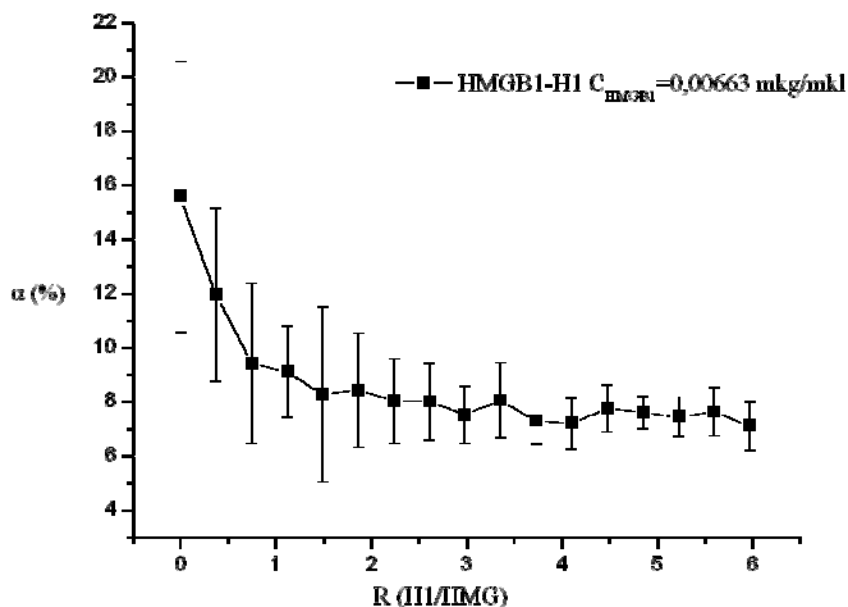


Рис. 2. Доля α -спиральных участков в растворе в зависимости от соотношения H1/HMGB1.

В частности, для белка HMGB1 в свободном состоянии это соотношение даёт процент α -спиральности от 20% до 35% в зависимости от ионного состава раствора. В случае с гистоном H1 это соотношение приводит к величине 12%. При увеличении доли гистона H1 в системе наблюдается постепенное увеличение доли неупорядоченной укладки полипептидной цепи в структуре белков. Это приводит к уменьшению доли α -спиральных участков в растворе до 8% (Рис. 2).

Таким образом, присутствие белка HMGB1 в растворе приводит к уменьшению степени α -спиральности меньшего, чем у каждого из белков в отдельно-

сти. Изменение вторичной структуры белков может быть следствием взаимодействия между ними. При этом любопытно отметить, что взаимодействие между собой молекул каждого из белков, в отсутствие другого не приводит к регистрируемому изменению спектров КД.

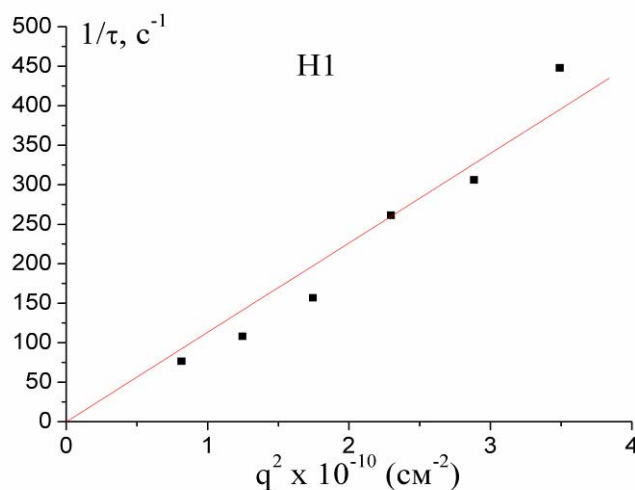


Рис. 3. Зависимость обратного времени релаксации от квадрата волнового вектора для растворов гистона Н1. Угловой коэффициент прямой соответствует величине трансляционной диффузии частиц в растворе.

Между тем, наличие самоассоциации молекул каждого из белков в отдельности подтверждается данными динамического светорассеяния. Согласно этим экспериментам, в растворах 15 мМ NaCl средняя величина коэффициента трансляционной диффузии для белковых частиц в растворах гистона Н1 составила $(1,13 \pm 0,06) \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$ (рис. 3), тогда как для растворов негистонового белка НМGB1 коэффициент трансляционной диффузии примерно вдвое больше $(2,18 \pm 0,08) \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$ (рис. 4). Соответствующие величины гидродинамических радиусов белковых частиц составляют около 100 нм для растворов НМGB1 и порядка 200 нм для растворов гистона Н1. Таким образом, размеры частиц, наблюдаемых в растворе, превышают размер отдельных молекул более чем на порядок. Эти данные свидетельствуют о том, что оба белка в растворе склонны к образованию надмолекулярных ассоциатов. Не исключено, что именно эта особенность белков определяет их ярко выраженный кооперативный характер взаимодействия с ДНК.

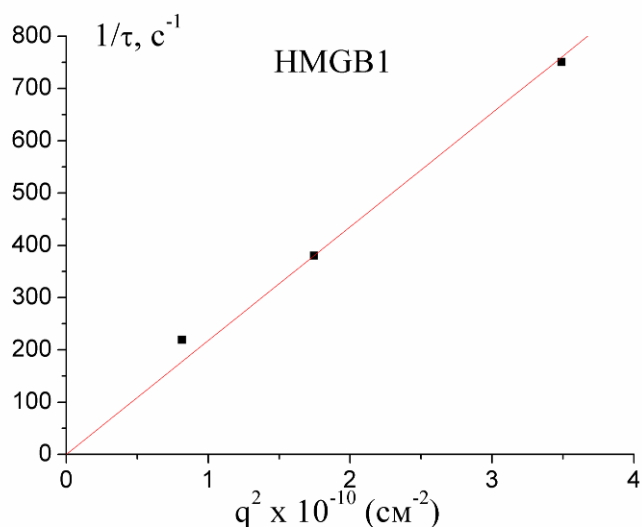


Рис. 4. Зависимость обратного времени релаксации от квадрата волнового вектора для растворов белка HMGB1. Угловым коэффициентом прямой соответствует величине трансляционной диффузии частиц в растворе.

Литература

1. Van Holde, K. Unusual DNA structures, chromatin and transcription / K. Van Holde, J. Zlatanova // *BioEssays*.- 1994.- V. 16.- P. 59-68
2. Bustin, M. High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function / M. Bustin, R. Reeves // *Proc. Nat. Acad. Sci.*- 1996.- V. 54.- P. 35-100
3. Zlatanova, J. Linker histones versus HMG1/2: if struggle for dominance? / J. Zlatanova, K. van Holde // *BioEssays*.- 1998.- V. 20.- P. 584-588
4. Kohlstaedt, L.A. Effect of pH on Interactions between DNA and High-Mobility Group Protein HMG1 / L.A. Kohlstaedt, R.D. Cole // *Biochemistry*.- 1994.-V. 33.- P. 12702-12707
5. Kohlstaedt, E.A. Non-histone chromosomal protein HMG1 modulates the histone H1-induced condensation of DNA / E.A. Kohlstaedt, E.C. Sung, A. Fujishige et al. // *J. Biol. Chem.*- 1987.- V. 262.- P. 524-526
6. Спири́н, А.С. Метод спектрофотометрического определения суммарного количества нуклеиновых кислот / А.С. Спири́н // *Биохимия*.- 1958.- Т. 23.- № 5.- С. 656-662
7. Johns, E.W. The HMG chromosomal proteins / E.W. Johns // London: Academic Press Inc., 1982.- 213 p.
8. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature*.- 1970.- V. 227.- P. 680-685
9. Kohlstaedt, L.A. Specific interaction between H1 histone and high mobility group protein HMG1 / L.A. Kohlstaedt, R.D. Cole // *Biochemistry*.- 1994.- V. 33.- P. 570-575
10. Morrow, J.A. Differences in stability among the human apolipoprotein E isoforms determined by the amino-terminal domain / J.A. Morrow, M.L. Segall, S. Lund-Katz et al. // *Biochemistry*.- 2000.- V. 39.- N. 38.- P. - 11657-11666

УДК 577.322.7+577.323.7+535.56

EVALUATION OF α -HELICITY OF CHROMATIN PROTEINS HMGB1 AND H1 IN SOLUTION

A.M. Polyanichko^{1,2}, B.A. Dribinsky¹, I.B. Kipenko¹,
M.S. Feofilova¹, E.V. Chikhirzhina²

¹ Saint-Petersburg State University

Physical Faculty of Saint Petersburg State University, 1 Ulyanovskaya st., Stary Petergoff, Saint-Petersburg, 198904, Russian Federation

E-mail: polyanichko@gmail.com phone: (812)428-43-88

² Institute of Cytology Russian Academy of Sciences

Tikhoretsky ave. 4, Saint-Petersburg, 194064, Russian Federation

E-mail: chikhir@gmail.com phone: (812)297-37-40

Using circular dichroism (CD) in UV range and dynamic light scattering, interactions of HMGB1 and H1 proteins were studied at different HMGB1/H1 ratios (R) and in various ionic strengths. Analysis of circular dichroism data allowed us to estimate α - helicity of the proteins. It has been determined that in 15mM NaCl solution the proteins form associates with hydrodynamic radius of 100 nm and 200 nm respectively. The obtained data suggests that both the proteins form associates in solutions.

Key words: nonhistone chromosomal protein HMGB1, H1 histone, protein-protein interactions, circular dichroism, dynamic light scattering.

Сведения об авторах

№	Ф.И.О.	Должность и место работы	Телефон рабочий E-mail
1	Поляничко Александр Михайлович	Доцент Санкт-Петербургского государственного университета, Физический факультет	Телефон рабочий: (812)4284388 E-mail: polyanichko@gmail.com
2.	Дрибинский Борис Аркадьевич	Аспирант Санкт-Петербургского государственного университета, Физический факультет	Телефон рабочий: (812)4284388 E-mail: bad1983@gmail.com
3.	Кипенко Ирина Борисовна	Студент Санкт-Петербургского государственного университета, Физический факультет	Телефон рабочий: (812)4284388 E-mail: kipenkoi@gmail.com
4.	Феофилова Мария Сергеевна	Студент Санкт-Петербургского государственного университета, Физический факультет	Телефон рабочий: (812)4284388 E-mail: maria.feofilova@gmail.com
5.	Чихиржина Елена Всеволодовна	Старший научный сотрудник Института цитологии РАН	Телефон рабочий: (812)2973740 E-mail: chikhir@gmail.com

ВЛИЯНИЕ ЦИС-ИЗОМЕРА ДИАММИНОДИХЛОРОПЛАТИНЫ(II) НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК С БЕЛКАМИ НМGB1 И НМGB2*

А.М. Поляничко^{1,2*}, Е.В. Чихиржина^{1*}, В.И. Воробьев¹

¹Институт цитологии РАН, С.-Петербург

194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. 4

E-mail: chikhir@gmail.com; тел:(812)-297-37-40

² Санкт-Петербургский государственный университет

198504, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, ул. Ульяновская, д. 1, Физический факультет

E-mail: polyanichko@gmail.com; тел:(812)-428-43-88

*Авторы внесли одинаковый вклад при подготовке работы.

В работе методами абсорбционной спектроскопии и кругового дихроизма в УФ диапазоне было исследовано взаимодействие ДНК, модифицированной противоопухолевым препаратом цисплатином, с негистоновыми хромосомными белками хроматина. Было показано, что связывание белка НМGB1 с ДНК-платиновым аддуктом не приводит к заметному изменению в структуре ДНК. Белок НМGB2 взаимодействует как с платиновыми аддуктами, так и со свободными участками ДНК и/или связывается только с участком ДНК, поврежденным цис-ДДП, что приводит к нарушениям в структуре ДНК вблизи аддукта. Отличие в спектральном поведении белков, близких по своей первичной структуре может быть связано с различным средством белков НМGB1 и НМGB2 к платинированной ДНК.

Ключевые слова: негистоновые хромосомные белки НМGB1 и НМGB2, ДНК, круговой дихроизм, цисплатин.

Комплексы на основе координационных соединений платины составляют одну из наиболее эффективных групп противоопухолевых препаратов. Цисплатин (цис-диамминодихлороплатина(II), цис-ДДП) является одним из самых успешных таких препаратов [1,2], особенно при лечении тестикулярных опухолей. Несмотря на то, что многие клеточные компоненты могут взаимодействовать с цисплатином, основной мишенью для него остается ДНК. В основе биологического действия этого соединения лежит их способность образовывать устойчивые аддукты с двойной спиралью ДНК [1,3-5]. Участки ДНК, связанные с цис-ДДП, испытывают серьезные нарушения в структуре, что препятствует их нормальному функционированию в клетке. Вероятно, биологическая активность препаратов ДДП обусловлена не только их взаимодействием с ДНК, но также и с белками хроматина. Некоторые структурные белки хроматина, в том числе белки семейства НМGB, способны избирательно связываться с участками двойной спирали ДНК, поврежденными цис-ДДП [6]. Среди белков этого семейства самыми распространенными являются белки НМGB1 и НМGB2 [7]. Оба белка (нуклеосом) взаимодействуют с линкерным участком ДНК, связываясь с двойной спиралью по малой бороздке. Они характеризуются наличием

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 09-08-01119), Комитета по науке и высшей школе Администрации г. Санкт-Петербурга, Программы "Ведущие научные школы России" (грант НШ-1961.2008.4).

сходных структурно-функциональных ДНК-связывающих HMGB-доменов. Несмотря на высокую гомологичность белков HMGB1 и HMGB2, в клеточном ядре необходимо присутствие их обоих. На сегодняшний день остаются неясными различия в функционировании этих двух белков. Ранее нами были выявлены отличия во вторичных структурах белков HMGB1 и HMGB2, что позволило предположить и различный характер их взаимодействия с ДНК.

В работе методами абсорбционной спектроскопии и кругового дихроизма в УФ диапазоне было исследовано взаимодействие ДНК, модифицированной *цис*-изомерами ДДП, с белками хроматина HMGB1 и HMGB2.

В работе были использованы белки, выделенные из тимуса теленка экстракцией 5%-ой хлорной кислотой с последующим осаждением 5 объемами ацетона при -20°C [8]. Разделение и очистка отдельных белковых фракций была проведена методом жидкостной ионообменной хроматографии в системе FPLC. Чистота и идентификация полученных препаратов проводилась в 15%-ном полиакриламидном геле в присутствии доцетилсульфата натрия [9]. Процесс платинирования ДНК контролировали по спектрам кругового дихроизма (КД) (рис.1-4, кр. 1,2). ДНК-белковые комплексы были приготовлены методом прямого медленного смешивания в растворе 15 мМ NaCl.

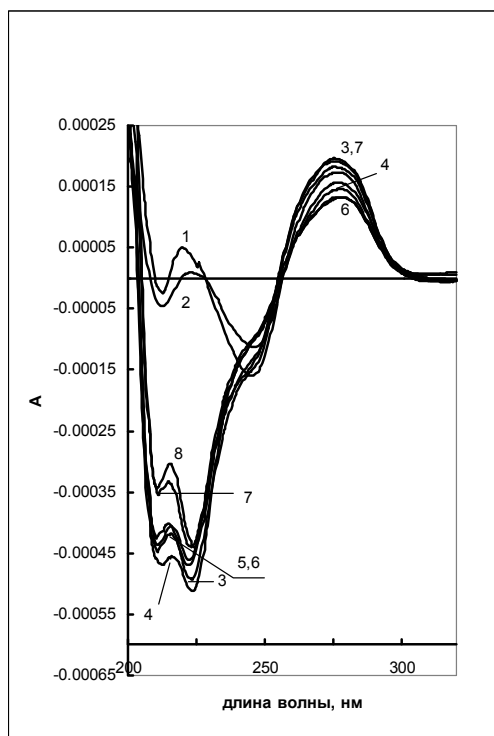


Рис. 1. 1– ДНК; 2- *цис*ДДП/ДНК; 3,7,8 – ДНК-HMGB2 ($r=0.5$): через 140 ч (7); после центрифугирования (8); 4,5,6 - *цис*ДДП/ДНК-HMGB2, через 140 ч (5), после центрифугирования (6)

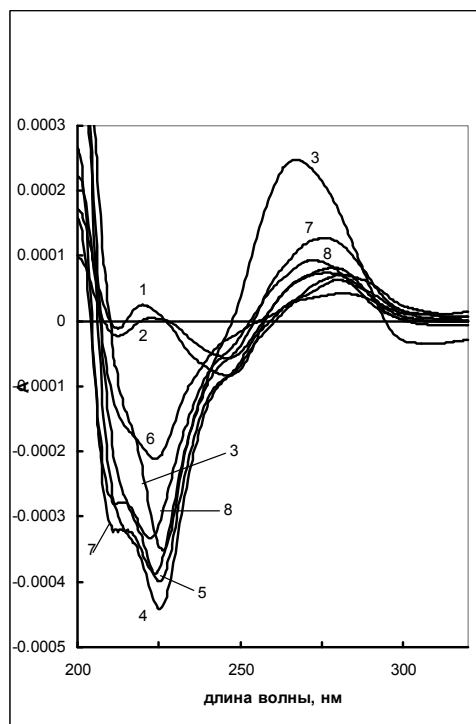


Рис. 2. 1– ДНК; 2- *цис*ДДП/ДНК; 3,7,8 – ДНК-HMGB2 ($r=0.75$): через 140 ч (7); после центрифугирования (8); 4,5,6 - *цис*ДДП/ДНК-HMGB2, через 140 ч (5), после центрифугирования (6)

Характерные спектры КД систем *цис*-ДДП/HMGB1 и *цис*-ДДП/HMGB2 представлены на рис. 1-4. В комплексах HMGB1 с *цис*-ДДП/ДНК количество

межбелковых взаимодействий уменьшается за счет избирательного связывания белка с платиновыми аддуктами на ДНК. Связывание белков с ДНК сильно зависит от степени платинирования ДНК. Нами была показана обратная зависимость скорости протекания реакции от соотношения $R=[Pt]/[P]$, в исследованном диапазоне концентраций. При этом характерные времена реакции разнятся от 20 часов ($R = 0.5$) до 200 часов ($R = 0.005$). Кроме того, мы показали, что оба НМГВ белка способны взаимодействовать с цисплатином, образуя координационные комплексы с атомами серы аминокислотных остатков в составе ДНК-связывающих доменов.

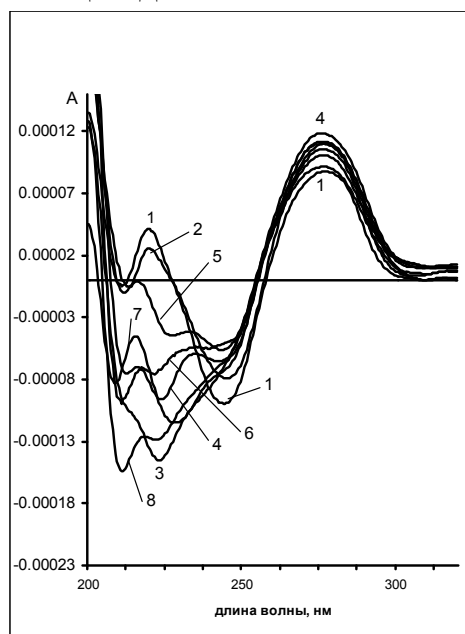


Рис. 3. 1– ДНК; 2- цисДДП/ДНК; 3,7,8 – ДНК-НМГВ1 ($r=1$): через 140 ч (7); после центрифугирования (8); 4,5,6 - цисДДП/ДНК-НМГВ1, через 140 ч (5), после центрифугирования (6)

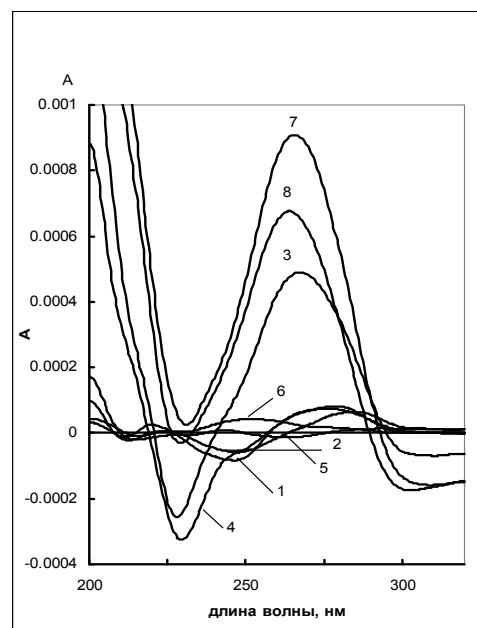


Рис. 4. 1– ДНК; 2- цисДДП/ДНК; 3,7,8 – ДНК-НМГВ2 ($r=1$): через 140 ч (7); после центрифугирования (8); 4,5,6 - цисДДП/ДНК-НМГВ2, через 140 ч (5), после центрифугирования (6)

Выявлены отличия в конформационных изменениях в структуре белков НМГВ1 и НМГВ2 при их взаимодействии с *цис*-ДДП, которое сопровождается довольно сильным уменьшением интенсивности отрицательной полосы в спектрах КД (данные не представлены). Более заметное изменение полосы КД наблюдается при взаимодействии с цисплатином белка НМГВ2.

Изучение взаимодействия белков НМГВ1 и 2 с ДНК, модифицированной *цис*-ДДП, в растворах 15 мМ NaCl выявило следующие основные отличия. Связывание белка НМГВ1 с ДНК-платиновым аддуктом не приводит к заметному изменению в структуре ДНК (рис.3). Ее спектральные свойства в тройном комплексе, в основном, определяются взаимодействием с *цис*-ДДП. Иная картина наблюдается при взаимодействии модифицированной ДНК с белком НМГВ2 (рис.1, 2, 4). В этом случае лишь при малых соотношениях белок-ДНК в комплексах их спектральные свойства сходны с теми, что наблюдались в присутствии НМГВ1 (рис.1, 3). При увеличении содержания НМГВ2 в комплексе на-

блюдается увеличение интенсивности положительной полосы в спектре КД ДНК и ее смещение в коротковолновую область (рис. 2, 4). Это обстоятельство указывает на существенные возмущения в структуре ДНК, которые могут быть вызваны (i) активным связыванием белка не только с платиновыми аддуктами, но и со свободными участками ДНК; и/или (ii) связыванием белка только с участком ДНК, поврежденным цис-ДДП и дальнейшими нарушениями в структуре ДНК вблизи аддукта. В обоих случаях, можно предположить, что эти спектральные изменения вызваны повышенным сродством НМGB2 к платинированной ДНК в сравнении с белком НМGB1.

В свою очередь, поведение белковых полос в спектрах КД комплексов с обоими белками, указывает на отсутствие структуризации белковой молекулы, характерной для связывания НМGB-домена с нативной ДНК [8,10]. Структуризация НМGB-домена при взаимодействии с ДНК вызвана возмущениями в структуре двойной спирали и обусловлена в первую очередь энергетическими соображениями. ДНК-платиновый аддукт представляет собой стерически удобный участок для посадки белковой молекулы и не требует дальнейшей реорганизации ее структуры. Меньшая структурная упорядоченность белковой молекулы ведет к ее большей подвижности и доступности для межмолекулярных взаимодействий. Такое поведение стимулирует формирование крупных надмолекулярных комплексов, особенно хорошо заметных в комплексах с белком НМGB2.

Литература

1. Jamieson, E.R. Structure, recognition and processing of cisplatin-DNA adducts / E.R. Jamieson, S.J. Lippard // *Chem. Rev.* - 1999.- V. 99.- P. 2467-2498
2. Wang, D. Cellular processing of platinum anticancer drugs / D. Wang, S.J. Lippard // *Nat. Rev. Drug Discov.* - 2005. -V. 4. - P. 307-320
3. Cohen, S.M. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy / S.M. Cohen, S.J. Lippard // *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* - 2001. - V. 67. - P. 93-130
4. Reedijk, J. New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA / J. Reedijk // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* - 2003. V. 100. - P. 3611-3616.
5. Cisplatin resistance and transcription factors / T. Torigoe, H. Izumi, H. Ishiguchi et al. // *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.* - 2005. - V. 5. - P. 15-27
6. Wei, M. M. Effects of spectator ligands on the specific recognition of intrastrand platinum-DNA cross-links by high mobility group box and TATA-binding proteins / Wei, S.M. Cohen, A.P. Silverman et al. // *J. Biol. Chem.* - 2001. - V. 276. - P. 38774-38780
7. Travers, A. Chromosomal HMG-box proteins / A. Travers, J.O. Thomas, Eds.: J. Zlatanova, S.H. Leuba // In: *Chromatin structure and dynamics: State-of-the-Art.* New York: Elsevier B.V.- 2004.- P. 103-126
8. НМGB1-домены: заложники обстоятельств / Е. Чихиржина, А. Поляничко, А. Скворцов и др. // *Мол. Биология.* - 2002. - Т. 36. - №3. - С. 523-531
9. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* - 1970. - V. 227. - P. 680-685.
10. Структурная организация комплексов ДНК с белками НМGB1 и НМGB1-(А+В) / А. Поляничко, З. Леоненко, Д. Крамб и др. // *Биофизика.*- 2008.- Т. 53.- №3.- С. 407-416

УДК 577.322.7, 577.323.7, 535.56, 543.422.8

THE INFLUENCE OF CIS-ISOMER OF DIAMMINEDICHLOROPLATINUM(II) ON THE INTERACTION OF DNA HMGB1 AND HMGB2 PROTEINS

Polyanichko A.M.^{1,2}, Chikhirzhina E.V.¹, Vorobyev V.I.¹

¹*Institute of Cytology Russian Academy of Sciences
Tikhoretsky ave. 4, Saint-Petersburg, 194064, Russian Federation.
Email: chikhir@gmail.com tel: (812)-297-37-40*

²*Saint-Petersburg State University
Physical Faculty of Saint Petersburg State University, 1 Ulyanovskaya st., Stary Petergoff, Saint-Petersburg, 198904, Russian Federation.
Email: polyanichko@gmail.com tel: (812)-428-4388*

The interaction of DNA, modified with anti-tumor drug cisplatin, with chromatin proteins was studied using UV absorption and circular dichroism spectroscopy. We have shown that the interaction of HMGB1 protein with DNA-Pt adduct results in no detectable changes in DNA secondary structure. HMGB2 protein in contrast interacts with both adducts and non modified regions in DNA, resulting in considerable changes in CD spectra of the complexes. The difference between these two proteins might be explained by their different affinity to the platinum adducts on DNA.

Key words: nonhistone chromosomal proteins HMGB1 and HMGB2, DNA, circular dichroism, cisplatin.

Сведения об авторах

№№	Ф.И.О.	Должность и место работы	Телефон рабочий E-mail
1	Поляничко Александр Михайлович	Доцент Санкт-Петербургского государственного университета, Физический факультет	Телефон рабочий: (812)428-43-88 E-mail: polyanichko@gmail.com
2.	Чихиржина Елена Всеволодовна	Старший научный сотрудник Института цитологии РАН	Телефон рабочий: (812)297-37-40 E-mail: chikhir@gmail.com
3.	Воробьев Владимир Иосифович	Главный научный сотрудник Института цитологии РАН	Телефон рабочий: (812)297-37-40 E-mail: vorobyev@mail.cytspb.rssi.ru

ИЗМЕНЕНИЯ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ НМGB-ДОМЕНА ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С ДНК*

Родионова Т.Ю.¹, Чихиржина Е.В.², Курилов Р.В.¹, Скворцова Е.В.²,
Поляничко А.М.^{1,2}

1 Санкт-Петербургский государственный университет

198904, Санкт-Петербург. Старый Петергоф, ул. Ульяновская, д.1. Физический факультет.

Email: tatirod9@gmail.com тел:(812)-428-43-88

2 Институт цитологии РАН

194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. 4

Email: polyanichko@gmail.com тел:(812)-297-37-40

Методами кругового дихроизма, гель-ретардации и спектрофотометрического плавления изучалось взаимодействие негистонового хромосомного белка НМGB1 с высокомолекулярной ДНК. В ходе исследования показано, что при взаимодействии с ДНК степень альфа-спиральности связанного белка увеличивается примерно на 30 % по сравнению с его свободным состоянием. Несмотря на значительную деформацию двойной спирали ДНК в месте связывания НМGB1, температура плавления ДНК в комплексе увеличивается с ростом количества белка в комплексе.

Ключевые слова: НМGB1, ДНК-белковые взаимодействия, структура хроматина.

За последние годы изучено большое число белков, не имеющих определенной структуры в нативном состоянии, но способных структурироваться при связывании со специфическим лигандом. Среди таких белков есть белки, выполняющие как архитектурные, так и регуляторные функции в хроматине, в т.ч. гистон Н1 и негистоновые белки семейства НМG [1]. Наиболее распространённый представитель семейства – негистоновый белок НМGB1, присутствующий в клетках всех эукариот в значительных количествах [2].

Белок НМGB1 и сходный с ним НМGB2 локализованы как в ядре, так и в цитоплазме клетки. Наибольшее количество белка обнаружено в активно делящихся клетках. Установлено также, что после дифференциации его концентрация уменьшается [3]. Эти два белка схожи по строению и отличаются только длиной С-концевого участка: НМGB1 (≈ 30 аминокислотных остатков), НМGB2 (≈ 20 аминокислотных остатков) [2]. Несмотря на большое число экспериментальных данных, литературные данные о пространственной структуре белка несколько разнятся. С помощью метода ЯМР отдельных ДНК-связывающих доменов белка НМGB1 [4] было установлено, что процент α -спиральных участков в молекуле превышает 80%. Однако, анализ термодинамических характеристик [5] показал, что белок имеет ярко выраженную вто-

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 09-08-01119) и Комитета по науке и высшей школе Администрации г. Санкт-Петербурга, Программы "Ведущие научные школы России" (грант НШ-1961.2008.4).

ричную структуру лишь при температурах меньших $+5^{\circ}\text{C}$, а при физиологических условиях в значительной мере неупорядочен.

Несмотря на обилие экспериментальных данных, биологическая роль белков остается до конца не выясненной. Есть основания полагать, что белки принимают участие в формировании структуры хроматина [2], а также выполняют целый ряд регуляторных функций [6, 7, 8]. На сегодняшний день является общепризнанной архитектурная роль НМGB1, однако пока нет однозначного объяснения механизмов, лежащих в основе многообразия выполняемых этим белком функций. Мы предполагаем, что в зависимости от мишени связывания, НМGB1 может по-разному изменять свою структуру, и, следовательно, ДНК-связывающие свойства.

В качестве первичного метода анализа комплексов ДНК-НМGB1 был выбран метод гель-ретардации. В работе были использованы белки, выделенные из тимуса теленка путем экстракции 5% хлорной кислотой с последующим осаждением белков из раствора, подкисленного ацетоном при -20°C . Для проведения гель-ретардации ДНК-белковых комплексов при увеличении весового соотношения белок/ДНК r в растворе использован плазмидный вектор рUC19. Выделение рUC19 из бактериальных клеток осуществлялось по стандартной методике методом щелочного лизиса.

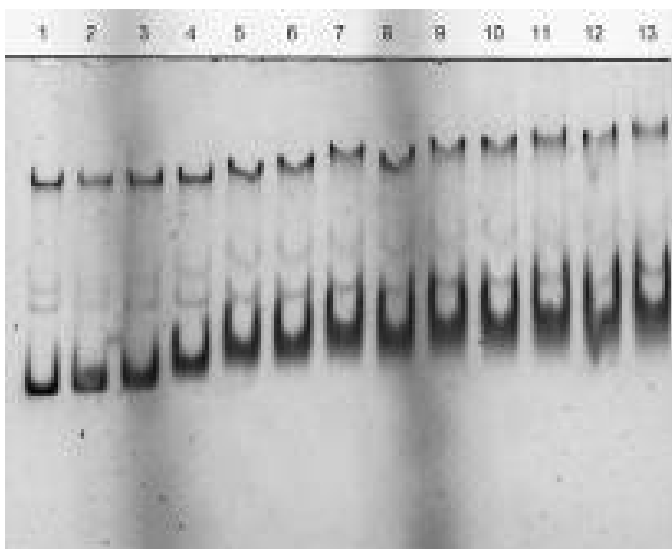


Рис. 1. Гель-ретардация комплексов рUC19-НМGB1. 1- рUC19, 2-13 рUC19-НМGB1 с шагом по $r = 0.05$.

Благодаря одновременному присутствию в растворе линейной, релаксированной и суперскрученной форм, плазмидная ДНК является очень удобной моделью для изучения ДНК-связывающих свойств НМGB1. Данные гель-ретардации комплексов рUC19-НМGB1 представлены на рис. 1. Анализ электрофоретической подвижности ДНК-белковых комплексов для разных форм плазмидной ДНК показал, что НМGB1 избирательно связывается с суперскрученной формой ДНК. Электрофоретическая подвижность комплекса при $r > 0,3$ (7 до-

рожка) практически перестает изменяться, что может свидетельствовать о прекращении процесса связывания НМGB1 с ДНК. В таком случае, можно примерно оценить участок связывания 60 - 80 п.о. ДНК на молекулу белка, что соответствует $r = 0,3$.

Изменения вторичной структуры комплекса ДНК-НМGB1 изучались с помощью метода кругового дихроизма (КД) в УФ области. В работе использовали высокомолекулярную ДНК тимуса теленка (Type II, Sigma). Измерения проводили на дихрографе Mark V (Jobin Ivon, Франция) в кварцевых кюветах с дли-

ной оптического пути 5 мм. Были получены серии спектров КД комплексов ДНК-НМGB1 в разных ионных силах (0,03-150 мМ NaCl) при постепенном

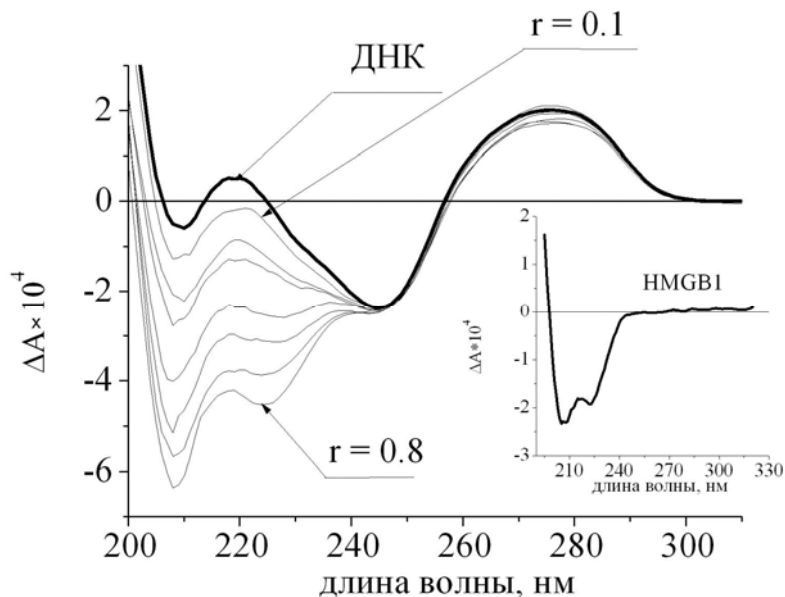


Рис. 2. Спектры КД ДНК-НМGB1 при $0 < r < 0,8$ с шагом 0,1 в растворе 25 мМ NaCl.

увеличении весового соотношения белок/ДНК r в пробе от $r = 0$ до $r = 0,8$ с шагом 0,1 (рис. 2). Анализ системы проводился в двух спектральных диапазонах: в области положительного максимума КД ДНК и отсутствия полос КД НМGB1 (в области 270 нм), и в белковой части спектра (210-240 нм). Изменения в спектре в окрестности 270 нм минимальны, что свидетельствует о незначительных возмущениях электронной структуры оснований ДНК. Для удобства анализа малых структурных изменений ДНК в ходе комплексообразования была построена зависимость КД ДНК на длине волны 270 нм ($КД_{270}$) от r (данные не приводятся). При малом содержании белка в пробе ($r \sim 0,1$) происходит заметное увеличение интенсивности КД ДНК, последующее увеличение содержания белка в пробе не вызывает дальнейших изменений интенсивности КД (все изменения лежат в пределах погрешности измерений).

Анализ в белковой части спектра (210-240 нм) несколько затруднен из-за перекрывания полос КД ДНК и белка. Однако, на длине волны 222 нм, где лежит характеристический минимум α -спирали, КД ДНК близок к нулю. Учитывая свойство аддитивности спектра КД ДНК и наличие малых изменений в области 270 нм, мы можем вклад ДНК вычесть из общего спектра. На длине волны 222 нм были построены зависимости молярной эллиптичности для НМGB1 в свободном состоянии и НМGB1 в присутствии ДНК (рис. 3). На зависимостях отчетливо видно, что при малых значениях r молярная эллиптичность белка в комплексе достигает минимальных значений. С ростом содержания белка в комплексе наблюдается увеличение молярной эллиптичности, которое прекращается к $r = 0,4$. При дальнейшем добавлении белка до $r = 0,8$ молярная эллиптичность комплекса остаётся неизменной, достигая предельного значения на уровне $[\Theta] = -9000$ (град·см²/моль), что примерно в 1,4 раза превосходит молярную эллиптичность свободного белка. Таким образом, при связывании молекулы НМGB1 с ДНК наблюдаются регистрируемые изменения вторичной структуры белка НМGB1 в области $r < 0,3$.

увеличения весового соотношения

белок/ДНК r в пробе от $r = 0$ до $r = 0,8$ с шагом 0,1 (рис. 2).

Анализ системы проводился в двух спектральных диапазонах: в области положительного максимума КД ДНК и отсутствия полос КД НМGB1 (в области 270 нм), и в белковой части спектра (210-240 нм).

Изменения в спектре в окрестности 270 нм минимальны, что свидетельствует о незначительных

При малых соотношениях r , в условиях избытка мест связывания на ДНК, белок преимущественно находится в связанном состоянии. В ходе дальнейшего титрования раствором белка, мест связывания на ДНК становится все меньше, и в растворе начинает преобладать фракция белка свободного, что и связано с ростом молярной эллиптичности при увеличении содержания белка в пробе.

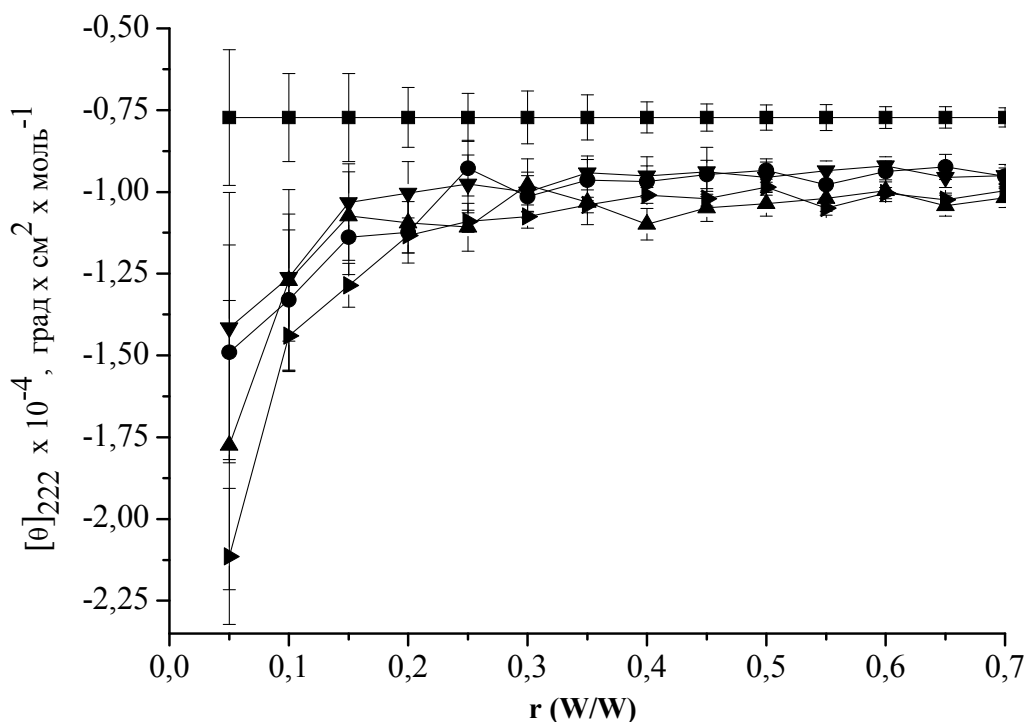


Рис. 3. Зависимость молярной эллиптичности НМГВ1 в свободном состоянии (■) и в комплексе от r в растворах разных ионных сил.

Для оценки термостабильности ДНК в комплексах в области малых значений $r < 0,2$ использовался метод спектрофотометрического плавления, основанный на росте поглощения ДНК при денатурации. Чтобы свести влияние ионной силы к минимуму, кроме выше описанных систем, была исследована серия в 0,25мМ ЭДТА. В рамках каждой серии было проведено исследование зависимости сдвига температуры плавления при увеличении весового соотношения белок/ДНК в пробе. Температура плавления определялась как точка максимума первой производной от S-образной функции, описывающей процесс плавления. Зависимость температуры плавления от r представлена на рисунке 4. При увеличении концентрации белка в пробе наблюдается смещение температуры плавления в область высоких температур, что свидетельствует о том, что при связывании НМГВ1 стабилизирует ДНК. Этот результат представляет большой интерес, ведь в ходе взаимодействия белок сильно изгибает двойную спираль ДНК в месте связывания, и стоило бы ожидать уменьшения стабильности ДНК. Возможно, добавление белка в пробу вызывает процесс компактизации молекулы ДНК, ведущий к образованию более устойчивых структур.

Согласно полученным данным, белок HMGB1 способен изменять свою структуру в ходе комплексообразования с ДНК, что выражается в увеличении в 1,4 раза молярной эллиптичности белка в присутствии ДНК по сравнению по сравнению с белком в свободном состоянии. Максимальные изменения моляр-

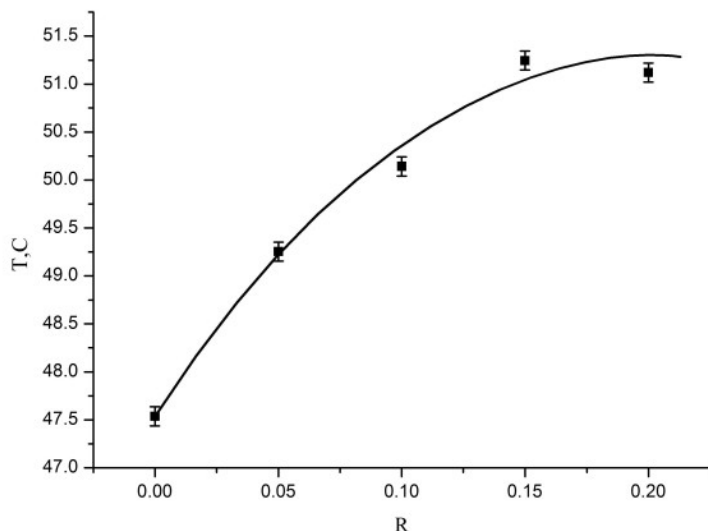


Рис. 4. Зависимость температуры плавления ДНК от r в комплексе с белком в 0,25 мМ ЭДТА.

ной эллиптичности, и следовательно, средней степени α -спиральности белка в растворе, приходится на диапазон значений $r < 0,2$. Это изменение структуры HMGB1 может служить индикатором процесса связывания HMGB1 с ДНК, которое заканчивается примерно к $r = 0,4$ (80-100 п.о. на молекулу белка). Способность белка структурироваться в ходе взаимодействия может лежать в основе многообразия функций белка HMGB1, выполняемых им в клетке.

Литература

1. Uversky, V.N. Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics / V.N. Uversky // Protein Science.- 2002.- V. 11.- P. 739.
2. Bustin, M. High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function / M. Bustin, R. Reeves // Proc. Nat. Acad. Sci.- 1996.- V. 54.- P. 35-100.
3. Tissue specificity of nucleocytoplasmic distribution of HMG1 and HMG2 proteins and their probable functions / M.I. Mosevitsky, V.A. Novitskaya, M.G. Iogannsen et al. // Eur. J. Biochem.- 1989.- V. 185.- P. 303-310.
4. Solution structure of a DNA-binding domain from HMG-1 / C.M. Read, P.D. Cary, C. Crane-Robinson et al. // Nucl. Acids Res.- 1993.- V. 21.- P. 3427-3436.
5. Watson, M. Mapping Intramolecular Interaction between Domains in HMGB1 using Tail-truncation / M. Watson, K. Stott, J.O. Thomas // Approach. J. Mol. Biol.- 2007.- V. 374.- P. 1286-1297.
6. Travers, A. Chromosomal HMG-box proteins / A. Travers, J.O. Thomas, Eds.: J. Zlatanova, S.H. Leuba // In: Chromatin structure and dynamics: State-of-the-Art. New York: Elsevier B.V.- 2004.- P. 103-126.
7. Teo, S.-H. Two mutations in the HMGB-box with very different structural consequences provide insights into the nature of binding to four-way junction DNA / S.-H. Teo, K.D. Grasser, C.H. Hardman et al. // EMBO J.- 1995.- V. 14.- P. 3844-3853.
8. Grosschedl, R. HMG domain proteins: architectural elements in assembly nucleoprotein structures / R. Grosschedl, K. Giese, J. Pagel // Trends Genet.- 1994.- V. 10.- P. 94-100.

CHANGES IN THE SECONDARY STRUCTURE OF HMGB-MOTIV DURING BINDING WITH DNA

Rodionova T.U.¹, Chikhirzhina E.V.², Kurilov R.V.¹, Skvortsova E.V.²,
Polyanichko A.M.^{1,2}

1Saint-Petersburg State University

Physical Faculty of Saint Petersburg State University, 1 Ulyanovskaya st., Stary Petergoff, Saint-Petersburg, 198904, Russian Federation.

Email: tatirod9@gmail.com tel: (812)428-4388

2Institute of Cytology Russian Academy of Sciences

Tikhoretsky ave. 4, Saint-Petersburg, 194064, Russian Federation.

Email: polyanichko@gmail.com tel: (812)297-37-40

Using circular dichroism spectroscopy and DNA melting analysis we have studied the interaction of non-histone chromosomal protein HMGB1 with high-molecular weight DNA. We have shown, that the degree of the alpha-helicity of the bound HMGB1 is approximately 30 % higher than the alpha-helicity of free HMGB1. We have also demonstrated that despite of strong DNA-bending properties of HMGB1 its binding to DNA results in increase of the double helix thermostability.

Key words: HMGB1, DNA-protein interaction, chromatin structure.

Сведения об авторах

№№	Ф.И.О. всех авторов полностью	Должность и место работы	Телефон рабочий E-mail
1	Родионова Татьяна Юрьевна	Студент Санкт-Петербургского государственного университета, Физический факультет	Телефон рабочий: (812)428-43-88 E-mail: tatirod9@gmail.com
2.	Чихиржина Елена Всеволодовна	Старший научный сотрудник Института цитологии РАН	Телефон рабочий: (812)297-37-40 E-mail: chikhir@gmail.com
3.	Курилов Роман Владимирович	Студент Санкт-Петербургского государственного университета, Физический факультет	Телефон рабочий: (812)428-43-88
4.	Скворцова Елена Вячеславовна	Старший лаборант-исследователь Института цитологии РАН	Телефон рабочий: (812)297-37-40 E-mail: evavdeeva@mail.ru
5.	Поляничко Александр Михайлович	Доцент Санкт-Петербургского государственного университета, Физический факультет	Телефон рабочий: (812)428-43-88 E-mail: polyanichko@gmail.com

НАДМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ДНК С «ЛИНКЕРНЫМИ» БЕЛКАМИ ХРОМАТИНА *

Е.В. Чихиржина^{1*}, А.М. Поляничко^{1,2*}, Е.И. Костылева¹, В.И. Воробьев¹

¹Институт цитологии РАН

194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. 4

E-mail: chikhir@gmail.com; тел.: (812)-297-37-40

² Санкт-Петербургский государственный университет

198504, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, Ульяновская ул., д. 1, Физический факультет

E-mail: polyanichko@gmail.com; тел.: (812)-428-43-88

*Авторы внесли равный вклад при подготовке работы.

В работе рассматривается структурная организация хроматина. Обсуждается роль хромосомных белков в упаковке ДНК в ядре. Рассматривается вопрос о смене белкового состава хроматина в процессе сперматогенеза при формировании генетически неактивного ядра с высокой степенью компактизации ДНК. Особое внимание уделено линкерному гистону H1 и негистоновым ядерным белкам семейства HMGB.

Ключевые слова: ДНК, белки хроматина, линкерный гистон H1, негистоновый хромосомный белок HMGB1, структура хроматина, надмолекулярные комплексы.

ДНК в ядре эукариотической клетки находится в виде сложного нуклеопротеидного комплекса – хроматина, который составляет основу хромосомы. Размер молекулы ДНК во много раз превышает не только размер клеточного ядра, но и размер каждой хромосомы. Следовательно, укладка двойной спирали в ядре невозможна без компактизации молекулы. Нуклеопротеидный комплекс в ядрах эукариотических клеток образуется при взаимодействии ДНК с белками основного характера – гистонами [1]. От других белков гистоны отличаются высоким содержанием основных (лизин, аргинин, гистидин) и гидрофобных аминокислот. По молекулярному весу и по аминокислотному составу различают пять фракций гистонов: H1, H2A, H2B, H3 и H4. Кроме того, гистоны отличаются отсутствием триптофана и почти полным отсутствием цистеина (только гистон H3 имеет два цистеиновых остатка). Молекулы всех гистонов содержат большое количество пролина.

Нуклеосома, первый уровень укладки ДНК, состоит из глобулярной белковой частицы, вокруг которой закручена ДНК (146 пар нуклеотидов). Белковая сердцевина (коровая частица) представляет собой комплекс из гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Их глобулярные участки ассоциируют друг с другом с образованием гетеродимеров H2A-H2B и H3-H4, а затем гистонового октамера, содержащего по две молекулы каждого из четырех гистонов. Состав и размер этого

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№№ 07-04-01072, 09-08-01119), Комитета по науке и высшей школе Администрации г. Санкт-Петербурга, Программы "Ведущие научные школы России" (грант НШ-1961.2008.4).

комплекса, так называемой минимальной нуклеосомы, одинаковы в клетках всех эукариот.

Следующим после нуклеосом уровнем компактизации ДНК является образование фибриллы диаметром 30-нм. Структурной единицей фибриллы является хроматосома, состоящая из гистонового октамера и одной молекулы гистона H1, которые связаны с 168 п.н. ДНК. В свою очередь 30 нм фибрилла организована в петельные домены. Эти структуры представляют собой петли, фиксированные ядерным остовом белковой природы. Впервые такая структура была обнаружена при исследовании митотических хромосом после удаления большинства белков, когда отчетливо видны петли ДНК. В этом случае хромосома представляет собой белковый остов (ядерный матрикс), окруженный ореолом ДНК. Что происходит с фибриллами далее пока неясно. Некоторые авторы предполагают, что дальнейшая укладка фибриллы приводит к образованию метафазных хромосом. 30 нм фибриллы складываются в 60-80 нм фибриллы, которые могут скручиваться в структуры размером 100-130 нм. Другие авторы считают, что организованные таким образом метафазные хромосомы существовать не могут. С определенностью можно утверждать лишь, что организация хроматина в 30 нм фибриллу не является конечной.

В состав полной нуклеосомы входит линкерный участок ДНК, связанный с пятым лизин-богатым гистоном H1 (у птиц это гистон H5) [1,2,3]. Этот гистон отличается более высокой молекулярной массой и меньшей эволюционной консервативностью. Дальнейшая укладка ДНК происходит в результате сворачивания нуклеосомной цепочки в наднуклеосомные структуры более высокой организации. Полная нуклеосома в хроматине различных видов отличается как по длине линкерной ДНК, так и по структуре гистона H1. Этот белок отличается от других гистонов большей длиной, видо- и ткане-специфичностью. Особенно ярко это проявляется в сперматогенных клетках. В процессе сперматогенеза клетки претерпевают различные физические и биохимические изменения. Хроматин в ядрах этих клеток транскрипционно неактивен, а ДНК упакована очень плотно. Все разнообразие изменений в составе основных белков в хроматине таких клеток может быть сведено к следующему. В ряде случаев (хроматин морских беспозвоночных) гистон H1 замещается на спермий-специфические варианты. В хроматине спермиев голотурий и моллюсков появляются дополнительные основные S-белки, характеризующиеся повышенным содержанием аргинина, лизина, серина и аланина. В клетках амфибий и насекомых обнаружены тиопротамины с высоким содержанием аргинина. А у млекопитающих гистон H1 полностью замещается на протамины.

Следует отметить, что при замене гистонов на протамины или промежуточные белки нуклеосомная структура разрушается. А в хроматине некоторых морских беспозвоночных, где появляются спермий-специфические варианты, гистоны нуклеосомы сохраняются. Поскольку такие гистоны отличаются от соматического гистона H1 более длинной полипептидной цепью и в них показано повышенное содержание аргинина, который способен к более сильным взаимодействиям с ДНК за счет образования водородных связей с остатками

фосфорной кислоты, можно предположить, что и взаимодействие этих белков с ДНК, а следовательно и ее укладка, будут отличны от связывания ДНК с соматическими гистонами H1 [4]. Это наглядно было показано при физико-химическом исследовании комплексов ДНК со сперминными гистонами семейства H1.

Эти белки способны изменять конформацию ДНК. Несмотря на то, что при связывании ДНК с гистонами H1 В-форма двойной спирали ДНК сохраняется, взаимодействие с лизин-богатыми гистонами приводит к некоторому нарушению канонической В-формы двойной спирали. Например, появление глубокой отрицательной полосы в спектрах кругового дихроизма объясняется возникновением так называемой ψ -формы ДНК (ψ -форма - полимер-соль индуцированная форма). Гистоны, выделенные из спермиев морского ежа и морской звезды, с ДНК связываются кооперативно. Гистон H1 спермиев моллюска, обладая наибольшей способностью образовывать левоспиральные структуры и наименьшей - α -спиральные участки [3], при взаимодействии с ДНК формирует комплексы, не образующие высокоупорядоченные специфические структуры [4]. Возможно, для появления последних существенным является взаимодействие гидрофобных кластеров на поверхности α -спиральных участков, способствующих регулярной ассоциации комплексов. В гистонах H1 хроматина спермиев морской звезды и морского ежа таких структур больше, чем в других гистонах [3], и это может объяснить более выраженную способность их комплексов с ДНК формировать компактные структуры [4].

В клеточном ядре ДНК связана не только с гистонами, но и с другими, негистоновыми белками. Сейчас достоверно известно, что роль хроматиновой фибриллы не ограничивается упаковкой ДНК в ядре. Ей отводится также роль в обеспечении доступности специфических последовательностей к регуляторным факторам и в обеспечении потенциального взаимодействия между расположенными на расстоянии друг от друга регуляторными элементами. Большинство клеточных процессов с участием ДНК должны рассматриваться в контексте с хроматином. И негистоновые белки, которые являются частью хроматиновой фибриллы, обеспечивают дополнительный уровень структурного и функционального единства. Эти белки составляют большое семейство белков с высокой электрофоретической подвижностью (*High Mobility Group*) [5,6].

По способу связывания с ДНК белки этого семейства разделены на три группы [7]: HMGA, HMGB и HMGN. HMGB-доменные белки (HMGB-Box) имеют в своем составе структурно консервативный домен, гомологичный ДНК-связывающему домену белка HMGB1. С ДНК такие белки связываются только за счет этих глобулярных доменов. Ко второй группе относятся белки HMGN, которые связаны непосредственно с нуклеосомой, облегчают транскрипцию, но не входят в состав транскрипционного комплекса. Белки третьей группы HMGA модифицируют структуру ДНК таким образом, чтобы облегчить белок-белковые взаимодействия в преинициативном комплексе, образованном в АТ-богатых последовательностях отдельных генов.

Наиболее распространенными являются HMGB-доменные белки. С линкерной ДНК помимо гистона H1 связан негистоновый хромосомный белок HMGB1 и гомологичный ему (на 80%) HMGB2. Белок HMGB1 состоит из двух ДНК-связывающих доменов, соединенных коротким линкером и длинного неупорядоченного С-концевого участка. Последний образован непрерывной последовательностью из 30 аминокислотных остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот. Во многих регуляторных факторах обнаружены участки, гомологичные структурно-консервативному HMGB1-домену [5,6]. HMGB-доменные белки могут иметь как один, так и несколько таких сегментов: LEF-1 (Lymphoid Enhancer-binding Factor-1), SRY (Sex Reversal Y chromosome-encoded factor), UBF (Upstream Binding Factor, транскрипционный фактор РНК-полимеразы I) и TCF-1 (T lymphocyte-specific transcription factor-1). А в транскрипционном факторе hUBF (human Upstream Binding Factor) РНК полимеразы I, присутствуют две субъединицы, каждая из которых содержит по шесть HMGB-доменов. Белок HMGB1 при связывании с ДНК сильно изгибает двойную спираль. Кроме того известно, что этот белок (так же как и гистон H1) узнает и предпочитает связываться с участками ДНК, обладающими различными структурными нарушениями. Ярким примером могут служить платиновые аддукты, образованные на ДНК при ее взаимодействии с цис-платином (успешно применяемый сегодня противоопухолевый препарат) [8-11].

Ранее нами было проведено исследование структурных изменений двойной спирали при взаимодействии ДНК с интактной молекулой HMGB1 и с рекомбинантным белком HMGB1-(A+B) [12,14-15]. Рекомбинантный белок отличается от HMGB1 отсутствием отрицательно заряженного С-концевого фрагмента, т.е. он состоит только из двух ДНК-связывающих доменов. Методом АСМ в сочетании со спектральными методами показано, что лишенный С-концевого домена рекомбинантный белок HMGB1-(A+B) образует с ДНК комплексы, обладающие высокой степенью упорядоченности с аномально высокой оптической активностью. Полученные данные свидетельствуют о том, что неструктурированный С-концевой домен молекулы HMGB1 может выполнять в хроматине функцию регулятора ДНК-белковых взаимодействий. В его отсутствии HMGB-домены, действуя совместно, формируют компактную упорядоченную структуру, в которой нарушения в укладке ДНК носят строго регулярный характер.

Гистон H1 и белок HMGB1 играют ключевую роль в функционировании хроматина. Линкерный гистон H1, взаимодействуя с ДНК, определяет характер конденсации хроматина в клетке. Негистоновый хромосомный белок HMGB1 в настоящее время рассматривается как "архитектурный" фактор транскрипции, осуществляющий свои функции путем сборки на ДНК транскрипционно активного многокомпонентного белкового комплекса [2,5,16]. Оба этих белка способны осуществлять эффективную трансфекцию чужеродного генетического материала в клетки млекопитающих в отсутствие каких бы то ни было нефизиологических добавок [17,18].

Белки H1 и HMGB1 располагаются в межнуклеосомных участках хроматина. На сегодня нет четкого представления о взаимоотношениях этих двух белков в хроматине. Некоторые авторы предполагают конкуренцию между этими белками за связывание с отдельными участками ДНК, тогда как другие указывают на признаки их кооперативного связывания с ДНК. HMGB1 может конкурировать с гистоном H1 за связывание с отдельными участками хроматина. В то время как гистон H1 является репрессором транскрипции, белок HMGB1 (как и гомологичный ему белок HMGB2) может служить стимулирующим транскрипцию фактором [19,20]. Существует гипотеза, согласно которой гистон H1 и белок HMGB1 одновременно связываются с ДНК [21]. С одной стороны оба белка взаимодействуют с линкерным участком ДНК, с другой стороны H1 располагается по большой бороздке двойной спирали, а HMGB1 – в малой [2,6], и, при одновременном связывании с ДНК, они сходным образом изменяют структуру ДНК и тем самым облегчают друг другу связывание с ней.

По данным, полученным нами [12,13,15], HMGB1 и гистон H1 скорее действуют сообща. При одновременном присутствии в комплексе с ДНК, гистон H1 взаимодействует преимущественно с фосфатными группами ДНК, частично экранируя их заряд, чем облегчает связывание HMGB1 с основаниями ДНК в малой бороздке.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чихиржина, Е.В. Линкерные гистоны: конформационные превращения и роль в организации структуры хроматина / Е.В. Чихиржина, В.И. Воробьев // Цитология.– 2002.– Т. 44.– №8.– С. 721-736
2. Jerzmanowski, A. The linker histones / A. Jerzmanowski, Eds.: J. Zlatanova, S. H. Leuba // In: Chromatin structure and dynamics: State-of-the-Art. New York: Elsevier B.V., 2004.- P. 75–102
3. Рамм, Е.И. Конформационные особенности линкерных белков суперкомпактного хроматина спермиев морских беспозвоночных / Е.И. Рамм, Е.В. Чихиржина, Е.И. Костылева и др. // Биохимия.- 1995.- Т. 60.- №1.- С. 150-158.
4. Исследование компактизации хроматина с использованием модельной системы ДНК-белковых комплексов / Е.В. Чихиржина, Е.И. Костылева, Е.И. Рамм и др. // Цитология.- 1998.- Т. 40.- №10.- С. 883-888
5. Bustin, M. High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function / M. Bustin, R. Reeves // Proc. Nat. Acad. Sci.- 1996.- V. 54.- P. 35-100
6. Travers, A. Chromosomal HMG-box proteins / A. Travers, J.O. Thomas, Eds.: J. Zlatanova, S.H. Leuba // In: Chromatin structure and dynamics: State-of-the-Art. New York: Elsevier B.V.- 2004.- P. 103-126
7. Bustin, M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the High-Mobility-Group chromosomal proteins / M. Bustin // Mol. Cell Biol.- 1999.– V. 19.– P. 5237-5246
8. Jamieson, E.R. Structure, recognition and processing of cisplatin-DNA adducts / E.R. Jamieson, S.J. Lippard // Chem. Rev.- 1999.– V. 99.- 2467-2498
9. Structural and kinetic studies of a cisplatin-modified DNA icosamer binding to HMGB1 domain B / E.R. Jamieson, M.P. Jacobson, C.M. Barnes et al. // J. Biol. Chem.- 1999.– V. 274.– P. 12346-12354
10. Cisplatin resistance and transcription factors / T. Torigoe, H. Izumi, H. Ishiguchi et al. // Curr. Med. Chem. Anticancer Agents. – 2005. – V. 5. – P. 15-27

11. Wang, D. Cellular processing of platinum anticancer drugs / D. Wang, S.J. Lippard // *Nat. Rev. Drug Discov.* - 2005. –V. 4. – P. 307-320
12. HMG-домены заложники обстоятельств / Е.В. Чихиржина, А.М. Поляничко, А.Н. Скворцов и др. // *Мол. биол.*- 2002.- Т. 36.- №3.- С. 525-531
13. Особенности структурной организации комплексов ДНК с белками HMGB1 и H1 / Е. Чихиржина, З. Леоненко, Х. Визер и др. // *Вестник СПбГУ. Сер. 4 (Физические науки и химия).*- 2007.- Вып. 1.- С. 32-38.
14. Структурная организация комплексов ДНК с белками HMGB1 и HMGB1-(A+B) / А. Поляничко, З. Леоненко, Д. Крамби др. // *Биофизика.*- 2008.- Т. 53.- №3.- С. 407-416
15. The HMG1 Ta(i)le. / А.М. Polyanychko, Е.У. Chikhirzhina, А.Н. Skvortsov et al. // *J. Biomol. Struct. Dyn.*- 2002.- V. 19.- P. 1053-1062
16. Thomas, J. HMG1 and 2, and related ‘architectural’ DNA-binding proteins / J. Thomas, A. Travers // *Trends Biochem. Sci.* - 2001. – V. 26. P. 167-174
17. Haberland, A. Histone H1-mediated transfection: serum inhibition can be overcome by Ca²⁺ ions / Haberland A., Knaus T., Zaitsev S. et al. // *Pharmaceutical Res.* - 2000. – V. 17. P. 229-235
18. An immunocytochemical visualization of transfected DNA in cultured cells / S. Zaitsev, I. Buchwalow, A. Haberland et al. // *Acta histochemica.* – 2000. – V. 102. – P. 49-55
19. Singh, J. High mobility group proteins 1 and 2 function as general class II transcription factors / J. Singh, G.H. Dixon // *Biochemistry.* – 1990. – V. 29. – P. 6295-6302
20. Stimulation of transcription in cultured cells by high mobility group protein 1: essential role of the acidic carboxyl-terminal region / S. Aizawa, H. Nishino, K. Saito et al. // *Biochemistry.* – 1994. –V. 33. – P. 14690-14695
21. Zlatanova, J. Linker histones versus HMG1/2: if struggle for dominance? / J. Zlatanova, K. van Holde // *BioEssays.* – 1998. - V. 20. - P. 584-588

УДК 577.322.7, 577.323.7, 535.56, 543.422.8

DNA SUPERMOLECULAR COMPLEXES WITH “LINKER” CHROMASOMAL PROTEINS

Chikhirzhina E.V.¹, Polyanychko A.M.^{1,2}, Kostyleva E.I.¹, Vorobyev V.I.¹

¹*Institute of Cytology Russian Academy of Sciences
Tikhoretsky ave. 4, Saint-Petersburg, 194064, Russian Federation.
Email: chikhir@gmail.com tel: (812)297-37-40*

²*Saint-Petersburg State University
Physical Faculty of Saint Petersburg State University, 1 Ulyanovskaya st., Stary Petergoff, Saint-
Petersburg, 198904, Russian Federation.
Email: polyanychko@gmail.com tel: (812)428-43-88*

The paper describes structural organization of chromatin. The role of chromatin proteins in DNA packing in the cell nuclei is discussed. The changes in protein content of chromatin upon the formation of genetically inactive nucleus is described. The special attention is paid to the linker histone H1 and HMGB non-histone proteins.

Key words: DNA, chromosomal proteins, chromosomal protein HMGB1, chromatin structure, supermolecular structures.

Сведения об авторах

№№	Ф.И.О.	Должность и место работы	Телефон рабочий E-mail
1	Чихиржина Елена Всеволодовна	Старший научный сотрудник Института цитологии РАН	Телефон рабочий: (812)2973740 E-mail: chikhir@gmail.com
2.	Поляничко Александр Михайлович	Доцент Санкт-Петербургского государственного университета, Физический факультет	Телефон рабочий: (812)4284388 E-mail: polyanychko@gmail.com
3.	Костылева Елена Ивановна	Научный сотрудник Института цитологии РАН	Телефон рабочий: (812)2973740
4.	Воробьев Владимир Иосифович	Главный научный сотрудник Института цитологии РАН	Телефон рабочий: (812)2973740 E-mail: vorobyev@mail.cytspb.rssi.ru

НАБУХАНИЕ И ФИЛЬТРАЦИЯ В БЕНТОНИТОВЫХ ГЛИНАХ*

Храмченков М.Г.¹, Федорин Р.П.¹

1 Казанский государственный университет

420008, Казань, ул. Кремлевская, 18. НИИ математики и механики

E-mail: maxim.Khramchenkov@ksu.ru тел: (843)2927524

Работа посвящена основным закономерностям термодинамики глин и фильтрации растворов в них. Особое внимание уделено анализу влияния набухания в некоторых типах глин (бентонитах) на фильтрацию растворов в них.

Введение. Глинистые горные породы давно и успешно изучаются методами минералогии, кристаллографии и других геолого-физических наук. Установлено, что особые свойства глин связаны с наличием в их составе особых минералов, называемых глинистыми. Частицы глинистых минералов различным образом «перемешаны» с частицами других минералов в составе глинистой породы. Необходимо сказать несколько слов о структуре частиц глинистых минералов. Они представляют собой тонкие листовые образования [1], обычно нескольких сотен нанометров по ширине и нескольких нанометров в высоту. Мы не будем останавливаться на структурно-кристаллохимических особенностях частиц глинистых минералов, поскольку по этому вопросу имеется обширная библиография. Заметим лишь, что, как правило, частицы глинистых минералов несут отрицательный электрический заряд из-за изоморфных замещений трехвалентных атомов в кристаллической решетке на двухвалентные. Возникший избыток отрицательного заряда компенсируется катионами, адсорбированными на поверхности частиц. Особо следует подчеркнуть важность представления о глинистых минералах и катионах, входящих в их состав, как о единой системе (понятие о едином ионно-гидратном слое), что подчеркивал в своих исследованиях М.В. Эйриш [2]. Для некоторых глинистых минералов катионы – компенсаторы избыточного отрицательного заряда решетки – могут взаимодействовать с молекулами воды и образовывать гидратные оболочки, удаляясь, таким образом, от поверхности частицы. При этом молекулы воды получают возможность проникать между частицами таких глинистых минералов, способствуя их раздвижению, что приводит к эффекту так называемого внутрикристаллического набухания. Глинистые минералы, обладающие подобным свойством, относятся к группе смектитов. Одним из минералов этой группы является монтмориллонит, о свойствах которого скажем более подробно.

Монтмориллонит – водный алюмомагниево-силикат натрия, калия, кальция и магния. Минеральный вид монтмориллонит входит, как уже отмечалось, в группу смектитов – минералов, обладающих внутрикристаллическим набуха-

* Грант МНТЦ №3590

нием. Диагностируются эти минералы по изменению параметров кристаллической решетки, устанавливаемому методом рентгеновского анализа при увлажнении препаратов глиномасс.

Монтмориллонит – наиболее высокодисперсный минерал в группе смектитов и среди глинистых минералов. В контакте с водой и некоторыми органическими жидкостями он осмотически набухает. В водных пастах и суспензиях идут химические реакции обмена катионов.

Специфические свойства монтмориллонита обусловлены особенностями его кристаллохимии и структуры частиц – кристаллитов и микроагрегатов. Кристаллохимическая структура монтмориллонита исследовалась методами рентгеновского анализа, электрографии, электронной микроскопии и микродифракции, а также методами резонансной спектроскопии – ПМР, ЯГР.

В соответствии с известными представлениями элементарной структурной единицей минерала монтмориллонит является трехэтажный диоктаэдрический силикатный слой, построенный путем сочленения трех сеток – внутренней октаэдрической и двух наружных тетраэдрических. В силикатном слое возникает отрицательный электрический заряд, прежде всего за счет гетеровалентного изоморфизма в октаэдрах (замещение трехвалентного алюминия на двухвалентный магний). Возможен также изоморфизм в тетраэдрах (бейделитовость, замещение четырехвалентного кремния на трехвалентный алюминий). Избыточный отрицательный заряд может дополнительно возникать за счет депротонизации гидроксильных групп. Заряд силикатных слоев компенсирует внеслоевые катионы натрия, калия, кальция и магния. Общее содержание внеслоевых катионов, обладающих способностью вступать в реакции обмена в водных глинистых пастах и суспензиях, характеризуется величиной обменной емкости (ОЕ) глины. Величина ОЕ в расчете на воздушно-сухую глину для большинства изученных монтмориллонитовых глин составляет $1,0 \pm 0,1$ мг-экв/г. Установлено, что при относительном давлении паров воздуха около 0,92 завершается формирование мономолекулярных сеток (слоев) воды на базальных поверхностях всех силикатных слоев. Количество воды при этой влажности воздуха для мономинеральной фракции монтмориллонита независимо от природы внеслоевых катионов составляет около 32% в расчете на сухую глину (или около 13 молекул воды в расчете на формальную единицу элементарной ячейки монтмориллонита). По механизму разворота тетраэдров выявлено, что кристаллическая структура силикатных слоев переходит в напряженное состояние с уменьшением влажности воздуха. Это позволяет объяснить нелинейное увеличение объема глины при поглощении воды.

Специфика кристаллохимии монтмориллонита предопределяет весьма малые размеры глинистых частиц (50 на 200 нм в плоскости а-в). Силикатные слои толщиной 0,95 нм отделены друг от друга гидратно-ионными прослоями и вместе формируют более крупные слоистые трехмерные частицы – кристаллиты и микроагрегаты. На всех структурных уровнях соединительными частицами служат гидратно-ионные прослои, предопределяющие порядок/беспорядок в наложении силикатных слоев (турбостратические структуры с разворотом си-

ликатных слоев друг относительно друга или с полным беспорядком в наложении смежных слоев). Методом мессбауэровской (ЯГР) спектроскопии выявлены [3, 4] подвижность микрочастиц в форме колебательных движений и их относительная доля в зависимости от степени увлажнения, замораживания, давления прессования. Мессбауэровский эффект безотдачного поглощения гамма-квантов ядрами Fe^{57} проявляется только в твердых телах, в системах взаимосвязанных частиц с критической массой $3 \cdot 10^{-17}$ г. Масса единичного силикатного слоя составляет $3 \cdot 10^{-18}$ г. Следовательно, при наличии в глине микрочастиц с массой больше и меньше критической вклад в величину мессбауэровского эффекта дают только крупные частицы. При увеличении влажности воздуха начинается уменьшение интенсивности гамма-сигнала, причем после прессования глинопорошка при давлении прессования 280 кг/см^2 значение интенсивности сигнала восстанавливалось и сохранялось даже при более высоких влажностях воздуха и глины, чем в порошках той же влажности, но без прессовки. Насыщение глинопорошков этиленгликолем дает только максимальный мессбауэровский эффект. Механизм, объясняющий специфику мессбауэровского эффекта в глинопорошках различной влажности, на наш взгляд, заключается во влиянии флуктуаций зарядовой плотности порового раствора ультрамикропор, образовавшегося за счет отдиссоциации части внеслоевых катионов при гидратации глины в парах воды, на колебания ядер Fe^{57} в решетке силикатного слоя. При влажностях, превышающих область внутрикристаллического набухания, на поверхности микрочастиц глины формируются многослойные гидратные оболочки. Образуются пластичные глиномассы и пасты. Весьма важно, что в набухом состоянии межслоевые катионы могут вступать в реакции обмена.

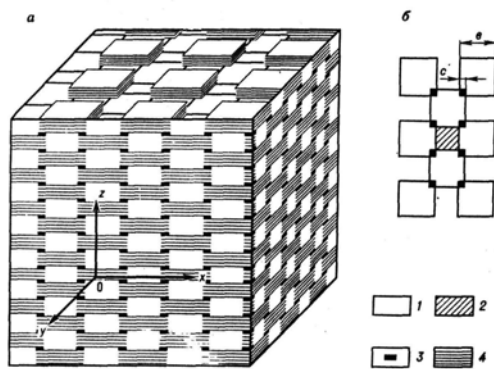


Рис. 1. Модель структуры глинистых пород по [1]

Сказанное выше позволяет схематизировать наши представления о структуре глинистых пород. Простейшая и в тоже время вполне адекватная схема структуры глинистых пород разработана Л. И. Кульчицким с соавторами (рис. 1). Здесь 1 – макропоры, 2 – несквозные макропоры, 3 – микропоры, 4 – микроагрегаты.

Важнейшей особенностью глинистых минералов является специфика их взаимодействия с водой и водными растворами. Для некоторых типов глинистых минералов это взаимодействие протекает настолько энергично, что в результате приводит к изменению межслоевого расстояния между глинистыми частицами (внутрикристаллическому набуханию) и существенному изменению энергетических характеристик решетки этих минералов. Минералы этого типа относятся к минералам с подвижной (лабильной) кристаллической решеткой (сметкитам), наиболее типичным представителем которых является монтмориллонит. В соответствии с известными представле-

ниями

ниями [2, 3], молекулы воды могут проникать между частицами монтмориллонита, формируя так называемый единый ионно-гидратный слой (рис. 2). Формирование такой структуры наступает уже на этапе кристаллизации минерала.

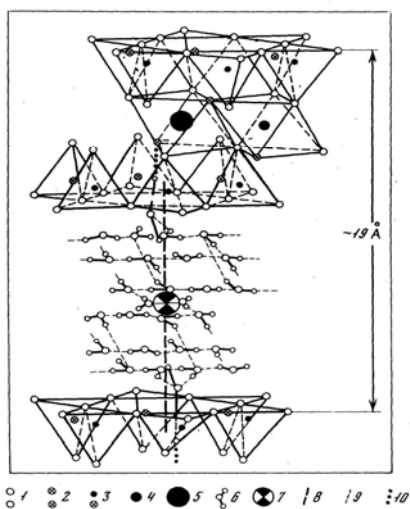


Рис. 2. Схема структуры монтмориллонита

Здесь 1 – кислород; 2 – гидроксил; 3 – кремний; 4 – алюминий или железо; 5 – магний; 6 – молекулы воды ионно-гидратного слоя; 7 – межслоевые катионы; 8 – электровалентная связь; 9 – водородная межмолекулярная связь; 10 – водородная гидроксильная связь.

Молекулы воды образуют три основных типа связи в составе единого ионно-гидратного слоя. Первый – гидроксильная связь донорно-акцепторного типа между водородом молекулы воды и кислородом октаэдрической сетки, несущим избыточный отрицательный заряд. Это сильно поляризованная растянутая молекула с наибольшей прочностью формируемой связи. Она служит «мостиком» между силикатным слоем и остальными молекулами воды гидратных слоев, в том числе и молекул воды гидратных оболочек катионов-компенсаторов. При этом формируются водородные связи со вторым водородом и кислородом этой молекулы воды.

Второй тип – координационные связи между молекулами воды и внеслоевыми катионами. Количество этой формы воды зависит от природы катиона и степени увлажнения глины. В результате гидратированные катионы оказываются смещенными в нормальном по отношению к базальной поверхности направлении (внутрикристаллическое набухание). Они дополнительно экранируются полярными молекулами воды, что резко ослабляет их связь с центром отрицательного заряда решетки. Высвободившаяся энергия перераспределяется через мостиковые молекулы воды на остальные молекулы воды ионно-гидратного слоя.

Третий тип – межмолекулярные водородные связи между молекулами воды ионно-гидратного слоя в нормальном направлении и в плоскости базальных поверхностей частиц монтмориллонита.

При относительном давлении паров воды в воздухе, равном 92%, завершается формирование мономолекулярных слоев молекул воды на базальных поверхностях частиц. Количество воды при этой влажности воздуха для мономеральной фракции монтмориллонита, независимо от природы внеслоевых катионов составляет 32% в расчете на сухую глину.

1. Особенности набухания глин. Выше было сказано о внутрикристаллическом набухании монтмориллонита как о сложном процессе, в котором участвуют как молекулы воды, так и внеслоевые катионы и атомы кристаллической решетки частиц монтмориллонита, в первую очередь ионы решетки, служащие причиной возникновения отрицательного заряда решетки в результате гетеровалентного изоморфизма. К таким ионам, прежде всего, относятся ионы железа. Повышенная химическая активность атомов железа как переходного элемента и его широкое распространение в местах кристаллизации монтмориллонита предопределяют вхождение ионов железа в структуру монтмориллонита, причем в общем случае возможен как изо-, так и гетеровалентный изоморфизм двух- и трехвалентного железа в октаэдрической сетке силикатного слоя, в котором эти ионы выполняют функции перераспределителей избыточного отрицательного заряда решетки минерала.

Методы мессбауэровской (ЯГР) спектроскопии дают важную информацию о внутрикристаллическом положении и состоянии ионов железа, что необходимо для выявления всех особенностей структуры минерала и понимания деталей процесса внутрикристаллического набухания. Этот метод позволяет выявить различную подвижность атомов в решетке и определять относительную долю таких атомов в составе глинистых частиц в зависимости от ряда условий.

Мессбауровский эффект безотдачного поглощения γ -квантов ядрами Fe^{57} проявляется только в твердых телах, в системах взаимосвязанных частиц с массой более $3 \cdot 10^{-17}$ г. При общем содержании ионов железа в монтмориллонитовых глинах более 1% количество ядер Fe^{57} достаточно для того, чтобы получать четкий сигнал. Традиционно [4] эффект постепенного ослабления интенсивности мессбауэровского эффекта в глинах в ходе их гидратации объясняют гидратацией частиц глины с массой, меньшей критической, за счет их вовлечение в тепловые колебания молекул воды гидратного слоя. Однако, на наш взгляд, такое утверждение требует дополнительных доказательств, поскольку эффект начинает проявляться при влажностях, при которых формирование единого (даже мономолекулярного) слоя еще не завершено, и поэтому говорить о бронировании даже мельчайших глинистых частиц представляется необоснованным. Более того, известно, что данный эффект исчезает, если глинопорошок набухает в парах этиленгликоля. Если бы наблюдаемый эффект объяснялся мобильностью мельчайших частиц в жидкой среде, то непонятно, почему проявление данного эффекта зависит от типа водной фазы. На наш взгляд, механизм этого эффекта

заключается в следующем. При гидратации монтмориллонита и формировании на базальных поверхностях ионно-гидратного слоя происходит отдиссоциация внеслоевых катионов. Переходя в состав слоя, катионы начинают участвовать в тепловых флуктуациях вместе с молекулами воды. Поскольку катионы представляют собой заряженные частицы, то речь фактически идет о тепловых флуктуациях электростатических сил в решетке кристалла. Таким образом, ядра Fe^{57} , участвуя в колебаниях кристаллической решетки вместе с другими атомами, начинают испытывать возмущающее действие стохастической природы за счет индуцированного воздействия со стороны отдиссоциированных внеслоевых катионов. Известно решение задачи о так называемом стохастическом разогреве классического маятника [5]. Из него следует, что колеблющаяся частица, испытывающая действие случайной силы, будет приобретать ненулевое дополнительное ускорение. Для частицы в поле волнового пакета (а это в простейшем случае модель иона Fe^{57} в решетке кристалла) это эквивалентно появлению диффузионной составляющей движения с коэффициентом диффузии, зависящим от параметров иона и волнового пакета. Таким образом, постепенная гидратация поверхности частиц монтмориллонита ведет ко все большему вовлечению в данный процесс все большей доли ионов Fe^{57} в решетке кристаллов и, следовательно, ко все большему уменьшению интенсивности мессбауровского эффекта от Fe^{57} . Отметим, что в случае, когда набухание глины идет в парах этиленгликоля, внеслоевые катионы остаются неотдиссоциированными и не покидают гексагональные лунки на базальных поверхностях. Таким образом, они не генерируют случайное возмущающее поле, действующее на ионы Fe^{57} .

Ниже приводятся результаты экспериментов [6], в которых исследовались некоторые специфические свойства монтмориллонитовых глин. Образцом служила полиминеральная глина, содержащая 32% МК (смесь монтмориллонита (ММ) и смешанослойного монтмориллонит-гидрослюдистого (ГМ) образования с преобладанием ММ). Анализ, выполненный на порошке исходной воздушно-сухой глины методом статической влагоемкости при некоторых влажностях воздуха, показал, что в парах воды гидратация кристаллитов МК идет преимущественно на базальных поверхностях в форме внутрикристаллического набухания (таблица, коэффициент $K=1.49$, $K=w(92\%)/w(43\%)$, w – влажность воздуха). После обработки этой глины раствором хлорида натрия, а затем промывки водой глина набухала в специальной ячейке с жесткими стенками, т. е. в условиях ограниченного объема. После заполнения всего объема ячейки глину извлекали, сушили на воздухе, растирали до порошка, навески помещали в эксикаторы, где поддерживалось заданное давление паров воды. После достижения равновесия оказалось, что гидратация глинопорошка этого образца в сравнении с исходной глиной при одинаковых давлениях паров воды возросла в 2,8 – 2,9 раза. При этом основная масса воды была поглощена в микрокапиллярах (коэффициент $K=3.82$), и лишь одна треть воды была адсорбирована с образованием гидратного прослоя на базальных поверхностях кристаллитов. Таким образом, солевая обработка раствором хлорида натрия с последующей отмывкой свободных солей привела к резкому изменению структуры глинистых час-

тиц. Эта структура оказалась фиксированной в подсохшей глине даже после ее растирания до порошка, т. е. в зернах размером менее 0.1 мм. Вторым эксперимент был проведен в ячейке со «свободным» объемом в условиях приложения к глине постоянного давления, причем изменения общего объема выявлено не было. Образование структур типа «раскрытого веера» имело место в меньшей степени, поскольку при этом в порошках заметно снизилось капиллярное поглощение воды (коэффициент $K=3.02$). Очевидно, что в первом опыте осмотическая межкристаллитная вода «захватила» всю свободную поверхность макропор, а во втором опыте этому несколько препятствовало внешнее давление. Третий эксперимент также проводился в кювете с изменяющимся объемом, но последовательность промывки изменилась – первоначально в глину вводили воду, а затем раствор хлорида натрия, как и в первом опыте. Изменение общего объема выявлено не было. В этом случае в подсушенном глинопорошке микропористость, как и ожидалось, проявилась в еще меньшей степени. Капиллярно-поглощенная вода составила около 70% от воды, поглощенной в виде гидратных слоев.

Таблица 1

**Результаты диагностики эталонного образца глины
(Миндюшское месторождение Республики Татарстан)**

№ п/п	Содержание воды в глинопорошке			K
	43%	92%	98%	
1	5,21	19,90	36,44	3,82
2	6,05	18,30	26,85	3,02
3	6,32	18,37	36,40	2,90
Исходный	6,47	9,69	13,16	1,49

Был проведен также специальный эксперимент с применением метода мессбауэровской (ЯГР) спектроскопии, который также выявил структурно-фазовые различия в описаниях трех образцов и в сравнении с исходной глиной.

В образце исходной глины в процессе ее гидратации в парах воды быстро уменьшалась доля частиц, находящихся в форме конденсационной (твердофазной) структуры. Уже при содержании в глине 13% воды доля частиц в твердофазной структуре снизилась до 23% (доля коагуляционной возросла соответственно до 77%). В образце первого эксперимента 23% твердофазных частиц зафиксировано при влажности глинопорошка 29%, а при влажности 36% твердофазные частицы практически отсутствуют, глина полностью перешла в фазу коагуляционной структуры, чему, очевидно, способствовали микропористость и капиллярная конденсация воды. В образце второго эксперимента наблюдались промежуточные соотношения между исходной глиной и образцом первого эксперимента, но ближе к последнему. Полное преобразование структуры в коагуляционную завершилось при влажности глины 27%. В глине третьего эксперимента даже после добавления воды сохранилась небольшая доля (7%) твердофазных частиц. Таким образом, воздействие солевых растворов на глины

вызывает весьма существенные и многообразные изменения на всех структурных уровнях глинистых частиц и в породе в целом.

Комплексное сочетание методов адсорбции органических красителей, статической влагоемкости, волнометрического синтеза, мессбауэровской (ЯГР) спектроскопии, рентгеновского анализа в порошковых препаратах и ориентированных пленках, *pH*-метрии и методики определения водопрочности по Качинскому, а также параллельного изучения воды в порах методом ПМР позволяет оценить водостойкость глинистых пород как природных водоупоров. Более того, по результатам исследования оказалось возможным выделить горизонты глинистых пород, отличающихся по окислительно-восстановительному потенциалу и по свойствам пропускать через себя воду и растворы минеральных солей, прежде всего хлорида натрия [1 – 3, 6]. Таким образом, вопрос о набухании и других специфических свойствах глинистых минералов оказывается связанным со структурно-кристаллохимическими особенностями глинистых минералов. В условиях ограниченного объема пор процесс набухания сводится к заполнению глинистыми частицами свободного пространства пор или к обратному процессу в случае поступления более концентрированного раствора. Однако добиться полной диспергации микроагрегатов до единичных силикатных слоев (своеобразных «элементарных частиц») бывает очень трудно даже в опыте, не говоря уже об условиях, присущих реальной гидрохимической обстановке. Скорее всего, для реальных условий характерна частичная перестройка структуры кристаллитов (микроагрегатов), с которой связан процесс формирования микропор, как это и было выявлено в ходе соответствующих экспериментов (см. таблицу). В результате ионного обмена на части базальных поверхностей внутренних силикатных слоев в кристаллите появляются катионы натрия с зарядом +1 вместо образующих катионные мостики ионов кальция с зарядом +2. Поскольку это происходит в условиях существенно ограниченного объема, то катион меняется на катион, а второму катиону натрия, необходимому для обеспечения электронейтральности системы в целом, локализоваться в месте, первоначально занятом катионом кальция, трудно.

Таким образом, положительный компенсирующий заряд ионно-гидратного слоя при ионном обмене перераспределяется, что вызывает появление сдвиговых усилий электростатической природы. Это приводит к развороту и смачиванию той части поверхности силикатных слоев, на которых завершился процесс ионного обмена, и таким образом формируется «вверная» структура частиц, о которой речь шла выше. Формируется вторая осмотическая система глины (первая образована отдиссоциированными катионами базальных поверхностей кристаллитов). В этом случае глину удобно моделировать с помощью представлений о кристаллите (микроагрегате) как об осмотической ячейке, в которой электростатическое взаимодействие отрицательно заряженной смоченной поверхности раздвинувшихся силикатных слоев с отдиссоциированными обменными катионами играет роль полупроницаемой мембраны. При раздвиже-

нии силикатных слоев в кристаллите вода переходит внутрь образовавшегося объема. Такой механизм влияет на просветность межкристаллитных пор, уменьшая проницаемость пород при насыщении глины пресной водой в условиях постоянства внешнего объема.

В силу всего выше сказанного сначала рассмотрим термодинамическую модель глины как набухающей при контакте с парами воды либо с растворами электролитов системы.

2. Термодинамика набухания глин. В основе часто встречающегося явления набухания природных систем, как правило, лежит взаимодействие способных к ионному обмену систем (природных ионообменных систем) с водой. Возникновение природной ионообменной системы обусловлено специфической адсорбцией ионов глинистыми или почвенными частицами с последующей нейтрализацией возникающего заряда за счет адсорбции противоионов [1], а также за счет избыточного (как правило, отрицательного) электрического заряда глинистых частиц, компенсируемого за счет адсорбции катионов на поверхности частиц. Если силы, связывающие ион и поверхность, достаточны для удержания иона (это относится, прежде всего, к так называемым антистоксовским ионам типа калия), то набухание будет слабо выражено. В противном случае за счет гидратации катионов и поверхности формируются многослойные гидратные оболочки, а сам процесс внешне идет как поглощение значительного количества воды средой в целом, что и называется набуханием.

Таким образом, при описании набухания глин необходимо отразить специфику взаимодействия подобных систем с водой и ионами. Эта специфика заключается в следующем. И вода, и ионы раствора, находящегося в порах глины, могут проникать в ионообменную систему глины и покидать ее, однако, за единственным исключением. Эту систему не могут покинуть ионы, обеспечивающие электрическую нейтральность всей системы в целом. Таким образом, если при описании классического осмоса [7] через полупроницаемую мембрану способен проходить один компонент раствора и не способен другой, то в данном случае имеет место явление, когда лишь часть одного из компонентов системы не способна покидать систему. Назовем такую систему, достаточно точно описывающую поведение способной к набуханию среды, *осмотической ячейкой*.

В стесненных условиях сформированных под огромным давлением горных пород смена гидрохимического равновесия вызывает силы, способствующие раздвижению глинистых частиц, чему препятствуют как структурные ограничения, так и собственно вес выше лежащих пород. Единственным механизмом, позволяющим частицам хоть как-то уменьшить избыточную энергию Гиббса, является описанный нами выше механизм раздвижения глинистых частиц, названный в [6] веерным. Перейдем к описанию равновесных свойств системы «глинистая частица – раствор». В основу рассмотрения положен достаточно очевидный механизм утилизации избыточной поверхностной энергии глинистых частиц при изменении некоторых параметров среды, например, концен-

трации раствора, через изменение относительной ориентации глинистых частиц, главным образом, через развороты друг относительно друга. В термодинамическом описании такой процесс будет проявляться в изменении поверхностного натяжения на смачиваемых участках частиц при их раздвижении в ходе взаимных разворотов. В этом случае меняется один из важнейших параметров глинистой породы – микропористость. На основе уравнений равновесия для воды и компонентов раствора (катионов и анионов раствора), а также первого уравнения Липпмана [7] и условия равновесия (им служит равенство нулю вариации свободной энергии Гиббса всей системы при постоянных давлении и температуре) имеем

$$\sum_{i=0,1,2} (\mu_i \delta n_i + \bar{\mu}_i \delta \bar{n}_i) + \gamma \delta A + \mu_1^s \delta n_1^s = 0 \quad (1)$$

где μ_i - химический потенциал соответствующего компонента, индекс 0 - относится к воде, индекс 1 - к катионам, индекс 2 - к анионам, индекс s обозначает компонент, сорбированный на поверхности, n_i - число молей i -го компонента в системе, символ δ означает вариацию (алгебраическое приращение) соответствующей величины, A – площадь смоченной поверхности глинистых частиц, γ - изменение удельной поверхностной энергии (поверхностного натяжения) при склеивании (раздвижении) частиц.

Обозначая q – заряд единицы поверхности глинистых частиц, H – расстояние между частицами, из условия для химического потенциала воды имеем, в соответствии с [6], уравнение

$$2\gamma / H = 2RT(\sqrt{q^2 / H^2 + C_0^2} - C_0) \quad (2)$$

Здесь C – концентрация, чертой сверху отмечена принадлежность параметра к внутри-агрегатному раствору глиномассы, C_0 - концентрация межагрегатного раствора. Разрешая (2) относительно H , имеем

$$H = A / C_0, \quad A = [q^2 - \gamma^2 / (R^2 T^2)] / [2\gamma / (RT)] \quad (3)$$

Можно рассмотреть две предельных ситуации. Когда концентрация межагрегатного раствора мала, то, как известно [8], заряд штерновского слоя ведет себя пропорционально квадратному корню из концентрации раствора, и мы получаем

$$q \cong \sqrt{C_0} \Rightarrow H \cong 1 / \sqrt{C_0} \quad (4)$$

В случае, когда концентрация межагрегатного раствора велика, то заряд штерновского слоя ведет себя пропорционально первой степени концентрации раствора

$$q \cong C_0 \Rightarrow H \cong \text{const} \quad (5)$$

Такое поведение согласуется с известными экспериментами К. Норриша по внутрикристаллическому набуханию монтмориллонита [1].

3. Коэффициент фильтрации глин. Фильтрацию в глине можно рассматривать как течение через систему щелей с расстоянием между щелями, зависящим от концентрации раствора [8]. Можно показать, что это приводит к харак-

терной зависимости проницаемости такой среды от концентрации фильтрующегося раствора (рис. 3).

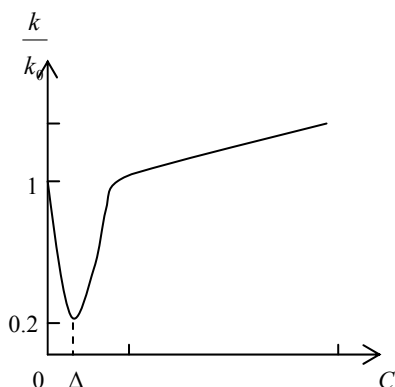


Рис. 3. График зависимости проницаемости глины от концентрации раствора

Действительно, согласно [8] имеем для коэффициента фильтрации в случае течения раствора в тонких щелевидных порах с учетом действия заряженной поверхности пор на поток $k = bH^2$, $b = \text{const}$. Считая пористость линейной функцией H , а коэффициент фильтрации в первом приближении линейно зависящим от пористости в соответствии с формулой Арчи, получаем итоговую зависимость коэффициента фильтрации от концентрации раствора в виде, изображенном на рис. 3.

4. Осмотическая фильтрация в глинах.

При увлажнении глин катионы могут диссоциировать и формировать так называемый двойной диффузионный слой, обуславливая тем самым способность глин к набуханию. Малые размеры глинистых частиц и формируемых ими пор, а также зависимость фильтрационной способности таких пор от концентрации фильтрующегося раствора приводят к необходимости одновременного рассмотрения процессов деформирования, фильтрации и осмоса в такой системе [6]. Комплексный характер общего процесса обуславливает более сложный вид закона фильтрации. Следуя [9], запишем закон фильтрации и уравнение баланса массы раствора в глинистой породе

$$\partial(m\rho) / \partial t + \nabla(\rho\vec{q}) = 0, \quad \vec{q} = -k(\nabla p + \rho g\hat{z}) / \eta - k_{hc} \nabla c \quad (6)$$

Здесь \vec{q} — скорость фильтрации, k — проницаемость, η — вязкость, ρ — плотность жидкости, g — ускорение силы тяжести, \hat{z} — единичный вектор по вертикали, k_{hc} — осмотический коэффициент, p — давление, c — концентрация раствора, m — пористость. Пренебрегая малыми второго порядка, имеем согласно [9, 10] $m = m_0 + \theta$. Считая плотность раствора равной плотности воды, вместо первого уравнения в (12) имеем $\partial\theta / \partial t + \nabla\vec{q} = 0$. Связывая усадку с напряжением через реологический закон и используя уравнение Терцаги [9, 10], получаем

$$\sigma_{ij}^{eff} = (K - 2G/3)\theta\delta_{ij} + 2G\varepsilon_{ij} - \alpha KT\delta_{ij} + \beta Kp\delta_{ij}, \quad \sigma_{ij} = \sigma_{ij}^{eff} - p\delta_{ij} \quad (7)$$

Подставляя (7) в (6) и используя для концентрации соотношения, полученные авторами [6], получаем для осредненной скорости усадки/набухания глины

$$\frac{\partial\langle\theta\rangle}{\partial t} = \frac{(k_0 \ln 10)\sigma^2}{0,03\eta H_0 K} + \frac{k_0\sigma}{\eta H_0} \left(1 - \frac{k_{hc}e\eta}{Km_0^2 V_0}\right) - \frac{k_{hc}e}{H_0 V_0 m_0}. \quad (8)$$

Здесь σ – общая нагрузка на слой, H_0 – толщина глинистого слоя. Можно видеть, что последнее уравнение имеет вид типичной зависимости скорости деформации глинистого слоя от нагрузки. Вещественный корень правой части уравнения (8) дает предел текучести для глины. Легко видеть, что этот предел не равен нулю.

Литература

1. Кульчицкий Л. И., Усыряев О. Г. Физико-химические основы формирования свойств глинистых пород / Л.И. Кульчицкий, О.Г. Усыряев. – М.: Недра, 1981. – 178 с.
2. Эйриш М. В. О природе сорбционного состояния катионов и воды в монтмориллоните / М.В. Эйриш // Коллоидный журнал. – 1964. – Т. 26. – №5. – С. 633 – 639.
3. Eirish, M.V., Tret'yakova L.I., The role of sorptive layers in the formation and change of the crystal structure of montmorillonite / M.V. Eirish, L.I. Tret'yakova // Clay Minerals. – Vol. 8, 1970. – P. 255 – 266.
4. Эйриш М.В., Двореченская А.А. Исследование положения и роли ионов Fe^{3+} в структуре глинистых минералов методом ЯГР-спектроскопии. I. Изменение состояния ионов Fe^{3+} при дегидратации и дегидроксилизации монтмориллонита / М.В. Эйриш, А.А. Двореченская // Геохимия. – 1976. – №4. – С. 597 – 606.
5. Заславский Г.М., Сагдеев Р.З. Введение в нелинейную физику: От маятника до турбулентности и хаоса / Г.М.Заславский, Р.З. Сагдеев. – М.: Наука. – 1988. – 368 с.
6. Храмченков М. Г., Эйриш М. В., Корнильцев Ю. А. Изучение структурных изменений и термодинамическая модель фильтрационных свойств глинистых пород / М. Г.Храмченков, М. В.Эйриш, Ю. А. Корнильцев // Геоэкология. – 1996. – №5. – С. 65 – 73.
7. Гуггенгейм Э. М. Современная термодинамика, изложенная по методу У. Гиббса / Э.А. Гуггенгейм. – М. – Л.: Госхимиздат, 1941. – 188 с.
8. Дерягин Б. В., Чураев Н. В., Муллер В. М. Поверхностные силы / Б.В. Дерягин, Н. В.Чураев, В. М. Муллер. – М.: Наука, 1987. – 398 с.
9. Mitchell J.K. Fundamentals of Soil Behavior / J.K. Mitchell. – New York: John Wiley & Sons, Inc. 1976, 422 p.
10. Greenberg J.A., Mitchell J.K., Witherspoon P.A. Coupled salt and water flows in a groundwater basin / J. A. Greenberg, J.K. Mitchell, P.A. Witherspoon // J. Geophys. Res. 1973. – Vol. 78. – P. 6341 – 6353.

УДК 549-057

SWELLING AND FILTRATION IN BENTONITE CLAY

M.G. Khramchenkov, R.P. Fedorin.

The article is devoted to general thermodynamic correlations for clays and clay solution. Main attention is given to analysis of swelling and filtration process in special type of clays minerals (smectite).

Key words: montmorillonite, swelling, hydration, Messbauer effect, thermodynamic, permeability properties, concentration of solution.

Сведения об авторах

№№	Ф.И.О.	Должность и место работы	Телефон рабочий E-mail
1	Храмченков Максим Георгиевич	д.ф.-м.н., с.н.с., заместитель директора НИИ математики и механики им. Н. Г. Чеботарева Казанского государственного университета.	Адрес: Казань, ул. проф. Нужина, 1/37. E-mail: Maxim.Khramchenkov@ksu.ru
2.	Федорин Роман Петрович	младший научный сотрудник НИИ математики и механики им. Н. Г. Чеботарева Казанского государственного университета	Адрес: Казань, ул. проф. Нужина, 1/37.

СОДЕРЖАНИЕ

Поляничко А.М., Дрибинский Б.А., Кипенко И.Б., Феофилова М.С. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ ХРОМОСОМНЫМИ БЕЛКАМИ HMGB1 И H1 В РАСТВОРЕ	3
Поляничко А.М. , Чихиржина Е.В., Воробьев В.И. ВЛИЯНИЕ ЦИС-ИЗОМЕРА ДИАММИНОДИХЛОРОПЛАТИНЫ(II) НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК С БЕЛКАМИ HMGB1 И HMGB2	9
Родионова Т.Ю., Чихиржина Е.В., Курилов Р.В., Скворцова Е.В., Поляничко А.М.^{1,2} ИЗМЕНЕНИЯ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ HMGB-ДОМЕНА ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С ДНК	14
Чихиржина Е.В., Поляничко А.М., Костылева Е.И., Воробьев В.И. НАДМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ДНК С «ЛИНКЕРНЫМИ» БЕЛКАМИ ХРОМАТИНА	20
Храмченков М.Г., Федорин Р.П. НАБУХАНИЕ И ФИЛЬТРАЦИЯ В БЕНТОНИТОВЫХ ГЛИНАХ	27