

БИОГЕРОНТОЛОГИЯ

ПЛАВЛЕНИЕ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С ГЕРОПРОТЕКТОРНЫМ ТЕТРАПЕПТИДОМ

В.Х.Хавинсон, А.Ю.Соловьёв*, Л.К.Шатаева*

*Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН;
Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

Экспериментальная зависимость гиперхромного эффекта ДНК [поли(dA-dT):поли(dA-dT)] при взаимодействии с пептидом Ala-Glu-Asp-Gly представляет собой изотерму с насыщением. Плавление (разделение цепей) двойной спирали свободной ДНК происходит при 69.5°C и при более высоких затратах энергии (повышение энтальпии на 976.4 кДж/моль п.н.) по сравнению с плавлением комплекса ДНК с пептидом (28°C и 444.6 кДж/моль п.н.). Выявленные закономерности плавления двойной спирали ДНК и термодинамических параметров этого процесса указывают на природный механизм взаимодействия ДНК и регуляторных пептидов, лежащий в основе функционирования живой материи.

Ключевые слова: ДНК, тетрапептид, комплексобразование, плавление двойной спирали

Тетрапептид Ala-Glu-Asp-Gly (ТП) обладает значительной геропротекторной активностью и способствует преодолению лимита Хейфлика при культивировании соматических клеток [1,2]. Физиологическая активность ТП основана на его участии в активации транскрипции путем взаимодействия с двойной спиралью ДНК на промоторном участке гена [3].

При исследовании методом гель-хроматографии показано, что ТП образует устойчивый комплекс с высокомолекулярной синтетической двуспиральной ДНК (ТАТАТА)_n, при этом наблюдается гиперхромный эффект в ультрафиолетовой области спектра (повышение оптической плотности раствора при 260 нм), свидетельствующий о разделении цепей двойной спирали ДНК [4]. Другими словами, регуляторный олигопептид может связываться с комплементарным сайтом на промоторном участке гена, вызывая локальное разделение цепей и тем самым инициируя процесс транскрипции гена РНК полимеразой. Это было доказано инициированием гена теломеразы с помощью пептида в соматических клетках [5].

Феномен разделения цепей наблюдается также при тепловой денатурации двойной спирали ДНК при повышенной температуре [8]. В последнее время это явление используют для изучения селективности взаимодействия нуклеотидных пар

(п.н.) в составе коротких двойных спиралей длиной 10-15 п.н. [9]. Кроме того, кривая плавления ДНК используется для оценки энергетической прочности связей в комплексе ДНК с ядерными белками группы высокой мобильности, содержащими повышенное количество аминокислотных остатков глутаминовой и аспарагиновой аминокислот [7,12].

Цель работы — исследовать зависимость гиперхромного эффекта от концентрации ТП. При концентрации пептида, которая обеспечивает предельное насыщение ДНК пептидом, исследовано плавление комплексов ДНК с ТП или с глутаминовой кислотой (ГК) по сравнению с плавлением свободной двойной спирали ДНК.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали синтетический препарат нуклеиновой кислоты (поли(dA-dT):поли(dA-dT); "Sigma"; в дальнейшем — ДНК) с оптической плотностью (ОП) при 260 нм 20 ЕД ОП/мг (двойная спираль); ТП, синтезированный в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН и не содержащий низкомолекулярных электролитов; ГК ("Serva").

Препарат ДНК после набухания в дистиллированной воде при 6°C растворяли в 0.1 н растворе NaCl до концентрации 18-20 мкг/мл. Полученный

раствор имел значение pH 7.1. Синтетический пептид, не содержащий солей, растворяли в 0.1 н растворе NaCl и по 10, 20 или 50 мкл добавляли к 2 мл раствора ДНК.

Ультрафиолетовые спектры растворов ДНК, пептида и их смесей измеряли в диапазоне концентраций пептида $(1-70) \times 10^{-6}$ М на спектрофотометре "Spectord M40" при 25°C. Поскольку молекулярная масса использованного препарата ДНК ($S_{20,w} = 12$), по крайней мере, на 2 порядка превышала молекулярную массу пептида, концентрацию ДНК выражали в молях п.н. в растворе, что составляло $(28.5-32) \times 10^{-6}$ М.

Конформационный переход ДНК и его комплексов исследовали при помощи спектрофотометра "Shimadzu UV-1700" с термостагированными кюветами; нагревание растворов проводили со скоростью 2°C/мин. Концентрация ДНК во всех системах составляла 5.3 мкг/мл, а количество ГК и ТП соответствовало соотношению: 6 молекул аминокислоты или пептида на 10 п.н.

Обработку экспериментальных графиков и расчеты проводили по общепринятому методу с учетом влияния базовых линий. По форме кривых плавления (температура плавления на полувысоте кривой и угол наклона кривой к оси температур) рассчитывали термодинамические функции процесса разделения цепей двойной спирали общепринятым методом [6,11].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Концентрационная зависимость гиперхромного эффекта от числа молекул пептида, добавленных к 10 п.н. ДНК, представляла собой изотерму с насыщением (рис. 1). Начальный участок изотермы отражает селективность связывания пептида с ДНК, а максимальное значение производной определяет область концентраций (6 молекул пептида на 10 п.н.), где, по-видимому, осуществляется наиболее прочное многоточечное связывание ДНК с пептидом. Взаимодействие 2 полимерных молекул происходит за счет гидрофобного связывания метильных групп аланина и тимина и за счет полярных взаимодействий 3 карбоксильных групп пептида с 3 аденинами, а именно, с протон-акцепторными атомами 7N и с протон-донорными аминогруппами при атоме углерода 8C . Это связывание вызывает локальное разделение цепей двойной спирали на соседних участках ДНК. Энергия, необходимая для этого процесса, компенсируется сильными полярными взаимодействиями нуклеиновых оснований с боковыми группами глутаминовой и аспарагиновой аминокислот, входящих в состав ТП.

Разделение цепей свободной двойной спирали ДНК, называемое также плавлением спирали или конформационным переходом "спираль— клубок", достигается также при повышении температуры и сопровождается гиперхромным эффектом [10] (рис. 2).

Следует отметить очень резкий конформационный переход свободной ДНК, что, по-видимому, определяется высокой кооперативностью процесса, пропорциональной молекулярной массе ДНК [10].

Для оценки влияния теплоемкости на величину теплосодержания (энтальпийной составляющей

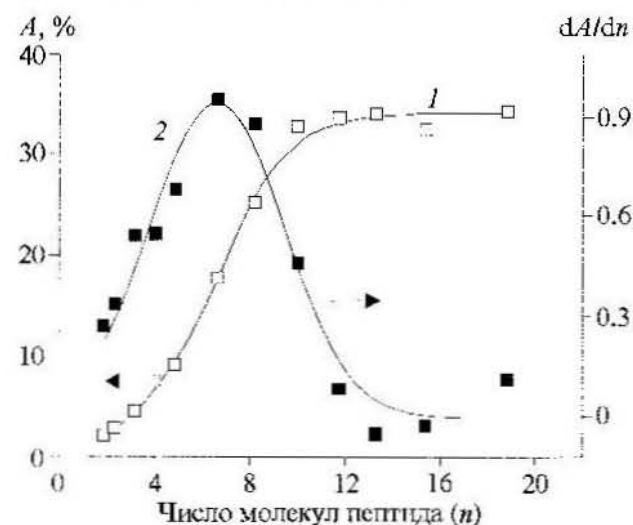


Рис. 1. Гиперхромный эффект (A) в зависимости от числа молекул пептида (n), добавленного в расчете на 10 п.н. ДНК (1) и производная гиперхромного эффекта dA/dn в зависимости от числа добавленных молекул пептида (2).

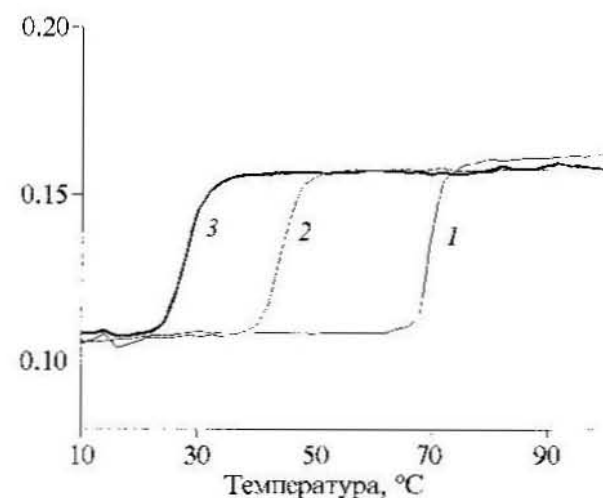


Рис. 2. Кривые плавления двойной спирали (поли(dA-dT):поли(dA-dT); 1) и ее комплексов с ГК (2) и ТП (3). По оси ординат — оптическая плотность растворов при 260 нм.

Термодинамические функции разделения цепей двойной спирали ДНК

Объект исследования	Температура плавления, °С	Свободная энергия (ΔG), кДж/моль п.н.	Энтальпия Вант-Гоффа, кДж/моль п.н.	Энтропийная составляющая ($T\Delta S$), кДж/моль п.н.
ДНК	69.5	-36.0	976.4	1012
ДНК+ГК	44	-32.5	487.8	520
ДНК+ТП	28	-30.9	444.6	475.5

взаимодействия пептида с ДНК) использованы данные литературы о величине молекулярной теплоемкости ДНК в исследованных интервалах температур $\Delta C_p = 312.6$ Дж/моль К [6]. Увеличение теплосодержания за счет теплоемкости оценивали как произведение $\Delta C_p \times (T_m - 25)$, где T_m — температура плавления ДНК, что составляло менее 1.5% от расчетной величины энтальпии Вант-Гоффа (таблица).

Большие положительные значения энтальпии и энтропийной составляющей плавления двойной спирали ДНК определяются не только разрушением водородных связей между основаниями двух цепей, но и большой величиной стэкинг-взаимодействий нуклеотидных пар оснований между собой [13]. В системах, где двойная спираль ДНК дополнительно связана с ГК или с ТП, плавление спирали характеризуется меньшими изменениями свободной энергии и почти вдвое меньшими значениями энтальпии и энтропии процесса. Это свидетельствует о том, что разделение цепей ДНК при физиологических температурах не является денатурацией, и указывает на термодинамически облегченный путь восстановления двойной спирали после разделения цепей за счет присутствия в системе ГК или ТП.

Особенно важным фактором является установленная наиболее низкая температура плавления комплекса ДНК и ТП, адекватная температурному режиму биохимических процессов у большинства живых организмов. Следует отметить, что для анализа теломеразной активности и оценки влияния на нее ТП использовали инкубирование легочных фибробластов человека при 30°C в течение 30 мин [2,5]. В результате впервые было установлено увеличение средней длины теломер в 2.5 раза и числа делений клеток

на 42.5% по сравнению с контролем, что в значительной степени объясняет способность ТП увеличивать среднюю длительность жизни у животных [1,3].

Таким образом, изучение закономерностей плавления двойной спирали ДНК и термодинамических параметров этого процесса указывает на природный механизм взаимодействия ДНК и регуляторных пептидов, лежащий в основе функционирования живой материи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н. Пептидные биорегуляторы и старение. СПб., 2003.
2. Хавинсон В.Х., Бондарев И.Э., Бутюгов А.А., Смирнова Т.Д. // Бюл. эксперим. биол. 2004. Т. 137, № 5. С. 573-577.
3. Хавинсон В.Х., Анисимов С.В., Малинин В.В., Анисимов В.Н. Пептидная регуляция генома и старение. М., 2005.
4. Хавинсон В.Х., Соловьёв А.Ю., Шатаева Л.К. // Бюл. эксперим. биол. 2006. Т. 141, № 4. С. 443-447.
5. Хавинсон В.Х., Бондарев И.Э., Бутюгов А.А. // Там же. 2003. Т. 135, № 6. С. 692-695.
6. Chen C., Russu I.M. // Biophys. J. 2004. Vol. 87, N 4. P. 2545-2551.
7. Dragan A.I., Liggins J.R., Crane-Robinson C., Privalov P.L. // J. Mol. Biol. 2003. Vol. 327, N. 2. P. 393-411.
8. Duguic J.G., Bloomfield V.A., Benevides J.M., Thomas G.J.Jr. // Biophys. J. 1996. Vol. 71, N 6. P. 3350-3360.
9. Leontis N.B., Kwok W., Newman J.S. // Nucleic Acids Res. 1991. Vol. 19, N 4. P. 759-766.
10. Morozov V.F., Badasyan A.V., Grigoryan A.V. et al. // Biopolymers. 2004. Vol. 75, N 5. P. 434-439.
11. Petruska J., Goodman M.F. // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270, N 2. P. 746-750.
12. Poland D. // Biophys. Chem. 2007. Vol. 125, N 2-3. P. 497-507.
13. Sponer J., Gabb H.A., Leszczynski J., Hobza P. // Biophys. J. 1997. Vol. 73, N 1. P. 76-87.

Получено 27.08.08