

ГЕРОНТОЛОГИЯ

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ОЛИГОПЕПТИДОВ И ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК

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

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

Экспериментально исследовано комплексообразование пептида Ala-Glu-Asp-Gly с двойной спиралью ДНК [поли(dA-dT):поли(dA-dT)] в нейтральной области рН при комнатной температуре. Связывание пептида с двойной спиралью сопровождается гиперхромным эффектом, что свидетельствует о локальном разделении цепей двойной спирали. Проведено сравнение энергий парных взаимодействий аминокислотных остатков и нуклеиновых оснований с энергией связи двух оснований в нуклеотидной паре (dA-dT). Предложена новая концепция взаимодействия двух видов молекул, несущих информацию. Это взаимодействие лежит в основе запуска механизма синтеза белка и может объяснить появление жизни на Земле.

Ключевые слова: пептид, двойная спираль, комплексообразование, гиперхромный эффект, синтез белка

В течение последних лет проведены подробные исследования активации хроматина в клетках лиц старческого возраста в результате селективного связывания регуляторных пептидов и факторов транскрипции с промоторными участками генов [3,4,8,9]. Основная задача этих исследований состоит в установлении соответствия нуклеотидной последовательности ДНК на промоторном участке гена и аминокислотной последовательности регуляторного пептида в области его сайта связывания с двойной спиралью [12-15]. Ранее нами была разработана структурная модель комплементарного соответствия определенной последовательности нуклеотидов на промоторном участке генов (блок узнавания) и последовательности аминокислотных остатков олигопептида, специфически связанного с блоком узнавания. Особенность этой модели заключается в том, что функциональные группы олигопептида комплементарно связываются не одной цепочкой ДНК, а одновременно обеими цепочками в большой канавке двойной спирали. В качестве примера была представлена модель комплементарного связывания синтетического пептида Ala-Glu-Asp-Gly (эпиталона) с нуклеотидной последовательностью АТТТГ в составе ведущей цепи двойной спирали ДНК, которая многократно

повторяется на промоторных участках генов теломеразы и РНК-полимеразы II [5,8,10].

Цель данной работы заключалась в том, чтобы экспериментально подтвердить факт комплексообразования регуляторного олигопептида с двойной спиралью ДНК, определить концентрационные соотношения компонентов в комплексе и, используя данные литературы о парных взаимодействиях нуклеотидов и аминокислот, оценить энергетические параметры селективного взаимодействия тетрапептида и двойной спирали ДНК в исследуемой системе.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Использовали синтетические препараты нуклеиновых кислот [поли(dA-dT):поли(dA-dT)] (двойная спираль), поли(dT) и поли(dA) (одинарные цепи) производства "Calbiochem", синтетический пептид Ala-Glu-Asp-Gly (эпиталон), полученный в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, а также нингидрин для определения наличия пептида.

Комплексообразование проводили в физиологическом растворе при комнатной температуре, добавляя тетрапептид к раствору двуспиральной или одноцепочной ДНК. Образование

комплекса “пептид—ДНК” контролировали методом гель-хроматографии на сефадексе G-25 (“Pharmacia”, колонка 1×35 см; скорость протекания раствора — 6 мл/ч). Полученные высокомолекулярные фракции лиофильно высушивали и анализировали методом тонкослойной хроматографии на пластинках “Silufol” (“Kavaliere”).

Конформационные изменения ДНК при связывании с пептидом исследовали с помощью УФ-спектрометрии. Для этого растворы пептида и ДНК смешивали так, чтобы конечные концентрации ДНК в растворе составляли 20-25 мкг/мл, а пептида — 1.0-1.4 мкг/мл. Комплексообразование осуществлялось при ультранизких, наномолярных концентрациях взаимодействующих компонентов. Погрешность при определении концентраций и величин не превышала 10%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Препараты нуклеиновых кислот имели молекулярную массу порядка 140 кДа. Молекулярные массы ДНК и пептида различались более чем на два порядка. Представлены результаты гель-хроматографии двуспиральной ДНК, пептида и их смеси (рис. 1). ДНК выходила из колонки со свободным объемом $V_0=19$ мл, а пептид — с объемом задержки $1.5 V_0=29$ мл. Тот факт, что при гель-хроматографии смеси пептида и двойной спирали [поли(dA-dT):поли(dA-dT)] пептид частично обнаруживается в пике ДНК, свидетельствует об образовании комплекса пептида и двуспиральной ДНК. Избыток пептида, не связанного в комплекс, выходил из колонки со своим объемом задержки (29 мл). Концентрирование

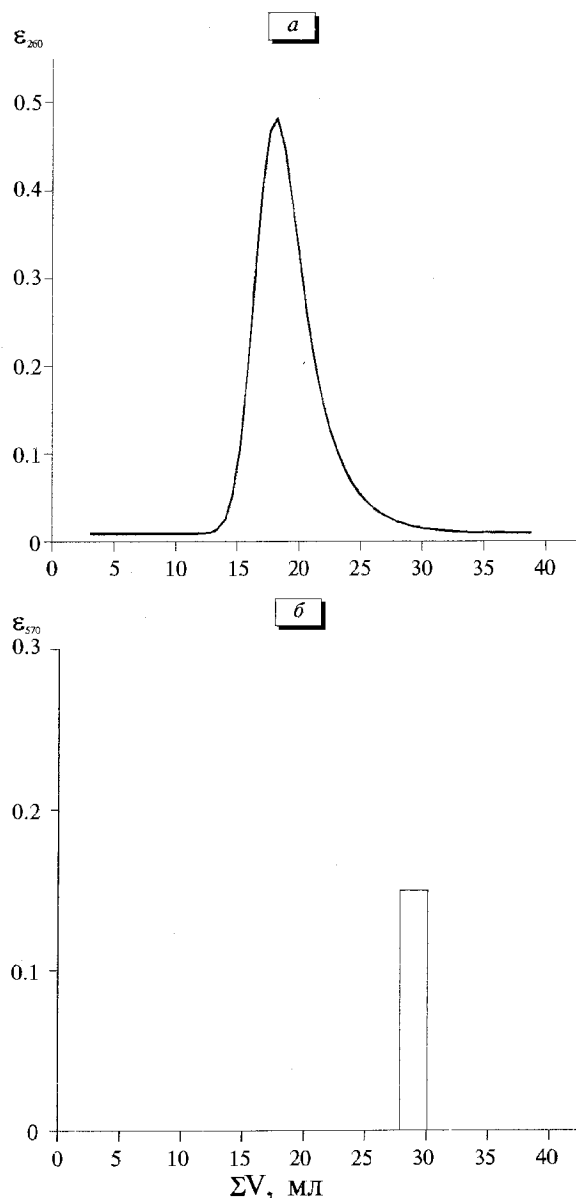


Рис. 1. Гель-хроматография ДНК и синтетического пептида на сефадексе G-25 при комнатной температуре.

По оси абсцисс — объем физиологического раствора, пропущенного через колонку. По оси ординат — оптическая плотность раствора на выходе из колонки. а — гель-хроматография двойной спирали ДНК [поли(dA-dT):поли(dA-dT)].

б — гель-хроматография синтетического пептида Ala-Glu-Asp-Gly.

в — гель-хроматография смеси ДНК и пептида. На выходе из колонки измеряли оптическую плотность раствора при $\lambda=260$ нм и присутствие пептида в каждой фракции по окраске нингидрином при $\lambda=570$ нм. Пептид, связанный в комплекс ДНК, выходит со свободным объемом колонки (1-й столбик).

пика позволило оценить равновесное количество пар нуклеотидов (п. н.), приходящееся на одну молекулу пептида в комплексе, как 17 п.н.

УФ-спектры растворов, содержащих двуспиральную ДНК и пептид, свидетельствуют об увеличении оптической плотности ДНК при 260 нм (ϵ_{260}) в результате связывания регуляторного пептида (гиперхромный эффект). При этом не наблюдается смещения длины волны максимального поглощения. Представлены УФ-спектры комплексов "пептид—ДНК" при разном соотношении компонентов (рис. 2, 1, 2) и свободной двойной спирали ДНК (рис. 2, 3). Регуляторный пептид (рис. 2, 4) не имеет оптической плотности в исследованной области длин волн, поэтому гиперхромный эффект можно объяснить локальным разделением цепей двойной спирали ДНК в результате связывания пептида. При смешивании

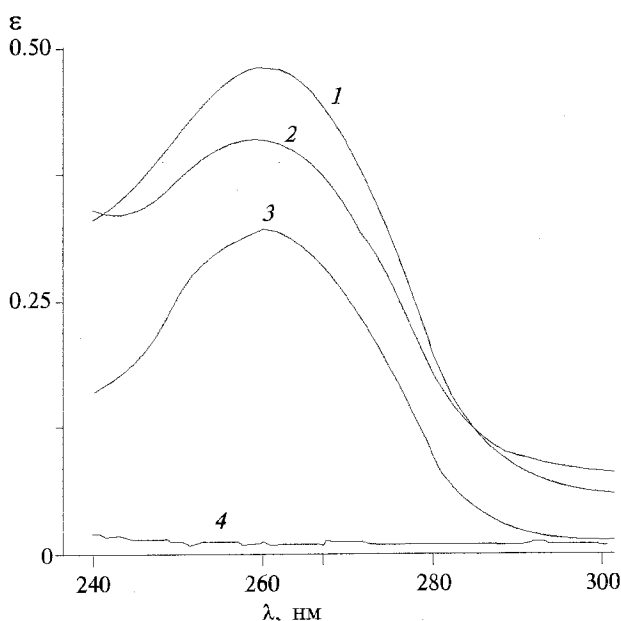


Рис. 2. УФ-спектры смесей ДНК с пептидом при разном соотношении числа нуклеотидных пар и молекул пептида (15:1 — 1 и 9:1 — 2), растворов двойной спирали ДНК [поли(dA-dT):поли(dA-dT)] (3) и пептида Ala-Glu-Asp-Gly (4).

растворов поли(dT) или поли(dA) (одноцепочных ДНК) с исследуемым пептидом гиперхромного эффекта не наблюдалось.

Представлены величины гиперхромного эффекта для комплекса двуспиральной ДНК с пептидом при разных соотношениях молярных концентраций пар нуклеотидов dA-dT и пептида (табл.1).

Препарат [поли(dA-dT):поли(dA-dT)] является синтетическим аналогом известного сайта связывания факторов транскрипции (ТАТА-бокса) на промоторных участках многих генов [11, 15]. Ранее нами было показано, что молекулярный размер пептида Ala-Glu-Asp-Gly позволяет ему в развернутой β -конформации разместиться в большой канавке двойной спирали ДНК вдоль оси этой спирали [10], а не поперек, как предусматривается моделями связывания высокомолекулярных факторов транскрипции [11,14]. Пептид имеет три карбоксильные группы, концевую аминогруппу и боковую метильную группу. Двойная спираль [поли(dA-dT):поли(dA-dT)] экспонирует на поверхность большой канавки группы нуклеиновых оснований, которые могут взаимодействовать с группами пептида. Аденин экспонирует две протон-акцепторные группы: аминогруппу при атоме углерода 6C и атом азота 7N , а тимин — только метильную группу. В предложенной ранее структурной модели протон-донорные карбоксильные группы пептида могут устанавливать водородные связи с протон-акцепторными группами трех аденинов, принадлежащих разным цепям двойной спирали [5,9]. Таким образом, исследуемый тетрапептид может связать (сшить) между собой дополнительными водородными и одной гидрофобной связями шесть пар нуклеотидов с последовательностью ТАТАТА ведущей цепи ДНК.

Гиперхромный эффект (до 30%) свидетельствует о частичном разрушении водородных связей между основаниями пар нуклеотидов dA:dT и локальном разделении цепей двойной спирали. Инициирование транскрипции генов включает

Таблица 1. Гиперхромный эффект при связывании пептида Ala-Glu-Asp-Gly с двойной спиралью [поли(dA-dT):поли(dA-dT)]

Концентрация ДНК, п.н.		Концентрация пептида		Отношение компонентов п.н./пептид моль/моль	ϵ_{260}	$\Delta\epsilon_{260}$	Гиперхромный эффект, %
мкг/мл	нмоль/мл	мкг/мл	нмоль/мл				
20	30.8	0	0	—	0.32	—	—
20	30.8	1.33	3.4	9.0	0.41	0.09	30
25	38.5	0	0	—	0.40	—	—
25	38.5	1.0	2.6	14.8	0.48	0.08	20

этап разрушения водородных связей между парами нуклеотидов и локальное разделение двух цепей ДНК в направлении первого экзона гена [11]. Представлена схема связывания регуляторного пептида в большой канавке двойной спирали, в результате чего происходит локальное и обратимое разделение цепей двойной спирали (рис. 3). По-видимому, подобные взаимодействия могут способствовать активации хроматина [4].

Пространственное расположение функциональных групп нуклеиновых оснований двуспиральной ДНК и пептида Ala-Glu-Asp-Gly позволяет этим молекулам участвовать в многоочечном комплементарном взаимодействии [10]. Интегральную энергию этого взаимодействия можно оценить, используя данные об энтальпии парных взаимодействий аминокислот и нуклеотидов, участвующих в связывании пептида Ala-Glu-Asp-Gly и двойной спирали [поли(dA-dT):поли(dA-dT)] (табл. 2).

Полная энергия связывания одной пары оснований (dA:dT) в двойной спирали Уотсона—Крика составляет 23.6 кДж/моль [2]. Все углы вращения двойной спирали ДНК строго связаны между собой, поэтому конформационные изменения ДНК происходят по кооперативному механизму: разрыв водородных связей одной нуклеотидной пары облегчает разрыв связей соседней пары. По-видимому, связывание пептида с двойной спиралью проходит как экзотермическая реакция, суммарной энергии которой достаточно для разрыва водородных связей между основаниями нескольких соседних пар нуклеотидов. Возникающий гиперхромный эффект свидетельствует о локальном разделении цепей двойной спирали.

Согласно модели Jacob и Monod [7], низкомолекулярные лиганды, такие как лактоза и триптофан, обеспечивают конформационные изменения репрессоров и тем самым деблокируют транскрипцию генов в клетках прокариотов. Можно предположить, что в клетках эукариотов регуляторные пептиды могут конкурентно замещать на промоторных участках компоненты, блокирующие транскрипцию генов. Локальное разделение двойной спирали ДНК способствует инициированию транскрипции гена РНК-полимеразой II. Аминокислотные последовательности регуляторных пептидов, как правило, входят повторяющимися блоками в состав высокомолекулярных белков и факторов транскрипции [6]. Аминокислотная последовательность пептида Ala-Glu-Asp-Gly обнаружена 54 раза в базе данных (Protein Sequence Database) в составе цитостатина, протимозина, паратимозина, тропонинов С и Т, тиреоглобулина, фактора адгезии нервных клеток, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и кальмодулинсвязывающих белков GAP-43 и P-57. По-видимому, эндогенная регуляция синтеза белков предусматривает частичный специфический гидролиз высокомолекулярных белков-предшественников с освобождением регуляторных пептидов, участвующих в инициировании транскрипции гена [6].

Таким образом, анализ результатов проведенного эксперимента, а также предложенной нами модели комплементарного взаимодействия пептидов и ДНК [5,9,10] позволяет предложить новую концепцию, согласно которой коротким пептидам принадлежит ключевая роль в регуляции экспрессии генов и, следовательно, синтеза

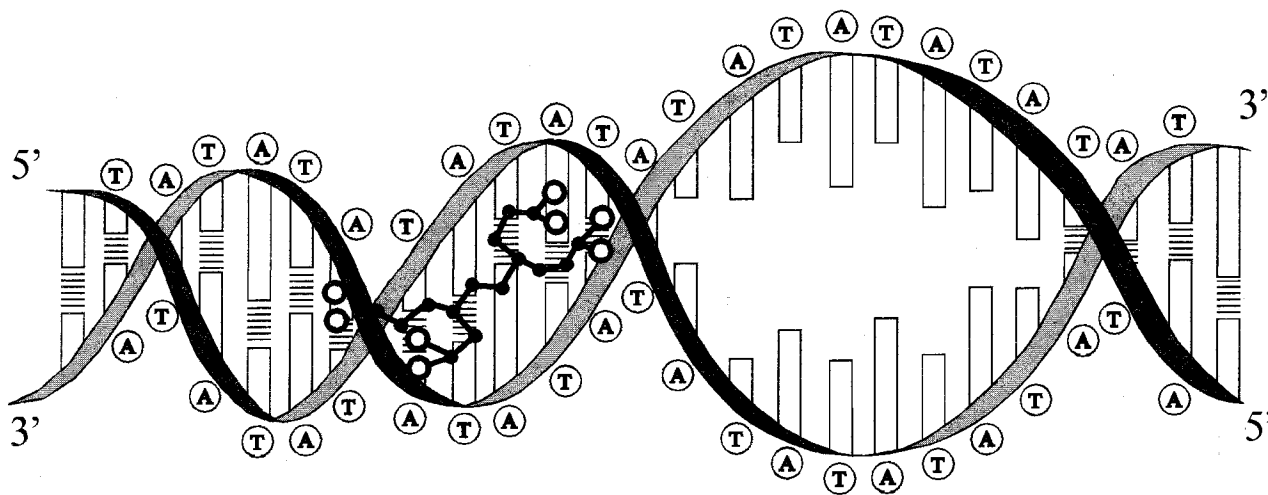


Рис. 3. Схема локального разделения цепей [поли(dA-dT):поли(dA-dT)] в результате связывания регуляторного пептида Ala-Glu-Asp-Gly в большой канавке двойной спирали ДНК.

≡ — водородные связи между аденином и тиминем (модель Уотсона—Крика).

Таблица 2. Энтальпийные коэффициенты парных взаимодействий нуклеотидов и аминокислот, входящих в состав пептида Ala-Glu-Asp-Gly, кДж/моль^{2*}

Аминокислота	Аденин	Тимин
Ala	-1.9	-4.3
Glu	-69.1	-85.1
Asp	-83.5	-43.0
Gly	-1.1	-8.2
Сумма для тетрапептида	-155.6	-140.6

Примечание. *По данным [1].

белка в клетках разных организмов. Указанный механизм взаимодействия двух видов информационных молекул лежит в основе возникновения синтеза белка, что при наличии благоприятных факторов (температуры, воды, газового состава, свободных аминокислот, импульса солнечной энергии и др.) могло привести к появлению жизни на Земле.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биологически активные вещества в растворах. Структура, термодинамика, реакционная способность. М., 2001.

2. Межмолекулярные взаимодействия: от двухатомных молекул до биополимеров / Под ред. Б.Пюльмана. М., 1981.

3. Хавинсон В.Х., Бондарев И.Э., Бутюгов А.А. // Бюл. экспер. биол. 2003. Т. 135, № 6. С. 692-695.

4. Хавинсон В.Х., Лежава Т.А., Малинин В.В. // Там же. 2004. Т. 137, № 1. С. 89-93.

5. Хавинсон В.Х., Шатаева Л.К., Чернова А.А. // Там же. 2003. Т. 136, № 9. С. 328-330.

6. Ivanov V.T., Karelin A.A., Philippova M.M. et al. // Biopolymers. 1997. Vol. 43, N 2. P. 171-188.

7. Jacob F., Monod J. // J. Mol. Biol. 1961. Vol. 3. P. 318-356.

8. Khavinson V.Kh. // Neuro Endocrinol. Lett. 2002. Vol. 23, Suppl. 3. P. 11-144.

9. Khavinson V.Kh., Malinin V.V. Gerontological aspects of genome peptide regulation. Basel, 2005.

10. Khavinson V., Shataeva L., Chernova A. // Neuro Endocrinol. Lett. 2005. Vol. 26, N 3. P. 237-241.

11. Lodish H., Berg A., Zirupsky S.L. et al. Molecular Cell Biology. NY., 2000.

12. Pabo C.O., Nekludova L. // J. Mol. Biol. 2000. Vol. 301, N 3. P. 597-624.

13. Sarai A., Kono H. // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2005. Vol. 34. P. 379-398.

14. Vazquez M.E., Caamano A.M., Mascarenas J.L. // Chem. Soc. Rev. 2003. Vol. 32, N 6. P. 338-349.

15. Warren A.J. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2002. Vol. 12, N 1. P.107-114.

Получено 23.12.05