

УДК 577.1

КОРОТКИЕ ПЕПТИДЫ МОДУЛИРУЮТ ДЕЙСТВИЕ ЭНДОНУКЛЕАЗ
ИЗ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

© 2011 г. В. Х. Хавинсон, Л. И. Федореева, член-корреспондент РАН Б. Ф. Ванюшин

Поступило 07.09.2010 г.

Короткие пептиды (2,3,4-аминокислоты) ингибируют или увеличивают гидролиз ДНК λ -фага сайт-специфическими пшеничными эндонуклеазами WEN1 и WEN2 в зависимости от статуса метилирования ДНК. Модуляция пептидами действия эндонуклеаз, надо полагать, происходит в результате их связывания с ДНК. Пептиды распознают не только определенные последовательности в ДНК, но и статус их метилирования. Пептиды связываются как с ДНК, так и с одно- и двутяжевыми дезоксирибоолигонуклеотидами, содержащими метилируемые у эукариот CNG- и CG-сайты. При гидролизе эндонуклеазами двутяжевых структур пептиды влияют на набор гидролизуемых сайтов. Действие пептидов (бронхоген, эпиталон, пинеалон и др.) на гидролиз ДНК эндонуклеазами различно, и оно модулируется гистонами (гистон H1). Сайт-специфические взаимодействия пептидов с ДНК могут эпигенетически контролировать генетические функции клетки.

В основе физиологического действия изученных нами пептидов лежит их ткане- или геноспецифичное взаимодействие с ДНК [1]. Однако закономерности и механизмы такого избирательного связывания пептидов с ДНК и обусловленные этим изменения в транскрипции все еще мало изучены. От такого связывания пептидов с ДНК должно зависеть действие многих конкурирующих за те же места связывания белков (ферментов), оперирующих с ДНК, в том числе и эндонуклеаз.

Мы изучили действие коротких пептидов на гидролиз ДНК фага λ и олигонуклеотидов, осу-

ществляемый эндонуклеазами пшеницы, и исследовали как на этот процесс может влиять гистон H1. Исследовали изменения флуоресценции меченых олигонуклеотидов под влиянием пептидов. Использованы пептиды: эпиталон (Ala-Glu-Asp-Gly), пинеалон (Glu-Asp-Arg), бронхоген (Ala-Asp-Glu-Leu), тестаген (Lys-Glu-Asp-Gly), кардиоген (Ala-Glu-Asp-Arg), панкреоген (Lys-Glu-Asp-Trp) [2]. Эндонуклеазы WEN1 и WEN2 выделяли из колеоптилей пшеницы [3], как описано ранее [4, 5]. WEN1 предпочтительно гидролизует по CNG-сайтам метилированную ДНК (dcm^+ , dam^+) фага λ [4], содержащую остатки 5-метилцитозина в последовательностях Cm^5CWGG и остатки N^6 -метиладенина в Gm^6ATC -сайтах. WEN2 гидролизует неметилированную ДНК (dcm^- , dam^-) [5]. ДНК гидролизовали ферментами WEN1 и WEN2 в разработанных нами стандартных и идентичных условиях без добавления [4, 5] либо с добавлением в реакционную смесь пептидов (1, 2 мкг на 1 мкг ДНК). Продукты гидролиза ДНК и олигонуклеотидов разделяли электрофорезом соответственно в 1.5%-ной агарозе и 20%-ном полиакриламидном геле. Спектры флуоресценции олигонуклеотидов снимали на спектрофлуориметре Perkin-Elmer LS55 (США).

Эпиталон подавляет гидролиз неметилированной ДНК ферментом WEN2 (рис. 1а, 5); в присутствии гистона H1 это ингибирующее действие пептида менее выражено (дорожка 6). По-видимому, гистон H1 снижает ингибирующее действие эпиталона, делая некоторые сайты ДНК более доступными для гидролиза ферментом. В присутствии бронхогена ДНК избирательно гидролизуется до фрагментов длиной около 140 нуклеотидов. По-видимому, бронхоген связывается с иными (чем эпиталон) сайтами ДНК, защищая их от гидролиза. Под влиянием гистона H1 это защитное действие бронхогена снимается (дорожка 8) и ДНК гидролизуется полностью, как в контроле. Пинеалон практически не влияет на гидролиз неметилированной ДНК ферментом WEN2 (дорожка 9), однако с гистонами H1 он сильно ингибирует гидролиз этой ДНК (дорожка 10). Сам по себе гистон H1 не влиял на гидролиз ДНК (дорожка 4). Следовательно, различные пептиды модулируют дей-

Санкт-Петербургский институт
биорегуляции и геронтологии
Российской Академии медицинских наук
Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии
Российской академии сельскохозяйственных наук,
Москва
Научно-исследовательский институт
физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, Москва

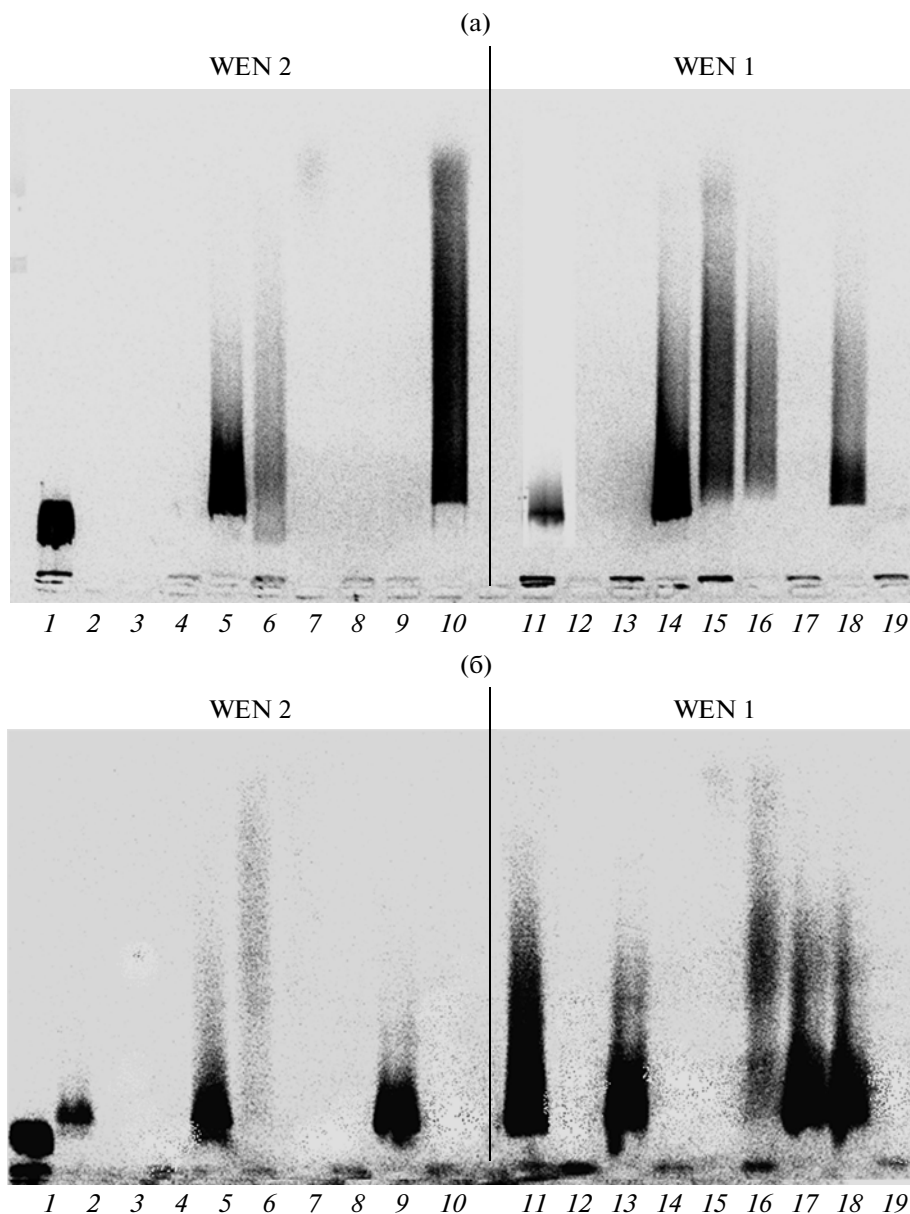


Рис. 1. Электрофоретическое разделение (в 1.5%-ной агарозе) продуктов гидролиза неметилированной (а) и метилированной (б) λ -фаговой ДНК эндонуклеазами WEN1 и WEN2. 1 – неметилированная фаговая ДНК; 2 – 1 + фермент WEN2; 3 – 2 + Mg^{2+} ; 4 – 2 + гистон H1; 5 – 2 + эпителион; 6 – 4 + эпителион; 7 – 2 + бронхоген; 8 – 4 + бронхоген; 9 – 2 + пинеалон; 10 – 4 + пинеалон; 11 – 1 + фермент WEN1; 12 – 11 + Mg^{2+} ; 13 – 11 + гистон H1; 14 – 11 + эпителион; 15 – 13 + эпителион; 16 – 11 + бронхоген; 17 – 13 + бронхоген; 18 – 11 + пинеалон; 19 – 13 + пинеалон.

ствие эндонуклеазы по-разному и их действие может быть опосредовано гистонами. Это – очень важный факт, поскольку в клетке пептиды изначально должны найти в хроматине те места, которые доступны для связывания с ДНК, а эта доступность может определяться гистонами.

Эпителион практически не влиял на гидролиз метилированной ДНК ферментом WEN2 (рис. 16, 5), но полностью подавлял гидролиз неметилированной ДНК (рис. 1а, 5). Это означает, что пептид “распознает” метилированную и неметилированную

ДНК и, по-видимому, по-разному с ними взаимодействует. Бронхоген сильно активизирует гидролиз метилированной ДНК ферментом WEN2 (рис. 16, 7). Значит, действие эпителиона и бронхогена на гидролиз метилированной ДНК имеет противоположный характер. Пинеалон не влияет на гидролиз разных по метилированию ДНК, но в присутствии гистона H1 пептид ингибирует гидролиз неметилированной ДНК (рис. 1а, 10), а метилированной ДНК – стимулирует (рис. 16, 10).

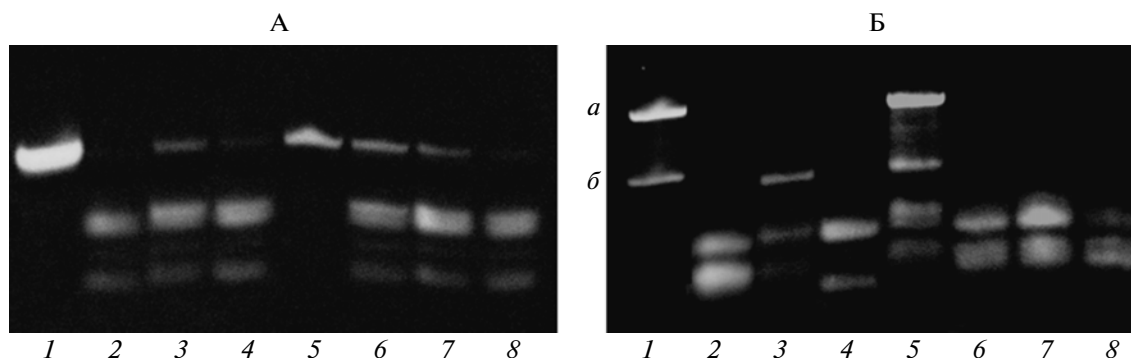


Рис. 2. Электрофоретическое разделение (в 20%-ном полиакриламидном геле) продуктов гидролиза флуоресцентно-меченных однотяжевого 5'-FAM-CGC CGC CAG GCG CCG CCG CG-3' (А) и двутяжевого 5'-FAM-CGC CGC CAG GCG CCG CCG CG-3'/3'-GCG GCG GTC CGC GGC GGC GC-FAM-5' (Б) дезоксирибоолигонуклеотидов эндонуклеазой WEN1. 1 – олигонуклеотид 2 – 1 + фермент + Mg²⁺; 3 – 2 + эпیتالон; 4 – 2 + бронхоген; 5 – 2 + кардиоген; 6 – 2 + панкреатин; 7 – 2 + пинеалон; 8 – 2 + тестаген. На Б: а – двутяжевый, б – смесь однотяжевых.

Эпیتالон, бронхоген и пинеалон ингибируют гидролиз неметилированной ДНК ферментом WEN1 (рис. 1а, 14, 16, 18). В отличие от WEN2 фермент WEN1 в присутствии пинеалона полностью гидролизует неметилированную ДНК в комплексе с гистоном (рис. 1а, 19). Степень гидролиза метилированной ДНК ферментом WEN1 увеличивается эпیتالоном (рис. 1б, 14).

Эпیتالон, бронхоген, пинеалон, панкреатин и тестаген частично и в разной степени ингибируют ферментом WEN1 гидролиз дезоксирибоолигонуклеотида 5'-FAM-CGC CGC CAG GCG CCG CCG CG-3', содержащего метилируемые у эукариот CNG- и CG-сайты, а кардиоген блокирует этот гидролиз (рис. 2А, 5). Панкреатин, пинеалон и тестаген не влияют на гидролиз двутяжевого олигонуклеотида 5'-FAM-CGC CGC CAG GCG CCG CCG CG-3'/3'-GCG GCG GTC CGC GGC GGC GC-FAM-5' (рис. 2Б, 6–8). Эпیتالон ингибирует гидролиз однотяжевого олигонуклеотида (рис. 2А, 3), но стимулирует гидролиз двутяжевого (рис. 2Б, 3). Если судить по интенсивности флуоресценции полос (рис. 2Б, 3), то эпیتالон способствует расплетанию цепей ДНК. Бронхоген не блокирует гидролиз одно- и двутяжевых структур, но изменяет его сайтовую специфичность. Кардиоген, в отличие от блокады гидролиза однотяжевых структур (рис. 2А), только частично подавляет гидролиз двутяжевого олигонуклеотида (рис. 2Б, 5).

Эпیتالон сильно тушит флуоресценцию дезоксирибо-5'-FAM-CGC CGC CAG GCG CCG CCG CG-3' (рис. 3А), что свидетельствует о высокой константе связывания пептида с олигонуклеотидом. Бронхоген слабее тушит его флуоресценцию. Кардиоген вообще не изменяет флуоресценцию олигонуклеотида. Между тем кардиоген полностью ингибировал гидролиз этого олигонуклеотида ферментом WEN1 (рис. 2А, 5). По-видимому, резкое подавление гидролиза ДНК кардиогеном обусловлено его взаимодействием с

ферментом, а не с ДНК. Ни один из изученных пептидов не тушил флуоресценцию меченого полидезоксирibo-С. Следовательно, пептиды обладают сайтовой избирательностью связывания с ДНК (олигонуклеотидами). Пептиды тушат флуоресценцию и двутяжевого олигонуклеотида (рис. 3Г), т.е. они могут интеркалировать в спираль ДНК. Если судить по разной степени тушения флуоресценции (рис. 3А, Г), то пептиды предпочтительнее связываются с однотяжевыми структурами.

Выявленное нами специфическое связывание пептидов с одноцепочечными олигонуклеотидами имеет особое значение. В ДНК всегда есть или появляются однотяжевые участки (цепи), особенно при репликации, рекомбинации и репарации. Взаимодействие коротких пептидов именно с такими участками может контролировать эти генетические процессы. Итак, нами впервые показано, что короткие пептиды модулируют действие эндонуклеаз. Эта модуляция в основном происходит благодаря сайт-специфическому связыванию пептид–ДНК.

Нами открыта тканевая, субклеточная и возрастная специфичность метилирования ДНК [6] и впервые показано, что характер метилирования ДНК в раковых клетках иной, чем в нормальных [7]. Мы постулируем, что один и тот же биологически активный пептид будет по-разному связываться с ДНК в зависимости от ее метилирования и по-разному воздействовать на геном: в различных тканях (клетках), в ядре и митохондриях, в молодых и старых клетках, в нормальных и раковых клетках. Почти все эти постулаты подтверждены экспериментально [1, 2].

Обнаруженный нами феномен модуляции действия эндонуклеаз короткими пептидами может быть лишь частью глобального биологического закона: сайт-специфично связывающиеся с ДНК (особенно с регуляторными элементами генома) пептиды должны модулировать функции

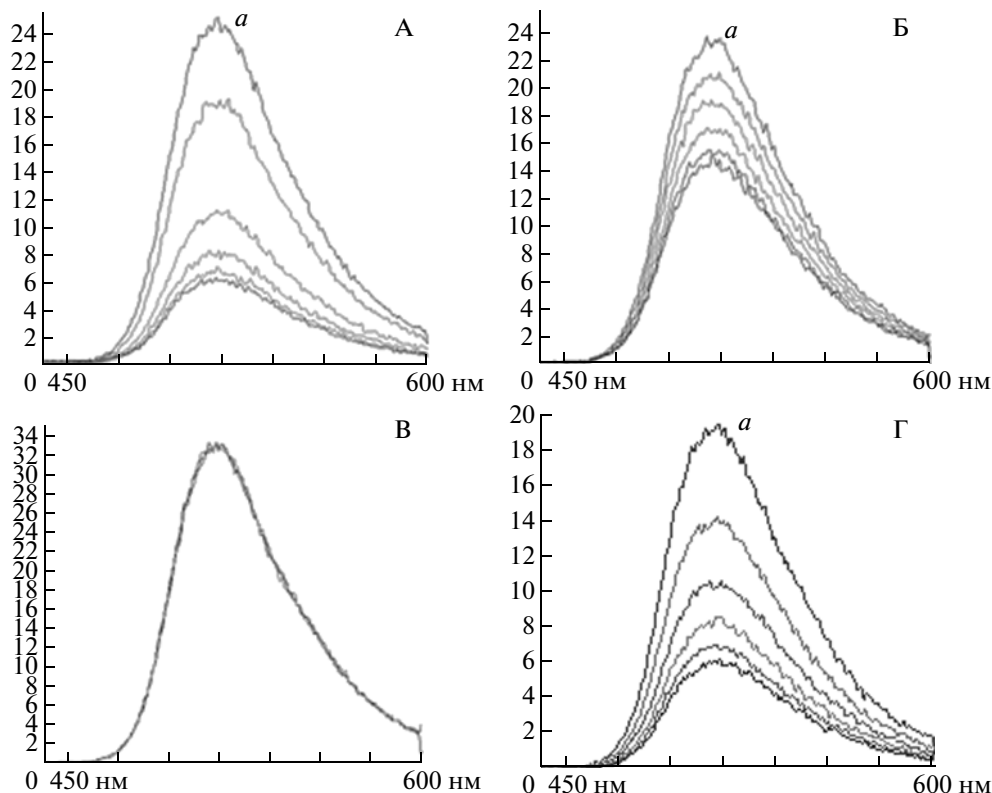


Рис. 3. Спектры флуоресценции флуоресцентно-меченного однострессового дезоксирибоолигонуклеотида 5'-FAM-CGC CGC CAG GCG CCG CCG CG-3' до (кривые *a*) и после (остальные кривые) титрования пептидами (А – эпیتالлоном, Б – бронхогеном, В – кардиогеном) и двустрессового олигонуклеотида 5'-FAM-CGC CGC CAG GCG CCG CCG CG-3'/3'-GCG GCG GTC CGC GGC GGC GC-FAM-5' (титрование эпیتالлоном – Г).

многих взаимодействующих с ДНК белков (РНК- и ДНК-полимеразы, ДНК-метилтрансферазы и многие регуляторные факторы). Так, определенные гексапептиды являются строго селективными лигандами для свободных от белка Holliday junctions и блокируют рекомбинацию [8]. Мы предлагаем один из наиболее вероятных механизмов активации генов короткими пептидами: пептиды селективно связываются с промоторными CNG- или CG-сайтами, что делает эти сайты недоступными для ДНК-метилтрансфераз и в результате промотор остается неметилированным, а это – решающий элемент активации генов.

Таким образом, специфические (комплементарные) пептид–ДНК-взаимодействия могут эпигенетически контролировать генетические функции клетки, и, вероятно, они играли очень важную роль уже на самых ранних этапах зарождения жизни и эволюции.

Благодарим Я.И. Алексева и А.В. Кузубова (ЗАО “Синтол”) за предоставление флуоресцент-

но-меченных дезоксирибоолигонуклеотидов. Работа поддержана грантами РФФИ 08–04–00012-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Khavinson V.Kh.* Gerontological Aspects of Genome Peptide Regulation. Basel: Karger AG, 2005. 104 p.
2. *Хавинсон В.Х.* Пептидная регуляция старения. СПб.: Наука, 2009. 50 с.
3. *Bakeeva L.E., Kirnos M.D., Aleksandrushkina N.I. et al.* // FEBS Lett. 1999. V. 457. P. 122–125.
4. *Fedoreyeva L.I., Sobolev D.E., Vanyushin B.F.* // Epigenetics. 2007. V. 2. P. 50–53.
5. *Федореева Л.И., Соболев Д.Е., Ванюшин Б.Ф.* // Биохимия. 2008. Т. 73. С. 1243–1251.
6. *Vanyushin B.F., Tkacheva S.G., Belozersky A.N.* // Nature. 1970. V. 225. P. 948–949.
7. *Romanov G.A., Vanyushin B.F.* // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 653. P. 204–218.
8. *Ranjit D.K., Rideout M.C., Nefzi A., et al.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010. V. 20. P. 4531–4534.