

УДК 541.64.547.96

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ С БЕЛКАМИ В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

© 2000 г. И. Ю. Ряднова*, Л. К. Шатаева*, В. Х. Хавинсон**

*Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук
199004 Санкт-Петербург, Большой пр., 31

**Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии
197110 Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3

Поступила в редакцию 22.04.99 г.

Принята в печать 14.09.99 г.

Методами спектроскопии, гель-хроматографии и мембранный диффузии изучены физико-химические особенности образования интерполимерных комплексов ДНК с инсулином, кортексином, цитохромом С в нейтральной области рН. Выбранные белки различаются кислотно-основными свойствами и не являются природными лигандами ДНК. Комpleксы ДНК с изученными белками сохраняют устойчивость при увеличении ионной силы раствора до 0.5 моль/л. Изотермы связывания ДНК с белками при ионной силе раствора 0.3 моль/л и рН 7.8–8.2 носят кооперативный характер. Характеристическая вязкость ДНК в присутствии белков уменьшается симбатно с количеством связанного белка.

Нуклеиновые кислоты – природные высокомолекулярные жесткоцепные полиэлектролиты, способные к разнообразным межмолекулярным взаимодействиям. Однако большие ММ (10^6 – 10^8) и высокая вязкость затрудняют изучение физико-химических особенностей таких взаимодействий в растворах.

Известно, что межмолекулярные реакции белков и нуклеиновых кислот осуществляются на всех этапах репликации и экспрессии ДНК, а также в ходе процессов эндогенной регуляции. Тем не менее представления о физико-химическом механизме таких взаимодействий остаются неполными. В работах школы академика В.А. Кабанова широко исследованы не только физико-химические особенности связывания ДНК с синтетическими полиэлектролитами [1, 2], но и определены перспективы использования соответствующих комплексов для доставки генетического материала в клетку [3, 4]. Одновременно исследованы особенности образования интерполимерных комплексов белковых макромолекул с синтетическими или природными полимерами, несущими сульфо- и карбоксильные группы [5–7]. Однако закономерности связывания нуклеиновых кислот с белками и стабильность нуклеопро-

теиновых комплексов (НПК) не были достаточно изучены.

НПК играют важную роль в регуляции функций организма – белковые молекулы с разными кислотно-основными свойствами входят в состав хроматина эукариотической клетки [8]. Как известно, хроматин (вещество хромосом) содержит 50% ДНК и 50% белковых компонентов. Нормальное соотношение между делящимися и покоящимися клетками – митотическое равновесие в постоянно функционирующих органах и тканях поддерживается с помощью специфических белков, выполняющих регуляторные функции (ядерных белков-регуляторов), связанных с ДНК [9]. Поэтому исследование особенностей комплексообразования ДНК и белков представляет большой практический интерес для создания новых пролонгированных форм лекарственных препаратов, направленно корректирующих функциональную активность организма на молекулярном уровне.

В настоящей работе исследованы процессы комплексообразования глобулярных белков: инсулина, кортексина и цитохрома С с ДНК. Целью экспериментов являлось установление количественных закономерностей связывания этих компо-

нентов в растворе, исследование устойчивости полученных комплексов и определение изменения конформации ДНК при взаимодействии с белками.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали натриевую соль ДНК из селезенки крупного рогатого скота производства НПО "Биохимреактив" Олайнского завода химреактивов, инсулин бычий, кортексин, цитохром С производства завода медпрепаратов АО "Самсон" (Санкт-Петербург). Кортексин представляет собой препарат, выделенный из мозга крупного рогатого скота, содержащий линейные пептиды. В их состав входят нейропептид Y и нейропинины A и B, которые содержат гомологические участки (Асп-Сер-Фен-Вал-Гли-Лей-Мет). Эти пептиды проявляют нейротрофическую активность и их ММ не превышают 1×10^4 [10].

Приготовление раствора ДНК заданной концентрации начинали с замачивания навески в небольшом объеме дистиллированной воды на холду. Набухание и сольватация нативной ДНК длилось 16–20 ч, затем набухшую ДНК растворяли в фосфатном буферe pH 7.8–8.0 с добавлением хлористого натрия до ионной силы 0.3 моль/л. Концентрация ДНК в рабочих растворах не превышала 1.0 мг/см³. Нативность ДНК определяли по наличию значительного гиперхромного эффекта после кипячения раствора ДНК с последующим немедленным охлаждением на льду [11]. Концентрацию ДНК контролировали по оптической плотности при длине волн 260 нм, концентрацию белков находили по методу Лоури (калибровка по сывороточному альбумину). Концентрацию цитохрома С рассчитывали из калибровочной прямой по оптической плотности растворов при длине волн 410 нм. Калибровку выполняли по препарату цитохрома С фирмы "Serva".

В данной работе изучали комплексообразование нативной ДНК с инсулином (изоэлектрическая точка рI 5.4), кортексином (рI 9.5) и цитохромом С (рI 10.6) [12], при этом ДНК рассматривали как природный полиэлектролит, обладающий функциональными одноосновными фосфатными группами и заряженными группами нуклеотидов [13]. На основании данных об аминокислотном составе и константах диссоциации белков [14–16] рассчитывали сумму положительных и отрицательных зарядов молекулы белка. При выбранном значении pH заряды молекул таковы: инсулин – 2⁻ (4⁺; 6⁻), цитохром С – 4⁺ (24⁺; 20⁻), кортексин 2⁺ (6⁺; 4⁻). Таким образом, выбранное значение pH 7.8–8.3 для кортексина и цитохрома

определяет избыток положительных зарядов, тогда как для инсулина при этом значении pH молекула несет избыточный отрицательный заряд.

Комплексообразование проводили смешением растворов ДНК и белков в том же буферном растворе и последующей инкубацией в холодильнике при +4°C в течение 16–20 ч. УФ-спектры растворов ДНК, инсулина, кортексина, цитохрома С и их смесей получали на спектрофотометре СФ-26. Устойчивость комплексов ДНК с белками исследовали методом ГПХ на Сефадексе G-200 Superfine при различной ионной силе раствора (колонка 2.0 × 60 см). На колонку наносили комплекс в 1 мл раствора и проводили элюирование фосфатным буфером pH 8.0 с добавлением NaCl до ионной силы 0.1, 0.3, 0.5 моль/л. Содержание белка по пикам хроматограмм определяли методом Лоури.

Связывание белков с ДНК исследовали методом мембранных диализа [17]. Кинетику диффузии белков через пористые мембранны измеряли в двухкамерной ячейке с объемом камер 50 см³ и окошком диаметром 2.65 см. Для диализа использовали сложенные вдвое трековые мембранны на основе лавсана толщиной 10 мкм, с диаметром пор 0.46 мкм. Выбранная пористость обеспечивает беспрепятственное прохождение свободного белка, тогда как ДНК и ее комплексы полностью задерживаются. В контрольных экспериментах измеряли проницаемость белка в отсутствие ДНК. В ресурсную камеру помещали растворы белков, в приемную камеру – буферный раствор. Диффузию наблюдали по увеличению концентрации белка в приемной камере, отбирая пробы через фиксированные промежутки времени и определяя оптическую плотность раствора. Коэффициент проницаемости P (см²/с) белка через мембранны определяли по увеличению оптической плотности раствора в приемной камере при длине волн 260 и 280 нм по формуле [18]

$$P = \frac{4c_t VL}{\pi D^2 t c_0}, \quad (1)$$

где c_t – концентрация белка в приемной камере в момент t , мг/см³; t – время, с; V – объем камеры, см³; D – диаметр окошка, см; L – толщина мембранны, см; c_0 – начальная концентрация белка в ресурсной камере, мг/см³.

В той же ячейке проводили аналогичный эксперимент, помещая в ресурсную камеру инкубированную систему белок–ДНК. Измеряли диффузию свободного белка из ресурсной камеры и по эффективной проницаемости P рассчитывали концентрацию свободного белка, который нахо-

дится в равновесии с комплексом. Концентрацию белка ($\text{мг}/\text{см}^3$), связанного в комплекс, вычисляли по уравнению

$$c_k = c_0 - c_p, \quad (2)$$

где c_0 – исходная концентрация белка при проведении комплексообразования, $\text{мг}/\text{см}^3$; c_p – равновесная концентрация свободного белка, не связанного в комплекс, $\text{мг}/\text{см}^3$.

Определение характеристической вязкости проводили методом последовательных разведений растворов, используя вискозиметр Оствальда с капилляром 0.73 мм при 20°C . Экстраполяцией зависимости приведенной вязкости от концентрации вещества определяли характеристическую вязкость для свободной ДНК и ее комплексов с инсулином и цитохромом С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены УФ-спектры растворов ДНК, инсулина и их смеси, а также рассчитанный по аддитивной схеме спектр смеси. Появление гиперхромного эффекта в случае смешивания ДНК и белков (кривая 4) свидетельствует об изменении конформации ДНК в результате образования интерполимерного комплекса нуклеиновой кислоты с белком. Для смесей ДНК с кортексином и цитохромом С получены аналогичные данные. Известно, что комплексообразование между макромолекулами полиэлектролитов осуществляется за счет ионных связей, гидрофобных или ион-дипольных взаимодействий [5]. В системах с участием ДНК – это взаимодействия фосфатных групп и аминогрупп оснований в составе двойной спирали с кислыми и основными боковыми группами аминокислотных звеньев белка [13]. Образование комплексов ДНК–кортексин, ДНК–инсулин и ДНК–цитохром С за счет полярных взаимодействий полиамфолитных макромолекул представляется вполне закономерным.

Чтобы определить характер межмолекулярных взаимодействий при образовании комплекса ДНК–инсулин, методом гель-хроматографии исследовали устойчивость комплекса в растворах с различной ионной силой. Соответствующие гель-хроматограммы представлены на рис. 2. Видно, что во всем диапазоне ионной силы белковый компонент (инсулин) проявляется в виде интенсивного пика слева на хроматограммах вместе с высокомолекулярной ДНК. При этом концентрация белка одинакова во всех экспериментах независимо от ионной силы раствора. Иначе говоря, добавление низкомолекулярного электролита не приводит к диссоциации комплекса ДНК–инсулин. По-види-

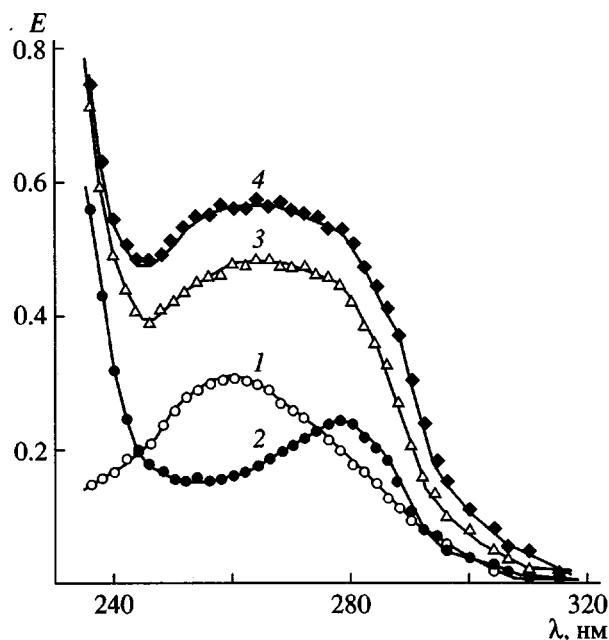


Рис. 1. УФ-спектры ДНК (1), инсулина (2), спектр смеси, рассчитанный по аддитивности (3), комплекса ДНК с инсулином (4). E – оптическая плотность растворов.

мому, взаимодействие ДНК и этого белка осуществляется не только за счет электростатического притяжения, но главным образом за счет других типов межмолекулярных взаимодействий. Возможно, к ним относится взаимодействие полипептидной цепи белка с двойной спиралью ДНК, при котором β -слой встраивается в “минорный” желобок спирали нуклеиновой кислоты, со стороны O^2 атома пиримидина и N^3 атома пурина [13].

Учитывая тот факт, что комплексообразование происходит между полиэлектролитом с $M \sim 1.9 \times 10^5$ (ДНК) и белком с ММ на 2 порядка меньшей, определяли мольное соотношение компонентов в комплексе. Для этого исследовали комплексообразование ДНК с инсулином, кортексином и цитохромом С в различных соотношениях (по массе) методом мембранных диффузии. На рис. 3 показана кинетика диффузии свободного (не связанного с ДНК) инсулина и цитохрома С через трековые мембранны. Аналогичные зависимости были получены и для системы ДНК–кортексин. По уравнениям (1) и (2) рассчитывали концентрации свободного и связанного в комплексе белка в ресурсной камере. При расчете коэффициента проницаемости по методу [18] рассматривали только начальные прямолинейные участки полученных кривых. Видно, что при варьировании соотношения компонентов в системе ДНК–белок, меняется концентрация свободного белка в ре-

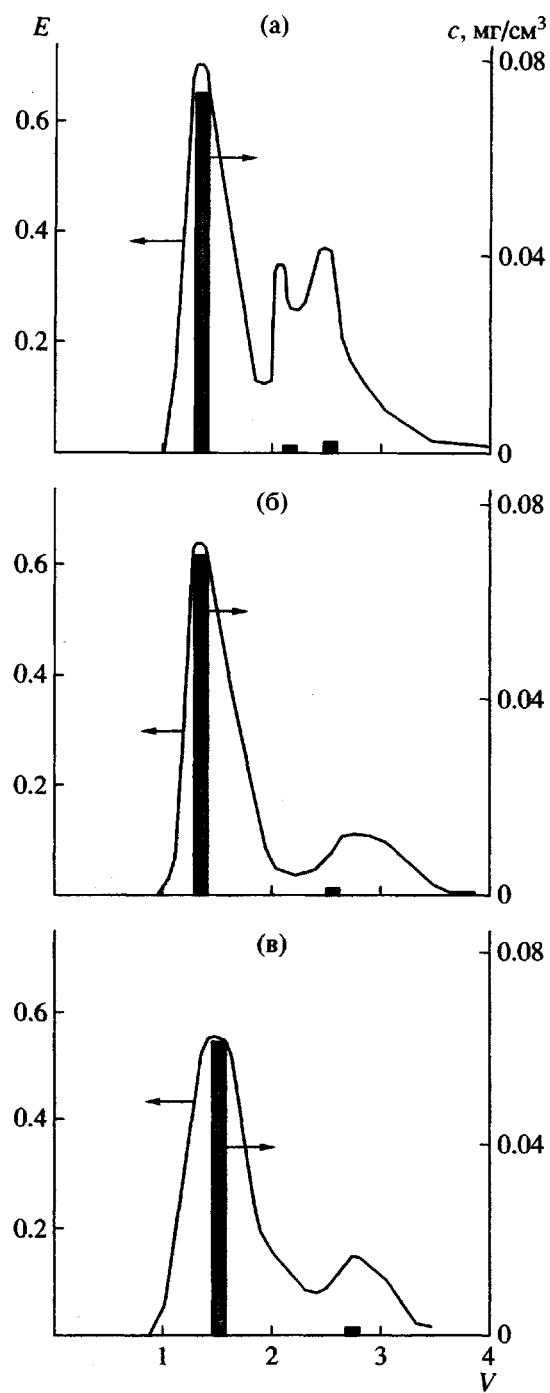


Рис. 2. Гель-хроматограммы растворов комплекса ДНК-инсулин при ионной силе 0.1 (а), 0.3 (б) и 0.5 моль/л (в). V – относительный объем выхода (отношение объема выхода пробы к объему удерживания); E – оптическая плотность растворов при длине волны 260 нм, c – концентрация белка.

сурсной камере, что связано с разной степенью ассоциации белка с ДНК. Полученные данные позволяют построить изотермы связывания ДНК с исследованными белками. Отношение количе-

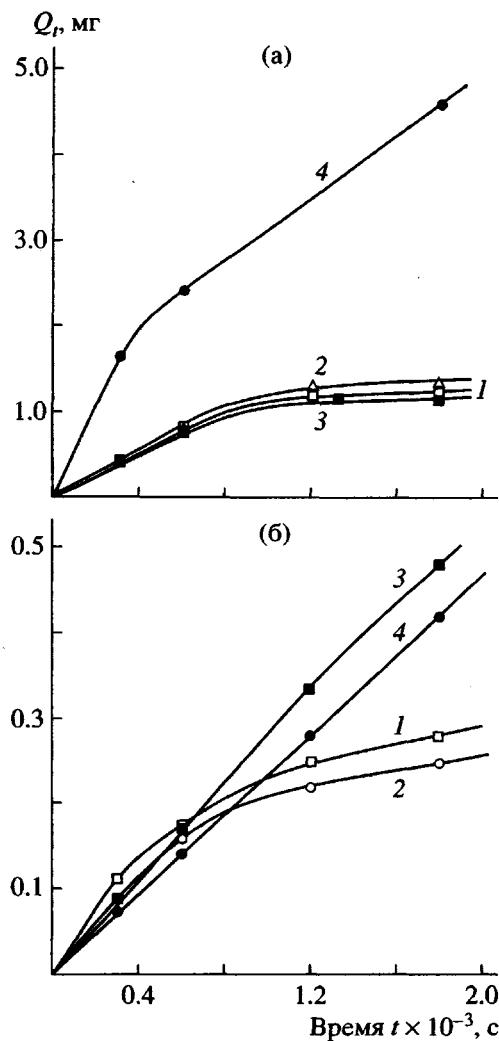


Рис. 3. Диффузия Q_t свободного инсулина из раствора белка и из раствора комплекса через трековые мембранны: а – инсулин (1), ДНК : инсулин в соотношении 1 : 3 (2), 1 : 7 (3), 1 : 16 (4); б – цитохром С (1), ДНК : цитохром С в соотношении 1 : 3 (2), 1 : 6 (3), 1 : 16 (4).

ства связанного белка к количеству ДНК – степень связывания m . Изотермы связывания для изучаемых систем представлены на рис. 4. Процесс комплексообразования для всех случаев описывается кооперативной изотермой. При взаимодействии ДНК с цитохромом С происходит резкое возрастание степени связывания после достижения концентрации свободного белка в растворе, равной 0.5 мг/см³, тогда как при связывании инсулина линейный участок изотермы наблюдается до концентрации белка 3.5 мг/см³.

В таблице приведены полученные характеристики для начального участка изотермы связывания. Массовое соотношение ДНК–белок в комплексах было пересчитано на число нуклеотидных

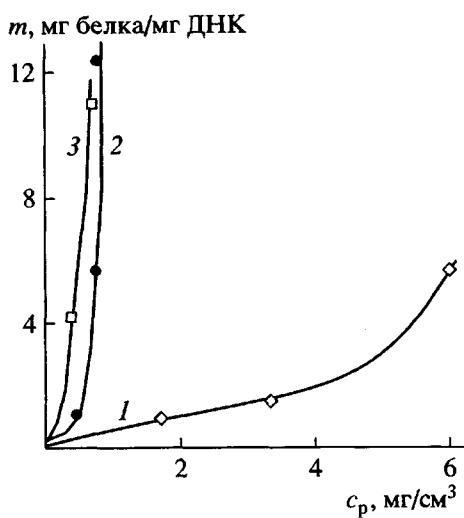


Рис. 4. Изотермы связывания инсулина (1), цитохрома С (2) и кортексина (3) с ДНК. m – степень связывания, c_p – равновесная концентрация свободного белка.

звеньев, приходящихся на 1 молекулу связанного белка. В условиях эксперимента (ионная сила 0.3 моль/л, pH 8.0) инсулин находится в растворе в виде димера, что было нами подтверждено при гель-хроматографическом исследовании чистого инсулина. Для оценки селективности комплексообразования пользовались величиной коэффициента связывания k :

$$k = \left(\frac{dc_k}{dc_p} \right)_{c_p \rightarrow 0}$$

Из таблицы видно, что коэффициент связывания ДНК с белками, не обладающими специфичностью связывания с нуклеиновыми кислотами, намного ниже, чем у кортексина, который содержит нейрогормоны, обладающие селективностью по отношению к ДНК. По данным таблицы, селективное взаимодействие кортексина с ДНК соответствует меньшему количеству нуклеотидных звеньев, приходящихся на одну молекулу белка на начальном этапе связывания.

Исследуемые вещества являются макромолекулами и большое значение в процессах их взаимодействия имеют стерические факторы и конформационные изменения, происходящие при комплексообразовании. Из литературы известно, что изменение структуры молекулы ДНК в растворе сопровождается увеличением оптической анизотропии [19] и уменьшением характеристической вязкости [20].

На рис. 5 приведена зависимость характеристической вязкости ДНК от количества звеньев нуклеиновой кислоты, которые связывают одну

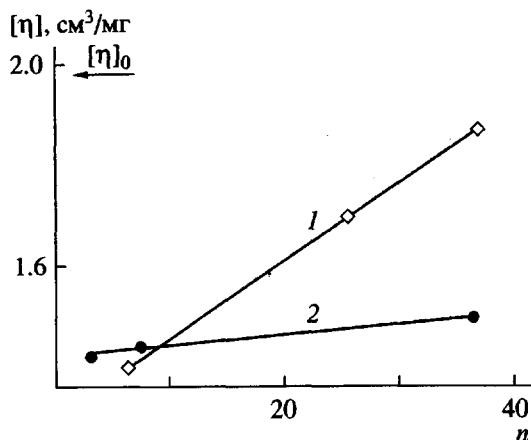


Рис. 5. Зависимость характеристической вязкости $[\eta]$ нуклеопротеиновых комплексов ДНК-инсулин (1) и ДНК-цитохром С (2) от количества звеньев ДНК n , приходящихся на одну молекулу белка; характеристическая вязкость свободной ДНК отмечена на ординате как $[\eta]_0$.

молекулу белка, т.е. плотности заполнения ДНК молекулами белка. Так, инсулин является кислым глобулярным белком и в случае комплекса ДНК-инсулин (кривая 1). При увеличении массового соотношения ДНК-белок от 1 : 3 до 1 : 16 уменьшается количество звеньев ДНК, связывающих молекулу белка, и характеристическая вязкость снижается от 1.90 ± 0.15 см³/мг до 1.40 ± 0.15 см³/мг, тогда как у нативной ДНК характеристическая вязкость равна 2.0 ± 0.15 см³/мг. Это показывает, что связывание ДНК с глобулярными белками определяется не только электростатическим взаимодействием положительных зарядов белка, но и дополнительными взаимодействиями. В частности, можно предполагать укладку α - и β -участков белка в "минорный" желобок спирали ДНК за счет образования связей между отрицательными зарядами белковой молекулы и положительными зарядами нуклеотидной цепи.

Основные характеристики интерполимерных комплексов ДНК с белками

Белок	$M \times 10^{-4}$	Коэффициент связывания k	n^*
Инсулин	1.2	0.6 ± 0.1	37
Кортексин	1.0	5.3 ± 0.1	7.5
Цитохром С	1.3	2.2 ± 0.1	37

*Количество звеньев ДНК, приходящееся на одну молекулу белка в комплексе.

Известно, что при взаимодействии ДНК с щелочными белками класса гистонов, происходит компактизация линейной макромолекулы [21]. Цитохром С является белком, который близок по кислотно-щелочным свойствам к гистонам, а также по избытку положительных зарядов его свойства близки к свойствам протаминов. В случае нуклеопротеинового ДНК–цитохром С (кривая 2) уже для весового соотношения 1 : 3 характеристическая вязкость снижается до $1.5 \pm 0.15 \text{ см}^3/\text{мг}$ и затем до $1.4 \pm 0.15 \text{ см}^3/\text{мг}$ при соотношении 1 : 16.

Из этих данных можно сделать вывод, что процесс компактизации ДНК при взаимодействии с белками, различающимися кислотно-основными и физиологическими свойствами, идет по-разному. Изменения характеристической вязкости свидетельствуют о том, что при взаимодействии ДНК с инсулином происходит постепенное уплотнение структуры ДНК, затем образование конформации “ожерелье” и последующая суперспирализация комплекса, как это было показано для взаимодействия ДНК с гистонами [20]. Такая компактизация объясняет отсутствие диссоциации комплекса ДНК–инсулин при увеличении ионной силы. При связывании ДНК с цитохромом С, процесс компактизации протекает намного быстрее. При наличии белка происходит практически полное его связывание с образованием нелинейных структур типа “ожерелье”, дальнейшее увеличение количества белка также ведет к суперспирализации молекулы ДНК. При этом предел компактизации интерполимерного комплекса нуклеиновой кислоты с белком примерно одинаков при насыщении белками независимо от их физических свойств.

Таким образом, комплексообразование ДНК с инсулином, кортексином, цитохромом С определяется кислотно-основными свойствами белков, соотношением компонентов в комплексе, а также специфичностью взаимодействия макромолекул и соответствующим изменением конформации ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кабанов В.А., Жирякова М.В., Каргов С.И., Зезин А.Б., Изумрудов В.А. // Докл. РАН. 1993. Т. 332. № 6. С. 722.
2. Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1994. Т. 36. № 2. С. 183.
3. Kabanov A.V., Astafyeva I.V., Chikindas M.L., Rosenblat G.F., Kiselev V.I., Severin E.S., Kabanov V.A. // Biopolymers. 1991. V. 31. P. 1437.
4. Kabanov A.V., Kabanov V.A. // Bioconjugate Chem. 1995. V. 6. P. 7.
5. Харенко О.В., Изумрудов В.А., Харенко А.В., Кацакин В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1980. Т. 22. № 1. С. 218.
6. Гликкина М.В., Кузнецова Н.П., Болотина И.Н., Самсонов Г.В. // Молек.биология. 1970. Т. 4. № 5. С. 692.
7. Стеценко Д.А., Лубяко Е.Н., Попанов В.К., Ажиккина Т.Л., Свердлов Е.Д. // Докл. РАН. 1995. Т. 343. № 6. С. 834.
8. Воробьев В.И. // Сб. науч. тр. “Молекулярные и клеточные аспекты биотехнологии”. Л.: Наука, 1986. С. 18.
9. Bullough W.S. // Biol. Revue. 1975. V. 50. P. 99.
10. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г., Чалисова Н.И., Окулов В.Б. // Цитология. 1997. Т. 39. № 7. С. 571.
11. Дэвидсон Дж. Биохимия нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1976.
12. Zeng X., Rucken E. // J. Membrane Sci. 1998. V. 148. P. 195.
13. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987.
14. Чанг Р. Физическая химия с приложениями к биологическим системам. М.: Мир, 1980.
15. Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology. Oxford.: Oxford Univ. Press, 1997. P. 447.
16. Кузник Б.И., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Цитомедины. СПб: Наука, 1998.
17. Тищенко Г.А., Мchedлишвили Б.В., Грушка Э., Тырачкова В., Попович А.М., Шашков Б.В., Шатаева Л.К. // Докл АН СССР. 1989. Т. 308. № 3. С. 655.
18. Crank J. The Mathematics of Diffusion. Oxford.: Clarendon Press, 1975. P. 51.
19. Касьяnenko Н.А., Назарова О.В., Панарин Е.Ф. // Сб. докл. II Междунар. конф. “Химия высокоорганизованных веществ и научные основы нанотехнологии”. СПб., 1998. С. 35.
20. Радченко И.Г., Пономаренко М.Н., Глазова Н.В., Иозен А.А. // Журн. прикл. химии. 1997. Т. 70. № 6. С. 1040.
21. Киселева О.И., Пышкина О.А., Кумазава Н., Сергеев В.Г., Яминский И.В. // Сб. докл. II Междунар. конф. “Химия высокоорганизованных веществ и научные основы нанотехнологии”. СПб, 1998. С. 104.

DNA-Protein Interaction Studied in Model Systems**I. Yu. Ryadnova*, L. K. Shataeva*, and V. Kh. Khavinson******Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences,
Bol'shoi pr. 31, St. Petersburg, 199004 Russia****Institute of Bioregulation and Gerontology,
pr. Dinamo 3, St. Petersburg, 197110 Russia*

Abstract—Physicochemical conditions for the formation of interpolymer complexes of DNA with insulin, cortexitin, and cytochrome C in the neutral pH range were studied by UV spectroscopy, gel-permeation chromatography, and membrane diffusion techniques. The selected proteins differ by their acid-base properties and do not belong to natural DNA ligands. The DNA-protein complexes remained stable when the ionic strength of solution was increased up to 0.5 mol/l. The isotherms of DNA binding to proteins in solutions with an ionic strength of 0.3 mol/l and pH 7.8–8.2 exhibit a cooperative character. The intrinsic viscosity of DNA in the presence of proteins studied decreases proportionally to the amount of bound protein.