

УДК 567.963.3

ВЛИЯНИЕ ДЛИНЫ ОЛИГОПЕПТИДА НА ПРОЦЕСС КОНДЕНСАЦИИ ДНК В ВОДНО-СОЛЕВЫХ РАСТВОРАХ

© 2011 Б.А. Дрибинский*, Н.А. Касьяненко

*Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет**Статья поступила 5 мая 2011 г.*

Методами кругового дихроизма, ультрафиолетовой спектрофотометрии, динамического светорассеяния, вискозиметрии, динамического двулучепреломления и атомно-силовой микроскопии изучены конформационные свойства молекулы ДНК при ее комплексообразовании с олигопептидами. Использовали образцы с двумя, тремя и пятью мономерными остатками L-лизина. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в разбавленных растворах ДНК малой ионной силы с олигопептидами (с тремя и пятью мономерными звеньями) наблюдается конденсация макромолекулы при определенных концентрациях пептидов. Для бипептида конденсации ДНК в растворе не наблюдается. В растворах ДНК большой ионной силы (1 М NaCl) олигопептиды не оказывают влияния на размер макромолекулы.

Ключевые слова: ДНК, конденсация, олигопептиды, лизин.

ВВЕДЕНИЕ

Процесс конденсации ДНК в разбавленных растворах малой ионной силы с образованием наночастиц продолжает привлекать внимание исследователей не только в связи с выяснением молекулярного механизма компактизации ДНК, но и из-за возросшего интереса к самоорганизующимся системам с участием биополимеров. Это объясняется интересом к формированию компактных структур с участием ДНК *in vivo* (ДНК находится в компактном состоянии в вирусных капсидах и хромосомах). Кроме того, исследование компактизации ДНК *in vitro* представляет интерес для разработки новых генных векторов [1, 2], а также в связи с развитием нанотехнологий, когда молекула ДНК рассматривается в качестве перспективного материала для создания наноразмерных конструкций [3].

Хорошо известными конденсирующими агентами являются природные и синтетические полиамины, гистоновые белки, мультивалентные ионы и поликатионы [1, 2, 4–7]. Взаимодействие молекулы ДНК с такими соединениями в растворе приводит к образованию компактных дискретных структур определенного размера [8–10]. К конденсирующим агентам относится и полилизин [11].

Изучение формирования комплексов ДНК—полипептид в растворе может служить удобной модельной системой для понимания ДНК-белковых взаимодействий в биологических системах.

Целью данной работы был анализ влияния ионной силы и длины цепочки полипептида на процесс конденсации ДНК в водно-солевом растворе.

* E-mail: bad1983@gmail.com

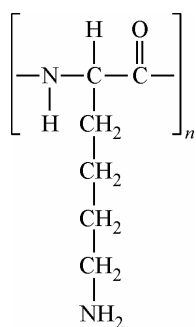


Рис. 1. Структура поли-L-лизина (PLL)

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали высокомолекулярную ($M = 13,6 \cdot 10^6$ Да) тимусную ДНК и олигопептиды фирмы "Sigma". Количество мономерных звеньев лизина n (рис. 1) в образцах составляло 2, 3 и 5. Исследования проводили в растворах большой (1 М) и малой (0,005 М) ионной силы при температуре 21 °С.

Вискозиметрия. Относительные вязкости растворов $\eta_r = \eta/\eta_0$ (где η — вязкость раствора; η_0 — вязкость растворителя), определяли с помощью ротационного низкоградиентного вискозиметра типа Зима—Крозерса [12] при разных градиентах скорости g .

Спектральные методы. Регистрацию спектров кругового дихроизма исследуемых растворов проводили на приборе Dichrograph Mark 4 (Франция). Определяли величину $\Delta\varepsilon$:

$$\Delta\varepsilon = \frac{S \cdot d}{C \cdot l},$$

где S — чувствительность прибора; d — интенсивность спектра; C — концентрация ДНК в М/л пар оснований; l — длина кюветы.

Измерение оптической плотности растворов ДНК D проводили на спектрофотометре СФ-56. Концентрацию ДНК определяли по разнице оптической плотности гидролизованных с 6 % HClO_4 растворов при λ 270 и 290 нм. Величину коэффициента молярной экстинкции $\varepsilon_{260}(p)$ вычисляли по формуле

$$\varepsilon_{260}(p) = \frac{A_p D_{260}}{0,099 C_{\text{ДНК}} l} \left[\frac{\text{л}}{\text{моль} \cdot \text{см}} \right],$$

где $A_p = 31$ — атомный вес фосфора; D_{260} — измеренная оптическая плотность при $\lambda = 260$ нм; l — длина кюветы; C — концентрация ДНК.

Динамическое двулучепреломление. Зависимость величины двойного лучепреломления Δn растворов ДНК от градиента скорости g определяли на установке с полутеневым эллиптическим компенсатором. Величину $(\Delta n/g)_0$, определенную при $g \rightarrow 0$, использовали для вычисления приведенного двойного лучепреломления $\frac{(\Delta n/g)_0}{(\eta_r - 1)\eta_0}$, которое для ДНК не зависит от кон-

центрации раствора и совпадает с отношением $[n]/[\eta]$, где $[n]$ — динамооптическая постоянная. В этом случае справедливо [13] следующее уравнение:

$$\frac{\Delta n}{g(\eta - \eta_0)} = \frac{[n]}{[\eta]} = \frac{4\pi}{45kT} \frac{(n_s^2 + 2)}{n_s} \Delta\alpha,$$

где n_s — показатель преломления растворителя; T — абсолютная температура; k — постоянная Больцмана; $\Delta\alpha$ — разность главных поляризуемостей статистического сегмента цепной молекулы (вдоль оси спирали и в плоскости, перпендикулярной этому направлению).

Динамическое светорассеяние. Гомодинную корреляционную функцию интенсивности рассеянного света $G^{(2)}(t)$ определяли на установке PhotoCor-SP (Россия) с He—Ne-лазером с длиной волны излучения 632,8 нм. В приближении отсутствия межмолекулярных взаимодействий с точностью до членов порядка $1/N$ (N — число рассеивателей) можно воспользоваться соотношением Зигерта:

$$g^{(2)}(t) = 1 + \beta |g^{(1)}(t)|^2,$$

где $g^{(2)}(t) = G^{(2)}(t)/G^{(2)}(\infty)$ — нормированная автокорреляционная функция интенсивности; $G^{(2)}(\infty)$ — экспериментально определяемая базовая линия; β — фактор когерентности; $g^{(1)}(t) = G^{(1)}(t)/G^{(1)}(0)$ — нормированная автокорреляционная функция поля.

В разбавленных растворах монодисперсных частиц при условии $q\langle R^2 \rangle^{1/2} \ll 1$ (где q — величина вектора рассеяния; $q = (4\pi/\lambda)\sin(\vartheta/2)$; ϑ — угол рассеяния; $\langle R^2 \rangle^{1/2}$ — среднеквадратич-

ный радиус инерции макромолекулы) автокорреляционная функция поля является взвешенной суммой индивидуальных вкладов различных релаксационных процессов

$$g^{(1)}(t) = \sum A(\tau_i) \exp(-t / \tau_i).$$

Здесь τ_i — время релаксации i -го релаксационного процесса; $A(\tau_i)$ — функция распределения по τ_i .

Коэффициент поступательной диффузии частицы D может быть определен из наклона зависимости скорости релаксации $\Gamma = 1/\tau$ от q^2 :

$$D = \lim_{q \rightarrow 0} (\Gamma / q^2).$$

Для получения функции распределения по временам релаксации из автокорреляционной функции использовали программное обеспечение DynaLS. Измерения для каждой системы проводили в диапазоне углов 40—90°. Используя коэффициенты поступательной диффузии, в предположении сферической формы частиц проводили оценку их размеров с помощью формулы Стокса—Энштейна:

$$R_h = kT/6\pi\eta_0 D.$$

Здесь k — постоянная Больцмана; T — абсолютная температура; η_0 — вязкость растворителя.

Атомно-силовая микроскопия. АСМ изображения ДНК и ее комплексов с пептидами были получены с помощью микроскопа NanoScope 4a (Veeco). При приготовлении образцов использовали способ самопроизвольной адсорбции ДНК из раствора на поверхность свежеисколотой слюды в присутствии ионов Mg^{2+} ($C(Mg^{2+}) = 5 \cdot 10^{-4}$ М). Раствор $MgCl_2$ добавляли в исследуемые растворы ДНК и ее комплексов непосредственно перед фиксацией. После помещения капли раствора ДНК на поверхность слюды и выдержки в течение 5 мин слюду промывали дистиллированной водой, удаляя незафиксированные компоненты, высушивали струей воздуха, а затем в вакуумном сушильном шкафу. Использовали методы прямого сканирования и прерывистого контакта сухих образцов на воздухе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 приведена зависимость относительного изменения специфической вязкости $\eta_{sp} = \eta_r - 1$ растворов ДНК с олигопептидами в 0,005 М NaCl от концентрации последних. На рисунке приведены также значения отношения концентрации положительно заряженных ионогенных групп олигопептидов и отрицательно заряженных фосфатных групп ДНК ($M(p)$ — концентрация в молях мономерного звена ДНК (нуклеотида). В состав каждого нуклеотида входит один остаток фосфорной кислоты. За среднее значение молекулярной массы нуклеотида взята величина 330 г/моль. Таким образом, $M(p)$ — это количество моль нуклеотидов (фосфатов) в 1 л раствора, и размерность этой величины [моль/л]). Метод вискозиметрии удобен для фиксации процесса компактизации ДНК [7]. Опыт показал, что в разбавленных растворах ДНК малой ионной силы (0,005 М NaCl) для олигопептидов с 3 и 5 мономерными звеньями падение специфической вязкости происходит при определенной концентрации конденсирующего агента вне зависимости от C (ДНК). Для $n = 5$ конденсация ДНК происходит при $C(Lys) > 1,2 \cdot 10^{-4}$ М, для $n = 3$ при $C(Lys) > 2,4 \cdot 10^{-4}$ М соответственно (концентрация приведена в молях мономерных звеньев). Для пептида с $n = 2$ (LysLys) конденсации ДНК 0,005 М NaCl не происходит ни при каких концентрациях лизина. Происходит лишь небольшое уменьшение объема

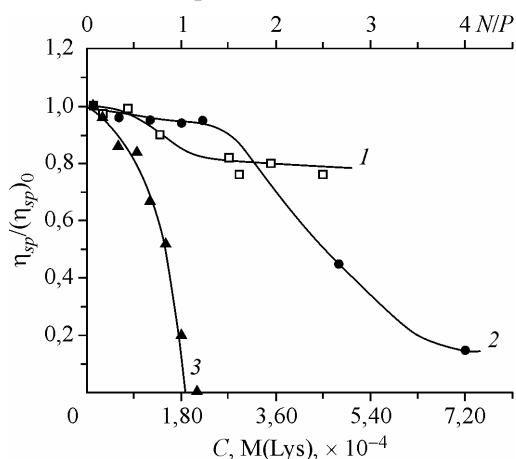


Рис. 2. Относительное изменение специфической вязкости растворов ДНК с LysLys (1), TriLys (2) и PentaLys (3) в 0,005 М NaCl. C (ДНК) = 0,006 % = $1,82 \cdot 10^{-4}$ М(p)

макромолекулы, как это наблюдается при взаимодействии ДНК с двухвалентными противоионами [14]. Ранее было показано, что при использовании полилизина (PLL) в качестве конденсирующего агента начало конденсации ДНК при рассмотрении зависимости специфической вязкости растворов от концентрации компонентов определяется зарядовым соотношением N/P (N — молярная концентрация положительно заряженных мономерных звеньев полилизина; P — молярная концентрация фосфатов ДНК), а не концентрацией агента [7, 11, 15]. Различие во взаимодействии ДНК с LysLys и с более длинными олиголизинами может быть связано с тем, что заряда $2+$ не хватает для эффективной компактизации ДНК. Действительно, двухвалентные ионы металлов не вызывают конденсации ДНК в водно-солевом растворе, но могут ее индуцировать при добавлении спирта за счет изменения качества растворителя [16], тогда как трехвалентные ионы металлов успешно конденсируют ДНК в растворах малой ионной силы [6, 17].

В растворах большой ионной силы специфическая вязкость растворов не изменяется с увеличением $C(\text{Lys})$ для всех используемых олигопептидов (рис. 3). Здесь также проявляется различие во влиянии полилизина и олигопептидов на объем молекулы ДНК в растворах большой ионной силы, так как при взаимодействии ДНК с полилизином наблюдается падение объема макромолекулы. Таким образом, экранировка заряженных групп ДНК в 1 М NaCl препятствует связыванию ДНК с используемыми олигопептидами, но не мешает связыванию PLL с ДНК.

Комплексообразование поли- и олигопептидов с ДНК в значительной степени обусловлено взаимодействием отрицательно заряженных фосфатных групп макромолекулы с азотсодержащими группами лизина. При большой ионной силе раствора, когда противоионы Na^+ эффективно экранируют заряд ДНК, олигопептиды не могут подойти к макромолекуле и вступить во взаимодействие с фосфатными группами. Вместе с тем, хотя заряд поликатионов в 1 М NaCl экранируется противоионами, а полиэлектролитное набухание подавлено, PLL все-таки компактизует ДНК [15].

Стоит отметить сходный характер взаимодействия олиголизин и полиаминов с ДНК [18]. И для тех, и для других определяющим фактором для конденсации ДНК является концентрация конденсирующего агента в растворе ДНК, а не N/P , как это наблюдается в растворах ДНК с поликатионами. Кроме того, полиамины также не способны конденсировать ДНК в растворах большой ионной силы [15].

Падение специфической вязкости растворов ДНК с олигопептидами при определенных концентрациях последних сопровождается синхронным изменением оптической анизотропии макромолекулы (рис. 4). Причиной падения оптической анизотропии при конденсации ДНК до

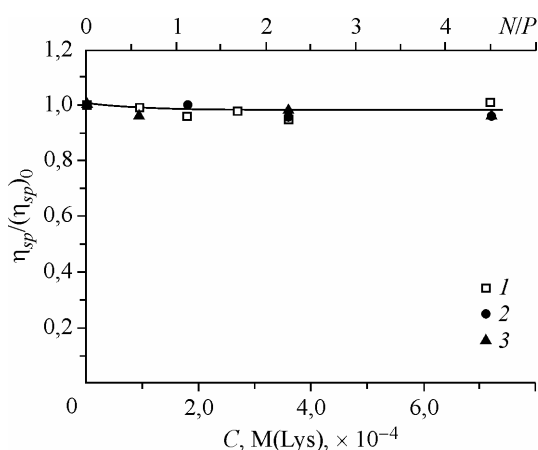


Рис. 3. Относительное изменение специфической вязкости растворов ДНК с LysLys (1), TriLys (2) и PentaLys (3) в 1 М NaCl.
 $C(\text{ДНК}) = 0,006\% = 1,82 \cdot 10^{-4} \text{ М(р)}$

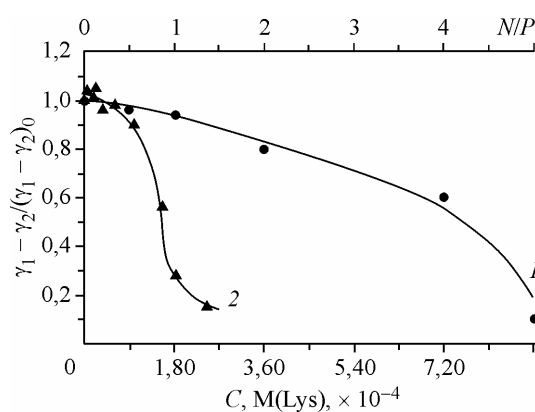


Рис. 4. Относительное изменение оптической анизотропии ДНК с TryLys (1) и PentaLys (2) в 0,005 М NaCl.
 $C(\text{ДНК}) = 0,006\% = 1,82 \cdot 10^{-4} \text{ М(р)}$

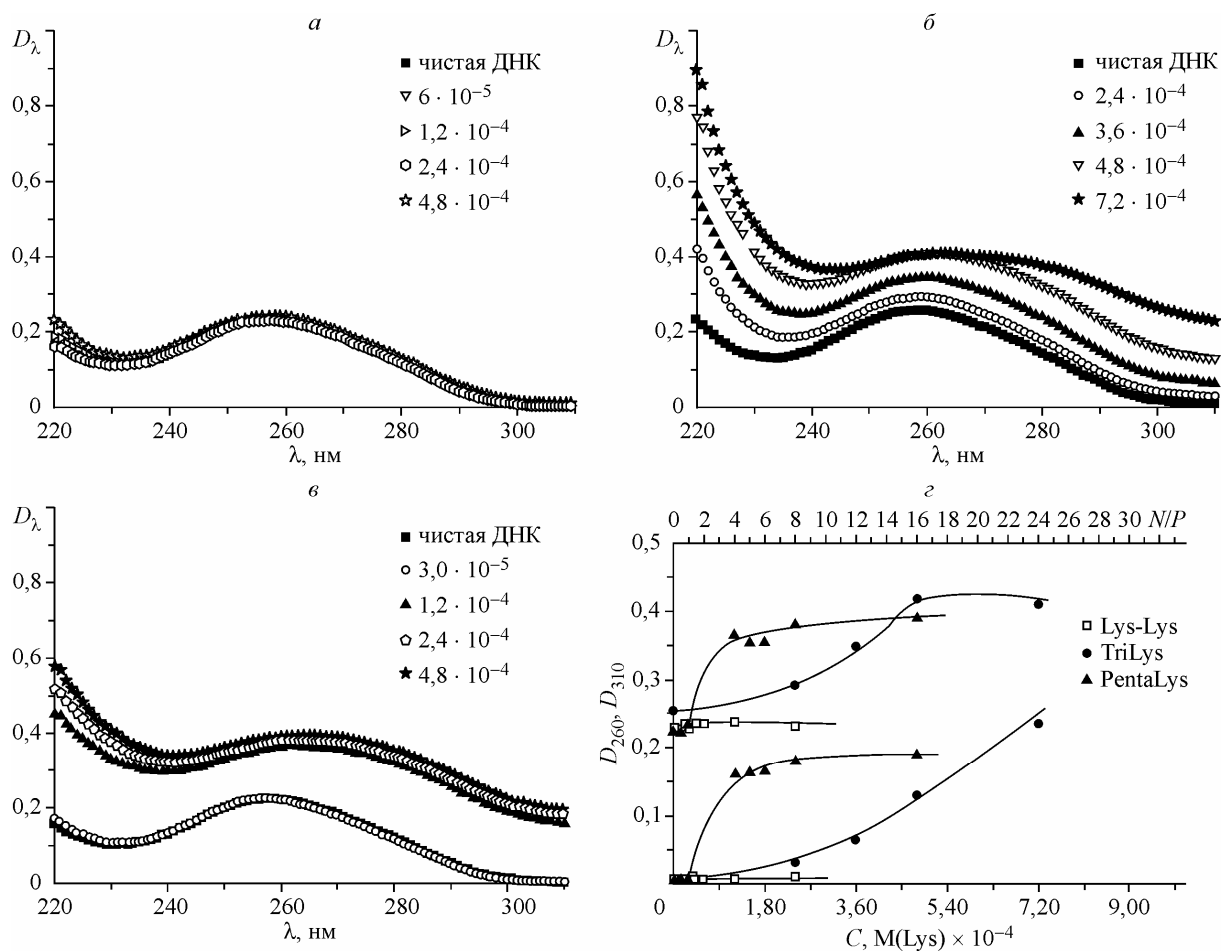


Рис. 5. Спектры УФ поглощения растворов ДНК (0,005 М NaCl, $C(\text{ДНК}) = 0,001\% = 3 \cdot 10^{-5}$ М(р)) с Lys-Lys (а), TriLys (б) и PentaLys (в); зависимость D_{260} и D_{310} от $C(\text{Lys})$ и N/P ДНК с Lys-Lys, TriLys и PentaLys (г)

очень малых значений может быть образование компактных дискретных частиц. При этом компактизация ДНК сопровождается также изменением оптической плотности растворов.

На рис. 5 приведены спектры УФ поглощения изучаемых систем, которые демонстрируют увеличение оптической плотности растворов во всем диапазоне длин волн даже вне полосы поглощения ДНК для тех же систем, для которых фиксируется резкое уменьшение вязкости растворов. Такое увеличение оптической плотности связано с появлением рассеяния в растворе. Действительно, как видно из рис. 5, г, при определенном значении $C(\text{Lys})$ наблюдаемое увеличение оптической плотности раствора практически одинаково при двух длинах волн D_{260} и D_{310} . Таким образом, увеличение оптической плотности растворов, по-видимому, происходит в результате рассеяния вследствие конденсации ДНК или агрегации (ДНК не поглощает на длине волны 310 нм). Привычным исключением является LysLys: с увеличением его концентрации в растворе ДНК изменения наблюдаются только в области 220—240 нм. В этой области оптическая плотность раствора может определяться изменением поглощения компонентов — ДНК и LysLys при образовании комплексов.

Из рис. 6, на котором приведены результаты исследования систем методом кругового дихроизма, видно, что LysLys практически не влияет на вид спектра, а трипептид и пентапептид вызывают сходные изменения спектра КД ДНК: при увеличении концентрации олигопептидов в растворе ДНК происходит смещение положительного максимума в длинноволновую область и уменьшение его интенсивности. Эти изменения наблюдаются при концентрациях, соответствующих конденсации ДНК.

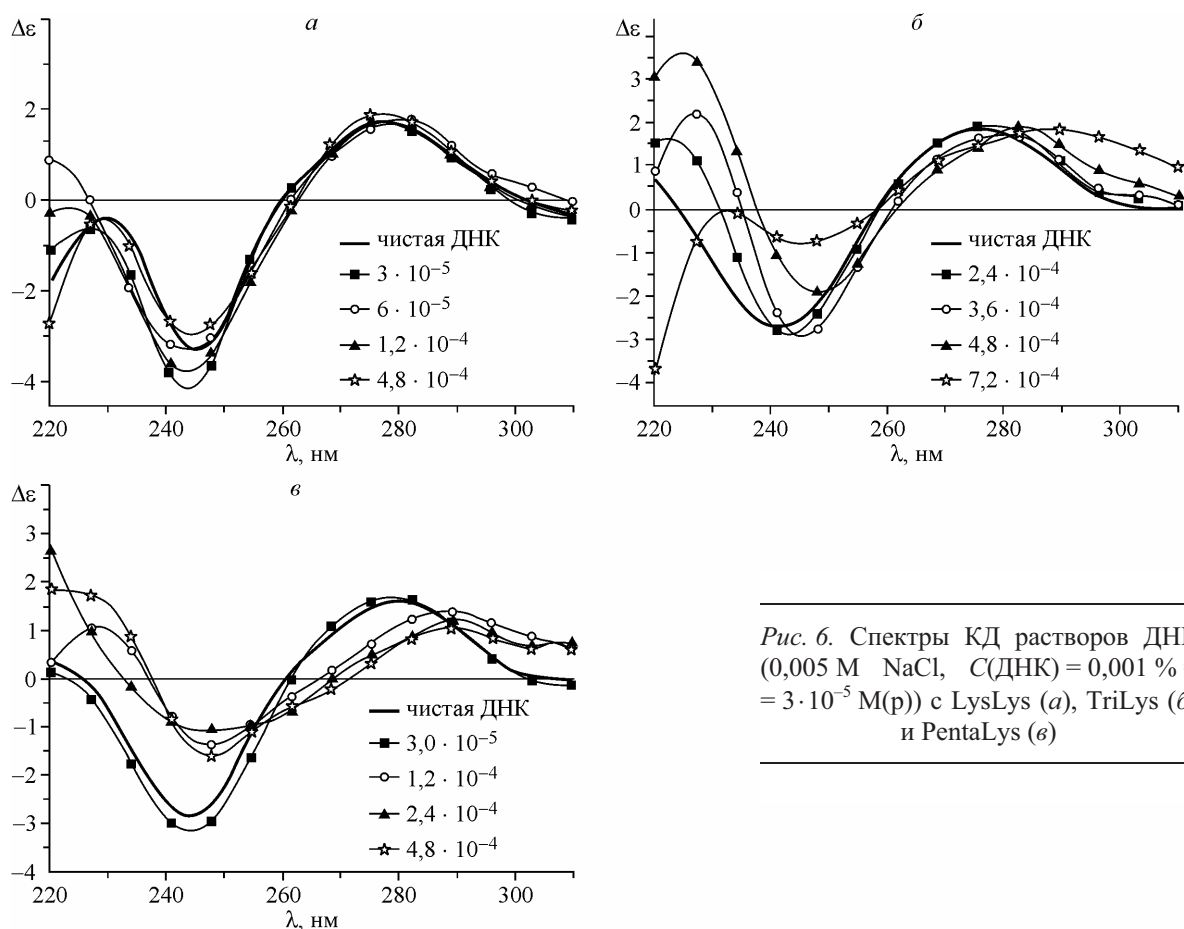


Рис. 6. Спектры КД растворов ДНК (0,005 М NaCl, $C(\text{ДНК}) = 0,001\% = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M(p)}$) с LysLys (а), TriLys (б) и PentaLys (в)

Оценка размеров частиц, образовавшихся в результате конденсации ДНК, проведенная методом динамического светорассеяния, свидетельствует об образовании достаточно компактных дискретных частиц. Их гидродинамический радиус практически на порядок меньше, чем его значение для свободной ДНК (см. таблицу). Следует подчеркнуть, что конденсация ДНК сопровождается появлением частиц, для которых характерна унимодальная функция распределения по временам релаксации. Это указывает на образование частиц практически одного размера. Их гидродинамический радиус лежит в интервале от 100 до 150 нм.

При увеличении концентрации конденсирующего агента (например, при ($C(\text{PentaLys}) = 3,6 \cdot 10^{-4} \text{ M(Lys)}$)) может наблюдаться образование агрегатов с последующим выпадением ДНК в осадок.

Результаты метода динамического светорассеяния подтверждаются данными атомно-силовой микроскопии. На рис. 7 приведены изображения ДНК в конденсированном состоянии (а), перед конденсацией (б) и в свободном состоянии (в). Размеры получившихся конденсированных структур коррелируют со значениями, приведенными в таблице. Интересно отметить,

Результаты исследования систем методом динамического светорассеяния в 0,005 М NaCl.
 $C(\text{ДНК}) = 0,004\% = 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M(p)}$

Комплекс	$C, \text{ M(Lys)}$	$R_h, \text{ нм}$	R_h/R_{h0}	Комплекс	$C, \text{ M(Lys)}$	$R_h, \text{ нм}$	R_h/R_{h0}
ДНК	0	1000±100	1	+ PentaLys	$0,6 \cdot 10^{-4}$	900±150	0,90±0,17
+ TriLys	$1,8 \cdot 10^{-4}$	1100±100	1,10±0,20	+ PentaLys	$1,8 \cdot 10^{-4}$	180±10	0,20±0,02
+ TriLys	$3,6 \cdot 10^{-4}$	610±80	0,61±0,15	+ PentaLys	$2,4 \cdot 10^{-4}$	135±5	0,14±0,01
+ TriLys	$7,2 \cdot 10^{-4}$	100±20	0,10±0,03				

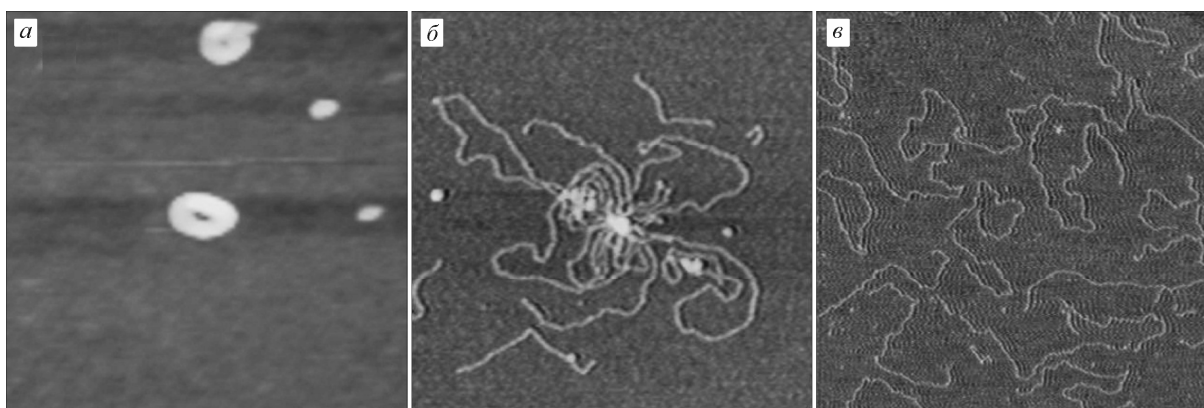


Рис. 7. АСМ изображения ДНК конденсированной PentaLys ($C = 2,4 \cdot 10^{-4}$ M(Lys)) (а); ДНК до конденсации ($C_{\text{PentaLys}} = 1,2 \cdot 10^{-4}$ M(Lys)) (б); свободная ДНК ($C_{\text{PentaLys}} = 0$) (в). $C(\text{ДНК}) = 0,0001\% = 3 \cdot 10^{-6}$ M(p) в 0,005 M NaCl. Масштаб 2×2 мкм

что пентализин при этом индуцирует появление тороидальных структур, которые также наблюдаются при конденсации ДНК полиаминами.

Таким образом, сопоставление полученных гидродинамических и спектральных характеристик позволило обнаружить определенные различия во влиянии LysLys, TriLys и PentaLys на конформацию ДНК в растворах. Бипептид не вызывает компактизации макромолекулы в области исследуемых концентраций, в то время как более длинные олигопептиды с зарядом 3+ и выше вызывают конденсацию ДНК.

Пентализин и трилизин сходным образом влияют на конформацию ДНК в растворе. Они индуцируют образование дискретных наночастиц приблизительно одного размера. При этом пентализин конденсирует макромолекулу при меньших концентрациях, чем трилизин. Вместе с тем все используемые в работе олигопептиды не влияют на объем ДНК в растворах большой ионной силы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vijayanathan V., Thomas T., Thomas T.J. // *Biochem.* – 2002. – **41**. – P. 14085 – 12094.
2. Slita A.V., Kasyanenko N.A., Nazarova O.V. et al. // *J. Biotechnol.* – 2007. – **127**. – P. 679 – 693.
3. Goodman R.P., Schaap A.T., Tardin C.F. // *Science.* – 2005. – **310**. – P. 1661 – 1665.
4. Bloomfield V.A. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1996. – **6**. – P. 334 – 341.
5. McCauley M.J., Zimmerman J. et al. // *J. Mol. Biol.* – 2007. – **374**. – P. 993 – 1004.
6. Kasyanenko N., Arikainen N., Frisman E. // *Biophys. Chem.* – 1998. – **70**. – P. 93 – 100.
7. Kasyanenko N., Afanasieva D., Dribinsky B. et al. // *Struct. Chem.* – 2007. – **18**. – P. 519 – 525.
8. Gosule L.C., Schellman J.A. // *Nature.* – 1976. – **259**. – P. 333 – 335.
9. Widom J., Baldwin R.L. // *J. Mol. Biol.* – 1980. – **144**. – P. 431 – 443.
10. Hansma H.J., Pietrasanta L.I., Golan R. et al. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2000. – **2**. – P. 271 – 275.
11. Nayvelt I., Thomas T., Thomas T.J. // *Biomacromol.* – 2007. – **8**. – P. 477 – 484.
12. Фрисман Э.В., Щагина Л.В., Воробьев В.И. // *Коллоид. журн.* – 1965. – **27**. – С. 130 – 134.
13. Фрисман Э.В., Сибилева М.А., Красноперова А.В. // *Высокомолекуляр. соед.* – 1959. – **1**. – С. 597 – 606.
14. Касьяненко Н.А., Дьяконова Н.Е., Фрисман Э.В. // *Мол. биология.* – 1989. – **23**, № 4. – С. 835 – 841.
15. Касьяненко Н.А., Дрибинский Б.А. // *Журн. структур. химии.* – 2007. – **48**, № 4. – С. 778 – 782.
16. Касьяненко Н.А., Мухин Д.А., Перевазко И.Л. // *Высокомолекуляр. соединения. Серия А.* – 2010. – **52**, № 7. – С. 1 – 13.
17. Kasyanenko N.A., Zanina A.V., Nazarova O.V. et al. // *Langmuir.* – 1999. – **15**. – P. 7912 – 7917.
18. Vijayanathan V., Thomas T., Shirakhata A. et al. // *Biochem.* – 2001. – **40**. – P. 13644 – 13651.