

На правах рукописи



Морозова Екатерина Алексеевна

Специфика взаимодействия ряда коротких пептидов с молекулой ДНК в растворе

Специальность 03.01.02– Биофизика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург - 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Научный руководитель: **Касьяненко Нина Анатольевна**, доктор физико-математических наук, профессор, профессор кафедры молекулярной биофизики и физики полимеров физического факультета Санкт-Петербургского государственного университета

Официальные оппоненты: **Нечипуренко Юрий Дмитриевич**, доктор физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории ДНК-белковых взаимодействий Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Ходорковский Михаил Алексеевич, кандидат физико-математических наук, директор научно-исследовательского комплекса «Нанобиотехнологии» ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «20» декабря 2019 года в 16:00 на заседании диссертационного совета Д 212.229.25 при федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 29) по адресу: 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина 11, корп.1, Высшая школа биомедицинских систем и технологий.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого по адресу: 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая 29 и на сайте ФГАОУ ВО «СПбПУ» www.spbstu.ru

Автореферат разослан « » _____ 2019 года.

Учёный секретарь
диссертационного совета, доктор
технических наук

Тимофеев Андрей Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Изучение молекулярного механизма взаимодействия коротких пептидов с молекулой ДНК может дать ответы на целый ряд актуальных вопросов, связанных с различными процессами, протекающими с участием ДНК и белков *in vivo*. Такие исследования позволяют выявить специфичность связывания различных полипептидных последовательностей с нуклеиновыми кислотами, изучить роль различных межмолекулярных взаимодействий (электростатических, ион-дипольных, диполь-дипольных, дисперсионных) в ДНК-белковом узнавании, рассмотреть предпочтительные позиции для связывания коротких аминокислотных композиций с ДНК и возможность формирования водородных связей.

Некоторые короткие пептиды (олигопептиды, состоящие из двух и более остатков аминокислот) обладают биологической активностью. Известно, что коротким пептидам отводится важная роль в функционировании различных органов и тканей. В частности, пептиды являются важным молекулярным звеном в реализации функциональной активности нервной, эндокринной, иммунной систем. Несмотря на большой прогресс, достигнутый к настоящему времени при изучении природы действия пептидов, белков и отдельных аминокислот в биологических системах, на сегодняшний день многие аспекты ДНК-пептидного взаимодействия не раскрыты в полной мере. В связи с этим изучение молекулярного механизма действия коротких пептидов с использованием модельных систем (водно-солевых растворов ДНК) представляет интерес не только для понимания физико-химической природы ДНК-белкового взаимодействия, но и для развития представлений о молекулярных основах формирования сложных надмолекулярных структур, которые необходимы для решения различных задач биотехнологии, использующей уникальные свойства биологических молекул при создании новых устройств и систем для современной персонализированной терапии сложных заболеваний. Сказанное выше свидетельствует об **актуальности темы исследования**

Целью диссертационной работы было изучить возможность связывания коротких пептидов различной структуры с ДНК, оценить специфику взаимодействия молекул, проанализировать конформационные изменения ДНК при формировании комплексов.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

- Изучение спектральных свойств ДНК в присутствии коротких пептидов в растворах разной ионной силы.
- Определение термодинамических параметров связывания пептидов с ДНК;
- Анализ конформационных изменений ДНК и определение ее молекулярных параметров при связывании с пептидами.

Научная новизна работы. Впервые было изучено связывание коротких пептидов AEDG, AEDL, EDR и KEDW с молекулой ДНК в растворе. Были определены термодинамические параметры их связывания, а также проведена оценка специфики взаимодействия этих пептидов с молекулой ДНК.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты, полученные в настоящей работе, расширяют представление о молекулярных основах ДНК-белковых взаимодействий *in vivo*, о свойствах ДНК-пептидных комплексов *in vitro* и о конформационных возможностях ДНК при формировании биологически значимых комплексов.

Методы исследования. В работе изучали взаимодействие высокомолекулярной тимусной ДНК с короткими синтетическими пептидами разного состава: AEDG, AEDL, EDR и KEDW. Использовали совокупность различных экспериментальных методик, позволяющих детектировать связывание пептидов с ДНК, а также следить за состоянием вторичной и третичной структуры макромолекулы при взаимодействии. Для установления наличия взаимодействия ДНК с исследуемыми соединениями и для оценки термодинамических параметров комплексообразования были применены методы УФ-спектрофотометрии, калориметрии и анализа кривых плавления ДНК. Для определения структуры комплексов и способов связывания пептидов с ДНК применяли спектральные методы, а также вискозиметрию, динамическое двойное лучепреломление, люминесцентную спектроскопию, круговой дихроизм, ЯМР.

Положения, выносимые на защиту:

- Короткие пептиды AEDG, AEDL, EDR и KEDW взаимодействуют с ДНК *in vitro*. Реализуется слабое связывание со значением константы диссоциации порядка 10^{-3} М.
- Пептиды при связывании локализуются преимущественно в большой бороздке ДНК.
- Связывание пептидов с ДНК осуществляется с помощью электростатических взаимодействий и формирования и водородных связей.
- Формирование комплексов пептидов с ДНК влияет на состояние вторичной и третичной структуры макромолекулы.

Личный вклад автора заключается в подготовке и проведении экспериментов (эксперименты по калориметрии и ЯМР были выполнены с участием сотрудников ресурсных центров СПбГУ), в обработке полученных данных, анализе и интерпретации результатов, в участии в подготовке публикаций по теме исследований, в написании диссертации.

Достоверность полученных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных, их согласованностью, использованием взаимодополняющих методов исследования.

Апробация работы. Основные результаты, полученные в работе, были представлены и обсуждены на международных и российских конференциях и симпозиумах: Международной молодежной конференции «Физика.СПб» (Санкт-Петербург, 2015); XXVII Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2015); V съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015); XXII Международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2015); 10 Европейском биофизическом конгрессе (Дрезден, 2015); XVIII Симпозиуме по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул (Ярославль, 2016); конференции «Инновационные российские технологии в геронтологии и гериатрии 2017», (Санкт-Петербург, 2017).

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, перечня условных обозначений и сокращений, списка терминов, благодарностей, списка использованной литературы. Работа содержит 134 страницы основного текста, 4 таблицы, 78 рисунков, 192 ссылки на источники литературы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во Введении отмечена актуальность темы диссертации, определена ее научная новизна и практическая значимость, приведены положения, выносимые на защиту, и методология исследования, указан личный вклад автора, обоснована достоверность полученных данных и приведены сведения об апробации работы.

В первой главе диссертации проанализировано современное состояние исследований взаимодействия ДНК с пептидами и белками. Рассмотрены механизмы распознавания сайтов связывания на ДНК белками, виды биологически активных пептидов, приведены сведения о взаимодействии молекулы ДНК с отдельными аминокислотами.

Вторая глава диссертации посвящена описанию используемых в работе материалов и экспериментальных методов исследования. Использовали коммерческий препарат высокомолекулярной ДНК тимуса телёнка фирмы Sigma Aldrich с молекулярной массой $M = 8,8 \cdot 10^6$ г/моль, определенной по значению характеристической вязкости в 0,15 М NaCl, пептиды AEDG, AEDL EDR и KEDW, синтезированные в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии, химические реактивы (марки х.ч) фирмы Вектон.

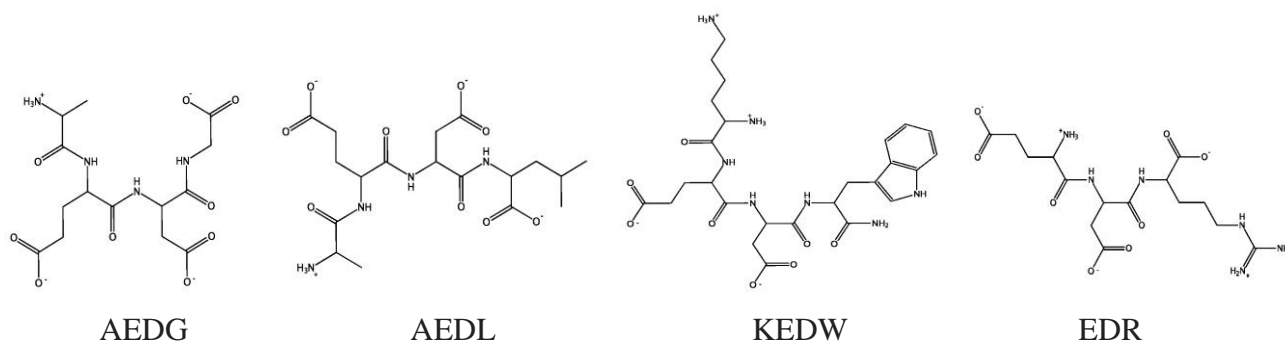


Рисунок 1 – Структура используемых пептидов

Для проведения экспериментов методом ЯМР использовали синтетические олигонуклеотиды фирмы «Евроген» (последовательности приведены в Таблице 1).

Таблица 1 – Характеристика используемых в работе олигонуклеотидов

| | 3'-5' | 5'-3' |
|------|--------------------|--------------------|
| ДНК1 | GCCCAGCATTTACCCAG | CGGGTCGTAAAGTGGGTC |
| ДНК2 | CCGGATCCTGCCCACTGG | GGCCTAGGACGGGTGACC |
| ДНК3 | GCAGCCGGGCAGGCACG | CGTCGGCCCGTCCGTGC |

Глава 2 содержит также рассмотрение некоторых вопросов конформационной статистики полимерных цепей и краткое описание используемых методов исследования и экспериментальных установок. Приведены сведения, необходимые для анализа изучаемых систем методами УФ спектрофотометрии (использовали СФ-56, Россия), кругового дихроизма (использовали дихрограф Mark IV, Франция), изотермического калориметрического титрования (измерения проводили в ресурсном центре СПбГУ «Термогравиметрические и калориметрические методы исследования» с использованием микрокалориметра титрования TA Instruments Nano ITC 2G и программы NanoAnalyze 3.6.0), низкоградиентной вискозиметрии (использовали ротационный вискозиметр типа Зимма-Крозерса), люминесценции (использовали спектрофлуориметр Hitachi 850, Япония), динамического двойного лучепреломления (использовали титановый динамооптиметр и оптическую установку с полутеневым эллиптическим компенсатором), методом изучения плавления ДНК (использовали спектрофотометр Specord 200+), ядерно-магнитного резонанса (WaterLOGSY 55). Для проведения исследований методом ЯМР использовали жидкостный ЯМР-спектрометр Bruker 500 МГц Avance III, находящийся в РЦ СПбГУ «Магнитно-резонансные методы исследования». Все

измерения проводили при 21° С (если не оговорено особо). Для поддержания рН растворов (6,8±0,1) использовали Tris-HCl буфер.

В Главе 3 изложены экспериментальные результаты, полученные в диссертационной работе, и приведено их обсуждение.

В начале третьей главы приведены экспериментальные результаты, полученные при исследовании взаимодействия пептида AEDG с ДНК, и проводится их анализ. Показано, что добавление разных концентраций пептида в раствор ДНК в 0,005 М NaCl приводит к изменению спектральных свойств макромолекулы (рис. 2) – наблюдается гиперхромный эффект с ростом величины r , показывающей отношение молярных концентраций пептида и пар оснований ДНК (пептид не поглощает в области длин волн более 240 нм). При этом не фиксируется сдвига полосы поглощения ДНК или изменения ее формы. Полученные данные свидетельствует о том, что связывание пептида с ДНК вызывает некоторое нарушение стэкинг взаимодействия между основаниями макромолекулы, но не влияет на состояние электронной структуры их гетероциклов. Подобные изменения спектральных свойств ДНК наблюдались ранее, например, при депротонировании ее оснований (в этом процессе участвуют ОН-группы гуанина и тимина, присоединенные к С6 и С4 соответственно). Спектры КД ДНК (рис. 2) также свидетельствуют о контактах пептида с основаниями ДНК. Можно полагать, что взаимодействие пептида с основаниями происходит через контакты с боковыми группами гетероциклов. Если такие группы участвуют в формировании водородных связей между комплементарными парами, можно ожидать нарушения стэкинг взаимодействия оснований при связывании ДНК с пептидами (особенно если в связывании с пептидом участвуют атомные группы А-Т пары с двумя водородными связями).

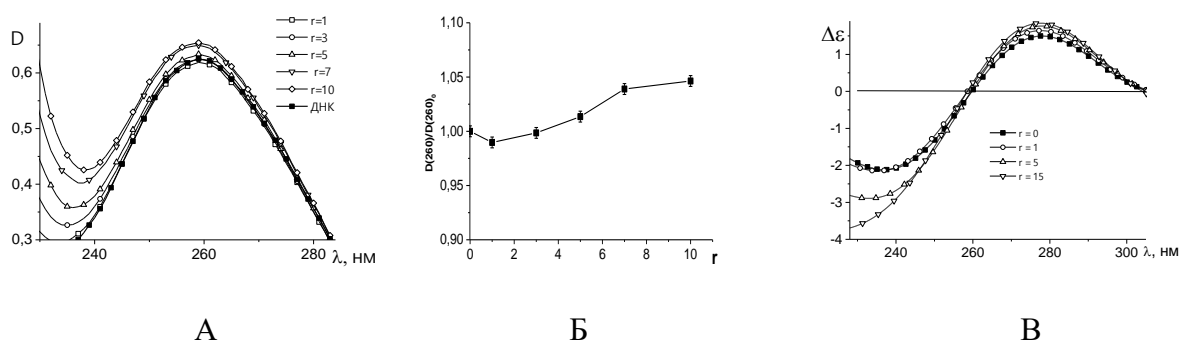


Рисунок 2 – Спектры поглощения (А) и кругового дихроизма (В) ДНК в 0,005 М NaCl при разных концентрациях пептида AEDG (величины r). На рис. 2 Б приведена зависимость относительного изменения поглощения растворов при 260 нм (максимум полосы поглощения ДНК) от r . рН=6,8.

Сравнение кривых плавления свободной ДНК и ДНК в растворах, содержащих AEDG, продемонстрировало уменьшение температуры плавления ДНК в присутствии пептида (при его

значительной концентрации $r = 10$). Первые производные кривых плавления (рис. 3 А) показывают отсутствие заметного изменения ширины перехода из нативного в денатурированное состояние. Эти данные указывают на дестабилизацию вторичной структуры ДНК в растворах, содержащих пептид, и на связывание пептида с основаниями ДНК, что коррелирует с наблюдаемым гиперхромизмом в спектрах поглощения ДНК при связывании с AEDG. Заметим, что для всех пептидов при $r \leq 3$ температура плавления ДНК не меняется.

Влияние пептида на третичную структуру ДНК проявляется при изучении зависимости приведенной вязкости растворов ДНК от r (рис. 3 Б). При малых концентрациях поддерживающего электролита (0,005 М NaCl) наблюдается заметное падение вязкости, свидетельствующее об уменьшении объема молекулярного клубка ДНК в растворе при связывании с пептидом. Отсутствие изменений вязкости в 0,15 М и 1 М NaCl указывает на важную роль электростатических взаимодействий при связывании пептида с ДНК (в 0,005 М NaCl наблюдается существенное полиэлектролитное набухание высокомолекулярной ДНК).

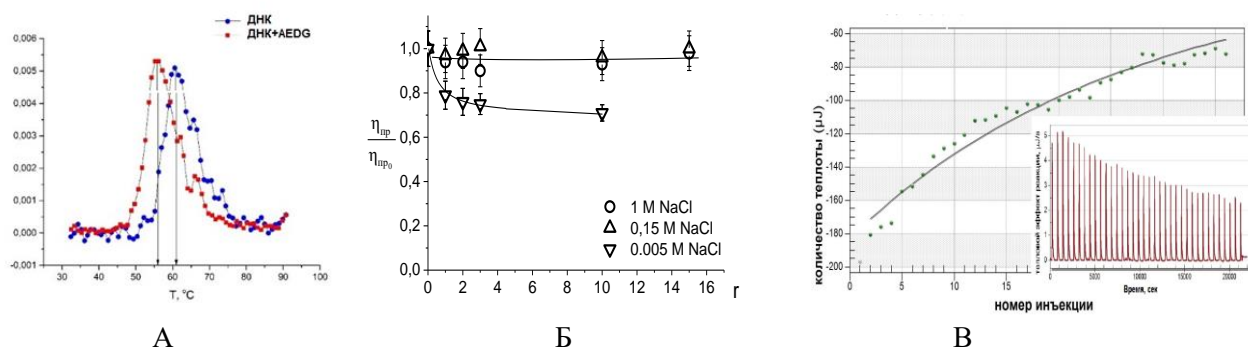


Рисунок 3 – Экспериментальные данные, полученные для комплексов ДНК с AEDG: первые производные кривых плавления свободной ДНК и ДНК в комплексах с пептидом AEDG в 0,005 М NaCl (А); зависимость относительного изменения приведенной вязкости раствора ДНК от r при разных концентрациях соли (указаны на рисунке) (Б), $C(\text{ДНК})=0,006\%$, $\text{pH}=6,8$; и калориметрическая изотерма связывания AEDG с ДНК (зависимость удельной теплоты, выделившейся при последовательном добавлении раствора соединения - от количества добавлений). Сплошная линия соответствует модели идентичных независимых мест связывания. На врезке рис В приведена термограмма титрования ДНК пептидом AEDG при $C(\text{AEDG})=10^{-2}$ М, $C_{\text{ДНК}}=1 \times 10^{-4}$ М, 0,005 М NaCl. В ячейку с раствором ДНК последовательно добавляли фиксированный объем раствора пептида через равные промежутки времени (500 секунд).

Метод изотермического калориметрического титрования позволил получить оценку термодинамических характеристик связывания пептида с ДНК (рис. 3 В). Практически монотонное изменение выделенной удельной теплоты с ростом отношения концентраций пептида и ДНК свидетельствует об одном типе связывания AEDG с макромолекулой. Полученное значение константы диссоциации $K = 1,67 \times 10^{-3}$ М может относиться к слабому связыванию пептида с ДНК. Этот результат в совокупности с другими экспериментальными данными свидетельствует о том, что пептид AEDG взаимодействует с ДНК в условиях малой

ионной силы, контактируя с основаниями макромолекулы и вызывая некоторую дестабилизацию двойной спирали. При этом реализуется достаточно слабое связывание.

Следующий блок экспериментальных данных, приведенных в Главе 3, относится к рассмотрению взаимодействия ДНК с пептидом AEDL, отличающимся от предыдущего остатком последней аминокислоты (присутствует лейцин вместо глицина). Получены сходные изменения в спектрах УФ поглощения и КД ДНК, а также такое же падение приведенной вязкости растворов ДНК в зависимости от γ . Оценка константы диссоциации ($K_d = 1,5 \times 10^{-3}$) для комплексов ДНК с AEDL также указывает на большое сходство в комплексообразовании пептидов AEDG и AEDL с ДНК. Неизменность оптической анизотропии ДНК при формировании ее комплексов с пептидом AEDL (рис. 4 А) указывает на неизменность изгибной жесткости ДНК (ее персистентной длины).

Для оценки локализации пептида на ДНК рассматривали конкуренцию за место связывания на ДНК между пептидом и ионами меди, формирующими комплексы с N7 гуанина в большой бороздке ДНК (при этом фиксируется батохромный сдвиг полосы поглощения ДНК). Так как связывание AEDL с ДНК не сдвигает полосу поглощения ДНК, можно видеть (рис. 4 Б), что вне зависимости от последовательности добавления пептида и Cu^{2+} (использовали раствор CuCl_2 в 0,005 М NaCl) в раствор ДНК всегда реализуется связывание пептида, а влияние ионов меди на спектр поглощения ДНК не проявляется. Отсюда следует, что пептид локализован в большой бороздке ДНК, и он препятствует связыванию ионов меди с N7 гуанина. Так как пептид достаточно большой, мы не можем утверждать, что он связан именно с N7 гуанина.

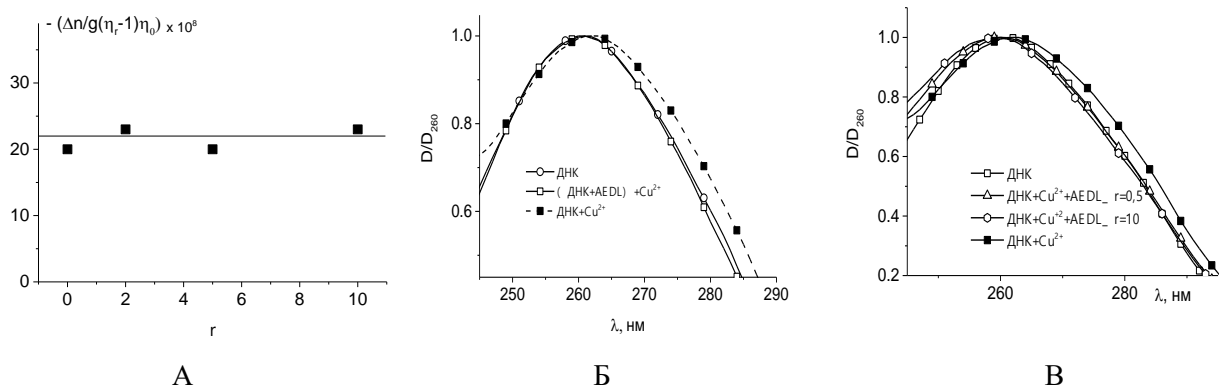


Рисунок 4 – Некоторые данные, полученные при изучении связывания пептида AEDL с ДНК: Зависимость отношения Петерлина - приведенного двойного лучепреломления (в см $\text{с}^2/\text{г}$) от γ (А); спектры поглощения свободной ДНК, ДНК в комплексах с ионами меди, с пептидом AEDL и в растворах при разной последовательности добавления Cu^{2+} и AEDL (последовательность и значения γ указаны на рисунках Б и В). Спектры нормированы на максимум поглощения ДНК. Измерения проводили в 0,005 М NaCl при pH=6,8

Для изучения возможности связывания пептида AEDL с ДНК по малой бороздке в качестве конкурента за место связывания на ДНК был выбран краситель DAPI, который связывается с

ДНК по малой бороздке или по фосфатным группам. Использовали одинаковое для всех растворов отношение концентраций красителя к ДНК $z=C(\text{DAPI})/C(\text{ДНК})=0.3$, здесь $C(\text{ДНК})$ выражена в молях нуклеотидов (z показывает количество молекул DAPI в растворе, приходящееся на фосфат ДНК). При таком значении z в растворе присутствуют два типа связанных с ДНК молекул DAPI с разными спектральными характеристиками. Первый тип – это сильное связывание в малой бороздке ДНК с высоким квантовым выходом люминесценции с максимумом при $\lambda_{\text{flmax}} = 455$ нм и длине волны возбуждения 340 нм, второй – существенно более слабое внешнее электростатическое связывание с фосфатами ДНК, с максимумом люминесценции с при $\lambda_{\text{flmax}} = 540$ нм с длиной волны возбуждения 420 нм.

Рис. 5 показывает зависимости интенсивности люминесценции для двух типов связанных с ДНК молекул DAPI от соотношения пептид/ДНК (r). В растворе ДНК с пептидом до $r=50$ изменения интенсивности люминесценции связанного по малой бороздке DAPI не наблюдается, а интенсивность связанного по фосфатам красителя несколько возрастает (при $r>1$) с последующим падением. На рис. 5 Б приведены аналогичные данные для пептида EDR. Приведенные результаты однозначно демонстрируют, что при связывании пептидов с ДНК ее малая бороздка остается свободной.

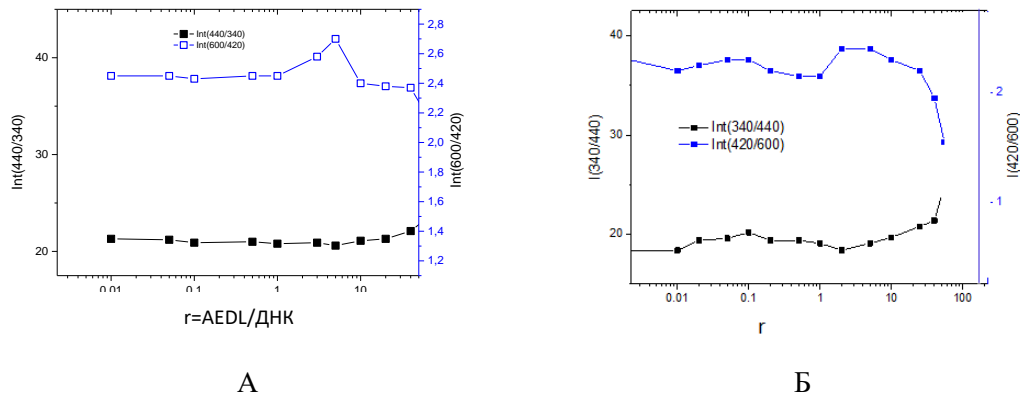


Рисунок 5 - Зависимость люминесценции DAPI в растворе ДНК ($z=0,3$) в 0,005 М NaCl от r для его сильного связывания в малой бороздке (нижний график на рисунках) и более слабого связывания с фосфатными группами (верхний график на рисунках) при добавлении пептидов AEDL (А) и EDR (Б).

Пептид EDR содержит три аминокислотных остатка (Glu-Asp-Arg). При рассмотрении его взаимодействия с молекулой ДНК наблюдали сходное изменение спектральных свойств макромолекулы, за исключением отсутствия видимых изменений в спектре КД ДНК, более сильное падение вязкости растворов ДНК при его добавлении, а также необходимость использовать существенно большие концентрации пептида, чтобы проявилась его конкуренция с Cu^{2+} за место связывания на ДНК (см. рис. 6 и рис. 4). Для EDR в качестве конкурирующего агента использовали также известное соединение цис-ДДП (противоопухолевый препарат

цисплатин), формирующее координационную связь с N7 гуанина. Связывание EDR с ДНК существенно слабее (результаты calorиметрического титрования для комплексов ДНК с пептидом EDR дали значение $K_d = 10^{-3}$ М). Действительно, в этом случае для всех растворов фиксировалось связывание цис-ДДП с ДНК, однако большие концентрации пептида в растворе ДНК все же оказывали влияние на последующее связывание цис-ДДП (см. рис. 6 В). Это указывало на локализацию пептида в большой бороздке ДНК.

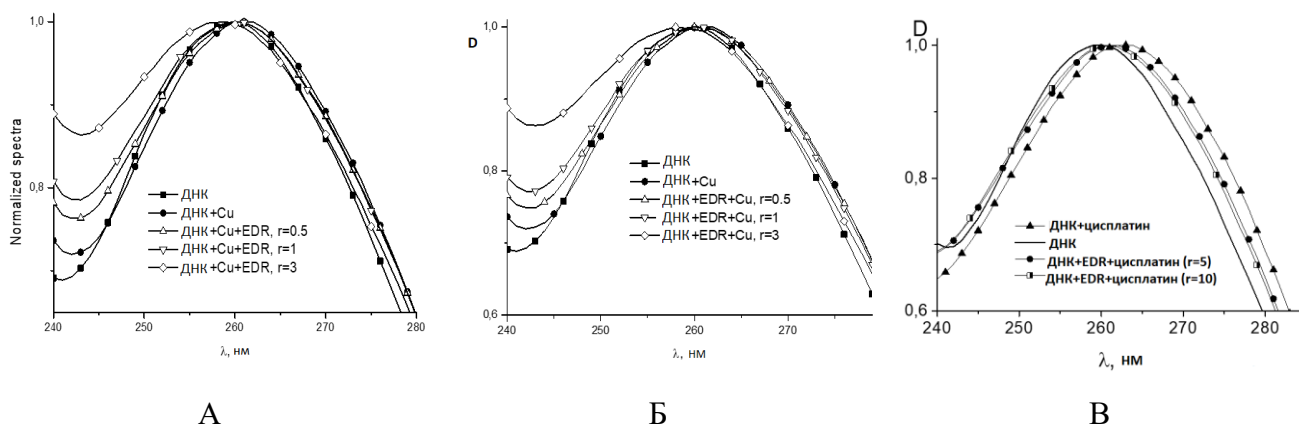


Рисунок 6 - Нормированные на максимум полосы поглощения ДНК спектры для свободной ДНК, ДНК в комплексах с ионами меди, с пептидом EDR и в растворах при разной последовательности добавления Cu^{2+} и EDR, последовательность и значения r указаны на рисунках; на рис. В приведены аналогичные данные при использовании в качестве конкурирующего агента цис-ДДП. Во всех растворах $\text{pH}=6,8$, и $0,005$ М NaCl .

При рассмотрении взаимодействия молекулы ДНК с пептидом KEDW, содержащим триптофан, следует учитывать, что пептид имеет полосу поглощения с максимумом на 280 нм. При анализе спектров поглощения комплекса ДНК и KEDW могут происходить изменения и в спектре поглощения пептида, и в спектре поглощения ДНК. Вычисленные спектры поглощения ДНК и пептида в комплексе (мы полагаем при вычислениях неизменность спектральных свойств второго компонента) показали (рис. 7), что связывание пептида с ДНК происходит. Изменения проявляются уже при $r < 1$. При больших концентрациях пептида ($r > 1$) полоса сдвигается к положению, характерному для свободного пептида. Можно полагать, что насыщение связывания происходит при $r=1$. Спектры КД ДНК в комплексах с KEDW указывают на реализацию связывания с участием азотистых оснований ДНК, вязкость растворов ДНК падает в присутствии KEDW аналогично наблюдаемому падению при добавлении AEDG и AEDL, константа диссоциации при использовании KEDW составила величину $6,7 \times 10^{-3}$ М.

Так как пептид имеет в своем составе триптофан, для изучения его комплексообразования с молекулой ДНК был использован метод флуоресценции. Действительно, наличие аминокислотного остатка триптофана, обладающего наиболее сильным квантовым выходом

среди всех аминокислот, создает преимущество в использовании метода флуоресценции для оценки связывания пептида с ДНК. Известно, что максимум полосы поглощения триптофана находится на 280 нм. После возбуждения он сольватохромно излучает в диапазоне 300—350 нм. На флуоресценцию триптофана большое влияние оказывает молекулярное окружение. Данный эффект активно используется при изучении белков. Взаимодействие индольного ядра с азотистыми основаниями нуклеиновых кислот приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции, что позволяет установить роль этой аминокислоты в протеин-нуклеиновых взаимодействиях. Рисунок 7В представляет сравнение флуоресценции свободной аминокислоты триптофана и пептида KEDW при взаимодействии с ДНК. В эксперименте концентрации триптофана и KEDW были постоянными, $C=5 \times 10^{-6}$ М, а концентрация ДНК изменялась (это выражается в различных значениях r , где $r=C_{\text{KEDW}}/C_{\text{ДНК}}$ или $C_{\text{тр}}/C_{\text{ДНК}}$).

Анализ данных показывает, что тушение люминесценции триптофана и KEDW при связывании с ДНК происходит при превышении концентрации ДНК (присутствие которой и обеспечивает тушение флуоресценции) по фосфатным группам в 10 раз по сравнению с концентрацией пептида или аминокислоты (при r менее 0,1). И триптофан, и KEDW имеют сходный характер изменения кривой тушения флуоресценции, что указывает на непосредственное участие аминокислотного остатка триптофана в связывании KEDW с ДНК. Сравнивая эти результаты с данными спектрофотометрии, можно отметить, что тушение флуоресценции наблюдается в области малых r , где фиксировалось изменение в спектре поглощения пептида при комплексообразовании.

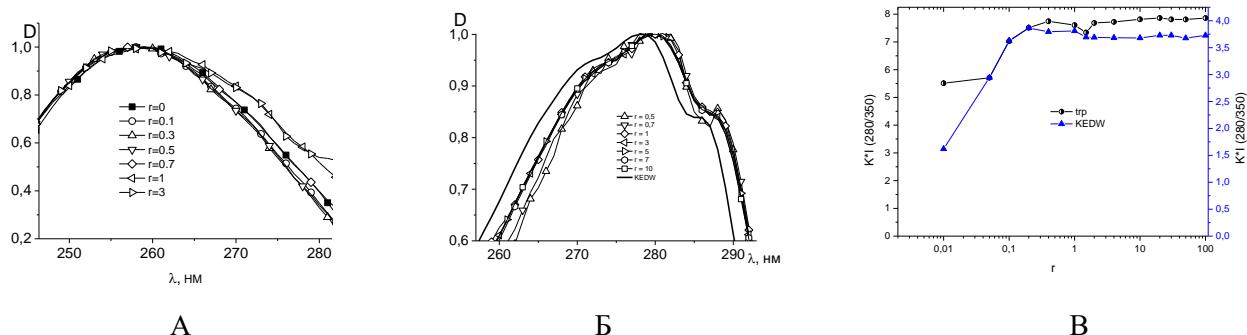


Рисунок 7 – Вычисленные и нормированные на максимум полосы спектры поглощения ДНК (А) и пептида (Б) в комплексах в 0,005 М NaCl при pH=6,8. Рисунок В показывает тушение флуоресценции триптофана и KEDW в комплексе с ДНК (уменьшение r соответствует увеличению концентрации ДНК)

Изменение вязкости растворов ДНК при добавлении пептида KEDW сопровождается падением оптической анизотропии статистического сегмента ДНК (более чем на 30% при достижении $r=0,1$ и выше, тогда как приведенная вязкость растворов ДНК при этих значениях r уменьшается всего на 20%), рис. 8.

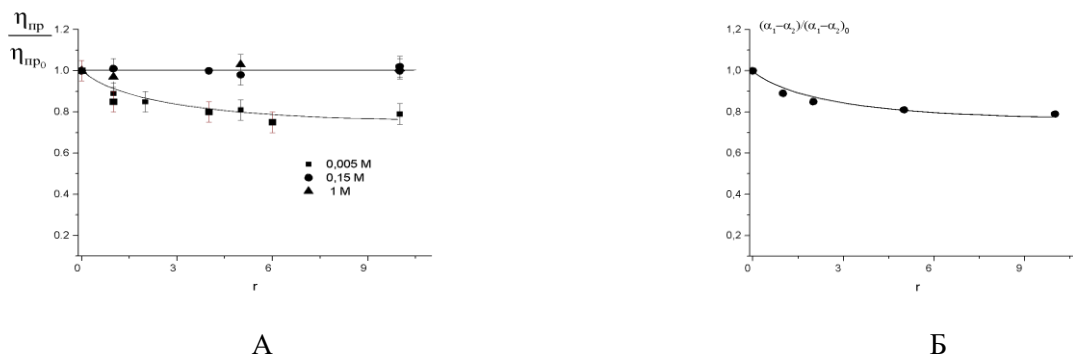


Рисунок 8 - Относительное изменение приведенной вязкости раствора ДНК (А) и относительное изменение оптической анизотропии статистического сегмента ДНК (Б) в присутствии пептида KEDW при его разных концентрациях (r). Измерения проведены в растворителе 5 мМ, 0,15М и 1М NaCl, pH фиксирован с помощью Tris-HCl буфера, pH=6.8, C(ДНК)=0,008%

Совокупность экспериментальных данных позволяет заключить, что падение оптической анизотропии сегмента не может быть объяснено уменьшением персистентной длины ДНК. Эта величина связана с жесткостью макромолекулы и равна произведению числа пар оснований в статистическом сегменте ДНК и разности поляризуемостей пары оснований вдоль оси спирали и перпендикулярно этому направлению. Остается предположить, что в процессе взаимодействия пептида KEDW с ДНК происходит определенная ориентация триптофана, который вносит вклад в измеряемую оптическую анизотропию статистического сегмента. При этом мы должны предположить, что плоскость индольной группы ориентирована преимущественно перпендикулярно плоскости пар оснований ДНК. Падение вязкости, возможно, обусловлено частичным нарушением вторичной структуры ДНК (например, большей подвижностью А-Т пары из-за разрыва одной водородной связи). Такое изменение в структуре может привести к локальному изгибу спирали, что и проявляется в методе вискозиметрии.

При проведении экспериментов методом ЯМР использовали пептиды AEDG, AEDL, KEDW и EDR и синтетические короткие олигонуклеотиды (18 п.о.). Исследовали возможность связывания исследуемых пептидов с олигонуклеотидами. Олигонуклеотиды были выбраны, исходя из данных молекулярного докинга. Были получены Н-спектры пептидов и олигонуклеотидов, спектры WaterLOGSY. В качестве растворителя использовали 50 мМ натрий-фосфатный буфер. Для примера на рис. 9 приведены данные, полученные при исследовании взаимодействия пептида KEDW с ДНК. Для всех изученных пептидов AEDG, AEDL, EDR и KEDW не было получено положительного NOE сигнала при их взаимодействии с тремя различными олигонуклеотидами.

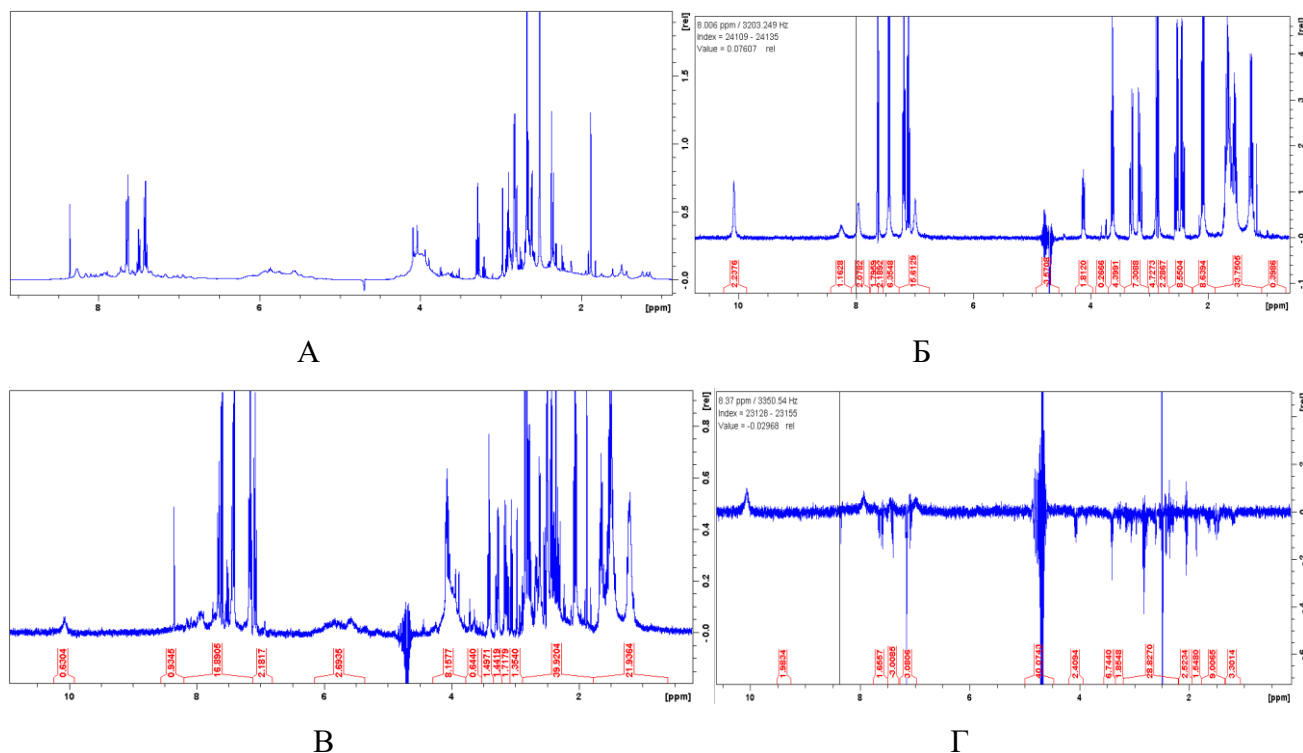


Рисунок 9 – Пример ЯМР исследования: ^1H -спектры ДНК1 (А), KEDW (Б), комплекса ДНК-KEDW при $r = 50$ (В) и WaterLOGSY спектр (Г) для комплекса пептида KEDW и DNA1. Спектр свободного пептида был зарегистрирован при его концентрации $C=10^{-2}$ М. Спектр олигонуклеотида - при концентрации $C=0,8$ М. Комплексы были приготовлены в соотношении $r=50$, где $r=C(\text{KEDW})/C(\text{DNA})$. В качестве растворителя использовали 50 мМ натрий-фосфатный буфер.

Результаты, полученные методом ЯМР, согласуются с данными изотермического калориметрического титрования, согласно которому значения констант диссоциации для пептидов лежат в интервале от 10^{-2} до 10^{-3} М. Взаимодействие пептидов с ДНК относится к слабому связыванию. Значения констант связывания находятся за пределами чувствительности метода ЯМР, которым возможно зарегистрировать взаимодействие со значениями констант диссоциации в интервале от 10^{-4} до 10^{-9} М.

В разделе «Заключение» проводится обобщение полученных данных, анализируются особенности связывания каждого из четырех пептидов с ДНК. Рассмотренные пептиды обладают различными аминокислотными последовательностями, суммарным зарядом и индексом гидрофобности. Тем не менее, для всех исследованных молекул пептидов выявлены общие характерные закономерности в их взаимодействии с молекулой ДНК в растворе. В первую очередь, взаимодействие проявляется в растворах малой ионной силы. При этом связывание пептидов с ДНК происходит с участием азотистых оснований. Комплексообразование влияет на третичную структуру макромолекулы в растворе. Оценка констант диссоциации свидетельствует о слабом связывании пептидов с ДНК. Исследования указывают на реализацию одного типа связывания пептидов с макромолекулой.

Изучение комплекса ДНК и тетрапептида KEDW методом УФ-спектрофотометрии, а также изучение люминесценции KEDW в растворах ДНК однозначно доказало связывание пептида с ДНК с участием аминокислоты триптофана. Исследование конкурентного связывания пептидом с использованием различных агентов указало на локализацию пептидов в большой бороздке ДНК.

В конце диссертации сформулированы **выводы**:

1. Все используемые в работе пептиды AEDG, AEDL, EDR и KEDW взаимодействуют с молекулой ДНК со значением константы диссоциации порядка 10^{-3} М. Это взаимодействие проявляется при малых ионных силах и не фиксируется при больших концентрациях поддерживающего электролита (NaCl), что указывает на важную роль электростатических взаимодействий при связывании.
2. В присутствии пептидов наблюдаются незначительные изменения спектральных свойств ДНК, указывающие, что в связывании участвуют азотистые основания макромолекулы. Аминокислоты, входящие в состав пептидов, взаимодействуют с атомными группами оснований, выходящими в большую бороздку ДНК. Малая бороздка при связывании пептидов с ДНК остается свободной.
3. Атомы и группы атомов ДНК, связывающиеся с пептидами в большой бороздке, участвуют в образовании водородных связей, поэтому их участие в связывании с пептидами приведет к нарушению стэкинга оснований, что проявляется в появлении гиперхромизма в спектре поглощения ДНК при связывании с пептидами.
4. Показано уменьшение квантового выхода флуоресценции пептида KEDW при связывании с ДНК, при этом в комплексообразовании непосредственное участие принимает аминокислотный остаток триптофана.
5. В присутствии пептидов наблюдается уменьшение объема молекулярного клубка ДНК в растворе: для пептидов AEDL, AEDG и KEDW на 20%, для пептида EDR до 50% при максимальной концентрации пептида в эксперименте, которое можно объяснить появлением локальных «шарнирных» участков из-за нарушения стэкинга оснований в результате связывания пептидов. Для пептида KEDW фиксировали также уменьшение оптической анизотропии ДНК, связанное с жесткой ориентацией аминокислотного остатка триптофана в комплексе.

Список публикаций по теме диссертации

1. **Морозова Е. А.**, Линькова Н. С., Хавинсон В. Х., Соловьёв А. Ю., Касьяненко Н. А. Взаимодействие пептида AEDL с ДНК *in vitro* // Журнал структурной химии. – 2017. – Т. 58. – №. 2. – С. 438-442. Перевод: E. A. Morozova, N. S. Lin'kova, V. Kh. Khavinson, A. Yu. Soloviev, N. A. Kasyanenko. *In vitro* interaction of the AEDL peptide with DNA // Journal of Structural Chemistry. – 2017. – Т. 58. – №. 2. – С. 420-424.
2. Silanteva I. A., Komolkin A. V., **Morozova E. A.**, Vorontsov-Velyaminov P. N., Kasyanenko N. A. Role of Mono and Divalent Ions in Peptide Glu Asp Arg–DNA Interaction // The Journal of Physical Chemistry B. – 2019. – T123. – V. 9. – С. 1896-1902.
3. **Морозова Е. А.**, Линькова Н. С., Касьяненко Н. А. Спектрофотометрическое исследование взаимодействия пептида H-Ala-Glu-Asp-Gly-OH с ДНК в растворе NaCl // Труды Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого. – 2012. – №. 514. – С. 110-113.
4. Khavinson V., Lin'kova N., Kukanova E., Bolshakova A., Gainullina A., Tendler S., **Morozova E.**, Tarnovskaya S., Vinski DSP, Bakulev V. Neuroprotective Effect of EDR Peptide in Mouse Model of Huntington Disease // J Neurology and Neuroscience. – 2017. – Т. 1. – №. 8. – С. 1-11.
5. Кузнецова Е.П., **Морозова Е.А.**, Касьяненко Н.А. Взаимодействие биологически активных пептидов KEDW, EDR с ДНК *in vitro* // Материалы научно-практической конференции «Инновационные российские технологии в геронтологии и гериатрии 2017», посвященной 25-летию Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии, 14-16 декабря 2017 г., Санкт-Петербург, С. 38.
6. **Е.А. Морозова**, Н.А. Касьяненко. Исследование взаимодействия пептида EDR с ДНК *in vitro* // XVIII Симпозиум по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул, 20-24 июня 2016 г., С. 16.
7. Болдырев А. Ю., **Морозова Е. А.**, Кузнецова Е. П., Касьяненко Н. А. Взаимодействие коротких пептидов KE и KEDW с ДНК // Международная молодежная конференция ФизикА.СПб, 26-29 октября 2015 г., С. 34.
8. **Морозова Е. А.** Сравнительный анализ взаимодействия коротких пептидов с ДНК *in vitro* // XXVII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 9-12 февраля, 2015 г., С. 87.
9. **Морозова Е.А.**, Болдырев А.Ю., Кузнецова Е.П., Линькова Н.С., Касьяненко Н.А. Взаимодействие коротких пептидов KE и KEDW с ДНК // V съезд биофизиков России, 4-10 октября 2015 г., г. Ростов-на-Дону, Т. 1, С. 147.

- 10. Морозова Е.А.** Исследование взаимодействия пептида KEDW с ДНК *in vitro* // Материалы XXII международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», секция «Биология», 13-17 апреля, 2015 г., Москва, С. 49-50.
- 11. E. Morozova, N. Kasyanenko, N. Linkova, V. Khavinson.** DNA interaction with peptide KEDW // P. 185. European biophysics journal with biophysics letters. – 233 Spring st, New York, NY 10013 USA : Springer, 2015. – Т. 44. – С. S185-S185.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

| | |
|------------|--|
| ДНК | дезоксирибонуклеиновая кислота |
| КД | круговой дихроизм |
| ЯМР | ядерный магнитный резонанс |
| AEDG | Ala-Glu-Asp-Gly, эпиталон |
| AEDL | Ala-Glu-Asp-Leu, бронхоген |
| EDR | Glu-Asp-Arg, пинеалон |
| KEDW | Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂ , панкреген |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole, 4',6-диамидино-2-фенилиндол |
| WaterLOGSY | Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy |
| NOE | nuclear Overhauser effect, ядерный эффект Оверхаузера |
| Tris | trisaminomethane, трисаминометан |
| Цис-ДДП | цис-Диамминдихлороплатина (II), цисплатин |