ДНК–СВЯЗАННЫЕ ЛИПИДЫ: МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК СО СТЕАРИНОВОЙ И НЕНАСЫЩЕННЫМИ ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ

[1]Жданов Р.И., [2, 4]Дьячков Е.П., [3]Стручков В.А., [2]Стражевская Н.Б., [4]Дьячков П.Н.

[1]Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича Российской Академии медицинских наук, г. Москва
[2]Институт общей патологии и патофизиологии Российской Академии медицинских наук, г. Москва
[3]Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, Российская Академия медицинских наук, г. Москва
[4]Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова, Российская Академия наук, г. Москва

Впервые с помощью компьютерных экспериментов показано, что жирные кислоты сильно связываются с ДНК, что согласуется с присутствием свободных жирных кислот в составе препаратов ДНК-связанных липидов, выделенных из различных клеток. Связывание всех жирных кислот с малой бороздкой ДНК сильнее, чем с большой. Это коррелирует с наличием двух пулов свободных жирных кислот, извлекаемых из препаратов ДНК биохимическими методами. Поскольку ДНК-полимераза связана также и с малой бороздкой ДНК, жирные кислоты могут играть важную роль в механизме регуляции репликации ДНК и передаче сигнала. Энергия взаимодействия жирных кислот с ДНК зависит как от числа двойных связей и изомерии жирной кислоты, так и от нуклеотидного состава ДНК. Зависимость энергии связи комплекса ДНК-жирная кислота от нуклеотидного состава указывает на возможность сайт-специфического связывания липидов с ДНК. При переходе от насыщенной жирной кислоты к ненасыщенным, содержащим одн! у, две и три двойных транс-связи наблюдается постепенное уменьшение энергий связи ДНК с жирной кислотой. Наличие одной и трех двойных цис-связей приводит к ослаблению прочности комплексов ДНК-жирная кислота по сравнению с насыщенной кислотой. Наиболее сильное связывание между ДНК и жирной кислотой обнаружено для ненасыщенной кислоты с двумя двойными связями . линолевой кислоты. Этот эффект можно объяснить тем, что изогнутая геометрия этой кислоты (форма бумеранга) повторяет изгиб спирали ДНК. Характер изменения энергии комплексов ДНК со стеариновой, линолевой, олеиновой и линоленовой кислотами коррелирует с экспериментальными данными по температуре плавления соответствующих комплексов: чем прочнее комплекс ДНК-жирная кислота, тем ниже температура плавления ДНК

Ключевые слова: олигодезоксирибонуклеотиды, ДНК-связанные липиды, жирные кислоты, линолевая кислота, молекулярная механика, структура, прочность комплексов.

Липиды входят в состав и ядерной мембраны, и являются важным интегральным компонентом хромосом, хроматина и ядерного матрикса, а также принимают активное участие в передаче сигнала, регуляции репликации и транскрипции ДНК и в индукции апаптоза1-8. Присутствие липидов в препаратах ДНК показано различными физико-химическими, физическими и биохимическими методами: седиментацией в градиенте CsCl9, в градиенте щелочной сахарозы10, дифракцией рентгеновских лучей под малыми углами11-12, методами микрокалориметрии13, кругового дихроизма14 и ЭПР15, а также в опытах с липолитическими и протеолитическими ферментами13. С помощью мягкого фенольного метода16 нами выделены природные надмолекулярные комплексы ДНК-связанные липиды из клеток эукариот и прокариот (тимус, печень крыс, регенерирующая печень крыс в S-фазе

и G2-фазе, сперма вьюна, эритроциты голубя, асцитная карцинома Эрлиха, асцитная гепатома Зайдела, саркома 37, E. coli B, фаг T2)13, 17-21. В опытах на курах установлено, что эти комплексы ДНК обладают высокой трансформирующей активностью13. Эти комплексы содержали 94-97% высокополимерных ДНК (3х 108 – 3х 109 Да), 1–3% липидов и 1–3% кислых негистоновых белков (НГБ). С помощью специальных экспериментов с добавлением меченых и не меченых липидов к гомогенату клеток перед выделением ДНК нами ранее доказано13, что ДНК связанные липиды являются природным компонентом ДНК, а не артефактом процедуры выделения. Наличие ДНК-связанных липидов in vivo доказано и с помощью изотопно-меченых липидов или их предшественников: 14С-ацетата13, 14С-холестерина и 3Н-глицерина22. Другими авторами с помощью нашего метода16 комплексы ДНК-связанные липиды выделены из Salmonella thyphimurium23 и из двух штамов Shigella sonnei24, а также другим методом из асцитной карциномы Эрлиха15,22.

Тот факт, что комплекс ДНК содержит близкое количество липидов и НГБ (1–3 %) не исключает возможность, что они могут функционировать в виде липопротеидов. Нами показано13, однако, что в отличие от протеолитических ферментов (трипсин, химотрипсин, проназа Е и Р) только липолитические ферменты (фосфолипазы А2, С, Д и липаза) вызывают сильную деградацию высокомолекулярных комлексов ДНК до 40 Х 106 Да. Отметим также, что при очень “жестком” методе выделения ДНК (ПАСК, фенол, этанол, РНКаза, проназа) из тимуса морской свинки был выделен низкомолекулярной препарат ДНК (5 Х 106 Да), в котором присутствовали лишь прочносвязанные ФЛ, так как профиль седиментации ДНК в CsCl изменялся только после предобработки фосфолипазой А, а не проназой9.

ДНК-связанные липиды имеют специфический состав, отличающийся от липидного состава ядерной мембраны, хроматина, ядерного матрикса, митохондрий и микросом. Для ДНК-связанных липидов характерно:

Преобладание нейтральных липидов (НЛ) над фосфолипидами (ФЛ);

Обогащение нейтральных липидов эфирами холестерина (ЭХ), свободными жирными кислотами (СЖК), диглицеридами (ДГ), и обеднение свободным холестерином (СХ) (35, 30, 25, 10 % соответственно от суммы НЛ);

Обогащение фосфолипидов кардиолипином (КЛ), и обеднение фосфатидилэтаноламином (Ф), фосфатидилхолином (ФХ), фосфатидилсерином (ФС), фосфатидилинозитом (ФИ) и наличие лишь следов сфингомиелина5 (50, 25, 12, 10, 3 % соответственно от суммы ФЛ);

Присутствие почти всего КЛ хроматина в ДНК5,13, что согласуется с наличием общего “межфосфатного” мотива между КЛ и ДНК25.

ДНК-связанные липиды состоят из двух пулов13, отличающихся по степени связывания с ДНК и составу: пул слабосвязанных липидов, который экстрагируется из ДНК в 35%

этанол (24 ч. при 37ºС без перемешивания), и пул прочносвязанных липидов, который экстрагируется смесью хлороформа и метанола (2:1) только после предъинкубации остатка ДНК (после 35% этанола) с ДНКазой I (2 ч., 37ºС). Каждый пул состоит из 4-х фракций НЛ (СЖК, ЭХ, СХ, ДГ) и из пяти фракций ФЛ (КЛ, Ф, ФХ, ФС, ФИ). Важно отметить что, независимо от метода выделения ДНК из асцитной карциномы Эрлиха13, 22, получены близкие результаты по содержанию прочносвязанных липидов (8,6 и 9,1 мкг на 1 мг ДНК, соответственно), а также по процентному составу СЖК (27,0 и 23,7% от суммы нейтральных липидов, соответственно).

Состав двух пулов ДНК-связанных липидов изменяется в зависимости от фазы клеточного цикла18, метаболической активности клетки19, при малигнизации20 и конформационном переходе ДНК из суперспирализованной формы в релаксированную13, а также под действием ионизирующей радиации и противоопухолевых препаратов in vivo13. Предполагалось, что слабосвязанный пул липидов участвует в регуляции транскрипции, а прочносвязанный пул – в прикреплении петель ДНК к ядерному матриксу13, Возможно также, что пул слабосвязанных липидов участвует в организации хроматина, а пул

прочносвязанных липидов представляет собой липиды, расположенные непосредственно в ДНК. Вышеизложенное позволяет сделать вывод о важной роли двух пулов специфических липидов в структурно-функциональной организации ДНК на различных стадиях эволюции.

Жирные кислоты представляют собой новый класс сигнальных молекул, которые участвуют в передаче сигнала13, регуляции экспрессии генов26 и активности ионных каналов27. Недавно появились работы28-31, в которых показаны различные эффекты цис- и транс-изомеров жирных кислот в зависимости от количества двойных связей или стереоизомеров ретиноевой кислоты на биохимические процессы в клетке. Так, только цис-ненасыщенные жирные кислоты (арахидоновая кислота) в отличие от транс-изомеров и насыщенных кислот активируют сайты связывания рецепторов аденозина А1 мозга крысы28. Обнаружено, что цис-изомеры арахидоновой кислоты (С20:4) и линолевой кислоты (С18:2) более эффективно увеличивает внутриклеточную концентрацию Ca2+, чем цис-олеиновая (С18:1) и миристиновая (С14:0)27. Из обзорной работы29 следует, что сфинголипиды с 4-транс-двойной связью и без двойной связи обладают различным влиянием на рост, дифференциацию и апоптоз клеток. В клетках печени и почек мышей найдены природные стереоизомеры ретиноевой кислоты (9-цис, 11-цис, 13-цис-ретиноевые кислоты), которые образуются из полностью транс-ретиноевой кислоты с помощью мембраносвязанной изомеразы30,31. Авторы приходят к выводу, что изомеризация ретиноидов является одним из ключевых механизмов передачи сигнала.

В пользу связывания липидов с ДНК в отсутствие белков свидетельствуют также результаты исследования нами титрования (мольное соотношение липид/пара оснований ДНК от 1:20 до 1:1) синтетических двуспиральных полинуклеотидов (гомо- или альтернативной последовательности: полиА.ролиТ, полиАТ, полиГ.полиЦ, полиГЦ) олеиновой кислотой различными физико-химическими методами: спектрофотометрия, спектроскопия кругового дихроизма, плазмонный резонанс (биосенсор), атомно-силовая микроскопия (наноскоп) и диализ комплексов ДНК-липид32. В этой работе данными методами было обнаружено сильное взаимодействие жирной кислоты с ДНК уже при соотношении 1:10 – 1:5. Методом спектроскопии кругового дихроизма было показано, что для полиАТ (и полиА.полиТ) связывание происходит по типу узнавания: спектр КД изменяется при величине соотношения липид/пара оснований ДНК 1:10 (уменьшается амплитуда полосы поглощения при 260 нм) и потом вплоть до величины соотношения 1:1 спектр КД не изменяется. Однако в случае полинуклеотидов полиГ.Ц (и полиГ.полиЦ) взаимодействие олеиновой кислоты с ДНК происходит по типу насыщения: спектр КД изменяется при титровании ДНК олеиновой кислотой вплоть до соотношения 1:1, причем при этом полоса спектра при 260 нм исчезает, а при 280 нм – появляется новая полоса. Это факт несомненно свидетельствует о сильном взаимодействии лиганда (олеиновая кислота) с полиГ.Ц. ДНК в отсутствие белков.

Несмотря на обилие биохимических данных о составе и биологической значимости хроматин- или ДНК-связанных липидов, информация о строении и прочности таких комплексов явно недостаточна. В 1994 г. была предложена гипотеза о существовании ДНК-фосфолипидного узнавания (рекогниции), т.е. специфичности взаимодействия нуклеиновых кислот и фосфолипидов, определяемой последовательностью оснований нуклеиновых кислот, природой полярной группы фосфолипида или природой иона металла33. В 1995 г. мы начали компьютерные эксперименты с целью оценки величин энергии взаимодействия двуцепочечных олигонуклеотидов (все 64 триплета генетического кода: pApApNpNpNpApA, где N-нуклеозид, А-аденозин, р-фосфат) с фосфолипидами (стабильности комплексов) без и в присутствии ионов металлов (П) в зависимости от последовательности нуклеотидов в олигомере или от природы фосфолипида33-35. Нами была, в частности, обнаружена тенденция, заключающаяся в большей величине энергии образования (большей стабильности) комплексов фосфатидилхолина и олигомеров ДНК с гуанозин/цитидин (ГЦ)-богатыми триплетами и для комплексов с ионами металла (Mg2+), чем без них36, 37.

Величины энергии образования комплексов в первом случае отличаются на 1.7-2.6 ккал.мол-1, что может рассматриваться как явление узнавания (рекогниции) на молекулярном уровне. Величины энергии образования комплексов со сфингомиелином были выше на 4-16 ккал.мол-1 по сравнению с соответствующими комплексами фосфатидилхолина37, что можно объяснить повышенным содержанием сфингомиелина в ядерной мембране, к которой прикрепляется хроматин.

Далее, методами молекулярной механики нами были изучены структура и энергии образования комплексов ДНК–элаидиновая («транс-олеиновая») кислота38. Показано, что эта кислота сильнее связывается с малой бороздкой ДНК, чем с большой, что может объяснить наличие двух пулов жирных кислот, извлекаемых из препаратов ДНК биохимическими методами13. Кроме того, в ходе компьютерных экспериментов обнаружена зависимость энергии такого взаимодействия элаидиновой кислоты от нуклеотидного состава ДНК. Тот факт, что при связывании ДНК с этой кислотой в комплексе происходит ослабление водородных связей, может свидетельствовать также об участии жирных кислот в регуляции транскрипции.

Цель настоящей работы – использовать более широкий круг жирных кислот для компьютерного моделирования характера взаимодействия и расчета энергии связи комплексов ДНК с липидами методами молекулярной механики. Для компьютерных экспериментов в работе взяты насыщенная и ненасыщенные жирные кислоты, содержащие 18 атомов углерода: стеариновая (I) (C18:0), олеиновая (III) с одной цис-двойной связью (C18:1), линолевая (V) с двумя цис-двойными связями (C18:2), линоленовая (VII) с тремя цис-двойными связями (C18 :3) и их и транс-изомеры: II, IV и VI, соответственно (Рис.1).

Методика расчета.

Как и ранее36-38, все расчеты проведены с помощью методов молекулярной механики MM+ или AMBER39. В этом методе полная энергия, Еполн , молекулярной системы представляется в виде суммы вкладов от растяжения химических связей (ER) и деформации валентных углов (EQ) относительно стандартных значений R0 и Q0, энергии торсионных взаимодействий (Еторс), энергии электростатических (Ее) и ван-дер-ваальсовых (Евдв) взаимодействий между валентно несвязанными атомами, и энергии водородных связей (EH).

$$E_{\text{полн}} = E_R + E_Q + E_{\text{торс}} + E_e + E_{\text{вдв}} + E_{\text{H}}\,, \qquad (1)$$

$$E_R = ½ \sum_i f_{R\,i}\,(R_i - R_{0i})^2, \qquad (2)$$

$$E_Q = ½ \sum_k f_{Q\,k}\,(Q_k - Q_{0k})^2, \qquad (3)$$

$$E_{\text{вдв}} = \sum_{i<j} f_{i\,j}[-\alpha/r_{i,j}^{\,6} + \beta\exp(-r_{i,j}/\gamma)],\ r_{i,j} = R_{i,j}/R_0; \qquad (4)$$

$$E_{\text{торс}} = ½ \sum_i V_i\,(1+\cos N\omega_i), \qquad (5)$$

$$E_e = \sum_{i<j} (q_i\,q_j)\,/\,R_{i,j}. \qquad (6)$$

В (2) суммирование ведется по связям, а fR i - силовые постоянные для растяжения связей i относительно стандартных значений R0i. В (3) суммирование по валентным углам, fQ k – силовые постоянные для искажения углов; Q0k – стандартное значение k-го валентного угла. При расчете энергий ван-дер-ваальсова взаимодействия (4) и электростатического взаимодействия (6) суммирование ведется по парам атомов i, j. В выражении (5) для Еторс Vi – барьер вращения для торсионного угла ω, N – параметр вращательного вырождения, который показывает какая конформация более выгодна – заслоненная или заторможенная. В (6) qi и qj – заряды атомов, а Ri,j – расстояние между ними.

Это – эмпирический метод; параметры силового поля, выбирают таким образом, чтобы воспроизвести строение и свойства достаточно широкого класса органических веществ.

Система параметров метода ММ+, по-видимому, более универсальная, применимая к более широкому кругу соединений, а параметры метода AMBER адаптированы к расчетам биополимеров: нуклеиновых кислот и белков. В данной работе с использованием молекулярной механики для фрагментов двойной спирали ДНК, для свободных жирных кислот, а также комплексов этих молекул (комплексов ДНК-лиганд) проведена полная оптимизация геометрии и определены значения энергии связи, Есвязи , лигандов с ДНК. Для ДНК взята В-форма, а для выполнения условия электронейтральности системы, добавлены ионы натрия. Энергия связи ДНК с лигандами определялась как разность полных энергий комплекса ДНК-лиганд и изолированных молекул. С учетом геометрических особенностей В-формы ДНК в рамках модели двойной спирали, молекулы лигандов были размещены в малой или большой борозде, и, соответственно, оценивались энергии связи лигандов при комплексообразовании с малой или большой бороздкой ДНК. Во всех случаях для

насыщенных частей углеводородных цепей лигандов была взята полностью заторможенная (шахматная) конформация (рис. 1).

Результаты и их обсуждение.

В табл. 1 представлены усредненные данные по количеству молекул СЖК, связанных с ДНК, в расчете на 1000 пар оснований (п.о.), исходя из экспериментальных данных по содержанию мкг СЖК на 10 мг ДНК13. Во всех объектах - эукариотах и прокариотах - кроме S-фазы регенирирующей печени крыс, количество молекул СЖК на 1000 п. о. в слабосвязанном пуле НЛ больше, чем прочносвязанном пуле. Особенно это характерно для метоболически неактивных геномов (сперма вьюна – в 16 раз, эритрациты голубя – в 3,3 раза). Наибольшее количество молекул СЖК (29 на 1000 п.о.) тестировано в G2 – фазе печени крыс. ДНК раковых клеток более обогащена СЖК, чем ДНК печени крыс в стадии активного синтеза. Отметим также, что ДНК фага Т2 содержит только прочносвязанный пул СЖК.

В нашей предыдущей работе38 было подробно изучено комплексообразование ДНК с элаидиновой (транс-олеиновой) кислотой, CH3(CH2)7CH=CH(CH2)7COOH,. В этой статье показано, что при расчете взаимодействия ДНК с жирными кислотами,

содержащими не более 20 атомов углерода в гидрофобном остове, можно ограничиться рассмотрением олигомера ДНК, включающего 10 пар нуклеотидов. В данной работе для расчетов в качестве олигомера ДНК выбраны олигодезоксирибонуклеотиды с альтернативной последовательностью пиримидиновых (АТ)10 или пуриновых нуклеотидов (ГЦ)10. Величины энергий этих олигонуклеотидов и энергии свободных жирных кислот приведены в таблице 2, а энергии связи для комплексов жирных кислот с ДНК - в таблице 3.

Начнем обсуждение с элаидиновой («транс-олеиновой») кислоты С18:1 (II). Энергия связи ДНК с данной кислотой II, Есвязи(ДНК–II), определяется как разность суммы полных энергий изолированных молекул, Еполн(ДНК) + Еполн(II), и полной энергии комплекса ДНК–II, Еполн(ДНК–II). Для элаидиновой кислоты в методе ММ+ Еполн(II) = 10.6 ккал/моль. Если фрагмент ДНК (АТ)10 и кислота II не взаимодействуют, полная энергия системы равна 662.5 + 10.6 = 673.1 ккал/моль, т.е. сумме энергий изолированных молекул. При помещении кислоты II в малую бороздку (АТ)10 происходит довольно большой выигрыш энергии равный 673.1 – 643.9 = 29.2 ккал/моль. Для сравнения энергия водородной связи CO...HN составляет не более 4 ккал/моль.

Можно видеть, что при помещении кислоты II в большую бороздку ДНК выигрыш энергии Есвязи = 16.8 ккал/моль, что почти в два меньше, чем при ее помещении в малую бороздку. Таким образом, кислота II довольно сильно взаимодействует с (АТ)10 и должна располагаться, в первую очередь, в малой бороздке.

Данные, приведенные в таблице 3, указывают на предпочтительность расположения всех изученных жирных кислот в малой бороздке ДНК по сравнению с большой. Эта предпочтительность отражает большее соответствие размеров желоба в малой бороздке ДНК размерам неразветвленных углеводородных остатков этих кислот. В большой бороздке для

них слишком “просторно”, что приводит к ослаблению взаимодействия между атомами жирной кислоты и бороздкой. Из таблицы 3 следует, что в (ГЦ)10 Есвязи кислоты II в малой бороздке на 6 ккал/моль, а в большой бороздке на 4.3 ккал/моль меньше, чем в (АТ)10, т.е. энергия взаимодействия кислоты II с молекулой ДНК зависит от ее нуклеотидного состава.

Теперь рассмотрим случай стеариновой кислоты (I), CH3(CH2)16COOH, не содержащей ни одной двойной связи. Для нее, Еполн(СТ) = 30,0 ккал/моль. Из таблицы 3 видно, что, при помещении стеариновой кислоты в малую бороздку (АТ)10 происходит выигрыш энергии равный 692,5 – 651,0 = 41,5 ккал/моль, что на 12,3 ккал/моль превышает аналогичную энергию связи кислоты II. Стеариновая кислота сильнее, чем кислота II связывается и с большой бороздкой ДНК: при помещении стеариновой кислоты в большую бороздку ДНК (АТ)10 выигрыш энергии Есвязи = 29,2 ккал/моль, что на 12,4 ккал/моль больше, чем в случае кислоты II. Более сильное взаимодействие стеариновой кислоты с ДНК, можно объяснить тем, что углеводородный хвост насыщенной кислоты конформационно более подвижен (не содержит жестких участков двойных связей), и эта кислота точнее укладывается в бороздках ДНК, легче изгибаясь вдоль бороздок и плотнее прилегая к их “стенкам”.

Аналогично случаю кислоты II, энергия связи стеариновой кислоты с ДНК зависит от нуклеотидного состава ДНК. Например, из таблицы 3 можно видеть, что в (ГЦ)10 Есвязи стеариновой кислоты в малой бороздке на 23,9 ккал/моль, а в большой бороздке на 12,4, ккал/моль меньше, чем в (АТ)10.

Сопоставим теперь прочность комплексов ДНК с кислотами II и III (транс- и цис-олеиновой кислотами). Переход от транс-изомера (элаидиновой кислоты) II к цис-изомеру III - олеиновой кислоте - сопровождается ослаблением взаимодействия жирной кислоты с ДНК: энергия связи с малой бороздкой ДНК (АТ)10 убывает от 29,2 до 21,7, а с большой бороздкой – от 16,8 до 10,9 ккал/моль; в случае (ГЦ)10 энергия связи в малой борозде меняется от 23,2 до 19,9, а в большой от 12,5 до 10,4 ккал/моль. Это различие в эффективности связывания стереоизомеров олеиновой кислоты возможно объясняется тем, что цис-изомер содержит изогнутый жесткий участок углеводородной цепи, препятствующий укладке молекулы вдоль бороздок ДНК.

Можно полагать, что наличие двух двойных связей (т.е. двух жестких участков) в линейной молекуле транс-,транс-линолевой кислоты (IV), CH3(CH2)4(CH=CHCH2)2(CH2)6COOH, должно ослаблять ее взаимодействие с ДНК по сравнению с транс-кислотой II. Действительно, численные значения показывают, что энергия связи транс-, транс-кислоты IV при ее размещении в малой и большой бороздках (АТ)10 меньше, чем для транс- кислоты II на 3,7 и 5,5 ккал/моль, соответственно. В случае (ГЦ)10 в малой бороздке энергии связи транс, транс-кислоты IV и транс-кислоты II практически совпадают: 23,7 и 23,2 ккал/моль, соответственно. При замене транс-кислоты II на транс, транс-кислоту IV в большой бороздке (ГЦ)10 происходит проигрыш энергии связи 3 ккал/моль. В транс-, транс-, транс-кислоте VI, CH3CH2 (CH=CHCH2)3(CH2)6COOH, на одну жесткую двойную связь больше, чем в транс, транс-кислоте IV, что должно предопределять дальнейшее ослабление взаимодействия кислоты с ДНК. Прямой расчет подтвердил уменьшение энергии взаимодействия ДНК и кислоты VI по сравнению с IV за исключением случая расположения кислот в малой бороздке (ГЦ)10.

Согласно приведенным в таблице 3 расчетам, из всех изученных нами жирных кислот, цис, цис-линолевая (V) кислота образует наиболее прочные комплексы с ДНК. При размещении кислоты III в малой и большой бороздках ДНК, энергии связи составляют 47-48 ккал/моль и 30-32 ккал/моль, соответственно. Возможно, это объясняется тем, что изогнутая за счет двух цис-связей конформация этой кислоты геометрически повторяет изгиб двойной спирали, что обеспечивает ей сильное взаимодействие с ДНК. Наличие трех цис-двойных связей в линоленовой кислоте (VII) приводит к очень сильному изгибу молекулы кислоты,

поэтому переход от кислоты V к кислоте VII нарушает геометрическое соответствие жирной кислоты форме бороздки ДНК и приводит к уменьшению величины Есвязи .

Наконец, отметим, что жирные кислоты ослабляют водородные связи в ДНК. Как показали расчеты, длины водородных связей в области расположения кислоты II в комплексе (AT)10-(II) в среднем равны 2.12 Å, в то время как в исходной молекуле (AT)10 они в среднем 2.06 Å. Длина шага ДНК при присоединении кислоты II практически не меняется (33.56 Å - для ДНК и 33.68 Å - для комплекса).

При изучении in vitro комплексов ДНК с ЖК (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3) в отсутствие белков методом термической денатурации показано40, что стабилизация или дестабилизация водородных связей ДНК зависит от длины и степени ненасыщенности ЖК, которые, по мнению авторов, могут располагаться и в малой и в большой бороздках ДНК.

Следует отметить, что предсказанные расчетами прочности связи ДНК с жирными кислотами подтверждаются экспериментальными данными по температурам плавления комплексов ДНК с этими кислотами40. Характерно, что взаимодействие со стеариновой кислотой понижало температуру плавления ДНК на 6оС. Взаимодействие с линолевой кислоты понижало температуру плавления ДНК на 2оС. Олеиновая и линоленовая кислоты слабее влияли на температуру плавления ДНК и даже повышали ее на 1-2оС.

Заключение.

1. Связывание всех жирных кислот с малой бороздкой ДНК сильнее, чем с большой. Это коррелирует с наличием двух пулов свободных жирных кислот, извлекаемых из препаратов ДНК биохимическими методами. Поскольку ДНК-полимераза взаимодействует также и с малой бороздкой ДНК41, жирные кислоты могут играть важную роль в механизме регуляции репликации ДНК и передаче сигнала.

2. Энергия взаимодействия жирных кислот с ДНК зависит как от числа двойных связей и изомерии жирной кислоты, так и от нуклеотидного состава ДНК. Зависимость энергии связи комплекса ДНК-жирная кислота от нуклеотидного состава указывает на возможность сайт-специфического связывания липидов с ДНК.

3. При переходе от насыщенной жирной кислоты к ненасыщенным, содержащим одну, две и три двойных транс-связи наблюдается постепенное уменьшение энергий связи ДНК с жирной кислотой.

4. Наличие одной и трех двойных цис-связей приводит к ослаблению прочности комплексов ДНК-жирная кислота по сравнению со случаем насыщенной кислоты.

5. Наиболее сильное связывание между ДНК и жирной кислотой обнаружено для случая ненасыщенной кислоты с двумя двойными связями – линолевой кислоты. Этот эффект можно объяснять тем, что изогнутая геометрия этой кислоты (форма бумеранга) повторяет изгиб спирали ДНК.

Работа поддержана грантами РФФИ № 00-03-32968, Министерства промышленности и науки Московского областного правительства № 01-04-97013 (2001-2003 гг.), Отделения химии и науки о материалах РАН и фонда им. А. Фон Гумбольдта (Р.И.Ж.) (Бонн, Германия).

Таблица 1. Плотность жирных кислот в геномной ДНК, рассчитанная как количество связанных с ДНК молекул жирных кислот в расчете на 1000 пар оснований (ошибка ± 5%) на основе экспериментальных данных13.

Объекты	Плотность	
	а	б
Тимус крысы	5,0	3,1
Печень крысы: G0-фаза	5,3	4,5
Печень крысы: S-фаза	3,6	5.0
Печень крысы: G2-фаза	29	15
Сперма вьюна	10	0,56
Эритроциты голубя	3,3	0,96
Асцитная гепатома Зайдела	9,1	6,3
Саркома 37	7,7	3,8
Асцитная карцинома Эрлиха	5,9	4.0
E. coli B	4,8	2,3
Фаг T2	0	1,3

Примечание: а – слабосвязанный пул, б – прочносвязанный пул липидов;
При расчете средних величин “липидной плотности” за величины молекулярных масс взяты: свободных жирных кислот - 260, ДНК - 10^8 Да.

Таблица 2. Значения полных энергий олигомеров ДНК (АТ)10, (ГЦ)10 и молекул жирных кислот.

№	Состав	Еполн, ккал/моль
1	(АТ)10	662,5
2	(ГЦ)10	363,2
3	стеариновая кислота (I)	30,0
4	транс-олеиновая кислота (II)	10,6
5	цис-олеиновая кислота (III)	10,9
6	транс, транс-линолевая кислота (IV)	9,3
7	цис, цис-линолевая кислота (V)	15,6
8	транс, транс, транс-линоленовая кислота (VI)	8,9
9	цис, цис, цис-линоленовая кислота (VII)	12,2

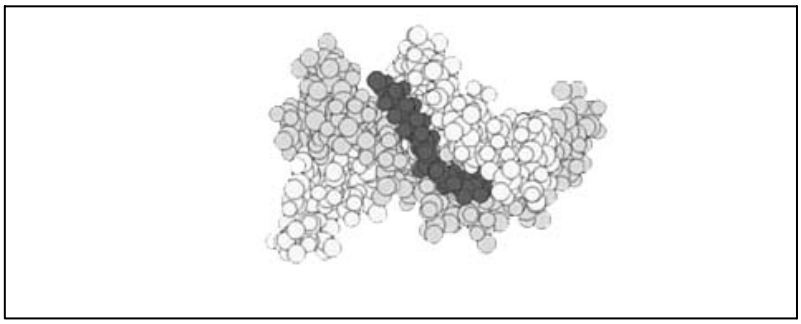
Таблица 3. Величины энергий образования комплексов ДНК с жирными кислотами при расположении жирных кислот в малой и большой бороздках (мб и бб, соответственно).

№	Состав комплекса	Расположение кислоты	Еполн, ккал/моль	Есвязи, ккал/моль
1	(АТ)10-(I) С18:0	м б	651,0	41,5
2	(АТ)10-(I)	б б	663,3	29,2
3	(ГЦ)10-(I)	м б	375,7	17,6
4	(ГЦ)10-(I)	б б	376,5	16,8
5	(АТ)10-(II), транс С18:1	м б	643,9	29,2
6	(АТ)10-(II)	б б	656,3	16,8
7	(ГЦ)10-(II)	м б	350,6	23,2
8	(ГЦ)10-(II)	б б	361,3	12,5
9	(АТ)10-(III), цис С18:1	м б	651,6	21,7
10	(АТ)10-(III)	б б	662,6	10,9
11	(ГЦ)10-(III)	м б	353,2	19,9
12	(ГЦ)10-(III)	б б	362,7	10,4
13	(АТ)10-(IV), транс С18:2	м б	646,4	25,5
14	(АТ)10-(IV)	б б	660,5	11,3
15	(ГЦ)10-(IV)	м б	348,8	23,7
16	(ГЦ)10-(IV)	б б	363,0	9.5
17	(АТ)10-(V), цис С18:2	м б	628,7	48,2
18	(АТ)10-(V)	б б	645,4	31,5
19	(ГЦ)10-(V)	м б	338,2	46,9
20	(ГЦ)10-(V)	б б	354,9	30,2
21	(АТ)10-(VI), транс С18:3	м б	647,8	23,6
22	(АТ)10-(VI)	б б	660,6	10,8
23	(ГЦ)10-(VI)	м б	340,0	32,2
24	(ГЦ)10-(VI)	б б	356.8	6,4
25	(АТ)10-(VII), цис С18:3	м б	662,5	12,6
26	(АТ)10-(VII)	б б	668,7	6,4
27	(ГЦ)10-(VII)	м б	353,1	22,3
28	(ГЦ)10-(VII)	б б	362.4	12.9

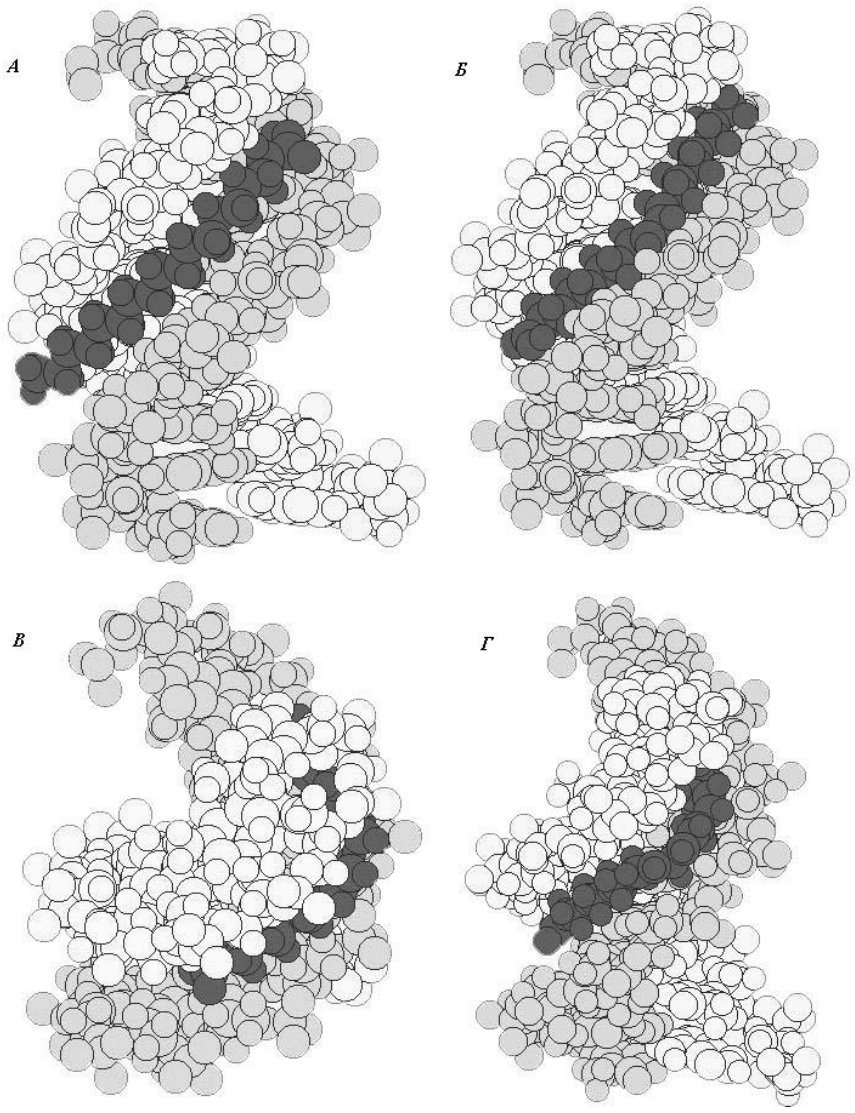
Подписи к рисункам:

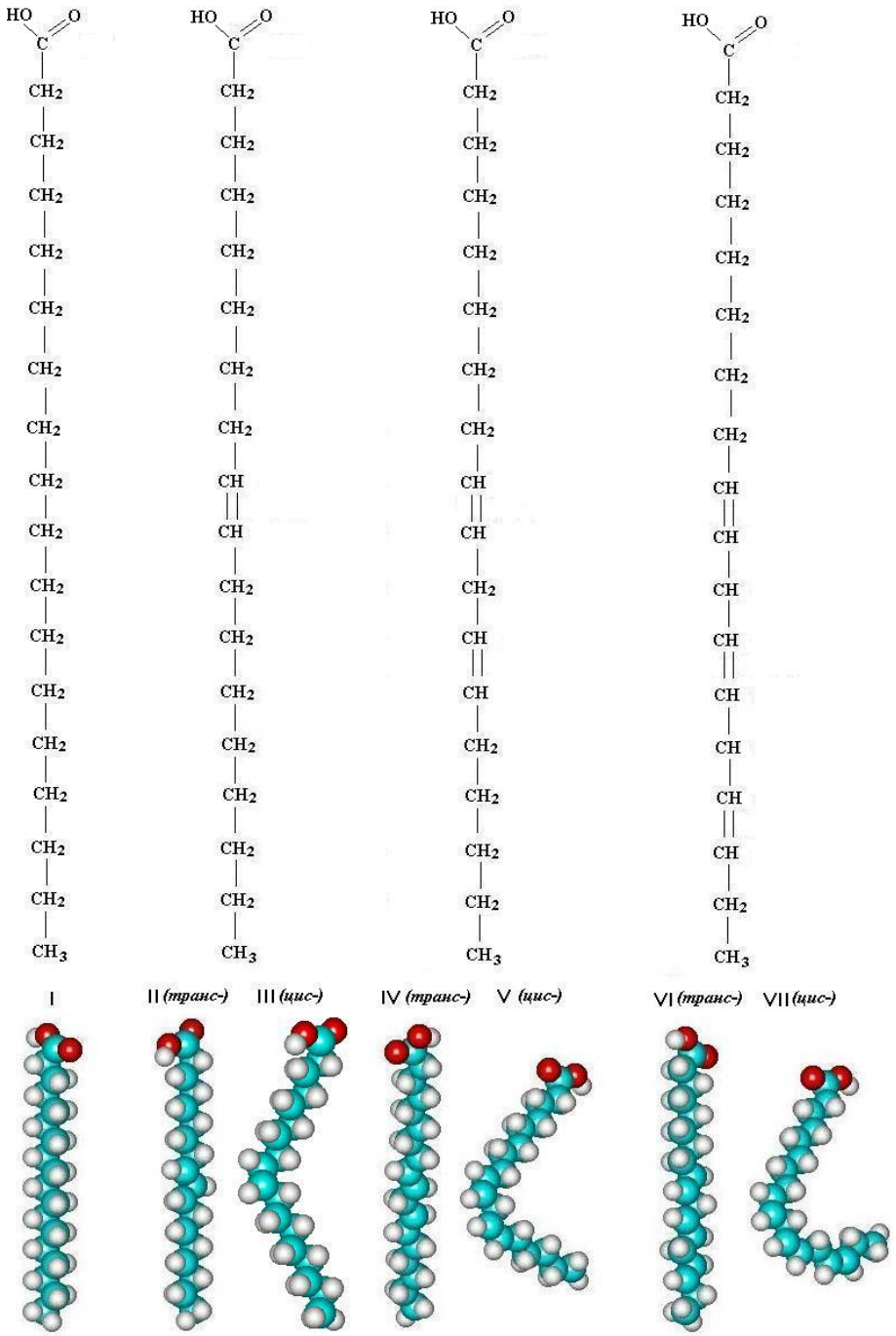
Рис. 1. Структурные формулы (вверху) и оптимизированные методом ММ+ заторможенные конфигурации (внизу) жирных кислот.

Рис. 2. Равновесная геометрия комплексов олиго-$(AT)_{10}$ со стеариновой (А), олеиновой (Б), линолевой (В) или линоленовой (Г) кислотами, оптимизированные по результатам молекулярной механики.



Графический реферат к статье Р.И. Жданова и др.


А
Б
В
Г



Структурированный перечень слов для статьи Р.И. Жданова и др.

Молекулярная механика
- AMBER
- MM +
- конформация

Жирная кислота
- стеариновая
- олеиновая
- линолевая
- линоленовая
- *цис, транс* изомеры

- элаидиновая
ДНК – жирная кислота
- комплекс
-- стабильность
-- строение
-- энергия связи
ДНК – связанные липиды
- состав
- выделение
- строение
- функция
- два пула
- липидная плотность

Лература

1. В.А. Стручков, Н.Б. Стражевская, *Биохимия*, 2000, **65**, 620.
2. А.В. Алесенко, *Биохимия*, 1998, **63**, 75.
3. R.I. Zhdanov, and T. Hianik, *Bioelectrochem*. 2002, **58**, 1. Special issue, devoted to DNA-bound lipids and membranes.
4. V.A. Struchkov, N.B. Strazhevskaya, and Zhdanov R.I., *Bioelectrochem*., 2002, **58**, 55.
5. R.I. Zhdanov, V.A. Struchkov, O.S. Dyabina, and N.B. Strazhevskaya, *Cytobios,* 2001, **106**, 55.
6. K. Tamiya – Koizumi, J. Biochem., 2002, **132**, 13.

7. Ю.С. Казначеев, Т.П. Кулагина, Л.Н. Маркевич, И.К. Коломийцева, А.М. Кузин, *Молекулярная биология*, 1984, **18**, 607.
8. L. Cocco, A.M. Martelli, R.S. Gilmour, S.G. Rhee, and F.A. Manzoli, *Biochim. Biophis. Acta,* 2001, **1530,** 1.
9. A.A. Gottlieb, L. Taylor, and F. Seinsheimer, *Biochemistry*, 1970, **9**, 4322.
10. M.M. Elkind, and C. Kamper, *Biophys. J*., 1970, **10**, 237.
11. J.F. Pardon, and M.H.F. Wilkins, *J. Mol. Biol*., 1972, **68**, 115.
12. E. Raukas, V.A. Struchkov, and N.B. Strazhevskaya, *Esti N S V Tead. Akad. Toim.,* Biol. Seria, 1966, **15**, 161.
13. В.А. Стручков, Н.Б. Стражевская, *Биохимия*, 1993, **58**, 1154.
14. N.L. Kruglova, N.B. Strazhevskaya, and V.M. Lobachev, *Studia Biophys*., 1982, **87**, 135.
15. З.В. Куроптева, Г.П. Жижина, Е.Ф. Бунина, С.И. Скалацкая, А.В. Алесенко, Л.К. Пулатова, *Докл. АН СССР*, 1983, **268**, 1248.
16. Г.П. Георгиев, В.А. Стручков, *Биофизика*, 1961, **5**, 745.
17. С.Д. Беляев, Н.Б. Стражевская, И.К. Коломийцева, В.А. Стручков, А.М. Кузин, *Докл. АН СССР*, 1974, **214**, 1189.
18. В.А. Стручков, Н.Б. Стражевская, *Биохимия*, 1988, **53**, 1449.
19. В.А. Стручков, Н.Б. Стражевская, *Биохимия,* 1990, **55**, 1266.
20. В.А. Стручков, Н.Б. Стражевская, *Эксперимент. онкология*, 1989, **11**, 35.
21. V.A. Struchkov, N.B. Strazhevskaya, and R.I. Zhdanov, *Bioelectrochem*., 2002, **56**, 195.
22. Zs. Balint, Bas. Appl. Histochem., 1987, **31**, 365.
23. К.М. Синяк, И.И. Даниленко, *ДАН УССР*, Сер. В., 1976, **12**, 1119.
24. Шепелев А. П., Шестопалов А. В., Рындич А. А., Ставиский И. М., Яговкина В. В. // *Бюлл. эксп. биол. и мед*., 1995, **120**, 332.
25. M. Guarnieri, and D. Eisner, *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 1974, **58**, 347.
26. E. Duplus, M. Glorian, and C. Forest, *J. Biol. Chem*., 2000, **270**, 30749.
27. З.И. Крутецкая, О.Е. Лебедева, Н.И. Крутецкий, Л.С. Курилова, *Цитология*, 2001, **43**, 1051.
28. R.A. Cunha, M.D. Costantino, E. Fonseca, and I.A. Ribeiro, *Eur. J. Biochem*. 2001, **268**, 2939.
29. Э.В. Дятловицкая, *Биоорганич. Химия,* 2002, **28**, 5.
30. R.A. Heyman, D.J. Mangelsdorf, J.A. Dyck, R.B. Stein, G. Eichele, R.M. Evans, and C. Thailler, *Cell*, 1992, **68**, 397.
31. P.S. Bernstein, W.C. Law, and R.R. Rando, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1987, **84**, 1849.
32. R.I. Zhdanov, N.B. Strazhevskaya, A.R. Jdanov, and G. Bischoff, *J. Biomol. Str. Dynamics*, 2002, **20**, 231-243.
33. R.I. Zhdanov, and R. Kaptein, *Appl. Magnetic Reson.,* 1994, **7**, #4, IX. Special issue, devoted to the study of nucleic acid–(phospho)lipid interactions, complexes and recognition by nuclear magnetic resonance techniques (R.I. Zhdanov, and R. Kaptein, eds).
34. R. Zhdanov, B.B. Fedorov, V.V. Kuvichkin, and P.N. Dyachkov, *J. Mol. Med*., 1997, **75**, № 5, B2.
35. Б. Федоров, Л. Лопухов, А. Меркин, П. Дьячков, Р. Жданов. II Съезд Биохимического общества, Май 1997, Москва, Тезисы докладов, часть II, IX.78, 473.
36. Б.Б. Федоров, П.Н. Дьяков, Р.И. Жданов. Изв. Акад.наук. Сер.хим.наук., 1999, № 11, 2068-2069.
37. P.N. Dyachkov, B.B. Fedorov, R. Bischoff, G. Bischoff, and R.I. Zhdanov, *Bioelectrochem*., 2002, **58**, 47.
38. В.А. Стручков, Е.П. Дьячков, Н.Б. Стражевская, Р.И. Жданов, П.Н. Дьячков, *Докл. РАН,* 2001, **381**, 554.
39. U. Burkert, N. Allinger, *Molecular Mechanics*, Am. Chem. Soc., Washington, DC, 1982.

40. F.A. Manzoli, J.H. Muchmore, B. Bonora, S. Capitani, and S. Bartoli, *Biochim. Biophis. Acta,* 1974, **340,** 1.
T.E. Spratt, *Biochemistry*, 2001, **40**, 2647.