

УДК 575.17:612.111.19

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ДНК

Сидоров Д. И., Трофимов В. А.

ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н. П. Огарева», Саранск, Россия (430005, г. Саранск, ул. Большевикская, 68), e-mail: geneticlab@yandex.ru

С помощью биоинформатического подхода и метода компьютерного моделирования проанализирована вероятность связывания холестерина (ХС) с регуляторно-промоторной областью гена *p53* человека. В опытах *in vitro* показано, что холестерин взаимодействует с олигонуклеотидной последовательностью участка гена минимально с тремя нуклеотидами. Выявлено, что наиболее предпочтительными сайтами связывания холестерина с олигонуклеотидными последовательностями ДНК являются триплеты: ctAAAaa, agTATct, ttTAAc, фланкированные определенными нуклеотидами. ДНК в комплексе с холестерином гидролизует *HinfI* по сайтам рестрикции с различной эффективностью. Определяющим фактором является значение pH среды. Наиболее полная рестрикция комплекса ДНК-ХС происходит в сильнощелочной среде, наименее полная в слабощелочной среде. Полученные данные свидетельствуют о возможном влиянии холестерина на транскрипционную активность гена и его регуляторной роли в экспрессии генов.

Ключевые слова: холестерин, промотор гена *p53*, биоинформатический подход, рестрикционная активность *HinfI*.

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL APPROACH IN CHOLESTEROL INFLUENCE ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF DNA

Sidorov D. I., Trofimov V. A.

Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russia (430005, Saransk, street Bolshevistskaya, 68), e-mail: geneticlab@yandex.ru

Using bioinformatics approach and a method of computer modeling analyzed the probability of binding cholesterol from the regulatory and promoter region of the human *p53* gene. The *in vitro* experiments demonstrated that cholesterol is reacted with the oligonucleotide sequence portion of the gene with minimal three nucleotides. It was found that the most preferred binding sites for cholesterol with oligonucleotide sequences of DNA triplets are: ctAAAaa, agTATct, ttTAAc, flanked by certain nucleotides. DNA complexed with cholesterol hydrolyzed by *HinfI* restriction sites with different efficiency. The determining factor is the pH values. The most complete restriction of the DNA-cholesterol takes place in a highly alkaline environment, the least complete in a slightly alkaline environment. These data suggest a possible effect of cholesterol on the transcriptional activity of the gene and its regulatory role in gene expression.

Keywords: cholesterol, the human *p53* gene promoter, bioinformatics approach, activity restriction *HinfI*.

ДНК – сложная биоорганическая молекула, существующая в виде надмолекулярного нуклеопротеидного комплекса – хроматина, конформация которого динамично изменяется в зависимости от набора взаимодействующих с ним биомолекул.

В составе хроматина, кроме белков, обнаружены фосфолипиды и нейтральные липиды. Причем состав липидов хроматина отличается по качественному и количественному составу от липидов ядерных мембран и изменяется при изменении функционального статуса хроматина [3,4,5]. В настоящее время показано, что взаимодействие с нуклеотидными последовательностями хроматина различных химических соединений, в частности низкомолекулярных веществ (липидов, ионов металлов, биологически активных веществ)

играет важнейшую роль в регуляции функциональной активности ДНК, реализуемой в различных генетических процессах (репликации, транскрипции, репарации, рекомбинации) [3,4].

По-видимому, изменение липидного состава может выступать в качестве одного из механизмов регуляции генной экспрессии, основанной на динамичности конформации ДНК, определяемой не только белками, но и липидами. В связи с этим актуальной задачей является поиск регуляторных молекул, способных взаимодействовать с нуклеотидными последовательностями ДНК и изменять функциональную активность генов и других структурных элементов ДНК.

В настоящем исследовании с помощью биоинформатического подхода и метода компьютерного моделирования изучена способность холестерина взаимодействовать с ДНК и экспериментально оценены некоторые возможные функциональные последствия образования подобного молекулярного комплекса.

Материалы и методы исследования. Молекулярную динамику взаимодействия холестерина с олигонуклеотидной последовательностью регуляторно-промоторной области гена *p53* человека (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) проводили с помощью программы HyperChem 7.0, расчеты проводили методом молекулярной механики Mm+.

Выделение ДНК проводили согласно методике Laura-LeeWoodram с небольшими модификациями [6].

Аmplification фрагмента ДНК размером 152 п.н., содержащего сайт рестрикции к рестриктазе *HinfI*, проводили с использованием фланкирующих праймеров: F 5'agcagtctgtctcctcсааа, R 5'cgatattggatcacatttctg в амплификаторе Veriti. Параметры циклов ПЦР:

- 1) 95°C – 180 сек. – 1 цикл;
 - 2) 60°C – 30 сек.
 - 3) 72°C – 30 сек.
 - 4) 95°C – 20 сек.
- } 30 циклов.

Рестриксию проводили с помощью рестриктазы *HinfI*, реакционную смесь, содержащую рестриктазу, SE-буферО (50 мМTris-HCl, 10 мМMgCl₂, 100 мМNaCl, 1 мМDTT) и ампликоны, инкубировали в течение 1 часа при 37 °C.

Электрофорез проводили в полиакриламидном геле (36 мл 0,5x TBE, 9 мл 30% PAAG, 250 мклPSA, 40 мклTEMED), содержащем бромистый этидий (0,5 мг/л) при разных значениях рН.

Результаты исследования и их обсуждение. Для обоснования целесообразности исследования влияния холестерина (ХС) на конформацию ДНК нами проведено моделирование взаимодействия ХС с фрагментами ДНК.

Способность ХС к взаимодействию с ДНК оценивалась путем определения энергетически выгодного расположения липида в бороздках В-формы двойной спирали фрагмента ДНК, соответствующей промоторной последовательности гена *p53*, а также энергии образования комплексов липид-ДНК. Критерием наиболее вероятного связывания ХС с участком молекулы ДНК являлось значение энергии связи. Энергия связи ДНК с ХС определялась как разность полных энергий комплекса ДНК-ХС и изолированных молекул ДНК и ХС. Молекулы ХС, с учетом геометрических особенностей В-формы двойной спирали ДНК, размещались в малой бороздке [1,2].

Ранее показано, что взаимодействие холестерина с ДНК (АТ)₅(ТА)₅ более сильное, чем с ДНК (ГЦ)₅(ГЦ)₅ [1].

Нами в компьютерном эксперименте показано, что наиболее предпочтительными сайтами связывания ХС с ДНК являются последовательности: ctAAAaa, agTATct, ttTAAac и некоторые другие (табл. 1).

Таблица 1

Наиболее предпочтительные сайты связывания холестерина с ДНК

№	Последовательность	Е _{св} kal/mol
1	ctAAAaa	43.53
2	agTATct	42.77
3	ttTAAac	42.54
4	ccAAAat	42.1
5	taGGGtg	41.43
6	acCCCa	41.3
7	ctGGGct	41.17
8	agAAAac	40.76
9	tcGGGct	40.62
10	aaAAAtg	40.55
11	gcAAAag	40.24
12	ttTTCca	40.1

Поскольку наибольшую энергию связи ХС образует в комплексе с тремя нуклеотидами ДНК, то в дальнейших экспериментах молярное соотношение холестерина и анализируемых олигонуклеотидов определялось как 1:3.

Исходя из наличия более или менее предпочтительных сайтов связывания ХС с ДНК, мы выявили наличие этих участков на последовательности гена, включающего область промотора гена *p53* (рис. 1).

Aaagtafctgggagaaaacgtaggtgtgatattacggaaagccttcttaaaaaatgacatttaactgatggaagaa
 aggatccagctgagagcaaacgcanaagctttcttcttccacccttcatatttgacacaatgcaggattcctccnaaa
 tgattccaccaattctgccctcacagctctggcttgcagaatttcaccccaaaatgtagtaactacggcaccaggt
 cggcgagaatcctgactctgcaccctctccccaaactccatttcttcttctcggcagggcgggattacttgcct
 tacttgcctatggcgactgtccagctttgtgccagagcctcgcaggggtgatgggattggggtttccccctccatgtg
 ctcaagactggcgctaaaagttttgagcttctcaaaagtctagagccaccgtccagggagcaggtagctgctgggct
 ccggggacactttgcgttcgggctgggagcgtgcttccacgacggtgacacgcttccctggattgggtaagctcct
 gactgaacttgatgagtcctctctgagtc

Рис. 1. Места возможного связывания холестерина с промоторной областью гена *p53*

Поиск триплетов, обладающих повышенным сродством к определенным последовательностям ДНК, показал, что они распределены по олигонуклеотидной последовательности неравномерно. В частности, в области -48 – -24 промотора гена *p53* человека существует последовательность, с которой связывается транскрипционный фактор белка *p53* (на рисунке выделено желтым цветом). В этой области не содержится ни одного триплета с характерным фланкированием для предпочтительного связывания с ХС. Всего триплетов с характерным рисунком фланкирования для предпочтительного связывания ХС на фрагменте анализируемого гена длиной 680 нуклеотидов – 14, что является косвенным подтверждением неравномерного распределения липидов в разных локусах ДНК.

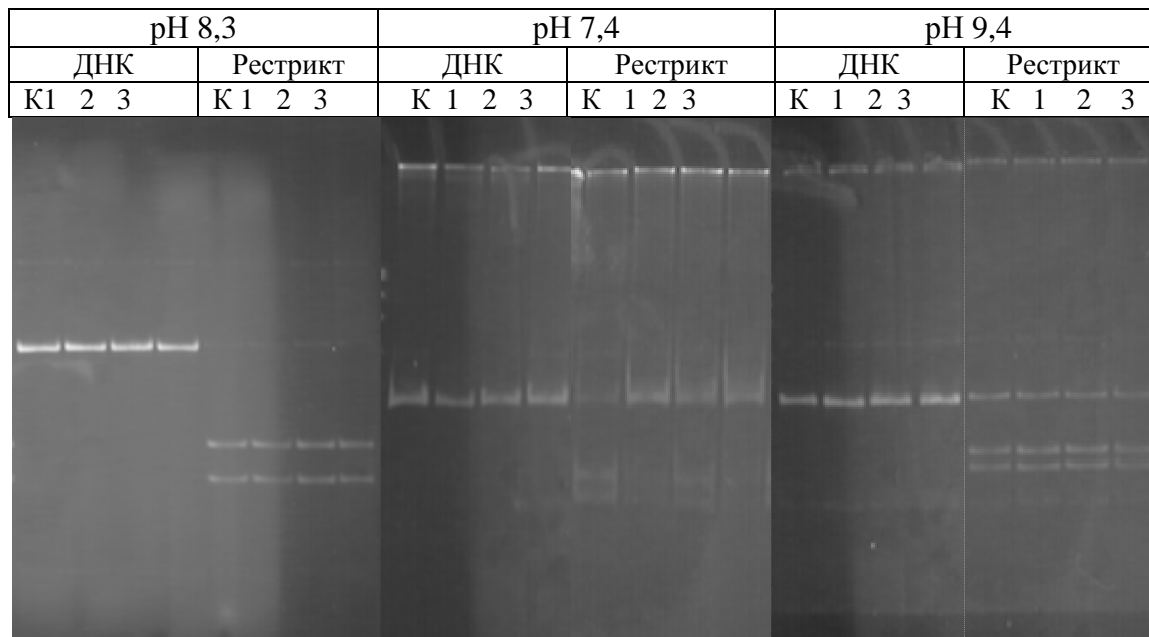
В эксперименте изучали взаимодействие ХС с амплифицированным фрагментом ДНК, содержащим сайт рестрикции к рестриктазе *HinfI* размером 152 п.н. с использованием фланкирующих праймеров: F 5'agcagtctgtctcctccaaa, R 5'cgatatttgatcacatttctg. Данный фрагмент содержал замену нуклеотида в положении gttg:

agcagtctgtctcctccaaaacagagggtcaccggtttggacttcatccctgggctccatcctgtcctgagttgtccaagatggaccagaccctgg
 cgatctaccaacagatcctcaccagctgccttcagaaatgtgatccaaatcgg

К ампликонам добавляли холестерин в концентрации 1:3, 1:6, 1:9 и инкубировали в течение 60 минут. Для рестрикции данного фрагмента использовали эндонуклеазу *HinfI* (рис. 2).

Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что при pH 8,3 *HinfI* полностью рестрицирует ампликоны как в контроле, так и при воздействии ХС в различной концентрации (рис. 2А). При увеличении значения pH до 9,4 способность *HinfI* рестрицировать ампликоны по сравнению с контролем не изменилась, однако в этом случае

рестрикция всех образцов ДНК была не полной (рис. 2В). Однако при значениях рН 7,4 по сравнению с контролем способность *HinfI* рестрицировать ампликоны понижается (рис. 2Б).



А Б В

Рис. 2. Электрофореграмма геля с ДНК и рестриктами (К – контроль (проба без холестерина); 1 – соотношение ДНК:ХС – 1:3; 2 – соотношение ДНК:ХС – 1:6; 3 – соотношение ДНК:ХС – 1:9)

Таким образом, рестриктаза режет комплекс ДНК-ХС по сайтам рестрикции с разной эффективностью в слабощелочной и сильнощелочной средах.

По-видимому, при снижении величины отрицательного заряда ДНК, сродство ХС к олигонуклеотидам ДНК возрастает, а образующийся устойчивый комплекс ДНК-ХС подвергается рестрикции в меньшей степени. При смещении рН в щелочную область величина отрицательного заряда олигонуклеотидов возрастает, вследствие чего сродство ХС к ДНК уменьшается.

Известно, что при действии повышенных температур в щелочной среде ДНК начинает разворачиваться, расплетаться. В клетке хроматиновая ДНК тоже локально расплетается при генетических процессах, в результате чего изменяется величина отрицательного заряда, что может выступать фактором изменения сродства биомолекул, в частности, холестерина к определенным нуклеотидным последовательностям и играть регуляторную роль, по крайней мере, изменяя чувствительность к действию ферментов, в том числе к нуклеазам.

Список литературы

1. Бойко Н.И. Моделирование взаимодействия ДНК с диглицеридами / Н.И. Бойко, Р.И. Жданов, Е.П. Дьячков и др. // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2008. – № 8. – С. 1741-1744.
2. Жданов Р.И. Структура и стабильность комплексов олигомеров ДНК с жирными кислотами по данным молекулярной механики / Р.И. Жданов, Е.П. Дьячков, Н.Б. Стражевская и др. // Доклады Академии наук. – 2003. – Т. 390, № 4. – С. 548-552.
3. Жданов Р.И. Структурная липидомика. Холестерин и его эфиры в геномной ДНК эукариот: биохимический анализ и компьютерное моделирование / Р.И. Жданов, Е.П. Дьячков, Н.Б. Стражевская и др. // Патогенез. – 2003. – № 1. – С. 55-61.
4. Трофимов В. А. Влияние холестерина на экспрессию генов раннего ответа и митотическую активность перитонеальных макрофагов / В.А. Трофимов, О.Н. Аксенова, А.В. Никулин, М.В. Ромашкина, Е.А. Иванова // Казанский медицинский журнал. – 2009. – Т. 90, № 4. – С.560-563.
5. Трофимов В. А. Характеристика спектра липидов фракций хроматина клеток печени мышей после частичной гепатэктомии / В. А. Трофимов, А. А. Дудко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, № 1. – С. 85–88.
6. Boodram Laura-Lee. Extraction of genomic DNA from whole blood / Protocol Online – Your Lab's Reference Book – online database of research protocols in a variety of life science fields [Electronic resource]. 1999–2006. Mode of access: <http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/Extraction-of-genomic-DNA-from-whole-blood-3171.html>

Рецензенты:

Ерофеев В.И., д.б.н., профессор, проректор по учебной и методической работе ФГБОУ ДПОС «Мордовский институт переподготовки кадров агробизнеса», г. Саранск;
Шубина О.С., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биологии, географии и методик обучения ФГБОУ ВПО «МГПИ им. М.Е. Евсевьева», г. Саранск.