

Изучение пространственной структуры протамина методом временной диэлектрической спектроскопии

Л. К. Охотникова, Е. В. Шерчкова, В. С. Цыганков

Ростовский государственный университет
Пр. Стачки, 194/1, Ростов-на-Дону, 344090, Россия

Методом временной диэлектрической спектроскопии изучена пространственная структура протамина. Показано, что протамины в водных растворах имеют ярко выраженную неглобулярную структуру.

Введение. Протамины относятся к классу низкомолекулярных аргинин-богатых ядерных белков, ассоциирующихся с ДНК. Их роль заключается в «упаковке» ДНК в очень компактную форму с образованием стабильного и неактивного комплекса протамин—ДНК [1, 2]. Существует предположение, что фосфорилированные протамины служат для «корректного» связывания протаминов с ДНК, дефосфорилированные — активны на последней стадии компактизации ДНК [2]. Хотя роль протаминов в хроматине достаточно хорошо изучена (см., например, [3—6]), структура образуемого комплекса протамин—ДНК и самого протамина обсуждается и по сей день. В данной работе предпринята попытка изучения третичной структуры протамина в водном растворе методом временной диэлектрической спектроскопии (ВДС).

Условия эксперимента. Для проведения эксперимента использован ядерный белок протамин производства фирмы «Sigma» (США). Использовали растворы белка в дистиллированной воде с концентрацией 2 %, для температурных исследований готовили трициновый буферный раствор (0,05 М, рН 7,3) [7]. Измерения проводили на автоматизированном временно-диэлектрическом (ВД) спектрометре, созданном на базе отечественного серийного прибора Р5-11 и управляющего компьютера

Pentium 166. Диапазон перекрываемых частот, достигаемый с помощью данного спектрометра, составляет $2 \cdot 10^5$ — $3 \cdot 10^9$ Гц. ВД-спектрометр позволяет также проводить измерения в широком интервале характеристических времен τ^{β} , который можно условно разделить на два диапазона: первый — быстрых процессов (10^{-8} — 10^{-10} с) и второй — медленных процессов (10^{-6} — 10^{-8} с). Диэлектрические измерения проводили в диапазоне частот $5 \cdot 10^5$ — $6 \cdot 10^8$ Гц, что соответствует β -дисперсии растворов белков. Для повышения разрешающей способности спектрометра применен дифференциальный метод измерений [8, 9] с неэквидистантной выборкой сигнала [10]. Интервалы между выборками составляли: $\omega_1 = 0,28$; $\omega_2 = 1,4$ и $\omega_3 = 7,0$ нс при общем количестве выборок $N = 1000$ и накоплений $M = 100$. Емкость измерительной ячейки $C = 0,099$ пФ. В качестве эталонного образца применяли диоксан с $\epsilon_p = 2,26$.

Результаты и обсуждение. Экспериментально получены температурные зависимости времен релаксации τ^{β} молекулы протамина и ее эффективного объема $V_{\text{эфф}}$, который вычисляется из соотношения

$$\tau^{\beta} = 3\eta V_{\text{эфф}}/kT,$$

где $V_{\text{эфф}}$ — эффективный объем макромолекулы; η — вязкость растворителя (температурная зависимость вязкости воды приведена на рис. 1); kT — энергия Больцмана.

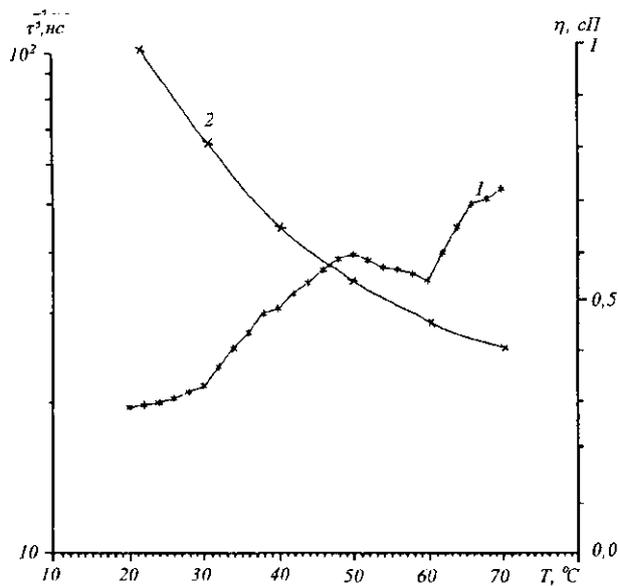


Рис. 1. Температурные зависимости времен диэлектрической релаксации τ^β (1) и динамической вязкости растворителя η (2) водного раствора протамина, $C = 2\%$, $pH = 7,3$

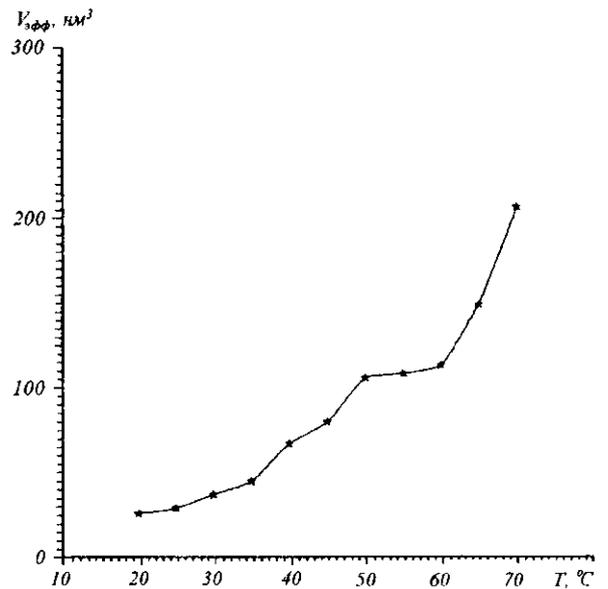


Рис. 2. Температурная зависимость эффективного объема $V_{эфф}$ водного раствора протамина, $C = 2\%$, $pH = 7,3$

Проведенные ранее измерения τ^β для различных глобулярных белков [9] показали, что в области нативного состояния белковой глобулы значения $\tau^\beta(T)$ линейно уменьшаются и могут быть охарактеризованы энергиями активации ΔE_a , значения которых находятся в интервале 18—21 кДж/моль. Совокупность экспериментальных данных свидетельствуют о том, что в области нативного состояния белка в диапазоне характеристических времен 10^{-7} — 10^{-8} имеет место вращательное движение жестких дипольных макромолекул в вязкой среде. Вблизи области тепловой денатурации наблюдается аномальное увеличение значений τ^β . Из этого следует вывод о том, что, например, для РНКазы А при денатурационном переходе не происходит смены механизма поляризации, а отмечается резкое увеличение объема макромолекулы за счет внутримолекулярных перестроек. Если при этом не наблюдается перехода глобула—клубок, то, по-видимому, белок находится в так называемом состоянии «расплавленной глобулы» [11]. При дальнейшем увеличении температуры происходит второе скачкообразное возрастание параметра τ^β с последующим резким уменьшением. Появляется быстрая релаксационная компонента, то есть глобулярная структура «разваливается» и переходит в состояние клубка с

сегментальным движением и довольно свободной подвижностью боковых групп [9].

Экспериментально полученные температурные зависимости τ^β , $V_{эфф}$ для водного раствора протамина приведены на рис. 1 и 2. Видно, что характер этих зависимостей резко отличается от вышеописанных. Понятно, что характер зависимостей τ^β , $V_{эфф}$ не может описывать глобулярного состояния протаминов. По-видимому, в водных растворах протамины находятся в конформационном состоянии «статистического клубка», структура которого определяется главным образом электростатическими силами и Ван-дер-Ваальсовым взаимодействием [12]. Последние быстро убывают с увеличением расстояния между взаимодействующими группами и поэтому даже небольшое набухание макромолекулы с повышением температуры может быть достаточным для их резкого ослабления [13]. Такое предположение может объяснить полученные температурные зависимости. Правда, остается неясной природа участка температурных зависимостей при $T = 50$ — 60°C (рис. 1, 2). Можно предположить также, что в этом температурном диапазоне макромолекула протамина находится в квазиравновесном состоянии, где силы отталкивания и притяжения взаимокompенсируются, т. е. молекула протамина в диапазоне температур 50—60 °C имеет Θ -точку и

переходит в состояние идеального гауссовского клубка [12]. Данное предположение требует дальнейшего осмысления, постановки новых экспериментов с привлечением методов молекулярной динамики и будет подробно рассмотрено в следующих работах.

В заключение авторы выражают благодарность В. К. Рыбину и Ю. Е. Чернышу за полезное обсуждение данной работы.

Л. К. Охотникова, О. В. Шерчкова, В. С. Цыганков

Вивчення просторової структури протаміну методом часової діелектричної спектроскопії

Резюме

Методом часової діелектричної спектроскопії вивчено просторову структуру протаміну. Показано, що протамінам у водних розчинах притаманна яскраво виражена неглобулярна структура.

L. K. Ochotnikova, E. V. Sherchkova, V. S. Tsygankov

The time domain reflectometry studies of spatial structure of protamine

Summary

In this work aqueous solution of protamine was investigated using the time domain reflectometry method. It was shown that in the aqueous solution the conformation of protamine differs from globular proteins conformation.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hecht N. B. Mammalian protamines and their expression // Histones and other basic nuclear proteins / Eds L. S. Hnilica, G. S. Stein, J. L. Stein.—Boca Raton: CRC press, 1989.—P. 347—373.
2. Oliva R. F., Dixon G. H. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction // Progr. Nucl. Acids Rees. Mol. Biol.—1991.—40.—P. 25—94.

3. Pihonen A., Valtonen P. Linnala-Kankkunen A., Heiskanen M.-L., Maenpaa P. N. Primary structures of two protamines 2 variants (St2a and St2b) from stallion spermatozoa // Biochim. et biophys. acta.—1990.—1039.—P. 177—180.
4. Pirhonen A., Jaaskelainen S., Linnala-Kankkunen A., Maenpaa H. H. An aminoterminally extended P1-protamine variant in the boar // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1993.—196, № 2.—P. 831—836.
5. Pirhonen A., Linnala-Kankkunen A., Maenpaa P. H. Comparison of partial amino acid sequence of two protamine 2 variants from stallion sperm // Biol. Reprod.—1994.—50.—P. 981—986.
6. Nelson J. E., Krawetz S. A. DNA sequence // Sequen. Map.—1995.—5.—P. 329—337.
7. Arellano A., Canales M., Jullian C., Brunet J. E. Fluorescence studies on clupein protamines: Evidence for globular conformation // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1988.—50, № 2.—P. 633—639.
8. Bone S. Time domain reflectometry: The difference method applied to conductive aqueous solutions // Biochim. et biophys. acta.—1988.—967.—P. 401—407.
9. Фельдман Ю. Д., Федотов В. Д. Изучение вращательной диффузии глобулярных белков методом временной диэлектрической спектроскопии // Журн. физ. химии.—1987.—61.—С. 2001—2012.
10. Ermolina I. V., Polygalov E. A., Romanychev G. D., Zuev Ju. F., Feldman Ju. D. Time-domain dielectric spectroscopy with nonuniform signal sampling // Rev. Sci. Instr.—1991.—62, N 9.—P. 2262—2265.
11. Птицын О. Б., Гильманшин Р. И., Долгих Д. А., Финкельштейн А. В., Шахнович Е. И. Белковые глобулы без уникальной пространственной структуры: экспериментальные данные для α -лактальбуминов и общая модель // Биофизика.—1982.—27, № 6.—С. 1005—1115.
12. Гросберг А. Ю., Хохлов А. Р. Статистическая физика макромолекул.—М.: Наука, 1989.—101 с.
13. Stejskal E. O., Tanner J. E. Self-diffusion measurements: Spin-echo on presence of time dependent field gradient // Chem. Phys.—1965.—42.—P. 288.

Поступила в редакцию 02.04.98