

COMPLEXOS D'OLIGONUCLEÒTIDS AMB PÈPTIDS

L. TABERNERO

Departament d'Enginyeria Química. ETSEIB.
Universitat Politècnica de Catalunya

La histona H1 és necessària per a la integritat de l'estructura de la cromatina (Thoma *et al.*, 1979) i probablement està implicada en el control de l'accessibilitat dels gens en la transcripció. Variants de la H1 com ara la H5 d'eritròcit de pollastre o la H1 d'esperma d'eriçó de mar, s'associen amb la repressió general de la transcripció gènica durant la maduració d'aquestes cèl·lules (Neelin *et al.*, 1980).

La H1 i les seves variants tenen tres dominis estructurals (Bradbury *et al.* 1975), un domini globular central, que s'uneix a la zona d'entrada i sortida del DNA del nucleosoma, segellant dues voltes senceres de DNA (Allan *et al.*, 1980) flanquejat per dues cues esteses, els dominis N- i C-terminal.

El domini C-terminal, ric en lisina, prolina i alanina, probablement s'uneix al DNA espaiador (Allan *et al.*, 1980) neutralitzant la seva càrrega i és necessari per a la condensació de la cromatina (Renz *et al.*, 1977). En solució apareix plegat a l'atzar (Bradbury *et al.*, 1975) segurament a causa de la distribució tan regular de les prolines i a la repulsió entre lisines i arginines. Tanmateix, prediccions d'estructura secundària suggereixen una conformació en hèlix α per a la majoria del domini C-terminal, que també s'observa per dicroisme circular en determinades condicions (Giancotti *et al.*, 1981; Clark *et al.*, 1988).

Els pèptids amb què hem treballat són seqüències anàlogues a la regió C-terminal de les histones riques en lisina i mostren una certa tendència a estructurar-se en hèlix α (Perelló, 1990). Així mateix la distribució de residus hidrofòbics i hidrofílics els fan bons candidats per a interaccionar amb el DNA.

L'estudi per difracció de raigs X dels cristalls de sistemes simples, com els complexos d'oligonucleòtids amb oligopèptids, ens ofereix la pos-

sibilitat de conèixer en detall les interaccions moleculars. La informació que s'obté resulta ben útil després per a la comprensió dels mecanismes d'associació selectiva entre macromolècules.

MATERIALS I MÈTODES

Per a la cristal·lització dels complexos es van usar els oligonucleòtids següents: d(CGCGATATCGCG), d(CGCAAATTTGCG) i d(CG^mCTTTAAAGCG) i els pèptids sintetitzats per M. Perelló, Ac-Lys-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Lys-Lys-NHEt (P1) i Ac-Lys-Ala-Ala-Lys-Lys-Ala-Ala-Lys-NHEt (P2).

Les condicions emprades van ser les estàndard per a la cristal·lització d'oligonucleòtids: 50 mM de cacodilat sòdic per a les proves a pH 5-7 i 50 mM d'acetat/acètic a pH 4-4,6, 1,0 mM d'oligonucleòtid (concentració de la cadena senzilla) i 2,5 mM de pèptid. Com a contraions van usar MgCl₂, CaCl₂ i LiCl a concentracions entre 2.5 mM i 25 mM. La solució amb 8% de MPD (2-metil-2,4-pentanodiol) com a precipitant s'equilibrava a temperatura ambient enfront de 50% de MPD.

Per a totes les proves es va usar la tècnica de difusió de vapor en gota penjada.

RESULTATS

En la majoria de casos es van obtenir cristalls en pocs dies excepte per a la seqüència CGCGATATCGCG que es resistí a cristal·litzar en totes les condicions provades i només se'n va aconseguir un precipitat.

Complexos amb d(CGCAAATTTGCG)

Amb el pèptid P2 es van obtenir unes agulles fines a pH 5 amb MgCl₂ i CaCl₂ que no van progressar. En canvi amb el pèptid P1 es van aconseguir gran diversitat de resultats.

Amb MgCl₂ i a pH 4-4,6 apareixia un precipitat cristal·lí i de vegades uns cristalls molt deformats. A pH 5 amb MgCl₂ sortien agulles i macles. En augmentar la concentració de MgCl₂ a la gota, augmentava la mida dels cristalls i passaven de tenir un gran nombre d'agulles a tenir pocs nuclis de cristal·lització. Els cristalls obtinguts en aquestes condicions eren força irregulars i d'aspecte fibrós. A pH 6-7 només apareixia precipitat.

Utilitzant el CaCl₂ com a contraió, es va observar una gran millora en la qualitat dels cristalls perquè a concentracions elevades (12,5-25 mM)

creixien uns cristalls regulars de tipus vareta que es van usar per a la difracció de raigs X (figura 1C).

Amb el LiCl només es van obtenir agulles que es degradaven en uns dies.

Els cristalls obtinguts amb CaCl_2 són els que es van usar per als estudis de difracció posteriors. Primerament es van prendre diagrames de precessió, en els quals es va veure que apareixia una taca o llepissada intensa a 3,4 Å (figura 2), que correspondria a la separació entre bases i que ens fa pensar que es tractava de DNA en forma B. També es van poder determinar els paràmetres de la cel·la unitat, així com el grup espacial (taula 1).

Posteriorment es va prendre un espectre amb radiació de sincrotró a l'estació de Daresbury (Anglaterra). L'espectre obtingut tenia poca resolució (fins a 4 Å) i era bastant feble. Després del processament de les dades es va arribar a una cel·la de tipus romboèdric. Les dades cristal·logràfiques i de l'espectre apareixen en la taula 1.

Finalment es va recollir l'espectre per difracció de raigs X, en el difractòmetre automàtic (CAD4) del nostre laboratori, que va confirmar la cel·la romboèdrica i que s'ha utilitzat per a resoldre'n l'estructura molecular.

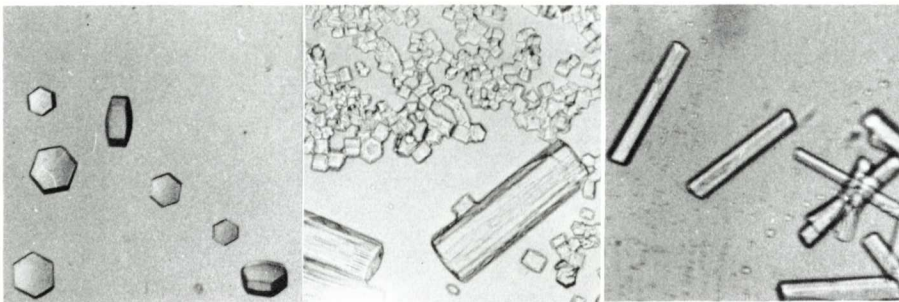


Fig. 1. Fotografies dels cristalls de A) $d(\text{CG}^m\text{CTTTAAAGCG})\text{-KAAKKAOK}$, B) $d(\text{CG}^m\text{CTTTAAAGCG})$ i C) $d(\text{CGCAAATTTGCG})\text{-KKAAAAKK}$.

La resolució d'aquesta estructura s'està realitzant actualment en el nostre laboratori i sembla que hi ha indicis prou clars que certes zones en els mapes de densitat electrònica podrien encabir el pèptid. Una secció del mapa de densitat electrònica que hem calculat es mostra a la figura 3.

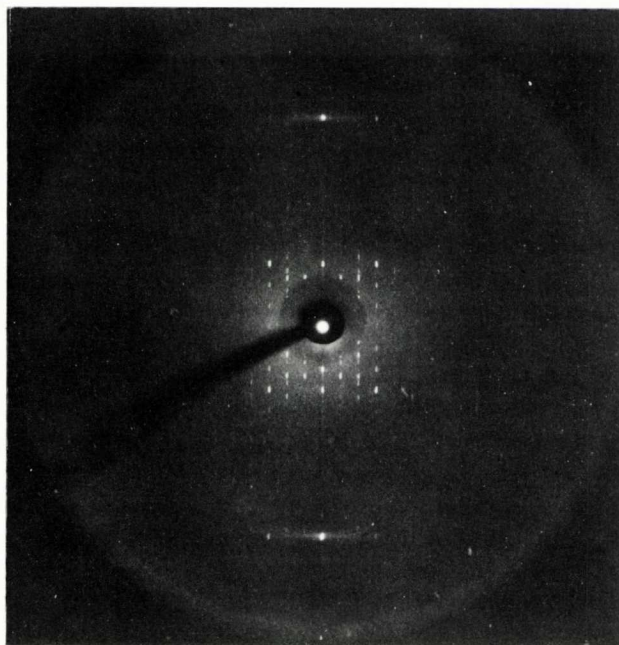


Figura 2. Diagrama de precessió del pla Okl del cristall d(CGCAAATTTGCG)-KKAAAAKK.

Taula 1. Dades cristal·logràfiques del complex d(CGCAAATTTGCG)-KKAAAAKK.

	Precessió	Sincrotró	CAD4
<i>Cel·la</i>			
a/b	44,76 Å	43,46 Å	43,7 Å
c	102,37 Å	104,71 Å	100,36 Å
α/β	90°	90°	90°
γ	120°	120°	120°
Resolució	3.4 Å	50-4 Å	25-2.5 Å
Reflexions totals		5179	2789
Reflexions úniques		1701	2472
Grup espacial	R3	R3	R3

Complexos amb d(CG^mCTTTAAAGCG)

Es van obtenir cristalls amb ambdós pèptids a pH 6 i amb CaCl₂, i també de l'oligonucleòtid tot sol. Els cristalls de l'oligonucleòtid sol (figu-

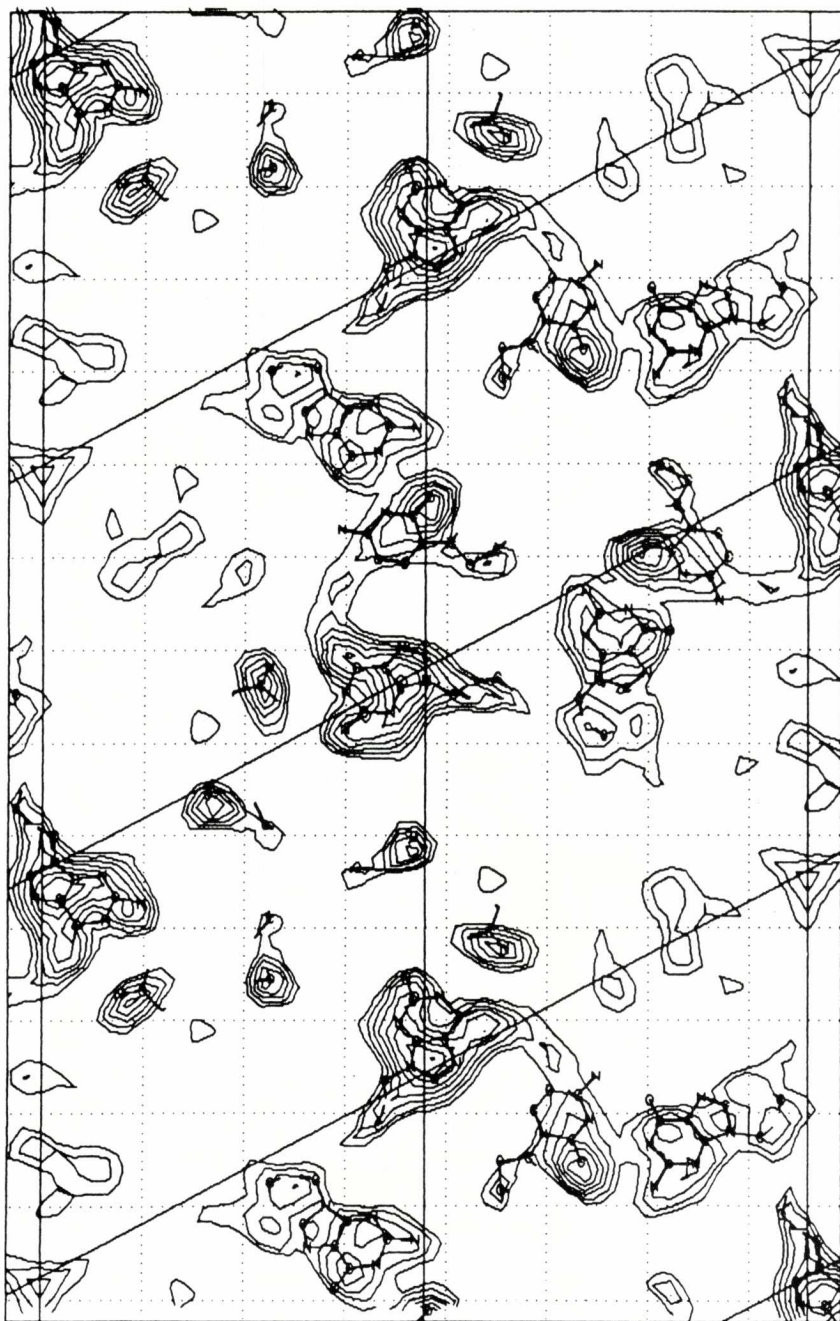


Figura 3. Secció en l'origen del mapa de densitat electrònica $2F_o - F_c$, α_c , calculat de 8 - 3 Å per a l'estructura del complex d(CGCAAATTTGCG)-KKAAAAKK.

ra 1B) eren de forma hexagonal molt regulars, i els crescuts amb el pèptid P2 (figura 1A) eren allargats però amb les bases també hexagonals. Aquests darrers es van utilitzar per a obtenir un diagrama de precessió. A partir de la precessió es va deduir que es tractava de DNA en forma B, per les taques intenses corresponents a la separació entre parells de bases. Les dades cristal·logràfiques es mostren a la taula 2.

Els intents de prendre un espectre de difracció no van tenir èxit els cristalls eren molt sensibles a la manipulació i un cop muntats difractaven molt malament.

Els cristalls obtinguts amb l'altre octapèptid i de l'oligonucleòtid tot sol, van resultar excessivament fràgils i va ser totalment impossible muntar-ne cap per a estudiar-lo per difracció de raigs X.

DISCUSSIÓ

Com hem dit en exposar els resultats, van créixer nombrosos cristalls en gairebé totes les condicions de pH i amb els diferents contraions. No obstant això, l'efecte de tots aquests factors es fa palès en la mida i qualitat dels cristalls. Per exemple es nota clarament la influència del pH perquè a pH inferiors a 5 sempre s'obtenien cristalls molt irregulars inmergits en un precipitat que s'estenia per tota la gota.

D'altra banda, és interessant destacar l'efecte dels diferents contraions en la solució de cristal·lització. Utilitzant el $MgCl_2$, que és el contraió usat habitualment, els cristalls apareixien deformats i d'aspecte fibrós. En augmentar la concentració de $MgCl_2$ en la gota, s'aconseguia disminuir el nombre de nuclis de cristal·lització i per tant creixien cristalls de dimensions més grans. Malgrat tot no va ser possible de millorar la qualitat dels cristalls obtinguts amb el $MgCl_2$.

En canvi, l'ús de $CaCl_2$ va tenir una influència espectacular. A concentracions iguals que les emprades amb el $MgCl_2$, els cristalls creixien molt regulars, en forma de vareta i en pocs dies. Tant és així que es van po-

Taula 2. Dades cristal·logràfiques del complex $d(CG^mCTTTAAAGCG)-KAAKKA$.

<i>Cel·la</i>	
a/b	43,94 Å
c	101,49 Å
α/β	90°
γ	120°
Grup espacial	R3

der millorar els cristalls obtinguts amb $MgCl_2$ per a tots els complexos i aconseguir cristalls aptes per a la difracció de raigs X.

Un fet important que cal remarcar, és que aquests cristalls crescuts en $CaCl_2$, cristal·litzen tots en una cel·la romboèdrica. Les cel·les romboèdriques no són gaire freqüents en cristalls de macromolècules i totalment inusuals en els d'oligonucleòtids. A més a més altres cristalls obtinguts amb l'oligonucleòtid d(CGCAAATTTGCG) presentaven una cel·la ortoròmbica (Coll *et al.*, 1987) molt més freqüent en les estructures de dodecàmers.

Recentment s'ha trobat que diferents ions metàl·lics poden influir en els ponts d'hidrogen dels aparellaments de bases Watson-Crick (Anwander *et al.*, 1990). També s'ha vist que diferents cations poden canviar el patró de difracció i la cel·la d'un mateix oligonucleòtid (Quintana *et al.*, 1990) com en el nostre cas.

Queda per veure doncs, amb la resolució de l'estructura d'aquests complexos, si es tracta simplement de canvis en l'empaquetament cristal·lí o si també es produeixen canvis en la conformació del DNA.

D'altra banda, l'anàlisi cristal·logràfica de l'estructura amb l'oligonucleòtid d(CGCAAATTTGCG) permetrà comparar-ne els resultats amb les estructures del mateix dodecàmer prèviament resoltes (Coll *et al.*, 1987; Taberner *et al.*, 1990) i així separar els efectes de la seqüència i de l'empaquetament sobre l'estructura del DNA.

ABSTRACT

The preparation of several co-crystals of several dodecadeoxynucleotides together with octapeptides rich in lysine and alamine has been attempted, and crystals from d(CGCAAATTTGCG) plus Ac-Lys Lys Ala Ala Ala Lys Lys-NHEt and also from d(CG^mCTTTAAAGCG) plus Ac-Lys Ala Ala Lys Lys Ala Ala Lys-NHEt have been obtained. The crystal data are reported together with some preliminary results on the structure of the complexes.

BIBLIOGRAFIA

1. ALLAN, J., HARTMAN, P. G., CRANE-ROBINSON, C. i AVILÉS, F. X. (1980) *Nature* 288, 675.
2. ANWANDER, E. H. S., PROBST, M. M. i RODE, B. M. (1990) *Biopolymers* 29, 757-769.
3. BRADBURY, E. M., CARY, P. D., CHAPMAN, G. E., CRANE-ROBINSON, C., DANBY, S. E., BOUBLIK, M., PALAU, J. i AVILÉS, X. (1975) *Eur. J. Biochem.* 52, 605-613.
4. CLARK, D. J., HILL, C. S., MARTIN, S. R. i THOMAS, J. O. (1988) *The EMBO J.* 7, 69-75.
5. COLL, M., FREDERICK, C. A., WANG, A. H.-J. i RICH, A. (1987) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84, 8385.
6. GIANCOTTI, V., RUSSO, V., COSIMI, E., CARY, S. i CRANE-ROBINSON, C. (1981) *Biochem. J.* 197, 655.
7. NEELIN, J. M., CALLAHAN, P. X., LAMB, D. C. i MURRAY, K. (1964) *Can. J. Biochem.* 42, 1743.
8. PERELLÓ, M. (1990) Tesi Doctoral. Univ. Polit. de Catal.
9. QUINTANA, J. R., GRZESKOWIAK, K., YANAGI, K. i DICKERSON, R. E. (1990) *14th ann. meeting. Am. Cryst. Assoc.*
10. RENZ, M., NEHLS, P. i HOZIER, J. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 1879.
11. TABERNERO, L., AYMAMI, J., i FITA, I (1990) *XVth Congress and General Assembly, Int. Union of Cryst.*
12. THOMA, F., KOLLER, T. H. & KLUG, A. (1979) *J. Cell Biol.* 83, 403.