

## БИОГЕРОНТОЛОГИЯ

### ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА БРОНХОГЕНА (Ala-Asp-Glu-Leu) НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ДНК

Дж.Р.Монаселидзе, В.Х.Хавинсон\*, М.З.Горгошидзе, Д.Г.Хачидзе,  
Э.М.Ломидзе, Т.А.Джохадзе\*\*, Т.А.Лежава\*\*

*Институт физики им. Э.Андроникашвили, Тбилиси; \*Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАН; \*\*Тбилисский государственный университет им. И.Джавахишвили*

Термодинамические характеристики плавления ДНК в присутствии разных концентраций пептида бронхогена определены дифференциальным сканирующим микрокалориметром. Показано, что бронхоген является агентом, стабилизирующим ДНК. Он увеличивает температуру плавления ДНК тимуса телят и печени мышей на 3.1°C в узкой области значений  $r$  (молярного соотношения бронхоген/ДНК п.н.) от 0.01 до 0.055 и не меняет данного значения при дальнейшем увеличении  $r$ . Установлено, что энтальпия плавления комплексов ( $\Delta H_{пл}$ ) в исследуемой области значений  $r$  от 0.01 до 1.0 не меняется и равна в случае ДНК тимуса 11.4 кал/г, а для ДНК печени мышей — 12.7 кал/г. На основе анализа полученных данных утверждается, что бронхоген не является аденин—тимин- и гуанин—цитозин-специфичным лигандом. Тип связывания определяется как сильное и редкое, осуществляемое с обеими цепями ДНК, преимущественно с азотистыми основаниями.

**Ключевые слова:** микрокалориметр, термостабильность ДНК, пептид

Исследования особенностей взаимодействия низкомолекулярных биологически активных соединений, проявляющих последовательно специфический характер связывания с ДНК сайтами, имеют важное значение в фармакологии. Такие исследования интенсивно проводятся с использованием разных физико-химико-биологических технологий [1,8].

Существенную информацию о биологической активности и механизмах связывания этих лигандов с ДНК можно получить, исследуя термодинамические характеристики плавления комплексов этих соединений с ДНК в растворах [3,6].

За последние годы синтезированы новые водорастворимые низкомолекулярные соединения пептидного происхождения, которые с успехом используются в геномике и медицинской практике [1,2,4]. Среди них новый пептид бронхоген (Ala-Asp-Glu-Leu), который стимулирует пролиферацию и функциональную активность основных клеточных структур тканевой культуры и оказывает трофическое и стабилизирующее действие на морфо-

логическую сохранность и регенерацию дифференцированной ткани. При клиническом изучении установлена его эффективность в комплексном лечении пациентов с нарушением функции дыхательной системы, а также для профилактики заболеваний бронхов у людей пожилого и старческого возраста.

Несмотря на успехи, достигнутые при лечении бронхогеном пациентов, немаловажным является выяснение характера взаимодействия бронхогена с ДНК *in vitro*. Эти данные, безусловно, представляют интерес в связи с тем, что для многих лекарственных препаратов аддукты препарат—ДНК, образованные *in vitro* и *in vivo*, различны.

В данной работе с помощью высокопрецизионного дифференциального сканирующего микрокалориметра (ДСМ) исследовали термодинамическую стабильность комплекса ДНК—бронхоген. Цель работы — выяснить, является ли бронхоген стабилизирующим или дестабилизирующим агентом ДНК, связывается ли он выборочно парами аденин—тимин или гуанин—цитозин и вызывает ли изменение их относительной термостабильности

или обладает специфическим характером связывания с дуплексом ДНК.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

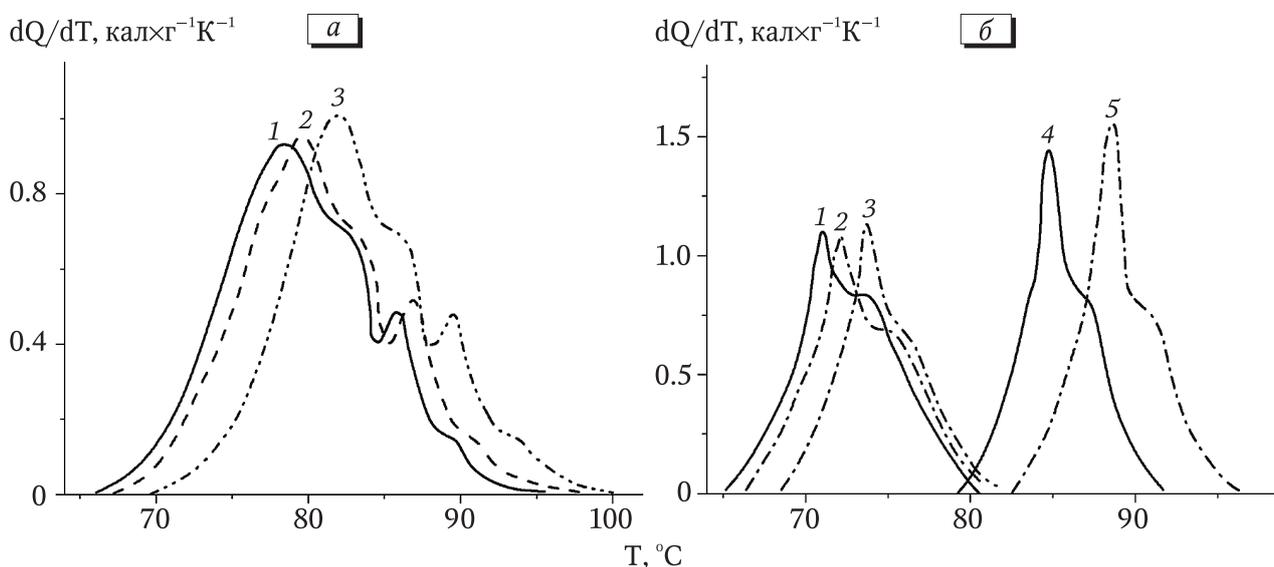
Измерения проводили на ДСМ (чувствительность —  $10^{-7}$  Вт, объем измерительной ячейки —  $0.2 \text{ см}^3$ , скорость нагрева —  $0.5^\circ\text{C}/\text{мин}$ ). Температурный интервал измерений —  $20\text{--}150^\circ\text{C}$ . Показатели для точности определения тепловых параметров плавления ДНК: температура плавления ( $T_{\text{пл}}$ ), ширина интервала плавления ( $\Delta T_{\text{пл}}$ ) и энтальпия плавления ( $\Delta H_{\text{пл}}$ ) не превышали  $0.2$ ,  $0.1^\circ\text{C}$  и  $0.8 \text{ кал/г}$  соответственно [5,7].  $T_{\text{пл}}$ ,  $\Delta T_{\text{пл}}$  и  $\Delta H_{\text{пл}}$  получали усреднением результатов 5 экспериментов. Исследовали высокоочищенные ДНК тимуса теленка и печени белых мышей (белок менее  $0.5\%$ , РНК  $<0.2\%$ ,  $M_{\text{вес}} >15 \text{ МД}$ , гиперхромный эффект — примерно  $39\%$ ). Концентрация ДНК — от  $0.45$  до  $0.5 \text{ мг/мл}$ , бронхогена —  $10^{-6}\text{--}10^{-4} \text{ М}$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 представлены микрокалориметрические кривые теплопоглощения ДНК тимуса теленка и печени белых мышей при разных соотношениях  $1 \text{ М}$  бронхогена на  $1 \text{ М}$  ДНК п.н. В обоих случаях увеличение  $r$  (молярное соотношение бронхоген/

ДНК п.н.) от  $0.01$  до  $0.055$  вызывало увеличение температуры плавления основной фракции ДНК тимуса теленка ( $T_{\text{пл}}=78.5$ ), сателлитной фракции ( $T_{\text{пл}}=84^\circ\text{C}$ ; кривая *a*) и основной фракции ДНК печени ( $T_{\text{пл}}=71^\circ\text{C}$  при  $0.015 \text{ М NaCl}$ ,  $T_{\text{пл}}=85.0^\circ\text{C}$  при  $0.15 \text{ М NaCl}$ ) на  $3.1^\circ\text{C}$ . Дальнейшее увеличение  $r$  от  $0.055$  до  $1.0$  не вызывало повышения температуры плавления этих ДНК. При добавлении бронхогена ширина интервала плавления  $\delta(\Delta T_{\text{пл}})$  сужалась до  $0.055 < r < 0.1$ . Так, при молярном соотношении бронхоген/ДНК н.п., равном  $0.055$ , это изменение составляет  $0.9^\circ$  для ДНК тимуса теленка и  $0.85^\circ$  для ДНК печени мышей при  $0.015$  и  $0.15 \text{ М NaCl}$ . Дальнейшее увеличение концентрации бронхогена не вызывало изменения ширины интервала плавления. Результаты изменения  $T_{\text{пл}}$  этих ДНК в зависимости от  $r$  суммированы на рис. 2.

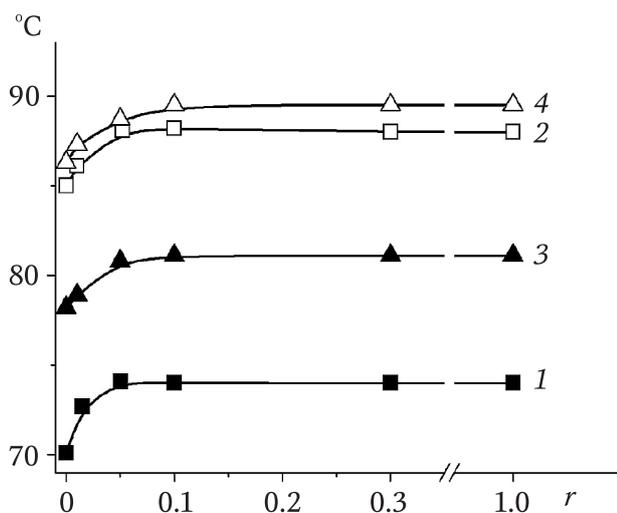
На основе многочисленных экспериментальных данных установлено, что стабильность разбавленных растворов ДНК разного происхождения линейно увеличивается с ростом гуанин—цитозин-пар и концентраций нейтральных солей в области от  $0.5 \text{ мМ}$  до  $0.5 \text{ М}$  при нейтральных значениях рН. Результаты свидетельствуют о том, что температура плавления сателлитной фракции, содержащей больше гуанин—цитозин-пар, чем основная стадия при добавлении бронхогена, увеличивается на ту же величину ( $3.1^\circ\text{C}$ ), что и основная стадия (рис. 1, 2).



**Рис. 1.** Микрокалориметрические кривые плавления ДНК, пересчитанные на грамм сухой массы при разных значениях  $r$  (скорость нагрева —  $0.5^\circ\text{C}/\text{мин}$ ).

*a* — ДНК тимуса теленка (рН 7.02,  $20 \text{ мМ}$  фосфатный буфер, концентрация ДНК —  $0.045\%$ , количество ДНК в ампуле — от  $92$  до  $94 \text{ мкг}$ ); кривые: 1 —  $r=0$ , 2 —  $r=0.03$ , 3 —  $r=0.1$ .

*б* — ДНК печени белых мышей (рН 7.02, концентрация ДНК —  $0.05\%$ , количество ДНК в ампуле — от  $100$  до  $102 \text{ мкг}$ ); кривые: 1 —  $r=0$ , 2 —  $r=0.05$ , 3 —  $r=1.0$ ,  $0.0015 \text{ М}$  цитратный буфер,  $0.015 \text{ М NaCl}$ ; кривые 4 —  $r=0$ , 5 —  $r=0.1$ ,  $0.015 \text{ М}$  цитратный буфер,  $0.15 \text{ М NaCl}$ .



**Рис. 2.** Зависимости температуры плавления ДНК от  $r$  при pH 7.02.

1 — основная фракция, 2 — сателлитная фракция ДНК тимуса теленка.

Основная фракция (четкий пик) ДНК печени мышей в растворах: 3 — 0.015 М NaCl, 0.0015 М цитратного буфера; 4 — 0.15 М NaCl, 0.015 М цитратного буфера.

Это указывает на то, что бронхоген, являясь стабилизирующим лигандом ДНК, не проявляет аденин—тимин- и гуанин—цитозин-специфичности и не сглаживает относительную термостабильность между ними. Увеличение  $T_{\text{пл}}$  основной стадии, сателлитной фракции ДНК тимуса теленка и  $T_{\text{пл}}$  ДНК печени мышей (рис. 2) с одновременным сужением ширины интервала плавления в узкой области значений  $r$  от 0.01 до 0.055 указывает на то, что в этом случае тип связывания редкий, но сильный, и осуществляется с обеими цепями ДНК. Последний вывод согласуется с данными работ, в которых на основании анализа многочисленных экспериментальных и теоретических данных показано, что в

случае малых лигандов, которые обратимо связываются и не контактируют друг с другом на поверхности ДНК, уменьшение  $T_{\text{пл}}$  и увеличение  $\Delta T_{\text{пл}}$  ДНК означает связывание лигандов с единичной цепью, а увеличение  $T_{\text{пл}}$  и сужение  $\Delta T_{\text{пл}}$  — на связывание с обеими цепями, что и наблюдалось в опыте. Увеличение температуры плавления ДНК в 0.15 М и 0.015 М растворах NaCl на одинаковую величину 3.1°C при увеличении  $r$  от 0.01 до 1.0 позволяет утверждать, что связывание бронхогена с ДНК в основном происходит с азотистыми основаниями.

Таким образом, бронхоген вызывает стабилизацию ДНК и связывается с редкими последовательностями двойной спирали. Поскольку насыщение редких центров связывания происходит при молярном соотношении бронхоген/ДНК п.н., равном 0.05, то мы вправе утверждать, что эти центры расположены в среднем вдоль двойной спирали ДНК примерно через каждые 50 п.н.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Khavinson V.Kh.* // Neuro. Endocrinol. Lett. 2002. Vol. 23, Suppl. 3. P. 11-144.
2. *Khavinson V.Kh., Lezhava T.A., Monaselidze J.R. et al.* // Ibid. 2003. Vol. 24, N 5. P. 329-333.
3. *Kuhn H., Cherny D.I., Demidov V.V., Frank-Kamenetskii D.M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101, N 20. P. 7548-7553.
4. *Lezhava T., Khavinson V., Monaselidze J. et al.* // Biogerontology. 2004. Vol. 5, N 2. P. 73-79.
5. *Monaselidze J., Abuladze M., Asatiani N. et al.* // Thermochemia Acta. 2006. Vol. 441. P. 8-15.
6. *Monaselidze J., Majagaladze G., Barbakadze Sh. et al.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2008. Vol. 25, N 4. P. 419-424.
7. *Topchishvili L., Barbakadze Sh., Khizanishvili A. et al.* // Biomacromolecules. 2002. Vol. 3, N 3. P. 415-420.
8. *Uhlmann E.* // Biol. Chem. 1998. Vol. 379, N 8-9. P. 1045-1052.

Получено 15.04.09