

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.Джавишвили*

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

Адрес для корреспонденции: lezhavat@yahoo.com. Лежава Т.А.

или обладает специфическим характером связывания с дуплексом ДНК.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Измерения проводили на ДСМ (чувствительность — 10^{-7} Вт, объем измерительной ячейки — 0.2 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°C и 0.8 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 $<0.2\%$, $M_{\text{вс}} >15 \text{ МД}$, гиперхромный эффект — примерно 39%). Концентрация ДНК — от 0.45 до 0.5 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 М бронхогена на 1 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 М NaCl , $T_{\text{пл}}=85.0^\circ\text{C}$ при 0.15 М NaCl) на 3.1°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° для ДНК тимуса теленка и 0.85° для ДНК печени мышей при 0.015 и 0.15 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 мМ до 0.5 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°C), что и основная стадия (рис. 1, 2).

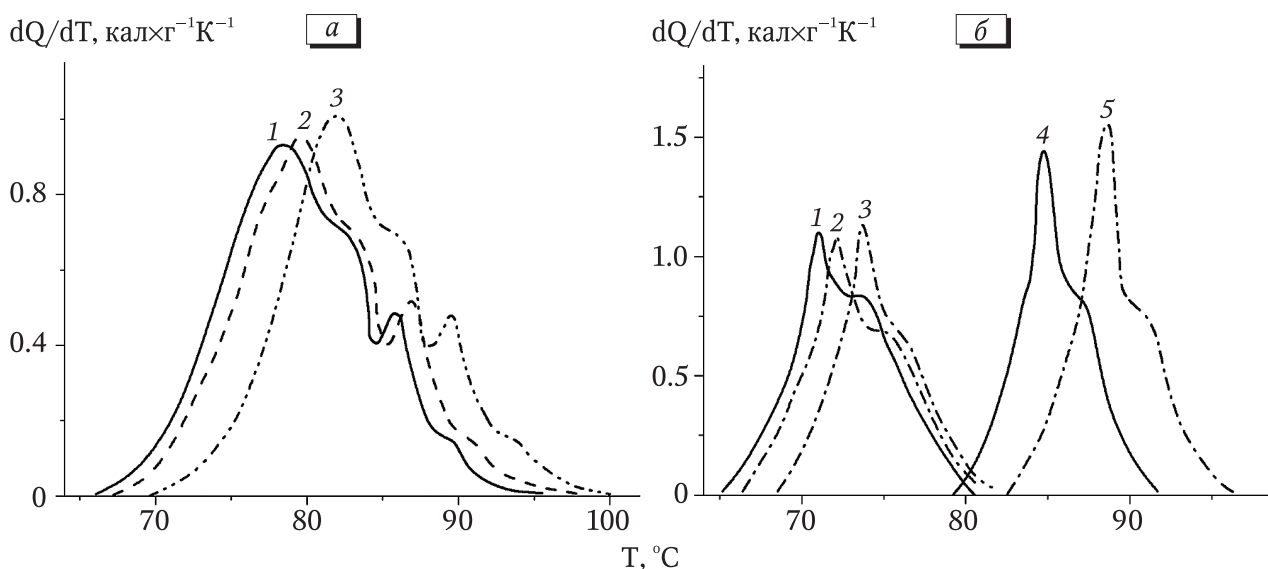


Рис. 1. Микрокалориметрические кривые плавления ДНК, пересчитанные на грамм сухой массы при разных значениях r (скорость нагрева — $0.5^\circ\text{C}/\text{мин}$).

a — ДНК тимуса теленка (рН 7.02, 20 мМ фосфатный буфер, концентрация ДНК — 0.045% , количество ДНК в ампуле — от 92 до 94 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 мкг); кривые: $1 - r=0$, $2 - r=0.05$, $3 - r=1.0$, 0.0015 М цитратный буфер, 0.015 М NaCl ; кривые $4 - r=0$, $5 - r=0.1$, 0.015 М цитратный буфер, 0.15 М NaCl .

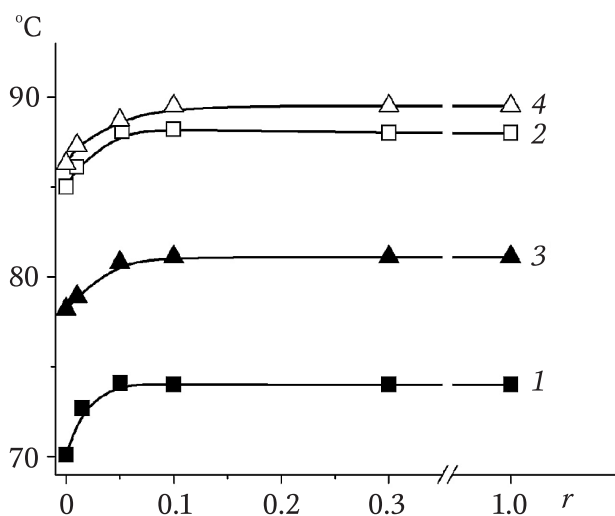


Рис. 2. Зависимости температуры плавления ДНК от r при pH 7.02.

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 $T_{пл}$ основной стадии, сателлитной фракции ДНК тимуса теленка и $T_{пл}$ 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 $T_{пл}$ и увеличение $\Delta T_{пл}$ ДНК означает связывание лигандов с единичной цепью, а увеличение $T_{пл}$ и сужение $\Delta T_{пл}$ — 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