



УДК 547.963.4.057:577.152.314'17"

СИНТЕЗ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИСКУССТВЕННЫХ НУКЛЕАЗ НА ОСНОВЕ КОНЬЮГАТОВ ГЕМИНА С ПЕПТИДНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ ФАКТОРА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК HLDF

© 2006 г. Г. А. Желтухина^{##}, Т. Н. Лобанова*, В. Е. Небольсин*, М. О. Галлямов^{**}, С. М. Драницына^{***}, И. А. Костянян^{***}

*Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, 119571, Москва, просп. Вернадского, 86;

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет;

***Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 22.07.2005 г. Принята к печати 22.09.2005 г.

Осуществлен твердофазный синтез окта-гексапептидов – фрагментов HLDF и их конъюгатов с гемом. Установлена взаимосвязь между строением и нуклеазной активностью в ряду синтезированных соединений. Исследовано влияние различных факторов (рН среды, присутствия ионов металлов, комплексообразователя, восстановителя, состава буфера) на деструкцию ДНК геминпептидами. Получены предварительные данные, подтверждающие окислительный механизм этого процесса. Расщепление плазмидной ДНК под действием геминпептида изучено методами электронной спектроскопии, гель-электрофореза и атомно-силовой микроскопии.

Ключевые слова: ДНК, нуклеазная активность, геминпептиды, твердофазный синтез, атомно-силовая микроскопия, фактор дифференцировки HLDF.

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к исследованию расщепления нуклеиновых кислот под действием нуклеаз во многом обусловлен разработкой новых систем для решения генно-инженерных задач и поиском терапевтических средств нового поколения.

Деструкция нуклеиновых кислот может осуществляться ферментативно – под действием обширной группы нуклеаз природного происхождения. Известно также значительное количество искусственных нуклеаз, представляющих собой соединения различных классов и их конъюгаты [1, 2].

В настоящее время продолжается поиск и конструирование биосовместимых и биodeградируемых соединений, способных высокоэффективно расщеплять ДНК и РНК. Так, была установлена

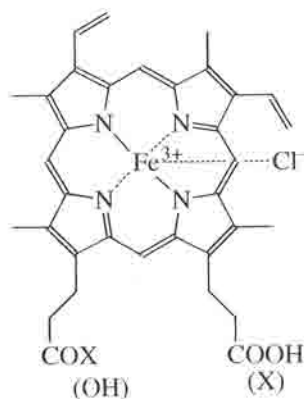
нуклеазная активность производных металлокомплексов порфиринов [3], в частности модифицированного гемина (Fe^{3+} -комплекса протопорфирина IX) [4]. Гемин, ковалентно связанный с интеркалятором и имидазольным лигандом, проявил способность расщеплять ДНК в присутствии восстановителя – дитионита натрия и кислорода воздуха [4]. Сам гемин в этих условиях был практически неактивен. Недавно было показано, что гемин способен к комплексообразованию с коротким синтетическим олигонуклеотидом, обогащенным остатками гуанина. В присутствии избытка перекиси водорода такие комплексы катализировали точечный разрыв олигонуклеотидной цепи по остатку гуанина [5].

Ранее при исследовании синтетических геминпептидов в качестве моделей гемсодержащих ферментов – пероксидаз и цитохрома P-450, были получены данные об их способности окислять органические субстраты. Так, геминпептиды эффективно катализировали окисление NADH в водной среде в присутствии перекиси водорода, а также холестерина – в органической среде в присутствии восстановителя и кислорода воздуха [6, 7].

С учетом этих данных нами недавно было предпринято исследование окислительной деструкции другого субстрата – плазмидной ДНК. Оказалось, что геминпептид (I) способен эффек-

Сокращения: Dns – дансил; Hem – остаток гемина; HLDF – фактор дифференцировки клеток промиелоцитарного лейкоза человека линии HL-60; HOBI – 1-гидроксibenзотриазол; EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота; Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил; Mmt – монометокситригил; Mtt – 4-метилтригил; ONSu – сукцинимидоокиси; (P) – полимер; PITC – фенилизотиоцианат; TFE – трифторэтанол; AA – аскорбиновая кислота; ACM – атомно-силовая микроскопия.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 936-89-03; факс: (095) 936-89-01; эл. почта: laboratory211@yandex.ru).



(I) X = -Arg-Arg-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH

(II) X = -Arg-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH

(III) X = -Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH

тивно расщеплять последнюю [8]. Пептидная составляющая геминпептида (I) представляет собой 8-членный фрагмент фактора дифференцировки клеток линии HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека (HLDF) [2]. Ковалентное присоединение остатка данного пептида к гемину позволило получить усовершенствованный агент для расщепления ДНК, эффективный в более широком диапазоне pH, в отличие от исходного пептида, активного лишь в кислой среде [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящая работа является продолжением исследований в области синтеза и изучения нуклеазных свойств геминпептидов на основе пептида HLDF-8 (I).

Для дальнейших исследований взаимосвязи между структурой и функцией в ряду родственных геминпептидов (I) соединений, а также механизмов их действия и факторов, влияющих на проявление ими нуклеазной активности, нами был синтезирован октапептид (IV), его укороченные аналоги H-Arg-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH (V), H-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH (VI) и соответствующие им геминпептиды (II), (III). Можно прогнозировать, что наличие объемного заместителя (гемовой группы) по N-концу и этерифицированной γ-карбоксильной группы глутаминовой кислоты по C-концу пептида позволит замедлить деградацию пептидного фрагмента при биомедицинских исследованиях.

Синтез геминпептидов (I)–(III) представляет самостоятельный интерес и сопряжен с рядом определенных трудностей, поскольку использование традиционных полимеров для твердофазного синтеза и стандартных кислотолабильных и удаляемых гидрированием защитных группировок ограничено наличием в молекуле остатка металлопорфирина.

H-Arg-Arg-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH (IV)

H-Arg-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH (V)

H-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH (VI)

Пептиды (IV)–(VI) и соответствующие им геминпептиды были синтезированы твердофазным методом в соответствии с ранее отработанной методологией на полимере с 2-хлортритилхлоридной якорной группой (схемы 1 и 2). Присоединение стартовой аминокислоты N^α-Fmoc-Glu(OMe)-OH к полимеру осуществляли в соответствии с условиями, описанными ранее [8]. Нарастивание пептидной цепи проводили действием 3-кратных избытков соответствующих N^α-Fmoc-аминокислот (по отношению к количеству стартовой аминокислоты на полимере) с использованием эквивалентных количеств DCC и HOBT в среде DMF. Имидазольное кольцо гистидина и ε-NH₂-группу лизина блокировали защитами тритильного типа, а именно Mtt и Mmt соответственно. Ранее мы наблюдали затруднения при отщеплении Tgt-защиты имидазола гистидина [8]. Замена этой защитной группы на родственную 4-метилтритильную (Mtt) группу, которая, как известно [9], является более кислотолабильной, чем тритильная, не позволила ускорить процесс деблокирования имидазола гистидина. Одной из причин неудовлетворительного отщепления этой защиты могут быть пространственные затруднения в пептидном фрагменте – Trp-His(Mtt)-Arg-. Остатки Arg и Trp вводили в пептидную цепь без дополнительной защиты гуанидиновой и индольной групп. Одновременное отщепление пептидов и геминпептидов от полимера и удаление Mtt-защиты имидазола достигалось в подобранных нами более жестких условиях, а именно действием смеси трифторуксусной кислоты, трифторэтанола и дихлорметана в соотношении 1 : 1 : 8 в течение 3 ч.

Конъюгаты гемина и пептидов получали на твердой фазе, ацилируя соответствующие деблокированные пептидилполимеры 3-кратным избытком 6(7)-моно-N-оксисукцинимидного эфира протогемина IX (XV) (схема 2). Соединения (I)–(III) были отщеплены от соответствующих геминпептидилполимеров (XVI)–(XVIII) и очищены колоночной хроматографией на сефадексе LH-20 с элюцией метиловым спиртом. Выходы пептидных произ-

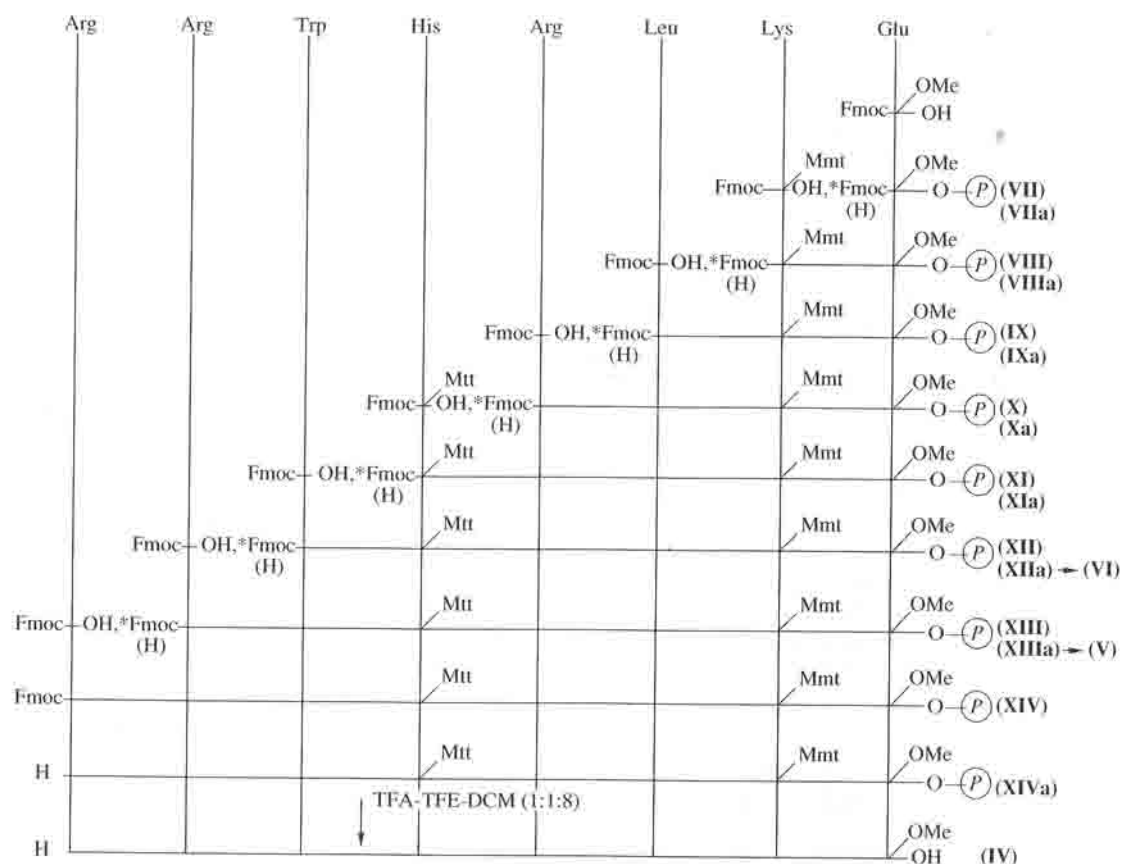
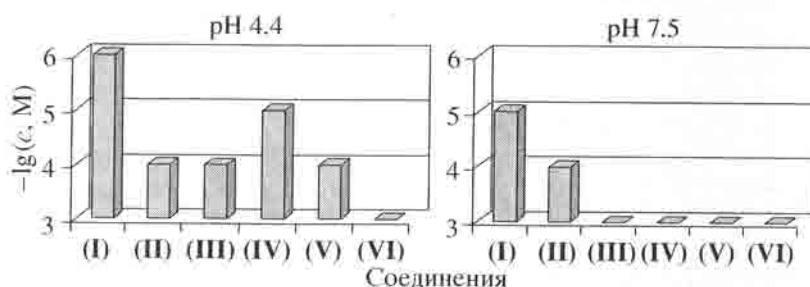


Схема 1. Твердофазный синтез пептида (IV).

Рис. 1. Зависимость нуклеазной активности пептидов (IV)–(VI) и геминпептидов (I)–(III) от их концентрации и pH среды (в присутствии ионов Mn^{2+}).

водных гемина (I), (II) и (III) составили 56–86%, считая на исходную аминокислоту на полимере.

Синтезированные пептиды и геминпептиды были охарактеризованы методами ТСХ, ВЭЖХ, электронной и масс-спектропии, аминокислотным анализом.

Ранее было показано [2], что октапептид HLDF-8 способен расщеплять плазмиду pSp65 при кислых значениях pH в присутствии ионов Mn^{2+} в интервале концентраций 10^{-4} – 10^{-6} М. В результате проведенных нами исследований октапептида (IV) и его укороченных с N-конца аналогов (V),

(VI) оказалось, что октапептид (IV) способен деструктурировать ДНК плазмиды pGem в кислой среде в интервале концентраций 10^{-4} – 10^{-5} М. При этом уменьшение длины октапептида с N-конца на один остаток аргинина несколько снижает его нуклеазную активность, увеличивая на порядок минимальную эффективную концентрацию для пептида (V). Удаление же с N-конца пептида (IV) аргининсодержащего дипептидного блока приводит к потере исследуемой активности у гексапептида H-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH (VI) (рис. 1, табл. 1). При этом геминпептид (II), содер-

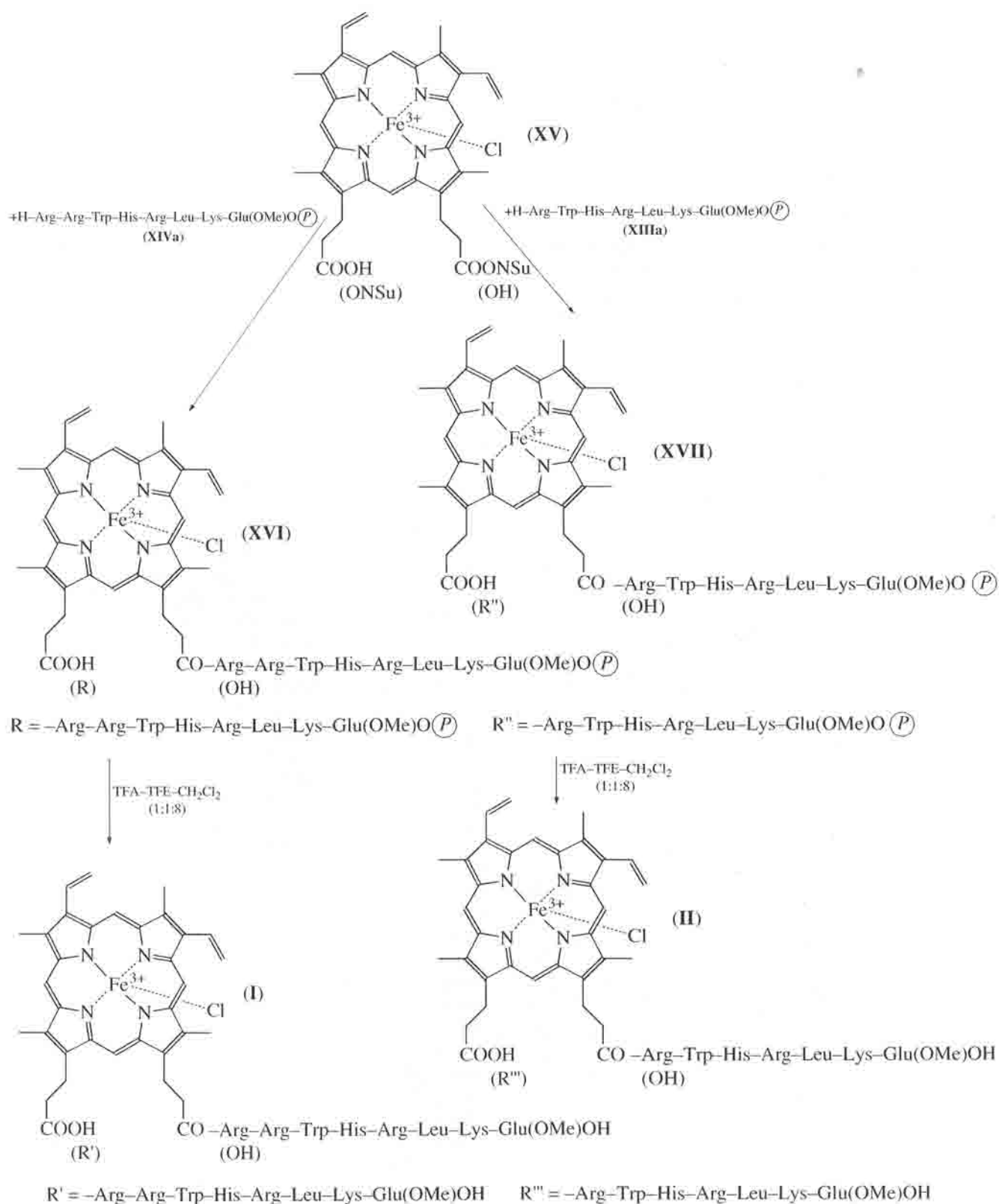


Схема 2. Синтез гемипептидов.

Таблица 1. Зависимость нуклеазной активности пептидов (IV)–(VI) и соответствующих конъюгатов с гемом (I)–(III) от их структуры

Соединение, 10^{-4} М	Буфер А рН 4.4	Буфер Е рН 7.5
H-Arg-Arg-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH (IV)	+	–
H-Arg-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH (V)	+	–
H-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH (VI)	–	–
Hemin	–	–
Hem-Arg-Arg-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH (I)	+	+
Hem-Arg-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH (II)	+	+
Hem-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH (III)	+	–
Hem-Arg-Trp-His-Arg-Leu-Lys(Dns)-Glu(OMe)-OH	±	
Hem-Arg-Trp-His-Arg-Leu-Lys(PITC)-Glu(OMe)-OH	+	
Hemin + H-Arg-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH	–	–

Примечание. “+” – расщепление ДНК; “–” – отсутствие расщепления ДНК; “±” – шмер.

жащий на N-конце лишь один остаток аргинина, все еще способен расщеплять ДНК не только в кислой (рН 4.5), но и в нейтральной среде (рН 7.5). Геминпептид (III), без остатков аргинина по N-концу, сохраняет ДНК-гидролизующую активность, но только в кислых условиях (рис. 1, табл. 1). Таким образом, присоединение остатка гема к “неактивному” гексапептиду (VI), лишенному N-концевого диаргининового блока, привело к получению “активного” конъюгата (III), обладающего нуклеазной активностью.

Учитывая, что гемингептапептид (II) представляет собой минимальную конструкцию в ряду синтезированных геминпептидов (I)–(III), сохраняющую способность расщеплять ДНК как в кислой, так и в нейтральной среде при концентрации 10^{-4} М (рис. 2), нам представилось интерес-

ным провести более детальное изучение взаимодействия с ДНК именно этого геминпептида.

Оказалось, что исчезновение на геле-электрофореграмме полос, соответствующих изоформам плазмидной ДНК, при воздействии геминпептида (II) наблюдается уже через 1 мин, в отличие от пептида (V) (данные не представлены). При этом полная сохранность строения геминпептида после расщепления ДНК (через 1 ч) подтверждается масс-спектрометрически, в том числе по отсутствию в спектре фрагментов геминпептида.

Для выявления и подтверждения участия атмосферного кислорода в деградации плазмидной ДНК под действием геминпептидов плазмиду рGem инкубировали с геминпептидом (II) в атмосфере аргона при кислых значениях рН. Действительно, в отсутствие кислорода наблюдалось некоторое снижение эффективности расщепления ДНК. Для подтверждения окислительного механизма деструкции ДНК в инкубационную среду, содержащую ДНК и геминпептид (II), добавляли известную ловушку активных форм кислорода – азид натрия. При этом наблюдалось явно выраженное дозозависимое снижение эффективности расщепления ДНК, которое полностью ингибировалось в присутствии 3% NaN_3 . Таким образом, получено предварительное подтверждение окислительного характера расщепления ДНК под действием геминпептидов, однако установление детального механизма требует дополнительных исследований.

Как видно из табл. 2, активность геминпептида (II) практически не зависит от рН (рис. 1), присутствия в реакционной среде ионов металлов, EDTA и восстановителя – аскорбиновой кислоты (в том числе в присутствии ионов металлов), температуры в интервале от +18 до +37°C (данные не представлены). Однако при увеличении концентрации

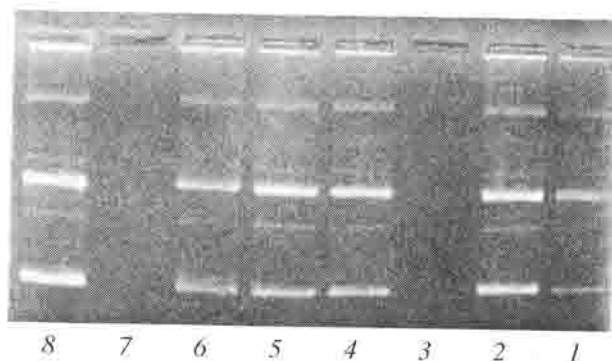


Рис. 2. Анализ с помощью геле-электрофореза инкубационной среды, содержащей ДНК-плазмиду рGem, через 1 ч инкубации при 37°C в воде (1); при рН 4.5 (буфер А) в отсутствие (2) и в присутствии геминпептида (II) в концентрации 10^{-4} (3), 10^{-5} (4), 10^{-6} М (5), а также при рН 7.5 (буфер Е) в отсутствие (6) и в присутствии геминпептида (II) в концентрации 10^{-4} (7) и 10^{-5} М (8).

Таблица 2. Влияние различных факторов на нуклеазную активность пептидов и геминпептидов

Соединение, 10 ⁻⁴ М	Буфер с Me ²⁺ (pH 4.4)				Буфер с Me ²⁺ (pH 7.5)							
	(Д)*	Mn ²⁺ (А)	Zn ²⁺ (Б)	Mg ²⁺ (В)	(Л)	Mn ²⁺ (Е)	Mg ²⁺ (З)	Fe ²⁺ (И)	Fe ²⁺ , EDTA (М)	Mg ²⁺ , EDTA (Н)	Fe ²⁺ , AA** (К)	AA (Л)
(IV)	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(V)	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(I)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(II)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание. "+" – расщепление ДНК; "—" – отсутствие расщепления ДНК; незаполненные графы – отсутствие экспериментальных данных.

* В скобках указана маркировка буфера.

** Реакционная смесь содержала 5 мМ аскорбиновую кислоту.

NaCl в среде до 150 мМ или ионов Fe²⁺ – до 1 мМ в кислой среде геминпептид (II) теряет способность расщеплять плазмидную ДНК. Добавление NaCl в реакционную среду до достижения той же концентрации через 1 ч после инкубации ДНК с геминпептидом (II) никак не сказывается на его расщепляющей способности (данные не представлены). Таким образом, нуклеазная активность геминпептида (II) зависит от ионной силы исходного реакционного раствора.

Снижение нуклеазной активности геминпептида (II) в присутствии ионов Fe²⁺, предположительно, может определяться разложением в растворе перекиси водорода, обычно присутствующей в небольших количествах в биологических препаратах. При этом, вследствие малых радиуса действия и времени жизни ОН-радикалов, образующихся в растворе по реакции Фентона [10], они не оказывают заметного деструктирующего действия на плазмидную ДНК.

Нами установлено наличие взаимодействия геминпептидов с ДНК (см. ниже), что, как известно, является обязательным условием осуществления окислительной деструкции нуклеиновых кислот под действием металлопорфиринов [11]. Если исходить из гипотезы пероксидазного механизма окислительного действия геминпептидов, по аналогии с другими геминпептидами [6], то отсутствие пероксида в реакционной среде может блокировать инициацию окисления ДНК.

В отличие от гептапептида (V) и геминпептида (II), нуклеазная активность октапептида (IV) и соответствующего геминпептида (I) усиливалась в присутствии ионов Mn²⁺ в реакционной среде, в результате чего их минимальные эффективные концентрации снижались на один-два порядка (рис. 1). При этом ионы Zn²⁺ и Mg²⁺ практически не влияли на минимально эффективные концентрации этих соединений (I), (IV).

По-видимому, структура октапептида (IV), в том числе в составе геминпептида (I), способству-

ет образованию комплекса с ионами Mn²⁺. Это, в свою очередь, может облегчать взаимодействие соединений (I), (IV) с элементами структуры ДНК и/или способствовать осуществлению расщепления ДНК по классическому нуклеазному механизму, и/или – по окислительному механизму. Последнее предположение основано на возможном подобии строения гипотетических комплексов пептида (IV) и геминпептида (I) с Mn²⁺ и активных центров марганцевых пероксидаз, в которых ион Mn²⁺ удерживается вблизи гема путем взаимодействия карбоксильных групп последнего и глутаминовой кислоты в составе белка. Ион Mn²⁺ в энзиме окисляется оксоферрильным комплексом до Mn³⁺, который затем освобождается из белковой матрицы и окисляет субстрат [12].

Первое предположение о возможном облегчении взаимодействия геминпептидов с ДНК при участии иона Mn²⁺ было сделано нами с учетом известных данных о комплексообразовании остатков лизина в активных центрах природных нуклеаз с ионами двухвалентных металлов и ДНК. В результате этого взаимодействия обеспечивается последующая атака иона металла на фосфатный остов ДНК [13]. Для проверки этого предположения нами была модифицирована ε-аминогруппа лизина в составе геминпептида (II) путем ее дансирования. Оказалось, что, в отличие от октапептида RRWHRLKE (HLDF-8), в котором такая модификация α-аминогруппы и ε-аминогруппы остатка лизина привела к полной потере им нуклеазной активности [2], упомянутая модификация геминпептида (II) не отменила его нуклеазных свойств, но изменила механизм его нуклеазной активности, приводя к образованию так называемого шмера (smear) (табл. 1). Аналогичная модификация геминпептида (II) остатком РТС не повлияла на его способность расщеплять плазмидную ДНК. Учитывая эти результаты, можно сделать предположение о том, что обе части конъюгата, гемин пептид и остаток лизина в

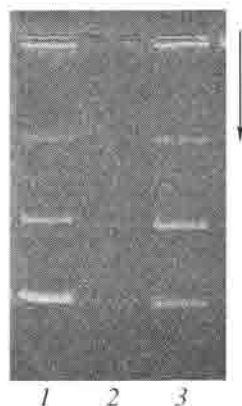


Рис. 3. Анализ с помощью гель-электрофореза инкубационной среды, содержащей ДНК плазмиды pGem, через 1 ч инкубации при 37°C и pH 7.5 (буфер Ж) в отсутствие (I) и в присутствии геминпептида (II) в концентрации 10^{-4} (2), 10^{-5} М (3).

его составе, существенны для проявления геминпептидами нуклеазной активности. Необходимость ковалентного связывания молекулы гемина с пептидным остатком для осуществления расщепления плазмидной ДНК дополнительно подтверждена отсутствием нуклеазной активности у смеси гемина с гептапептидом (II) при различных концентрациях и соотношениях реагентов (табл. 1).

Первоначально заключение о полноте расщепления ДНК геминпептидами (I)–(III) было сделано на основании исчезновения на электрограммах полос, характерных для конформационных изоформ интактной ДНК (рис. 3).

Подобная интерпретация данных гель-электрофореза в некоторых случаях может быть недостаточно достоверной, например, при образовании “плотных” комплексов эффектора с ДНК, затруд-

няющих интеркалирование бромистого этидия и визуализацию ДНК. В этом случае, при сохранении целостности ДНК, бромистый этидий не может интеркалировать между парами оснований ДНК и визуализировать ее [14, 15]. Нельзя исключить такую возможность и для геминпептидов, учитывая, что расщепление, по результатам гель-электрофореза, наблюдается при высоком соотношении числа молекул геминпептида к числу п. о. ДНК, составляющем приблизительно 1.2 : 1.

Изменения, наблюдаемые в электронных спектрах смесей геминпептидов с плазмидной ДНК, по сравнению со спектрами индивидуальных соединений в области 200–600 нм, указывают на наличие взаимодействия между ДНК и эффектом. Форма кривых поглощения, особенно в области полосы Соре, зависит от многих факторов, например, от комплексообразования остатка гемина с остатком пептида или нуклеотидным основанием в составе ДНК, агрегации молекул геминпептида и др. Поэтому, как и в случае гель-электрофореза, без привлечения дополнительных методов однозначная интерпретация спектральных данных, в том числе указывающих на расщепление ДНК, представляется проблематичной.

Так, с учетом литературных данных [11], можно лишь предположить, что увеличение оптического поглощения в области полосы Соре обусловлено нарушением степени организованности исходных структур: 10^{-5} М геминпептида и/или ДНК – при их взаимодействии (табл. 3). Этому может способствовать низкое соотношение числа молекул геминпептида к числу п.о. ДНК: ~1 : 10. Сохранение вида спектра во времени (через 0.5–1 ч) может косвенно подтверждать отсутствие дальнейших изменений в структуре ДНК и геминпептида. При более высокой концентрации геминпептида (II) (10^{-4} М) вначале, через 1 мин после смешения с раствором ДНК, наблюдается небольшой гипохромизм, что, в соответствии с литературными данными [9], может указывать на “внешнее” связывание геминпептида с ДНК с возможным образованием на ее поверхности агрегатов молекул геминпептида с более упорядоченной структурой. Протеканию этого процесса может способствовать высокое соотношение числа молекул геминпептида к числу пар оснований ДНК: ~1.2 : 1. Далее равномерно во времени наблюдается повышение оптического поглощения в области полосы Соре – на 20% через 0.5 ч и на 11% еще через 0.5 ч. После этого вид спектра геминпептида в области полосы Соре практически возвращается к виду исходного геминпептида в отсутствие ДНК. Возможным объяснением этого явления может быть дезагрегация ранее связанных с ДНК молекул геминпептида вследствие разрушения молекулы ДНК.

Таблица 3. Спектральные характеристики смесей геминпептида (II) с ДНК

Концентрация геминпептида, М	Продолжительность реакции, мин	$\lambda_{\max}$ полосы Соре	Оптическое поглощение
10^{-4}	Контроль	395.00	0.3679
	I	393.40	0.2814
	30	393.40	0.3387
	60	391.80	0.3772
	Контроль	396.80	0.0099
10^{-5}	I	398.20	0.0283
	30	396.80	0.0299
	60	396.40	0.0294

Примечание. Контроль – раствор геминпептида в 10 мМ буфере Трис-HCl, содержащем 10 мМ Zn^{2+} , с pH 7.5, в отсутствие ДНК. Концентрация ДНК плазмиды pGem 0.28×10^{-7} М.

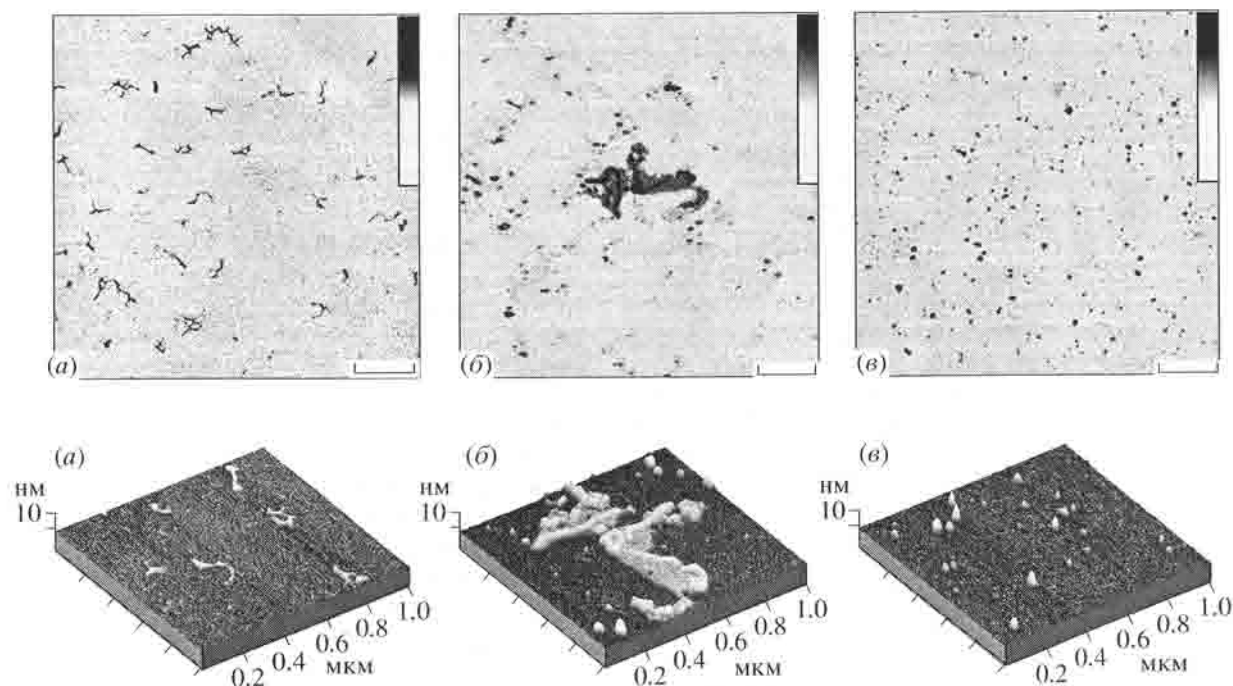


Рис. 4. Микрофотографии атомно-силовой микроскопии: intactных молекул плазмидной ДНК pGem (a) и продуктов их взаимодействия с 10^{-5} М (б) и 10^{-4} М (в) геминпептида (II) в течение 1 ч. Вверху – двумерные топографические изображения. Размер кадров 3×3 мкм², длина реперной черты 500 нм. Внизу – трехмерные профили для выбранных участков размером 1×1 мкм, соответствующих центральным частям верхних изображений рисунка. Шкала высот 10 нм.

Для дополнительного подтверждения нуклеазной активности геминпептидов и получения наглядных доказательств факта расщепления ДНК мы использовали метод атомно-силовой микроскопии, который в последнее время нашел применение для исследования процессов деструкции ДНК под действием природных [16, 17] и синтетических [18] нуклеаз. Литература по теме данной статьи ограничена работой [16], в которой методом АСМ исследовали превращения сверхскрученной формы ДНК в релаксированную циркулярную/линейную изоформу в результате одноцепочечных разрывов под действием химической нуклеазы – окислителя.

При АСМ-исследовании продуктов взаимодействия ДНК с геминпептидом в концентрации 10^{-5} М через 1 ч наблюдается расщепление некоторой части молекул ДНК. Молекулы геминпептида находятся в связанном с ДНК состоянии и визуализируются в виде агрегатов – “бусин” на острове протяженной молекулы ДНК или в виде “шубы”, покрывающей расправленные линейризованные макромолекулы (рис. 4б). Полученные методом АСМ данные в основном находятся в соответствии с результатами гель-электрофореза, указывающими на уменьшение доли сверхскрученной изоформы ДНК. При этом АСМ позволила дополнительно выявить частичное расщепление ДНК, которое оказалось “незамеченным” при исследовании методом гель-электрофореза. Результаты, полученные с помощью АСМ, поз-

волили уточнить интерпретацию изменений, наблюдаемых в электронных спектрах смесей геминпептида и ДНК. По-видимому, “бусины” и “шуба” на острове ДНК представляют собой агрегаты молекул геминпептида неупорядоченной структуры, “налипшие” на поверхность ДНК.

Гистограммы измерений объектов по длине, ширине, высоте подтверждают образование комплексов геминпептида с ДНК (рис. 4б) и отсутствие молекул ДНК или каких-либо ее фрагментов после воздействия геминпептида в концентрации 10^{-4} М (рис. 4в). Так, размер наиболее крупных агрегатов геминпептида, единственно определяемых на слюде в последнем случае, в среднем более чем на порядок меньше размеров ДНК, что исключает возможность некорректной интерпретации наблюдаемой картины.

Таким образом, в данной работе предложены биосовместимые низкомолекулярные синтетические нуклеазы на основе геминпептидов, расщепляющие все изоформы плазмидной ДНК с высокой скоростью в широком диапазоне рН и практически независимо от большинства обычных эффекторов (температуры, ионов металлов, восстановителей, комплексонов), устойчивые в условиях реакции. Установлена взаимосвязь между структурой и функцией в ряду родственных геминпептидов соединений. Получены предварительные данные, подтверждающие окислительный механизм расщепления ДНК геминпептида-

ми. Методом АСМ подтверждена достоверность факта полного расщепления плазмидной ДНК генинпептидами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В синтезе использовали *L*-аминокислоты и их производные (Reanal, Венгрия; Bachem, Швейцария). *N*^α-Fmoc-производные глутаминовой кислоты и триптофана были получены нами по методикам [19]. Колоночную хроматографию проводили на сефадексе LH-20 (Pharmacia, Швеция). При исследовании нуклеазных свойств применяли Трис-буфер (Serva, ФРГ), NaN₃, DMSO (Sigma, США). Индивидуальность полученных соединений подтверждали с помощью ТСХ на пластинах Kieselgel 60 F₂₅₄ "Merck" (Германия) в системах: *n*-бутанол–пиридин–уксусная кислота–вода, 63 : 36 : 6 : 45 (1), *n*-бутанол–пиридин–уксусная кислота–вода, 30 : 20 : 6 : 24 (2). Аминокислоты и пептиды на хроматограммах обнаруживали с помощью раствора нингидрина и хлор-толидинового реагента, а также реактива Паули и реагента Эрлиха. ВЭЖХ осуществляли на хроматографе Breeze (Waters, США) в условиях: 1) колонка Symmetry C8.5 (4.6 × 250 мм), элюция градиентом 10 → 60% фазы II (0.09%-ная TFA в смеси ацетонитрил–вода, 60–40) в течение 15 мин в фазе I (0.1%-ная водная TFA), детекция при 280 нм; 2) колонка Xterra MS C18.5 (3.9 × 150 мм), элюция градиентом 0 → 60% фазы II (0.09%-ная TFA в смеси ацетонитрил–вода 60–40) в фазе I (0.1%-ная водная TFA) в течение 18 мин, детекция при 280 нм. Гидролиз пептидилполимеров, пептидов и генинпептидов проводили в смеси 12 н. соляной и пропионовой кислот (1 : 1) при 140°C в течение 2 ч. Аминокислотный состав определяли на автоматическом аминокислотном анализаторе Biotronik IC5001 (Германия). Величины удельных углов оптического вращения измеряли на спектрополяриметре Perkin Elmer 341 (Швеция). Температуры плавления веществ определяли на термоплавильном столике Voetius (Германия). Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на время-пролетном масс-спектрометре с лазерной десорбционной ионизацией (TOF MALDI) Vision 2000 (Thermo Bioanalysis, Англия). Электронные спектры регистрировали на спектрофотометре Jasco model UV/VIS 7800 (Япония). Спектры поглощения генинпептидов регистрировали в области полосы Соре (300–450 нм). Измерения проводились в кювете толщиной 1 см. АСМ-измерения проводили на приборе Nanoscope IIIa (Digital Instruments, США) как описано ранее в работе [20]. Анализ продуктов расщепления ДНК осуществляли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле в TAE-буфере (0.04 М Трис-ацетат (pH 8.0), 0.02 М EDTA) при градиенте потенциала 10 В/см. Визуализировали продукты реакции путем окрашива-

ния их флуоресцирующим красителем бромистым этидием. Полосы ДНК детектировали с помощью источника УФ-света в длинноволновой области (300 нм) и фотографировали с помощью цифровой камеры фирмы "Canon G2". Выделение плазмидной ДНК осуществляли как описано ранее [2].

В качестве полимерных носителей в синтезе пептидов и генинпептидов использовали сополимер стирола с 1% дивинилбензола с 2-хлортритилхлоридной якорной группой с содержанием хлора 1.43 ммоль/г (Bachem, Швейцария). Твердофазный синтез пептидов и генинпептидов осуществляли в соответствии с Fmoc-стратегией [21]. Степень замещения носителя стартовой аминокислотой определяли спектрофотометрическим методом [22] и по данным количественного аминокислотного анализа смолы. Полноту протекания реакций конденсации на полимере проверяли с помощью нингидринового теста [23].

H-Arg-Arg-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH (IV). К 1.0 г полимера (*P*-Cl 1.43 ммоль Cl), предварительно набухшего в 10 мл дихлорэтана, добавляли свежеприготовленный раствор 0.548 г (1.43 ммоль) Fmoc-Glu(OMe)-OH и 0.50 мл (3.58 ммоль) триэтиламина в 6 мл дихлорэтана, перемешивали воздухом в течение 25 мин при 20°C. Реакцию останавливали прибавлением 20 мл смеси метанол–триэтиламин (9 : 1), перемешивали 1 мин [21]. Пептидилполимер (VII) отфильтровывали, промывали дихлорэтаном (2 мин × 3), DMF (2 мин × 2), изопропанолом (2 мин × 2), DMF (2 мин × 2), изопропанолом (2 мин × 2), метанолом (2 мин × 1), диэтиловым эфиром (2 мин × 2). Объем одной порции промывочного раствора 3 мл. Содержание γ-метилового эфира глутаминовой кислоты в аминокислотном полимере (VII) – 0.45 ммоль/г. Отщепление Fmoc-защиты от аминокислотного полимера (VII) проводили по следующей схеме: 1) промывка DMF (3 мин × 2), обработка 20% раствором пиперидина в DMF (3 мин × 1, 11 мин × 1); промывка DMF (1 мин × 5). К раствору 0.864 г (1.35 ммоль) Fmoc-Lys(Mmt)-OH в 6 мл DMF при охлаждении и перемешивании добавляли 0.18 г (1.35 ммоль) HOBT и 0.28 г (1.35 ммоль) DCC. Смесь перемешивали в течение 20 мин, прибавляли к Fmoc-деблокированному пептидилполимеру (VIIa), перемешивали воздухом в течение 30 мин и оставляли на 24 ч при комнатной температуре, отфильтровывали, промывали DMF (1 мин × 5). Нингидриновый тест пробы дипептидилполимера (VIII) отрицательный. Последующие стадии отщепления Fmoc-защиты и пептидообразования проводили аналогично, в соответствии с табл. 4. Получали 0.38 г гептапептидилполимера Fmoc-Arg-Arg-Trp-His(Mmt)-Arg-Leu-Lys(Mmt)-Glu(OMe)-O-(P) (XIV).

К 0.14 г Fmoc-деблокированного пептидилполимера (XIVa) прибавляли 6 мл смеси TFA–TFE–

Таблица 4. Синтез пептидилполимеров (VIII)–(XIV)

№	Аминокислота (АК)	Количество реагентов, г/ммоль	Время реакции конденсации, ч	Нингидриновый тест	Время отщепления Fmoc-группы (мин) от пептидилполимера (цифр)
1	Fmoc-Lys(Mmt)-OH	0.864/1.35 АК 0.18/1.35 HOBt 0.28/1.35 DCC	24	–	14 (VIII)
2	Fmoc-Leu-OH	0.48/1.35 АК 0.18/1.35 HOBt 0.28/1.35 DCC	24	–	30 (IX)
3	Fmoc-Arg-OH*	0.535/1.35 АК 0.18/1.35 HOBt 0.28/1.35 DCC	48	+	45 (X)
		0.214/0.54 АК 0.073/0.54 HOBt 0.111/0.54 DCC	24	–	
4	Fmoc-His(Mtt)-OH	0.856/1.35 АК 0.18/1.35 HOBt 0.28/1.35 DCC	24	–	14 (XI)
5	Fmoc-Trp-OH	0.576/1.35 АК 0.18/1.35 HOBt 0.28/1.35 DCC	24	–	60 (XII)
6	Fmoc-Arg-OH*	0.369/0.93 АК 0.13/0.93 HOBt 0.19/0.93 DCC	24	+	60 (XIII)
		0.186/0.47 АК 0.064/0.47 HOBt 0.097/0.47 DCC	48	+	
		0.186/0.47 АК 0.064/0.47 HOBt 0.097/0.47 DCC	24	–	
7	Fmoc-Arg-OH*	0.206/0.52 АК 0.07/0.52 HOBt 0.107/0.52 DCC	24	+	60 (XIV)
		0.103/0.26 АК 0.035/0.26 HOBt 0.054/0.26 DCC	24	–	

* Непосредственно перед реакцией активации боковую функцию аргинина переводили в гидрохлорид добавлением одного эквивалента 3.25 н. раствора HCl в диоксане.

DCM (1 : 1 : 8), перемешивали 3 ч в токе аргона. Полимер отделяли, промывали смесью TFA–TFE–DCM (1 : 1 : 8) (1 мин × 4 мл), растворители из фильтрата удаляли в вакууме, остаток растирали с безводным эфиром. Выпавший осадок отделяли, сушили в вакууме над P₂O₅. Целевое вещество пересаждали 4 мл медицинского эфира

из 1 мл *n*-бутилового спирта. Выход 0.07 г (90%). R_f 0.14 (1). $[\alpha]_D^{20}$ –12.0° (с 0.3, DMF). Масс-спектр, m/z : $[M]^+$ 1194.8 (вычислено 1194.4). ВЭЖХ в условиях (1): индивидуальный пик, время удерживания 10.2 мин.

N^α-[6(7)-(Протогемин IX)-ил]-Arg-Arg-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH (I). К 0.24 г Fmoc-

деблокированного пептидилполимера (XIVa) прибавляли раствор 6(7)-моно-*N*-оксисукцинимидного эфира протогемина IX (XV) в 7 мл DMF, перемешивали в течение 30 мин и оставляли на 24 ч при комнатной температуре. Геминпептидилполимер (XVI) отделяли, промывали DMF (1 мин $\times$ 7). Нингидриновый тест отрицательный. К геминпептидилполимеру (XVI) прибавляли 6 мл смеси TFA-TFE-CH₂Cl₂ (1 : 1 : 8), перемешивали 3 ч в токе аргона. Полимер отделяли, промывали смесью TFA-TFE-CH₂Cl₂ (1 : 1 : 8) (1 мин $\times$ 4). Растворители из фильтрата удаляли в вакууме. Остаток растирали с эфиром, выпавший осадок отделяли, сушили в вакууме над P₂O₅. Продукт очищали на колонке (1.2 $\times$ 24 см) с сефадексом LH-20, элюируя целевое вещество смесью метанол-вода (20 : 1). Выход 0.171 г (86%). *R_f* 0.71 (2). Электронный спектр (метанол), $\lambda_{\max}$, нм ($\epsilon \times 10^{-3}$, M⁻¹ cm⁻¹): 397.80 (90.9), 499.80 (4.15), 538.40 (2.47), 625.20 (1.23). Масс-спектр, *m/z*: [M]⁺ 1790.8 (вычислено 1791.9). Аминокислотный анализ: Glu 1.37 (1), Leu 1.17 (1), Lys 0.77 (1), His 0.99 (1), Arg 2.7 (3). Содержание геминпептида в полученном продукте (II), определенное количественным аминокислотным анализом, составляет 84% от теоретического.

H-Arg-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH (V). К 0.13 г Fmoc-деблокированного пептидилполимера (XIIIa) прибавляли 4 мл смеси TFA-TFE-CH₂Cl₂ (1 : 1 : 8). Суспензию перемешивали 3 ч при 20°C в токе аргона, затем смолу отделяли, промывали TFA-TFE-CH₂Cl₂ (1 : 1 : 8). Растворители из фильтрата удаляли в вакууме. Остаток растирали с эфиром, выпавший осадок отделяли, сушили в вакууме над P₂O₅. Целевое вещество (V) переосаждали 4 мл медицинского эфира из 1 мл *n*-бутилового спирта. Выход 0.037 г (62%). *R_f* 0.17 (1), $[\alpha]_D^{20}$ -8.83° (с 0.6, DMF). Масс-спектр, *m/z*: [M]⁺ 1038.5 (вычислено 1038.2). ВЭЖХ в условиях (1): индивидуальный пик, время удерживания 11.4 мин.

N^α-[6(7)-(Протогемин IX)-ил]-Arg-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH (II). К 0.172 г Fmoc-деблокированного пептидилполимера (XIIIa) прибавляли раствор (0.23 ммоль) 6(7)-моно-*N*-оксисукцинимидного эфира протогемина IX (XV) в 7 мл DMF, перемешивали в течение 30 мин и оставляли на 24 ч при комнатной температуре. Геминпептидилполимер (XVII) отделяли, промывали DMF (1 мин $\times$ 7). Нингидриновый тест отрицательный. К геминпептидилполимеру (XVII) прибавляли 6 мл смеси TFA-TFE-CH₂Cl₂ (1 : 1 : 8), перемешивали 3 ч в токе аргона. Полимер отделяли, промывали смесью TFA-TFE-CH₂Cl₂ (1 : 1 : 8) (1 мин $\times$ 4). Растворители из фильтрата удаляли в вакууме. Остаток растирали с эфиром, выпавший осадок отделяли, сушили в вакууме над P₂O₅. Продукт очищали на колонке (1.2 $\times$ 24 см) с сефадексом LH-20, элюируя целевое вещество смесью метанол-вода (20 : 1). Выход 0.109 г (84%). *R_f* 0.34 (2).

Электронный спектр (метанол), $\lambda_{\max}$, нм ($\epsilon \times 10^{-3}$, M⁻¹ cm⁻¹): 398.40 (67.42), 499.80 (5.62), 536.0 (4.39), 620.20 (1.46). Масс-спектр, *m/z*: [M]⁺ 1636.5 (вычислено 1636.7). Аминокислотный анализ: Glu 1.42 (1), Leu 0.76 (1), Lys 0.60 (1), His 1.34 (1), Arg 1.89 (2). Содержание геминпептида в полученном продукте (II), определенное количественным аминокислотным анализом, составляет 83% от теоретического.

H-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH (VI). К 0.125 г деблокированного пептидилполимера (XIIa) прибавляли 3 мл смеси TFA-TFE-CH₂Cl₂ (1 : 1 : 8). Суспензию перемешивали 3 ч при 20°C в токе аргона, затем смолу отделяли, промывали TFA-TFE-CH₂Cl₂ (1 : 1 : 8). Растворители из фильтрата удаляли в вакууме. Остаток растирали с эфиром, выпавший осадок отделяли, сушили в вакууме над P₂O₅. Целевое вещество (VI) переосаждали 4 мл медицинского эфира из 1 мл *n*-бутилового спирта. Выход 0.028 г (56%). *R_f* 0.16 (1), $[\alpha]_D^{20}$ -15.59° (с 0.34, DMF). Масс-спектр, *m/z*: [M]⁺ 882.8 (вычислено 882.03). ВЭЖХ в условиях (2): индивидуальный пик, время удерживания 8.3 мин.

N^α-[6(7)-(Протогемин IX)-ил]-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(OMe)-OH (III). К 0.19 г Fmoc-деблокированного пептидилполимера (XIIa) прибавляли раствор (0.3 ммоль) 6(7)-моно-*N*-оксисукцинимидного эфира протогемина IX (XV) в 5 мл DMF, перемешивали в течение 4 ч и оставляли на 24 ч при комнатной температуре. Геминпептидилполимер (XVIII) отделяли, промывали DMF (1 мин $\times$ 7). Нингидриновый тест отрицательный. К геминпептидилполимеру (XVIII) прибавляли 6 мл смеси TFA-TFE-CH₂Cl₂ (1 : 1 : 8), перемешивали 3 ч в токе аргона. Полимер отделяли, промывали смесью TFA-TFE-CH₂Cl₂ (1 : 1 : 8) (1 мин $\times$ 4). Растворители из фильтрата удаляли в вакууме. Остаток растирали с эфиром, выпавший осадок отделяли, сушили в вакууме над P₂O₅. Продукт очищали на колонке (1.2 $\times$ 24 см) с сефадексом LH-20, элюируя целевое вещество смесью метанол-вода (20 : 1). Выход 0.071 г (56%). *R_f* 0.42 (1). Электронный спектр (метанол), $\lambda_{\max}$, нм ($\epsilon \times 10^{-3}$, M⁻¹ cm⁻¹): 405.30 (54.3), 503.60 (3.35), 536.60 (3.03), 623.20 (1.13). Масс-спектр, *m/z*: [M]⁺ 1479.3 (вычислено 1479.7). Аминокислотный анализ: Glu 1.24 (1), Leu 0.77 (1), Lys 0.90 (1), His 1.12 (1), Arg 0.98 (1). Содержание геминпептида в полученном продукте (III), определенное количественным аминокислотным анализом, составляет 89% от теоретического.

Модификация геминпептида (II) по N^ε-группе остатка лизина. Дансирование геминпептида (II) (0.8 мг/мл) проводили в 0.1 М NaHCO₃ (pH 10.5) в течение 30 мин при 45°C в присутствии 100-кратного избытка Dns-хлорида [2]. Непрореагировавший Dns-хлорид удаляли многократным промыванием ацетоном. Электронный спектр

(DMSO), λ_{max} , нм, ($\epsilon \times 10^{-3}$, $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 340.2 (8.87), 402.2 (7.01), 502.4 (0.09). Масс-спектр, m/z : $[M]^+$ 1869.1 (вычислено 1871). РИТС-мечение осуществляли путем инкубации пептида с 2.5% раствором РИТС в 50% пиридине [2]. Полученный продукт промывали этилацетатом. Электронный спектр (MeOH), λ_{max} , нм, ($\epsilon \times 10^{-3}$, $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 402.2 (10.72), 490.20 (0.36).

Определение нуклеазной активности. Пептиды и геминпептиды в концентрации 10^{-4} – 10^{-8} М инкубировали с 0.05 г/л (0.28×10^{-7} М) плазмидной ДНК pGem в течение 1 ч при 37°C в 10 мкл реакционной смеси. Состав и pH реакционной смеси варьировали в зависимости от эксперимента. Были использованы следующие буферные растворы (концентрации компонентов соответствуют такому в составе реакционной пробы): 50 мМ AcONH_4 (pH 4.5), 5 мМ MnCl_2 (А); 50 мМ AcONH_4 (pH 4.5), 10 мМ ZnOAc_2 (Б); 50 мМ AcONH_4 (pH 4.5), 5 мМ MgCl_2 (В); 50 мМ AcONH_4 (pH 4.5), 1 мМ FeSO_4 (Г); 50 мМ AcONH_4 (pH 4.5) (Д); 10 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 10 мМ MnCl_2 (Е); 10 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 10 мМ ZnOAc_2 (Ж); 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 5 мМ MgCl_2 (З); 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 5 мМ MgCl_2 , 150 мМ NaCl (И); 10 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 1 мМ FeSO_4 (К); 10 мМ Трис-HCl (pH 7.5) (Л); 10 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 1 мМ FeSO_4 ; 10 мМ EDTA (М); 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 5 мМ MgCl_2 ; 10 мМ EDTA (Н).

Спектральные методы исследования. Приготовление проб для спектральных измерений: отдельные порции реакционной смеси в буфере с pH 7.5, содержащем 10 мМ Трис-HCl и 10 мМ Zn^{2+} , а также 0.28×10^{-7} М плазмиды pGem и 10^{-4} М или 10^{-5} М геминпептида, выдерживали 1 мин, или 30, или 60 мин, разбавляли в 25 раз водой и немедленно снимали электронный спектр в интервале 200–600 нм. Семейство спектральных кривых регистрировали последовательно во времени.

Проведение эксперимента в АСМ-исследованиях. До нанесения образцов для АСМ слюду экспонировали в течение 1 ч в 10 мМ ZnCl_2 , затем промывали водой. Пробы образцов получали 50-кратным разбавлением реакционной смеси водой. Исследуемые пробы включали вещества в следующих концентрациях: 0.001 г/л плазмидной ДНК pGem, 0.2 мМ Трис-HCl и 0.2 мМ ZnCl_2 (а), а также дополнительно 0.2×10^{-6} (б) или 0.2×10^{-5} М (в) геминпептид. Во всех случаях на поверхность слюды, предварительно модифицированной ионами Zn^{2+} , наносили каплю пробы объемом 2 мкл и полностью высушивали на воздухе.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 04-03-32687 и ООО "Фарминтерпрайсез".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Власов В.В., Сильников В.Н., Зенкова М.А. // Молекулярная биология. 1998. Т. 32. С. 62–70.
2. Драницына С.М., Костанян И.А., Андреева С.Г., Астапова М.В., Бабиченко И.И., Баева О.В., Богачук А.П., Молотковская И.М., Родионов И.Л., Смирнова Е.В., Липкин В.М. // Биоорганическая химия. 2000. Т. 26. С. 340–351.
3. Крынецкая Н.Ф., Кубарева Е.А., Тимченко М.А., Белков В.М., Шабарова З.А. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 1251–1257.
4. Hashimoto Y., Iijima H., Nozaki Y., Shudo K. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 5103–5110.
5. Travascio P., Witting P.K., Mauk A.G., Sen D. // J. Am. Chem. Soc. 2001. V. 123. P. 1337–1348.
6. Рожкова Е.А., Желтухина Г.А., Евстигнеева Р.П. // Кинетика и катализ. 1999. Т. 40. С. 256–260.
7. Евстигнеева Р.П., Лукашева Е.А., Соловьева А.Б., Желтухина Г.А., Лубсандоржиева Л.К. // Журн. физ. химии. 1995. Т. 69. С. 1972–1974.
8. Евстигнеева Р.П., Желтухина Г.А., Зарубина Т.В., Небольсин В.Е., Антоненкова Т.Н., Костанян И.А., Драницына С.М., Астапова М.В., Сурин Е.А. // ДАН. 2003. Т. 388. С. 56–60.
9. Sax B., Dick F., Tanner R., Gosteli J. // Pept. Res. 1992. V. 5. P. 245–246.
10. Фридович И.Т. Свободные радикалы в биологии: Пер. с англ. М.: Мир, 1979. Т. 1.
11. Успехи химии порфиринов/Ред. Голубчиков О.А. С.-Петербург: НИИ химии СПбГУ, 1999. Т. 2. С. 337.
12. Hayashi T., Sato H., Matsuo T., Matsuda T., Hitomi Y., Hiseada Y. // J. Porphyrins and Phthalocyanines. 2004. V. 8. P. 255–264.
13. Horton N., Newberry K., Perona J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 13489–13494.
14. Власов Г.П., Корольков В.И., Панкова Г.А., Тарасенко И.И., Баранов А.Н., Глазков П.Б. и др. // Биоорганическая химия. 2004. Т. 30. С. 15–24.
15. Lown J.W., Sondhi S.M., Ong C.W., Skorobogaty A., Kishikawa H., Dabrowiak J.C. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 5111–5117.
16. Abdelhady H.G., Allen S., Davies M.C., Roberts C.J., Tendler S.J.B., Williams P.M. // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. P. 4001–4005.
17. Poma A., Spano L., Pittaluga E., Tucci A., Palladino L., Limongi T. // J. Microsc. 2005. V. 217. P. 69–74.
18. Mukhopadhyay R., Srivatsan S.G., Verma S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. V. 308. P. 165–169.
19. Гершкович А.В., Кубишев В.К. Химический синтез пептидов. Киев: Наукова Думка, 1992.
20. Касьяненко Н.А., Абрамчук С.С., Благодатских И.В., Богданов А.А., Галлямов М.О., Кононов А.И., Космачинская Ю.В., Ситникова Н.Л., Хохлов А.Р. // Высокомолек. соед. А. 2003. Т. 45. С. 1626–1637.
21. Barlos K., Chatzi O., Gamos D., Stavropoulos G. // Int. J. Peptide Protein. Res. 1991. V. 37. P. 513–520.
22. Dryland A., Sheppard R.C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1986. № 1. P. 125–137.
23. Kaiser E., Collescott R.L., Rossinger G.D., Cook P.J. // Anal. Biochem. 1970. V. 34. P. 595–598.

Synthesis and Structure–Function Study of Artificial Nucleases on the Basis of Hemin Conjugates with Peptide Fragments of Cell Differentiation Factor HLDF

G. A. Zheltukhina^{a, #}, T. N. Lobanova^a, V. E. Nebolsin^a, M. O. Gallyamov^b,
S. M. Dranitsyna^c, and I. A. Kostanyan^c

[#] Phone: +7 (495) 936-8903; fax: +7 (495) 936-8901; e-mail: laboratory211@yandex.ru

^a Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 119571, Russia

^b Faculty of Physics, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

^c Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,

ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

A series of octa–hexapeptide fragments of HLDF and their conjugates with hemin were obtained by solid phase peptide synthesis. A relationship between the structure and the nuclease activity of the compounds was established. The effect of various factors (medium pH, the presence of metal ions, complexons, reducers, and buffer composition) on DNA destruction with hemin peptides was studied. Preliminary information confirming an oxidative mechanism of this process was obtained. The cleavage of plasmid DNA under the action of hemin peptides was studied by the methods of electron microscopy, gel electrophoresis, and atomic force microscopy.

The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2006, vol. 32, no. 1; see also <http://www.maik.ru>

Key words: atomic force microscopy, differentiation factor, DNA, hemin peptides, HLDF, nuclease activity, solid phase synthesis