



Структура и функция биополимеров

УДК 577(322+323):543.422(25+6)

И. В. Кондратьев, И. Н. Коломиец, С. А. Самойленко, Н. В. Желтовский ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ ЦИТОЗИНА С КАРБОКСИЛЬНОЙ ГРУППОЙ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР *

С помощью УФ-спектроскопии установлено, что из оснований нуклеиновых кислот с недиссоциированной карбоксильной группой аминокислот в растворе в диметилсульфоксиде (ДМСО) взаимодействует только цитозин. Методом ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C изучена структура образующихся H -связанных комплексов. Показана конкуренция карбоксильной группы с гуанином за образование H -связей с цитозином.

Введение. Важную роль в белково-нуклеиновом узнавании играют взаимодействия между функциональными группами мономерных компонентов нуклеопротеидных комплексов. Благодаря наличию донора и акцептора протонов карбоксильная группа аспарагиновой и глутаминовой кислот, часто встречающихся в местах связывания белков с нуклеиновыми кислотами, является одной из наиболее активных групп боковых радикалов полипептидной цепи. В зависимости от полярных свойств окружения карбоксильная группа может быть как нейтральной, так и ионизированной (карбоксилат-ион). Выяснение специфичности взаимодействий нуклеотидных оснований с нейтральной карбоксильной группой и карбоксилат-ионом может дать полезную информацию для понимания ее роли во взаимодействии белков с нуклеиновыми кислотами. Ранее исследовалось взаимодействие оснований нуклеиновых кислот с карбоксилат-ионом в ДМСО [1] и в ДМСО с добавлением воды [2, 3] методами УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии. Было показано, что в ДМСО все нуклеотидные основания, кроме цитозина, образуют с карбоксилат-ионом водородно-связанные комплексы с участием имино- и аминогрупп.

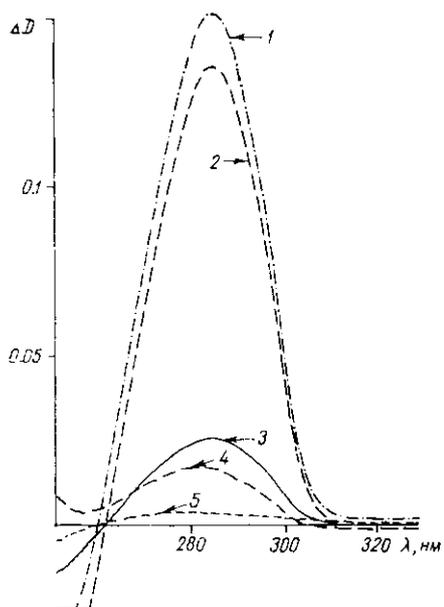
В настоящем сообщении приводятся результаты исследования в ДМСО с помощью ЯМР-спектроскопии на ядрах ^1H и ^{13}C водородно-связанных комплексов нуклеотидных оснований (цитозин, С; 9-метилгуанин, $m^9\text{G}$; аденин, А; урацил, У; тимин, Т) с N -ацилпроизводными аминокислот, содержащих недиссоциированную карбоксильную группу (N -формиласпарагиновая кислота, $f\text{-Asp}$; N -ацетиласпарагиновая кислота, $ac\text{-Asp}$; N -ацетилглутаминовая кислота, $ac\text{-Glu}$; N -формилглицин, $f\text{-Gly}$; α -метиловый эфир N -ацетиласпарагиновой кислоты, $ac\text{-Asp-O-Met}$).

Материалы и методы. В работе использовали следующие реактивы: цитозин и цитидин («Calbiochem», США), $m^9\text{G}$ («Fluka», Швейцария), $f\text{-Asp}$, $ac\text{-Asp}$ и $ac\text{-Glu}$ («Sigma», США), $ac\text{-Asp-O-Met}$ («Serva», ФРГ); $f\text{-Gly}$ любезно предоставлен А. Г. Терентьевым. Растворители ДМСО фирмы «Fluka» и ДМСО- d_6 производства ВО «Изотоп» очищали вакуумной перегонкой при температуре 52°C и высушивали над ситами 0,4 и 0,5 м фирмы «Serva».

* Представлена членом редколлегии В. И. Даниловым.

Образование комплексов между основаниями и указанными производными аминокислот определяли по появлению дифференциального УФ-поглощения в области 260 нм смеси основания с производными аминокислот относительно раствора основания, структуру комплексов исследовали методом ЯМР-спектроскопии. УФ-поглощение регистрировали с помощью спектрометра MPS-2 000 («Shimadzu», Япония), спектры ЯМР — спектрометра WP-200 («Bruker», ФРГ) в ДМСО. В качестве внутреннего стандарта использовали ТМС. Сигналы ЯМР идентифицировали, сравнивая спектры модельных соединений, а также используя литературные данные [4, 5]. Для записи спектров ^{13}C при концентрациях 30 мМ требовалось, как правило, до 3 000 накоплений (ампула диаметром 10 мм), а для спектров ^1H (ампула диаметром 5 мм) — до 500 накоплений.

Результаты и обсуждение. Данные УФ-спектроскопии свидетельствуют об образовании межмолекулярного комплекса с N-ацилпроизводными аминокислот только в случае цитозина. На рис. 1 представлены соответствующие дифференциальные спектры. В табл. 1 приведены химические сдвиги сигналов протонов цитозина и их изменения в смесях с производными аминокислот. На образование водородно-связанных комп-



лексов водородно-связанных комп-

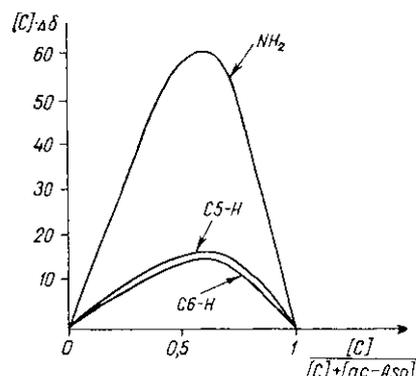


Рис. 1. Дифференциальные спектры УФ-поглощения цитозина (0,001 моль/л) в присутствии N-ацилпроизводных аминокислот (0,01 моль/л): 1 — f-Asp; 2 — ac-Asp; 3 — ac-Glu; 4 — ac-Gly; 5 — ac-Asp-O-Met. D — оптическая плотность, λ — длина волны

Fig. 1. Differential absorption UV spectra of cytosine in presence of amino acid N-acyl derivatives: 1 — f-Asp, 2 — ac-Asp, 3 — ac-Glu, 4 — ac-Gly, 5 — ac-Asp-O-Met. D — transmission density, λ — wave-length. Concentrations of cytosine — 0,001 mol/l, of amino acid derivatives — 0,01 mol/l

Рис. 2. Графики Джоба химических сдвигов протонов цитозина для определения стехиометрии комплекса цитозин: N-формиласпарагиновая кислота; $\Delta\delta$ — изменение химического сдвига сигналов протонов (Hz) при образовании комплекса

Fig. 2. The Job plots of chemical shifts of cytosine proton signals to determine cytosine: N-acetyl aspartic acid complex stoichiometry; $[C]$ — cytosine concentration, $[ac-Asp]$ — concentration of N-acetyl aspartic acid, $\Delta\delta$ — chemical shift change of proton signals (Hz) under the complex formation.

лексов указывает сдвиг сигналов протонов основания в сторону слабого поля. Наиболее чувствительными к межмолекулярному взаимодействию оказались имино- и аминогруппа цитозина. При образовании комплексов исчезают сигналы протонов карбоксильных групп производных аминокислот, а сигнал протона NH N-ацилпроизводных аминокислот не изменяется. Производные f-Asp, ac-Asp и ac-Glu, имеющие по две карбоксильные группы, оказывают большее влияние на спектр ПМР цитозина, чем f-Gly и ac-Asp-O-Met, имеющие по одной группе COOH. Представленный на рис. 2 график Джоба [6]

для химических сдвигов сигналов протонов цитозина NH₂, C5-H и C6-H (суммарная концентрация C+ac-Asp постоянна) показывает образование комплекса ac-Asp : C стехиометрии 1 : 2.

Попытка исключить влияние гликозидного протона цитозина N1H, отсутствующего в реальных системах белково-нуклеинового узнавания, заменой основания на его нуклеозид цитидин (Cyd) оказалась неудачной. Межмолекулярное взаимодействие карбоксильных групп аминокислот с основанием ослаблено (табл. 1) из-за конкурирующего связывания с гидроксильными группами рибозы.

Химические сдвиги сигналов ядер ¹³C цитозина и их изменения в присутствии аминокислот в ДМСО приведены в табл. 2. При образовании комплексов сигналы атомов углерода C2 и C4 сдвигаются в сторону сильного поля, а атомов C5 и C6 — претерпевают слабепольный сдвиг. Такой характер изменения сигналов ядер ¹³C цитозина указывает на протонирование основания по атому N3 [7, 8] в составе комплекса за счет протона карбоксильной группы. Как было установлено в работе [9], в твердофазном комплексе цитозина с f-Gly основание также протонировано по атому N3, а карбоксильная группа аминокислоты депротонирована.

Ранее было показано, что карбоксилат-ион специфически взаимодействует с гуанином посредством двух равноценных водородных связей (рис. 3, а) [1] и конкурирует за связывание с гуанином в паре гуанин — цитозин [2]. Структура комплекса, образуемого цитозином с карбоксильной группой (рис. 3, б) благодаря переносу протона, по-

Таблица 1

Химические сдвиги (δ) сигналов протонов цитозина и цитидина и их изменения (Δδ) в комплексах с N-ацилпроизводными аминокислот в ДМСО (м. д. относительно TMC, концентрации 30 мМ)

Proton signal chemical shifts of cytosine and cytidine and their changes in complexes with amino acid N-acyl derivatives in DMSO (p. p. m. from TMS, concentrations 30 mM)

Образец	N1-H		N4-H2		C5-H		C6-H	
	δ	Δδ	δ	Δδ	δ	Δδ	δ	Δδ
C	10,29		6,94		5,53		7,28	
C+f-Asp	11,32	+1,03	7,29	+0,35	5,61	+0,08	7,38	+0,10
C+ac-Asp	11,29	+1,00	7,24	+0,30	5,60	+0,07	7,35	+0,07
C+ac-Glu	11,12	+0,83	7,08	+0,14	5,57	+0,04	7,33	+0,05
C+f-Gly	10,75	+0,44	7,06	+0,12	5,57	+0,04	7,32	+0,04
C+ac-Asp-O-Met	10,69	+0,40	7,03	+0,09	5,57	+0,04	7,33	+0,05
Cyd			7,13		5,76		7,84	
Cyd+f-Asp			7,20	+0,07	5,77	+0,01	7,86	+0,02
Cyd+ac-Asp			7,20	+0,07	5,76	+0,01	7,85	+0,01
Cyd+ac-Glu			7,14	+0,01	5,76	0	7,89	+0,05
Cyd+ac-Asp-O-Met			7,14	+0,01	5,76	0	7,84	+0,05

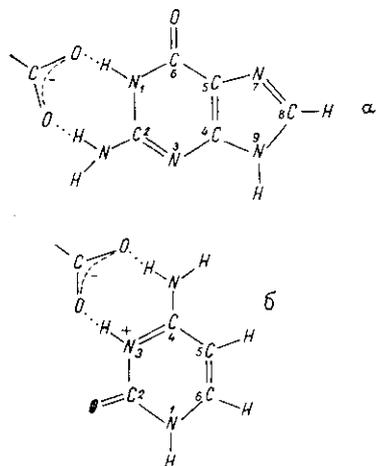
Таблица 2

Химические сдвиги (δ) сигналов ¹³C цитозина и их изменения (Δδ) в его комплексах с N-ацилпроизводными аминокислот в ДМСО (м. д. относительно TMC, концентрации 30 мМ)

¹³C signal chemical shifts of cytosine atoms and their changes in its complexes with amino acid N-acyl derivatives in DMSO (p. p. m. from TMS, concentrations 30 mM)

Образец	C2		C4		C5		C6	
	δ	Δδ	δ	Δδ	δ	Δδ	δ	Δδ
C	156,63		166,51		92,32		142,46	
C+f-Asp	155,73	-0,90	165,86	-0,65	92,56	+0,24	143,04	+0,58
C+ac-Asp	155,85	-0,78	160,94	-0,57	92,44	+0,12	143,87	+0,41
C+f-Gly	156,55	-0,08	166,42	-0,09	92,34	+0,02	142,51	+0,05
C+ac-Asp-O-Met	156,69	+0,06	166,48	-0,03	92,41	+0,09	142,63	+0,17

добна структуре комплекса гуанина с карбоксилат-ионом [9]. Представляло интерес изучение тройной смеси f-Asp : C : m⁹G. Как видно из табл. 3 и 4, добавление f-Asp к паре C : m⁹G вызывает изменения спектра ¹³C цитозина, характер которых указывает на значительный вклад в структуру тройного комплекса взаимодействий цитозина с карбоксильной группой.



В то же время смещение сигналов ¹³C m⁹G в сторону сильного поля свидетельствует о заметном увеличении экранирования ядер C5 и C6 за счет ослабления водородных связей с цитозином. Таким образом, нейтральная карбоксильная группа также способна ослаблять водородные связи в паре, конкурируя за связывание с цитозином.

Рис. 3. Структура комплексов: а — гуанина с карбоксилат-ионом; б — цитозина с недиссоциированной карбоксильной группой

Fig. 3. The structure of complexes between: а — guanine and carboxylate-ion; б — cytosine and undissociated carboxylic group

В заключение укажем, что в реальных системах белково-нуклеинового узнавания могут иметь место взаимодействия между цитозином и карбоксильной группой аминокислотных остатков, аналогичные исследованным в настоящей работе. Например, можно назвать вирус желтой мозаики турнепса [10], РНК которого на 40 % состоит из цитозина, а белок содержит 13 остатков глутаминовой и аспарагиновой аминокислот.

Таблица 3

Химические сдвиги (δ) сигналов ¹³C цитозина и их изменения ($\Delta\delta$) в его комплексах с m⁹G и f-Asp в ДМСО (м. д. относительно ТМС, концентрации 30 мМ)

¹³C signal chemical shifts of cytosine atoms and their changes in its complexes with 9-methyl guanine and N-formyl aspartic acid in DMSO (p. p. m. from TMS, concentrations 30 mM)

Образец	C2		C4		C5		C6	
	δ	$\Delta\delta$	δ	$\Delta\delta$	δ	$\Delta\delta$	δ	$\Delta\delta$
C	156,63		166,51		92,32		142,46	
C+m ⁹ G	156,77	+0,14	166,62	+0,11	92,56	+0,24	142,60	+0,14
C+m ⁹ G+f-Asp	156,03	-0,60	166,06	-0,45	92,71	+0,39	142,99	+0,53

Таблица 4

Химические сдвиги (δ) сигналов ¹³C m⁹G и их изменения ($\Delta\delta$) в его комплексах с цитозином и f-Asp в ДМСО (м. д. относительно ТМС, концентрации 30 мМ)

¹³C signal chemical shifts of 9-methyl guanine atoms and their changes in its complexes with cytosine and N-formyl aspartic acid (p. p. m. from TMS, concentrations 30 mM)

Образец	C2		C4		C5		C6		C8	
	δ	$\Delta\delta$								
m ⁹ G	153,37		151,39		116,37		156,63		137,78	
m ⁹ G+C	153,46	+0,09	151,57	+0,18	116,61	+0,24	157,16	+0,53	137,87	+0,09
m ⁹ G+C+f-Asp	153,46	+0,09	151,54	+0,15	116,25	-0,12	157,04	+0,41	137,87	+0,09

A STUDY OF COMPLEXES BETWEEN CYTOSINE AND AMINO ACID CARBOXYLIC GROUP BY NMR SPECTROSCOPY

I. V. Kondratyuk, I. N. Kolomiets, S. A. Samoilenko, N. V. Zheltovsky

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

It has been shown by UV spectroscopy that of all the nucleotide bases only cytosine interacts with undissociated amino acid carboxylic group in DMSO solution. H-bonded complexes of cytosine with some amino acid N-acyl derivatives (N-formyl aspartic acid, N-acetyl aspartic acid, α -methyl ester of N-acetyl aspartic acid, N-acetyl glutamic acid, N-formyl glycine) were studied by the PMR spectroscopy. It has been determined by ^{13}C NMR spectroscopy that while complexing cytosine is protonated at N3 atom by carboxylic group proton. It was shown that in triple complex N-formyl aspartic acid: cytosine: 9-methyl guanine amino acid carboxylic group, binding to cytosine, loosens H-bonds inside the base pair.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Взаимодействие* нуклеотидных оснований с карбоксильной группой аминокислот в ДМСО: модель точечных белково-нуклеиновых контактов / Н. В. Желтовский, С. А. Самойленко, И. Н. Коломиец, И. В. Кондратюк // Докл. АН УССР. Сер. Б.—1988. № 8.—С. 68—71.
2. *Lancelot G., Helene C.* Selective recognition of nucleic acids by proteins: The specificity of guanine interaction with carboxylate-ion // PNAS.—1977.—74, N 11.—P. 4872—4875.
3. *Брусков В. И., Бушнев В. Н.* Исследование методом протонного магнитного резонанса комплексообразования между нуклеозидами и соединениями, моделирующими аминокислотные остатки белков, в диметилсульфоксиде // Биофизика.—1977.—22, № 1.—С. 26—31.
4. *Carbon-13 magnetic resonance. 17. Pyrimidine and purine nucleosides* / A. J. Jones, D. M. Grant, M. W. Winkley, R. K. Robins // J. Amer. Chem. Soc.—1970.—92, N 13.—P. 4079—4087.
5. *Breitmaier E., Voelter W.* Carbon-13 NMR spectroscopy.—Weinheim: VCH, 1987.
6. *Job M. P.* Etude spectrographique de la formation des complexes en solution et de leur stabilité // Compt. Rend.—1925.—180, N 12.—P. 928—930.
7. *Comparative structural analysis of cytidine, ethenocytidine and their protonated salts* III. ^1H , ^{13}C and ^{15}N NMR studies at normal isotope abundance / L. Kozerski, H. Sierzpulowska-Cracz, W. Krzyzosiak et al. // Nucl. Acids Res.—1984.—12, N 4.—P. 2205—2223.
8. *Benoit R. L., Frechette M.* ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance and ultraviolet studies of the protonation of cytosine, uracil, thymine, and related compounds // Can. J. Chem.—1986.—64, N 12.—P. 2348—2352.
9. *Колебательный спектр и структура комплекса цитозина с N-формилглицином в твердой фазе* / Н. В. Желтовский, С. А. Самойленко, М. И. Губайдуллин, И. В. Кондратюк // Докл. АН УССР. Сер. Б.—1988.—№ 5.—С. 75—78.
10. *Studies of virus structure by laser-Raman spectroscopy. Turnip yellow mosaic virus and capsids* / K. A. Hartman, P. E. McDona'd-Ordzie, J. M. Kaper et al. // Biochemistry.—1978.—17, N 11.—P. 2118—2123.

Ин-т молекуляр биологии и генетики
АН УССР, Киев

Получено 23.06.89

УДК 577.3:547.963.3

С. В. Корнилова, А. Г. Шкорбатов, Ю. П. Благой

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЩЕЛОЧНОЗЕМЕЛЬНЫХ И ПЕРЕХОДНЫХ МЕТАЛЛОВ НА ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ И МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ДНК

Изучено влияние ионов Me^{2+} щелочноземельных (Mg^{2+} , Ca^{2+}) и переходных металлов (Mn^{2+} , Cu^{2+}) на характеристическую вязкость $[\eta]$ и величину параметра исключенного объема ДНК ϵ . Показано что ионы Mn^{2+} и Cu^{2+} оказывают больший эффект на величины $[\eta]$ и ϵ , чем ионы Mg^{2+} и Ca^{2+} , вследствие связывания с азотистыми основаниями ДНК уже при малых концентрациях ($5 \cdot 10^{-6}$ М). Установлены универсальные зависимости величин $[\eta]$ и ϵ от степени связывания Me^{2+} .