

М. В. Желтовський, С. П. Самійленко,
І. М. Коломієць, І. В. Кондратюк, А. В. Степанюгін

ВЗАЄМОДІЯ МЕТИЛ- ТА ГЛІКОЗИЛПОХІДНИХ ПІРИМІДИНОВИХ НУКЛЕОТИДНИХ ОСНОВ З КАРБОКСИЛЬНОЮ ГРУПОЮ АМІНОКИСЛОТ

За допомогою УФ, ІЧ спектроскопії та ПМР вивчено взаємодію в ДМСО низки метил- та глікозилпохідних піримідинових основ з карбоксильною групою амінокислот як моделі можливих точкових контактів в реальних нуклеопротейдних комплексах. Встановлено, що подібно до незаміщеної основи з нейтральною карбоксильною групою утворюють комплекси 1-метилцитозин, 5-метилцитозин, 1,5-діметилцитозин, цитидин, дезоксицитидин, 5-метилдезоксцитидин, а 3-метилцитозин та ізоцитозин взаємодіють з депротонованою карбоксильною групою (карбоксилат-іоном). Як і незаміщені тимін та урацил, 1-метилтимін, 1-метилурацил, 3-метилурацил, тимідин, уридин, 5-метилуридин, дезоксиуридин взаємодіють лише з карбоксилат-іоном. Аналіз отриманих результатів та даних попередніх робіт вказує на здатність карбоксильної групи амінокислот відрізняти цитозин від тиміну та урацилу, що стосується також їх нуклеозидів та ряду похідних.

Вступ. Сьогодні ні в кого не викликає сумніву важлива роль навіть окремих мономер-мономерних контактів у процесах високоспецифічних білково-нуклеїнових взаємодій. Висвітленню структурних аспектів точкових механізмів білково-нуклеїнового впізнавання за участю карбоксильних груп амінокислотних залишків в модельних системах присвячено низку наших попередніх публікацій [1—7]. За допомогою методів УФ, ІЧ спектроскопії та ПМР у безводному ДМСО вивчалися комплекси нейтральної та іонізованої карбоксильних груп з аденіном, 9-метилгуаніном, тиміном, урацилом та цитозином [1, 2], метилпохідними гуаніну та аденіну [3], їх нуклеозидами, в т. ч. метилзаміщеними, а також з низкою метил- і глікозилпохідних гіпоксантину та ксантину [4]. Досліджено коливальний спектр і структуру комплексу цитозину з N-формілгліцином також у твердій фазі [5]. В даному повідомленні, що є продовженням вказаної серії робіт, наводяться результати вивчення взаємодії серії метил- та глікозилпохідних піримідинових нуклеотидних основ — цитозину, урацилу та тиміну (рис. 1) з нейтральною та іонізованою карбоксильною групою.

Матеріали та методи. В роботі використано реактиви: 1-метилцитозин ($m^1\text{Cyt}$), гідрохлорид 3-метилцитозину ($m^3\text{Cyt}\cdot\text{HCl}$), 1,5-діметилцитозин ($m_2^{1,5}\text{Cyt}$), ізоцитозин (isoCyt), дезоксицитидин ($d\text{C}$), 5-метилдезоксцитидин ($m^5d\text{C}$), 1-метилурацил ($m^1\text{Ura}$), 1-циклогексилурацил (chx^1Ura), 3-метилурацил ($m^3\text{Ura}$), уридин (U), дезоксиуридин ($d\text{U}$), 5-метилуридин ($m^5\text{U}$) або ріботимідин ($r\text{T}$), 1-метилтимін ($m^1\text{T}$), дезокситимідин ($d\text{T}$) — фірми «Sigma»; цитозин (Cyt), 5-метилцитозин ($m^5\text{Cyt}$), урацил (Ura), тимін (Thy) — «Calbiochem»; цитидин (C) та N-ацетиласпарагінова кислота (ac-Asp), котра використовувалася як ліганд з нейтральною карбоксильною групою, — «Serva»; 1,3-діметилурацил ($m_2^{1,3}\text{Ura}$) та ДМСО — «Fluka»; ацетат натрію (NaAc), використаний як ліганд з іонізованою карбоксильною групою, — «Реахим»; дейтерований діметилсульфоксид ДМСО- d_6 — «Ізотоп»; тетраметилсилан

© М. В. Желтовський, С. П. Самійленко, І. М. Коломієць, І. В. Кондратюк,
А. В. Степанюгін, 1994

(TMC) — «Aldrich». Розчинники висушували над молекулярними ситами 0,4 та 0,5 м фірми «Serva».

Утворення комплексів та їх структуру вивчали за допомогою диференційних спектрів ультрафіолетового (УФ) поглинання, що реєструвалися на спектрофотометрі MPS-2000 («Shimadzu», Японія), як у роботі [6], інфрачервоних спектрів (ІЧ) поглинання, отриманих за допо-

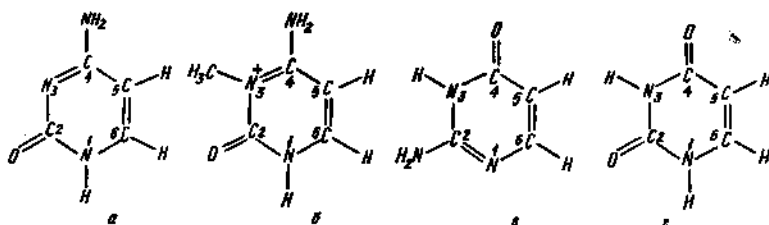


Рис. 1. Структурні формули: Cyt (а), m^3 Cyt (б), isoCyt (в), урацилу (г)

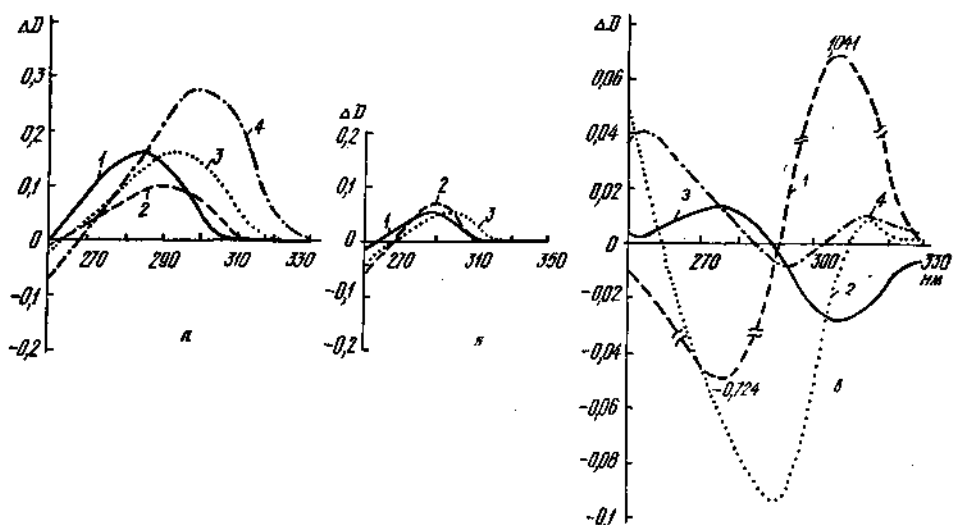


Рис. 2. УФ диференційні спектри цитозину та його похідних в суміші з ас-Asp: а — Cyt (1), m^3 Cyt (2), m^5 Cyt (3), $m^{2,5}$ Cyt (4); б — С (1), dC (2), m^5 dC (3); в — в суміші з NaAc m^3 Cyt (1), isoCyt (2) та в суміші з ас-Asp m^3 Cyt (3), isoCyt (4). Концентрації основ та нуклеозидів 10^{-3} М, лігандів — 10^{-2} М

могою спектрометра Specord M80 («Carl Zeiss», Німеччина), та спектрів протонного магнітного резонансу (ПМР), отриманих на спектрометрі Gemini 200 («Varian», США).

Результати та обговорення. В наших попередніх роботах [1, 2] було показано, що серед незаміщених нуклеотидних основ один лише Cyt здатний утворювати в ДМСО комплекси з нейтральною карбоксильною групою амінокислот. За допомогою спектроскопії ЯМР на ядрах ^{13}C встановлено, що Cyt утворює в розчині з ас-Asp комплекс з переносом протона від карбоксильної групи амінокислоти на атом N3 основи [7], котрий має місце і в твердофазному комплексі з N-формілгліцином [5]. Як і незаміщена основа, похідні m^4 Cyt, m^3 Cyt, $m^{2,5}$ Cyt практично не взаємодіють з іонізованою карбоксильною групою (карбоксилат-іоном), а для нуклеозидів С, dC, m^5 dC спостерігається лише неспецифічна взаємодія з протонами гідроксильних груп рибози та дезоксирибози. Про утворення комплексів з нейтральною карбоксильною групою свідчать поява УФ диференційних спектрів вказаних похідних Cyt в суміші з ас-Asp (рис. 2, а, б), а також дані спектрів ПМР (табл. 1). Значні зсуви сигналів аміногрупи основи в бік слабких полів свідчать про втягнення останньої у водневий зв'язок. Зникнення в спектрі ПМР суміші сигналу 12,53 м. ч. протонів карбоксильних груп COOH ас-Asp вказує

Таблиця I

Хімізсуви протонів піримідинових основ і нуклеозидів та їх зміни (Δ) в еквімолярних сумішах з NaAc і ac-Asp в ДМСО (концентрації 30 мМ) в м. ч. відносно ТМС

Сполука	Ізольована	В суміші з			
		NaAc	Δ	ac-Asp	Δ
Cyt					
N1H	10,390	10,510	+0,120	дуже широкий	
NH ₂	7,033	7,037	+0,004	7,270	+0,237
C5H	5,559	5,570	+0,011	5,606	+0,047
C6H	7,316	7,327	+0,011	7,368	+0,052
m ¹ Cyt					
NH ₂	6,929	6,972	+0,043	7,070	+0,141
C5H	5,608	5,622	+0,014	5,633	+0,025
C6H	7,561	7,560	-0,001	7,587	+0,026
CH ₃	3,193	3,193	0	3,204	+0,011
m ⁵ Cyt					
N1H	10,265	10,380	+0,115	—	—
NH ₂	6,650	6,676	+0,026	7,100	+0,450
C6H	7,157	7,172	+0,015	7,249	+0,092
CH ₃	1,787	1,788	+0,001	1,820	+0,033
m ₂ ^{1,5} Cyt					
NH ₂	6,820	6,837	+0,017	7,014	+0,194
C5H ₃	1,801	1,798	-0,003	1,820	+0,019
C1H ₃	3,180	3,179	-0,001	3,191	+0,011
C6H ₃	7,427	7,427	0	7,466	+0,039
m ³ Cyt-HCl					
N1H	10,200	—	—	10,140	-0,060
N4H	—	—	—	—	—
C5H	6,178	5,671	-0,507	6,173	-0,005
C6H	7,752	7,619	-0,133	7,753	+0,001
CH ₃	3,335	3,265	-0,070	3,336	+0,001
IsoCyt					
N3H	10,790	—	—	12,020**	—
NH ₂	6,539	7,447*	+0,908	6,560	+0,021
C5H	5,497	5,395	-0,102	5,506	+0,009
C6H	7,516	7,447	-0,069	7,520	+0,004
Ura					
N1H	10,824	—	широкий	10,923	-0,001
N3H	11,020	—	→	11,019	-0,001
C5H	5,450	5,400	-0,050	5,450	0
C6H	7,395	7,420	+0,025	7,395	0
m ¹ Ura					
N3H	11,210	11,240	+0,030	11,210	0
C5H	5,513	5,506	-0,007	5,511	-0,002
C6H	7,609	7,604	-0,005	7,704	-0,005
CH ₃	3,217	3,215	-0,002	3,217	0
chx ¹ Ura					
N3H	11,216	11,260	+0,044	11,227	+0,011
C5H	5,548	5,593	-0,005	5,551	+0,005
C6H	7,724	7,719	-0,005	7,729	-0,005
m ³ Ura					
N1H	11,115	—	—	11,122	+0,007
C5H	5,591	5,570	-0,081	5,592	+0,001
C6H	7,435	7,460	+0,025	7,436	+0,001
CH ₃	3,112	3,100	-0,012	3,112	0
Thy					
N3H	10,998	—	широкий	11,002	+0,004
N1H	10,591	—	→	10,589	-0,002
C6H	7,252	7,275	+0,023	7,251	-0,001
CH ₃	1,725	1,719	-0,006	1,725	0
m ¹ Thy					
N3H	11,231	11,250	+0,019	11,233	+0,002
C6H	7,505	7,502	-0,003	7,504	-0,001
C1H ₃	1,734	1,733	-0,001	1,733	-0,001
C5H ₃	3,187	3,186	-0,001	3,187	0
C					
NH ₂	7,130	7,120	-0,010	7,200	+0,070
C5H	5,699	5,698	-0,001	5,712	+0,013
C6H	7,834	7,862	+0,028	7,849	+0,015
dC					
NH ₂	7,094	7,110	+0,006	7,180	+0,086
C5H	5,704	5,711	+0,005	5,721	+0,017
C6H	7,780	7,799	+0,019	7,797	+0,017

Сполука	Ізольована	В суміші з			
		NaAc	Δ	ac-Asp	Δ
m^5dC					
NH ₂	6,995	6,992	-0,003	7,080	+0,085
C6H	7,604	7,628	+0,024	7,627	+0,023
CH ₃	1,823	1,826	+0,003	1,826	+0,003
U					
N3H	11,299	—	—	11,299	0
C5H	5,638	5,608	-0,030	5,635	-0,003
C6H	7,880	7,889	+0,009	7,880	0
dU					
N3H	11,277	—	—	11,277	0
C5H	5,629	5,680	-0,021	5,626	-0,003
C6H	7,846	7,858	+0,012	7,843	-0,003
$m_2^{1,3}Ura$					
C5H	5,668	5,665	-0,003	5,667	-0,001
C6H	7,678	7,679	+0,001	7,675	-0,003
C1H ₃	3,292	3,293	+0,001	3,292	0
CH ₃ (3)	3,152	3,152	0	3,153	+0,001
T					
N3H	11,262	—	—	11,264	+0,002
C6H	7,691	7,712	+0,021	7,689	-0,002
CH ₃	1,768	1,765	-0,003	1,771	+0,003
rT(m^3U)					
N3H	11,280	—	—	11,289	+0,009
C6H	7,727	7,740	+0,013	7,730	+0,003
CH ₃	1,768	1,762	-0,006	1,768	0

* Сигнал амінопротонів співпадає із сигналом протону C6H; ** середньоарифметичне значення хімізсувів OH протонів двох карбоксильних груп ac-Asp 12, 53 м. ч. та протону N3H isoCyt як наслідок їх обміну.

Таблиця 2

Взаємодія піримідинових основ та нуклеозидів з двома формами карбоксильної групи в безводному DMCO

Основа	Комплекс з		Нуклеозид	Комплекс з	
	NaAc	ac-Asp		NaAc	ac-Asp
Cyt	—	Перенос протона (на N3)	C	—	Два Н-зв'язки (N3 та NH ₂)
m'Cyt	—	Два Н-зв'язки (N3 та NH ₂)	dC	—	Два Н-зв'язки (N3 та NH ₂)
m ⁵ Cyt	—	Два Н-зв'язки (N3 та NH ₂)	m ⁵ dC	—	Два Н-зв'язки (N3 та NH ₂)
m ³ CytHCl	Перенос протона (від N1H чи N4H)	Слабкий			
isoCyt	Два Н-зв'язки (NH ₂ та N3H)	Слабкий			
Ura	Один Н-зв'язок (N1H чи N3H)	—			
m ¹ Ura	Слабкий	—	U	Один Н-зв'язок (N3H)	—
chl ¹ Ura	Слабкий	—	dU	Один Н-зв'язок (N3H)	—
m ³ Ura	Один Н-зв'язок (N1H)	—			
$m_2^{1,3}Ura$	—	—			
Thy	Один Н-зв'язок (N1H чи N3H)	—			
m ¹ Thy	Слабкий	—	T	Один Н-зв'язок (N3H)	—
			rT	Один Н-зв'язок (N3H)	—

на участь цих протонів в утворенні комплексів. Очевидно, як і у випадку Cyt, вищезгадані похідні утворюють водневозв'язані комплекси з карбоксильною групою через два водневі зв'язки: протон ОН амінокислоти з атомом N3 цитозину і протон аміногрупи основи з атомом кисню групи C=O. Аналіз даних УФ та спектроскопії ПМР свідчить, що метилювання як основи, так і нуклеозиду в положенні С5 не змен-

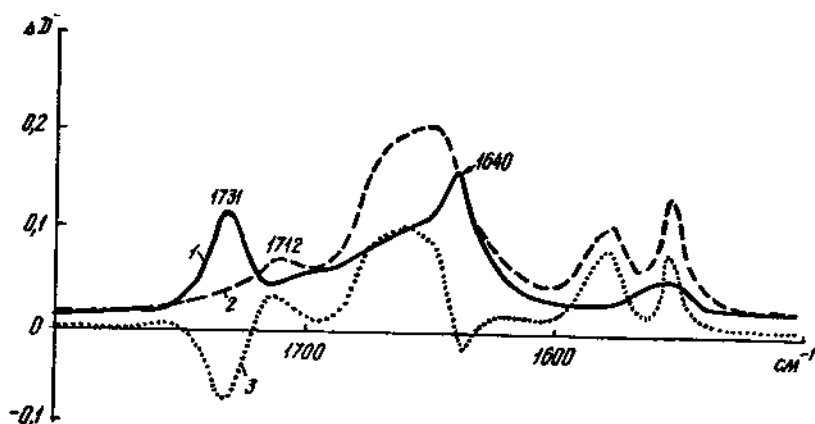


Рис. 3. ІЧ спектри $m^3\text{Cyt}$ (1), його еквімолярної суміші з NaAc (2), диференційний спектр (3). Концентрація 10^{-2} М

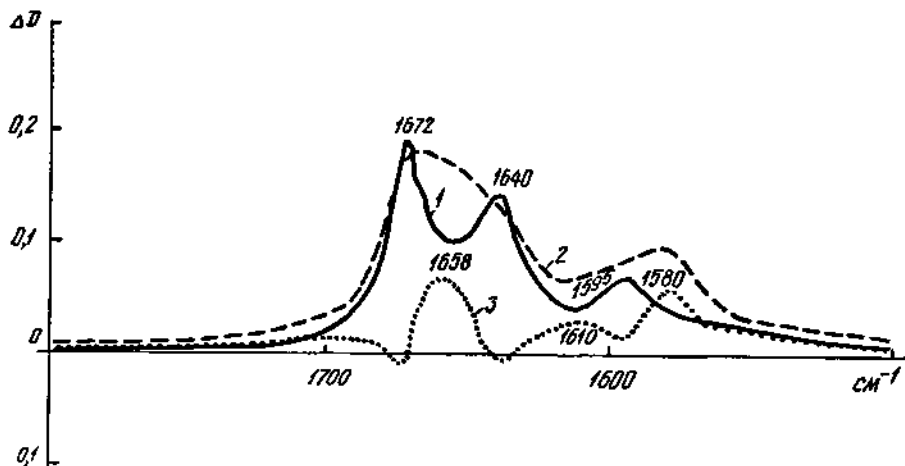


Рис. 4. ІЧ спектри $iso\text{Cyt}$ (1), його еквімолярної суміші з NaAc (2), диференційний спектр (3). Концентрація 10^{-2} М

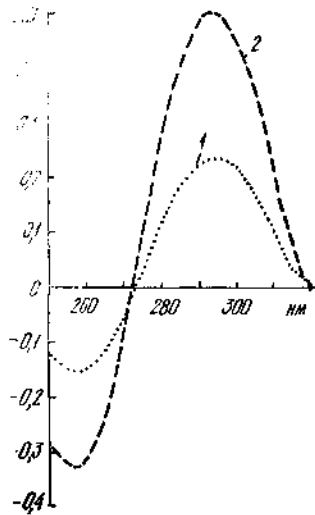
шує комплексоутвірної здатності, в той час як заміщення в положенні N1 відчутно її знижує, причому ефект посилюється при переході від метилпохідних до нуклеозидів. На жаль, ІЧ спектроскопія для комплексів перелічених похідних з неіонізованою карбоксильною групою виявилася малоінформативною через перекривання смуг поглинання валентних коливань карбонільних зв'язків ас-Asp та похідних Cyt.

Протилежною є специфічність взаємодії $m^3\text{Cyt}$ та $iso\text{Cyt}$ з двома формами карбоксильної групи: для обох сполук спостерігається сильна взаємодія з карбоксилат-іоном та незначна — з нейтральною карбоксильною групою. Утворення комплексів з NaAc супроводжується появою інтенсивного диференційного УФ поглинання (рис. 2б), значними змінами в спектрах ПМР (табл. 1) та ІЧ спектрах (рис. 3 і 4).

Хоча в рамках отриманих нами спектроскопічних даних не можна з певністю встановити структуру $m^3\text{Cyt}$, тобто вирішити питання щодо існування його в ДМСО в аміно- чи іміноформі, кардинальні зміни ІЧ спектру в присутності NaAc (рис. 3) — сильне зниження інтенсивності смуги $\nu(\text{C}=\text{O})=1731\text{ см}^{-1}$ та поява значного додаткового поглинання біля 1712 см^{-1} та в інтервалі $1675\text{—}1650\text{ см}^{-1}$, — а також значні зсуви

сигналів протонів C5H і C6H в бік сильного поля можуть бути інтерпретовані як такі, що вказують на депротонування основи.

В ІЧ спектрі isoCyt (рис. 4), котрий (завдяки тому, що аміно- та карбоксильна групи помінялися місцями в порівнянні з Cyt) структурно подібний до піримідинового кільця гуаніну, в еквімолярній суміші з



NaAc зменшується інтенсивність смуги валентного коливання карбонільної групи $\nu(\text{C}=\text{O}) = 1672 \text{ cm}^{-1}$ та смуги ножичного коливання аміногрупи $\alpha(\text{NH}_2) = 1640 \text{ cm}^{-1}$, участь якої у водневому зв'язку зумовлює появу нового додаткового поглинання в області 1660 cm^{-1} . Участь іміногрупи N3H у водневому зв'язку з карбоксилат-іоном зумовлює також виникнення нового поглинання біля 1610 cm^{-1} (котре видно на диференційному спектрі), що відповідає зміщеному на 15 cm^{-1} до високих частот деформаційному коливанню $\beta(\text{N3H})$ із вкладом валентних коливань кільця. З таким трак-

Рис. 5. УФ диференційний спектр Ura (1), $m^3\text{Ura}$ (2) в суміші з NaAc. Концентрації основ 10^{-3} M , піганда 10^{-2} M .

туванням ІЧ даних узгоджується зсув сигналу аміногрупи на $0,908 \text{ м. ч.}$ в бік слабого поля (табл. 1), а сигнал протона N3H не спостерігається в спектрі ПМР, очевидно, через значне поширення внаслідок утво-

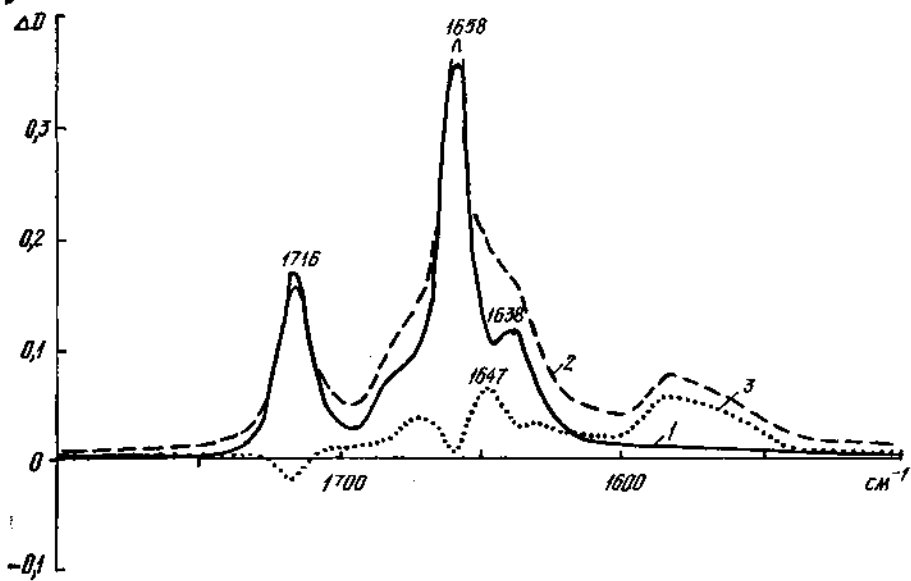


Рис. 6. ІЧ спектри $m^3\text{Ura}$ (1), його еквімолярної суміші з NaAc (2), диференційний спектр (3). Концентрація 10^{-2} M .

рення сильного водневого зв'язку. Отже, подібно до гуаніну [1, 2], isoCyt взаємодіє з карбоксилат-іоном через два водневі зв'язки із залученням аміно- та імінопротонів.

Дані УФ, ІЧ спектроскопії та ПМР свідчать про те, що вивчені нами похідні урацилу та тиміну не взаємодіють з нейтральною карбоксильною групою ас-Asp. Заміщення атома водню в положенні N1 цих основ суттєво зменшує їх здатність взаємодіяти з карбоксилат-іоном, що підтверджує аналіз спектрів ПМР (табл. 1). УФ спектри, як і ІЧ, виявились неінформативними. Лише у випадку $m^3\text{Ura}$ утворення комп-

лексу з карбоксилат-іоном рееструвалося не тільки за допомогою спектрів ПМР (табл. 1), а й супроводжувалося появою інтенсивного диференційного УФ спектру (рис. 5) та певними змінами в ІЧ спектрі (рис. 6): зменшення інтенсивності смуги 1716 см^{-1} , віднесеної нами до валентних коливань групи $\text{C}=\text{O}$, сусідньої з іміногрупою $\text{N}=\text{H}$, котра, вступаючи у водневий зв'язок з карбоксилат-іоном, зумовлює нове подовження з максимумом 1647 см^{-1} .

У випадку $m_2^{1,3}\text{Uga}$ не спостерігалось жодних ознак взаємодії як з нейтральною, так і з депротонованою карбоксильною групою.

Таким чином, аналіз даних попередніх досліджень [1, 2] вкупі з результатами цієї роботи свідчить на користь значно більшої ролі групи $\text{N}=\text{H}$ порівняно до групи $\text{N}3\text{H}$ у взаємодії в ДМСО урацилу і тиміну з іонізованою карбоксильною групою. Проте слід зауважити, що у випадку нуклеозидів за допомогою методу ПМР спостерігалась конкуренція за водневий зв'язки з карбоксилат-іоном з боку груп OH глікозидного фрагменту.

Підсумки вивчення взаємодії піримідинових основ та нуклеозидів з обома формами карбоксильної групи наведено в табл. 2. З неї наочно видно, що карбоксильна група амінокислот може однозначно відрізнити цитозин від тиміну та урацилу. При цьому специфічно впізнаються як вільні основи, так і основи у складі нуклеозидів, а також їх різноманітні похідні.

N. V. Zheltovsky, S. A. Samoilenko, I. N. Kolomiets, I. V. Kondratyuk, A. V. Stepanyugin
INTERACTIONS OF METHYL AND GLYCOSYL DERIVATIVES
OF PYRIMIDINE NUCLEOTIDE BASES WITH AMINO ACID CARBOXYLIC GROUP

Summary

By UV, IR spectroscopies and PMR interactions of a number of methyl and glycosyl derivatives of pyrimidine bases with amino acid carboxylic group in DMSO were studied as a model of probable point contacts in real nucleoprotein complexes. It was found that like the unsubstituted base 1-methylcytosine, 5-methylcytosine, 1,5-dimethylcytosine, cytidine, deoxycytidine, 5-methyldeoxycytidine form complexes with a neutral carboxylic group, and 3-methylcytosine and isocytosine interact with deprotonated carboxylic group (carboxylate ion). Like free thymine and uracil, their derivatives 1-methylthymine, 1-methyluracil, 3-methyluracil, thymidine, uridine, 5-methyluridine, deoxyuridine interact only with carboxylate ion. Analysis of the results obtained and the data of previous works points out the ability of amino acid carboxylic group to differentiate between cytosine and thymine (uracil), and between their nucleosides and derivatives as well.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Zheltovsky N. V., Samoilenko S. A., Kolomiets I. N. et al. Some structural aspects of protein-nucleic acid recognition point mechanisms involving amino acid carboxylic groups // *J. Mol. Struct.*—1989.—15.— P. 15—26.
2. Желтовський М. В., Самійленко С. П., Коломієць І. М., Кондратюк І. В. Взаємодія нуклеотидних основ з карбоксильною групою амінокислот в ДМСО: модель точкових білково-нуклеїнових контактів // *Доп. АН УРСР. Сер. Б.*—1988.— № 8.— С. 68—71.
3. Kolomiets I. N., Kondratyuk I. V., Stepanyugin A. V. et al. Influence of methylation of nucleic acid purine bases on their interactions with amino acids through the carboxylic group // *J. Mol. Struct.*—1991.— 250.— P. 1—11.
4. Желтовський М. В., Самійленко С. П., Коломієць І. М. та ін. Дослідження взаємодії желтоксантину, ксантину та їх метил- та глікозилпохідних з карбоксильною групою амінокислот спектроскопічними методами // *Біополімери і клітина.*—1993.—9, № 3.— С. 72—77.
5. Желтовський М. В., Самійленко С. П., Губайдулін М. І., Кондратюк І. В. Коливальний спектр і структура комплексу цитозину з N-формілгліцином у твердій фазі // *Доп. АН УРСР, Сер. Б.*—1988.— № 5.— С. 72—75.
6. Гульгяев А. П., Самойленко С. А., Желтовский Н. В. Спектроскопическое изучение взаимодействий между нуклеотидными основаниями и эфирами аминокислот в диметилсульфоксиде // *Молекуляр. биология.*—1981.— № 6.— С. 1295—1302.
7. Кондратюк И. В., Коломиец И. Н., Самойленко С. А., Желтовский Н. В. Изучение комплексов цитозина с карбоксильной группой аминокислот методом спектроскопии ЯМР // *Биополимеры и клетка.*—1989.—5, № 6.— С. 21—25.

Ін-т молекуляр. біології і генетики НАН України, Київ

Одержано 25.07.94