



Структура и функция биополимеров

УДК 543.422.4+543.422.6+543.422.25+577.323.23

Н. В. Желтовский, С. А. Самойленко,
И. Н. Коломиец, И. В. Кондратюк, А. В. Степанюгин

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГИПОКСАНТИНА, КСАНТИНА И ИХ МЕТИЛ- И ГЛИКОЗИЛПРОИЗВОДНЫХ С КАРБОКСИЛЬНОЙ ГРУППОЙ АМИНОКИСЛОТ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ *

Исследовано взаимодействие в DMSO некоторых метил- и гликозилпроизводных гипоксантина и ксантина с ионизированной и нейтральной карбоксильной группой аминокислот. Установлено, что с ионизированной карбоксильной группой взаимодействуют гипоксантин, инозин, ксантин, 3-метилксантин и 9-метилксантин. В последнем случае происходит перенос протона от основания к карбоксилат-иону. Метилирование атома N7 нуклеозидов ксантина и гипоксантина приводит к возникновению способности взаимодействовать с нейтральной карбоксильной группой. Слабое взаимодействие с нейтральной карбоксильной группой наблюдается и для 9-метилксантина. 1-Метилинозин индифферентен к обеим формам карбоксильной группы.

Введение. Изучение физико-химических механизмов белково-нуклеинового узнавания в модельных системах является необходимым этапом на пути к пониманию специфичности образования реальных комплексов биополимеров. Подходящей моделью для таких исследований служат комплексы между нуклеотидными основаниями (или их производными) и аминокислотами (или веществами, моделирующими боковые радикалы аминокислот) [1]. Взаимодействие нуклеотидных оснований с карбоксильной группой (одной из наиболее активных групп аминокислотных остатков с точки зрения комплексообразования) исследовалось ранее в диметилсульфоксиде с примесью воды [2, 3], а также в безводном диметилсульфоксиде [1, 4, 5].

Особую роль в тонких механизмах белково-нуклеинового взаимодействия играют минорные основания (нуклеозиды, нуклеотиды) разной структуры, прежде всего метилпроизводные оснований. Они определяют образование уникальных структур и функционирование полинуклеотидов, обладают фармакологическими свойствами. Влияние метилирования аденина и гуанина на специфичность их взаимодействия с карбоксильной группой аминокислот исследовано в работе [6]. В данной статье представлены результаты изучения взаимодействия в безводном диметилсульфоксиде ряда метил- и гликозилпроизводных гипоксантина и ксантина (рис. 1) с нейтральной и ионизированной карбоксильной группой аминокислот. При этом следует отдельно отметить терапевтическое действие выбранных объектов. Метилпроизводные ксантина имеют противовоспалительные и бронхоспазмолитические свойства. Известен терапевтический эффект препаратов инозина при ишемии

* Работа финансировалась Государственным комитетом Украины по вопросам науки и технологий.

миокарда, он входит в состав иммуномодулирующих комплексов, есть сообщение о лечебном действии его препаратов в случае заражения вирусом иммунодефицита человека.

Материалы и методы. В работе использовали такие реактивы: ксантин (Xan), 3-метилксантин (m^3 Xan), 9-метилксантин (m^9 Xan), гипоксантин (Hyp), диметилсульфоксид (DMSO) — фирмы «Fluka» (Швейцария); N-ацетиласпарагиновая кислота (ac-Asp), 7-метилксантозин (m^7 X), 1-метилюнозин (m^1 I) — «Serva» (Германия); 2'-дезоксидеозин (dI), тетраметилсилан (TMS) — «Aldrich» (США); инозин (I) — «Reanal» (Венгрия); ацетат натрия (NaAc) — «Реахим» (РФ); дейтерированный диметилсульфоксид (DMSO-d6) — «Изотоп» (РФ). Растворители DMSO и DMSO-d6 вы-

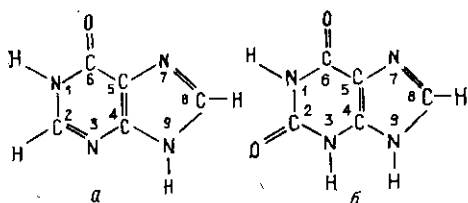


Рис. 1. Структурные формулы гипоксантина (а) и ксантина (б).

сушивали над молекулярными ситами (0,4 и 0,5 м) фирмы «Serva».

Взаимодействие перечисленных оснований и нуклеозидов с нейтральной карбоксильной группой изучали в их смесях с ac-Asp, а ионизированную карбоксильную группу (карбоксилат-ион) моделировали

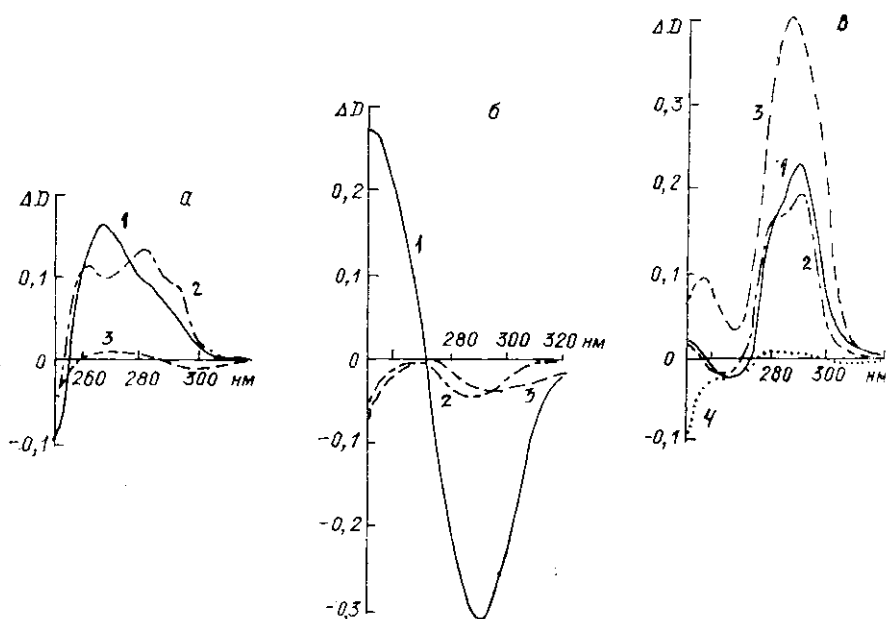


Рис. 2. Дифференциальные УФ спектры смесей: а — Hyp (1), dI (2), m^1 I (3) с NaAc; б — m^1 I (1), m^3 Xan (2), m^7 X (3) с ac-Asp; в — Xan (1), m^3 Xan (2), m^9 Xan (3), m^7 X (4) с NaAc. Концентрации оснований и нуклеозидов 0,5 мМ, NaAc и ac-Asp — 5 мМ

ацетатом натрия, как в работах [1, 2, 4—6], поскольку динатриевая соль ac-Asp слабо растворяется в DMSO. Образование комплексов фиксировали с помощью ультрафиолетового (УФ) дифференциального поглощения, их структуры определяли, основываясь на изменениях в спектрах протонного магнитного резонанса (ПМР) и инфракрасных (ИК) спектрах поглощения. Дифференциальные УФ спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре MPS-2000 («Shimadzu», Япония) по методике работы [7]. Для получения ИК спектров использовали кюветы CaF_2 толщиной 0,1 мм, спектры регистрировали на спектрометре Specord M80 («Carl Zeiss», Германия). Спектры ПМР получали на

спектрометре Gemini-200 («Varian», США), ампулы диаметром 5 мм; химический сдвиг резонансов протонов приводится в миллионных долях (м. д.) относительно TMS как внутреннего стандарта. При интерпретации ИК спектров ориентировались на данные работы [8], в спектрах ПМР сигналы относили с учетом результатов работ [9—11].

Результаты и обсуждение. Взаимодействие гипоксантиновых производных с карбоксильной группой. Появление дифференциального УФ спектра (рис. 2, а) гипоксантина в смеси с NaAc свидетельствует о его взаимодействии с карбоксилат-ионом. В ИК спектре эквимольной смеси гипоксантина с NaAc (рис. 3) за-

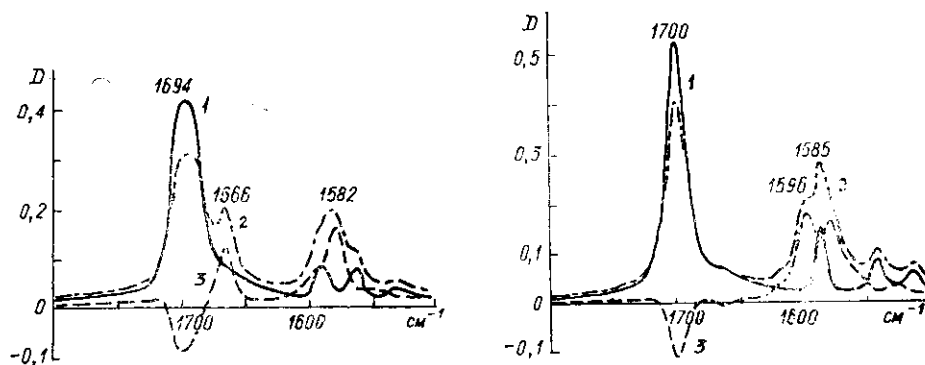


Рис. 3. ИК спектры 30 мМ Нур (1), его эквимольной смеси с NaAc (2), дифференциальный спектр смеси относительно основания (3)

Рис. 4. ИК спектры 30 мМ dI (1), его эквимольной смеси с NaAc (2), дифференциальный спектр смеси относительно нуклеозида (3)

метно снижается интенсивность полосы валентных колебаний его карбоксильной группы $\nu(\text{C}=\text{O})=1694 \text{ см}^{-1}$, что, очевидно, связано с вовлечением в водородную связь с карбоксилат-ионом иминогруппы NH, соседней с группой $\text{C}=\text{O}$ (нумерацию атомов в изученных молекулах см. на рис. 1). Исчезновение в спектре ПМР сигналов NH и N9H с химсдвигами 12,23 и 13,30 м. д. указывает на участие в формировании комплекса не только группы NH, но и группы N9H, при этом сигналы соседних с иминогруппами протонов C2H и C8H сдвигаются в сторону сильных полей на 0,213 и 0,121 м. д. соответственно (табл. 1).

Четкие доказательства взаимодействия с карбоксилат-ионом сохраняются и при переходе от основания к нуклеозиду. В случае dI образование комплекса также подтверждается появлением УФ дифференциального поглощения его смеси с NaAc (рис. 1, а), уменьшением интенсивности полосы $\nu(\text{C}=\text{O})=1700 \text{ см}^{-1}$ и появлением новой полосы 1596 см^{-1} в ИК спектре (рис. 4), которая, очевидно, является смещенной в сторону высоких частот (вследствие образования водородной связи) полосой деформационных колебаний иминогруппы NH с участием валентных колебаний кольца 1586 см^{-1} . Как и для незамещенного основания, в спектре ПМР при образовании комплекса с карбоксилат-ионом исчезает сигнал протона NH с химсдвигом 12,37 м. д., а сигналы протонов C2H и C8H сдвигаются в сторону сильных полей на 0,10 и 0,045 м. д. (табл. 1). Аналогичные спектральные проявления образования комплекса с NaAc характерны и для рибозида гипоксантина — инозина.

С помощью использованных методов не наблюдалось взаимодействия гипоксантина и его незамещенных нуклеозидов с нейтральной карбоксильной группой.

Метилирование атома N7 инозина приводит к инверсии специфичности его взаимодействия с карбоксильной группой: сильно снижается его способность взаимодействовать с карбоксилат-ионом и возникает способность образовывать комплексы с нейтральной карбоксильной

группой. Смесь m^7I с ас-Asp дает интенсивный дифференциальный УФ спектр (рис. 2, б), в ИК спектре (рис. 5) наблюдаются существенные изменения, для интерпретации которых требуются дополнительные исследования. В ПМР спектре сигналы протонов C2H и C8H сдвигаются в сторону слабых полей на 0,23 и 0,20 м. д. соответственно (табл. 2), что указывает на вероятное протонирование m^7I в составе комплекса. Замещение в инозине атома водорода, связанного с атомом N1, метильной группой делает его неспособным к взаимодействию с карбоксильной группой как в нейтральном, так и в ионизированном состоянии.

Взаимодействие ксантиновых производных с карбоксильной группой. О взаимодействии незамещенного

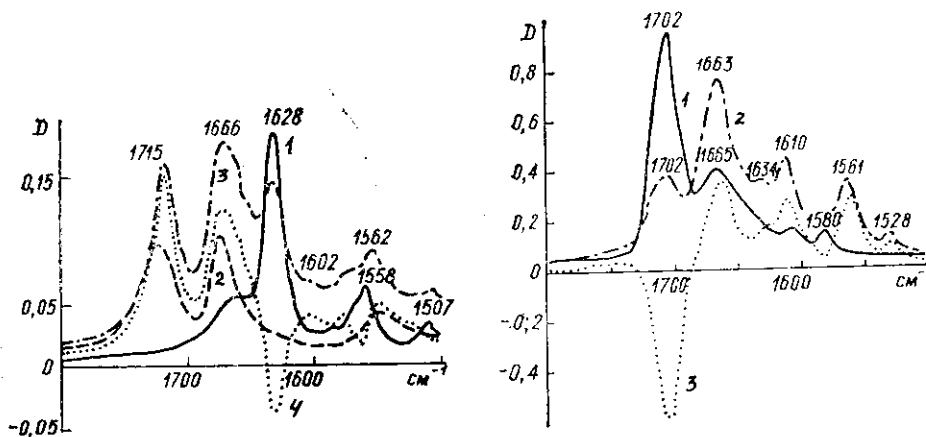


Рис. 5. ИК спектры 10 мМ m^7I (1), 10 мМ ас-Asp (2), их смеси (3), дифференциальный спектр смеси относительно нуклеозида (4)

Рис. 6. ИК спектры 30 мМ m^9Xap (1), его эквимольной смеси с NaAc (2), дифференциальный спектр смеси относительно основания (3)

ксантина с карбоксилат-ионом свидетельствуют интенсивный дифференциальный УФ спектр его смеси с NaAc (рис. 2, в), исчезновение сигналов трех иминопротонов—N1H, N3H и N9H, а также сдвиг в сторону сильных полей резонанса протона C8H на 0,389 м. д. (табл. 1). В ИК

Таблица 1

Химические сдвиги протонов ксантина, гипоксантина, их производных и изменения химических сдвигов (Δ) в эквимольных смесях с NaAc в DMSO (концентрации 10 мМ) в м. д. относительно TMS как внутреннего стандарта

Соединение Протон	Изолиро- ванное	В смеси с NaAc	Δ	Соединение Протон	Изолиро- ванное	В смеси с NaAc	Δ
Xap				Hyp			
N1H	10,83	—	—	N1H	12,23	—	—
N3H	11,53	—	—	N9H	13,30	—	—
N9H	13,26	—	—	C2H	8,115	7,902	-0,213
C8H	7,928	7,539	-0,389	C8H	7,971	7,850	-0,121
m^3Xap				I			
N1H	11,09	10,30	-0,79	N1H	12,41	—	—
N9H	13,49	—	—	C2H	8,344	8,233	-0,111
C8H	8,010	7,416	-0,594	C8H	8,078	8,024	-0,054
m^9Xap				m^4I			
N1H	10,75	9,08	-1,67	C2H	8,421	8,415	-0,006
N3H	11,92	—	—	C8H	8,349	8,351	+0,002
C8H	7,610	7,319	-0,291	m^7I			
m^7X				N1H	—	—	—
N1H	10,14	10,13	-0,01	C2H	8,031	8,028	-0,003
N3H	—	—	—	C8H	9,302	9,365	+0,063
C8H	9,003	9,071	+0,068	dI			
				N1H	12,37	—	—
				C2H	8,310	8,210	-0,100
				C8H	8,063	8,017	-0,046

спектре несколько снижается интенсивность широкой полосы $\sim 1700 \text{ см}^{-1}$, обусловленной валентными колебаниями карбонильных групп, вследствие влияния водородных связей, образовавшихся имино-группами.

Образование комплекса $m^3\text{Xap}$ с карбоксилат-ионом сопровождается появлением интенсивного дифференциального УФ спектра (рис. 2, в) и снижением интенсивности широкой ИК полосы $\sim 1700 \text{ см}^{-1}$ валентных колебаний карбонильных групп. В спектре ПМР сигнал протона N9H исчезает, а сигналы протонов N1H и C8H смещаются в сторону сильных полей на 0,79 и 0,594 м. д. соответственно, что указывает на значительный вклад депротонированного состояния основания (отрыв протона N9H) в комплексе с ионизированной карбоксильной группой.

Взаимодействие $m^9\text{Xap}$ с NaAc обуславливает возникновение очень интенсивного дифференциального УФ поглощения и кардинальные изменения в ИК спектре: сильно уменьшается интенсивность полосы $\nu(\text{C}=\text{O}) = 1702 \text{ см}^{-1}$, возникает новая интенсивная полоса 1665 см^{-1} , а также исчезает полоса антисимметричного валентного колебания группы $-\text{COO}^-$ ацетата натрия 1580 см^{-1} (рис. 6), что свидетельствует о переходе протона от основания к карбоксилат-иону. Этот вывод подтверждается данными ПМР. В спектре смеси $m^9\text{Xap}$ с NaAc отсутствует сигнал протона N3H, а резонансы протонов N1H и C8H смещены соответственно на 1,67 и 0,291 м. д. в сторону сильных полей (табл. 1).

С помощью использованных методов заметного взаимодействия Xap и $m^3\text{Xap}$ с нейтральной карбоксильной группой не установлено. Незначительное взаимодействие $m^9\text{Xap}$ с нейтральной карбоксильной группой проявляется только в возникновении слабого дифференциального УФ поглощения в его смеси с ac-Asp (см. рис. 2, б).

Метилирование атома N7 ксантина и замещение протона N9H рибозой сильно подавляют его взаимодействие с карбоксилат-ионом, о чем свидетельствуют очень слабый УФ дифференциальный спектр смеси $m^7\text{X}$ с NaAc (рис. 2, в) и небольшой слабопольный сдвиг сигнала протона C8H (табл. 1). Слабое взаимодействие с нейтральной карбоксильной группой обнаруживается по возникновению слабого дифференциального УФ спектра (рис. 2, б), а также по незначительным слабопольным сдвигам протонов N1H и C8H (табл. 2).

Таблица 2

Химические сдвиги протонов ксантина, гипоксантина, их производных и изменения химических сдвигов (Δ) в эквимолярных смесях с ac-Asp в DMSO (концентрации 10 мМ) в м. д. относительно TMS как внутреннего стандарта

Соединение Протон	Изолиро- ванное	В смеси с ac-Asp	Δ	Соединение Протон	Изолиро- ванное	В смеси с ac-Asp	Δ
Xap				Пуp			
N1H	10,83	10,84	+0,01	N1H	12,22	12,23	+0,01
N3H	11,53	11,52	-0,01	N9H	13,25	13,30	+0,05
N9H	13,26	13,35	+0,09	C2H	8,111	8,119	+0,008
C8H	7,928	7,932	+0,004	C8H	7,969	7,975	+0,006
$m^3\text{Xap}$				I			
N1H	11,09	11,11	+0,02	N1H	12,41	12,41	0
N9H	13,49	13,51	+0,02	C2H	8,344	8,344	0
C8H	8,010	8,021	+0,011	C8H	8,078	8,077	-0,001
$m^4\text{Xap}$				$m^4\text{I}$			
N1H	10,75	10,77	+0,02	C2H	8,421	8,422	+0,001
N3H	11,92	11,93	+0,01	C8H	8,349	8,351	+0,002
C8H	7,610	7,615	+0,005	$m^7\text{I}$			
$m^7\text{X}$				N1H	—	—	—
N1H	10,14	10,20	+0,06	C2H	8,031	8,260	+0,229
N3H	—	—	—	C8H	9,302	9,506	+0,204
C8H	9,003	9,018	+0,015	dI			
				N1H	12,37	12,39	+0,002
				C2H	8,310	8,312	+0,002
				C8H	8,063	8,065	+0,002

Итак, установлено, что подобно незамещенным пуриновым основаниям нуклеиновых кислот аденину и гуанину [1] гипоксантин и ксантин взаимодействуют с ионизированной карбоксильной группой аминокислот. При замещении атома водорода, связанного с гликозидным атомом азота, карбоксилат-ион по-разному связывается с производными гипоксантина и ксантина. В случае дезоксиинозина (инозина) водородная связь осуществляется через иминогруппу N1H (m^4I не способен к комплексообразованию с карбоксилат-ионом), а m^9Xap образует сильный комплекс с переносом протона N3H на карбоксилат-ион, вследствие чего укрепляется связь N1H.

Метилирование атома N7 нуклеозидов гипоксантина и ксантина приводит к возникновению способности взаимодействовать с нейтральной карбоксильной группой: m^7I формирует сильный комплекс, а m^7X — слабый. С карбоксилат-ионом они образуют водородные связи через протоны C8H.

Summary. The interactions of some methyl and glycosyl derivatives of hypoxanthine and xanthine with ionized and neutral amino acid carboxylic group were investigated in dimethylsulfoxide. It was established that ionized carboxylic group forms complexes with hypoxanthine, inosine, xanthine, 3-methylxanthine and 9-methylxanthine. In the last case the proton transfer occurs from the base to carboxylate-ion. The methylation of hypoxanthine and xanthine nucleosides at N7 atoms results in their ability to interact with a neutral carboxylic group. The weak interaction with neutral carboxylic group was observed in the case of 9-methylxanthine. 1-Methylxanthine proved to be indifferent to the two forms of carboxylic group.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zheltovsky N. V., Samoilenko S. A., Kolomiets I. Some structural aspects of protein-nucleic acid recognition point mechanisms involving amino acid carboxylic groups // *J. Mol. Struct.*—1989.—15.—P. 15—26.
2. Lancelot G., Helene C. Selective recognition of nucleic acids by proteins: the specificity of guanine interactions with carboxylate-ion // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—74, N 11.—P. 4872—4875.
3. Брусков В. И., Бушцев 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. Желтовський М. В., Самійленко С. П., Коломієць І. М., Кондратюк І. В. Взаємодія нуклеотидних основ з карбоксильною групою амінокислот в ДМСО: модель точкових білков-нуклеїнових контактів // *Доп. АН УРСР. Сер. Б.*—1988.—№ 8.—С. 68—71.
5. Кондратюк І. В., Коломієць І. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Tsuboi M., Takahashi S. Infrared and Raman spectra of nucleic acids.—Vibrations in the base-residues // *Physico-chemical properties of nucleic acids.*—New York: Acad. press.—Pt. 2.—P. 91—145.
9. Breitmaier E., Voelter W. Carbon-13 NMR spectroscopy.—Weinheim: VCH, 1987.—515 p.
10. Jones A. J., Grant D. M., Winkley M. W., Robins R. K. Carbon-13 magnetic resonance. 17. Pyrimidine and purine nucleosides // *J. Amer. Chem. Soc.*—1970.—92, N 13.—P. 4079—4087.
11. Lichtenberg D., Bergmann F., Neiman Z. Tautomeric forms and ionisation processes in xanthine and its N-methyl derivatives // *J. Chem. Soc. (C).*—1971.—9.—P. 1676—1682.

Инт. молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев

Получено 24.12.92