



УДК 547.963.3

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АРГИНИНА И ЛИЗИНА С ПОЛИНУКЛЕОТИДАМИ И ИХ КОМПОНЕНТАМИ

Брусков В. И., Бушуев В. Н.

Институт биологической физики Академии наук СССР, Пущино

Методом протонного магнитного резонанса исследована специфичность взаимодействия хлоргидратов аргинина и лизина с ДНК и полинуклеотидами poly (G), poly (I), poly (A), poly (C), poly (U), а также гистонов F1 и F2a1 с poly (I). Исследованы изменения растворимости нуклеозидов: Ado, Guo, Ipo и оснований Thy и Cyt в присутствии глицина, аргинина и лизина. Определены кажущиеся константы ассоциации комплексов. Обсуждается механизм взаимодействия аминокислот с основаниями полинуклеотидов.

Образование специфических комплексов белков с нуклеиновыми кислотами, вероятно, помимо взаимодействия с сахарофосфатным остовом, включает прямое взаимодействие между аминокислотными остатками белка и азотистыми основаниями.

Непосредственное исследование этой связи на полимерном уровне является чрезвычайно сложной задачей, поэтому для понимания роли отдельных аминокислотных остатков во взаимодействии белков с нуклеиновыми кислотами полезным является изучение более простых модельных систем.

Так, исследование комплексообразования аргинина и лизина с нуклеиновыми кислотами и их компонентами представляет интерес в связи с выяснением роли этих аминокислот в процессах взаимодействия гистонов и других белков с нуклеиновыми кислотами, а также в связи с проблемой белково-нуклеинового узнавания [1,2].

Исследованиями последних лет показано, что молекулы ДНК в составе хроматина представляют собой суперспираль, образованную комплексом ДНК с белковыми субчастицами, которые, в свою очередь, состоят из определенных комплексов гистонов [3, 4] друг с другом.

Гистоны в хроматине, по-видимому, локализуются преимущественно по большей бороздке ДНК, оставляя малую бороздку открытой [5, 6]. Имеются протяженные участки ДНК, свободные от белка [7]. Эти факты свидетельствуют о том, что, вероятно, должна быть определенная специфичность во взаимодействии гистонов (или их комплексов друг с другом и кислыми белками хроматина) с определенными нуклеотидными последовательностями ДНК.

Для выяснения возможности такой специфичности нами изучено взаимодействие аргинина и лизина с ДНК, полинуклеотидами и их компонентами, а также гистонов F1 и F2a1, обогащенных соответственно лизином и аргинином, с полинуклеотидами.

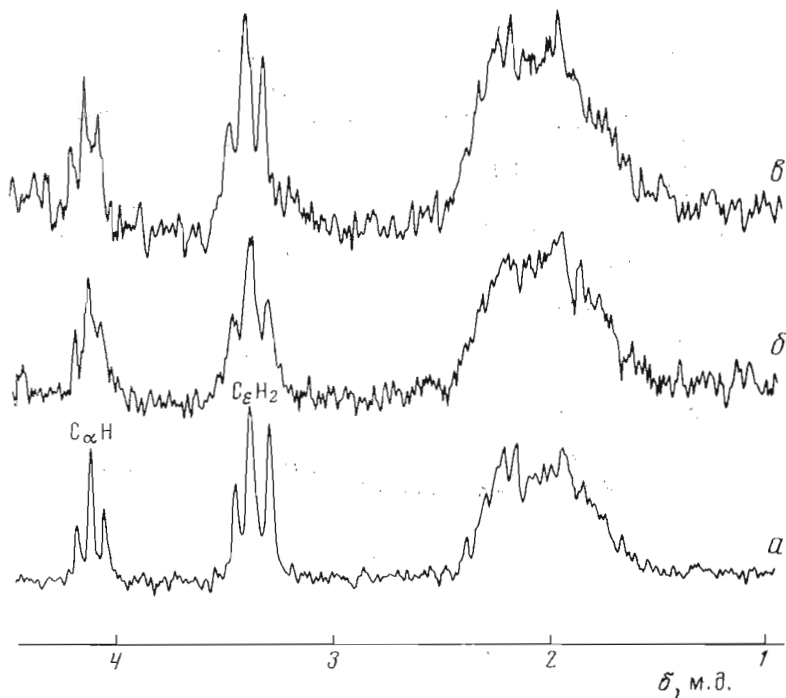


Рис. 1. Спектры ^1H -ЯМР лизина (а), а также лизина в присутствии ДНК в 0,01 М (б) и 0,1 М (в) NaCl при pH 7,0 и 6°

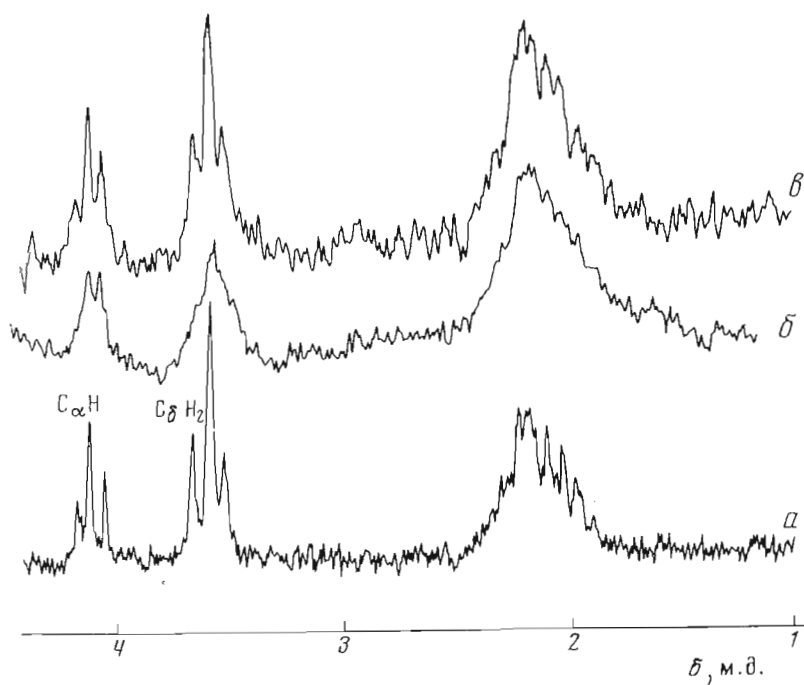


Рис. 2. Спектры ^1H -ЯМР аргинина (а), а также аргинина в присутствии ДНК в 0,01 М (б) и 0,1 М (в) NaCl при pH 7,0 и 6°

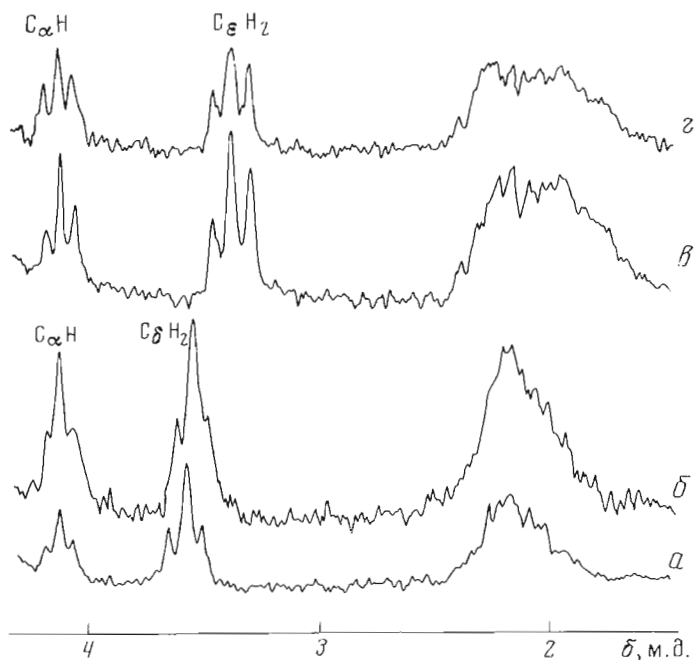


Рис. 3. Спектры ^1H -ЯМР аргинина (а, б) и лизина (с, д) в присутствии poly (U) (а, с) и poly (A) (б, д) при pH 7,0 и 6°. Концентрации аминокислот $2 \cdot 10^{-3}$ М и полинуклеотидов $0,75 \cdot 10^{-2}$ М

На рис. 1 представлены спектры ЯМР лизина в отсутствие и в присутствии ДНК при разных ионных силах раствора. Из рис. 1 видно, что в присутствии ДНК в спектре ЯМР лизина наблюдается увеличение ширины линии, причем увеличение ширины линии C_αH протонов лизина заметно больше по сравнению с уширением линий для протонов C_βH_2 -группы. С повышением ионной силы раствора ширина C_αH - и C_βH_2 -линий лизина уменьшается. Эти данные свидетельствуют о том, что наблюдаемое уширение линий обусловлено не вязкостью раствора, а комплексобразованием лизина с ДНК. Причем образование комплекса, по-видимому, обусловлено электростатическими взаимодействиями как бокового радикала, так и аминокислотной части молекулы лизина с ДНК.

Пики, соответствующие протонам C_αH и C_βH_2 в спектре ЯМР аргинина в присутствии ДНК, также имеют большую ширину по сравнению с пиками для свободного аргинина (см. рис. 2). Этот эффект, а также разница между увеличением ширины сигналов протонов C_α и C_β более ярко выражена для аргинина, чем для лизина. Причем увеличение ширины пика C_β -протонов в этом случае больше, чем для C_α .

Неясно, чем обусловлено это различие; более сильным взаимодействием гуанидиновой группы аргинина с фосфатными группами ДНК или же тем, что гуанидиновая группа образует водородные связи с доступными для взаимодействия группами комплементарных пар оснований, расположенными в большой и малой бороздках ДНК. Для выяснения возможности участия оснований ДНК в комплексобразовании с аргинином и лизином методом ЯМР изучено взаимодействие лизина и аргинина с различными полинуклеотидами (рис. 3 и 4).

Во всех исследуемых случаях в присутствии полинуклеотидов увеличивается ширина линий лизина и аргинина по сравнению с шириной линий свободных аминокислот. Уширение линий, наблюдаемое в случае полинуклеотидов, в ряде случаев больше, чем уширение, вызванное комплек-

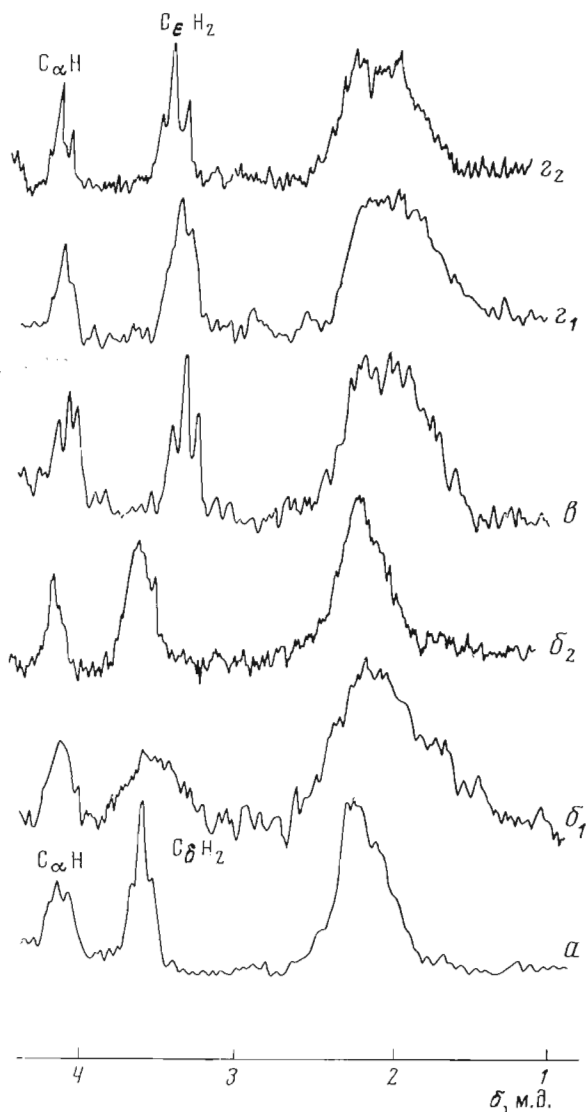


Рис. 4. Спектры ^1H -ЯМР аргинина (a , b_1) и лизина (g , g_1) в присутствии poly(C) (a , g) и poly(I) (b_1 , g_1) при pH 7,0 и 6° . Спектры b_2 и g_2 соответствуют комплексообразованию аргинина и лизина с poly(I) при 28°

сооброзованием с ДНК. Полученные данные свидетельствуют об участии оснований в образовании комплекса с основными аминокислотами. Более того, увеличение ширины линий в спектрах лизина и аргинина оказывается различным для разных типов полинуклеотидов, что свидетельствует о специфичности наблюдаемых взаимодействий. Наиболее значительное увеличение ширины линий лизина и аргинина происходит в случае образования комплексов с poly(G). Линии в спектрах лизина и аргинина в комплексе с poly(G) настолько уширены, что их трудно наблюдать даже при высоких (до 80°) температурах. Как следует из сравнения спектров на рис. 3, a , 3, b , 4, a и 4, b , взаимодействие аргинина с полинуклеотидами уменьшается в ряду $G > I > C \geq A > U$. Для лизина этот эффект выражен слабее, чем для аргинина (рис. 3, g , 3, g , 4, g и 4, g), хотя, по-видимому, сохранена общая последовательность в ряду полинуклеотидов $G > I >$

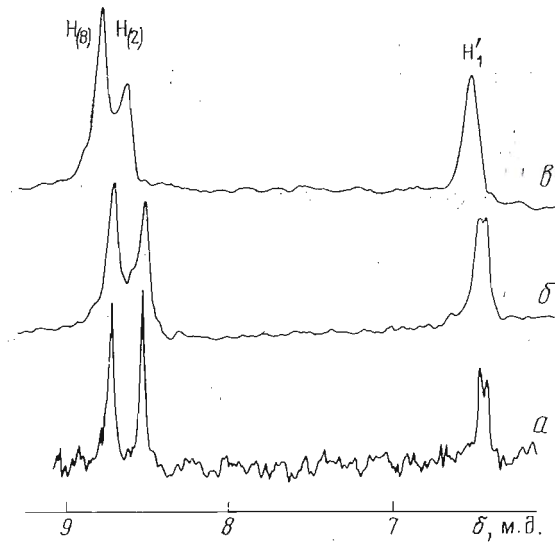


Рис. 5. Низкопольная часть спектра ^1H -ЯМР poly (I) (0,75%, вес/объем) (а) в 1 М NaCl и ее комплексов с гистоном F1 (б) и F2a1 (в) при pH 8,0 и 40°

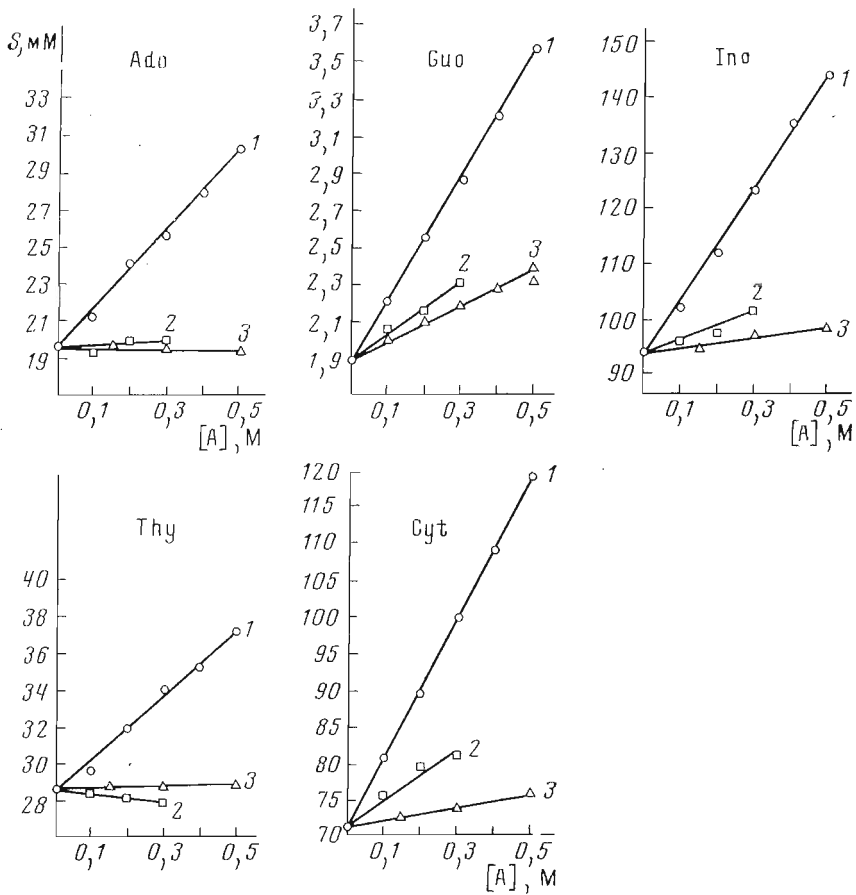


Рис. 6. Влияние аргинина (1), лизина (2) и глицина (3) на растворимость нуклеозидов и оснований

$> C \geq A \geq U$. При этом во всех исследованных случаях комплекс полинуклеотидов с аргинином является более прочным и более специфичным, чем с лизином.

Образование комплексов гистонов с полинуклеотидами приводит к значительному изменению в спектре ЯМР оснований полинуклеотида (рис. 5). В присутствии гистонов сигналы протонов 8-Н, 2-Н, 1-Н' poly (I) сдвигаются в область слабых полей и уширяются. Причем наибольшие изменения наблюдаются для линии 2-Н poly (I). Из сравнения рис. 5, б и в следует, что взаимодействие гистона F2a1, обогащенного аргинином, с основаниями poly (I) сильнее, чем взаимодействие комплекса poly (I) с гистоном F1, обогащенным лизином. Эти данные показывают непосредственное участие оснований полинуклеотидов в образовании комплекса poly (I) с гистонами.

Чтобы полностью исключить влияние фосфатных групп на взаимодействие, было изучено комплексообразование пуриновых нуклеозидов и пиримидиновых оснований с основными аминокислотами методом изменения растворимости [8].

На рис. 6 представлены растворимости пуриновых нуклеозидов и пиримидиновых оснований в присутствии аргинина, лизина и глицина (в различных концентрациях) при нейтральных рН. Из полученных данных рассчитаны кажущиеся константы ассоциации K_a нуклеозид (основание)—аминокислота в предположении, что образующийся комплекс имеет состав 1 : 1. Расчет проводили по формуле [8]:

$$K_a = \frac{\Delta S}{S^0} \cdot \frac{1}{[A] - \Delta S},$$

где S^0 — растворимость нуклеозида (основания) в воде, $\Delta S = S - S^0$ — увеличение растворимости нуклеозида (основания) в присутствии аминокислоты, $[A]$ — концентрация аминокислоты.

Рассчитанные значения K_a приведены в таблице в сопоставлении с данными, полученными при взаимодействии нуклеотидов с иммобилизованными на полимере аминокислотами [9], и значениями кажущихся констант ассоциации нуклеотидов с поли-*L*-аргинином и поли-*L*-лизинном [10]. Следует отметить, что кажущиеся константы ассоциации существенно отличаются от истинных в результате конкурирующего взаимодействия молекул воды с каждым из компонентов комплекса [11]. Данных для расчета истинных констант ассоциации в настоящее время недостаточно, однако приближенная оценка показывает, что они могут быть на несколько порядков выше K_a [11].

Нуклеозид или основание	K_a, M^{-1}		Нуклеотид	Кажущаяся константа ассоциации [10]	
	<i>L</i> -лизин	<i>L</i> -аргинин		поли- <i>L</i> -лизин	поли- <i>L</i> -аргинин
Thy	≤ 0	$0,6 \pm 0,1$	pU	2,25	4,6
Cyt	$0,5 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,2$	pC	2,2	5,3
Ino	$0,03 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,2$	pI	—	—
Ado	$0,06 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	pA	2,25	9,4
Guo	$0,85 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	pG	3,25	14,5

Из таблицы видно, что и при отсутствии фосфатных групп закономерности взаимодействия аргинина и лизина с нуклеозидами и основаниями в основном аналогичны наблюдаемому при взаимодействии с полинуклеотидами. В частности, видно, что комплексообразование с аргинином во всех случаях более ярко выражено, чем с лизином. В случае аргинина прочность комплекса специфически уменьшается в ряду; $Guo > Ino = Cyt \geq Ado > Thy$, в случае лизина $Guo \geq Cyt > Ado = Ino > Thy$.

При этом необходимо учитывать, что, строго говоря, данные, относящиеся к пуриновым нуклеозидам и пиримидиновым основаниям, не вполне сопоставимы друг с другом.

Данные, полученные при изучении изменения растворимости гуанозина в присутствии глицина, β -аланина, аспарагиновой и глутаминовой кислот и уксуснокислого натрия при нейтральных рН, показывают, что во всех перечисленных случаях происходит специфическое, по сравнению с другими нуклеозидами и основаниями, увеличение растворимости гуанозина. При этом характер взаимодействия гуанозина с лизином оказывается очень близким к взаимодействию с глицином. Очевидно, при комплексообразовании аминокислот с гуанозином существенным является взаимодействие между гуанозином и карбоксильной группой аминокислоты.

Полученные нами результаты показывают, что наряду с электростатическими взаимодействиями фосфатных групп с положительно заряженными группами основных аминокислот имеет место специфическое взаимодействие оснований нуклеиновых кислот с аминокислотами. Для аргинина полученные результаты качественно коррелируют со способностью оснований к образованию водородных связей с аминокислотой. Так, гуанидиновая группа аргинина способна к специфическому образованию одновременно двух водородных связей, с 6-О и 7-N гуанина и гипоксантина и с 2-О и 3-N цитозина [2], что и обнаруживается, по-видимому, данными ЯМР. Данные растворимости показывают, что наряду с этим существует дополнительное специфическое комплексообразование между карбоксильной группой аминокислоты и гуанозином, вероятно, за счет образования водородных связей с группами $N_{(1)}-H$ и $N_{(2)}-H$ гуанина.

При исследовании взаимодействия нуклеотидов с иммобилизованными аминокислотами [9] также было отмечено, что характер и величина взаимодействия лизина и глицина очень близки. Полученные методом ЯМР результаты по специфичности взаимодействия основных аминокислот с полинуклеотидами находятся в близком соответствии с результатами по специфичности взаимодействия поли-*L*-аргинина и поли-*L*-лизина с нуклеотидами [10, 12, 13].

Некоторые расхождения в оценке специфичности взаимодействия между данными ЯМР и растворимости могут быть обусловлены тем, что исследование растворимости выполнено при 25°, а данные ЯМР в основном получены при 6°. Сложный характер комплексообразования может изменять соотношение между разными типами взаимодействий при разных температурах. Изменения в химических сдвигах протонов 2-H, 8-H и 1-H' в спектре ЯМР *poly*(I) в присутствии гистонов наиболее вероятно обусловлены образованием водородных связей между молекулой гистона и основаниями, так как известно, что сдвиг сигналов протонов в слабое поле характерен для образования водородных связей [14]. Бóльший химический сдвиг в слабое поле протона 2-H по сравнению с 8-H и 1-H', по-видимому, вызван образованием водородных связей с группами основания 3-N, $N_{(1)}-H$, 6-О и 7-N, находящимися в непосредственной близости к протону 2-H. Вопрос о том, все или только часть из перечисленных групп основания образуют водородные связи, требует дальнейших исследований.

Данные о взаимодействии гистонов F1 и F2a1 с *poly*(I), аргинина и лизина с ДНК и полинуклеотидами, а также результаты связывания гистонов с ДНК [15] и нуклеотидами [16] позволяют предположить, что гистоны, обогащенные аргинином, помимо электростатических взаимодействий с фосфатными группами ДНК, могут образовывать более специфические связи с основаниями ДНК. Такими связями наиболее вероятно являются водородные связи. Из данных о связывании аргинина и лизина с ДНК и полинуклеотидами следует, что гистоны, обогащенные аргинином, должны

обладать определенной специфичностью при связывании с участками ДНК, обогащенными G·C-парами.

Имеющиеся данные [17—19] о взаимодействии полиаргинина и гистонов, обогащенных аргинином, с ДНК и двуспиральными полинуклеотидами свидетельствуют о специфичности взаимодействия остатков аргинина с G·C-парами, тогда как в случае полилизина отмечается избирательность по отношению к A·T-парам [17, 19, 20]. Такую специфичность в случае аргинина можно объяснить образованием специфического комплекса с двумя водородными связями между гуанидиновой группой аргинина и группами 6-O, 7-N гуанина, расположенными в широкой бороздке ДНК. Известно, что связь гистонов с ДНК осуществляется в основном через широкую бороздку ДНК [5, 6]. Вывод о более прочном связывании аргинина и лизина с одноцепочечными полинуклеотидами согласуется с данными о том, что, хотя больше гистонов связывается с нативной ДНК, связь гистонов с денатурированной ДНК оказывается более прочной [21].

В целом, комплексы основных аминокислот с полинуклеотидами и их компонентами в модельных экспериментах являются весьма слабыми. Однако они могут играть существенную роль в комплексах белков с нуклеиновыми кислотами, так как показано, что может происходить значительное усиление взаимодействия и специфичности при комплексообразовании макромолекул вследствие удаления конкурирующих за образование водородных связей молекул воды и изменения локальной диэлектрической постоянной среды [22].

Экспериментальная часть

Спектры протонного магнитного резонанса высокого разрешения сняты на спектрометре НХ-90Е фирмы «Bruker» на частоте 90 МГц с использованием преобразователя Фурье. Длительность импульса 12 мкс. Время накопления одного спектра ~90 мин. Химические сдвиги сигналов протонов отсчитывали относительно внешнего эталона — тетраметилсилана. Исследуемые растворы были приготовлены в D₂O (Всесоюзное объединение «Изотоп») с содержанием дейтерия 99,7 ат.%. Значения pH растворов устанавливали близкими к нейтральным с помощью NaOD и DCl. В работе использовали препараты калиевых солей полигуаниловой, полиинозиновой и полиуридилловой кислот фирмы «Serva» (ФРГ), калиевых солей полиадениловой и полицитидиловой кислот фирмы «Reanal» (Венгрия). Аргинин·HCl и лизин·HCl (A grade) фирмы «Calbiochem» (США). Все реактивы использовали без дополнительной очистки. ДНК была выделена из тимуса телят стандартными методами фенольной депротеинизации. Растворы ДНК для уменьшения вязкости обрабатывали ультразвуком на диспергаторе УЗДН-1 на частоте 22 кГц при токе 0,4 А, 20 раз по 15 с. Концентрации лизина и аргинина в опытах были $3 \cdot 10^{-3}$ М, а ДНК $1,5 \cdot 10^{-2}$ М в расчете на нуклеотид.

Гистоны тимуса телят выделяли по методу Джонса [23, 24]. Комплекс гистонов с полинуклеотидами готовили смешиванием обеих компонентов в 4М NaCl при весовом отношении гистон — полинуклеотид, равном единице. Затем диализом против D₂O доводили концентрацию соли до 1М. Концентрации гистонов и полинуклеотидов были равны 0,75% (вес/объем).

Растворимость. Для определения растворимости использовали следующие реактивы: аденозин и гуанозин (марки ч.) производства ОЗХР г. Олайне Латвийской ССР, инозин и цитозин (х. ч.), тимин (ч.), L-аргинин·HCl (х. ч.), L-лизин·HCl (ч.) — все производства фирмы «Reanal» (Венгрия). Для контроля несколько опытов провели с L-лизином·HCl (A-grade) фирмы «Calbiochem» (США). Результаты оказались одинаковыми в пределах точности эксперимента. Реактивы использовали без дополнительной очистки.

Растворимость определяли в термостатированных кюветах при $25 \pm \pm 0,1^\circ$ методом, аналогичным описанному ранее [8], с выдерживанием раствора в течение более 3 сут до достижения равновесной концентрации (рН растворов 6,5—7,5). Концентрации нуклеозидов и оснований определяли спектрофотометрически. Для вычисления растворимости использовали следующие значения коэффициентов молярной экстинкции: аденозин — $14,9 \cdot 10^3$ при 259,5 нм, гуанозин — $13,65 \cdot 10^3$ при 252,5 нм, инозин — $12,25 \cdot 10^3$ при 248,5 нм, тимин — $7,89 \cdot 10^3$ при 264,5 нм, цитозин — $5,55 \cdot 10^3$ при 260 нм [25]. Были получены следующие значения растворимости нуклеозидов и оснований в воде: аденозин — $1,95 \cdot 10^{-2}$ М, гуанозин — $1,88 \cdot 10^{-3}$ М, тимин — $2,85 \cdot 10^{-2}$ М, которые хорошо совпадают с данными работы [26]. Данные о растворимости цитозина ($7,2 \cdot 10^{-2}$ М) приблизительно на 10% выше опубликованных. Для инозина получена величина $9,4 \cdot 10^{-2}$ М; литературных данных для сопоставления нами не обнаружено.

Авторы выражают глубокую благодарность Б. А. Королю за выделение и предоставление гистонов F1 и F2a1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богданов А. А. (1974) Успехи соврем. биологии, **77**, 48—67.
2. Брусков В. И. (1975) Молекулярн. биология, **9**, 304—309.
3. Kornberg R. D. (1974) Science, **184**, 868—871.
4. Bradbury S. E., Inglis R. I., Lewis P. N., Crane-Robinson C., Danby S. E., Cary P. D., Chapman G., Matthews H. R., Rattle H. W. (1974) VI International conference on magnetic resonance in biological systems Abstracts B6, Kandersteg, Switzerland.
5. Мирзабеков А. Д., Мельникова Н. Ф., Кольчинский А. М. (1974) 3-й Всесоюзный биохимический съезд. Тезисы докладов, стр. 58, Рига.
6. Mirzabekov A. D., Kolchinsky A. M. (1974) Mol. Biol. Rep., **1**, 385—389.
7. Varshavsky A. I., Puyin Yu. V., Georgiev G. P. (1974) Nature, **250**, 602—606.
8. Брусков В. И., Климов А. И. (1972) Биофизика, **17**, 151—153.
9. Saxinger C., Ponnampereuma C., Woese C. (1971) Nature New Biol., **234**, 172—174.
10. Wagner K. G., Arav R. (1968) Biochemistry, **7**, 1771—1777.
11. Гурьянова Е. Н., Гольдштейн И. П., Ромм И. П. (1973) Донорно-акцепторная связь, стр. 48—51, «Химия», М.
12. Wagner K. G. (1969) Eur. J. Biochem., **10**, 261—267.
13. Rifkind J. M., Eichorn G. L. (1970) Biochemistry, **9**, 1753—1761.
14. Быстров В. Ф. (1964) в сб. Водородная связь (под ред. Н. Д. Соколова и В. М. Чулановского), стр. 253—266. «Наука», М.
15. Азизова О. А., Бушуев В. Н., Король Б. А., Каюшин Л. П., Сибельдина Л. А., Николаев Ю. В., Копылов В. А. (1975) Биофизика, **20**, 154—155.
16. Азизова О. А., Бушуев В. Н., Король Б. А., Каюшин Л. П., Сибельдина Л. А., Николаев Ю. В., Копылов В. А. (1975) Биофизика, **20**, 327—328.
17. Leng M., Felsenfeld G. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **56**, 1325—1332.
18. Clark R. J., Felsenfeld G. (1972) Nature New Biol., **240**, 226—228.
19. Combard A., Vendrely R. (1970) Biochem. J., **118**, 875—881.
20. Shapiro J. T., Leng M., Felsenfeld G. (1960) Biochemistry, **8**, 3219—3232.
21. Уманский С. Р., Король Б. А., Пикер Е. Г., Рунова Ю. Н. (1974) Молекулярн. биология, **8**, 491—500.
22. Брусков В. И., Полтев В. И. (1974) Биофизика, **19**, 1093—1094.
23. Jons E. W. (1964) Biochem. J., **92**, 55—59.
24. Jons E. W. (1967) Biochem. J., **105**, 611—614.
25. Dawson R. M. C. et al. (1969) in Data for Biochemical Research, p. 176, 2Ed., Oxford.
26. Herskovits T. T., Harrington J. P. (1972) Biochemistry, **11**, 4800—4811.

Поступила в редакцию
11.IV.1975

**SPECIFICITY OF ARGININE AND LYSINE INTERACTION
WITH POLYNUCLEOTIDES AND THEIR COMPONENTS**

BRUSKOV V. I., BUSHUEV V. N.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences
of the USSR, Pushchino*

Proton magnetic resonance was used to investigate the specificity of arginine and lysine interaction with DNA and polynucleotides: poly (G), poly (I), poly (A), poly (C) poly (U) and histones F1 and F2a1 with poly (I). In all cases complexes of arginine are, more stable and more specific than those of lysine. The interaction of arginine with polynucleotides decreases in the following order: $G > I > C \geq A > U$. The changes have been studied in the solubility of purine nucleosides Ado, Guo, Ino and pyrimidine bases Thy and Cyt in the presence of glycine, arginine and lysine. The apparent association constants for the complex formation have been calculated. It is proposed that in addition to specific hydrogen bonds between arginine guanidine group and O-6, N-7 guanine and inosine or O-2, N-3 cytosine groups, the formation of specific hydrogen bonds between carboxyl group of the amino acid and H-N1, H-N2 guanine groups takes place.
