



УДК 547.96.4 : 543.422.23

**СИНТЕЗ ФРАГМЕНТОВ ГИСТОНОВОЙ ФРАКЦИИ НІ
И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ДНК
МЕТОДОМ ПМР**

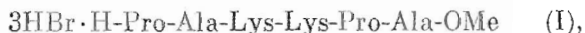
*Тураев О. Д., Бушуев В. Н., Король Б. А.,
Шибнев В. А.*

*Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;
Институт биологической физики Академии наук СССР, Пуцзино-на-Оке*

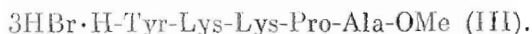
Синтезированы метиловые эфиры пептидов, соответствующие фрагментам (17—22, 23—28) гистоновой фракции НІ. Методом ПМР показано, что пептидный фрагмент -Ala-Ala-Lys-Lys-Pro-Ala- (23—28), возможно, более прочно связан с ДНК за счет электростатической связи N-концевой аминогруппы аланинового остатка. Установлено, что стабильность комплекса ДНК с пептидом, содержащим тирозин, может быть обусловлена и дополнительным взаимодействием ароматического кольца с основаниями ДНК.

Известно, что гистоны в составе хроматина являются репрессорами матричной активности. При этом, образуя комплексы с ДНК, они могут обладать некоторым избирательным сродством к различным участкам ее молекулы. Хотя существенный вклад в стабилизацию комплекса ДНК с гистонами вносят электростатические взаимодействия между положительно заряженными аминогруппами остатков лизина и отрицательно заряженными фосфатными группами молекулы ДНК, заметную роль при этом могут играть и другие аминокислотные остатки.

Для изучения характера взаимодействия ароматических и алифатических остатков аминокислот с ДНК можно использовать синтетические пептиды. Так, рассматривая первичную структуру гистона НІ, можно заметить, что фрагмент молекулы (15—36) содержит большое количество остатков не только лизина, но и аланина и пролина. В этом отношении представляет интерес исследование роли этих аминокислотных остатков при образовании комплекса с ДНК. С этой целью мы синтезировали метиловые эфиры двух гексапептидов:



обладающие соответственно аминокислотными последовательностями (17—22, 23—28) гистона НІ, а также пептид (III), отличающийся от соединения (I) тем, что на N-конце фрагмент Pro-Ala замещен на остаток тирозина:



Включение в эту последовательность остатка тирозина было интересным

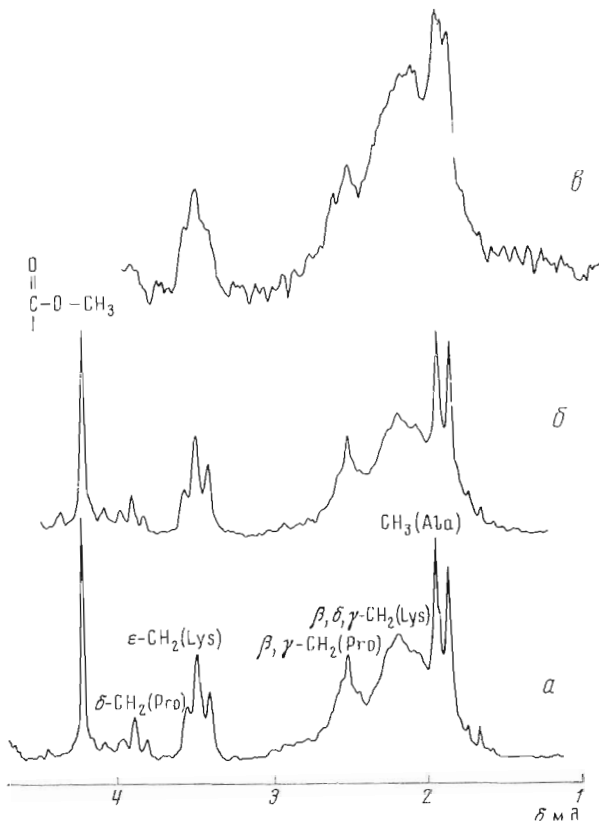


Рис. 1. Спектр ПМР пептида $3\text{HBr} \cdot \text{H-Pro-Ala-Lys-Lys-Pro-Ala-OMe}$ (I) в D_2O , pH 6,5; с 5 мг/мл в 0,5 М NaCl (а); в комплексе с ДНК в 0,5 М NaCl (б); в комплексе с ДНК в 0,2 М NaCl (в)

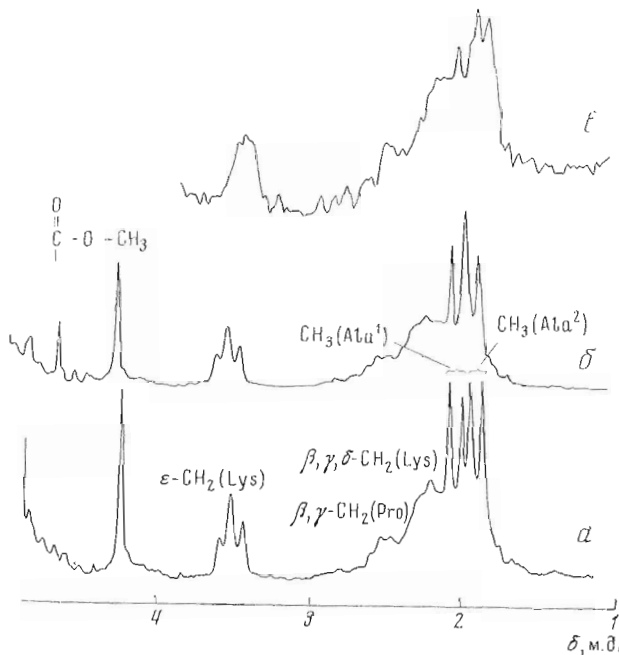


Рис. 2. Спектр ПМР пептида $3\text{HBr} \cdot \text{H-Ala-Ala-Lys-Lys-Pro-Ala-OMe}$ (II) в D_2O , pH 6,5; с 5 мг/мл в 0,5 М NaCl (а); в комплексе с ДНК в 0,5 М NaCl (б); в комплексе с ДНК в 0,2 М NaCl (в)

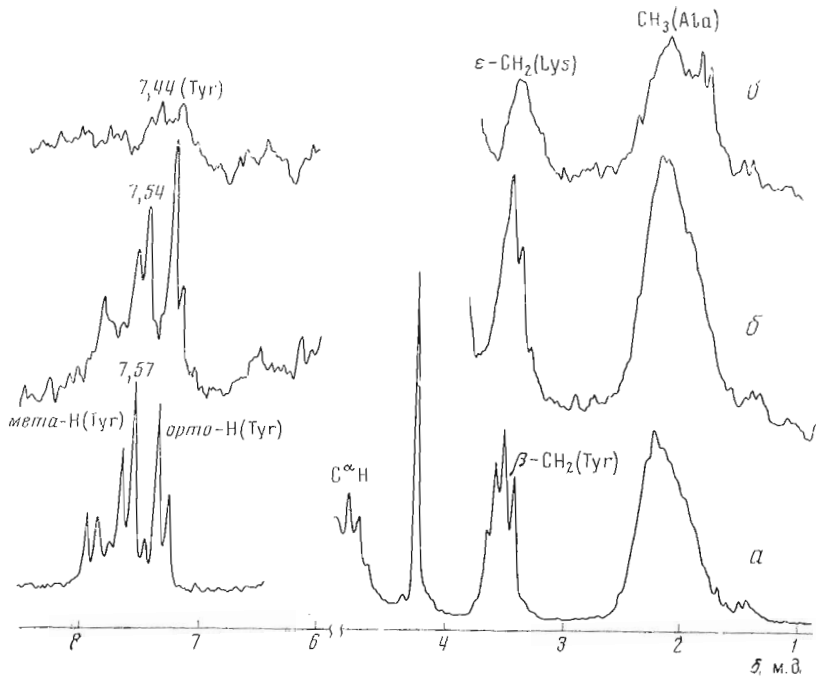


Рис. 3. Спектр ПМР пептида $3\text{NBr}\cdot\text{H}\cdot\text{Tyr}\cdot\text{Lys}\cdot\text{Lys}\cdot\text{Pro}\cdot\text{Ala}\cdot\text{OMe}$ (III) в D_2O , pH 6,5; с 5 мг/мл в 0,5 М NaCl (а); в комплексе с ДНК в 0,36 М NaCl (б); в комплексе с ДНК в 0,2 М NaCl (в)

с точки зрения роли, которую может выполнять этот единственный остаток тирозина в гистоновой фракции Н1.

Синтез пептидов осуществлялся методом смешанных ангидридов и карбодиимидным методом. В качестве защиты N^α -аминогруппы лизина использовалась *трет*-бутилоксикарбонильная группа, а для защиты N^ϵ -аминогруппы — бензилоксикарбонильная группа. Вос-группа отщеплялась действием абс. CF_3COOH , а Z-группа — HBr в нитрометане. Так как наращивание пептидов проводилось с C-конца, то не исключена частичная рацемизация.

На рис. 1—3 приведены спектры ПМР пептидов (I), (II) и (III) в растворе D_2O соответственно. Отнесение линий в спектрах сделано на основании аминокислотного состава пептидов и спектров ПМР денатурированных белков [1]. Характер спектров пептидов свидетельствует о достаточно высокой чистоте препаратов. Увеличение pH раствора до 10 и более приводит к ионизации оксигруппы тирозина и в неионизованное состояние основную группу лизина, что в свою очередь вызывает химический сдвиг резонансных линий $\epsilon\text{-CH}_2$ -группы лизина и линий ароматических протонов тирозина в область высокого поля. Так, при изменении pH до 10 резонансная линия $\epsilon\text{-CH}_2$ -группы лизина в спектре ПМР пептида (III) сдвигается на 34 Гц, а линия ароматических протонов тирозина — на 14 Гц.

Добавление к раствору пептидов ДНК в 0,2 М NaCl вызывает увеличение ширины резонансных линий в спектре ПМР пептидов, особенно $\epsilon\text{-CH}_2$ -групп лизина (рис. 1, в, 2, в, 3, в) по сравнению с их шириной в отсутствие ДНК (рис. 1, а, 2, а, 3, а). Хорошо разрешенный триплетный сигнал $\epsilon\text{-CH}_2$ -группы лизина с шириной линии $\sim 4,9$ Гц и константой спин-спинового взаимодействия $\sim 7,2$ Гц в присутствии ДНК в 0,2 М NaCl представляет собой плохо разрешенный триплет (рис. 1, в, 2, в, 3, в). Это свидетельствует о том, что ширина линии $\epsilon\text{-CH}_2$ -группы лизина при добавлении ДНК увеличилась до 7 Гц. При 0,5 М концентрации NaCl

резонансная линия ϵ - CH_2 -группы лизина пептидов в присутствии ДНК имеет такую же ширину, что и для свободного пептида в растворе в отсутствие ДНК (рис. 1, б, 2, б, 3, б). Эти данные позволяют считать, что увеличение ширины линий в спектрах ПМР пептидов обусловлено не увеличением вязкости раствора при добавлении ДНК, а комплексобразованием пептидов с ДНК. Зависимость ширины линий ϵ - CH_2 -групп лизина пептидов в комплексе с ДНК от ионной силы раствора свидетельствует об электростатическом характере взаимодействия пептидов с ДНК, как следует из сравнения спектров пептида (II) в свободном состоянии в растворе (рис. 2, а) и в присутствии ДНК в 0,5 и 0,2 М NaCl (рис. 2, б, в). Образование комплекса с ДНК приводит к химическому сдвигу резонансных линий CH_3 -группы N-концевого аланина в область высокого поля на 5 Гц. Это указывает на то, что концевая аминогруппа электростатически связана с ДНК. В случае комплекса с ДНК пептида (III) помимо электростатического взаимодействия стабильность комплекса ДНК — пептид обусловлена также тем, что ароматическое кольцо тирозинового остатка взаимодействует с основаниями ДНК. Это заключение основано на том факте, что при образовании комплекса с ДНК ширина резонансных линий протонов ароматического кольца тирозина увеличивается и наблюдается сдвиг в высокое поле резонансных линий *meta*- и *ortho*-протонов тирозина (рис. 3, в). Известно, что взаимодействие ароматического кольца аминокислот с основаниями полинуклеотидов и ДНК приводит к тому, что кольцевые токи оснований вызывают химический сдвиг в область высокого поля резонансных линий протонов ароматических аминокислот [2, 3]. Так, линия *meta*-протонов тирозина пептида (III) при 7,57 м. д. (рис. 3, а) при образовании комплекса с ДНК в 0,2 М NaCl сдвигается в высокое поле до 7,44 м. д. (рис. 3, в). При 0,36 М концентрации NaCl высокопольный сдвиг протонов ароматического кольца тирозина в комплексе с ДНК незначителен (рис. 3, б), т. е. при высоких ионных силах раствора, ароматическое кольцо тирозина не взаимодействует с основаниями ДНК и лишь при образовании электростатической связи основных групп пептида с ДНК возникает определенное взаимодействие и тирозинового остатка с ДНК. Комплексообразование этого пептида с ДНК обусловлено как ионными связями его основных групп, так и отчетливым взаимодействием ароматического кольца тирозина с ДНК.

Экспериментальная часть

Хроматографирование проводили на закрепленном слое силикагеля (250 меш, пластинка 75×25 мм, толщина слоя 0,1—0,2 мм) и на силифоле (150×50 мм). Системы растворителей: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 100 : 10 : 30 (А), 3% водный аммиак — *втор*-бутанол, 44 : 100 (Б). Электрофорез проводили 40 мин в 0,2 М CH_3COOH (рН 2,7) при градиенте потенциала 38 В/см, бумага Whatman 2 (Англия). Электрофоретическую подвижность измеряли по отношению к глицину (E_{GLY}) или гистидину (E_{HIS}). Спектры ПМР сняты на спектрометре НХ-90 (Bruker, ФРГ) с рабочей частотой 90 МГц в режиме фурье-преобразования. Исследуемые растворы были приготовлены в D_2O с содержанием дейтерия 99,7 ат. %. рН раствора устанавливали с помощью NaOD и DCl. Концентрация пептидов — 0,5% (5 мг/мл). Химические сдвиги резонансных линий протонов даны относительно внешнего эталона — тетраметилсилана. ДНК выделяли из тимуса теленка с помощью депротенизации 1% додецилсульфатом натрия и фенолом в 4 М NaCl и 3-кратной депротенизацией смесью хлороформ — изоамиловый спирт (24 : 1).

Молекулярный вес ДНК $\sim 5 \cdot 10^7$, температура плавления 86° , гиперхромный эффект 34%.

Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-Pro-Ala-OMe (IV). К раствору 1,8 г *Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-OH* [4] в 10 мл тетрагидрофурана, содержащего 0,4 мл триэтил-

амина, прибавляли 0,37 мл изобутилхлорформната при -10° и через 10 мин 0,76 г $\text{HBr} \cdot \text{H-Pro-Ala-OMe}$ [5] в 5 мл тетрагидрофурана с 0,4 мл триэтиламина. Перемешивали 1 ч при -5° , 1 ч при 0° и 4 ч при 20° . Растворитель упарили, остаток растворили в этилацетате и раствор промыли 10% лимонной кислотой (3×5 мл), водой, 0,5 н. NaHCO_3 (3×5 мл) и снова водой. Этилацетатный раствор высушили над Na_2SO_4 и упарили в вакууме. Выход аморфного продукта (I) 2 г (90%), $[\alpha]_D^{25} = -34,7$ (c 1,1; CH_3OH), R_f на силикагеле 0,87 (A), 0,93 (B), R_f на силуфоле 0,79 (A), 0,86 (B).

$\text{CF}_3\text{COOH} \cdot \text{H-Lys(Z)-Lys(Z)-Pro-Ala-OMe}$ (V). 1 г защищенного тетрапептида (IV) растворили в 2 мл абс. CF_3COOH и выдержали 2 ч при 20° , прибавили 2 мл абс. бензола и упарили в вакууме (операцию повторили трижды). Образовавшуюся густую массу растворили в 2 мл абс. спирта и высадили абс. эфиром. Выход аморфного продукта (V) 0,83 г (81,4%), R_f на силикагеле 0,67 (A), $[\alpha]_D^{25} = -36,2$ (c 0,94; CH_3OH).

$\text{Z-Pro-Ala-Lys(Z)-Lys(Z)-Pro-Ala-OMe}$ (VI). К раствору 0,27 г Z-Pro-Ala-OH в 2 мл тетрагидрофурана при -5° прибавили 0,17 г дициклогексилкарбодимида. Через 30 мин добавили 0,7 г (V) в 2 мл тетрагидрофурана с 0,12 мл триэтиламина. Перемешивали 4 ч при 0° и оставили на 24 ч при 20° , добавили 0,1 мл ледяной CH_3COOH , тетрагидрофуран упарили, остаток растворили в этилацетате, отфильтровали от дициклогексимочевины. Дальнейшая обработка и выделение аналогичны описанным для (IV). Получено 0,82 г (96%) аморфного продукта (VI), $[\alpha]_D^{25} = -48$ (c 0,84; CH_3OH), R_f на силикагеле 0,9 (A), 0,82 (B), R_f на силуфоле 0,84 (A), 0,76 (B).

$\text{Z-Ala-Ala-Lys(Z)-Lys(Z)-Pro-Ala-OMe}$ (VII). К раствору 0,25 г Z-Ala-Ala-OH [5] в 2,2 мл тетрагидрофурана при -5° прибавили 0,22 г дициклогексилкарбодимида и через 30 мин 0,7 г (V) в 2 мл тетрагидрофурана с 0,12 мл триэтиламина. Через 24 ч прибавили 0,1 мл ледяной CH_3COOH и обрабатывали аналогично (IV). После пересаживания из спирта эфиром выход аморфного продукта (VII) 0,8 г (94%), $[\alpha]_D^{22} = -3,2$ (c 1,1; CH_3OH), R_f на силикагеле 0,94 (A), 0,91 (B), R_f на силуфоле 0,96 (A), 0,9 (B).

$\text{Z-Tyr(Z)-Lys(Z)-Lys(Z)-Pro-Ala-OMe}$ (VIII). К раствору 0,45 г Z-Tyr(Z)-OH [6] в 3 мл тетрагидрофурана, содержавшего 0,15 мл триэтиламина, прибавили 0,14 мл изобутилхлорформната при -10° и через 10 мин 0,87 г (V) в 5 мл тетрагидрофурана с 0,15 мл триэтиламина. Перемешивали 1 ч при -5° , 1 ч при 0° и 4 ч при 20° . Дальнейшая обработка и выделение проводились аналогично (IV). Выход аморфного продукта (VIII) 0,76 г (64,4%), $[\alpha]_D^{20} = -25,8$ (c 0,89; CH_3OH), R_f на силикагеле 0,74 (A), 0,9 (B), R_f на силуфоле 0,64 (A), 0,87 (B).

$\text{HBr} \cdot \text{H-Pro-Ala-Lys-Lys-Pro-Ala-OMe}$ (I) 0,2 г $\text{Z-Pro-Ala-Lys(Z)-Lys(Z)-Pro-Ala-OMe}$ растворили в 4 мл абс. нитрометана и пропускали ток сухого HBr в течение 35 мин. Добавили абс. эфир, выпавшее масло тщательно перетерли с абс. эфиром (3×20 мл), эфир отделили декантацией, а масло растворили в минимальном количестве спирта. Добавили абс. эфир и получили 0,15 г (88,2%) аморфного продукта (I), $[\alpha]_D^{21} = -41,8$ (c 0,96; CH_3OH), R_f на силикагеле 0,77 (A), 0,48 (B), R_f на силуфоле 0,69 (A), 0,15 (B), E_{Gly} 0,43, E_{His} 0,79.

$\text{HBr} \cdot \text{H-Ala-Ala-Lys-Lys-Pro-Ala-OMe}$ (II). 0,2 г $\text{Z-Ala-Ala-Lys(Z)-Lys(Z)-Pro-Ala-OMe}$ растворили в 4 мл абс. нитрометана и пропускали ток сухого HBr в течение 35 мин. Обработку и выделение проводили аналогично (I). Получено 0,15 г (88,7%) аморфного продукта (II), $[\alpha]_D^{21} = -38,4$ (c 1,1; CH_3OH), R_f на силикагеле 0,68 (B), R_f на силуфоле 0,2 (A), 0,73 (B), E_{Gly} 0,45, E_{His} 0,81.

$\text{HBr} \cdot \text{H-Tyr-Lys-Lys-Pro-Ala-OMe}$ (III). 0,15 г $\text{Z-Tyr(Z)-Lys-Lys-Pro-Ala-OMe}$ растворили в 3 мл абс. нитрометана и пропускали ток HBr в течение 45 мин. Дальнейшая обработка и выделение аналогично (I). Получено 0,096 г (80%) аморфного (III), $[\alpha]_D^{22} = -28,3$ (c 0,96; CH_3OH), R_f на силикагеле 0,58 (B), R_f на силуфоле 0,12 (A), 0,47 (B), E_{Gly} 0,60, E_{His} 0,89.

ЛИТЕРАТУРА

1. McDonald C. C., Phillips W. D. (1969) *J. Amer. Chem. Soc.*, **91**, 1513—1521.
2. Helene C., Dimicoli J. L. (1972) *FEBS Lett.*, **23**, 6—10.
3. Brun F., Toulme J. J., Helene C. (1975) *Biochemistry*, **14**, 558—563.
4. Марьян Л. И., Шибнев В. А. (1972) *Изв. АН СССР. Сер. хим. н.*, **8**, 1858—1860.
5. Stein W. H., Moore S., Bergmann M. (1944) *J. Biol. Chem.*, **154**, 491.
6. Katchalski E., Sela M. (1953) *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 5284—5289.

Поступила в редакцию
23.XII.1975

После переработки
27.IV.1976

SYNTHESIS OF FRAGMENTS OF HISTONE FRACTION H1 AND PMR STUDIES OF THEIR INTERACTION WITH DNA

TURAEV O. D., BUSHUEV V. N., KOROL B. A.,
SHIBNEV V. A.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
Institute of Biological Physics, Academy of Sciences
of the USSR, Pushchino

The peptide methyl esters are synthesized which correspond to 17-22 and 23-28 fragments of histone fraction H1. Proton magnetic resonance study revealed more effective binding to DNA of Ala-Ala-Lys-Lys-Pro-Ala (23-28 fragment) as compared to that of other fragments, the fact being attributed to possible electrostatic interaction with the amino group of N-terminal alanine. To account for increased stability of the DNA complex with tyrosine-containing peptide, a contribution of aromatic ring intercalation with DNA bases was implicated.
