

DNA – OLIGOPEPTID WECHSELWIRKUNG. NMR-UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFITÄT DER OLIGOPEPTID-BINDUNG

H. FRITZSCHE

*Zentralinstitut für Mikrobiologie und
experimentelle Therapie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Abteilung Biophysikochemie, DDR – 69 Jena*

Received 13 March 1972

The specific broadening of ^1H -NMR lines caused by the binding of a small molecule to a biopolymer is used for the study of the oligopeptide–DNA interaction. In the NMR spectra of both the dipeptide carnosine (β -alanyl–histidine) and the tripeptide glycyl–histidyl–glycine, addition of DNA causes specific broadening of the imidazole H-2 and H-4 protons of the histidine residues. All the other ^1H -NMR lines remain sharp, thus indicating a strongly restricted mobility solely of the imidazole ring in the DNA complex with these two oligopeptides.

1. Einleitung

Die Bindung von kleinen Molekülen an Makromoleküle führt generell zu Bewegungseinschränkungen der kleinen Moleküle. Dabei wird die unmittelbar für die Bindung an das Makromolekül verantwortliche Gruppe des kleinen Moleküls am stärksten in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt, mit wachsender Entfernung von der bindenden Gruppe wird die Einschränkung immer geringer. Mittels Kernresonanzspektroskopie kann aus der Linienform der Resonanzsignale die Beweglichkeitseinschränkung ermittelt werden, weil damit eine Linienverbreiterung (d.h. Verkleinerung der Spingitter-Relaxationszeit T_2) verknüpft ist [1]. In zahlreichen Arbeiten wurden aus Relaxationszeit- oder Linienbreitenmessungen der Kernresonanzsignale wertvolle Informationen über die Wechselwirkung kleiner Moleküle (Pharmaka, Effektoren) mit Biopolymeren (Proteinen, Enzymen) erhalten (Übersicht in [2]). Diese Methodik ist prinzipiell auch zur Untersuchung der Wechselwirkung kleiner Moleküle mit der DNA geeignet [3] und wird in dieser Arbeit auf die DNA-Oligopeptid-Wechselwirkung angewandt.

2. Experimentelles

Kalbsthymus-DNA wurde mit einem hochtourigen

Mixer abgebaut, anschliessend im Rotations-Umlaufverdampfer bei 25° aufkonzentriert und dabei in D_2O -Lösung überführt. Die Oligopeptide L-Carnosin (Serva, reinst) und L-Glycyl–L-histidyl–L-glycin (Serva) wurden ohne weitere Reinigung in D_2O gelöst. Das erforderliche Konzentrationsverhältnis wurde durch Mischung entsprechender Volumina eingestellt. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen bei angelegtem Vakuum und anschliessendes Abschmelzen des NMR-Probenröhrchens im Vakuum führte zu entgasten Präparaten mit der gewünschten Endkonzentration. Die NMR-Messungen wurden an einem 60-MHz-Gerät (ZKR 60, VEB Carl Zeiss Jena) und an einem 100-MHz-Gerät (HA 100-A, Varian) durchgeführt. Die angegebenen chemischen Verschiebungen sind bezogen auf den inneren Standard TTP = Na-Salz der 2,2,3,3-Tetradeutero-3-(trimethylsilyl)-propionsäure (Merck).

3. Ergebnisse

Zusatz von DNA führt durch den Viskositätsanstieg in wässrigen Lösungen zu einer geringfügigen allgemeinen Verbreiterung der NMR-Linien. Die verwendete konzentrierte DNA-Lösung (0,4 Gew.-%) verbreitert die NMR-Linien um den Faktor 1,4 (gemessen am Signal der Referenzsubstanz TTP). Durch spezifische

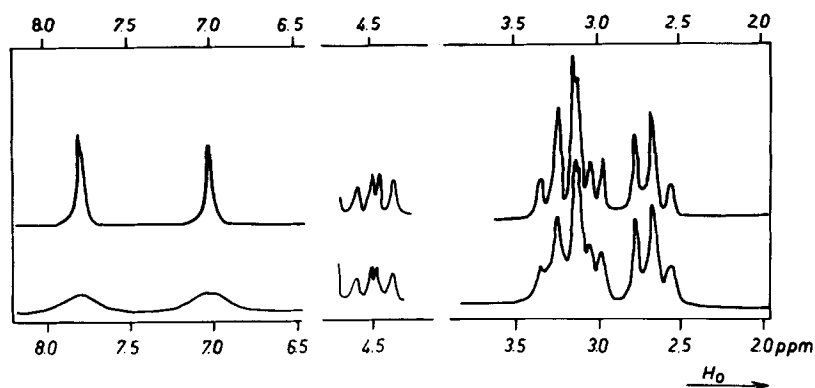


Abb. 1. Protonenresonanzsignal (60 MHz) von Carnosin (0,2 M). Obere Kurve: Reine D_2O -Lösung des Carnosins. Untere Kurve: Die Carnosin-Lösung enthält 0,4 Gew.-% DNA. - Die angegebenen chemischen Verschiebungen sind auf den inneren Standard TTP bezogen.

Interaktionen mit der DNA verursachte Linienverbreiterungen im Protonenresonanzspektrum von Oligopeptiden müssen deshalb signifikant über dem Faktor 1,4 liegen. Am Beispiel des Dipeptids L-Carnosin sei die Methode demonstriert: In der oberen Kurve der Abb. 1 ist das 60-MHz-Protonenresonanzspektrum des Carnosins allein (0,2 M in D_2O) und in der unteren Kurve bei Zusatz von 0,4 Gew.-% DNA wiedergegeben. Die Resonanzsignale bei 7,8 ppm und 7,0 ppm werden durch den DNA-Zusatz drastisch verbreitert. Die Signale bei 4,3 – 4,7 ppm (α -CH-Gruppe des Histidinrests) und 2,5 – 3,5 ppm (CH_2 -Gruppen des β -Alanin- und des Histidinrests) bleiben dagegen scharf und gut aufgespalten. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Bindung des Carnosins an die DNA über den Imidazolring des Histidinteils erfolgt; die übrigen Molekultteile, auch die dem Imidazolring benachbarte CH_2 -Gruppe, sind offensichtlich noch relativ frei beweglich.

Bei dem Tripeptid L-Glycyl-L-histidyl-L-glycin konnte ganz analog bei DNA-Zusatz eine Verbreiterung der Protonenresonanzlinien des Imidazolrings gemessen werden, so dass auch hier eine Bindung des Tripeptids an die DNA über den Imidazolring des Histidinrests angenommen werden kann.

Im Zusammenhang mit anderen bei uns durchgeführten Arbeiten über die besondere Funktion der Histidinreste in Polypeptiden und Proteinen [4] und deren Bedeutung für die Interaktion mit der DNA [5]

erscheint die hier gefundene bevorzugte Bindung des Imidazolrings von Oligopeptiden an die DNA als sehr aufschlussreich.

NMR-Untersuchungen unter Variation der Temperatur und DNA-Konzentration sowie mit anderen Oligopeptiden werden bereits durchgeführt oder werden vorbereitet.

Danksagung

Für die Aufnahme der 100-MHz-Protonenresonanzspektren danke ich Frau Chem.-Ing. Ch. Neitzsch und Herrn Doz. Dr. H. Frischleder, Sektion Physik der Karl-Marx-Universität Leipzig. Frau R. Paschy bin ich für technische Mitarbeit zu Dank verpflichtet.

Literatur

- [1] O. Jardetzky, *Advan. Chem. Phys.* 7 (1964) 499.
- [2] B. Sheard und E.M. Bradbury, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 20 (1970) 187.
- [3] E.J. Gabbay, R. Glasser und B.L. Gaffney, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 171 (1970) 810.
- [4] K.E. Reinert, XXIII. IUPAC Congress, Boston, U.S.A. 25–27.7.1971, Symposium J–5, Preprint.
- [5] G. Burckhardt und Ch. Zimmer, Manuskript in Vorbereitung.