



УДК 577.113.6.088.53 : 543.422.25

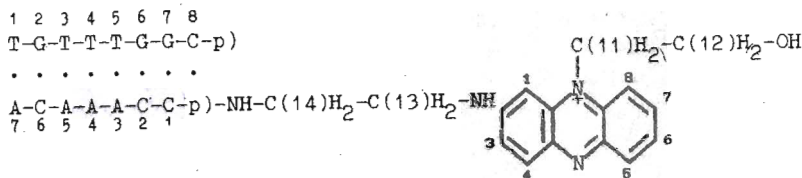
© 1992 г. *Е. В. Биченкова, Л. А. Горенштейн, Ю. Н. Воробьев, Е. Ю. Тэннэ, В. Ф. Зарытова, Е. М. Иванова, Т. В. Мальцева, А. В. Лебедев*

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ДУПЛЕКСА (Phn-NH(CH₂)₂NH)pd(CCAAACA)-pd(TGTTTGGC) С КОВАЛЕНТНО ПРИСОЕДИНЕННЫМ 10-(2-ГИДРОКСИЭТИЛ)ФЕНАЗИНИЕМ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ МЕТОДОМ 2М-¹Н-ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ И МЕТОДОМ ОГРАНИЧЕННОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕХАНИКИ

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН

Методом одно- и двумерной ¹H-ЯМР-спектроскопии (400 МГц) предложено детальное исследование пространственной структуры комплементарного комплекса (Phn-NH(CH₂)₂NH)pdCCAAACA-pdTGTGGC с ковалентно присоединенным 10-(2-гидроксиэтил)феназином в водном растворе. С помощью серии одномерного ЯЭО определены расстояния между сближенными в пространстве протонами олигонуклеотидов, а также между протонами модифицирующей группировки и протонами ближайших нуклеотидных звеньев. Для некоторых пар протонов определены эффективные времена корреляции τ_c , из которых следует, что феназиновый фрагмент в целом является более подвижным, чем гетерояклические основания олигонуклеотидов. Анализ констант спин-спинового взаимодействия протонов углеводных циклов показал, что они находятся в 2'-эндо-конформации. С использованием метода ограниченной молекулярной механики предложено вероятное состояние дуплекса в растворе, наилучшим образом удовлетворяющее полученному из эксперимента набору межпротонных расстояний.

Ранее [1] методом 1М- и 2М-¹H-ЯМР, а также методом ограниченной молекулярной механики (ОММ) было проведено детальное исследование конформации немодифицированного дуплекса pCCAAACA-pdTGTGGC (дуплекс (I)) в водном растворе. Следующим объектом наших исследований [2] был выбран модифицированный дуплекс (II), полученный на основе дуплекса (I) и содержащий остаток 10-(2-гидроксиэтил)феназина, ковалентно присоединенного к 5'-концевому фосфату гептануклеотида:



дуплекс (II)

С использованием 2М-¹H-ЯМР-спектров была проведена идентификация сигналов протонов олигонуклеотидного фрагмента и модифицирующей группировки, а также получена предварительная информация о взаимодействии красителя и ближайших к нему нуклеотидных звеньев.

Принятые сокращения: Phn – 10-(2-гидроксиэтил)феназин; 1М-ЯМР и 2М-ЯМР – одномерный и двумерный ЯМР; метод ОММ – метод ограниченной молекулярной механики. В обозначениях 2'-дезоксинуклеозидов префикс «d» всюду опущен.

Значения эффективного времени корреляции τ_c для некоторых пар протонов H_i-H_j

H_i-H_j	$H5(C)-H6(C)$	$H2'a-H2'b$	$H(6)-H(7)$	$H(1)/H(8)-C(14)H_2$
$r_{ij}, \text{\AA}$	2,50	1,80	2,50	1,88
$\tau_c, \text{нс}$	1,04	0,65	0,79	0,66

Настоящая публикация продолжает наши исследования пространственной структуры модифицированного дуплекса (II) в водном растворе. Для построения детальной пространственной структуры в данной работе определены расстояния между протонами, сближенными в пространстве. На основании величин $^3J_{H-H}$ для протонов $H1'$, $H2'a$, $H2'b$ и $H3'$ дезоксирибозы проведен анализ конформации углеводных циклов нуклеотидных звеньев. С использованием метода ОММ определено вероятное состояние молекулы в растворе, наилучшим образом удовлетворяющее полученному из ЯМР-эксперимента набору межпротонных расстояний.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕЖПРОТОННЫХ РАССТОЯНИЙ. Расстояния между сближенными в пространстве протонами дуплекса (II) определяли по аналогии с работой [1]. Для каждой пары протонов i и j относительное расстояние r_{ij} вычисляли из соотношения

$$\frac{r_{ij}}{r_{kl}} = \left(\frac{\sigma_{kl}}{\sigma_{ij}} \right)^{1/2}, \quad (1)$$

используя известное межпротонное расстояние r_{kl} между базисной парой протонов k и l и определяя экспериментально скорости кросс-релаксации σ_{ij} и σ_{kl} из серии 1М-ЯЭО-экспериментов [3]. Соотношение (1) выполнимо лишь в том случае, если межпротонные векторы $i-j$ и $k-l$ имеют сравнимые по величине эффективные времена корреляции τ_c . Однако до сих пор остается неясным, одинаково ли значение τ_c для любых пар протонов в молекуле ДНК-дуплекса. Ряд авторов считает (см. обзор [4] и ссылки в нем), что в дуплексе олигонуклеотидов существует внутреннее движение, обуславливающее различные времена корреляции τ_c для разных фрагментов макромолекулы. Альтернативная точка зрения заключается в том, что ДНК-дуплекс является жесткой молекулой, для которой τ_c одинаково для всех пар протонов [5]. Для выяснения этого вопроса мы определяли τ_c для некоторых пар протонов дуплекса (II), расстояния между которыми известны, фиксированы и не зависят от конформации молекулы, а именно для $H2'a-H2'b$ ($r=1,80 \text{ \AA}$), $H5(C)-H6(C)$ ($r=2,50 \text{ \AA}$), $H(6)-H(7)$ ($r=2,50 \text{ \AA}$), $H(7)-H_{C(11)H_2}$ ($r=1,88; 3,38$), $H(1)-H_{C(11)H_2}$ ($r=3,88; 1,88$)^{*}. Время корреляции для этих межпротонных векторов вычисляли, используя соотношение

$$\sigma_{ij} = \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10 r_{ij}^6} \left(\tau_c - \frac{6 \tau_c}{1 + 4 \omega^2 \cdot \tau_c^2} \right), \quad (2)$$

где σ_{ij} — скорость кросс-релаксации для протонов i и j , τ_c — эффективное время корреляции вектора между протонами i и j ; r_{ij} — расстояние между

* Поскольку один из протонов метиленовой группы $C(11)H$ находится на расстоянии $3,88 \text{ \AA}$ от $H(1)$ (или от $H(8)$), его вклад в ЯЭО не превышает 2% от вклада ближайшего протона, локализованного на расстоянии $1,88 \text{ \AA}$ от этих протонов. Поэтому при рассмотрении процессов кросс-релаксации между $H(1)/H(8)$ и $C(11)H_2$ учитывали вклад только ближайшего метиленового протона.

Значения расстояний (Å) между протонами олигонуклеотидов для разных структур *

Внутринуклеотидные расстояния							
Оси.	S(Phn)5	Эксп.	S(Phn)5 *	Оси.	S(Phn)5	Эксп.	S(Phn)5 *
H1' - H6/H8							
T-1	3,7	3,8	3,7	C-1	3,7	3,4	3,7
G-2	4,0	3,6	4,0	C-2	3,7	3,7	3,7
T-3	3,7	3,0	3,7	A-3	3,9	3,7	3,9
T-4	3,7	н. о.	3,7	A-4	3,9	3,8	3,9
T-5	3,7	3,2	3,7	A-5	3,9	3,5	3,9
G-6	4,0	3,9	4,0	C-6	3,7	3,4	3,7
G-7	4,0	3,7	4,0	A-7	3,9	3,4	3,9
C-8	3,7	3,6	3,7				
H2'a - H6/H8							
T-1	2,0	1,9	2,0	C-1	1,9	2,1	1,9
G-2	2,4	н. о.	2,4	C-2	2,0	2,1	2,0
T-3	2,1	2,0	2,1	A-3	2,1	н. о.	2,1
T-4	2,0	2,1	2,0	A-4	2,1	»	2,1
T-5	1,9	1,9	1,9	A-5	2,25	2,0	2,25
G-6	2,6	н. о.	2,6	C-6	2,05	2,0	2,05
G-7	2,3	»	2,7	A-7	2,3	2,2	2,3
C-8	2,3	»	1,7				
H1' - H2'b							
T-1	2,4	2,2	2,4	C-1	2,4	н. о.	2,4
G-2	2,4	2,3	2,4	C-2	2,4	2,2	2,4
T-3	2,4	2,0	2,4	A-3	2,4	н. о.	2,4
T-4	2,4	н. о.	2,4	A-4	2,4	2,1	2,4
T-5	2,4	1,9	2,4	A-5	2,4	2,2	2,4
G-6	2,4	н. о.	2,4	C-6	2,4	2,1	2,4
G-7	2,4	»	2,4				
C-8	2,4	»	2,4				
Межинуклеотидные расстояния							
Пара осн.	S(Phn)5	Эксп.	S(Phn)5 *	Пара осн.	S(Phn)5	Эксп.	S(Phn)5 *
H1' - H6/H8							
T-1 - G-2	3,95	н. о.	3,95	C-1 - C-2	2,9	3,7	2,9
G-2 - T-3	3,5	3,2	3,5	C-2 - A-3	3,5	3,6	3,5
T-3 - T-4	3,5	н. о.	3,5	A-3 - A-4	3,3	н. о.	3,3
T-4 - T-5	3,5	3,2	3,5	A-4 - A-5	3,3	3,3	3,3
T-5 - G-6	3,7	3,6	3,7	A-5 - C-6	3,3	3,3	3,3
G-6 - G-7	3,6	3,7	3,6	C-6 - A-7	3,8	3,6	3,8
G-7 - C-8	>5,0	---	>5,0				
H2'b - H6/H8							
T-1 - G-2	2,7	н. о.	2,7	C-1 - C-2	2,3	2,8	2,3
G-2 - T-3	2,4	2,4	2,4	C-2 - A-3	2,6	н. о.	2,6
T-3 - T-4	2,2	2,3	2,2	A-3 - A-4	2,3	»	2,3
T-4 - T-5	2,0	2,1	2,0	A-4 - A-5	2,3	2,7	2,3
T-5 - G-6	2,7	3,1	2,7	A-5 - C-6	2,2	2,3	2,2
G-6 - G-7	1,7	н. о.	1,7	C-6 - A-7	2,6	2,4	2,6
G-7 - C-8	>5,0	---	3,9				
H6/H8 - H5/CH ₃							
C-1 - C-2	3,7	3,7	3,7				
A-5 - C-6	3,9	3,6	3,9				
H2'b - H5/CH ₃							
A-5 - C-6	2,6	2,8	2,6				
H2'a - H5/CH ₃							
C-1 - C-2	3,1	2,9	3,1				

* н. о. — расстояние не удалось определить из-за перескрывания сигналов в спектре; --- взаимодействие отсутствует.

Значения расстояний для пар протонов

$$H_{Phn}-H_{Phn}, H_{Phn}-H_{ДНК}, H_{Phn}-H_{C(13,14)H_2} \text{ и } H_{ДНК}-H_{C(13,14)H_2}^*$$

H_i-H_j	$r_{ij}(\text{расч.}), \text{\AA}$				$r_{ij}(\text{эксп.}), \text{\AA}$
	S(Phn)3	S(Phn)3 *	S(Phn)5	S(Phn)5 *	
H(5) - H1'(G-7)	4,55	4,15	7,65	2,81	3,4
H(5) - H2'a, b(G-7)	3,44	3,29	6,07	2,76	3,9
H(6) - H1'(G-7)	3,42	3,09	6,75	1,75	3,2
H(6) - H2'a(G-7)	6,20	5,80	6,49	3,15	2,9
H(1) - C(12)H ₂	4,25	3,85	4,20	2,62	2,4
H(1) - C(13)H ₂	2,61	2,65	2,60	2,60	2,8
H(1) - C(14)H ₂	3,84	3,87	3,84	3,82	2,9
H(8) - C(12)H ₂	2,00	2,26	4,47	2,92	2,4
H(8) - C(13)H ₂	2,58	2,30	4,50	4,12	2,6
H(8) - C(14)H ₂	4,58	4,50	4,91	4,56	2,8
H5(C-1) - C(13)H ₂	4,27	4,50	4,86	3,23	2,7
H5(C-1) - C(14)H ₂	3,82	3,79	2,59	3,82	2,9
H5(C-1) - C(13)H ₂	2,59	2,56	3,82	2,60	2,4
H5(C-1) - C(14)H ₂	3,83	3,64	2,82	3,21	2,6
H6(C-1) - C(13)H ₂	5,27	4,99	4,44	3,01	2,8
H6(C-1) - C(14)H ₂	6,18	6,29	5,20	4,55	2,7
H6(C-1) - C(13)H ₂	4,93	5,42	3,89	6,10	2,9
H6(C-1) - C(14)H ₂	3,65	3,13	3,25	3,37	
	5,06	4,70	4,62	3,86	
	4,92	5,07	4,14	4,32	
	3,40	3,76	2,52	4,70	

* Сигналы G-7 (H2'a) и (H2'b) в ¹H-ЯМР-спектре совпадают, в экспериментах по ЯЭО наблюдается суммарный эффект.

этими протонами, ω — рабочая частота прибора (в рад·с⁻¹); γ — гиромагнитное отношение и $\hbar$ — постоянная Планка, деленная на 2π [6].

Значения τ_c , полученные из соотношения (2), представлены в табл. 1. Видно, что τ_c углеводных циклов несколько короче, чем τ_c гетероциклических оснований, что согласуется с данными работ [4, 7, 8]. Поэтому выбор нормировочного расстояния r_{ik} для определения неизвестного расстояния r_{ij} между протонами олигонуклеотидов проводили таким образом, чтобы времена корреляции межпротоновых векторов $i-j$ и $k-l$ были сравнимы по величине [2, 9, 10]. Значения расстояний между протонами олигонуклеотидов приведены в табл. 2.

Феназиниевый фрагмент и этилендиаминовая группа также более подвижны, чем гетероциклические основания олигонуклеотидов (табл. 1). Расстояния $H_{Phn}-H_{Phn}$, $H_{Phn}-H_{ДНК}$ определяли из соотношения (2), используя время корреляции ароматических протонов феназина $H(6)-H(7)$ ($\tau_c=0,79 \cdot 10^{-9}$ с). При определении расстояний $H_{C(13,14)H_2}-H_{Phn}$ и $H_{C(13,14)H_2}-H_{ДНК}$ использовали время корреляции между ароматическими и метиленовыми протонами Phn $C(11)H_2-H(1)/H(8)$ ($\tau_c=0,63 \cdot 10^{-9}$ с). Результаты вычислений приведены в табл. 3.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТ СПИН-СПИНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ. Для определения конформации углеводных циклов дуплекса (II) был проведен анализ констант спин-спиновое взаимодействия для протонов H1', H2'a, H2'b и H3' дезоксирибозы. Значения $J_{1'-2'a}$, $J_{1'-2'b}$, $J_{2'a-3'}$, $J_{2'b-3'}$, а также $\Sigma_{1'}$, $\Sigma_{2'a}$ и $\Sigma_{2'b}$ для протонов дуплекса (II) представлены в табл. 4. Видно, что разница в значениях констант для дуплексов (I) и (II) в основном не превышает предела экспериментальной ошибки. Таким образом, наличие остатка феназина в составе дуплекса практиче-

Значения констант спин-спинового взаимодействия для протонов дезоксирибозы дуплексов (I) и (II) *

Осно- вание	$J_{1'-2'a}$	$J_{1'-2'b}$	$J_{2a'-3'}$	$J_{2'b-3'}$	$J_{2'a-2'b}$	$\Sigma_{1'}$	$\Sigma_{2'a}$	$\Sigma_{2'b}$
T-1	9,8 (8,8)	4,9 (5,9)	4,8 (5,0)	0,9 (1,9)	14,7 (12,6)	14,7 (14,6)	29,3 (26,4)	20,5 (20,3)
G-2	9,8 (9,1)	4,9 (5,9)	2,9 (2,5)	1,6 (2,0)	14,7 (14,0)	14,6 (15,0)	27,4 (25,6)	21,5 (20,5)
T-3	7,8 (9,8)	5,9 (4,9)	5,6 н. о.	0,6 (2,9)	14,0 (16,6)	13,7 (14,7)	27,4 н. о.	20,5 (24,4)
T-4	7,8 (9,8)	5,9 (4,9)	3,6 н. о.	1,6 (2,4)	13,0 (16,6)	13,7 (14,7)	24,4 н. о.	20,5 (23,9)
T-5	8,8 (8,1)	4,9 (5,9)	4,9 (3,6)	3,0 (1,9)	14,6 (14,7)	14,6 (14,0)	28,3 (26,4)	22,5 (22,5)
G-6	9,8 н. о.	4,9 н. о.	н. о. »	н. о. »	н. о. »	14,7 (15,6)	н. о. (27,3)	н. о. (20,5)
G-7	8,8 н. о.	4,9 н. о.	» »	» »	» »	13,7 н. о.	н. о. »	н. о. »
C-8	6,8 (7,8)	3,9 (5,9)	» (5,8)	» (3,5)	» (13,5)	10,7 (13,7)	» (27,2)	» (22,3)
C-1	9,8 (7,8)	4,9 (6,9)	2,8 (3,9)	1,9 (1,9)	14,7 (14,7)	15,7 (13,7)	27,3 (26,4)	20,5 (22,5)
C-2	9,8 (7,8)	4,9 (5,9)	3,0 (2,9)	1,9 (1,0)	13,7 (14,7)	15,6 (14,7)	27,4 (25,4)	20,5 (22,5)
A-3	9,8 н. о.	5,7 н. о.	3,6 н. о.	1,8 н. о.	14,0 н. о.	15,5 (14,6)	27,4 (26,4)	21,5 н. о.
A-4	9,8 (8,8)	4,9 (4,9)	3,9 н. о.	2,9 (2,0)	13,7 (15,6)	14,7 (13,7)	27,4 н. о.	21,5 (22,4)
A-5	9,8 (8,8)	5,9 (4,9)	» »	0,8 (2,0)	15,6 (15,5)	14,7 (13,7)	» »	22,3 (22,4)
C-6	8,8 (7,8)	5,0 (5,9)	5,8 (4,7)	1,8 (2,0)	13,7 (14,7)	14,7 (13,7)	28,3 (27,2)	20,5 (22,5)
A-7	7,8 ---	5,9 ---	6,9 ---	1,0 ---	13,6 ---	13,7 ---	28,3 ---	20,5 ---

* В скобках приведены соответствующие значения констант спин-спинового взаимодействия для немодифицированного дуплекса (I). н. о. — константа не определена из-за перекрывающихся сигналов; --- константы не приведены, так как в дуплексе (II) АА-7 заменен на ГА-7.

Таблица 5

Значения энергий оптимальных конформаций дуплекса (II) (ккал/моль)

Структура	S(Phn)1	S(Phn)2	S(Phn)3	S(Phn)4	S(Phn)5	S(Phn)3 *	S(Phn)5 *
Полная энер- гия дуплекса	-104,8	-125,7	-125,4	-128,9	-129,2	-131,5	-128,5

если не меняет конформационное состояние углеводных циклов, которое также описывается S-типом конформации дезоксирибозы.

ПОСТРОЕНИЕ СТРУКТУРЫ ДУПЛЕКСА (II) В РАСТВОРЕ проводили методом ОММ по аналогии с работой [1]. Качественный анализ данных по ЯЭО показал [2], что наличие остатка Рнл в составе дуплекса (II) не вносит существенных изменений в структуру его двойной спирали. Основные конформационные изменения затрагивают только ближайшую к Рнл область дуплекса, а именно дуплекстидные звенья С-1, G-7 и

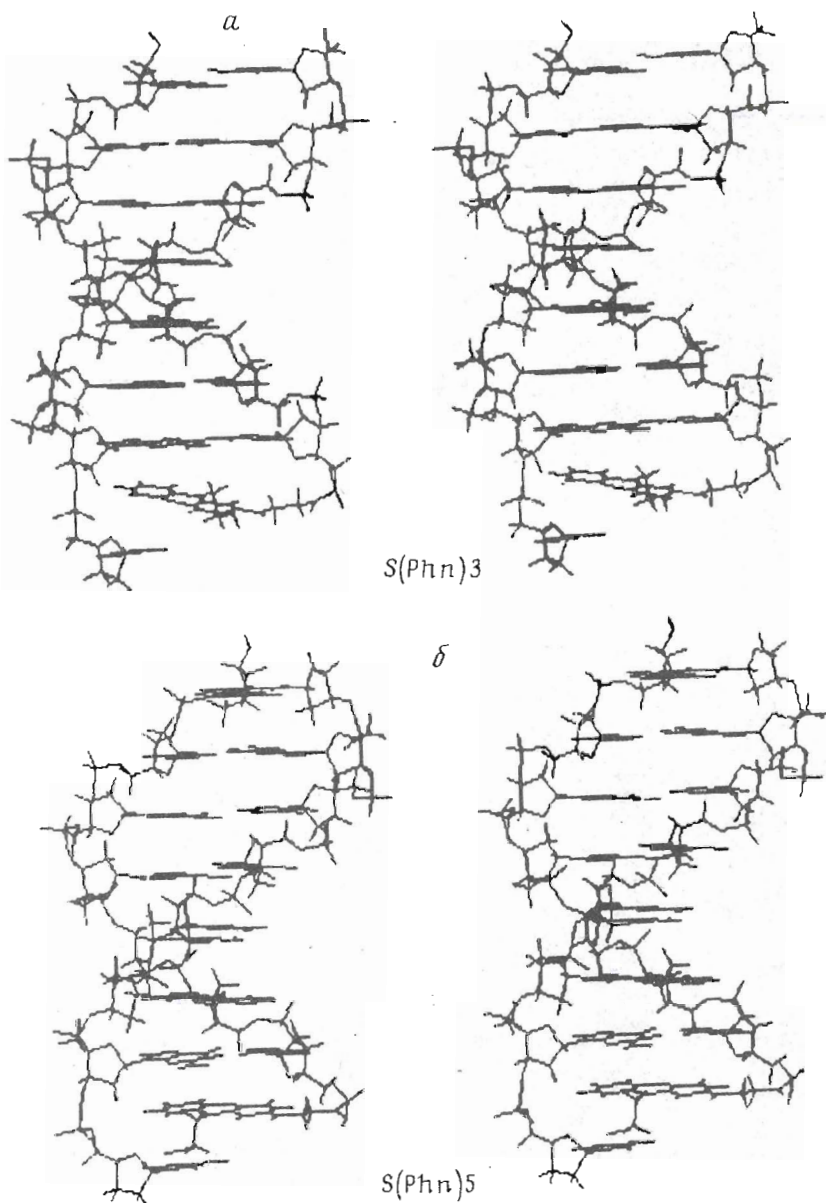


Рис. 1. Стереопары конформаций дуплекса (II), полученные в результате энергетической минимизации: $S(Phn)3$ (а), $S(Phn)5$ (б)

С-8. Поэтому при оптимизации структуры методом ОММ в качестве стартовой конформации для олигонуклеотидного фрагмента молекулы рассматривали структуру $S1^*$, полученную при оптимизации исходного немодифицированного дуплекса (I) [1]. На ее основе были определены оптимальные по энергии конформации дуплекса (II), которые различаются положением феназиевого фрагмента в структуре молекулы. Расчеты энергии показали, что возможны три типа ориентации красителя. Один из вариантов предполагает локализацию Phn в области большой бороздки вдоль оси дуплекса. Другой вариант — это интеркаляция полициклической си-

системы феназина между парами оснований C-2-G-6 и C-1-G-7. Третий вариант — стэкинг-взаимодействие остатка феназина с парой C-1-G-7 со стороны нуклеотида C-8. Этому состоянию соответствуют структуры S(Phn)3 (рис. 1а), S(Phn)4 и S(Phn)5 (рис. 1б), которые различаются либо конформацией углеводного цикла при G-7 (3'-*эндо*-конформация в структуре S(Phn)4, 2'-*эндо*-конформация в структурах S(Phn)3 и S(Phn)5), либо ориентацией плоскости красителя: структура S(Phn)5 отличается от S(Phn)3 и S(Phn)4 поворотом плоскости полициклической системы феназина на 180° вокруг связи C(2)-N. Конформационные энергии, рассчитанные для структур S(Phn)1-S(Phn)5, приведены в табл. 5. Видно, что их значения совпадают с точностью до величины тепловых флуктуаций (± 5 ккал/моль), за исключением неинтеркалирующей структуры S(Phn)1.

Анализ констант спин-спинового взаимодействия протонов сахаров (см. табл. 4) показал, что все углеводные циклы находятся в 2'-*эндо*-конформации, что позволяет исключить структуру S(Phn)4 из рассмотрения в качестве стартовой для оптимизации геометрии дуплекса (II). Экспериментальные данные по ЯЭО между протонами красителя и протонами олигонуклеотидов, свидетельствующие об интеркаляции феназиниевого красителя между основаниями G-7 и C-8 [2], позволили также исключить из рассмотрения структуры S(Phn)1 и S(Phn)2. Поэтому для дальнейшей оптимизации структуры дуплекса (II) были выбраны стартовые конформации S(Phn)3 и S(Phn)5.

Оптимизацию проводили по спиральным и торсионным параметрам феназина и ближайших к нему звеньев (C-1, G-7, C-8) с учетом экспериментальных ограничений на расстояния. В качестве варьируемых были выбраны следующие параметры: угол спирального вращения, угол наклона, угол проецилера, дислокация, фазовый угол псевдовращения, задающий конформацию сахарного кольца, торсионный угол гликозидной связи и все торсионные углы линкера, соединяющего остаток феназина с дуплексом.

Оптимизацию проводили по функционалу, который является суммой полной энергии и геометрического штрафа отклонений расчетных расстояний от соответствующих расстояний, полученных из эксперимента. Геометрический штраф описывали в виде гармонического псевдопотенциала ограничений ЯЭО [4, 11]:

$$E_{\text{ЯЭО}} = C_{-}(r_{ij}^0 - r_{ij}), \text{ если } r_{ij}^0 > r_{ij}$$

$$C_{+}(r_{ij} - r_{ij}^0), \text{ если } r_{ij}^0 < r_{ij}$$

$$C_{+,-} = \alpha kT/(\Delta r_{ij+,-})^2,$$

где r_{ij}^0 и r_{ij} — экспериментальные и расчетные значения межпротонных расстояний, $C_{+,-}$ — силовые константы, значения которых зависят от погрешности определения расстояний r_{ij}^0 , k — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура, α — масштабный фактор, равный 2, $\Delta r_{ij+,-}$ — погрешности определения расстояния r_{ij}^0 .

Величину погрешностей определения расстояний $\Delta r_{ij+,-}$ оценивали по аналогии с работами [1, 11]: для $r_{ij}^0 < 2,0$ Å ошибка составляет $-0,1/+0,2$ Å, для $2,0 < r_{ij}^0 < 2,4$ Å — $0,2/+0,3$ Å, для $2,4 < r_{ij}^0 < 3,4$ Å — $-0,4/+0,4$ Å, для $3,4 < r_{ij}^0 < 4,0$ Å — $-0,4/+0,5$ Å.

Для $\Delta r_{ij+,-} = 0,10, 0,15, 0,20, 0,30$ и $0,40$ Å были получены значения силовых констант $C_{+,-}$, равные 119, 53, 29, 13,2 и 7,5 соответственно [1].

В результате оптимизации структур S(Phn)3 и S(Phn)5 были получены структуры S(Phn)3* (рис. 2а) и S(Phn)5* (рис. 2б). Значения расстояний между протонами феназиниевого фрагмента и протонами олиго-

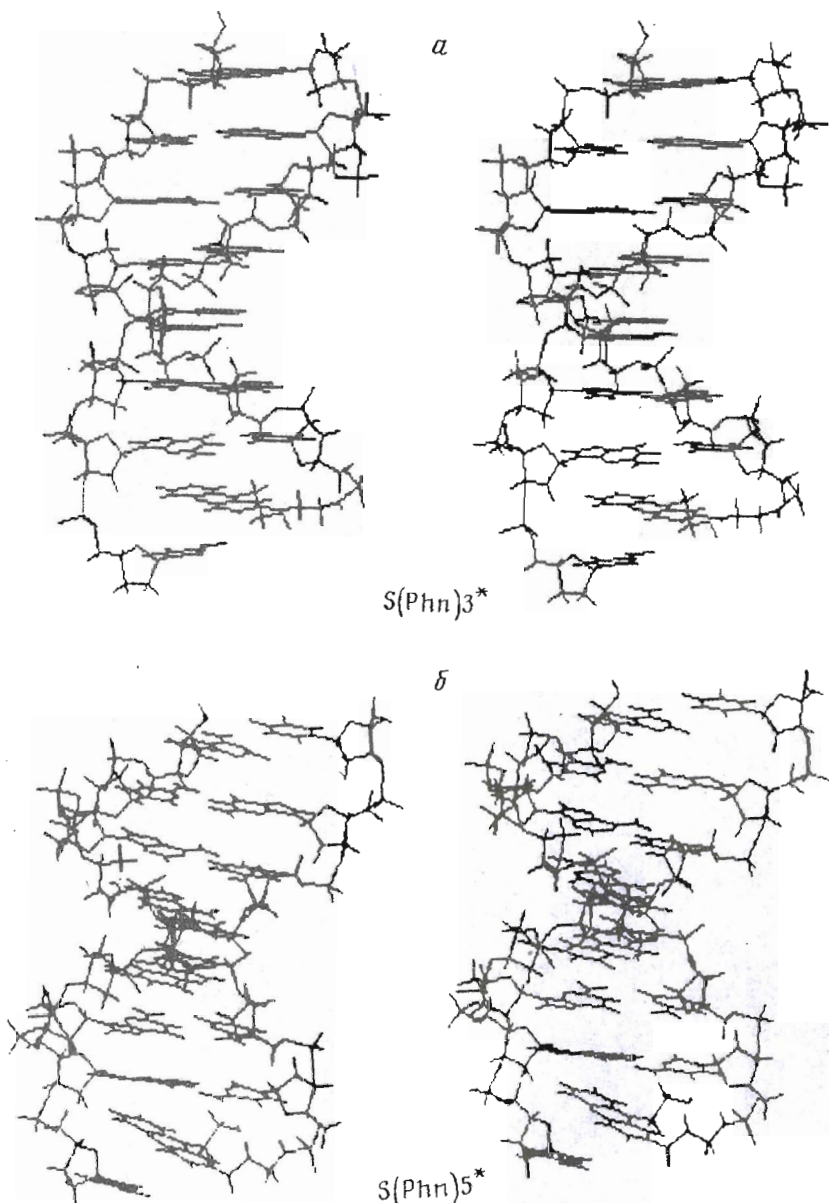


Рис. 2. Стереопары конформаций динуклеотида (II) после оптимизации структур с учетом данных ЯМР: $S(\text{Phn})3^*$ (а) и $S(\text{Phn})5^*$ (б)

нуклеотидных звеньев для расчетных структур $S(\text{Phn})3$, $S(\text{Phn})3^*$ и $S(\text{Phn})5$, $S(\text{Phn})5^*$ приведены в табл. 3.

Видно, что структура $S(\text{Phn})3^*$ не соответствует экспериментальным данным (см., например, расстояния $\text{H}(6) - \text{H}1'(\text{G}-7)$, $\text{H}5(\text{C}-1) - \text{C}(14)\text{H}_2$, $\text{H}6(\text{C}-1) - \text{C}(14)\text{H}_2$). В силу этого структура $S(\text{Phn})3^*$ исключена из дальнейших обсуждений как не соответствующая реально существующей в растворе.

Структура $S(\text{Phn})5^*$, полученная в результате оптимизации $S(\text{Phn})5$, с одной стороны, соответствует минимуму энергии, а с другой — в целом удовлетворяет полученному из эксперимента набору межпротонных рас-

стояний. Значения внутри- и межукулеотидных межпротонных расстояний для расчетных структур $S(\text{Phn})5$ и $S(\text{Phn})5^*$ приведены в табл. 2.

Обсуждение результатов

С целью построения пространственной модели дуплекса (II) в растворе нами был получен набор межпротонных расстояний из серии 1М-ЯМР-экспериментов. Эти расстояния затем были использованы в качестве экспериментальных ограничений при оптимизации стартовой структуры $S(\text{Phn})5$, теоретически рассчитанной методом ОММ. В результате оптимизации получена структура $S(\text{Phn})5^*$, которая соответствует минимуму функционала ОММ. Феназиновое кольцо в этой структуре находится в стэкинге с последней парой дуплекса C-1—G-7 на расстоянии ~ 4 и ~ 5 Å от неспаренного нуклеозидного звена C-8. Такое взаимодействие должно (и это найдено экспериментально) резко увеличить стабильность дуплекса (II) по сравнению с немодифицированным дуплексом (I). Действительно, это проявляется в повышенной температуре плавления дуплекса (II) по сравнению с дуплексом (I) [12], а также в наличии в ЯМР-спектре первого дополнительного сигнала протона водородной связи C-1—G-7 (в дуплексе (I) этот сигнал отсутствует). Таким образом, в результате проведенной работы найдено структурное объяснение ряда экспериментальных свойств дуплекса (II).

С другой стороны, хотя расчетные расстояния для структуры $S(\text{Phn})5^*$ в основном воспроизводят экспериментальные расстояния в пределах погрешности (табл. 2 и 3), нам не удалось получить полного соответствия между расчетными и экспериментальными данными. Так, расстояния $\text{H}(5) - \text{H}'(\text{G}-7)$ и $\text{H}(5) - \text{H}''(\text{G}-7)$, рассчитанные для структуры $S(\text{Phn})5^*$, заметно короче соответствующих расстояний, полученных из эксперимента; расстояния $\text{H}5(\text{C}-1) - \text{C}(14)\text{H}_2$, $\text{H}6(\text{C}-1) - \text{C}(13)\text{H}_2$ и $\text{H}6(\text{C}-1) - \text{C}(14)\text{H}_2$, напротив, существенно завышены по сравнению с экспериментальными данными.

Таким образом, основной особенностью расчетной структуры $S(\text{Phn})5^*$ по сравнению со структурой, реально существующей в растворе, является большая сближенность феназинового кольца с нуклеотидным звеном G-7. В то же время связующий этилендиаминовый фрагмент в расчетной структуре оказывается несколько удаленным от протонов гетероциклического основания C-1. Вероятно, это объясняется тем, что структура потенциальных функций, достаточно хорошо описывающая атом-атомные взаимодействия нуклеотидных фрагментов внутри дуплекса, не в полной мере учитывает взаимодействия атомов остатка феназина и его линкера с растворителем и противоионами на границе дуплекс — растворитель. В результате оптимизации равнодействующая всех взаимодействий несколько смещает феназиновый фрагмент ближе в сторону нуклеозидного остатка G-7 (примерно на 1—1,5 Å) по сравнению с его расположением, вытекающим из экспериментальных расстояний. В дальнейшем для более точного описания пространственной структуры модифицированных дуплексов, содержащих одновременно гидрофобные и полярные фрагменты в составе заместителя, требуется детальная проработка описания потенциальных функций взаимодействия подобных полициклических гетероароматических производных со средой.

Экспериментальная часть

Приготовление образца для записи спектров ^1H -ЯМР подробно описано в работах [1, 2].

^1H -ЯМР-спектры записывали при 400 МГц на спектрометре «АМ-400» (Bruker, ФРГ), оснащенном компьютером Aspect-3000.

Величины констант спин-спинового взаимодействия определяли, используя фазочувствительные COSY-DQF спектры [2]. Для получения точной структуры кросс-пиков повышали цифровое разрешение вдоль направления ω_2 (разрешение по ω_2 составляло 0,9 Гц, по ω_1 — 7,0 Гц). Анализ структуры кросс-пиков проводили вдоль ω_2 , как было описано ранее [1]. Точность определения J -констант составляла ± 1 Гц. Для определения величин ЯЭО в одномерных спектрах ЯМР проводили селективное облучение низкой мощностью на частоте выбранного резонанса и вне резонанса. Время предоблучения варьировалось от 0,05 до 0,40 с. Ширина спектра 4000 Гц, длина данных 32 К. Задержка между импульсами 2 с. Дифференциальный спектр получали, вычитая из спектра, полученного с насыщением тестируемого сигнала, спектр без насыщения.

Расчеты оптимальных конформаций дуплекса проводили на ЭВМ IBM/386/25 МГц, оснащенной сопроцессором 387 по методике [4].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биченкова Е. В., Воробьев Ю. Н., Кутявин И. В., Лебедев А. В., Мальцева Т. В., Тенне Е. Ю. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 9. С. 1236–1258.
2. Биченкова Е. В., Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Лебедев А. В., Мальцева Т. В., Сальникова Г. Е. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 3. С. 398–412.
3. Clore G. M., Gronenborn A. M. // J. Magn. Reson. 1985. V. 61. № 1. P. 158–164.
4. Clore G. M., Gronenborn A. M. // Prog. NMR Spectrosc. 1985. V. 17. P. 1–32.
5. Reid B. R., Banks K., Flynn P., Nerdal W. // Biochemistry. 1989. V. 28. № 20. P. 10001–10007.
6. Solomon I. // Phys. Rev. 1955. V. 90. № 2. P. 559–565.
7. Clore G. M., Gronenborn A. M. // FEBS Lett. 1984. V. 172. № 1. P. 219–223.
8. Clore G. M., Gronenborn A. M. // FEBS Lett. 1984. V. 175. № 1. P. 117–121.
9. Clore G. M., Gronenborn A. M. // EMBO J. 1983. V. 2. № 11. P. 2109–2113.
10. Gronenborn A. M., Clore G. M., Kimber B. J. // Biochem. J. 1984. V. 221. № 4. P. 723–736.
11. Clore G. M., Gronenborn A. M., Brunger A. T., Karplus M. // J. Mol. Biol. 1985. V. 186. № 2. P. 435–455.
12. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сальников В. Н., Шишкин Г. В. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 911–920.

Поступила в редакцию

20.XII.1991

После доработки

20.II.1992

E. V. BICHENKOVA, L. A. GORENSHTEIN, Yu. N. VOROB'EV, E. Yu. TENNE,
V. F. ZARYTOVA, E. M. IVANOVA, T. V. MALTSEVA, A. V. LEBEDEV

INVESTIGATION OF THE SPATIAL STRUCTURE OF DUPLEX (Phn-NH(CH₂)₂NH)pd(CCAAACA)-pd(TGTTTGGC) HAVING COVALENTLY LINKED N-(2-HYDROXYETHYL)-PHENAZINE BY MEANS OF 2D-¹H-NMR SPECTROSCOPY IN AQUEOUS SOLUTION AND BY RESTRAINED MOLECULAR MECHANICS

Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division,
Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

Detailed investigation of the spatial structure of duplex (Phn-NH(CH₂)₂NH)X × pd(CCAAACA)-pd(TGTTTGGC) having a covalently linked N-(2-hydroxyethyl)-phenazine in aqueous solution was continued by means of one- and two-dimensional ¹H-NMR spectroscopy. Distances between the protons of the oligonucleotides as well as distances between the phenazinium and the nearest nucleotide groups' protons were determined from the series of one-dimensional NOE experiments. The effective correlation time τ_c determined for some proton pairs shows the phenazinium fragment to have greater internal motion than the heterocyclic bases. The deoxyribose protons coupling constants show the sugars to be in 2'-endo-conformation. The restrained molecular mechanics have yielded a possible structure of duplex in the aqueous solution fitting the experimental set of interproton distances.