



УДК 547.963.32:543.422.25:539.194

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННОГО СОСТОЯНИЯ  
 $\gamma$ -*n*-АЗИДОАНИЛИДА АТР В КОМПЛЕКСЕ С  $Mn^{2+}$   
МЕТОДАМИ ЯМР И АТОМ-АТОМНЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ

Абрамова Т. В., Воробьев Ю. Н., Дашкевич Е. Ю.,  
Лебедев А. В.

Новосибирский институт биоорганической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР

С использованием данных спин-решеточной релаксации  $^1H$  и  $^{31}P$  и теоретических расчетов методом атом-атомных потенциалов установлено, что в водном растворе  $\gamma$ -*n*-азидоанилид АТР (ААТР) в комплексе с ионом  $Mn^{2+}$  существует преимущественно в виде смеси двух конформеров. Два основных конформера  $\gamma$ -*n*-азидоанилида АТР, присутствующие с весами 60 и 40%, — это «свернутые» молекулы с расстояниями между ароматическими кольцами 5–6 Å. В обоих конформерах основание аденина находится в *анти*-ориентации, но в одном конформации рибозы  $^3E$ , конформация трифосфатной цепочки  $g^+g^+$ ,  $g^-g^-$ ,  $g^-g^-$ , а в другом —  $^2E$ ,  $g^-g^-$ ,  $g^-g^-$ ,  $g^-g^-$ . Ион  $Mn^{2+}$  с каждым из конформеров ААТР образует два-три комплекса с различной координацией иона. Комплексы ААТР- $Mn^{2+}$  образуются замещением двух молекул воды в гидратной оболочке иона  $Mn^{2+}$  на фосфорильные атомы кислорода или N7 аденина. Ион  $Mn^{2+}$  образует комплекс внутренней сферы с двумя из четырех ион-связывающих центров:  $R_{\alpha}$ ,  $R_{\beta}$ ,  $R_{\gamma}$ , N7(A) и комплексы внешней сферы с двумя другими центрами.

$\gamma$ -Производные нуклеозид-5'-трифосфатов широко используются в качестве аффинных реагентов для модификации различных ферментов [1]. Сходство или различие конформаций этих соединений и соответствующих природных субстратов может играть решающую роль в направленности и эффективности аффинной модификации. В большинстве случаев, однако, конформации  $\gamma$ -производных нуклеозид-5'-трифосфатов остаются неизвестными.

Наиболее информативным методом для изучения конформации производных нуклеотидов в растворе в настоящее время является метод ЯМР [2, 3]. Однако в случае конформационно подвижных молекул он дает усредненную во времени картину состояния молекулы. Определить, основываясь только на экспериментальных данных, состав равновесной смеси и геометрию отдельных конформеров, находящихся в динамическом равновесии, часто бывает невозможно.

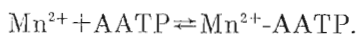
Существенно большую информацию о состоянии молекулы в растворе можно извлечь сочетанием метода ЯМР и теоретических конформационных расчетов. Этот подход был реализован для изучения конформаций динуклеотидов в растворе по данным о скоростях СРР и константах спин-спиновой взаимоделия [4, 5], а также при исследовании конформации 2'-дезокситимидин-3',5'-циклопиррофосфата [6]. В настоящей работе проведено исследование конформационного состояния  $\gamma$ -*n*-азидоанилида АТР — одного из наиболее эффективных аффинных реагентов, используемых для модификации АТР-узнающих участков различных ферментов [1, 7–15]. В качестве экспериментальных параметров предлагается использовать значения скоростей СРР релаксирующих ядер молекулы в комплексе с парамагнитным ионом  $Mn^{2+}$ . Это позволяет определить состояния от релаксирующих ядер до иона. Методом атом-атомных потенциалов были рассчитаны пространственно разрешенные конформации ААТР в комплексе с  $Mn^{2+}$ . Для найденных конформеров определены состояния от  $Mn^{2+}$  до ряда протонов и ядер фосфора и для всех этих ядер

Сокращения: СРР — спин-решеточная релаксация, ААТР —  $\gamma$ -*n*-азидоанилид АТР.

вычислены теоретические значения скоростей спин-решеточной релаксации  $1/T_{1P}$ , обусловленные присутствием парамагнитного иона  $Mn^{2+}$ . Сопоставление соответствующих экспериментальных и теоретических величин  $1/T_{1P}$  дало возможность определить наиболее вероятный состав смеси конформеров ААТР в комплексе с  $Mn^{2+}$ , существующий в водном растворе при концентрации ААТР  $10^{-2}$  М.

В табл. 1 приведены значения химических сдвигов  $^1H$ -ЯМР для АТР,  $\gamma$ -анилида АТР и ААТР (в отсутствие ионов  $Mn^{2+}$ ). Отнесение сигналов в спектре ААТР проведено на основании анализа тонкой структуры сигналов, экспериментов по двойному резонансу, а также на основании сопоставления со спектрами АТР и  $\gamma$ -анилида АТР. (Для  $\gamma$ -анилида АТР отнесение сигналов в спектре  $^1H$ -ЯМР не вызывает затруднений.) Так, отнесение сигналов протонов *n*-азидоанилидного кольца ААТР основано на известном факте, что замещение протона на азидогруппу вызывает смещение сигналов протонов, находящихся в *орто*-положении, на 0,4 м.д., а *мета*-протонов — на 0,1 м.д. в сильное поле [16]. Действительно, сопоставление химических сдвигов соответствующих протонов  $\gamma$ -анилида АТР и ААТР полностью согласуется с предлагаемым отнесением сигналов. Значительное смещение сигналов ароматических протонов аденинового кольца ААТР по сравнению с АТР (на 0,26 м.д. для H8 и 0,16 м.д. для H2) в область сильного поля свидетельствует о влиянии кольцевых токов *n*-азидоанилидного кольца, т. е. о пространственной близости двух ароматических систем. Аналогичные выводы можно сделать и о  $\gamma$ -анилиде АТР. Значения химических сдвигов и отнесение в спектрах  $^{31}P$ -ЯМР ААТР и  $\gamma$ -анилида АТР совпадают с данными работы [17]. Отметим, что ионы  $Mn^{2+}$  в концентрации в  $10^3$ – $10^4$  меньшей, чем концентрация ААТР, не оказывают заметного влияния на химические сдвиги сигналов в спектрах  $^1H$ - и  $^{31}P$ -ЯМР.

Основной эффект ионов  $Mn^{2+}$  проявляется в увеличении скоростей спин-спиновой ( $1/T_2$ ) и спин-решеточной релаксации ( $1/T_1$ ). Это объясняется тем, что при добавлении соли  $Mn^{2+}$  к раствору ААТР ион  $Mn^{2+}$  обратимо образует комплексы с нуклеотидом:



Парамагнитный вклад иона в увеличение скорости СРР ( $1/T_{1P}$ ) определяется формулой [18, 19]

$$1/T_{1P} = 1/T_1 - 1/T_{10},$$

где  $1/T_1$  и  $1/T_{10}$  — наблюдаемые скорости СРР ядра в присутствии и в отсутствие  $Mn^{2+}$ . В свою очередь нормализованный парамагнитный вклад  $Mn^{2+}$  в скорость СРР ( $1/fT_{1P}$ ) связан с временем жизни ( $\tau_M$ ) комплекса  $Mn^{2+} \cdot ААТР$  и с временем СРР ядра в этом комплексе ( $T_{1M}$ ):

$$1/fT_{1P} = \frac{1}{T_{1M} + \tau_M},$$

где  $f$  — доля молекул ААТР, связанных с  $Mn^{2+}$ .

Таблица 1

Значения химических сдвигов  $^1H$ -ЯМР АТР, ААТР,  $\gamma$ -анилида АТР в  $D_2O$  при  $23^\circ C$   
Концентрация всех соединений 9,2 мМ, рН 7,5

Соединение	Химический сдвиг, м. д.									
	H2	H8	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'(5'') *	H <sub>орто</sub>	H <sub>мета</sub>	H <sub>пара</sub>
АТР	8,395	8,605	6,140	**	**	**	**	—	—	—
ААТР	8,236	8,344	6,006	4,312	4,286	4,204	4,102	6,873	6,602	—
$\gamma$ -Анилид АТР	8,206	8,396	6,003	**	**	**	**	6,928	7,034	6,666

\* Приведено положение центра сигналов двух протонов.

\*\* Значение не определяли.

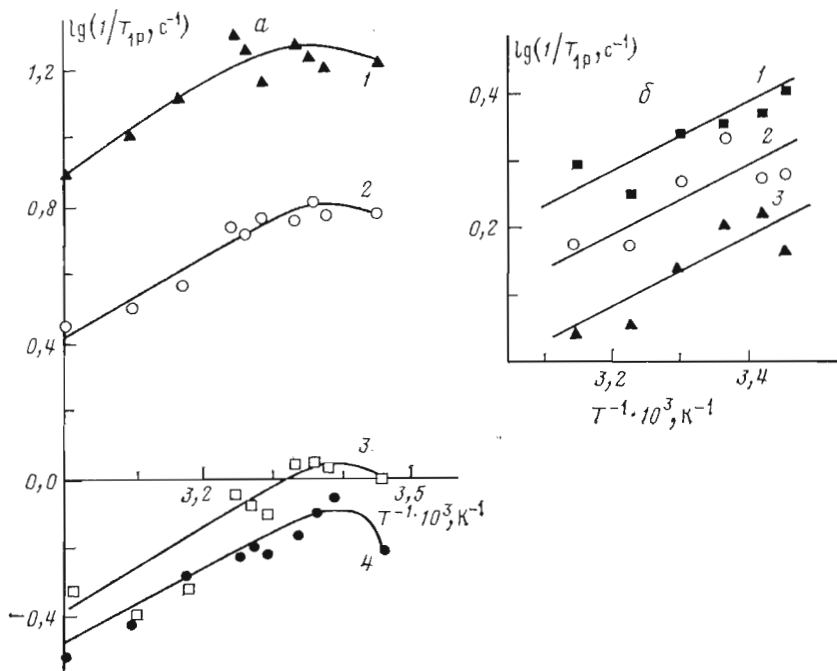


Рис. 1. Зависимость парамагнитного вклада  $Mn^{2+}$  в скорость СРР ядер  $^1H$  и  $^{31}P$  ААТР от обратной температуры: а — для  $N_8$  (1),  $N_{ortho}$  (2),  $N_{1'}$  (3),  $N_2$  (4); б — для  $P_a$  (1),  $P_b$  (2),  $P_t$  (3)

Так как константа ассоциации  $Mn^{2+}$  с фосфатными группами достаточно велика ( $\sim 10^3 M^{-1}$  [20]), то при выполнении условия  $[Mn^{2+}] \ll [AATR]$  можно с большой точностью считать, что  $f \approx [Mn^{2+}] / [AATR]$ . В изученном нами случае с повышением температуры от 60 до 30° С наблюдается возрастание величины  $\lg(1/fT_{1P})$  (см. рис. 1). Это означает, что в указанном диапазоне температур для системы  $Mn^{2+} + AATR$  выполняется условие быстрого химического обмена. В этом случае  $\tau_M \ll T_{1M}$  или  $1/fT_{1P} \approx 1/T_{1M}$  [18, 19]. При дальнейшем понижении температуры на кривых может наблюдаться максимум (рис. 1, а, 25° С), а далее величина  $\lg(1/fT_{1P})$  начинает несколько падать, что свидетельствует о переходе в область медленного химического обмена, где  $\tau_M \gg T_{1M}$ , т. е.  $1/fT_{1P} \approx \tau_M$ . Аналогичные результаты получены для комплекса  $Mn^{2+}$  и АТР [20–22]. В свою очередь величина  $1/T_{1M}$  прямо связана с расстоянием между  $Mn^{2+}$  и релаксирующим ядром уравнением Соломона — Бломбергена [23–25] (см. «Экспериментальную часть»). В табл. 2 приведены значения  $T_1$  и  $T_{10}$  (из которых легко определить величины  $1/fT_{1P}$ ) для ядер  $^1H$  и  $^{31}P$ , а также расстояния от  $Mn^{2+}$  до этих ядер. Эти данные, однако, характеризуют только среднестатистическое состояние ААТР в комплексе с  $Mn^{2+}$ . Для количественного анализа конформационной ситуации в растворе мы провели теоретические расчеты конформации ААТР в комплексе с  $Mn^{2+}$  методом атом-атомных потенциалов. Детали расчета и параметризация описаны в «Экспериментальной части».

Сначала были определены наиболее вероятные конформации ААТР без иона  $Mn^{2+}$ . Множество конформационных состояний молекулы ААТР является произведением множеств конформационных состояний нуклеозидной (А) и  $\gamma$ -азидоапилидной ( $Azrrrr$ ) частей молекулы. В качестве стартовых конформаций А-части были выбраны стандартные значения конформационных параметров для нуклеотидов в растворе [26] —  $\chi$  (анти или син),  $P$  ( $N$  или  $S$ ),  $\psi$  ( $g^+$ ,  $t$  или  $g^-$ ) и  $\phi$  (только  $t$ ) (обозначение углов на рис. 2) — и рассматривались все их возможные комбинации. Для определения стартовых конформаций  $Azrrrr$ -части были рассчитаны конформационные карты  $(\omega_i, \omega'_i)$  и  $(\omega'_i, \omega_{i+1})$ . Получено, что каждый из углов  $\omega$ ,  $\omega'$  может находиться в  $g^+$ - или  $g^-$ -областях, а углы  $\omega_2$ ,  $\omega'_2$  дополни-



Параметры оптимальных конформаций ААТР

Конформация	Конформационные углы *, град											Энергия, ккал/моль				
	P	ψ	φ	χ	ω <sub>1</sub>	ω <sub>1</sub> '	ω <sub>2</sub>	ω <sub>2</sub> '	ω <sub>3</sub>	ω <sub>3</sub> '	E <sub>M</sub>	U <sub>нев</sub>	U <sub>эл</sub>	U <sub>торс</sub>	E <sub>пол</sub>	
1	6	60	168	120	73	84	303	281	292	296	-17,3	0,1	-18,0	2,2	-1,6	
2	186	65	181	139	72	64	70	87	69	64	-16,8	1,9	-19,3	2,0	-1,5	
3	8	65	142	103	71	58	67	90	68	61	-15,1	3,1	-19,2	2,2	-1,4	
4	175	67	152	110	72	71	300	283	296	298	-15,0	2,8	-18,7	2,4	-1,5	
5	10	66	202	85	71	68	76	89	307	295	-14,6	2,5	-18,4	2,7	-1,5	
6	4	180	187	50	75	68	77	79	67	60	-14,0					
7	10	178	189	130	288	299	289	274	290	300	-13,7					
8	15	171	235	76	72	76	82	81	305	296	-13,6					
9	8	66	193	162	288	297	258	267	51	63	-13,6					
10	13	181	163	92	73	76	298	283	290	299	-13,3					
A 2*			t	анти	64	164	232	84	235							
B 2*			t	анти	310	291	51	241	160							
C 3*					210	300	405	285	75	300						
D 3*					180	300	90	292	55	296						
E 4*					g <sup>-</sup>	g <sup>-</sup>	g <sup>-</sup>	g <sup>-</sup>	g <sup>-</sup>	g <sup>-</sup>						

\* φ — C3' — C4' — C5' — O5', ψ — C4' — C5' — O5' — Pα, χ — C4' — N9 — C1' — C2', ω<sub>1</sub> — C5' — O5' — Pα — Oαβ, ω<sub>1</sub>' — O5' — Pα — Oαβ, ω<sub>2</sub> — Pβ — Oβγ, ω<sub>2</sub>' — Oβγ — Pβ — Oβγ, ω<sub>3</sub> — Pβ — Oβγ — Pγ — Nγ, ω<sub>3</sub>' — Oβγ — Pγ — Nγ — C, P — фазовый угол псевдотвращения, E<sub>M</sub> — полная энергия молекул, U<sub>нев</sub> — энергия невалентных взаимодействий, U<sub>эл</sub> — энергия электростатических взаимодействий, U<sub>торс</sub> — энергия торсионных взаимодействий, E<sub>пол</sub> — энергия полимеризации растворителя.

\*\* A, B — две формы АТР в элементарной ячейке кристалла [28].

\*\*\* C, D — оптимальные конформации трифосфатной цепи АТР, рассчитанные методом Хьюнеля [29].

\*\*\*\* E — область оптимальных торсионных углов трифосфатной цепи АТР (рассчитано расширенным методом Хьюнеля [30]).

шихся по энергии от конформации с минимальной энергией не более чем на 4 ккал/моль. Рассмотрение конформаций с более высокой энергией нецелесообразно, так как в растворе доля конформеров в равновесной смеси экспоненциально уменьшается с ростом их энергии. Низкоэнергетические конформации Азррр-части характеризуются свернутой структурой, в которой  $\gamma$ -фосфат направлен в сторону нуклеотидной части.

Аналогичная геометрия трифосфатной цепи обнаружена в кристаллической структуре натриевой соли АТР [28]. Исследования конформации АТР методом атом-атомных потенциалов [29] и квантовой химии [30] приводят к структурам, в которых  $\gamma$ -фосфат удален от нуклеотидной части, хотя в трифосфатной цепочке подтверждается принцип скрещенности для фосфорильных кислородов. По-видимому, в работах [29, 30] переоценено электростатическое взаимодействие  $\alpha$ - и  $\gamma$ -фосфатных групп, так как расчеты выполнены для вакуума без учета влияния растворителя.

Из оптимальных по энергии конформаций ААТР составляли комплексы с ионом  $Mn^{2+}$ . Для определения стартовых позиций иона  $Mn^{2+}$  анализировали распределение электростатического потенциала вокруг молекулы ААТР. Найдено, что в каждой конформации ААТР существует несколько (4–6) локальных минимумов электростатического потенциала. Эти минимумы служили стартовым положением для иона  $Mn^{2+}$ . Конформации каждого комплекса ААТР- $Mn^{2+}$  оптимизировали по координатам иона  $Mn^{2+}$  и всем углам внутреннего вращения ААТР. Из общих соображений ясно, что наиболее прочный комплекс ААТР- $Mn^{2+}$  будет наблюдаться для конформаций ААТР со свернутой трифосфатной цепочкой, так как в этом случае возрастает пространственная концентрация отрицательного заряда и электростатический потенциал. Поэтому наибольший интерес при исследовании комплексов ААТР- $Mn^{2+}$  представляли конформации трифосфатной цепи, у которых фосфат и анилидное кольцо были ориентированы в сторону аденина.

Энергетические характеристики оптимальных комплексов ААТР- $Mn^{2+}$ , а также расчетные расстояния от  $Mn^{2+}$  до релаксирующих ядер приведены в табл. 4, а геометрия некоторых конформаций — на рис. 3. Из этих данных видно, что во всех конформациях комплекса наборы расчетных расстояний  $Mn^{2+}$  — ядро существенно отличны от экспериментального набора этих расстояний. Исследования взаимодействия ионов двухвалентных металлов, в том числе  $Mn^{2+}$ , с ДНК методом  $^{31}P$ -ЯМР [30], а также квантово-химические расчеты [31] показали, что ионы  $Mn^{2+}$  связываются с фосфатной группой двумя способами: 1) непосредственно, путем замещения одной молекулы воды в гидратной оболочке иона (комплекс внутренней сферы); 2) через водяной мостик, путем образования водородных связей между атомом фосфорильного кислорода и молекулой воды из гидратной оболочки иона  $Mn^{2+}$  (комплекс внешней сферы). Характерное расстояние  $r_{(P-Mn^{2+})}$  между  $Mn^{2+}$  и атомом фосфора в комплексе внешней сферы 5,8–6 Å, а в комплексе внутренней сферы — 3–3,3 Å.

Из табл. 4 видно, что оптимальные положения иона  $Mn^{2+}$  в комплексе ААТР- $Mn^{2+}$  характеризуются расстояниями до атомов азота и фосфора, свойственными комплексу либо внутренней, либо внешней сферы. Получено, что каждая конформация молекулы ААТР имеет несколько позиций иона  $Mn^{2+}$ , таких, что эти комплексы с различными положениями иона незначительно различаются по энергии (на 2–3 ккал/моль). При включении в расчеты иона  $Mn^{2+}$  для моделирования образования комплекса конформация молекулы ААТР изменяется несущественно (в пределах  $7^\circ$  по углам внутреннего вращения). Поэтому исследование геометрии комплекса  $Mn^{2+}$ -ААТР позволяет сделать предположение о геометрии самой молекулы ААТР в растворе. Ион  $Mn^{2+}$  может служить парамагнитным зондом для исследования конформаций ААТР в водном растворе. В условиях эксперимента при низкой концентрации  $Mn^{2+}$  ( $[Mn^{2+}]/[ААТР] \approx 10^{-3}$ ) имеем приблизительно следующую картину: в растворе существует равновесный ансамбль конформеров ААТР, ионы  $Mn^{2+}$  связываются с каждым из конформеров множеством способов.

Ввиду ошибок оценки энергии комплексов ААТР- $Mn^{2+}$ , а также не-

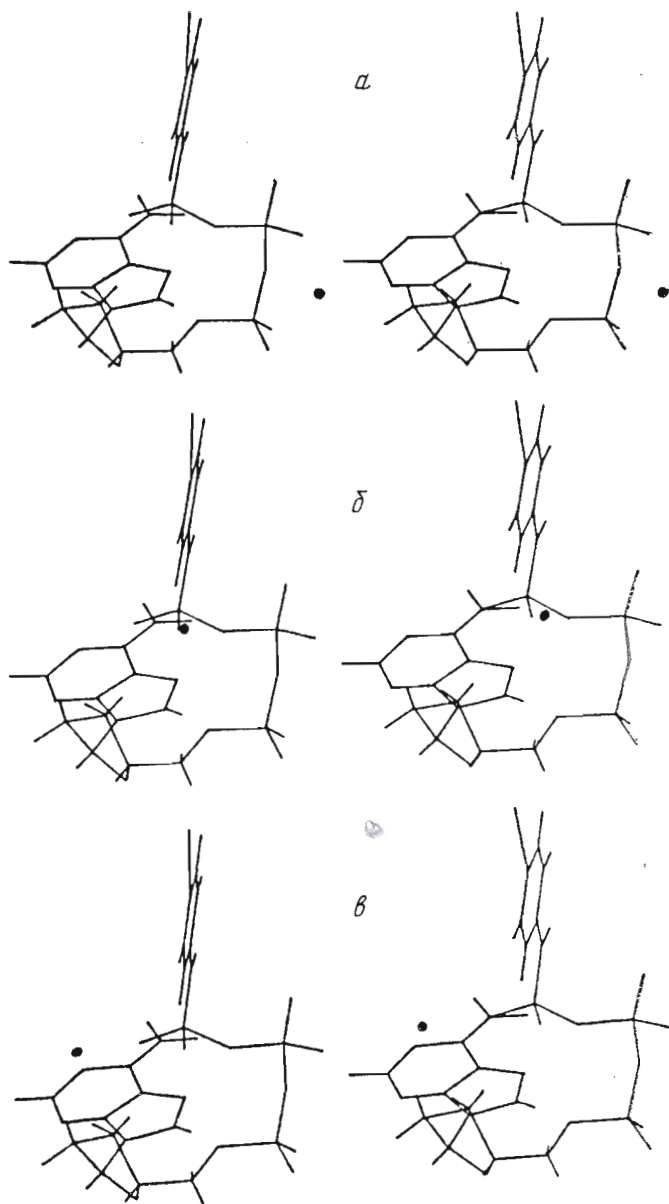


Рис. 3. Стереопары оптимальных структур комплексов ААТР —  $Mn^{2+}$ ; конформации 1.1 (а), 1.2 (б), 1.3 (в), 2.1 (з), 2.2 (д) из табл. 4. Точкой обозначен ион марганца

учета энтропийных эффектов равновесный состав смеси конформеров невозможно определить исходя только из конформационных расчетов. Наиболее вероятные конформации ААТР могут указать экспериментальные данные по расстояниям от иона  $Mn^{2+}$  до ядер  $P_{\alpha}$ ,  $P_{\beta}$ ,  $P_{\gamma}$  и протонов  $H1'$ ,  $H4'$ ,  $H2$ ,  $H8$ . Эти расстояния зависят от конформации нуклеотидной и трифосфатной частей молекулы.

Для расчета состава конформеров был составлен и минимизирован функционал по концентрациям  $C_{\alpha}$ :

$$\sum_{i=1}^{N_{\text{я}}} \left( \frac{1}{T_i^{\text{эксп}}} - \sum_{\alpha=1}^{N_{\text{к}}} \frac{C_{\alpha}}{T_{i,\alpha}} \right)^2 = \min \{C_{\alpha}\},$$

где  $N_{\text{я}}$  — число ядер,  $N_{\text{к}}$  — число конформеров,  $C_{\alpha}$  — концентрация,  $1/T_i^{\text{эксп}}$  — экспериментально определенный парамагнитный вклад  $Mn^{2+}$  в скорость

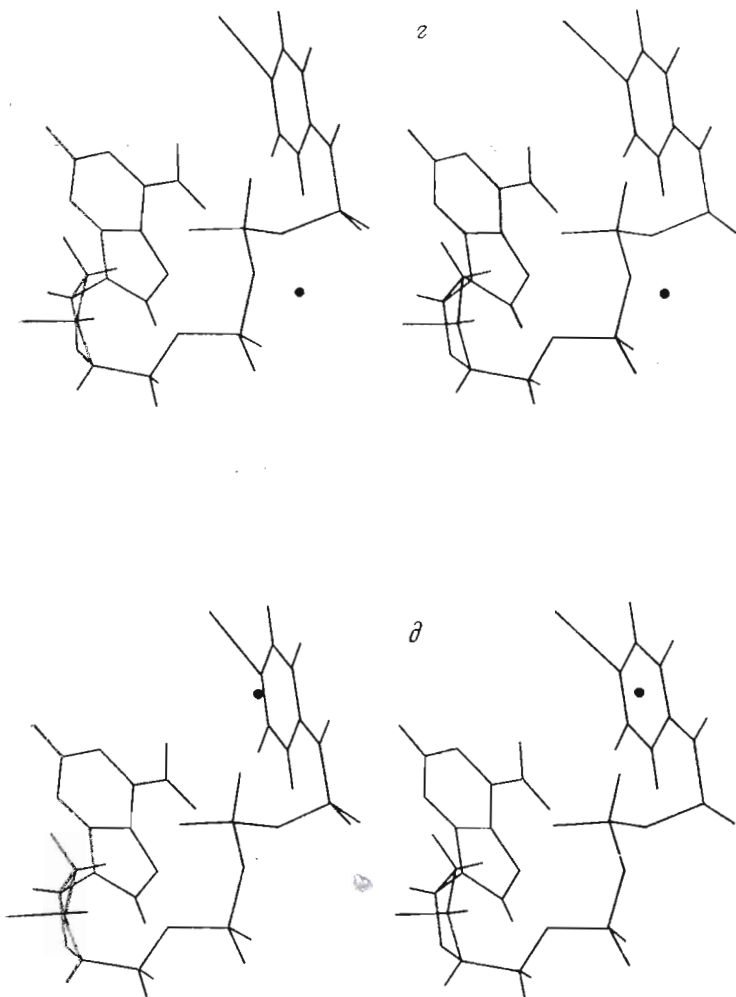


Рис. 3

$CPR, 1/T_{i,\alpha}$  — расчетный вклад в скорость  $CPR$   $i$ -го ядра для структуры комплекса в конформации  $\alpha$ , найденной методом атом-атомных потенциалов.

Состав конформеров  $\{C_\alpha\}$  рассчитан в ограниченном базисе конформаций комплексов, приведенных в табл. 4. Мы выбрали базис конформаций, имеющих энергию в интервале 4 ккал/моль от оптимальной. Ядра *орто*- и *мета*-атомов водорода не включались в процедуру расчета концентраций  $\{C_\alpha\}$  ввиду существенно большей по сравнению с другими ядрами погрешности экспериментального определения скоростей  $CPR$  (см. «Экспериментальную часть»). Получено, что в растворе комплекса с  $Mn^{2+}$  преобладают две конформации молекулы ААТР: 1 и 2 (см. табл. 3) в суммарной концентрации  $\geq 0,9$ . Каждый из конформеров ААТР образует несколько типов комплексов с  $Mn^{2+}$ , соответственно 1.1, 1.2, 1.3 и 2.1, 2.2, которые присутствуют в растворе в относительных концентрациях 0,1—0,3. Точность соответствия теоретического набора расстояний  $Mn^{2+}$  — ядро экспериментальным данным не хуже 0,1 Å (см. табл. 4) для всех ядер, за исключением *орто*- и *мета*-атомов водорода анилида. Для последних отклонение расчетных расстояний от экспериментальных в среднем  $\sim 0,3$  Å для малых расстояний и  $\sim 2$  Å для больших. Следовательно, с приемлемой точностью средняя расчетная ориентация кольца анилида соответствует экспериментальной. Из табл. 3, 4 видно, что конформеры ААТР 1 и 2 наиболее оптимальны по внутримолекулярной энергии ААТР, а комплексы ААТР- $Mn^{2+}$ , дающие вклад в скорости  $CPR$ , также принадлежат к семейству наиболее низкоэнергетических. Это дает основание заклю-



Энергии оптимальных конформаций комплексов ААТР с  $Mn^{2+}$  и рассчитанные расстояния  $Mn^{2+}$  — ядро

Конформация	Энергия *, вкал/моль			Расстояние (Å) от $Mn^{2+}$ до ядра												Относительный вес
	$E_{ком}$	$E_M$	$E_{AM}$	И12	И18	И1'	И14	И10,10'	И10,10''	И10,10'''	И10,10''''	И10,10'''''	И10,10''''''	Р $\alpha$	Р $\beta$	
1.1	-31,1	-17,3	-13,8	6,9	5,8	7,4	4,4	5,6	7,5	6,0	6,3	3,1	3,1	5,3	0,16	
1.2	-28,7	-17,3	-11,4	9,6	5,9	7,1	5,5	4,9	6,2	4,9	7,1	4,3	4,3	3,4	0,30	
1.3	-28,7	-17,3	-11,4	5,9	4,0	5,7	5,2	5,3	6,9	5,6	7,4	6,6	5,8	3,3	0,11	
1.4	-29,0	-17,3	-11,7	9,5	5,9	9,1	8,4					5,8	3,4	4,1		
1.5	-28,1	-17,3	-10,8	9,6	5,6	7,5	6,1					4,4	3,0	2,9		
2.1	-28,9	-16,8	-12,1	8,5	3,4	6,6	6,5	4,4	8,1	5,9	9,0	3,4	4,4	4,5	0,18	
2.2	-28,1	-16,8	-11,3	6,9	7,1	7,7	8,8	3,9	5,9	4,8	6,2	6,0	3,3	3,7	0,25	
3.1	-27,9	-15,1	-12,8	12,4	7,1	9,8	8,4					4,3	4,2	3,4		
3.2	-26,9	-15,1	-11,8	9,4	4,0	7,0	6,9					3,4	4,7	4,5		
4.1	-28,8	-15,0	-13,8	3,8	7,6	6,4	6,9					3,2	3,2	5,4		
4.2	-20,7	-15,0	-11,7	10,8	7,2	7,3	5,2					4,5	4,4	3,4		
5.1	-26,6	-14,6	-12,0	9,4	4,1	7,3	7,2					3,5	4,4	4,6		
Экспериментальные расстояния от $Mn^{2+}$ до ядра				7,1	4,0	6,8	5,8	4,4	8,6	5,4	9,0	3,8	3,5	3,6		
Рассчитанные с учетом относит. весов				7,1	4,0	6,9	5,6	4,0	6,5	5,2	7,0	3,8	3,6	3,7		

\*  $E_{ком}$  — полная энергия комплекса в растворе,  $E_M$  — конформационная энергия ААТР,  $E_{AM}$  — энергии взаимодействия ион — молекула.

чить, что методика расчетов внутримолекулярной энергии ААТР и энергии комплексов ААТР- $Mn^{2+}$  достаточно удовлетворительна, а точность определения относительной энергии конформеров  $\sim \pm 1,5$  ккал/моль. Эта точность оценена как половина ширины интервала энергетического спектра конформеров, вносящих вклад в наблюдаемые времена СРР.

Таким образом, при исследовании конформации ААТР в комплексе с  $Mn^{2+}$  методами ЯМР и атом-атомных потенциалов удалось показать, что в растворе комплекс не может существовать в виде единственной конформации. Среднестатистическая картина состояния ААТР следующая. Трифосфатная цепь в растворе находится преимущественно в виде двух конформаций (1 и 2, см. табл. 3). Конформации ААТР, дающие максимальный вклад, приведены на рис. 2, из которого видно, что общая пространственная конфигурация ААТР в этих конформациях практически одинакова, различаются только детали конформации трифосфатной цепочки и рибозы. Рибозный фрагмент испытывает переходы, основание в *анги*-ориентации. Ион  $Mn^{2+}$  имеет несколько мест связывания вдоль трифосфатной цепочки. Каждое место связывания иона  $Mn^{2+}$  характеризуется образованием двух комплексов внутренней сферы и двух комплексов внешней сферы с четырьмя центрами: фосфатные группы  $P_{\alpha}$ ,  $P_{\beta}$ ,  $P_{\gamma}$  и атом N7 аденина. Таким образом, в растворе связывание иона  $Mn^{2+}$  с ААТР происходит в основном путем замещения двух молекул воды гидратной оболочкой иона фосфорильными атомами кислорода или атомом N7 аденина. Ион  $Mn^{2+}$  мигрирует по трифосфатной цепочке, проводя примерно  $1/3$  времени вблизи каждой из фосфатных групп, связываясь с одним из атомов фосфорильного кислорода (длина связи  $O - Mn^{2+} \sim 2,0$  Å).

В целом молекула ААТР имеет сложенную конформацию со сближенными кольцами аденина и анилида, расстояние между их центрами 5,5 Å.

В литературе описаны другие подходы определения конформации нуклеотидов в комплексе с  $Mn^{2+}$  по данным СРР. Поиск конформеров осуществляли либо эмпирически, используя молекулярные модели [32, 33], либо перебором на ЭВМ всех возможных конформеров и сравнением расстояний, найденных для этих конформеров, с экспериментально определенными расстояниями металл — ядро [34]. Например, для определения конформации 2'-дезокситимидин-5'-трифосфата варьировали торсионные углы  $\chi$ ,  $\psi$ ,  $\phi$  с интервалом  $10^\circ$ . Получили  $36^3$  конформаций, из которых выбрали одну с наименьшими отклонениями от экспериментальных расстояний  $Mn^{2+}$  — протон (фосфор) [34]. С нашей точки зрения, такой подход не может быть общим, так как не учитывает энергетические параметры найденных конформаций и не позволяет производить поиск конформеров даже на быстродействующих ЭВМ за приемлемые времена при большом количестве переменных (для ААТР это 9 торсионных углов,  $36^9$  конформеров). Более того, поскольку все расстояния, найденные по данным СРР, являются средневзвешенными по всем конформациям, существующим в растворе, нет основания ожидать, что вообще в значительном количестве присутствуют комплексы с расстояниями металл — ядро, равными экспериментальным. В связи с этим конформационные расчеты — необходимое звено в исследовании конформаций производных нуклеотидов. В последнее время разработаны подходы, которые дают возможность применять конформационные расчеты для больших фрагментов нуклеиновых кислот [35—38]. Это позволяет надеяться, что совокуный подход, объединяющий конформационный анализ и метод ЯМР, даст положительные результаты при исследовании пространственного строения достаточно длинных ( $\sim 10$ ) олигонуклеотидов и их комплексов.

### Экспериментальная часть

В работе использовали АТР (Reanal, Венгрия), Chelex-100 (BRL, США).  $\gamma$ -*n*-Азиданилид АТР и  $\gamma$ -анилид АТР синтезировали по методу [39]. Перед записью спектров ЯМР образцы растворяли в воде в концентрации  $10^{-2}$  М, доводили рН в растворе до 7,5, пропускали через Chelex-100 в  $Na^+$ -форме, упаривали 5 раз с дважды перегнанной  $D_2O$  и растворяли в дважды перегнанной  $D_2O$ . Концентрация образцов при исследовании

довании СРР  $^1\text{H}$ -ЯМР составляла  $1 \cdot 10^{-2}$  М, концентрация  $\text{MnCl}_2$   $1 \cdot 10^{-5}$  и  $2,86 \cdot 10^{-6}$  М соответственно. Спектры ЯМР записывали на приборе X-200 (Varian, США). Химические сдвиги  $^1\text{H}$ -ЯМР измерены относительно натриевой соли 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфокислоты и переведены в шкалу ТМС. Время спин-решеточной релаксации  $T_1$  определяли с помощью импульсной последовательности  $180^\circ - \tau - 90^\circ$ . Время задержки между импульсами  $\tau$  подбирали экспериментально.

Конформации комплекса ААТР с  $\text{Mn}^{2+}$  рассчитывали методом атом-атомных потенциалов в приближении жестких длин связей и валентных углов, но с учетом «гибкости» рибозы. Подвижность рибозы в настоящих расчетах ограничена в фазовом пространстве линией оптимальной внутренней конверсии в рамках однопараметрической модели [35] с переменным параметром псевдповращения  $P$  [24]. Это позволяло охватить широкий спектр основных состояний рибозы и уменьшить количество варьируемых конформационных параметров. Учет экранирования электростатического взаимодействия заряженных атомов ААТР за счет постепенной поляризации водного растворителя выполнен введением константы диэлектрического экранирования  $\epsilon(r)$ , зависящей от расстояния между зарядами. Зависимость  $\epsilon(r)$  аппроксимировали выражением, приведенным в работе [40]. Электростатическую энергию ААТР вычисляли в монополярном приближении с учетом зависимости  $\epsilon(r)$  и энергии поляризации атомов молекулы ее зарядами [40]. Заряды на атомах нуклеозидной части взяты из работы [41];  $q_P = +0,8$ ,  $q_{O(P)} = -0,8$ ,  $q_{O5'} = 0,22$ , заряды атомов азидоанилидного кольца (см. рис. 2) вычислены методом CNDO/2.

Взаимодействие иона  $\text{Mn}^{2+}$  с заряженными и нейтральными атомами ААТР в водном растворе имеет важное значение при расчете комплексов ААТР- $\text{Mn}^{2+}$ , поэтому для обоснования способа расчета этих взаимодействий были выполнены специальные исследования [42]. Взаимодействие иона  $\text{Mn}^{2+}$  с заряженными атомами кислорода и азота аппроксимировали соответствующими потенциалами средней силы взаимодействия, которые вычисляли по методике [42]. Потенциалы взаимодействия иона  $\text{Mn}^{2+}$  с атомами фосфатной группы параметризовали так, чтобы правильно воспроизводить расстояния  $\text{Mn}^{2+} - \text{P}$  и  $\text{Mn}^{2+} - \text{O}$  в комплексах внутренней и внешней сферы, а также величины соответствующих констант связывания [30]. Расстояние от парамагнитного иона  $\text{Mn}^{2+}$  до протонов и ядер фосфора вычисляли по дипольным членам уравнений Соломона — Бломбергена [43]:

$$r(\text{Å}) = 812 [T_{1M} f(\tau_c)]^{1/6} \quad (\text{для протонов})$$

$$r(\text{Å}) = 601 [T_{1M} f(\tau_c)]^{1/6} \quad (\text{для ядер фосфора}),$$

где

$$f(\tau_c) = \frac{3\tau_c}{1 + \omega_i^2 \tau_c^2} + \frac{7\tau_c}{1 + \omega_s^2 \tau_c^2}.$$

В этих уравнениях  $\omega_i$  и  $\omega_s$  — ядерная и электронная прецессионные частоты,  $\tau_c$  — время корреляции диполь-дипольного взаимодействия, которое полагали равным  $1 \cdot 10^{-10}$  с по аналогии с данными, полученными для комплекса  $\text{Mn}^{2+}$  и АТР [25]. Так как  $\omega_i^2 \tau_c^2 \ll 1$ , а  $\omega_s^2 \tau_c^2 \gg 1$ , то  $f(\tau_c) = 3\tau_c$ .

В конформациях, рассчитанных методом атом-атомных потенциалов, расстояния от  $\text{Mn}^{2+}$  до атомов  $\text{H}_{\text{орто}}$  и  $\text{H}_{\text{орто}'}$ , а также  $\text{H}_{\text{мета}}$  и  $\text{H}_{\text{мета}'}$  значительно различаются. Следовательно, должна различаться и скорость СРР этих протонов в присутствии  $\text{Mn}^{2+}$ . Поэтому наблюдаемая зависимость интенсивности сигнала *орто*- (или *мета*-) протонов от времени задержки между импульсами ( $\tau$ ) будет представлять собой полусумму двух экспонент:

$$1 - I/I_0 = \psi(\tau) = 1/2 \exp(-\tau/T_{1'}) + 1/2 \exp(-\tau/T_{1''}).$$

Полагая  $T_{1'} \gg T_{1''}$ , имеем

$$2\psi(\tau) = \exp(-\tau/T_{1'}) \cdot (1 + \exp(-\tau/T_{1''}));$$

если  $\tau \simeq T_{1'} \ll T_{1''}$ , то

$$\ln(2\psi(\tau) - 1) = -\frac{\tau}{T_{1''}};$$

если  $\tau \simeq T_{1'} \gg T_{1''}$ , то

$$\ln(2\psi(\tau)) = -\frac{\tau}{T_{1'}}.$$

Таким образом, построив зависимости  $\ln[2\psi(\tau) - 1]$  для малых  $\tau$  или  $\ln[2\psi(\tau)]$  для больших  $\tau$ , можно определить индивидуальные скорости релаксации вышеуказанных протонов в присутствии  $Mn^{2+}$ . Для расчета были использованы экспериментальные значения  $\psi(\tau)$ , полученные для 29° С. Вклад  $Mn^{2+}$  в скорости СРР индивидуальных протонов определяли по известным формулам (см. выше), полагая, что в отсутствие  $Mn^{2+}$  различные скорости СРР двух *орто*- или *мета*-протонов несущественно. Значения расстояний  $Mn^{2+}$  - протон (*орто* или *мета*) в пределах указанной точности эксперимента удовлетворительно согласуются с расчетными данными (см. табл. 2 и 4).

Необходимо отметить, что данный подход не является общим и может быть использован при условиях: а) расстояния от парамагнитного иона до релаксирующих ядер различаются не менее чем в 2 раза, б) вклады от других механизмов релаксации равны или независимо определены для каждого из двух протонов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grachev M. A., Knorre D. G., Lavrik O. I. // Biology Reviews Soviet Scientific Review. Section D/Ed. Sculachev V. P. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1981. V. 2. P. 107-143.
2. Davies D. B. // Progr. NMR Spectr. 1978. V. 12. P. 135-225.
3. Mildvan A. S. // Accounts Chem. Res. 1977. V. 12. P. 246-252.
4. Бобрускии И. Д., Гогтих Б. П., Крицын А. М., Лысов Ю. П., Покровская М. Ю., Тычинская Л. Ю., Флорентьев В. Л. // Биофизика. 1980. Т. 25. Вып. 4. С. 774-778.
5. Покровская М. Ю., Лысов Ю. П., Голышев Н. В., Флорентьев В. Л. // Биоорганич. химия. 1984. Т. 10. № 11. С. 1508-1524.
6. Воробьев Ю. Н., Бадашкева А. Г., Лебедев А. В. // Журн. структур. химии. 1982. Т. 23. № 1. С. 29-41.
7. Budker V. G., Knorre D. G., Kravchenko V. V., Lavrik O. I., Nevinski G. A., Teplova N. M. // FEBS Lett. 1974. V. 49. № 1. P. 159.
8. Ankilova V. N., Knorre D. G., Kravchenko V. V., Lavrik O. I., Nevinski G. A. // FEBS Lett. 1975. V. 60. № 1. P. 172.
9. Akhverdyan V. Z., Kisselev L. L., Knorre D. G., Lavrik O. I., Nevinski G. A. // J. Mol. Biol. 1977. V. 113. P. 475-501.
10. Свердлов Е. Д., Царев С. А., Модянов Н. Н., Липкин В. М., Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Плетнев А. Г. // Биоорганич. химия. 1978. Т. 4. № 9. С. 1278-1281.
11. Sverdlov E. D., Tsarev S. A., Levitan T. L., Lipkin V. M., Modyanov N. N., Grachev M. A., Zaychikov E. F., Pletnev A. G., Ovchinnikov Yu. A. // Macromolecules in the functional cell/Eds Salvatore F., Marino G., Volpe P. N. Y.: Plenum Press, 1979. P. 149-158.
12. Grachev M. A., Zaychikov E. F. // FEBS Lett. 1981. V. 130. P. 23-26.
13. Лаврик О. И., Невинский Г. А., Рязанкин И. А. // Молекуляр. биология. 1979. Т. 13. Вып. 5. С. 1001-1011.
14. Бульчев Н. А., Лаврик О. И., Невинский Г. А. // Молекуляр. биология. 1980. Т. 13. Вып. 5. С. 558-567.
15. Бунеева В. Н., Кнорре Д. Г., Кудряшова Н. В. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1982. Вып. 2. С. 122-125.
16. Трейшников В. М., Олейник А. В., Ермолаев С. А. // Журн. физ. химии. 1976. Т. 2. Вып. 5. С. 1089-1091.
17. Лебедев А. В., Резвухин А. И. // Биоорганич. химия. 1983. Т. 9. № 2. С. 149-185.
18. Swift T. J., Connic R. E. // J. Chem. Phys. 1962. V. 37. № 1. P. 307.
19. Luz Z., Meiboom S. // J. Chem. Phys. 1964. V. 37. № 8. P. 2686.
20. Sternlicht H., Shulman R. C., Anderson W. W. // J. Chem. Phys. 1965. V. 43. № 9. P. 3123-3232.
21. Sternlicht H., Shulman R. C., Anderson W. W. // J. Chem. Phys. 1965. V. 43. № 9. P. 3133-3143.
22. Brown F. F., Campbell I. D., Henson R., Hirst C. W. J., Richards R. E. // Eur. J. Biochem. 1973. V. 38. № 1. P. 54-58.
23. Solomon I. // Phys. Rev. 1955. V. 99. P. 559-565.
24. Solomon I., Blombergen N. // J. Chem. Phys. 1956. V. 25. № 1. P. 261.
25. Sloan D. L., Mildvan A. S. // J. Biol. Chem. 1975. V. 251. № 8. P. 2412-2420.

26. Zenger B. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987.
27. Sundaralingam M. // Biopolymers. 1969. V. 7. P. 821-860.
28. Kennard O., Isaacs N. W., Motherwell W. D. S., Coppala J. C., Wampler D. L., Larson A. C., Watson D. G. // Proc. Roy. Soc. London. 1971. V. 325. P. 401-436.
29. Miller O. E., Anderson J. J. // Biopolymer. 1975. V. 14. P. 2159-2179.
30. Sandra M., Beckel C. L., Larson A. G. // J. Theor. Biol. 1980. V. 85. P. 293-323.
31. Pullman B., Pullman A., Berthod H. // Int. J. Quant. Chem. 1978. Quant. Biol. Symposium. 1978. V. 5. № 1. P. 79-90.
32. Nowak T., Mildvan A. S., Kenyon G. L. // Biochemistry. 1973. V. 12. P. 1690.
33. Nowak T., Mildvan A. S. // Biochemistry. 1972. V. 11. № 1. P. 2819-2828.
34. Sloan D. L., Loeb L. A., Mildvan A. S. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. P. 8913-8920.
35. Воробьев Ю. Н. // Молекуляр. биология. 1981. Т. 15. Вып. 3. С. 517-528.
36. Воробьев Ю. Н. // Молекуляр. биология. 1983. Т. 17. Вып. 1. С. 184-191.
37. Воробьев Ю. Н. // Молекуляр. биология. 1983. Т. 17. Вып. 2. С. 257-270.
38. Воробьев Ю. Н. // Молекуляр. биология. 1983. Т. 17. Вып. 2. С. 271-285.
39. Бабкина Г. Т., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. // Биоорг. химия. 1975. Т. 1. № 5. С. 611-617.
40. Hingerty B. E., Ritche R. H., Ferrel T. L., Terner I. E. // Biopolymers. 1985. V. 24. P. 427-439.
41. Журкин В. Б., Полтев В. И., Флорентьев В. Л. // Молекуляр. биология. 1980. Т. 14. Вып. 5. С. 1116-1130.
42. Воробьев Ю. Н. // Молекуляр. биология. 1988. Т. 22. Вып. 1. С. 67-79.
43. Mildvan A. S., Engle J. L. // Meth. Enzymol. 1972. V. 26. Part C. P. 654-682.

Поступила в редакцию  
5.V.1988  
После доработки  
14.X.1988

**A STUDY OF THE CONFORMATIONAL STATE OF THE ATP  
γ-p-AZIDOANILIDE — Mn<sup>2+</sup> COMPLEX BY NMR SPECTROSCOPY  
AND ATOM-ATOMIC POTENTIALS METHOD**

ABRAMOVA T. V., VOROB'EV Yu. N., DASHKEVICH E. Yu., LEBEDEV A. V.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry,  
Siberian Division, Academy of Sciences of the USSR*

By means of H<sup>1</sup> and P<sup>31</sup> spin-lattice relaxation and atom-atomic potentials method it is shown that in aqueous solution the ATP γ-p-azidoanilide — Mn<sup>2+</sup> complex occurs mainly as a mixture of two conformers in the ratio of 60:40. They both possess folded conformations with distances between aromatic rings 5-6 Å, and adenine residue anti-oriented, the ribose and triphosphate chain conformations are <sup>3</sup>E and gg, g'g', g'g', respectively, in the major conformer, and <sup>2</sup>E and g'g', g'g', g'g' in the second conformer. Mn<sup>2+</sup> ion forms 2-3 complexes with each conformer (the cation being differently coordinated) by substituting phosphoryl oxygens or N7 atoms of adenine for two water molecules in the hydration shell of the cation. Magnesium ion forms inner-sphere complexes with two out of four ion-coordination centres (P<sub>α</sub>, P<sub>β</sub>, P<sub>γ</sub>, N7(A)) and outer-sphere complexes with two other centres.