



УДК 577.113.6.088.53:543.422.25

© 1990 г.

*Е. В. Биченкова, Ю. Н. Воробьев, И. В. Кутявин,  
А. В. Лебедев, Т. В. Мальцева, Е. Ю. Тэннэ*

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ДУПЛЕКСА  
 $d(\text{pTGTTTGGC}) \cdot d(\text{pCCAAAC})\text{A}$  В ВОДНОМ РАСТВОРЕ;  
МЕТОДАМИ ОДНО- И ДВУМЕРНОЙ  $^1\text{H}$ -ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ  
И ОГРАНИЧЕННОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕХАНИКИ**

*Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР*

Методом одно- и двумерной  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии (400 МГц) проведено исследование пространственной структуры комплементарного комплекса  $d(\text{pTGTTTGGC}) \cdot d(\text{pCCAAAC})\text{A}$  \* в водном растворе. На основании данных гомоядерной двумерной  $J$ -корреляционной спектроскопии (COSY) и двумерной спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY) были идентифицированы сигналы необмениваемых протонов гетероциклических оснований, метильных протонов, а также протонов 1', 2'a, 2'b, 3' и 4' сахарных остатков.

С помощью серии одномерного ЯЭО были определены межпротонные расстояния для сближенных в пространстве ядер (внутринуклеотидные:  $(\text{H6}/\text{H8})_i - (\text{H1}')_i$ ;  $(\text{H6}/\text{H8})_i - (\text{H2}'\text{a})_i$ ;  $(\text{H1}')_i - (\text{H2}'\text{a})_i$ ;  $(\text{H1}')_i - (\text{H2}'\text{b})_i$ ; межнуклеотидные:  $(\text{H6}/\text{H8})_i - (\text{H1}')_{i-1}$ ;  $(\text{H6}/\text{H8})_i - (\text{H2}'\text{a})_{i-1}$ ;  $(\text{H6}/\text{H8})_i - (\text{H2}'\text{b})_{i-1}$ ;  $(\text{H5}/\text{CH}_3)_i - (\text{H6}/\text{H8})_{i-1}$ ;  $(\text{H5}/\text{CH}_3)_i - (\text{H2}'\text{a}/\text{H2}'\text{b})_{i-1}$ ).

Из анализа спектра COSY получены константы спин-спинового взаимодействия для ряда протонов сахарных остатков.

С использованием метода ограниченной молекулярной механики определены вероятные состояния дуплекса в растворе, удовлетворяющие полученному из эксперимента набору межпротонных расстояний.

Ранее было показано [1], что остаток N-(2-гидроксиэтил)феназиния (Phn), ковалентно присоединенный через этилендиаминный фрагмент к 5'-концевому фосфату олигодезокси-нуклеотида, существенно стабилизирует соответствующий комплементарный комплекс олигодезокси-нуклеотидов. Для выяснения причин повышения стабильности комплексов нуклеиновых кислот, несущих остаток интеркалирующего красителя, необходимо изучить пространственную организацию подобных стабилизированных комплексов. С этой целью в качестве модельного был выбран комплекс производного гептануклеотида  $d[(\text{PhnNH}(\text{CH}_2)_n\text{NH})\text{pCCAAAC}]\text{A}$  с комплементарным ему октануклеотидом  $d(\text{pTGTTTGGC})$ .

В настоящей работе выполнен первый этап исследований модельной системы — определение пространственной структуры исходного немодифицированного дуплекса  $d(\text{pTGTTTGGC}) \cdot d(\text{pCCAAAC})\text{A}$  («8·7») в солевом растворе методом одно- и двумерной  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии.

Ранее методом  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии нами был изучен процесс термической денатурации подобного комплементарного комплекса  $d(\text{pTGTTTGGC}) \cdot d(\text{pCCAAAC})\text{A}$  («8·8») в солевом растворе [2]. Из кривых зависимости химических сдвигов сигналов от температуры была определена температура плавления комплекса («8·8»), которая при 1 мМ концентрации дуплекса составляла  $\sim 60^\circ\text{C}$ . Отсутствие одной G·C-пары в исследуемом комплексе («8·7») частично компенсируется высокой концентрацией олигонуклеотидов (25 мМ по каждой цепи). Можно полагать, что в условиях эксперимента (см. «Экспериментальную часть») при  $21^\circ\text{C}$  олигонуклеотиды  $d(\text{pTGTTTGGC})$  и  $d(\text{pCCAAAC})\text{A}$  в основном находятся

\* Нумерация нуклеотидов в направлении 5' → 3'.

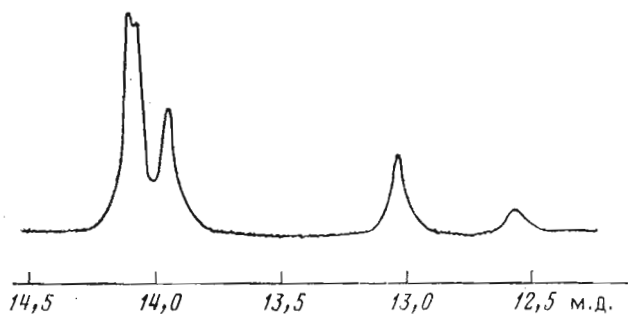


Рис. 1. Область обменивающихся иминопотонов спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР дуплекса d (pTGTGGC)·d (pCCAAAC)A в  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1 М NaCl, 0,01 М натрий-фосфатный буфер (pH 7,0), 0,01 мМ EDTA; 21° С; концентрация олигонуклеотидов составляет 25 мМ)

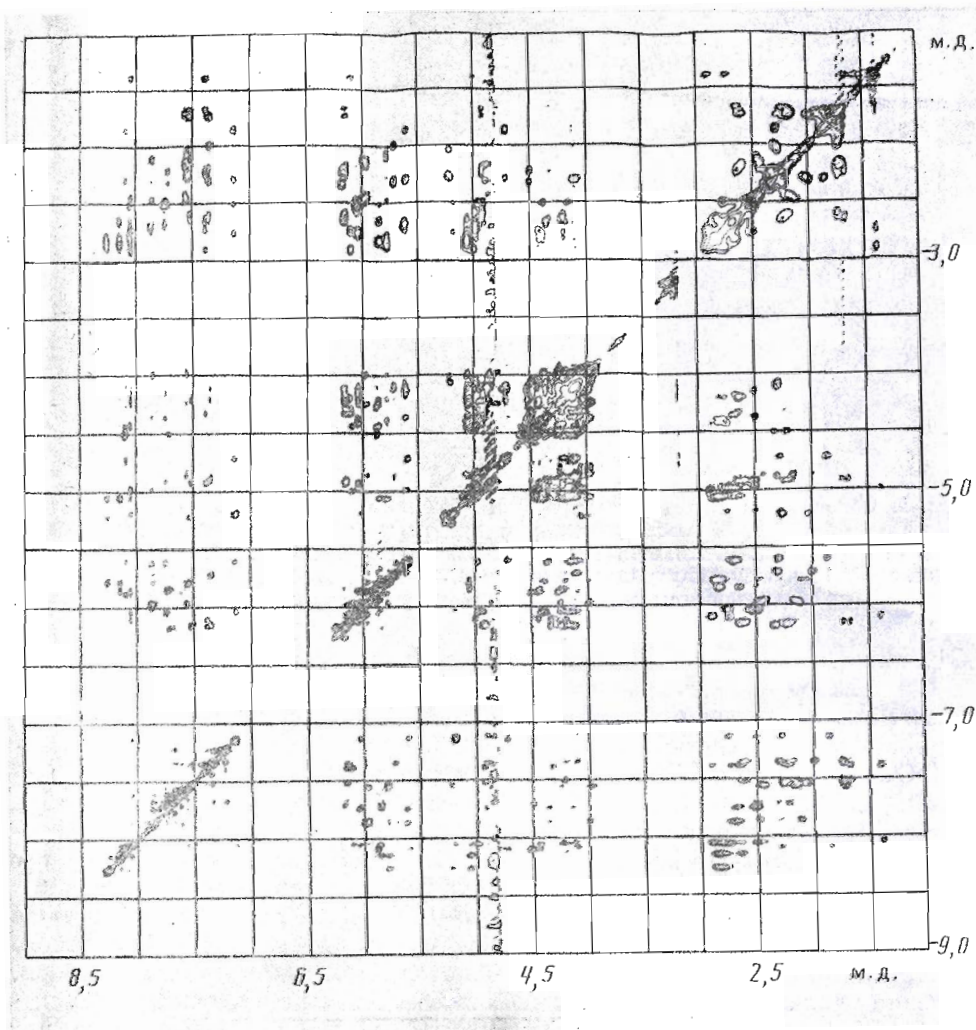


Рис. 2. Спектр NOESY (400 МГц) дуплекса d (pTGTGGC)·d (pCCAAAC)A в  $\text{D}_2\text{O}$  (21° С)

в состоянии двуспирального дуплекса. Об этом также свидетельствует наличие сигналов пяти иминопотонов в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре дуплекса («8·7») в  $\text{H}_2\text{O}$  в тех же условиях (рис. 1). Три сигнала иминопотонов А·Т-пар (N3H T-3, T-4 и T-5) находятся в области 13,8–14,2 м. д. В более сильном поле (12,4–13,2 м. д.) лежат сигналы иминопотонов двух

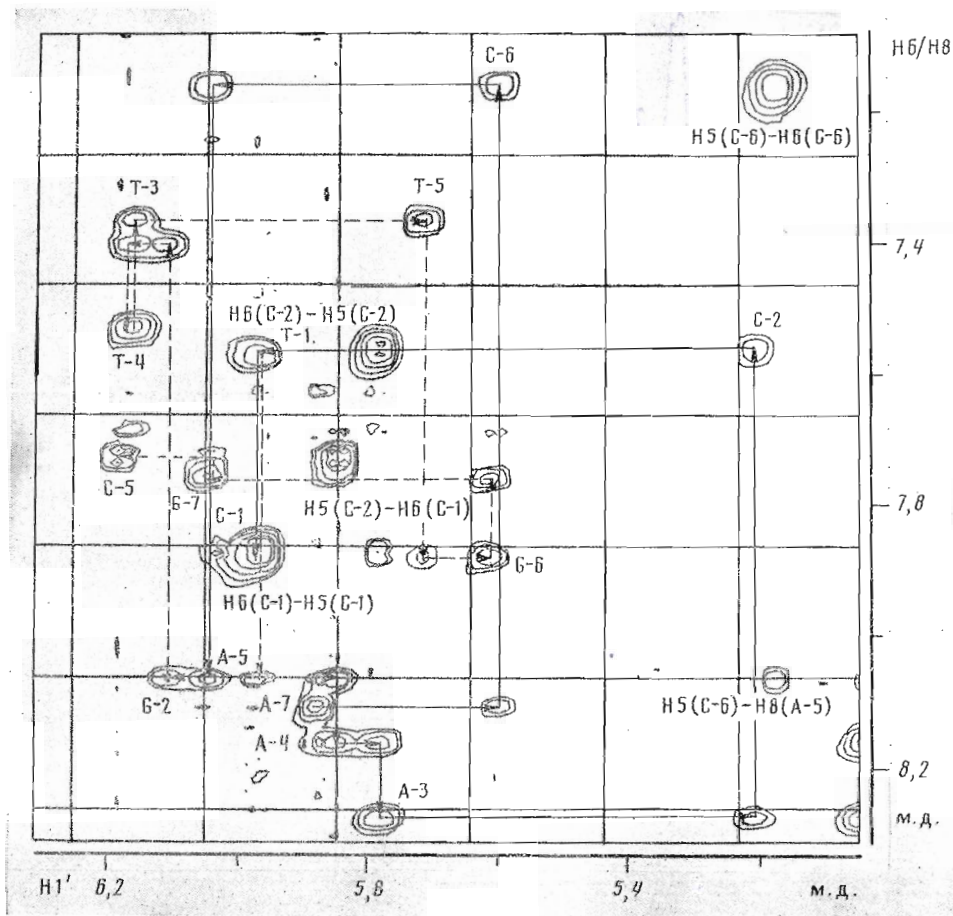
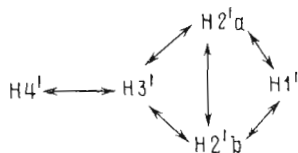


Рис. 3. Область H6/H8—H1' спектра NOESY (400 МГц) дуплекса d(pTGTTTGGC)·d(pCCAAAC)A. Схема последовательной идентификации сигналов октануклеотида обозначена штриховой линией, гептануклеотида — сплошной. Здесь и далее крестики, соответствующие внутринуклеотидным ЯЭО-взаимодействиям (H6/H8)<sub>i</sub> — (H1')<sub>i</sub>, обозначены символом и номером нуклеотидного остатка

G-C-пар (N1H G-2 и G-6). Сигналы иминопротонов концевых пар (N3H T-1 и N1H G-7) в спектре отсутствуют или сильно уширены вследствие обменных процессов с растворителем [3—5].

На рис. 2 представлен NOESY-спектр дуплекса d(pTGTTTGGC)·d(pCCAAAC)A при 21° C. Наличие межнуклеотидных ЯЭО-взаимодействий между ароматическими (или метильными) протонами оснований с 1'-, 2'-а- и 2'-б-протонами дезоксирибозы соседнего с 5'-конца остатка ((H6/H8)<sub>i</sub> — (H1'/H2'a/H2'b)<sub>i-1</sub>) и (H5/CH<sub>3</sub>)<sub>i</sub> — (H1'/H2'a/H2'b)<sub>i-1</sub>) свидетельствует о том, что дуплекс формирует правозакрученную спираль [6].

Отнесение сигналов в двумерных <sup>1</sup>H-ЯМР-спектрах. Идентификацию сигналов d(pTGTTTGGC)·d(pCCAAAC)A начали с анализа двумерного J-корреляционного (COSY) спектра, который позволил выделить ядра, связанные скалярным спин-спиновым взаимодействием. С помощью спектра COSY установили связь между H6 и H5 цитидинов, H6 и протонами метильной группы тимидинов, а также объединили протоны каждого углеводного цикла в свою спиновую систему по схеме:



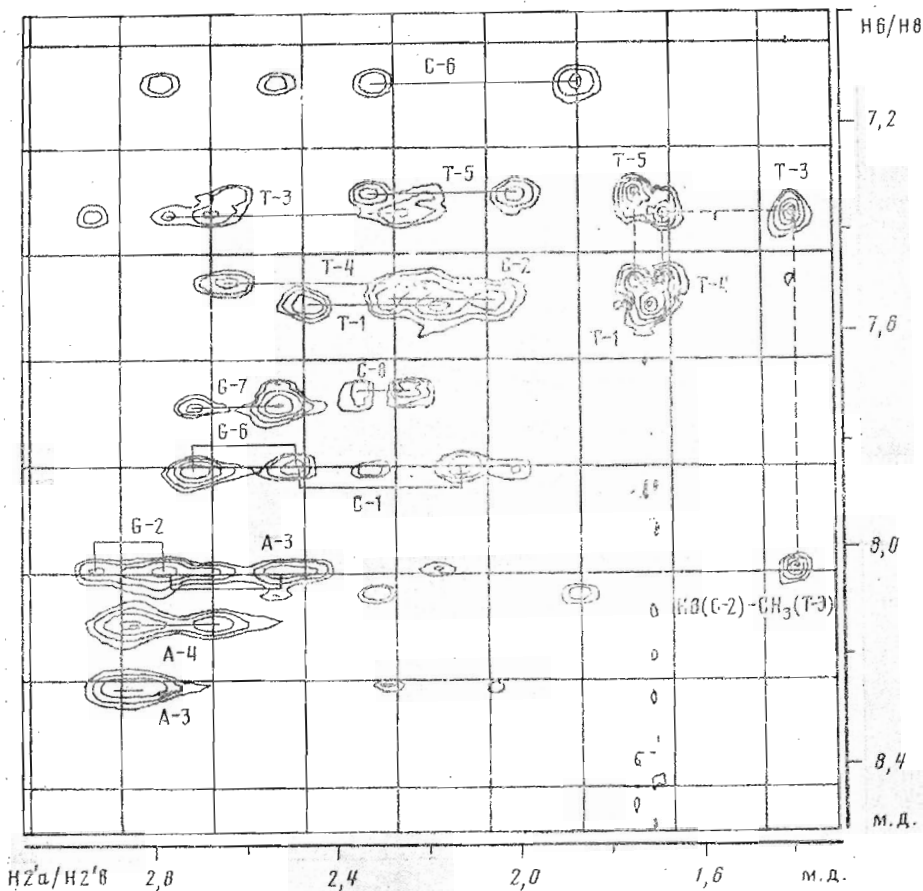


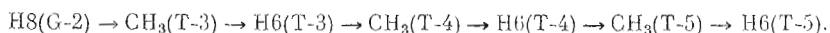
Рис. 4. Область H6/H8 — H2'a/H2'b/CH<sub>3</sub>' спектра NOESY (400 МГц) дуплекса d(pTGTGGGC)·d(pCCAAAC)A. Кросс-пики (H6/H8)<sub>i</sub> — (H2'a)<sub>i</sub> и (H6/H8)<sub>i</sub> — (H2'b)<sub>i</sub> соединены горизонтальной линией; схема последовательной идентификации H6 и CH<sub>3</sub>-групп тимидинов показана штриховой линией

Для того чтобы идентифицированные спиновые системы отнести к индивидуальным нуклеотидным звеньям, использовали двумерную спектроскопию ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY). Кросс-пики в спектре NOESY отражают процессы кросс-релаксации между приближенными в пространстве протонами. Принципы последовательного отнесения сигналов в спектрах NOESY для правоспиральных ДНК-дуплексов подробно описаны в литературе [7—11].

На рис. 3 приведена H5/H8 — H1'-область NOESY-спектра дуплекса. Кросс-пики, связанные с внутринуклеотидными процессами кросс-релаксации (H6/H8)<sub>i</sub> — (H1')<sub>i</sub>, обозначены символом и номером соответствующего нуклеотидного остатка. При идентификации сигналов гептануклеотида в качестве стартового использовали сигнал H1' (A-7) при 5,82 м. д., который связан кросс-пиком лишь с одним ароматическим протоном в области 8,10 м. д. На этом основании сигнал при 8,10 м. д. был отнесен к H8 (A-7), который в свою очередь связан кросс-пиком (8,10—5,61 м. д.) с 1'-протоном C-6 (5,61 м. д.). Дальнейшее отнесение сигналов ароматических и 1'-протонов гептануклеотида показано на рис. 3.

Отнесение ароматических и 1'-протонов октануклеотида удобнее всего начинать с выявления сигналов H6 тимидинов, которые легко идентифицируются через ЯЭО с метильными протонами этого же основания. Кросс-пики между T(H6) и T(CH<sub>3</sub>) слабо проявляются также в COSY-спектре благодаря спин-спиновому взаимодействию этих протонов через четыре связи (*J* 1,2 Гц). В правоспиральной ДНК метильная группа тимидина

сближена в пространстве со своим Н6, а также с Н6/Н8-протоном соседнего основания с 5'-конца и, следовательно, будет иметь два кросс-пика в области резонанса ароматических протонов (рис. 4). Исключение составляет СН<sub>3</sub>-группа остатка Т-1, который не имеет 5'-соседнего основания. Очевидно, что протоны метильной группы при 1,72 м. д. (рис. 4), имеющие лишь один кросс-пик в области ароматических протонов, принадлежат Т-1. В соответствии со схемой, представленной на рис. 4, последовательность отнесения Н6 и метильных протонов остатков Т-3, Т-4 и Т-5, а также Н8(Г-2) была такой:



Кросс-пик, связывающий Н8(Г-2) и СН<sub>3</sub>(Т-3), легко идентифицируется, так как сигнал Н8 гуанозина находится в более слабом поле, чем сигналы Н6 тимидинов.

Отнесение Н6 тимидинов, а также Н8(Г-2) значительно облегчает дальнейшую идентификацию ароматических и 1'-протонов октануклеотида. Схема последовательного отнесения этих протонов представлена на рис. 3 штриховой линией.

Сигналы Н5 цитидинов были идентифицированы в NOESY-спектре с помощью интенсивных кросс-пиков с соответствующими Н6, поскольку эти протоны разделены расстоянием в 2,5 Å. Эти же кросс-пики проявляются в COSY-спектре благодаря спин-спиновому взаимодействию Н5 и Н6 с  $J$  7,8 Гц. ЯЭО между Н5 цитидинов и Н6/Н8-протоном 5'-соседнего нуклеотидного остатка (Н5(С-6)—Н8(А-5) и Н5(С-2)—Н6(С-1)) (рис. 3) позволяет дополнительно контролировать правильность отнесения Н5(С).

Существует также альтернативный подход к отнесению ароматических протонов. В правоспиральной ДНК Н6/Н8 сближен в пространстве с 2'а- и 2'б-протонами своего углеводного цикла, а также с 2'а- и 2'б-протонами соседнего с 5'-конца нуклеотидного остатка. Поэтому существует независимый путь отнесения ароматических протонов — через Н2'а/Н2'б, что позволяет контролировать правильность идентификации сигналов через Н1'. На рис. 4 представлена область Н6/Н8—Н2'а/Н2'б спектра NOESY. Кросс-пики (Н2'а)<sub>*i*</sub> — (Н6/Н8)<sub>*i*</sub> и (Н2'б)<sub>*i*</sub> — (Н6/Н8)<sub>*i*</sub> соединены горизонтальной линией и обозначены символом и номером соответствующего остатка.

Для определения конформации углеводного цикла важно правильно различить 2'а- и 2'б-протоны дезоксирибозы каждого нуклеотидного звена, поскольку химические сдвиги этих протонов часто слабо различаются [6]. Существует несколько особенностей конформаций, позволяющих различить протоны 2'а и 2'б.

1. Для всех торсионных углов гликозидной связи *анти*-семейства (А- и В-форма ДНК) ароматический протон гетероциклического основания расположен ближе к Н2'а, чем к Н2'б собственной дезоксирибозы (внутри этого семейства ЯЭО от Н6/Н8 с Н2'б возникает как не прямой эффект кросс-релаксации через Н2' по пути (Н6/Н8)<sub>*i*</sub> → (Н2'а)<sub>*i*</sub> → → (Н2'б)<sub>*i*</sub>) [12—14].

2. Для всех конформаций дезоксирибозы Н1' находится ближе к Н2'б по сравнению с Н2'а, давая в спектре NOESY кросс-пик (Н1')<sub>*i*</sub> — (Н2'б)<sub>*i*</sub> большей интенсивности [12—14].

Область Н1' — Н2'а/Н2'б спектра NOESY представлена на рис. 5. Кросс-пики (Н1')<sub>*i*</sub> — (Н2'а)<sub>*i*</sub> и (Н1')<sub>*i*</sub> — (Н2'б)<sub>*i*</sub> соединены горизонтальной линией. Видно, что каждый протон Н1' образует два кросс-пика разной интенсивности в области 2'а/2'б-протонов. Анализ Н1' — Н2'а/Н2'б- и Н6/Н8 — Н2'а/Н2'б-областей NOESY-спектра (рис. 5 и 4 соответственно) показывает, что для любой пары Н2'а и Н2'б протон, дающий большую интенсивность кросс-пика с Н1', формирует кросс-пик меньшей интенсивности с собственным ароматическим протоном, а следовательно, это Н2'б. Видно, что для любого остатка сигнал протона Н2'б находится в более слабом поле по сравнению с Н2'а, что согласуется с данными работ [15—17].



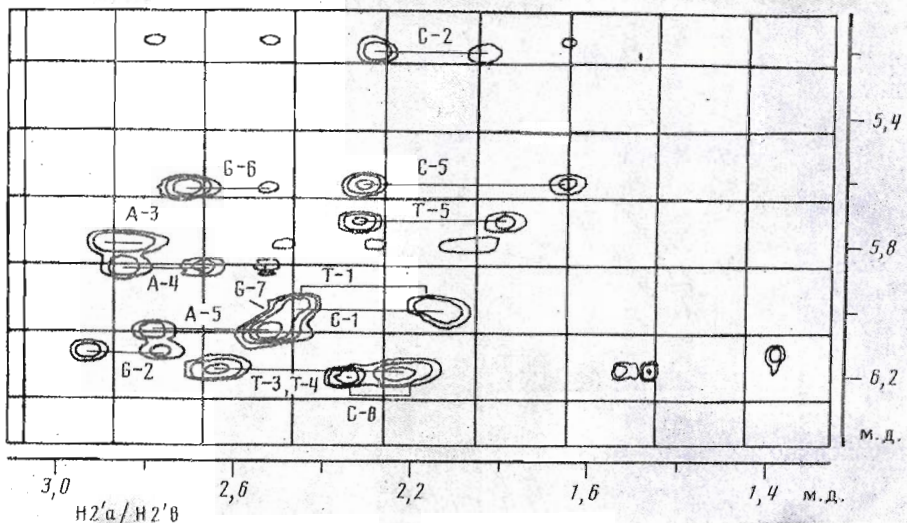


Рис. 5. Область  $H1' - H2'a/H2'b$  спектра NOESY (400 МГц) дуплекса  $d(pTGTGGG) \cdot d(pCCAAAC)A$ . Кресс-пики  $(H1')_i - (H2'a)_i$  и  $(H1')_i - (H2'b)_i$  соединены горизонтальной линией

$H3'$  и  $H4'$  были идентифицированы по эффектам кресс-релаксации с  $H1'$  в спектре NOESY. Кресс-пики  $(H4')_i - (H1')_i$  (прямой ЯЭО) обычно имеют большую интенсивность и смещены в более сильное поле по сравнению с соответствующими  $(H3')_i - (H1')_i$ -кресс-пиками [14] (непрямой процесс кресс-релаксации через  $2'a/2'b$ -протоны:  $H3' \rightarrow H2'a/H2'b \rightarrow H1'$ ). Кроме того, правильность отнесения  $3'$ -протонов подтверждали, используя их внутринуклеотидные ЯЭО-взаимодействия с ранее идентифицированными ароматическими и  $2'a/2'b$ -протонами, а также  $J$ -взаимодействие  $(H3')_i$  с  $(H2')_i$  в спектре DQFCOSY\*. Проверку правильности отнесения сигналов  $H4'$  осуществляли с помощью кресс-пиков  $(H4')_i - (H3')_i$  в спектре DQFCOSY.

Сигналы  $H5'a$  и  $H5'b$  не удалось идентифицировать из-за сильного перекрытия их между собой и с сигналом  $H4'$ .

Результаты идентификации протонов  $H6$ ,  $H8$ ,  $H5$  оснований, метильных протонов, а также протонов  $H1'$ ,  $H2'a$ ,  $H2'b$ ,  $H3'$  и  $H4'$  углеводных циклов представлены в табл. 1.

**Определение межпротонных расстояний.** Для получения структурной информации был определен ряд расстояний между протонами, сближенными в пространстве:  $(H6/H8)_i - (H1')_i$ ;  $(H6/H8)_i - (H1')_{i-1}$ ;  $(H6/H8)_i - (H2')_i$ ;  $(H6/H8)_i - (H2'a)_{i-1}$ ;  $(H6/H8)_i - (H2'b)_{i-1}$ ;  $(H5/CH_3)_i - (H6/H8)_{i-1}$ ;  $(H5/CH_3)_i - (H2'a/H2'b)_{i-1}$ ;  $(H1')_i - (H2'a)_i$ ;  $(H1')_i - (H2'b)_i$ .

Для коротких времен облучения величина ЯЭО<sub>j</sub>(i), наблюдаемая на протоне j при облучении протона i, пропорциональна скорости кресс-релаксации  $\sigma_{ij}$  между протонами i и j [6, 18, 19]:

$$\text{ЯЭО}_j(i) \approx \sigma_{ij} t \text{ при } t \rightarrow 0, \quad (1)$$

где  $t$  — длительность времени облучения.

С целью экспериментального определения ЯЭО для каждой пары протонов i и j была проведена серия одномерных  $^1H$ -ЯМР-экспериментов с временами облучения 0,075\*\*; 0,1; 0,25; 0,5 и 1,0 с. Величину ЯЭО<sub>j</sub>(i) определяли как отношение изменения интегральной интенсивности сигнала j в спектре ЯМР в условиях насыщения ядра i к интегральной

\* DQFCOSY —  $J$ -корреляционная спектроскопия с использованием двухквантового фильтра.

\*\* Эксперименты с  $t = 0,075$  с проводили лишь в тех случаях, когда величина ЯЭО (t) превышала —1%.

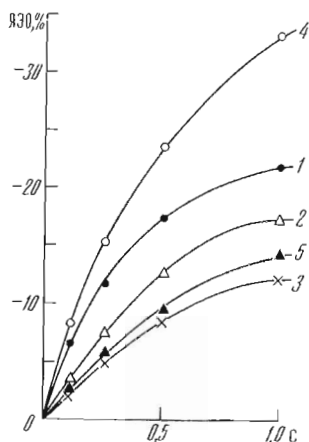


Рис. 6. Зависимость величины ЯЭО на протонах Н6(Т-3) (1), Н2'б (G-2) (2) и Н2'а (G-2) (3) при насыщении сигнала СН<sub>3</sub>(Т-3) и величины ЯЭО на протонах Н5(С-8) (4) и Н1' (G-7) (5) при насыщении сигнала Н6(С-8) от времени насыщения  $t$

интенсивности сигнала  $j$  в отсутствие насыщения [20]:

$$\text{ЯЭО}_j(i) = \frac{(I_j - I_j^0)^*}{I_j^0}, \quad (2)$$

где  $I_j$  — интегральная интенсивность сигнала  $j$  в условии насыщения ядра  $i$ ;  $I_j^0$  — интегральная интенсивность сигнала  $j$  в отсутствие насыщения.

Скорость кросс-релаксации определяли из начального линейного участка кривой ЯЭО ( $t$ ), используя уравнение (1). Возможны два альтернативных способа определения  $\sigma_{ij}$  для пары протонов  $i$  и  $j$ :

1) измерение величины ЯЭО на протоне  $j$  при облучении протона  $i$  при различных временах облучения  $t$ ;

2) обратный эксперимент с облучением протона  $j$  и измерением ЯЭО <sub>$i$</sub>  ( $j$ ). В некоторых случаях удалось определить  $\sigma_{ij}$  двумя способами.

На рис. 6 приведена зависимость ЯЭО от времени облучения для некоторых протонов. Во всех случаях для времен облучения, меньших 0,1 с, наблюдается линейная зависимость ЯЭО от времени  $t$ .

Таблица 1

Значения химических сдвигов протонов Н5, Н6, Н8 оснований, метильных протонов и протонов 1', 2'а, 2'б, 3' и 4' углеводных циклов дуплекса d(pTGTTTGGC)·d(pCCAAAC)A

Нуклеотидный остаток	Протоны						
	Н6/Н8	Н5/СН <sub>3</sub>	Н1'	Н2'а	Н2'б	Н3'	Н4'
Т-1	7,56	1,72	5,97	2,18	2,45	4,87	4,25
Г-2	8,05		6,10	2,74	2,92	4,99	4,44
Т-3	7,39	1,40	6,16	2,24	2,66	4,93	4,34
Т-4	7,52	1,68	6,16	2,20	2,61	4,92	4,21
Т-5	7,35	1,75	5,72	2,01	2,31	4,89	4,11
Г-6	7,87		5,62	2,51	2,69	4,99	4,36
Г-7	7,75		6,06	2,51	2,50	4,92	4,37
С-8	7,71	5,85	6,18	2,23	2,33	4,51	4,12
С-1	7,86	5,97	5,98	2,12	2,49	*	*
С-2	7,55	5,79	5,23	2,05	2,28	*	*
А-3	8,25		5,78	2,83	2,83	5,06	4,38
А-4	8,15		5,86	2,65	2,83	5,06	4,43
А-5	8,05		6,05	2,52	2,76	4,97	4,41
С-6	7,14	5,19	5,61	1,87	2,30	4,72	4,12
А-7	8,10		5,82	4,51		4,44	4,25

\* Значения химических сдвигов не определены из-за перекрывания сигналов.

\* Для больших молекул (мол. масса  $\geq 1000$ ) с  $\tau_c \geq 1 \cdot 10^{-9}$  с при рабочей частоте 400 МГц наблюдается отрицательный эффект Оверхаузера [6].

Скорость кросс-релаксации  $\sigma_{ij}$  для протонов  $i$  и  $j$  связана с расстоянием между ними следующим образом:

$$\sigma_{ij} = \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10 r_{ij}^6} \left( \tau_c - \frac{6\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right), \quad (3)$$

где  $\omega$  — частота спектрометра (рад/с),  $\gamma$  — гиромагнитное отношение;  $\hbar$  — постоянная Планка, деленная на  $2\pi$ ;  $\tau_c$  — время корреляции межпротонного вектора  $\overrightarrow{i-j}$  [21].

Поскольку  $\sigma_{ij} \sim 1/r_{ij}^6$  [6], соотношение между двумя межпротонными расстояниями можно записать как

$$\frac{r_{ij}}{r_{kl}} = \left( \frac{\sigma_{kl}}{\sigma_{ij}} \right)^{1/6} \quad (4)$$

при условии, что межпротонные векторы  $\overrightarrow{i-j}$  и  $\overrightarrow{k-l}$  имеют одинаковые времена корреляции  $\tau_c$ . Относительное межпротонное расстояние  $r_{ij}$  вычисляли, используя известное расстояние  $r_{kl}$  между парой протонов  $k$  и  $l$  и определяя экспериментально скорости кросс-релаксации  $\sigma_{ij}$  и  $\sigma_{kl}$ . В качестве  $r_{kl}$  использовали внутринуклеотидные расстояния, которые не зависят от пространственной структуры молекулы:  $r_{H2'a-H2'b}$ ,  $r_{H5(C)-H6(C)}$ ,  $r_{CH_3(T)-H6(T)}$ , равные 1,8; 2,5 и 2,7 Å соответственно. Стандартные векторы для определения неизвестного расстояния, согласно работе [22], были выбраны следующим образом:

а) для определения расстояния между протоном основания и  $H2'a/H2'b$ -протоном дезоксирибозы ( $(H6/H8)_i - (H2'a)_i$ ,  $(H6/H8)_i - (H2'a)_{i-1}$ ,  $(H6/H8)_i - (H2'b)_{i-1}$ ,  $(H5/CH_3)_i - (H2'a/H2'b)_{i-1}$ ) использовали  $r_{H2'a-H2'b}$  и среднее значение  $\sigma_{H2'a-H2'b}$ .

б) для определения расстояния между протонами оснований ( $(H6/H8)_i - (H5)_{i+1}$ ), а также между протоном основания и  $1'$ -протоном дезоксирибозы ( $(H6/H8)_i - H1'_i$ ;  $(H6/H8)_i - (H1')_{i-1}$ ) использовали  $r_{H5(C)-H6(C)}$  и среднее значение  $\sigma_{H5(C)-H6(C)}$ ;

в) для определения расстояния между протонами метильной группы и протоном основания ( $(H6/H8)_i - (CH_3)_{i+1}$ ) использовали  $r_{CH_3(T)-H6(T)}$  и среднее значение  $\sigma_{CH_3(T)-H6(T)}$ .

Значения межпротонных расстояний для некоторых протонов комплементарного комплекса  $d(\text{pTGTTCGGC}) \cdot d(\text{pCCAAAC})A$  приведены в табл. 2.

*Определение констант спин-спинового взаимодействия.* Известно, что В-подобная форма ДНК характеризуется S-типом конформации углеводного цикла (C2'-эндо; C3'-экзо; C2'-эндо-C3'-экзо), в то время как для А-ДНК характерен N-тип конформации сахара (C3'-эндо; C2'-экзо; C3'-эндо-C2'-экзо). Исследования олигонуклеотидов в растворе методом ЯМР показали, что углеводный цикл обладает определенной степенью конформационной свободы, т. е. находится в состоянии быстрого на шкале ЯМР равновесного перехода между основным и минорным конформационным состоянием [23—25]. С целью исследования геометрии углеводного цикла и определения относительного распределения между S- и N-типом конформаций был проведен анализ ряда межпротонных вицинальных констант:  $J_{1'2'a}$ ,  $J_{1'2'b}$ ,  $J_{2'a3'}$  и  $J_{2'b3'}$ , а также  $\Sigma_{1'}$ ,  $\Sigma_{2'a}$  и  $\Sigma_{2'b}$ , где  $\Sigma_{1'} = J_{1'2'a} + J_{1'2'b}$ ,  $\Sigma_{2'a} = J_{1'2'a} + J_{2'a2'b} + J_{2'a3'}$  и  $\Sigma_{2'b} = J_{1'2'b} + J_{2'2'b} + J_{2'b3'}$ . Значения констант спин-спинового взаимодействия, а также  $\Sigma_{1'}$ ,  $\Sigma_{2'a}$ ,  $\Sigma_{2'b}$  получали непосредственно из спектра DQFCOSY. В фазочувствительном спектре DQFCOSY кросс-пик имеет зависимость от конформации сахара сложную мультиплетную структуру [26—30]. Однако ограниченное спектральное разрешение не всегда позволяет получить тонкую структуру кросс-пиков, в точности соответствующую истинным значениям  $J$ -констант. Чтобы выделить индивидуальные компоненты тонкой структуры кросс-пиков, часто повышают цифровое разрешение вдоль одного из направлений, чаще вдоль  $\omega_2$  [31, 32]. В наших спектрах DQFCOSY разрешение по  $\omega_2$  составляло 0,9 Гц, по  $\omega_1$  — 7,0 Гц. Поэтому анализ структуры кросс-пиков проводили только вдоль  $\omega_2$ -направления.



Значение межпротонных расстояний, определяемое в эксперименте, и для рассчитанных структур

Взаимодействующие протоны	Эксперимент	S1	S1*	S2	S2*
Внутри нуклеотида					
H1' - H6/H8					
T-1	3,4	3,7	3,6	3,7	3,6
G-2	3,6	4,0	3,9	4,0	3,7
T-3	3,3	3,7	3,6	3,7	3,6
T-5	3,1	3,7	3,7	3,7	3,7
C-6	3,5	4,0	4,0	4,0	4,0
G-7	3,6	4,0	3,9	4,0	3,9
C-8	3,6	3,7	3,6	3,7	3,6
C-2	3,4	3,7	3,6	3,7	3,6
A-3	3,4	3,9	3,9	3,9	3,9
A-4	3,6	3,9	3,8	3,9	3,8
A-5	3,6	3,9	3,8	3,9	3,8
C-6	3,4	3,7	3,6	3,7	3,6
A-7	3,6	3,9	3,8	3,9	3,8
H2'a - H6/H8					
T-1	2,1	1,7	2,1	2,1	2,1
T-3	2,1	2,1	2,1	2,7	2,1
T-5	1,9	2,0	1,9	2,0	1,9
G-6	2,6	2,7	2,6	2,3	2,3
C-8	2,6	2,1	2,6	2,1	2,3
C-2	2,0	1,9	2,0	2,0	2,0
A-4	2,1	2,4	2,1	2,3	2,2
C-6	2,1	1,9	2,1	2,1	2,1
A-7	2,3	2,4	2,3	2,3	2,3
H1' - H2'b					
T-1	2,1	2,3	2,3	2,3	2,3
G-2	2,1	2,3	2,3	2,3	2,3
T-5	2,0	2,3	2,3	2,3	2,3
G-6	2,0	2,3	2,3	2,3	2,3
C-8	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3
C-2	2,7	2,3	2,3	2,3	2,3
A-4	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3
A-5	2,1	2,3	2,3	2,3	2,3
C-6	2,1	2,3	2,3	2,3	2,3
Между нуклеотидами					
H1' - H6/H8					
T-1 - G-2	3,7	3,1	3,7	3,5	3,7
G-2 - T-3	3,4	3,5	3,4	3,4	3,4
T-4 - T-5	3,6	3,5	3,6	3,4	3,6
T-5 - G-6	3,9	3,1	3,9	3,4	3,9
G-6 - G-7	3,4	3,6	3,5	3,4	3,4
G-7 - C-8	3,6	3,4	3,6	3,4	3,6
C-2 - A-3	3,4	3,6	3,4	3,4	3,4
A-3 - A-4	3,3	3,4	3,3	3,4	3,3
A-4 - A-5	3,3	3,5	3,3	3,4	3,3
A-5 - C-6	3,4	3,4	3,4	3,5	3,4
C-6 - A-7	3,6	3,4	3,6	3,4	3,6
H2'a - H6/H8					
T-1 - G-2	2,8	2,4	2,8	2,0	2,8
G-2 - T-3	2,4	2,1	2,4	2,2	2,4
T-3 - T-4	2,2	2,2	2,2	2,1	2,2
T-4 - T-5	2,0	2,2	2,0	2,1	2,0
T-5 - G-6	2,7	1,9	2,7	1,9	2,7
G-6 - G-7	2,1	1,7	2,1	2,0	2,1
G-1 - C-2	2,3	1,9	2,3	2,1	2,3
C-2 - A-3	2,9	2,0	2,6	2,3	2,6
A-5 - C-6	2,7	2,2	2,7	2,2	2,2
C-6 - A-7	2,7	2,1	2,7	2,0	2,7
H2'a - H5/(CH <sub>3</sub> )					
G-2 - T-3	2,5	2,9	2,8	2,7	2,7
T-4 - T-5	2,3	2,8	2,8	2,9	2,8
C-1 - C-2	2,7	2,9	3,0	3,3	3,2
A-5 - C-6	2,1	3,0	3,1	3,2	3,2
H2'b - H5/(CH <sub>3</sub> )					
G-2 - T-3	2,4	2,7	2,6	2,6	2,5

Взаимодействующие протоны	Эксперимент	S1	S1*	S2	S2*
C-1 — C-2	2,8	2,5	2,3	2,3	2,3
A-5 — C-6	2,5	2,2	2,5	2,2	2,5
C-6 — A-7	2,7	2,1	2,7	2,0	2,7
H6/H8 — H5/(CH <sub>3</sub> )					
C-1 — C-2	3,4	4,0	3,9	3,9	3,9
A-5 — C-6	3,6	4,0	3,9	4,0	3,9

На рис. 7а представлена H2'a/H2'b ( $\omega_1$ ) — H1' ( $\omega_2$ )-область спектра DQFCOSY. Этот же фрагмент спектра с H2'a/H2'b-областью вдоль  $\omega_2$ -направления приведен на рис. 7б. На H2'a и H2'b, принадлежащие одному нуклеотидному остатку, соединены горизонтальной линией и обозначены соответствующим символом.

Анализ кросс-пика H2'b ( $\omega_1$ ) — H1' ( $\omega_2$ ) (рис. 7а) вдоль  $\omega_2$ -направления позволяет получить информацию о вицинальных константах для 1'-протона. Расстояние между внешними компонентами мультиплета H2'b ( $\omega_1$ ) — H1' ( $\omega_2$ ) соответствует сумме его констант ( $\Sigma_{1'} = J_{1'2'a} + J_{1'2'b}$ ). Анализируя интенсивность кросс-пигов H1' — H2'a и H1' — H2'b, можно заключить, что  $J_{1'2'a} = J_{1'2'b}$ , поскольку интенсивность кросс-пика качественно отражает величину константы спин-спинового взаимодействия [33]. В соответствии с этим кросс-пик H2'b ( $\omega_1$ ) — H1' ( $\omega_2$ ) должен иметь квартетную структуру в направлении  $\omega_2$ . Однако

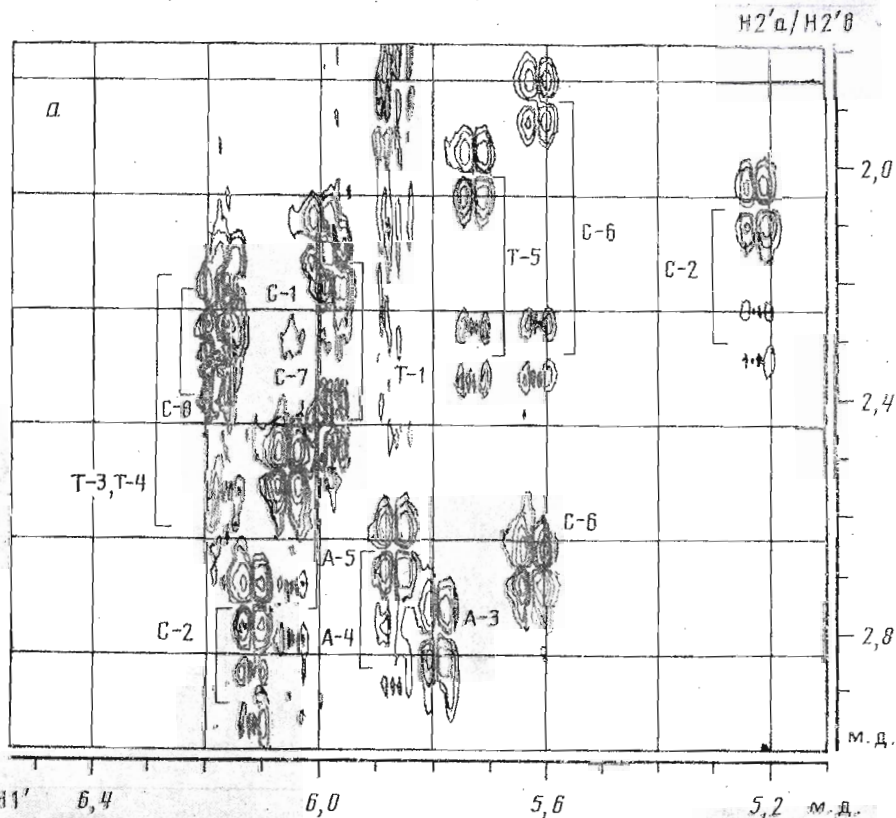
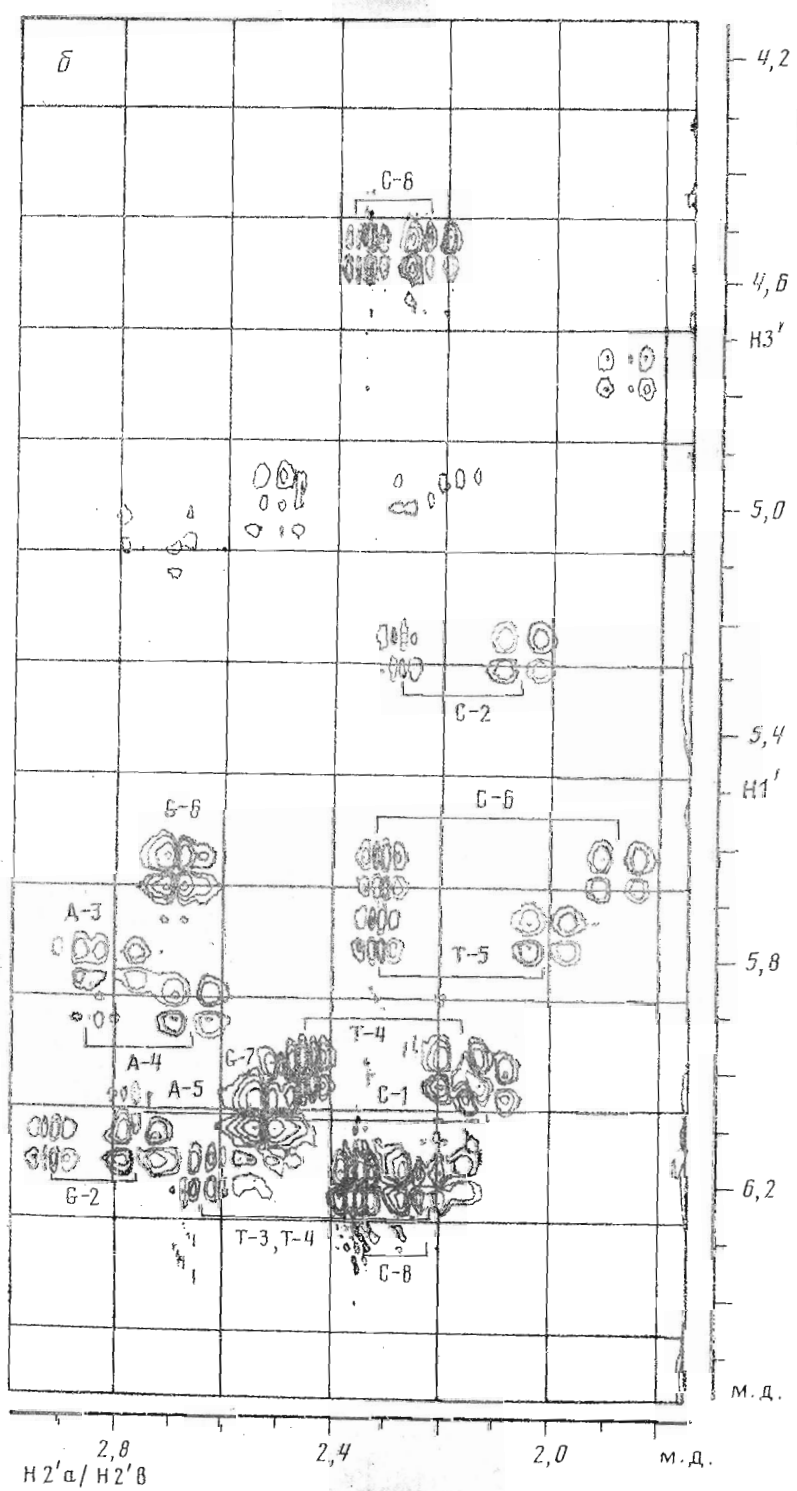


Рис. 7. Фрагмент H1'—H2'a/H2'b спектра DQFCOSY дуплекса d(pTGT'TTGCC)·d (pCCAAAC)A с H1'-областью вдоль  $\omega_2$ -направления (а) и с H2'a/H2'b-областью вдоль  $\omega_2$ -направления (б). Кросс-пики (H1')<sub>i</sub>—(H2'a)<sub>i</sub> и (H1')<sub>i</sub>—(H2'b)<sub>i</sub> соединены между собой (рис. 7, б см. стр. 1246)

из-за слабого различия в значениях  $J_{1'2'a}$  и  $J_{1'2'b}$ , а также недостаточного спектрального разрешения происходит перекрывание его внутренних противофазных компонент, что приводит к их частичному взаимному погашению. По этой причине  $J_{1'2'a}$  и  $J_{1'2'b}$  оценивали из профиля сечения крест-шика  $H2'b$  ( $w_1$ ) —  $H1'$  ( $w_2$ ) вдоль направления  $w_2$ , как показано на рис. 8а. Величина  $J_{1'2'a}$  (большая константа) соответствует расстоя-



нию между однофазными компонентами; значение  $J_{1'2'b}$  определяли из расстояния между противофазными компонентами [28—30].

В случае мультиплета  $H2'a (w_1) = H1' (w_2)$  совокупность вышеуказанных факторов, а также существенная ширина линий приводит к сильному искажению тонкой структуры кросс-пики, что делает невозможным определение КССВ.

Константы  $J_{2'a2'b}$ ,  $J_{2'az'}$  и  $J_{2'bz'}$  определяли, анализируя кросс-пики  $H1' - H2'a$  и  $H1' - H2'b$  в области  $H2'a/H2'b$  вдоль  $w_2$ -направления (рис. 7б), а также профиль сечения этих кросс-пигов вдоль  $w_2$ -направления (рис. 8б)

Ширина мультиплета  $H1' (w_1) - H2'b (w_2)$  характеризует  $\Sigma_{2'b}$ -сумму констант  $J_{1'2'b}$ ,  $J_{2'a2'b}$  и  $J_{2'bz'}$ . Геминальную константу  $J_{2'a2'b}$  определяли из расстояния между однофазными компонентами кросс-пики.

Величина  $J_{2'bz'}$  для всех нуклеотидных звеньев (за исключением С-8) близка к 0. Об этом свидетельствует отсутствие кросс-пигов между  $2'b$ - и  $3'$ -протонами, а также квартетная структура кросс-пики  $H1' (w_1) - H2'b (w_2)$  в направлении  $w_2$ , характерная для спина с двумя невырожденными взаимодействиями. Таким образом, прямое измерение  $J_{2'bz'}$  из спектров DQFCOSY невозможно. Значение этой константы оценивали, используя формулу  $J_{2'bz'} = \Sigma_{2'b} - (J_{1'2'b} + J_{2'a2'b})$ .

Тонкая структура кросс-пики  $H1' (w_1) - H2'a (w_2)$  сильно изменена из-за взаимного погашения перекрывающихся противофазных компонент и взаимного усиления однофазных компонент, что препятствует прямому измерению КССВ. Однако, используя ранее определенные  $J_{1'2'a}$  и  $J_{2'a2'b}$ , а также измеряя  $\Sigma_{2'a}$  из ширины мультиплета  $H1' (w_1) - H2'a (w_2)$ , можно определить величину  $J_{2'az'}$ :  $J_{2'az'} = \Sigma_{2'a} - (J_{1'2'a} + J_{2'a2'b})$ .

Значения  $J_{1'2'a}$ ,  $J_{1'2'b}$ ,  $J_{2'a2'b}$ ,  $J_{2'az'}$ ,  $J_{2'bz'}$ , а также  $\Sigma_{1'}$ ,  $\Sigma_{2'a}$  и  $\Sigma_{2'b}$  приведены в табл. 3.

Построение модели структуры дуплекса в растворе выполнено методом ограниченной молекулярной механики (ОММ) [33—35]. В методе ОММ исследуется конформационное пространство макромолекулы, чтобы с учетом экспериментальных ограничений на межпротонные расстояния выбрать состояния, которые может принимать молекула. Проблема в том, чтобы сделать это наиболее экономичным и надежным способом. Метод ограниченной молекулярной динамики (ОМД) [36, 37] позволяет охватить достаточно обширные области конформационного пространства и не требует предварительных знаний о строении молекулы, поэтому он наиболее универсален. Однако для расчета дуплексов нуклеиновых кислот он приемлем лишь для суперкомпьютера, так как для расчета только одного цикла оптимизации необходимо моделировать траектории длительности в 100 пс. Для системы из 400 атомов моделирование такой траектории требует сотни часов машинного времени на ЕС ЭВМ 1061. Ограниченная молекулярная механика позволяет рассчитывать дуплексы ДНК за доступное время, но исследовать лишь ограниченную область конформационного пространства. Результат расчетов методом ОММ в значительной степени зависит от удачного выбора стартовых состояний, обеспечивающего охват важных конформационных областей, значимость которых предполагается на основании предварительного исследования. Если найден весь вероятный спектр энергетически возможных состояний, учет ограничений на расстояния позволит выбрать из этого набора состояния,

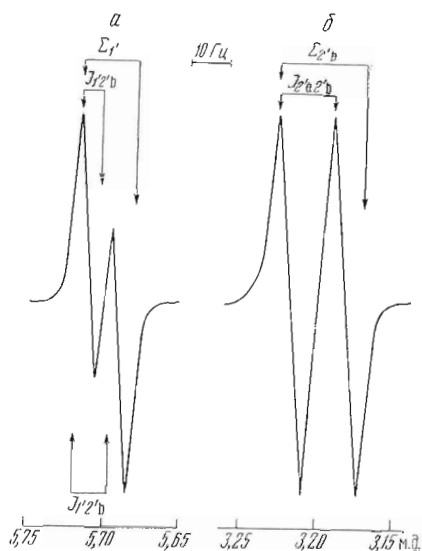


Рис. 8. Профиль сечения кросс-пики  $H2'b (w_1) - H1' (w_2)$  (Т-5) и кросс-пики  $H1' (w_1) - H2'b (w_2)$  (Т-5) вдоль  $w_2$ -направления

## Значения констант спин-спинового взаимодействия (Гц)

Основание	Структура	$P$ , град	$J_{12a}$	$J_{12b}$	$J_{23a}$	$J_{23b}$	$J_{23a2b}$	$\Sigma_1$	$\Sigma_2^a$	$\Sigma_2^b$	$\Delta^*$
T-1	S1	158	9,5	5,8	6,4	0,0					
	S1*	173	9,1	6,3	5,9	0,0					0,4
	S2	154	9,6	5,7	7,7	0,0					
	S2*	158	9,5	5,9	6,2	0,0					0,5
	Эксперимент		8,8	5,9	5,0	1,9	12,6	14,6	26,4	20,3	
G-2	S1	124	9,4	6,2	8,3	0,5					
	S1*	126	9,5	5,9	8,2	0,4					0,3
	S2	153	9,6	5,7	7,7	0,0					
	S2*	153	9,6	5,7	7,7	0,0					0,4
	Эксперимент		9,1	5,9	2,5	2,0	14,0	15,0	25,6	20,5	
T-3	S1	159	9,5	5,8	6,4	0,0					
	S1*	156	9,6	6,0	7,7	0,0					0,8
	S2	153	9,6	5,7	7,7	0,0					
	S2*	154	9,6	5,7	7,7	0,0					0,6
	Эксперимент		9,8	4,9	**	2,9	16,6	14,7	**	24,4	
T-4	S1	157	9,6	5,8	6,4	0,0					
	S1*	150	9,6	5,6	6,7	0,0					0,5
	S2	153	9,6	5,7	7,7	0,0					
	S2*	149	9,6	5,7	6,8	0,0					0,6
	Эксперимент		9,8	4,9	**	2,4	16,6	14,7	**	23,9	
T-5	S1	160	9,5	5,8	6,3	0,0					
	S1*	149	9,6	5,7	6,8	0,0					1,1
	S2	153	9,6	5,7	7,7	0,0					
	S2*	150	9,6	5,6	6,7	0,0					1,1
	Эксперимент		8,1	5,9	3,6	1,9	14,7	14,0	26,4	22,5	
G-6	S1	127	9,5	5,9	8,2	0,0					
	S1*	135	9,6	5,7	7,6	0,0					
	S2	153	9,6	5,7	7,7	0,0					
	S2*	149	9,6	5,7	6,8	0,0					
	Эксперимент		**	**	**	**	**	15,6	27,3	20,5	
G-7	S1	160	9,5	5,8	6,3	0,0					
	S1*	158	9,5	5,8	6,4	0,0					
	S2	153	9,9	5,7	7,7	0,0					
	S2*	153	9,9	5,7	7,7	0,0					
	Эксперимент		**	**	**	**	**	**	**	**	**
C-8	S1	147	9,6	5,5	6,5	0,0					
	S1*	119	9,2	6,2	8,6	0,8					1,0
	S2	153	9,6	5,7	5,7	0,0					
	S2*	143	9,7	5,7	5,7	0,0					1,4
	Эксперимент		7,8	5,9	5,8	3,4	13,5	13,7	27,2	22,3	
C-1	S1	161	9,5	5,9	6,2	0,0					
	S1*	161	9,5	5,9	6,2	0,0					1,4
	S2	153	9,6	5,7	7,7	0,0					
	S2*	161	9,5	5,9	6,3	0,0					1,4
	Эксперимент		7,8	6,9	3,9	1,9	14,7	13,7	26,4	22,5	
C-2	S1	160	9,5	5,8	6,3	0,0					
	S1*	160	9,5	5,8	6,3	0,0					1,2
	S2	152	9,6	5,7	7,7	0,0					
	S2*	160	9,5	5,8	6,3	0,0					1,2
	Эксперимент		7,8	5,9	2,9	1,0	14,7	14,7	25,4	22,5	
A-3	S1	127	9,5	5,9	8,2	0,0					
	S1*	145	9,7	5,7	7,0	0,0					
	S2	152	9,6	5,7	7,7	0,0					
	S2*	155	9,6	5,7	6,5	0,0					



Осно- вание	Структура	$P$ , град	$J_{1'2'a}$	$J_{1'2'b}$	$J_{2'a3'}$	$J_{2'b3'}$	$J_{2'a2'b}$	$\Sigma_{1'}$	$\Sigma_{2'a}$	$\Sigma_{2'b}$	$\Delta$ *
A-4	Экспе- римент		**	**	**	**	**	**	14,6	26,4	0,8
	S1	151	9,6	5,6	6,7	0,0					
	S1 *	160	9,5	5,8	6,3	0,0					
	S2	152	9,6	5,7	7,7	0,0					
	S2 *	156	9,6	5,7	6,5	0,0					
A-5	Экспе- римент		8,8	4,9	**	2,0	15,6	13,7	**	22,4	0,8
	S1	153	9,6	5,7	7,7	0,0					
	S1 *	156	9,6	5,7	6,5	0,0					
	S2	152	9,6	5,7	7,7	0,0					
	S2 *	155	9,6	5,7	6,6	0,0					
C-6	Экспе- римент		8,8	4,9	**	2,0	15,5	13,7	**	22,4	1,3
	S1	162	9,5	5,9	6,2	0,0					
	S1 *	156	9,6	5,7	6,5	0,0					
	S2	152	9,6	5,7	7,7	0,0					
	S2 *	153	9,6	5,7	7,7	0,0					
A-7	Экспе- римент		7,8	5,9	4,7	2,0	14,7	13,7	27,2	22,5	1,3
	S1	127	9,5	—	8,2	—					
	S1 *	143	9,7	—	7,1	—					
	S2	152	9,6	—	7,7	—					
	S2 *	153	9,6	—	7,7	—					
	Экспе- римент		4,9	—	6,9	—		4,9	11,7		

\*  $\Delta$  — среднеквадратичное отклонение расчетных и экспериментальных значений определены для констант  $J_{1'2'a}$  и  $J_{1'2'b}$ . Точность определения экспериментальных значений констант  $J_{1'2'}$ ,  $J_{1'2'b}$ ,  $J_{2'a2'b}$ , а также  $\Sigma_{1'}$ ,  $\Sigma_{2'a}$  и  $\Sigma_{2'b}$  составляла  $\pm 1$  Гц, констант  $J_{2'a3'}$  и  $J_{2'b3'}$   $\pm 3$  Гц.

\*\* Экспериментальные значения не определены из-за перекрытия кросс-пиков в спектре.

наилучшим образом описывающие конформационное поведение олигонуклеотида в растворе. Для методов, учитывающих энергетические характеристики состояний (ОММ и ОМД), существует проблема: насколько выбор структуры определяется ограничениями по расстояниям, а насколько зависит от выбора потенциалов межзатомных взаимодействий и способа учета среды.

Выбор вероятно присутствующих в растворе конформеров из набора энергетически возможных на основе экспериментальных данных проводили следующим образом: геометрический штраф отклонения расчетных расстояний от соответствующих расстояний, полученных из эксперимента (табл. 2), описывали в виде гармонического псевдопотенциала ограничений ЯЭО, добавляемого к полной энергии молекулы [38]:

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

$$C_{+}(r_{ij} - r_{ij}^0), \text{ если } r_{ij}^0 < r_{ij}, \quad (5)$$

$$C_{+,-} = SkT / \langle \Delta r_{+,-} \rangle^2. \quad (6)$$

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

В качестве параметров, определяющих структуру дуплекса, выбраны следующие параметры, которые определяют ориентацию комплементарных пар оснований друг относительно друга [39]:  $t$  (twist) — угол спирального вращения  $\theta_i$  (tilt) — угол наклона,  $\theta_p$  (propeller twist) — угол пропеллера,  $H$  (rise) — шаг спирали,  $y$  (slide) — дислокация; а также параметры, описывающие внутреннюю структуру каждого нуклеотида: фазовый угол псевдповращения  $P$ , задающий конформацию сахарного

кольца, и торсионный угол  $\chi$ . В анализе не включали торсионные параметры фосфатов, так как они подвергаются более интенсивному усреднению вследствие внутреннего движения по сравнению с основаниями.

Из выражения (6) видно, что, чем точнее определено расстояние, тем больший вклад оно дает в энергию ЯЭО-ограничений и соответственно тем сильнее учитывается в процессе построения структуры молекулы путем оптимизации геометрии. Поэтому важно правильно оценить погрешности определения расстояний между протонами. Прямой метод определения межпротонных расстояний по интенсивностям ЯЭО согласно [4] не обладает достаточной точностью и может привести к стерически несовместным результатам. Двухспиновое приближение (1) не учитывает не прямые пути перехода намагниченности, существующие в многоспиновой системе. Для извлечения достоверной структурной информации из данных ЯЭО необходимо решать матричное уравнение релаксации всей системы взаимодействующих спинов, которое учитывает вероятность не прямых переходов намагниченности [40]. Матричный элемент экспоненциальной матрицы релаксации описывается уравнением [41]:

$$\text{ЯЭО}_{ij}(t) = \hat{R}_{ij}t + 1/2 \sum_k \hat{R}_{ik} \hat{R}_{kj} t^2 + (i/3!) \sum_{k,l} \hat{R}_{ik} \hat{R}_{kl} \hat{R}_{lj} t^3 + \dots \quad (7)$$

где  $\hat{R}$  — матрица релаксации,  $t$  — время облучения. Первый член, соответствующий приближению (1), описывает прямое взаимодействие спинов  $i$  и  $j$ . Второй член выражает диффузию сигнала ЯЭО от спина  $i$  через все спины на спин  $j$ .

Полное уравнение релаксации решается итерационными методами: поскольку матрица релаксации содержит информацию о межпротонных расстояниях, выбирается некоторая стартовая структура, для нее рассчитываются спектры ЯЭО, а затем структура варьируется до тех пор, пока не достигается соответствие расчетных и экспериментальных наборов ЯЭО-спектров.

Решение матричного уравнения релаксации требует больших затрат машинного времени и не представляется возможным для таких сложных систем, как дуплексы олигонуклеотидов. Чтобы уменьшить вклад спиновой диффузии, используют [42] очень короткие ( $< 100$  мс) времена облучения. Однако при малых временах вследствие малой интенсивности кросс-пика для межпротонных расстояний более 3 Å сильно ухудшается соотношение сигнал — шум и соответственно возрастает погрешность определения расстояний. Систематическая ошибка при определении расстояния вследствие неизбежного вклада спиновой диффузии в наблюдаемую величину ЯЭО, который не учитывается в приближении (3), оценивается в работе [43]. Показано, что с увеличением вклада спиновой диффузии значение неизвестного расстояния, которое определяется по соотношению (3), стремится к величине соответствующего вектора-маркера. Другими словами, если неизвестное расстояние меньше маркерного, его значение будет систематически завышаться; наоборот, если неизвестное расстояние больше маркерного, его значение будет систематически занижаться. Таким образом, величина ошибки измерения зависит от величины неизвестного расстояния. Чем оно меньше, тем меньше вклад спиновой диффузии в наблюдаемую величину ЯЭО и, следовательно, тем меньше ошибка. Величина погрешности измерения расстояний по уравнению (3) оценивается следующим образом: для  $r < 2,4$  Å систематическая ошибка  $-0,1 \div +0,2$  Å; для  $2,4$  Å  $< r < 3,4$  Å ошибка  $-0,15 \div +0,2$  Å; для  $3,4$  Å  $< r < 4,4$  Å ошибка  $-0,2 \div +0,4$  Å.

Спиновая диффузия особенно сказывается на ЯЭО H1' — H6/H8 (межпротонное расстояние 3,7—3,9 Å), поскольку H1' сближен с протонами H2'a, H2'b на расстоянии 2,4—3,1 Å (путь интенсивной спиновой диффузии H1' → (H2'a/H2'b → (H6/H8))). В определение расстояния кроме систематической ошибки, обусловленной непрямыми переходами намагниченности, дополнительная погрешность вносится вследствие высокого уровня шума при малых временах облучения. Для сигналов H1' — H6/H8 уровень шума достигает 50%, что дает дополнительную погрешность в оп-

## Расчет энергии оптимальных конформаций дуплекса d(pTGTTTGGC)·d(pCCAAAC)A

Энергия, ккал/моль	S1	S1*	S2	S2*
Ван-дер-ваальсова	-142,0	-141,7	-132,3	-134,7
Электростатическая	-44,2	-41,6	-54,2	-45,2
Торсионная	22,0	17,0	21,6	21,1
Гидратации	-190,9	-188,9	-189,5	-191,4
Скрепок	-21,4	-16,0	-22,3	-26,6
Взаимодействия с ионами	-17,2	-15,7	-17,5	-16,9
Полная энергия дуплекса	-628,0	-623,3	-626,1	-626,8

Таблица 5

## Параметры оптимальных конформаций дуплекса d(pTGTTTGGC)·d(pCCAAAC)A

Основания	$\tau$ , град		$H$ , Å		$\nu$ , Å		$\chi$ , град		$\rho$ , град	
	S1	S1*	S1	S1*	S1	S1*	S1	S1*	S1	S1*
T-1					0,8	0,9	98	116	158	173
G-2	29	30	3,3	3,8	1,3	1,6	122	113	124	126
T-3	40	41	3,4	3,6	2,9	1,5	118	119	159	156
T-4	38	39	3,4	3,5	0,8	0,6	121	120	157	150
T-5	38	39	3,3	3,4	0,5	0,6	109	110	160	149
G-6	29	30	3,4	3,7	1,0	1,0	133	128	127	135
G-7	40	41	3,4	3,7	1,0	1,3	122	120	160	158
C-8	38	39	3,4	3,2	1,1	1,0	120	135	147	119
C-1	40	41	3,4	3,1	0,8	0,6	122	119	161	161
C-2	29	30	3,4	3,5	0,7	0,5	133	118	160	160
A-3	38	39	3,4	3,9	0,8	1,0	112	114	127	145
A-4	38	39	3,4	3,8	0,7	1,3	122	109	151	160
A-5	40	41	3,4	4,0	0,9	1,2	124	110	153	156
C-6	29	30	3,4	4,1	1,0	0,9	119	117	162	156
A-7					1,2	1,3	113	118	127	143
	S2	S2*	S2	S2*	S2	S2*	S2	S2*	S2	S2*
T-1					0,8	0,9	118	116	154	162
G-2	37	38	3,5	3,8	0,8	1,3	116	120	153	153
T-3	37	38	3,5	3,9	0,8	1,5	118	119	153	154
T-4	37	38	3,5	3,6	0,8	1,3	117	117	153	149
T-5	37	38	3,5	3,6	0,8	0,6	117	114	153	150
G-6	37	38	3,5	3,8	0,8	0,8	116	117	153	149
G-7	37	38	3,5	3,6	0,8	0,9	118	120	153	153
C-8	37	38	3,5	3,4	1,2	1,0	118	117	153	143
C-1	37	38	3,5	3,3	0,8	0,5	119	115	153	161
A-2	37	38	3,5	3,6	0,8	0,8	119	117	152	160
C-3	37	38	3,5	3,6	0,8	0,9	118	118	152	155
A-4	37	38	3,5	3,7	0,8	1,0	118	115	152	156
A-5	37	38	3,5	3,9	0,8	0,9	118	117	152	155
C-6	37	38	3,5	4,2	0,8	1,0	118	119	152	153
A-7					0,8	0,9	118	120	152	153

ределении расстояния 10%. Поэтому суммарная ошибка складывается из систематической ошибки при определении интенсивности кросс-пика и зависит от величины определяемого расстояния, согласно [43]: для  $r < 2,0$  Å ошибка  $-0,2 \div +0,2$  Å; для  $2,0$  Å  $< r < 2,5$  Å ошибка  $-0,2 \div +0,4$  Å; для  $2,5$  Å  $< r < 3,3$  Å ошибка  $-0,3 \div +0,5$  Å; для  $3,3$  Å  $< r < 6,0$  Å ошибка  $-0,5 \div +0,7$  Å. Предполагаемые значения погрешности достаточно велики, поэтому можно считать, что влияние погрешности, возникающей из-за различных эффективных времен корреляции межпротонных векторов, практически не сказывается на конечном результате.

Для ошибок определения межпротонных расстояний ( $\Delta r$ ) 0,1; 0,15; 0,2; 0,3 и 0,4 Å были выбраны значения силовых констант 119, 53, 29, 13,2 и 7,5 ккал/моль·Å соответственно.

В качестве стартовых выбраны две В-подобные структуры: S1 и S2. Структура S1 построена с учетом зависимости спиральных параметров от последовательности оснований, согласно расчетам дуплексов нуклеиновых кислот [44]. Структура S2 получена из идеальной регулярной структуры Арнотта [45]. В обоих случаях нами проведена полная оптимизация по спиральным и торсионным параметрам. Влияние растворителя учитывали в приближении статистической модели среды [46-47]. В качестве ограничений взято 43 межпротонных расстояния. Проведена оптимизация стартовых структур S1 и S2 с учетом ограничений на расстояния по всем спиральным и торсионным параметрам по функционалу, являющемуся суммой полной энергии и геометрического штрафа (5). Получены структуры S1\* и S2\*, соответствующие минимуму функционала методом ОММ. Среднеквадратичное отклонение расчетного набора расстояний от экспериментального составляет 0,1 Å для структур S1\* и S2\*. Для стартовых структур S1 и S2 эти отклонения существенно выше (порядка >0,6 Å). Значения энергий торсионных углов и спиральных параметров молекулы в различных состояниях приведены в табл. 4 и 5 соответственно.

### Результаты и обсуждение

Из качественного анализа данных ЯЭО однозначно следует, что дуплекс d(pTGTTCG·GG)·d(pCCAAC)A в растворе присутствует в В-форме. Поэтому в качестве стартовых структур для оптимизации методом ОММ

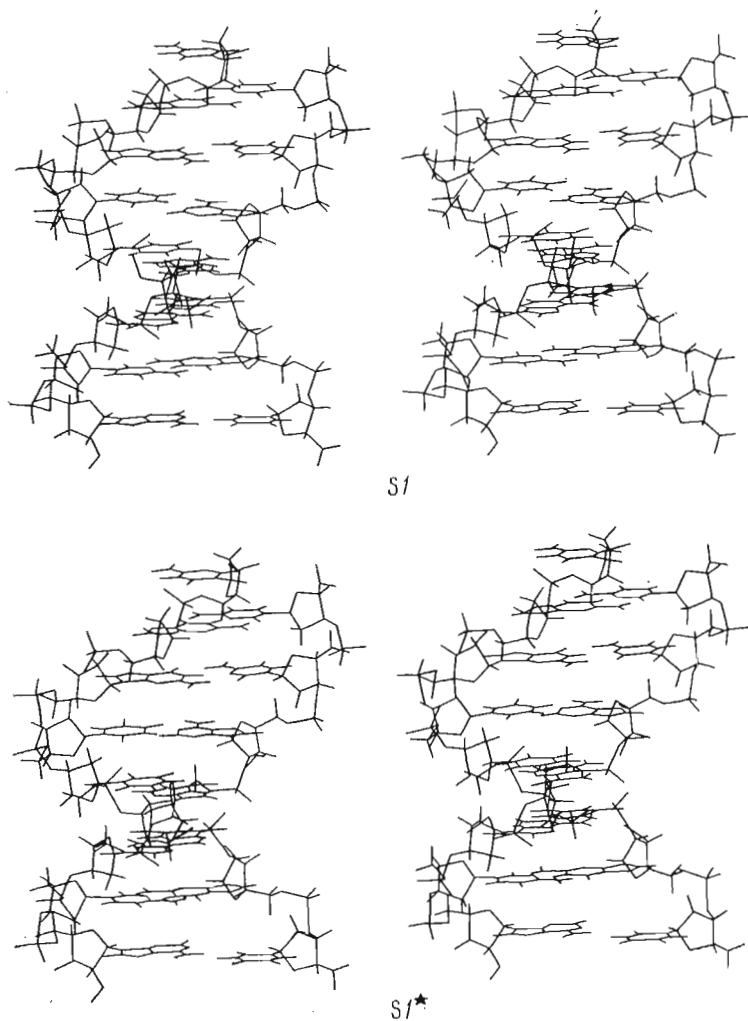
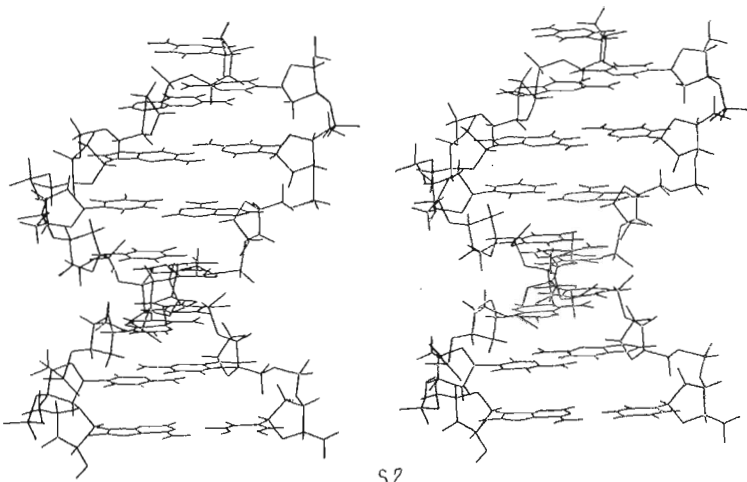
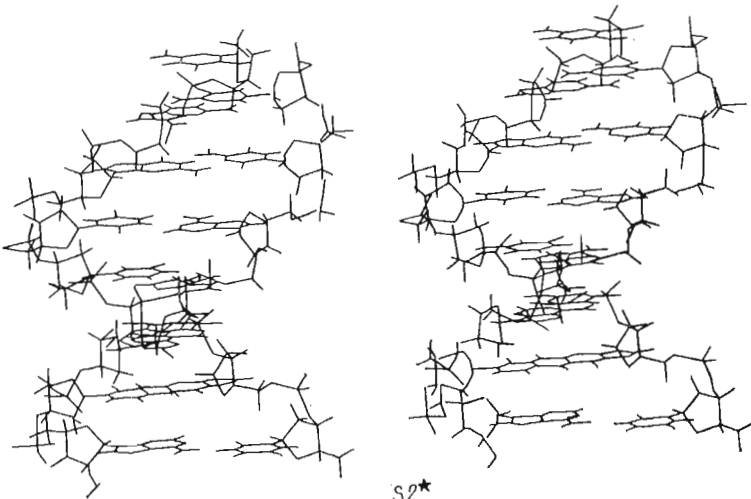


Рис. 9. Стереопары



S2



S2\*

конформаций дуплекса

рассматривали только В-подобные конформации, различающиеся, однако, детальной геометрией дуплексов. Выбирая структуру S1 со спиральными параметрами, зависящими от последовательности оснований, в отличие от усредненной структуры S2 предполагалось установить, насколько последовательность влияет на структуру молекулы. Сравнение параметров стартовых и результирующих структур (табл. 5, рис. 9) показывает, что включение в расчеты ограничений на межпротонные расстояния изменяет значения параметров, однако основные черты стартовых структур S1 и S2 сохраняются. Значения межпротонных расстояний, полученных из эксперимента и рассчитанных для структур S1, S1\*, S2, S2\*, приведены в табл. 3. Видно, что расчетные расстояния для структур S1\*, S2\* воспроизводят эксперимент в пределах погрешности. Исключения составляют расстояния H2'a—H5, H2'b—H5, которые заметно занижены в эксперименте, что, по-видимому, можно связать с интенсивной спиновой диффузией в группе сближенных протонов H5, H6, H2'a, H2'b. Структура S1\*, так же как S1, сохраняет зависимость от последовательности оснований (особенно для углов спиральной закрутки), структуры S2 и S2\* имеют более однородное строение. В то же время структуры S1\* и S2\* имеют сходство, тогда как S1 и S2 совершенно различны. Особенностью структур S1\* и S2\* является «разрыхление» концов двойной спирали (табл. 5). Конформационные энергии структур S1, S2, S1\* и S2\* отличаются друг от друга не более чем на 5 ккал/моль, что соответствует величине тепловых флуктуаций. Различия структурных параметров S1\* и S2\*, с одной сто-



роны, укладываются в оценки пределов погрешности определения параметров при реконструкции структуры молекулы по межпротонным расстояниям [48], с другой — соответствует разбросу значений за счет тепловых флуктуаций [44]. Поэтому можно представить структуры  $S1^*$  и  $S2^*$  как некоторые вероятные состояния молекулы дуплекса в растворе, являющиеся результатом теплового движения молекулы вблизи некоторого среднего состояния.

Отдельного обсуждения требует следующий важный вопрос: насколько точно можно восстановить структуру олигонуклеотида по межпротонным расстояниям? Поскольку мы имеем ограниченный набор расстояний (число расстояний меньше числа степеней свободы дуплекса), вопрос однозначного восстановления точной структуры остается открытым. Аналогичные проблемы возникают в рентгеноструктурных исследованиях неупорядоченных (аморфных, жидких и др.) веществ [49]. Не решен вопрос, насколько точно структура спирали определяется набором межпротонных расстояний в зависимости от полноты набора расстояний, определенных с высокой степенью точности. Недавно появились работы, обсуждающие эту проблему [41, 48]. В работе [48] оценивается погрешность восстановления спиральных параметров только на основе экспериментального набора расстояний, рассчитанных с точностью 0,2 Å. Определяемые расстояния не могут быть равномерно распределены по структуре молекулы, поэтому разные структурные параметры определяются с различной степенью точности. Хуже всего определяется положение фосфатов, лучше — оснований, причем терминальные основания определяются хуже внутренних. Приводятся следующие оценки погрешности (%):  $P \sim \pm 3$ ,  $\theta_i \sim \pm 7$ ,  $t \pm 6$ ,  $\chi \pm 18$ ,  $H \sim \pm 17$ ,  $y \sim \pm 13$ ,  $\theta_s \sim \pm 15$ . Остальные параметры определяются по данным ЯЭО с существенно большей неопределенностью.

Таким образом, даже при оптимальных экспериментальных данных определение параметров спиральной структуры с точностью, достаточной для установления их достоверной связи с последовательностью оснований дуплекса, проблематично. Экспериментальный набор межпротонных расстояний с учетом погрешности соответствует широкой области параметров в конформационном пространстве, и одним и тем же экспериментальным значениям могут в равной степени удовлетворять несколько структур. Повышение достоверности оценки конформационной энергии дуплекса в растворе методом молекулярной механики в зависимости от деталей геометрии дуплекса играет дополнительную дискриминирующую роль при выборе альтернативных структур. В работе [41] на основе графического анализа зависимости параметра псевдowращения  $P$  от межпротонных расстояний показано, что для В-ДНК при  $P$ , имеющем значения  $100^\circ < P < 180^\circ$ , ни одно внутринуклеотидное расстояние не меняется более чем на 0,3 Å. Поэтому точное определение конформации дезоксирибозы внутри  $S$ -области на основании измеренных с большей погрешностью межпротонных расстояний невозможно. Достоверность определения конформации рибозы может быть повышена путем измерения КССВ методом DQFCOSY и определения значений параметра псевдowращения  $P$  по уравнениям Карплуса [41]. В то же время сравнение расчетов констант для конформаций рибозы, полученных методом ОММ, с результатами независимого определения этих констант из эксперимента является тестом достоверности данных метода ОММ. В целом между расчетными и экспериментальными значениями  $^3J_{1'2'a}$ ,  $^3J_{1'2'b}$  в структурах  $S1^*$ ,  $S2^*$  имеется удовлетворительное соответствие со средним квадратичным отклонением порядка погрешности эксперимента — 1 Гц (табл. 3). На рис. 10 приведены зависимости величин вицинальных констант спин-спинового взаимодействия протонов рибозы от параметра псевдowращения  $P$ , построенные по уравнениям [41]. Изменения констант  $J_{1'2'a}$ ,  $J_{1'2'b}$  в области  $S$ -конформаций рибозы  $110^\circ < P < 180^\circ$  укладываются в интервал 1 Гц, поэтому для определения конформации дезоксирибозного цикла с большой точностью требуется уменьшение экспериментальной погрешности до 0,3—0,5 Гц, что довольно затруднительно на таких сложных системах, как дуплексы олигонуклеотидов. Увеличение отклонения расчетных значений

констант  $J_{1'2'a}$ ,  $J_{1'2'b}$  от экспериментальных до 1,4 Гц для концевых нуклеотидов С-8 и С-1, вероятно, можно отнести за счет большей конформационной подвижности этих нуклеотидов в пределах  $90^\circ < P < 180^\circ$ , т. е. без перехода в область N-состояний, поскольку экспериментальный набор межпротонных расстояний удовлетворительно описывается структурами S1\*, S2\*.

Таким образом, применение метода ЯМР для исследования тонкой структуры дуплексов нуклеиновых кислот в растворе сталкивается с рядом проблем как в смысле полноты и достоверности оценки точности экспериментальных данных, так и в смысле совершенствования теоретических методов обработки структурной информации. Наиболее перспективно, на наш взгляд, сочетание методов ЯМР и молекулярной механики для определения строения комплексов нуклеиновой кислоты с низкомолекулярными лигандами в растворе, так как в этом случае требование к точности и полноте экспериментальной информации может быть ослаблено и компенсировано повышением достоверности расчетов структур методом молекулярной механики.

### Экспериментальная часть

Для синтеза олигодезоксинуклеотидов использовали N-ацил-3'-O-левулинил-5'-n-хлорфениловые эфиры 5'-моно- и динуклеотидов, 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид производства НИВХ СО АН СССР, N-метилимидазол (Ega, Chemie, ФРГ).

Синтез олигонуклеотидов d(pTGTTTGGC) и d(pCCAAAC)A осуществляли фосфотриэфирным методом в растворе соответственно [50]. Целевые олигонуклеотиды деблокировали обработкой 0,3 М раствором тетрабутиламмонийфторида в 50% водном пиридине, pH 6,5 (12 ч при 20° С), а затем 25% водным аммиаком (5 ч при 50° С) [51]. Выделение и очистку деблокированных олигонуклеотидов проводили с помощью ионообменной и обращенно-фазовой хроматографии на хроматографе Altex-332 (США) согласно [2]. Осаждение олигонуклеотидов в ацетон осуществляли по методу [52].

*Приготовление образцов для записи спектров  $^1\text{H}$ -ЯМР.* Для получения натриевой соли олигонуклеотидов раствор, содержащий  $10^{-5}$  М d(pTGTTTGGC) или d(pCCAAAC)A, пропускали через колонку ( $10 \times 100$  мм) с дауэксом 50 WX4 ( $\text{Na}^+$ -форма, Serva, США). Парамагнитные катионы удаляли хроматографией на колонке ( $10 \times 50$  мм) с сорбентом Chelex-100 (Bio-Rad, США).

Олигонуклеотиды d(pTGTTTGGC) и d(pCCAAAC)A смешивали в эквимолярном соотношении. После двукратной лиофилизации из  $\text{D}_2\text{O}$  (99,9%) растворяли в буфере, содержащем 0,1 М NaCl, 0,01 М натрий-фосфатный буфер (pD 7,0) и 0,01 мМ EDTA в  $\text{D}_2\text{O}$  (99,9%) или 10%  $\text{D}_2\text{O}/90\%$   $\text{H}_2\text{O}$ . Концентрация каждого олигонуклеотида составляла 25 мМ.

pD измеряли на pH-метре, модель 501 (Orion, США). Поправку на изотопный эффект не вводили.

$^1\text{H}$ -ЯМР-спектры записывали при 400 МГц на спектрометре «AM-400» (Bruker, ФРГ), оснащеном компьютером Aspect-3000.

Фазочувствительные спектры DQFCOSY получали с помощью импульсной последовательности  $[D1-90^\circ - t_1 - 90^\circ - \tau - 90^\circ - t_2] \cdot NS$  [25], где  $t_1$  — длительность периода эволюции,  $t_2$  — текущее время периода регистрации;  $NS = 128$ . Ширина спектра равнялась 4000 Гц при длине данных 8К (0,98 Гц на точку). Период эволюции варьировали от 3 мкс с шагом 125 мкс (всего 512 приращений).  $\sigma = 3$  мкс. Матрица данных  $t_2 = 8192 \cdot t_1 = 512$ .

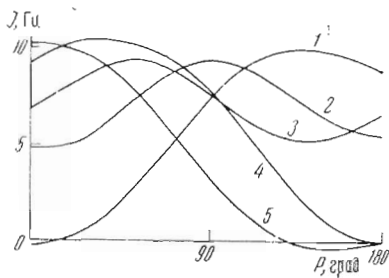


Рис. 10. Зависимость величины КСВВ от фазового угла псевдотворения  $P$ , рассчитанная по уравнению Карплуса: 1 —  $J_{1'2'a}$ , 2 —  $J_{2'az'}$ , 3 —  $J_{1'2'a'}$ , 4 —  $J_{3'4'}$ , 5 —  $J_{2'bz'}$

Фазочувствительный спектр NOESY получали с помощью последовательности  $[D1 - 90^\circ - t_1 - 90^\circ - \tau_m - 90^\circ - t_2] \cdot NS$  [53], которая в каждом эксперименте повторялась 128 раз. Продолжительность релаксационной задержки  $D1 - 2$  с, время смещения  $\tau_m - 0,4$  с. Сделано 512 приращений в периоде эволюции. Ширина спектра равнялась 4000 Гц при длине данных 2К (3,0 Гц на точку). Матрица данных  $t_2 = 2048 \cdot t_1 = 512$ .

Сигнал радиочастотного импульса помещали на частоту резонанса остаточной ДОН. Так как концентрация  $H_2O$  составляла всего несколько миллимолей на 1 л, специальное подавление сигнала ДОН не применяли.

Отношение сигнал/шум в спектрах DQFCOSY повышали, умножая спад свободной индукции (ССИ) перед первым преобразованием на синусную функцию, а перед вторым — на квадрат сдвинутой синусной функции (сдвиг равнялся  $\pi/2$ ). В случае спектра NOESY ССИ умножали на гауссову функцию.

Двумерные эксперименты ЯМР проводили при температуре образца 294К. В качестве стандарта использовали тетраметиламмонийхлорид, принимая химический сдвиг его сигнала равным 3,20 м. д. Все двумерные спектры ЯМР представлены в виде контурных карт-сечений, параллельных плоскости  $w_1 w_2$ .

Для определения величины ядерного эффекта Оверхаузера в одномерных спектрах ЯМР проводили селективное облучение низкой мощностью на частоте выбранного резонанса и вне резонанса. Время предоблучения варьировалось от 0,075 до 1,0 с. Ширина спектра 4000 Гц, длина данных 32К. Задержка между импульсами 2 с. Дифференциальный спектр получали, вычитая из спектра, полученного с насыщением тестируемого сигнала, спектр без насыщения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 911—920.
2. Биченкова Е. В., Денисов А. Ю., Кутявин И. В., Лебедев А. В. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 11. С. 1498—1507.
3. Fazakerley G. V., Quignard E., Jeoule R., Guy A., Guschlbauer W. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 167. P. 397—404.
4. Boelens R., Scheek R. M., Dijkstra K., Kaptein R. // J. Magn. Reson. 1985. V. 62. P. 378—386.
5. Chou S.-H., Flynn P. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 2422—2435.
6. Clore G. M., Gronenborn A. M. // Progress in NMR Spectroscopy. 1985. V. 17. P. 1—32.
7. Hare D. R., Wemmer D. E., Chou S.-H., Drobny G., Reid B. R. // J. Mol. Biol. 1983. V. 171. P. 319—336.
8. Feigon J., Leupin W., Denny W. A., Kearns D. R. // Biochemistry. 1983. V. 22. P. 5943—5951.
9. Scheek R. M., Russo N., Boelens R., Kaptein R., Van Boom J. H. // J. Amer. Chem. Soc. 1983. V. 105. P. 2914—2916.
10. Weiss M. A., Patel D. J., Sauer R. T., Karplus M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 130—134.
11. Wemmer B. E., Chou S.-H., Reid B. R. // J. Mol. Biol. 1984. V. 180. P. 41—60.
12. Clore G. M., Gronenborn A. M., McLaughlin L. W. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 151. P. 153—165.
13. Clore G. M., Lauble H., Frenkel A. J., Gronenborn A. M. // Eur. J. Biochem. 1984. V. 145. P. 629—636.
14. Kintanar A., Klevit R. E., Reid B. R. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 14. P. 5845—5862.
15. Jamin N., James J. L., Zon G. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 152. № 1. P. 157—166.
16. Lefevre J. F., Lane A. N., Jardetzky O. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 16. P. 5076—5090.
17. Rinkel L. J., Sanderson M. R., Van der Marel G. A., Van Boom J. H., Altona C. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 159. P. 85—93.
18. Wagner G., Wuthrich K. // J. Magn. Reson. 1979. V. 33. P. 675—680.
19. Dobson C. M., Olejniczak E. T., Poulsen F. M., Ratcliffe R. F. // J. Magn. Reson. 1982. V. 48. P. 97—110.
20. Derome A. E. // Modern NMR Techniques for Chemistry Research. V. 6 (Org. Chem. Ser.). Oxford: Pergamon Press, 1987.
21. Solomon J. // Phys. Rev. 1955. V. 90. P. 559—565.
22. Gronenborn A. M., Clore G. M., Kimber B. J. // Biochem. J. 1984. V. 224. P. 723—736.

23. Sanderson M. R., Mellena J.-R., Van der Marel G. A., Wille G., Van Boom J. H., Altona C. // Nucl. Acids. Res. 1983. V. 13. P. 3333—3346.
24. Altona C. J. // J. Mol. Struct. 1986. V. 141. P. 109—125.
25. Marion D., Wuthrich K. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1983. V. 113. P. 967—974.
26. Celda B., Widmer H., Leupin W., Chazin W. J., Denny W. A., Wuthrich K. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 1462—1471.
27. Chary K. V. R., Hosur R. V., Govil G. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 10. P. 3858—3867.
28. Zhou N., Managanan S., Zon G., James T. L. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 16. P. 6013—6020.
29. Aboul-ela F., Varini G., Walker G. T., Tinoco J. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 8. P. 3559—3572.
30. Wider G., Hosur R. V., Wuthrich K. // J. Magn. Reson. 1983. V. 52. № 1. P. 130—135.
31. Hore P. J. // J. Magn. Reson. 1984. V. 56. № 3. P. 535—538.
32. Hosur R. V., Ravikummar M., Chary K. V. R., Sheth A., Govil G., Zu-Kun T., Miles H. T. // FEBS Lett. 1986. V. 205. № 1. P. 71—76.
33. Cuniasso P., Sowers L. C., Eritja R., Kaplan B., Goodman M. F., Cognet J. A. H., Le Bret M., Guschlbauer W., Fazakerley G. V. // Biochemistry. 1989. V. 28. № 5. P. 2018—2026.
34. Woodson S. A., Crothers D. M. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 9. P. 3130—3141.
35. Pelton J. G., Wemmer D. E. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 8088—8096.
36. Clore G. M., Oschkinat M., McLoughlin L. W., Bensele F., Happ C. S., Happ E., Gronenborn A. M. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 4185—4197.
37. Nilges M., Clore G. M., Gronenborn A. M. // Biochemistry. 1987. V. 26. P. 3718—3733.
38. Clore G. M., Gronenborn A. M., Brunger A. T., Karplus M. // J. Mol. Biol. 1985. V. 186. P. 435—455.
39. Dickerson R. E. // J. Biomol. Struct. Dynam. 1989. V. 6. № 4. P. 627—634.
40. Macura S., Huang Y., Suter D., Ernst P. R. // J. Magn. Reson. 1981. V. 43. P. 259—281.
41. Chazin W. J., Wuthrich K. K., Hyberts S., Rance M., Denny W. A., Leupin W. // J. Mol. Biol. 1986. V. 190. P. 439—453.
42. Clore G. M., Gronenborn A. M. // J. Magn. Reson. 1985. V. 61. P. 158—164.
43. Nilges M., Clore G. M., Gronenborn A. M., Peil M., McLaughlin L. W. // Biochemistry. 1987. V. 26. P. 3734—3744.
44. Sarai A., Mazur J., Nussinov R., Jernigan R. L. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 8498—8502.
45. Arnott S., Campbell-Smith P., Chandrasekharan R. // CRC Handbook of Biochemistry. 1976. V. 2. P. 411—441.
46. Воробьев Ю. Н. // Молекуляр. биология. 1989. № 1. С. 80—91.
47. Воробьев Ю. Н. // Молекуляр. биология. 1989. № 2. С. 545—554.
48. Pardi A., Hare D. R., Wang C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 8785—8789.
49. Гинье А. Рентгенография кристаллов. М., 1961.
50. Зарытова В. Ф., Романенко В. П., Иванова Е. М. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 14. С. 518—521.
51. Бауск Е. В., Горн В. В., Лебедев А. В. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 6. С. 815—820.
52. Барал Г. И., Грачев С. А. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1420—1422.
53. Bodenhausen G., Kogler H., Ernst R. R. // J. Magn. Reson. 1984. V. 580. P. 370—383.

Поступила в редакцию  
4.XI.1989

E. V. BICHENKOVA, Yu. N. VOROB'EV, I. V. KUTYAVIN, A. V. LEBEDEV,  
T. V. MALTSEVA, E. Yu. TENNE

THE INVESTIGATION OF THE SOLUTION STRUCTURE OF DUPLEX  
d(pTGTTTGGC) · d(CCAAAC)A BY MEANS OF ONE- AND  
TWO-DIMENSIONAL <sup>1</sup>H NMR SPECTROSCOPY AND BY RESTRAINED  
MOLECULAR MECHANICS

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

Structure of the complementary complex d(pTGTTTGGC) d(pCCAAAC)A in the aqueous solution has been investigated by one- and two-dimensional <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. The resonances of nonexchangeable protons of bases as well as methyl and deoxyribose 1', 2'a, 2'b, 3' and 4' protons have been assigned by means of two-dimensional *J*-correlated spectroscopy (COSY) and two-dimensional nuclear Overhauser enhancement spectroscopy (NOESY).

Using one-dimensional NOE measurements, 62 interproton distances (intranucleotide:  $(\text{H6}/\text{H8})_i - (\text{H1}')_i$ ,  $(\text{H6}/\text{H8})_i - (\text{H2}'\text{a})_i$ ,  $(\text{H1}')_i - (\text{H2}'\text{a})_i$ ,  $(\text{H1}')_i - (\text{H2}'\text{b})_i$ ; internucleotide:  $(\text{H6}/\text{H8})_i - (\text{H1}')_{i-1}$ ,  $(\text{H6}/\text{H8})_i - (\text{H2}'\text{a})_{i-1}$ ,  $(\text{H6}/\text{H8})_i - (\text{H2}'\text{b})_{i-1}$ ,  $(\text{H5}/\text{CH}_3)_i - (\text{H6}/\text{H8})_{i-1}$ ,  $(\text{H5}/\text{CH}_3)_i - (\text{H2}'\text{a}/\text{H2}'\text{b})_{i-1}$ ) have been determined for nearest-neighbour protons.

Spin-coupling constant values for some sugar protons have been obtained from COSY spectra. The restrained molecular mechanics calculations have yielded the possible solution structures of duplex fitting the experimental set of interproton distances and coupling constants.