



УДК 577.113.6.088.53:543.422.25

© 1992 г.

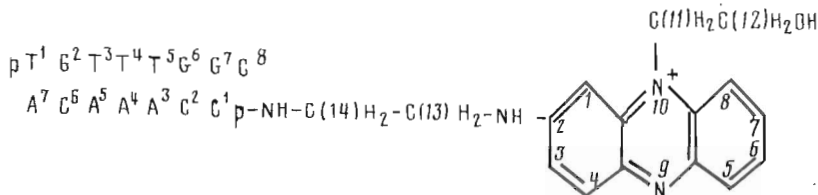
*Е. В. Биченкова, В. Ф. Зарытова, Е. М. Иванова,
Т. В. Мальцева, Г. Е. Сальников*, А. В. Лебедев*

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ДУПЛЕКСА (Phn-NH(CH₂)₂NH) - pd(CCAAACA) · pd(TGTTTGGC) С КОВАЛЕНТНО ПРИСОЕДИНЕННЫМ 10-(2-ГИДРОКСИЭТИЛ)ФЕНАЗИНИЕМ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ МЕТОДОМ 2М-¹H-ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

*Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
* Новосибирский институт органической химии СО РАН*

Методом одно- и двумерной ¹H-ЯМР-спектроскопии начато исследование пространственной структуры дуплекса (Phn-NH(CH₂)₂NH)pCCAAACA-pTGTTTGGC, содержащего остаток 10-(2-гидроксиэтил)феназиния (Phn), ковалентно присоединенного к 5'-концевому фосфату гептануклеотида. С использованием ¹H-COSY, ¹H-NOESY и ¹H-¹³C-COSY-спектров проведено отнесение сигналов Phn, протонов этилендиаминового фрагмента, а также протонов H5/H6/H8/CH₃ гетероциклических оснований и протонов H1', H2'a, H2'b, H3' и H4' дезоксирибозы олигонуклеотидов. Исследование области резонанса иминопротонов водородных связей показало, что наличие остатка Phn в составе дуплекса приводит к появлению в спектре дополнительного сигнала иминопротона концевой пары (G-7)·(C-1), что свидетельствует о его повышенной стабильности по сравнению с немодифицированным дуплексом pCCAAACrA-pTGTTTGGC. Анализ наблюдаемых ЯЭО-взаимодействий между протонами красителя и протонами олигонуклеотида позволил заключить, что полициклическая система Phn интеркалирует между G-7- и C-8-звеньями октануклеотида.

Известно, что полициклические гетероароматические красители, производные акридина [1—6], феназина [7] или фенантридина [8], ковалентно присоединенные по фосфатным группам олигонуклеотидов, способны стабилизировать соответствующие комплементарные комплексы олигонуклеотидов. Было также показано, что скорость и эффективность комплементарно-адресованной модификации, протекающей в подобных стабилизированных комплексах, существенно возрастают [9, 10]. Для выяснения стабилизирующей роли полициклических ароматических красителей в настоящей работе методом 1М- и 2М-ЯМР начато изучение пространственной структуры модельного комплекса (1), содержащего остаток 10-(2-гидроксиэтил)феназиния (Phn), ковалентно присоединенного к концевому фосфату гептануклеотида pCCAAACA:



* Нумерация нуклеотидов от 5'- к 3'-концу.

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

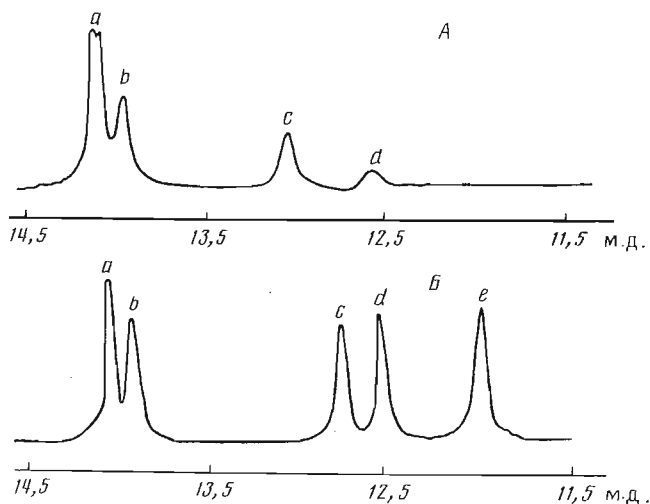


Рис. 1. Область резонанса обменивающихся иминопотонов ^1H -ЯМР-спектра исходного дуплекса $\text{pCCA AACrA} \cdot \text{pTGT T TGGC}$ (А) и модифицированного дуплекса $(\text{Phn-NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH})\text{pCCA AACrA} \cdot \text{pTGT T TGGC}$ (Б)

В предыдущей работе [11] с использованием методов ЯМР и ограниченной молекулярной механики (ОММ) были определены конформационные параметры дуплекса $\text{pCCA AACrA} \cdot \text{pTGT T TGGC}$ (2). Сравнение пространственной организации дуплексов (1) и (2) позволит оценить роль красителя в стабилизации комплементарного комплекса олигонуклеотидов.

Отнесение сигналов обменивающихся иминопотонов. На рис. 1 представлены спектры ^1H -ЯМР, содержащие область резонанса обменивающихся иминопотонов дуплексов (1) и (2), полученные в одинаковых условиях. Сравнение спектров свидетельствует о том, что наличие Phn в составе дуплекса (1) не меняет существенно экранирование протонов водородных связей А·Т-пар по сравнению с дуплексом (2). Действительно, в области 14,2–13,8 м. д. в обоих случаях наблюдаются сигналы иминопотонов трех центральных дезокситимидинов: Т-3, Т-4 и Т-5. Сигнал иминопотонов концевого дезокситимидина Т-1 в обоих спектрах отсутствует вследствие обменных процессов этого протона с растворителем [12–14]. При этом в спектре дуплекса (1) сигнал *a*, имеющий удвоенную интенсивность, смещен на 0,05 м. д. в область сильного поля по сравнению с соответствующим сигналом *b* в спектре дуплекса (2), а значения химических сдвигов сигналов *b* в спектрах обоих дуплексов практически совпадают. На этом основании сигнал *b* в спектре дуплекса (1) был идентифицирован как N3H (Т-3), поскольку этот остаток дезокситимидина в большей степени, чем Т-4 и Т-5, удален от места присоединения Phn. Сигнал *a* отнесен к иминопотонам Т-4 и Т-5.

Таблица 1

Значения химических сдвигов сигналов иминопотонов в ^1H -ЯМР-спектрах дуплексов (1) и (2) (м. д.)

Дуплекс	N1H(G-2)	N3H(T-3)	N3H(T-4)	N3H(T-5)	N1H(G-6)	N1H(G-7)
(1)	12,57	13,92	14,01	14,01	12,78	11,98
(2)	12,58	13,93	14,06	14,06	13,02	--

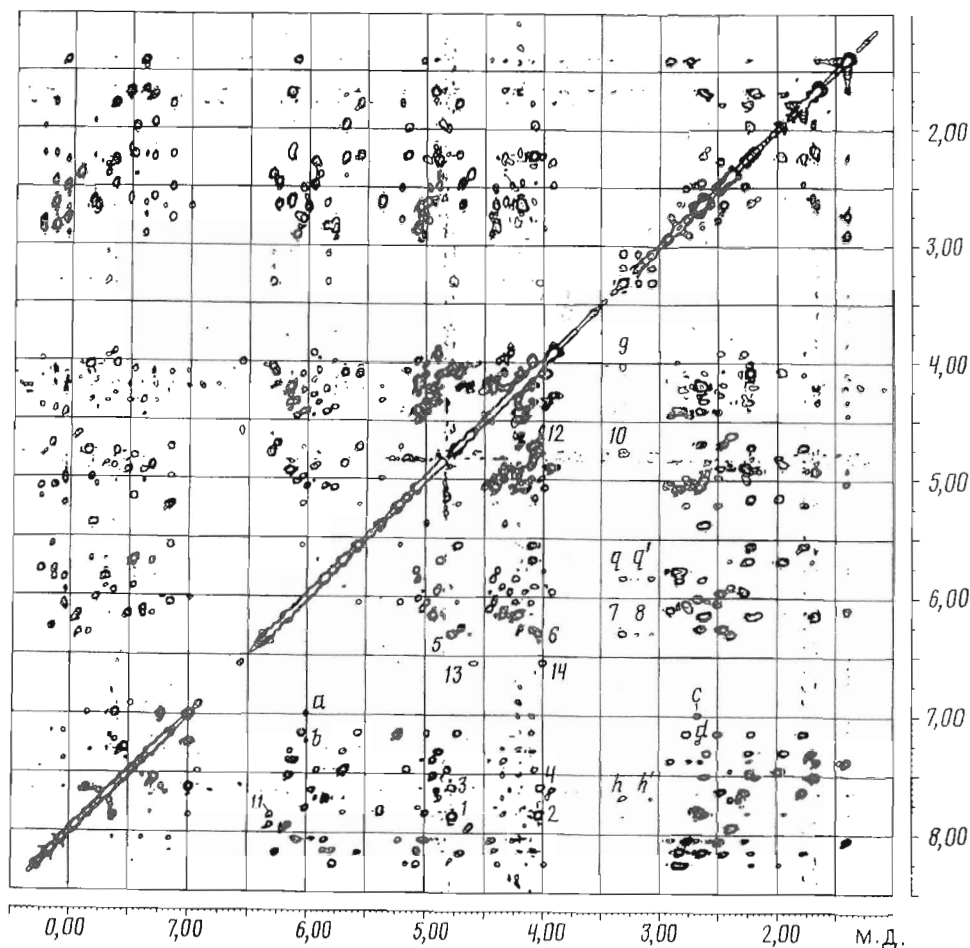


Рис. 2. ^1H -NOESY-спектр дуплекса (1). Кросс-пики между протонами Phn Н(8) - С(11)Н₂, Н(8) - С(12)Н₂, Н(7) - С(11)Н₂, Н(7) - С(12)Н₂, Н(1) - С(11)Н₂, Н(1) - С(12)Н₂, Н(1) - С(13)Н₂, Н(1) - С(14)Н₂, С(12)Н₂ - С(13)Н₂, С(11)Н₂ - С(13)Н₂, Н(1) - Н(8) обозначены символами 1-11 соответственно. Кросс-пики, отражающие взаимодействие протонов Phn и -NN(CH₂)₂NH-группы с протонами олигонуклеотидов, обозначены символами а - g': а - Н1' (G-7) - Н(6); б - Н1' (G-7) - Н(5); с - Н2'/а/Н2'б (G-7) - Н(6); d - Н2'/а/Н2'б (G-7) - Н(5); h - С(13)Н₂ - Н6 (С-1); h' - С(14)Н₂ - Н6 (С-1); g - С(13)Н₂ - Н5 (С-1); g' - С(14)Н₂ - Н5 (С-1)

Анализ области резонанса иминопротонов водородных связей G-C-пар (13,1-11,8 м. д.) показывает, что наличие остатка Phn в составе дуплекса (1) приводит к появлению в его спектре дополнительного интенсивного сигнала e при 11,98 м. д. Этот сигнал был отнесен к иминопротону концевой пары (G-7)·(C-1), поскольку из-за экранирующего влияния остатка Phn он должен находиться в области самого сильного поля по сравнению с сигналами иминопротонов других G-C-пар.

Положение сигналов d практически совпадает для дуплексов (1) и (2), что позволяет идентифицировать сигнал d как N1H (G-2). Действительно, иминопротон G-2 не должен испытывать заметного влияния со стороны остатка красителя, поскольку пара (G-2)·(C-6) наиболее удалена от Phn. Сигнал e отнесен к иминопротону G-6. Это отнесение подтверждается как смещением сигнала e в спектре дуплекса (1) на

Значения химических сдвигов сигналов необмениваемых протонов олигонуклеотидов дуплекса (1) (м. д.)

	H6/H8	H5/CH ₃	H1	H2'a	H2'b	H3'	H4'	H5'a/H5'b
T-1	7,63	1,79	5,96	2,28	2,48	4,90	4,29	3,93
G-2	8,05		6,10	2,75	2,91	5,03	4,45	4,33
T-3	7,38	1,42	6,15	2,25	2,65	4,94	4,34	*
T-4	7,51	1,67	6,14	2,18	2,62	4,93	4,35	4,21
T-5	7,31	1,72	5,69	1,95	2,25	4,88	4,09	*
G-6	7,82		5,38	2,63	2,63	5,00	4,33	4,21
G-7	7,78		6,01	2,68	2,68	5,06	4,41	*
C-8	7,94	6,15	6,31	2,39	2,39	4,62	4,22	*
C-1	7,70	5,83	5,95	2,32	2,40	4,88	4,36	4,07
C-2	7,47	5,68	5,17	2,00	2,23	4,82	4,07	*
A-3	8,25		5,77	2,81	2,86	5,07	4,39	4,00
A-4	8,14		5,84	2,65	2,84	5,06	4,42	4,24
A-5	8,05		6,06	2,50	2,78	4,79	4,42	*
C-6	7,16	5,22	5,57	1,79	2,23	4,73	4,10	*
A-7	8,16		6,25	2,65	2,41	4,70	4,20	4,08

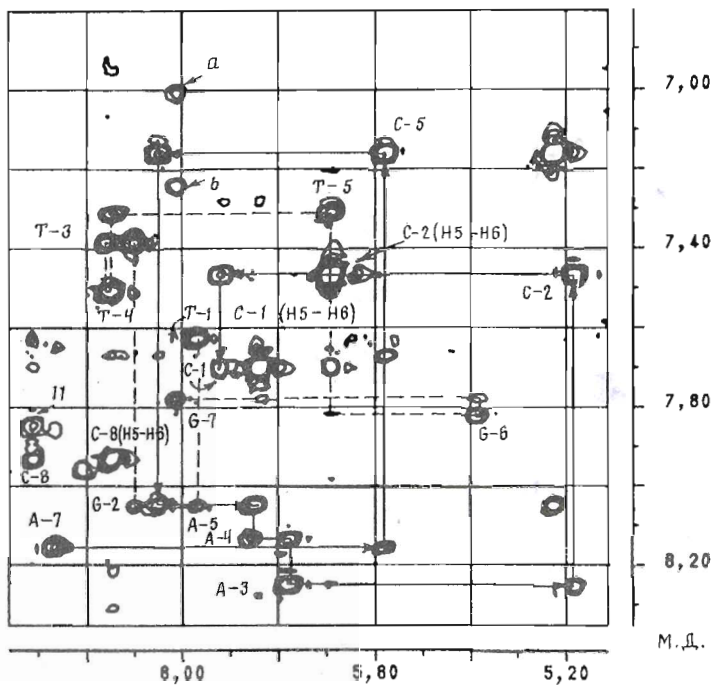
* Химический сдвиг сигнала не определен из-за перекрывания сигналов.

0,24 м. д. в область сильного поля, так и резким увеличением (в 1,7 раза) его интенсивности по сравнению с соответствующим сигналом с в спектре дуплекса (2). Увеличенная интенсивность ряда сигналов иминопротонов дуплекса (1), в первую очередь для пар (G-2)·(C-6), (G-6)·(C-2) и (G-7)·(C-1), по сравнению с дуплексом (2) свидетельствует о повышенной прочности дуплекса (1), что вызывает замедление обменных процессов иминопротонов с протонами растворителя. Результаты отнесения иминопротонов дуплексов (1) и (2) приведены в табл. 1.

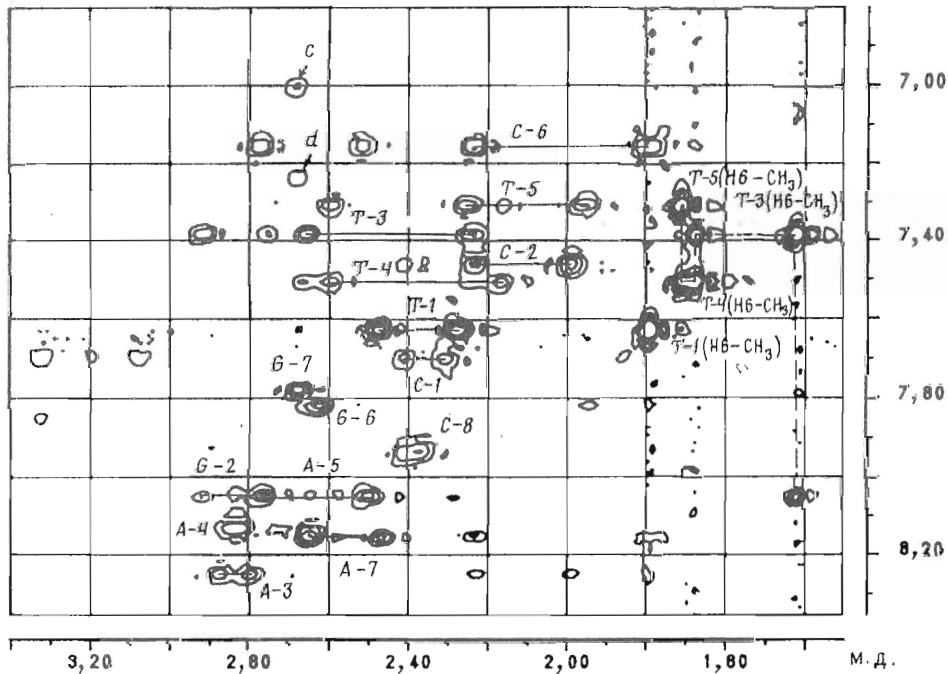
Отнесение сигналов необмениваемых протонов олигонуклеотидов. На рис. 2 представлен полный ¹H-NOESY-спектр дуплекса (1). Его фрагменты, содержащие области резонанса нуклеотидных протонов H1'/H5-H6/H8, H2'a/H2'b/CH₃-H6/H8, приведены на рис. 3а, б соответственно. Ранее нами была проведена идентификация сигналов NOESY-спектра дуплекса (2) [11]. Сравнение соответствующих областей NOESY-спектров дуплексов (1) и (2) показывает, что наличие остатка Phn на 5'-концевом фосфате гептануклеотида не вносит принципиальных изменений в пространственную форму ДНК. Поэтому идентификацию сигналов в 2М-ЯМР-спектре дуплекса (1) мы проводили по аналогии с работой [11], используя принципы последовательного отнесения протонов для правозакрученной ДНК [15-19]. На рис. 3а приведена схема последовательной идентификации ароматических и 1'-протонов гептануклеотида (сплошная линия) и октануклеотида (штриховая линия). На рис. 3б указано отнесение H2'a, H2'b, метильных и ароматических протонов. Результаты отнесения H5/H6/H8-протонов оснований, метильных протонов, а также 1', 2'a, 2'b, 3' и 4'-протонов дезоксирибозы приведены в табл. 2.

Отнесение сигналов протонов красителя. Сначала провели идентификацию сигналов 2-диметиламино-10-(2-гидроксиэтил)феназиния (Phn-N(CH₃)₂)⁺Cl⁻, а также сигналов Phn, ковалентно присоединенного через этилендиаминовый фрагмент к 5'-концевому фосфату гептануклеотида pССАААСА.

На рис. 4 представлена область резонанса ароматических протонов 1М- и 2М-ЯМР-спектра (Phn-N(CH₃)₂)⁺Cl⁻. В COSY-спектре были вы-



б



Значения химических сдвигов сигналов ^1H и ^{13}C феназиниевого красителя, входящего в состав $(\text{Phn-N}(\text{CH}_2)_2)^+\text{Cl}^-$ (1), $(\text{Phn-NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH})\text{pCCAAACA}$ (2) и $(\text{Phn-NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH})\text{pCCAAACA-pTGTGGC}$ (3)

$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	1	2	3	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	1	2	3
H(1)	6,34	6,61	6,33	H(7)	7,95	7,95	7,63
C(1)	88,30	—	88,50	C(7)	136,40	—	138,00
H(3)	7,19	7,33	7,29	H(8)	8,01	8,01	7,85
C(3)	128,80	—	128,50	C(8)	117,00	—	117,80
H(4)	7,46	7,58	7,53	(H11) ₂	4,81	4,65	4,77
C(4)	133,10	—	131,80	(H12) ₂	4,14	4,49	4,05
H(5)	7,85	7,95	7,23	(H13) ₂	—	3,59	3,33
C(5)	131,00	—	130,20	(H14) ₂	—	3,21	3,06
H(6)	7,66	7,66	7,00				
C(6)	128,60	—	127,30				

делены две спиновые системы. Первая (показана штриховой линией) объединяет H(1)-, H(3)- и H(4)-протоны феназиниевого красителя, находящиеся в более сильном поле. Вторая система (определена сплошной линией) объединяет остальные ароматические протоны красителя ((H5)–(H8)). Идентификация сигналов этих протонов, а также метиленовых протонов гидроксипропанового фрагмента C(11)H₂ и C(12)H₂ не вызвала затруднений (табл. 3).

Далее идентифицировали сигналы протонов Phn, присоединенного к гептануклеотиду pCCAAACA. Кросс-пик метиленовых протонов связующего фрагмента C(13)H₂–C(14)H₂ проявляется в области 3,59; 3,21 м. д. Сигнал при 3,21 м. д. был отнесен к протонам группы C(14)H₂, так как в 1М-ЯМР-спектре он представлен дублетом триплетов вследствие дополнительного вицинального спин-спинового взаимодействия с фосфором. Сигнал группы C(13)H₂ проявляется в виде триплета при 3,59 м. д. Отнесение сигналов остальных протонов Phn проведено аналогично отнесению сигналов для свободного красителя (табл. 3.) Видно, что присоединение гептануклеотида в положение 2 феназиниевого красителя не меняет порядок следования ароматических протонов Phn в спектре, однако происходит смещение сигналов протонов H(1), H(3), H(4) и H(5) в область слабого поля на 0,27; 0,14; 0,12 и 0,10 м. д. соответственно. Химические сдвиги сигналов остальных протонов (H(6), H(7) и H(8)) не изменяются.

На следующем этапе работы идентифицировали сигналы протонов Phn, входящего в состав комплементарного комплекса. Метиленовые протоны гидроксипропановой группы C(11)H₂ (4,77 м. д.) и C(12)H₂ (4,05 м. д.), а также протоны этилендиаминового фрагмента C(13)H₂ (3,33 м. д.) и C(14)H₂ (3,06 м. д.) были идентифицированы через соответствующие кросс-пики в COSY- и NOESY-спектрах дуплекса (1), как было описано выше для $(\text{Phn-NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH})\text{pCCAAACA}$ и для $(\text{Phn-N}(\text{CH}_2)_2)^+\text{Cl}^-$. Обнаружено ЯЭО-взаимодействие протонов гидроксипропановой группы с протонами первого звена связующего этилендиаминового фрагмента C(13)H₂. Об этом свидетельствуют кросс-пики 3,33–4,05 и 3,33–4,77 м. д. (рис. 2, кросс-пики 9 и 10 соответственно).

Рис. 3. Фрагмент ^1H -NOESY-спектра дуплекса (1), содержащий область резонанса нуклеотидных протонов H1'/H5–H6/H8 (а) и H2'a/H2'b/CH₂–H6/H8 (б). Здесь и далее кросс-пики, соответствующие внутринуклеотидным взаимодействиям (H1')₂–(H6/H8)₂, (H6/H8)₂–(H2'a)₂ и (H6/H8)₂–(H2'b)₂, обозначены символом и номером соответствующего нуклеотидного остатка. Кросс-пики (H6/H8)₂–(H2'a)₂ и (H6/H8)₂–(H2'b)₂ соединены горизонтальной линией

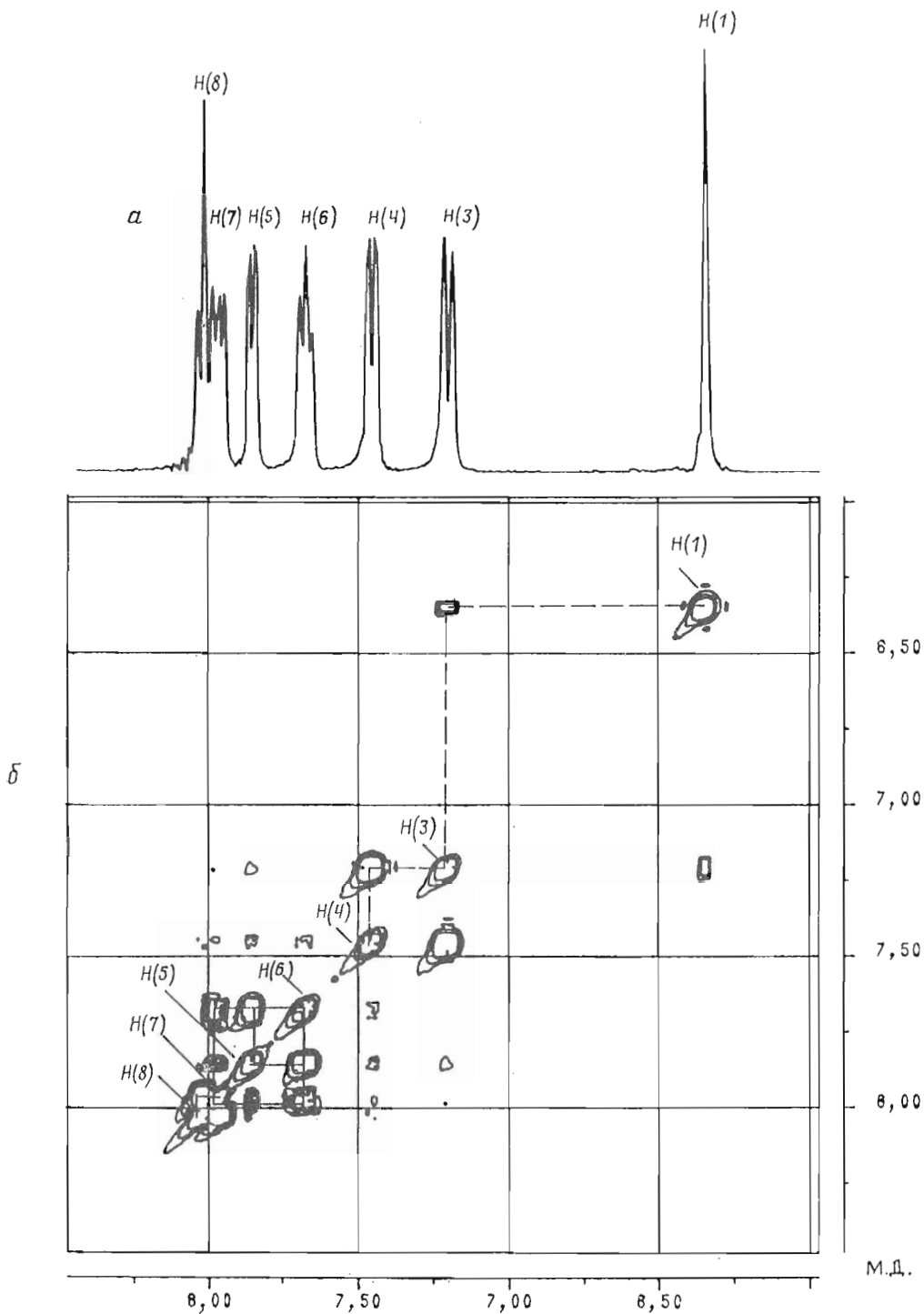


Рис. 4. Область резонанса ароматических протонов $(\text{PhN}(\text{C}_2\text{H}_5)_2)^+\text{Cl}^-$ одномерного спектра (а) и ^2H -COSY-спектра (б)

Образование комплекса $(\text{Phn-NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH})\text{pCCAAACA}$ с октануклеотидом rTGTTTGGC вызывает изменение пространственного окружения ароматических протонов Phn. Действительно, сравнение ароматической области COSY-спектра дуплекса (1) (рис. 5а) с соответствующей областью спектра $(\text{Phn-NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH})\text{pCCAAACA}$ (табл. 3) показывает, что при формировании дуплекса меняется порядок следования протонов феназилиевого красителя в спектре. Видно (рис. 5а), что резонансные сигналы k (7,22 м. д.) и l (7,85 м. д.) проявляют по одному ЯЭО-взаимодействию с протонами i (7,00 м. д.) и j (7,63 м. д.) соответственно. При этом сигналы последних связаны дополнительным кросс-пиком (7,00; 7,63 м. д.), который отражает их спин-спиновое взаимодействие: $k \leftarrow i \rightarrow j \leftarrow l$. Эта спиновая система связывает протоны Н(5)–Н(6)–Н(7)–Н(8). В пользу такого варианта отнесения свидетельствует наличие кросс-пиков между протонами Н(8) и Н(7) и метиленовыми протонами гидроксипропановой группы. Действительно, в NOESY-спектре дуплекса (1) (рис. 2) каждый из сигналов С(11)Н₂ (4,77 м. д.) и С(12)Н₂ (4,05 м. д.) образует кросс-пик большей интенсивности с сигналом l (Н(8)) и менее интенсивный кросс-пик с сигналом j (Н(7)) (рис. 2, кросс-пики 1, 2, 3 и 4 соответственно). При альтернативном варианте отнесения (i -Н(7), k -Н(8), j -Н(6) и l -Н(5)) следует, что гидроксипропановая группа должна быть локализована вблизи Н(5) и Н(6) и пространственно удалена от протонов Н(8) и Н(7), что противоречит структуре молекулы.

Отнесение сигналов спиновой системы Н(1), Н(3) и Н(4) оказалось осложненным из-за отсутствия кросс-пика между Н(1) и Н(3) (этот кросс-пик наблюдается в COSY-спектре $(\text{Phn-N}(\text{CH}_3)_2)^+\text{Cl}^-$ и $(\text{Phn-NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH})\text{pCCAAACA}$). Идентифицировать сигналы этих протонов удалось, используя корреляционную спектроскопию ^1H - ^{13}C . Сначала провели отнесение сигналов ^{13}C в ^1H - ^{13}C -COSY-спектре $(\text{Phn-N}(\text{CH}_3)_2)^+\text{Cl}^-$ (рис. 6) на основании результатов отнесения сигналов его протонов с использованием ^1H -COSY-спектра (табл. 3). Отнесение сигналов углеродных атомов показано на спектре (рис. 6) и приведено в табл. 3. Аналогичным образом проведено отнесение сигналов углеродных атомов С(5), С(6), С(7) и С(8) Phn в ^1H - ^{13}C -COSY-спектре дуплекса (1) (рис. 7). Положение сигналов углеродных атомов С(1), С(3) и С(4) было найдено путем сравнения 1M - ^{13}C -ЯМР-спектра дуплекса (1) (рис. 8а) с соответствующими спектрами дуплекса (1) и $(\text{Phn-N}(\text{CH}_3)_2)^+\text{Cl}^-$ (рис. 8б и в соответственно). Видно, что значения химических сдвигов сигналов ^{13}C в спектрах дуплекса (1) и $(\text{Phn-N}(\text{CH}_3)_2)^+\text{Cl}^-$ различаются незначительно (табл. 3).

Отнесение сигналов С(1), С(3) и С(4) позволило определить положение Н(1), Н(3) и Н(4) феназилиевого красителя в протонной части ^1H - ^{13}C -COSY-спектра дуплекса (1) через соответствующие кросс-пики (рис. 7). Как следует из структуры феназилиевого красителя, Н(1)-протон пространственно обличен с протонами гидроксипропановой группы С(11)Н₂ и С(12)Н₂, а также с протонами связующего этилендиаминового фрагмента С(13)Н₂ и С(14)Н₂. В соответствии с этим в NOESY-спектре дуплекса (1) протон Н(1) (6,33 м. д.) образует интенсивные кросс-пики с протонами С(11)Н₂ (4,77 м. д.), С(12)Н₂ (4,05 м. д.), С(13)Н₂ (3,33 м. д.) и С(14)Н₂ (3,06 м. д.) (рис. 2, кросс-пики 5–8 соответственно). Наблюдается также взаимодействие между Н(1)- и Н(8)-протонами красителя (рис. 2, кросс-пик 11).

Кросс-пики ароматической области COSY-спектра дуплекса (1) проявляются также в соответствующей области NOESY-спектра (рис. 5б). Кроме того, наблюдаются также дополнительные кросс-пики меньшей интенсивности между протонами Н(5) и Н(7) (7,22; 7,63 м. д.), а также между протонами Н(6) и Н(8) (7,00; 7,85 м. д.).

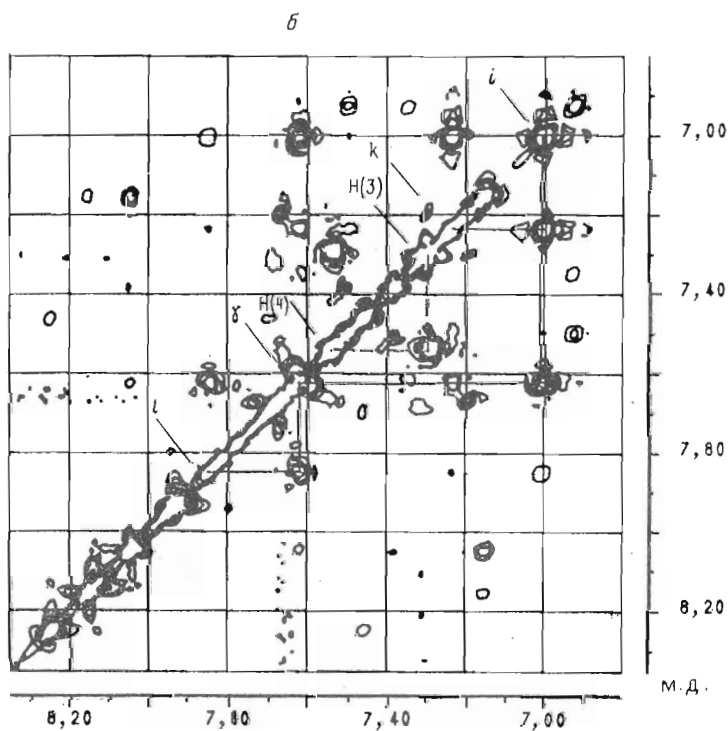
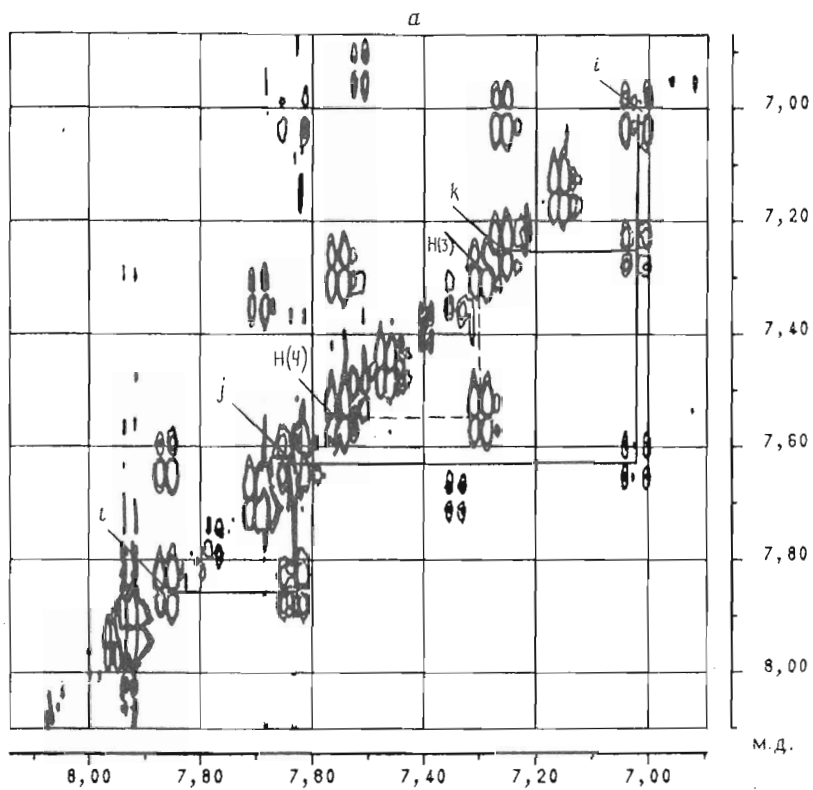


Рис. 5. Область резонанса ароматических протонов дуплестеа (1) COSY-DQF-спектра (а) и NOESY-спектра (б),

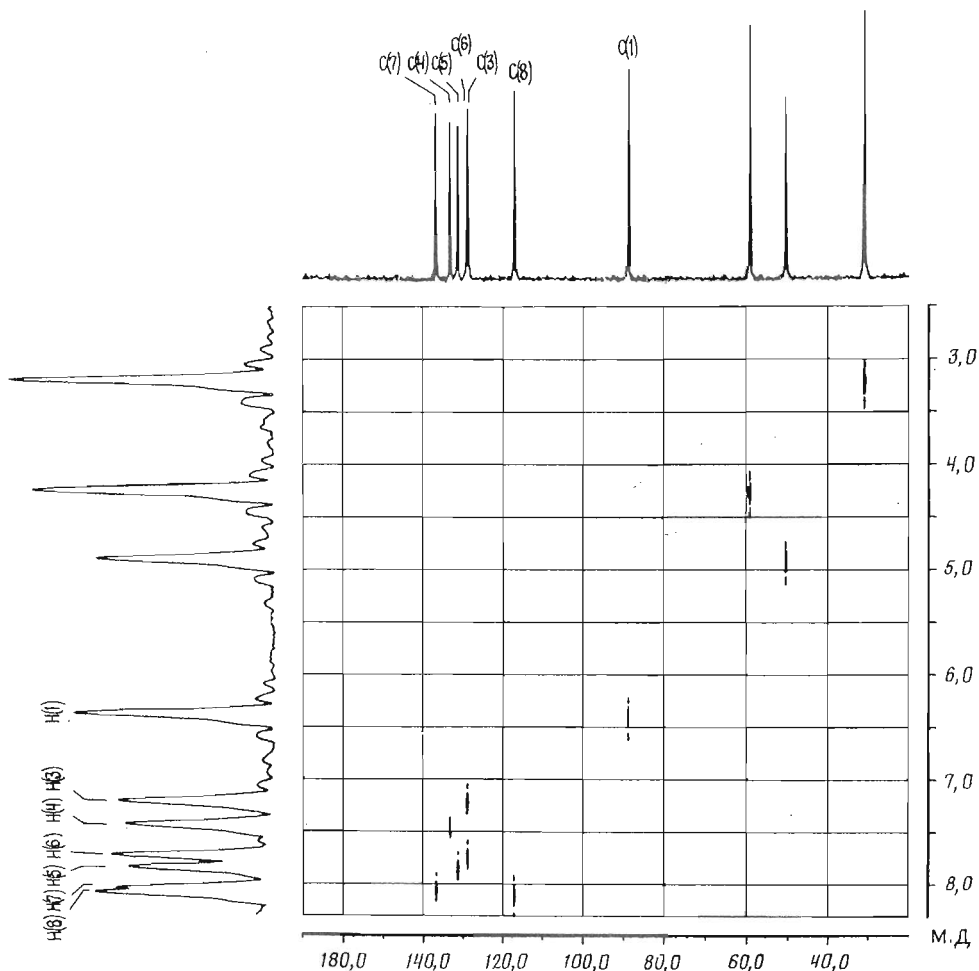


Рис. 6. ^1H - ^{13}C -COSY-спектр $(\text{PhN}(\text{CH}_3)_2)_2\text{Cl}$

При детальном анализе ароматической области COSY-DQF- и NOESY-спектров дуплекса (1) (рис. 2 и рис. 5а, б) были обнаружены дополнительные кросс-пики 6,90; 7,50 и 7,35; 7,69 м.д., которые в настоящее время не удалось идентифицировать. Их положение близко к положению кросс-пигов H(5)–H(6) и H(3)–H(4), а интенсивность составляет ~33% от интенсивности основных кросс-пигов COSY-DQF-спектра, связывающих протоны феназиниевого красителя.

Кроме того, в NOESY-спектре дуплекса (1) (рис. 2) выявлены три взаимодействующих сигнала при 6,58; 4,60 и 4,01 м.д., которые не удалось отнести ни к протонам олигонуклеотидов, ни к протонам красителя. Сигналы при 4,60 и 4,01 м.д. связаны кросс-пиком 12. В свою очередь каждый из этих протонов взаимодействует с протоном при 6,58 м.д. (кросс-пики 13 и 14 соответственно). В COSY-спектре взаимодействие этих протонов не обнаружено. Положение сигналов при 4,60 и 4,01 м.д. близко к положению сигналов C(11)H₂ и C(12)H₂ в составе дуплекса (1).

Важно отметить, что ни один из минорных сигналов не имеет значения химического сдвига, идентичного химическому сдвигу протонов феназиниевого красителя в свободном состоянии и в составе $(\text{PhN}(\text{CH}_3)_2\text{NH})_2\text{pCCAACA}$, что исключает присутствие не связанного с

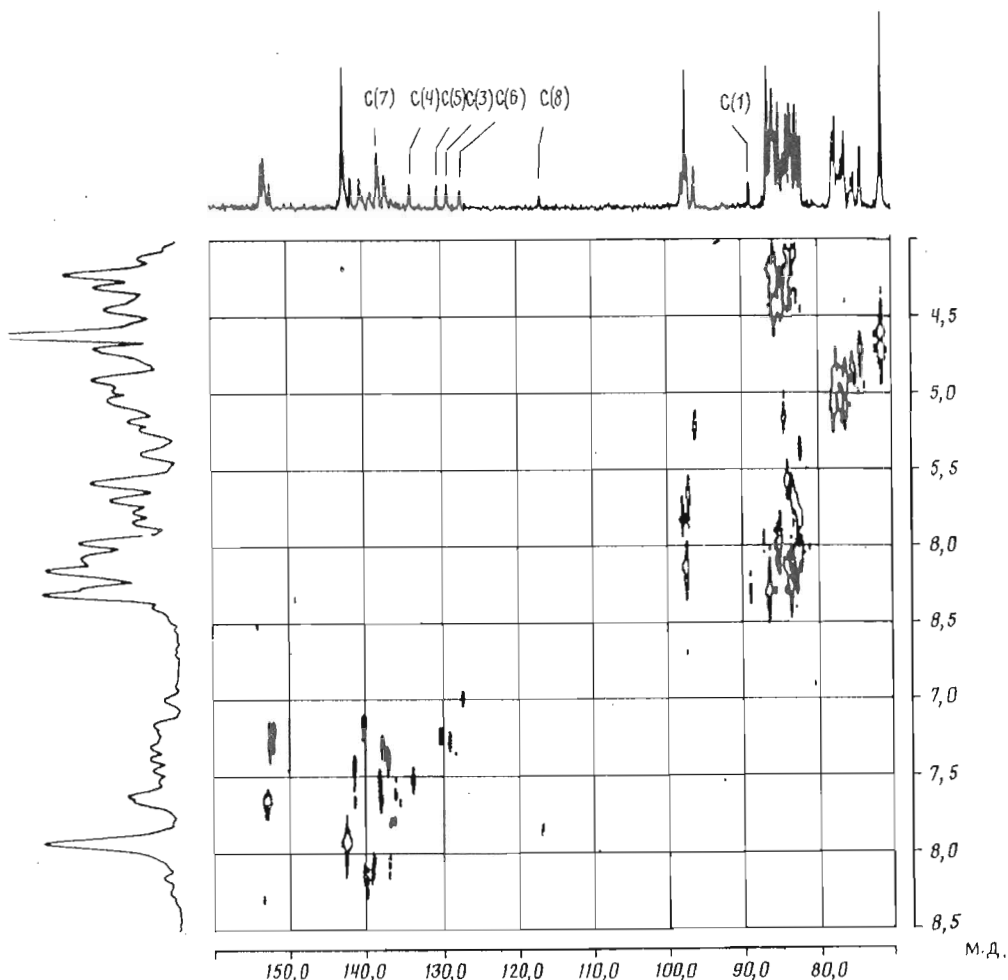


Рис. 7 ^1H - ^{13}C -COSY-спектр дуплекса (1); приведены сигналы атомов углерода ароматического ядра феназиниевого красителя

дуплексом красителя. Предварительные данные позволяют сделать предположение о наличии минорной конформации красителя в составе дуплекса (1). Однако выяснение природы этих сигналов требует дальнейшего исследования.

Взаимодействие протонов красителя с протонами олигонуклеотидов. Анализ NOESY-спектра дуплекса (1) позволил обнаружить ряд кросс-пиков, свидетельствующих о пространственной сближенности протонов красителя с протонами нуклеотидных звеньев С-1, G-7 и С-8. Так, в $\text{H}1'$ -H6/H8-области спектра (рис. 2, 3а) наблюдаются два кросс-пика, отражающих ЯЭО-взаимодействие $\text{H}1'$ G-7 (6,02 м. д.) с $\text{H}(5)$ (7,22 м. д.) и $\text{H}(6)$ (7,00 м. д.) протонами феназиниевого красителя (на рис. 2 и 3а эти кросс-пики обозначены символами *a* и *b*). Эти же протоны Рнп в $\text{H}2'\text{a}/\text{H}2'\text{b}$ -H6/H8-области спектра (рис. 2 и 3б) образуют кросс-пики *c* и *d*, связывающие их с $\text{H}2'\text{a}$ - и (или) * $\text{H}2'\text{b}$ -протонами G-7. Важно отметить, что ЯЭО-взаимодействие между $\text{H}1'$, $\text{H}2'\text{a}$ и $\text{H}2'\text{b}$ -протонами G-7 и H6-протоном 3'-соседнего с ним С-8, характерное для правоспиральной ДНК, в данном случае отсутствует. На основании этих данных

* Значения химических сдвигов сигналов G-7 $\text{H}2'\text{a}$ и $\text{H}2'\text{b}$ совпадают.

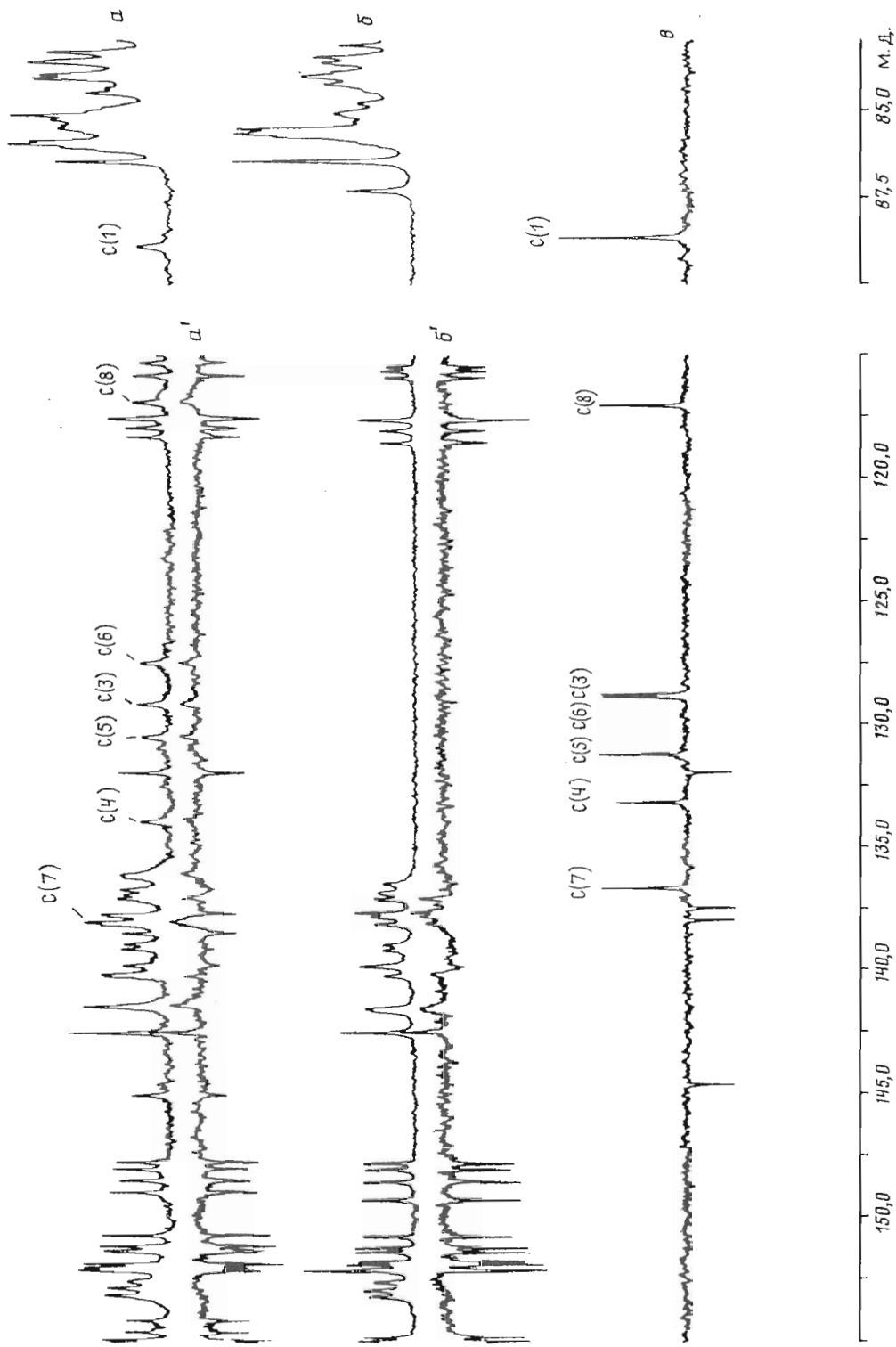


Рис. 8. ^{13}C -ЯМР-спектр дуплекса (1) (a) и исходного дуплекса (2) (б), α' , β' , θ J -модулированные ^{13}C -ЯМР-спектры дуплекса (1), исходного дуплекса (2) в $(\text{Ph-N}(\text{CH}_3)_3)$ CDCl_3 соответственно

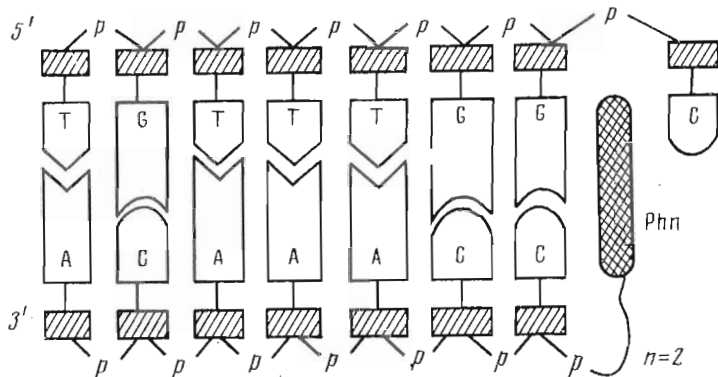


Рис. 9. Схематическая модель дуплекса (1)

можно полагать, что полициклическая система Phn интеркалирует между G-7- и C-8-звеньями олигонуклеотидной цепи, вытесняя нуклеотидный остаток C-8 из структуры дуплекса (рис. 9). Действительно, сигналы ароматических протонов C-8 (H5 и H6) в спектре дуплекса (1) смещены в область слабого поля по сравнению с соответствующими сигналами дуплекса (2) ($\Delta\sigma_{H5}=0,28$ м. д., $\Delta\sigma_{H6}=0,31$ м. д., ср. данные табл. 2 с данными работы [11]). С другой стороны, как было отмечено выше при анализе области резонанса иминопротонов дуплекса (1), феназпиевый краситель стабилизирует ближайшие нуклеотидные пары (C-1)·(G-7) и (C-2)·(G-6). В соответствии с этим наблюдается смещение в сильное поле сигналов всех ароматических протонов оснований этих нуклеотидных остатков дуплекса (1) по сравнению с соответствующими сигналами протонов дуплекса (2).

Связующий этилендиаминовый фрагмент взаимодействует с ароматическими протонами концевого цитидина C-1. Так, метиленовые протоны (11)CH₂ (3,33 м. д.) в NOESY-спектре (рис. 2) образуют интенсивные кросс-пики *h* и *q* с H6 (7,47 м. д.) и H5 (5,83 м. д.) протонами C-1. Вторая метиленовая группа C(12)H₂ (3,06 м. д.) взаимодействует с этими протонами слабее, образуя кросс-пики *h'* и *q'* меньшей интенсивности.

Совокупность полученной информации позволяет сделать качественные выводы о взаимном расположении красителя и ближайших нуклеотидных звеньев в дуплексе (1). Для построения детальной пространственной структуры в настоящий момент проводится серия одномерных ЯЭО-экспериментов по определению расстояний между протонами, сближенными в пространстве. Далее с использованием метода ОММ будут определены оптимальные по энергии вероятные состояния дуплекса (1) в растворе, удовлетворяющие полученному из ЯМР-эксперимента набору межпротонных расстояний.

Экспериментальная часть

Для синтеза олигодезоксирибонуклеотидов использовали *N*-ацил-3'-дезугуанил-5'-*n*-хлорфениловые эфиры 5'-моно- и динуклеотидов, 2,4,6-триизопробилбензолсульфохлорид производства НИВХ СО АН СССР, *N*-метилимидазол (Ega, Chemie, ФРГ). Синтез олигонуклеотидов рТGTTTGGC и рССАААСА осуществляли фосфотриэфирным методом в растворе в соответствии с работой [20]. Деблокирование целевых олигонуклеотидов про-

водили обработкой 0,3 М раствором тетрабутиламмонийфторида в 50% водном пиридине (рН 6,5) в течение 12 ч при 20° С, а затем 25% водным аммиаком (5 ч при 50° С) [21]. Выделение и очистку деблокированных олигонуклеотидов осуществляли с помощью ионообменной и обращенно-фазовой хроматографии на хроматографе Altex-322 (США) в соответствии с [22]. Осаждение олигонуклеотидов в ацетон проводили по методу [23]. Производное (Phn-NH(CH₂)₂NH)рССАААСА синтезировали по аналогии с работой [7].

Подготовка образцов для записи спектров ЯМР, а также получение 2М-¹H-COSY- и ¹H-NOESY-спектров подробно описаны в работе [11]. Спектры ¹H-¹³C-COSY записывали, используя стандартную импульсную последовательность [24]. Матрица данных (4096×2048); задержка между импульсными последовательностями 1с; J_{C-H}=165 Гц. Количество накоплений 256. Количество точек по оси ω₁=382.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Asseline U., Toulme F., Thuong N. T., Delarue M., Montenay-Garestier T., Helene C. // *EMBO J.* 1984. V. 3. № 4. P. 795-800.
2. Asseline U., Delarue M., Lancelot G., Toulme F., Thuong N. T., Montenay-Garestier T., Helene C. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. № 11. P. 3297-3301.
3. Lancelot G., Thuong N. T. // *Biochemistry.* 1986. V. 25. P. 5357-5363.
4. Cieplak P., Rao S. N., Helene C., Montenay-Garestier T., Kolman A. // *J. Biomol. Dyn. Str.* 1987. V. 5. P. 361-382.
5. Lancelot G., Guesnet J.-L., Asseline U., Thuong N. T. // *Biochemistry.* 1988. V. 27. № 4. P. 1265-1273.
6. Guesnet J.-L., Novell F., Thuong N. T., Lancelot G. // *Biochemistry.* 1990. V. 29. № 20. P. 4982-4991.
7. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сильников В. И., Шихкин Г. В. // *Биоорганич. химия.* 1986. Т. 12. № 7. С. 911-920.
8. Letsinger R., Schott M. E. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1981. V. 103. № 24. P. 7394-7396.
9. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Подымигогин М. А., Сильников В. И., Шихкин Г. В. // *Биоорганич. химия.* 1987. Т. 13. № 9. С. 1212-1220.
10. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сергеев Д. С., Сильников В. И., Шихкин Г. В. // *Рук. деп. в ВИНТИИ.* № 4276-B89 от 29 июня. 1989. 11 с.
11. Биченкова Е. В., Воробьев Ю. И., Кутявин И. В., Лебедев А. В., Мальцева Т. В., Тэнли Е. Ю. // *Биоорганич. химия.* 1990. Т. 16. № 9. С. 1236-1258.
12. Fazakerly G. V., Quignard E., Jeoul R., Guy A., Guschlbauer W. // *Eur. J. Biochem.* 1987. V. 167. P. 397-404.
13. Boelens R., Scheek R. M., Dijkstra K., Kaptein R. // *J. Magn. Reson.* 1985. V. 62. P. 378-386.
14. Chou S.-H., Flynn P. // *Biochemistry.* 1989. V. 28. P. 2422-2435.
15. Hare D. R., Wemer D. E., Chou S.-H., Droby G., Reid B. R. // *J. Mol. Biol.* 1983. V. 171. P. 319-336.
16. Faigon J., Leapin W., Denny W. A., Kearns D. R. // *Biochemistry.* 1983. V. 22. P. 5943-5951.
17. Scheek R. M., Russo N., Boelens R., Kaptein R., Van Boom J. H. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1983. V. 105. P. 2914-2916.
18. Weiss M. A., Patel D. J., Sauer R. T., Karplus M. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. P. 130-134.
19. Wemer D. E., Chou S.-H., Reid B. R. // *J. Mol. Biol.* 1984. V. 180. P. 41-60.
20. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. // *Биоорганич. химия.* 1983. Т. 9. № 4. С. 516-521.
21. Бауск Е. В., Горн В. В., Лебедев А. В. // *Биоорганич. химия.* 1985. Т. 11. № 6. С. 815-820.
22. Биченкова Е. В., Денисов А. Ю., Кутявин И. В., Лебедев А. В. // *Биоорганич. химия.* 1986. Т. 12. № 11. С. 1498-1507.
23. Барам Г. И., Грачев С. А. // *Биоорганич. химия.* 1985. Т. 11. № 10. С. 1420-1422.
24. Rutar V. // *J. Magn. Reson.* 1984. V. 58. P. 306.

Поступила в редакцию
18.11.1991
После доработки
24.1V.1991

E. V. BICHENKOVA, V. F. ZARYTOVA, E. M. IVANOVA, T. V. MALTSEVA,
G. E. SAL'NICOV*, A. V. LEBEDEV

**STRUCTURAL INVESTIGATION OF DUPLEX
(Phn-NH(CH₂)₂NH)pd(CCAAACA)·pd(TGTTTGGC) HAVING
COVALENTLY LINKED N-(2-OXYETHYL)-PHENAZINIUM RESIDUE
BY MEANS OF 2D ¹H-NMR SPECTROSCOPY IN AQUEOUS SOLUTION**

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry; *Novosibirsk Institute of Organic
Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk*

The spatial structure of duplex (Phn-NH(CH₂)₂NH)pd(CCAAACA)·pd(TGTTTGGC) having a N-(2-oxyethyl)-phenazinium residue covalently linked with the 5'-terminal phosphate of the heptanucleotide was studied by means of one- and two-dimensional ¹H-NMR spectroscopy. The resonances of phenazinium protons, ethylenediamine linker protons, as well as, oligonucleotide H5/H6/H8/CH₃ base protons and H1', H2'a, H2'b, H3', H4' deoxyribose protons have been assigned by means of ¹H-COSY, ¹H-NOESY and ¹H-¹³C-COSY. The presence of the phenazine residue in duplex causes an additional imino proton signal of the terminal (G-7)·(C-1) base pair, suggesting a higher stability of the duplex (Phn-NH(CH₂)₂NH)pd(CCAAACA)·pd(TGTTTGGC) as compared to the unmodified duplex pd(CCAAACA)·pd(TGTTTGGC). Analysis of NOE interactions between protons of the dye and the oligonucleotides show the phenazinium polycyclic system to intercalate between G-7 and C-8 residues of the octanucleotide.