



УДК 577.113.6.088.53:543.422.25

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ
ПРОДУКТА ВНУТРИКОМПЛЕКСНОГО АЛКИЛИРОВАНИЯ
ОКТАНУКЛЕОТИДА $\rho d[TGTTTGGC]$
4-[N-МЕТИЛ-N-(2-ХЛОРЭТИЛ)АМИНО]БЕНЗИЛ-5'-ФОСФАМИДНЫМ
ПРОИЗВОДНЫМ ГЕПТАНУКЛЕОТИДА $\rho d[ССАААСА]$
В ВОДНОМ РАСТВОРЕ МЕТОДОМ ДВУМЕРНОЙ
 1H -ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ И ОГРАНИЧЕННОЙ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕХАНИКИ**

© 1995 г. Л. А. Горенштейн, Е. В. Биченкова, Ю. Н. Воробьев, А. В. Лебедев

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 28.10.94 г.

Методом одно- и двумерной 1H -ЯМР-спектроскопии (400 МГц) продолжено детальное исследование пространственной структуры ковалентного аддукта – продукта внутрикомплексного алкилирования октануклеотида $\rho d[TGTTTGGC]$ 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензил-5'-фосфамидным производным гептануклеотида $\rho d[ССАААСА]$ в водном растворе. С помощью серии одномерных ЯЭО-экспериментов определены расстояния между сближенными в пространстве протонами олигонуклеотидов, а также между протонами бензиламидного фрагмента и протонами ближайших нуклеотидных звеньев. Анализ эффективного времени корреляции для некоторых пар протонов ковалентного аддукта показал, что значения τ_c бензиламидного фрагмента и непосредственно взаимодействующих с ним нуклеотидных звеньев С-1 и С-8 совпадают и несколько меньше, чем τ_c внутренних нуклеотидных звеньев, что отражает возросшую жесткость структуры вблизи участка модификации. С использованием метода ограниченной молекулярной механики предложено вероятное состояние ковалентного аддукта в растворе, наилучшим образом удовлетворяющее полученному из эксперимента набору межпротонных расстояний. Рассмотрены вопросы, связанные с определением расстояния между парой протонов с совпадающими химическими сдвигами и произвольным третьим протоном.

Ключевые слова: олигодезоксинуклеотиды, дуплексы, модификация; ЯМР-спектроскопия; ядерный эффект Оверхаузера; структура, оптимизация.

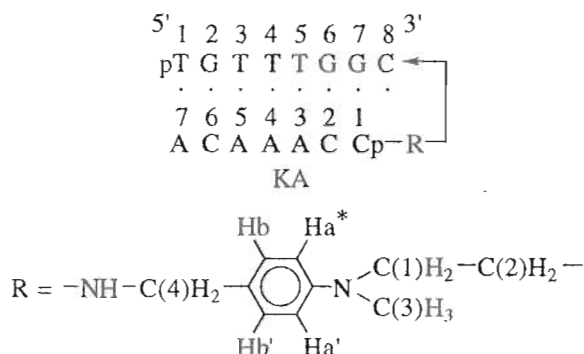
Для комплементарно адресованной модификации одноцепочечных фрагментов НК в настоящее время широко используют олигонуклеотидные реагенты, несущие в своей структуре 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензиламидную группировку на 5'- или 3'-конце цепи [1 - 5]. Ранее [6 - 8] были исследованы кинетические и термодинамические аспекты реакции внутрикомплексного алкилирования этими реагентами, а также вопросы

позиционной направленности модификации. Однако до сих пор не уделялось внимание структурным аспектам этой реакции. В то же время можно полагать, что существенную роль в эффективности и позиционной направленности реакции алкилирования играет пространственная организация комплементарного комплекса в растворе. Для детального понимания механизма внутрикомплексного алкилирования также представляется целесообразным исследовать пространственную структуру конечного продукта реакции.

Сокращения: 1М-ЯМР и 2М-ЯМР – одномерный и двумерный ЯМР; метод ОММ – метод ограниченной молекулярной механики; КА – ковалентный аддукт; ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера; НК – нуклеиновые кислоты. В обозначениях 2'-дезоксинуклеозидов префикс "d" всюду опущен.

Ранее [9] нами был осуществлен синтез ковалентного аддукта (КА) $\rho TGTTTGGC \cdot (R)\rho CCAAACA$ – продукта внутрикомплексного алкилирования по N3-положению дезоксицитидинового звена С-8 окта-

нуклеотида-мишени pTGTGGC с помощью 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензил-5'-фосфамидного производного гептануклеотида (RCl)pCCAAACA.



Были получены ¹H-COSY-, DQF-COSY- и NOESY-спектры ковалентного аддукта и проведена полная идентификация сигналов протонов олигонуклеотидов и модифицирующей группировки. Конформационный анализ углеводных циклов, проведенный на основании констант спин-спинового взаимодействия протонов дезоксирибозы, показал, что фрагменты сахара находятся в 2'-эндо-конформации. Была получена предварительная информация о взаимном расположении модифицирующей группировки и олигонуклеотидных звеньев.

В настоящей работе проведено уточнение пространственной структуры КА на основе межпротонных расстояний, полученных из данных ЯЭО-спектроскопии, которые использовались в качестве экспериментальных ограничений при расчете вероятного состояния молекулы в растворе методом ОММ.

Определение межпротонных расстояний. Расстояния между сближенными в пространстве протонами КА определяли по аналогии с работами [10, 11]. Для каждой пары протонов *i* и *j* относительное расстояние r_{ij} вычисляли из соотношения

$$r_{ij}/r_{kl} = (\sigma_{kl}/\sigma_{ij})^{1/6}, \quad (1)$$

используя известное межпротонное расстояние r_{kl} между базисной парой протонов *k* и *l* и определяя экспериментально скорости кросс-релаксации σ_{ij} и σ_{kl} из серии 1М-ЯЭО-экспериментов [12, 13]. Соотношение (2) выполнимо лишь в том случае, если межпротонные векторы *i-j* и *k-l* имеют сравнимые по величине эффективные времена кор-

* Протоны Ha и Ha', а также Hb и Hb' попарно магнитоэквивалентны, вероятно, вследствие вращения фенильного кольца. Магнитоэквивалентны также протоны каждой метиленовой группы C(1)H₂, C(2)H₂ и C(3)H₃. Полученные дополнительные данные показали, что метиленовые протоны при углеродном атоме C(4) бензиламидного фрагмента, C(4)H и C(4)H', в отличие от протонов остальных метиленовых групп неэквивалентны и в ЯМР-спектре имеют различные химические сдвиги (3.78 и 3.68 м. д. соответственно), при этом сигналы протонов C(4)H' и C(2)H₂ в спектре перекрываются.

Таблица 1. Времена корреляции для некоторых пар протонов дуплексов pd(CCAAAC)A · pd(TGTGGC) (I), (Phn-NH-(CH₂)₂-NH)pd(CCAAACA) · pd(TGTGGC) (II) и КА

Пара протонов (остаток цитидина)	Время корреляции τ_c , нс		
	Дуплекс (I)	Дуплекс (II)	КА
(C-1) H5 – H6	3.46	2.42	1.92
(C-2) H5 – H6	3.57	2.95	2.49
(C-6) H5 – H6	2.99	2.95	2.95
(C-8) H5 – H6	3.18	1.37	1.84
(C-6) H2'a – H2'b	1.29	1.30	1.45
H(6) – H(7)*		1.93	
Ha – Hb**			1.92

* H(6) и H(7) – ароматические протоны феназина [11].

** Протоны бензиламидного фрагмента.

реляции τ_c . Ранее было показано [12 - 15], что τ_c углеводных циклов несколько короче, чем τ_c гетероциклических оснований. Поэтому нормировочное расстояние r_{kl} для определения неизвестного расстояния r_{ij} между протонами олигонуклеотидных фрагментов выбирали таким образом, чтобы времена корреляции межпротонных векторов *i-j* и *k-l* были сравнимы по величине [10, 11, 13]. Времена корреляции для некоторых пар протонов КА приведены в табл. 1. Значения расстояний между протонами олигонуклеотидов представлены в табл. 2.

Для того чтобы оценить время корреляции протонов бензиламидного фрагмента, мы определили τ_c для пары ароматических протонов Ha-Hb этого фрагмента, расстояние между которыми известно, фиксировано и не зависит от конформации молекулы ($r = 2.50 \text{ \AA}$).

Время корреляции вычисляли, используя соотношение

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

где σ_{ij} – скорость кросс-релаксации для протонов *i* и *j*; τ_c – эффективное время корреляции вектора между протонами *i* и *j*; r_{ij} – расстояние между этими протонами; ω – рабочая частота прибора (в рад с⁻¹); γ – гиромагнитное отношение; \hbar – постоянная Планка, деленная на 2π [13].

Из соотношения (2) было найдено, что время корреляции для Ha-Hb-межпротонного вектора составляет 1.92 нс (табл. 1).

Расстояния между протонами модифицирующей группировки и протонами олигонуклеотидов определяли из соотношения (2), используя самое короткое (для данной пары протонов) время корреляции (см. также "Приложение"). В случае

Таблица 2. Значения расстояний (Å) (экспериментальные и расчетные в итоговой структуре S(Alk)8*) между протонами КА

Нуклеотидное звено	Эксп.	S(Alk)8*	Нуклеотидное звено	Эксп.	S(Alk)8*	Нуклеотидное звено	Эксп.	S(Alk)8*	Нуклеотидное звено	Эксп.	S(Alk)8*
Внутринуклеотидные расстояния						Н1'-Н2'б					
Н1'-Н6/Н8						G-6	*	2.4	C-6	2.5	2.4
T-1	3.8	3.7	C-1	3.8	3.7	G-7	2.5	2.4	A-7	2.8	2.4
G-2	3.7	4.0	C-2	3.6	3.7	C-8	2.4	2.4			
T-3	3.0	3.7	A-3	3.8	3.9	Межнуклеотидные расстояния					
T-4	*	3.7	A-4	3.6	3.9	Н1'-Н6/Н8					
T-5	3.8	3.7	A-5	3.7	3.9	T-1 - G-2	*	3.95	C-1 - C-2	3.7	3.3
G-6	4.2	4.0	C-6	*	3.7	G-2 - T-3	3.2	3.5	C-2 - A-3	3.6	3.5
G-7	4.0	4.0	A-7	3.5	3.9	T-3 - T-4	*	3.5	A-3 - A-4	*	3.3
C-8	4.0	3.7				T-4 - T-5	3.2	3.5	A-4 - A-5	3.3	3.3
Н2'a-Н6/Н8						T-5 - G-6	3.6	3.7	A-5 - C-6	3.3	3.3
T-1	1.9	2.0	C-1	2.1	1.9	G-6 - G-7	3.7	3.6	C-6 - A-7	3.6	3.8
G-2	2.7	2.4	C-2	2.1	2.0	G-7 - C-8	*	3.7			
T-3	2.0	2.1	A-3	*	2.1	Н2'б-Н6/Н8					
T-4	2.1	2.0	A-4	*	2.1	T-1 - G-2	*	2.7	C-1 - C-2	2.6	2.3
T-5	1.9	1.9	A-5	2.0	2.3	G-2 - T-3	2.3	2.4	C-2 - A-3	*	2.6
G-6	*	2.6	C-6	2.1	2.1	T-3 - T-4	2.4	2.2	A-3 - A-4	*	2.3
G-7	*	2.7	A-7	2.2	2.3	T-4 - T-5	2.2	2.0	A-4 - A-5	2.5	2.3
Н1'-Н2'б						T-5 - G-6	3.0	2.7	A-5 - C-6	2.4	2.2
T-1	2.2	2.4	C-1	*	2.4	G-6 - G-7	*	1.7	C-6 - A-7	2.5	2.6
G-2	2.5	2.4	C-2	2.2	2.4	G-7 - C-8	*	2.5			
T-3	2.0	2.4	A-3	*	2.4	Н6/Н8-Н5/СН ₃					
T-4	*	2.4	A-4	2.1	2.4	C-1 - C-2	3.6	3.7	Н2'-Н5/СН ₃		
T-5	2.6	2.4	A-5	2.7	2.4	A-5 - C-6	3.7	3.9	C-1 - C-2	2.8	3.1

* Расстояния не удалось определить из-за перекрытия сигналов в спектре.

метиленовых протонов бензиламидного фрагмента использовали τ_c метиленовых протонов углеводных циклов. Результаты вычислений приведены в табл. 3.

Построение структуры ковалентного аддукта в растворе проводили методом ОММ по аналогии с работами [10, 11]. В работе [9] было показано, что наличие ковалентной сшивки не вносит существенных изменений в структуру основной части дуплекса. Все изменения происходят на границе контакта бензиламидного фрагмента с нуклеотидными звеньями G-7, C-1 и C-8 при минимальном искажении остальной части структуры дуплекса. Поэтому при оптимизации структуры методом ОММ в качестве стартовой конформации для олигонуклеотидного фрагмента молекулы КА рассматривали структуру S1* [10], полученную при оптимизации исходного немодифицированного дуплекса (I).

На основании данных по ЯЭО [9] был сделан вывод, что остаток алкилирующей группировки

локализован в области недостающего звена гептануклеотидной цепи и взаимодействует с предыдущим нуклеотидным звеном C-1, а также с алкилированным основанием звена C-8 из противоположной цепи. В соответствии с этим были сконструированы восемь стартовых структур (S(Alk)1 - S(Alk)8, рис. 1), представляющих два конформационных семейства КА с различным расположением бензиламидного фрагмента в структуре молекулы. Отличие заключается в различной ориентации метильной группы C(3)H₃, которая может быть направлена в сторону большой бороздки (структуры S(Alk)1 - S(Alk)4, семейство K) или малой бороздки (структуры S(Alk)5 - S(Alk)8, семейство L) дуплекса. Конформационные различия структур внутри каждого из указанных семейств связаны с различной ориентацией протонов метиленовой группы C(4)H₂.

Оптимизацию структур S(Alk)1 - S(Alk)8 проводили методом ОММ с учетом экспериментальных ограничений по межпротонным расстояниям.

Таблица 3. Значения расстояний (Å, экспериментальные, расчетные (r_{ij}) и эффективные ($r_{эф}$) для структур S(Alk)3* и S(Alk)8* между протонами бензиламидного фрагмента и некоторыми протонами олигонуклеотидного дуплекса, а также среднеквадратичного отклонения экспериментальных и расчетных межпротонных расстояний Δ^*

H_i-H_j	r_{ij}^a экспер.	S(Alk)3*		S(Alk)8*	
		r_{ij}	$r_{эф}$	r_{ij}	$r_{эф}$
(C-1)H6 – Hb/Hb'	3.2	3.73; 4.96	3.61	4.34; 3.80	3.54
(C-1)H5 – Hb/Hb'	3.4	4.70; 4.79	4.20	3.14; 5.89	2.86
(C-1)H1' – Hb/Hb'	3.5	3.15; 7.04	3.13	4.54; 5.44	4.04
(C-1)H6 – C(4)H	2.8	2.52	–	3.00	–
(C-1)H6 – C(4)H'	3.3	3.30	–	4.27	–
(C-1)H5 – C(4)H	3.7	4.17	–	3.00	–
(C-1)H6 – C(4)H'	4.4	4.18	–	4.62	–
C(1)H ₂ – Ha		2.09; 2.58		2.00; 3.57	
	1.8 - 2.1 ^b		1.99		1.98
C(1)H ₂ – Ha'		4.68; 4.57		4.55; 4.68	
C(1)H ₂ – C(3)H ₃	2.1 - 2.5 ^b	3.31 ^c	2.69	2.37 ^c	2.23
C(2)H ₂ – Ha		4.43; 4.69		2.37; 3.40	
	2.2 - 2.5 ^b		3.77		2.31
C(2)H ₂ – Ha'		5.08; 4.96		5.40; 4.73	
C(2)H ₂ – C(3)H ₃	2.6 - 3.0 ^b	2.12 ^c	1.82	3.00 ^c	2.62
Δ^*^d			0.45		0.57

^a О точности определения расстояний см. в работе [10].

^b Приведен диапазон расстояний.

^c Приведено расстояние до ближайшего протона метильной группы.

^d При расчете среднеквадратичного отклонения Δ^* учтены расстояния только между протонами бензиламидного фрагмента Hb/Hb', C(4)H и C(4)H' и протонами (C-1)H5, (C-1)H6 и (C-1)H1' олигонуклеотидной части дуплекса.

как описано в работах [10, 11]. В оптимизацию были включены спиральные и торсионные параметры бензиламидной группировки и ближайших к ней звеньев (C-1, G-7, C-8). В качестве варьируемых выбраны следующие параметры: угол спирального вращения, угол наклона, угол пролеллера, дислокация, фазовый угол псевдовращения, задающий конформацию сахарного кольца, торсионный угол гликозидной связи и все торсионные углы линкера, соединяющего бензиламидную группировку с дуплексом.

В результате оптимизации были получены итоговые структуры S(Alk)1* - S(Alk)8*. Конформационные энергии (E , ккал/моль) и среднеквадратичные отклонения экспериментальных и расчетных межпротонных расстояний (Δ^* , Å) для структур S(Alk)1* - S(Alk)8* приведены в табл. 4. Видно, что в семействе K (S(Alk)1* - S(Alk)4*) к наиболее оптимальной с точки зрения энергетических и структурных параметров можно отнести структуру S(Alk)3*, а в семействе L (S(Alk)5* - S(Alk)8*) – структуру S(Alk)8*. Энергетические параметры структуры S(Alk)8* резко предпочтительнее, чем у структуры S(Alk)3*, в то время как межпротонные расстояния между бензиламидным фрагмен-

том и олигонуклеотидной частью дуплекса (т.е. величины Δ^*) различаются незначительно. Для более обоснованного выбора между структурами S(Alk)3* и S(Alk)8* был проведен детальный анализ геометрии бензиламидного фрагмента. Из табл. 3 видно, что в структуре S(Alk)3* C(2)H₂-группа расположена ближе к C(3)H₃-группе, чем к протонам Ha и Ha', а протоны C(3)H₃-группы локализованы ближе к C(2)H₂-протонам, чем к C(1)H₂-протонам. Это в целом противоречит экспериментальным данным (ср. экспериментальные и эффективные[#] межпротонные расстояния в табл. 3). В противоположность этому соответствующие расстояния в структуре S(Alk)8*, которая, с одной стороны, соответствует минимуму функционала

[#] Поскольку сигналы протонов в каждой группе C(1)H₂, C(2)H₂, C(3)H₂, Hb/Hb' и Ha/Ha' имеют одинаковый химический сдвиг, измеряемый в эксперименте ЯЭО между протонами указанных групп и любым третьим (i) протоном в общем случае представляет собой суммарный эффект, который можно аппроксимировать к ЯЭО от некоего гипотетического протона z , находящегося на эффективном расстоянии $r_{эф}$ от протона i . Расчетные эффективные расстояния $r_{эф}$, полученные для некоторых групп протонов в оптимизированных структурах S(Alk)3* и S(Alk)8* (см. "Экспериментальную часть"), приведены в табл. 3.

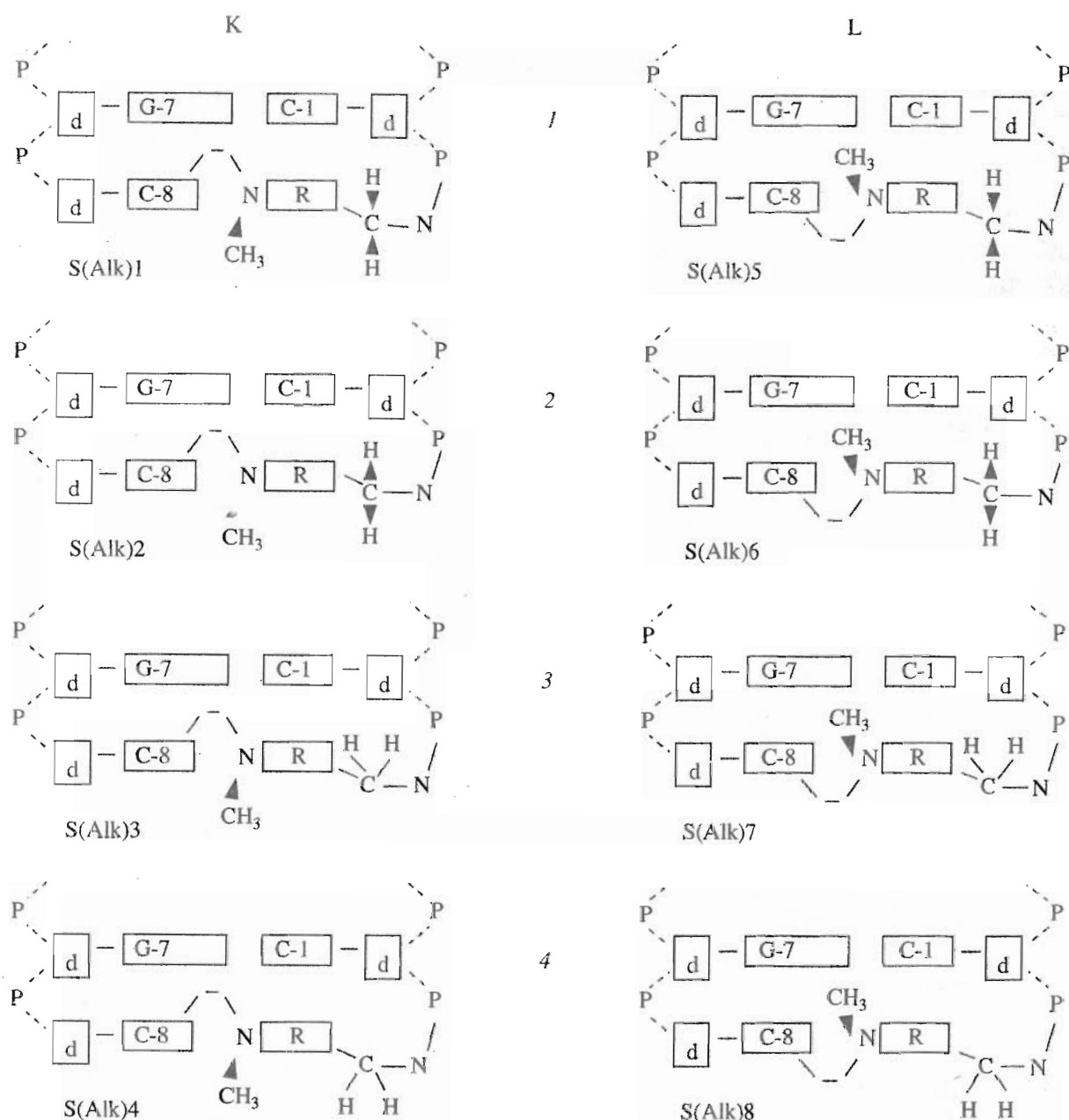


Рис. 1. Фрагменты моделей стартовых конформаций для КА. К и L – семейства конформаций с ориентацией N-CH₃-группы в сторону большой и малой бороздки дуплекса соответственно. В каждом семействе конформации 1 - 4 различаются ориентацией вектора C(4)H₂-группы: 1 – вектор ориентирован в сторону большой бороздки дуплекса; 2 – в сторону малой бороздки; 3 – вдоль направления оси спирали дуплекса; 4 – против направления оси спирали. d – остаток дезоксирибозы.

ОММ, а с другой – в целом удовлетворяет набору экспериментально полученных межпротонных расстояний, качественно согласуются с экспериментом. Этот критерий дает основание полагать, что структура S(Alk)8* наиболее адекватно описывает экспериментальное состояние КА в растворе. Стереопара этой структуры представлена на рис. 2.

Основной особенностью структуры S(Alk)8* (рис. 2) является то, что гетероциклическое осно-

вание алкилированного дезоксицитидина C-8 располагается параллельно плоскости, образуемой парой оснований (G-7) · (C-1), на расстоянии около 3 Å от нуклеозидного остатка (G-7). Плоскость фенильного кольца бензиламидного фрагмента образует угол величиной примерно 10° с плоскостью пары оснований (G-7) · (C-1) и находится на расстоянии около 3.7 Å от нуклеозидного остатка C-1.

Наблюдаемые различия между экспериментально определенными расстояниями и расстояниями,

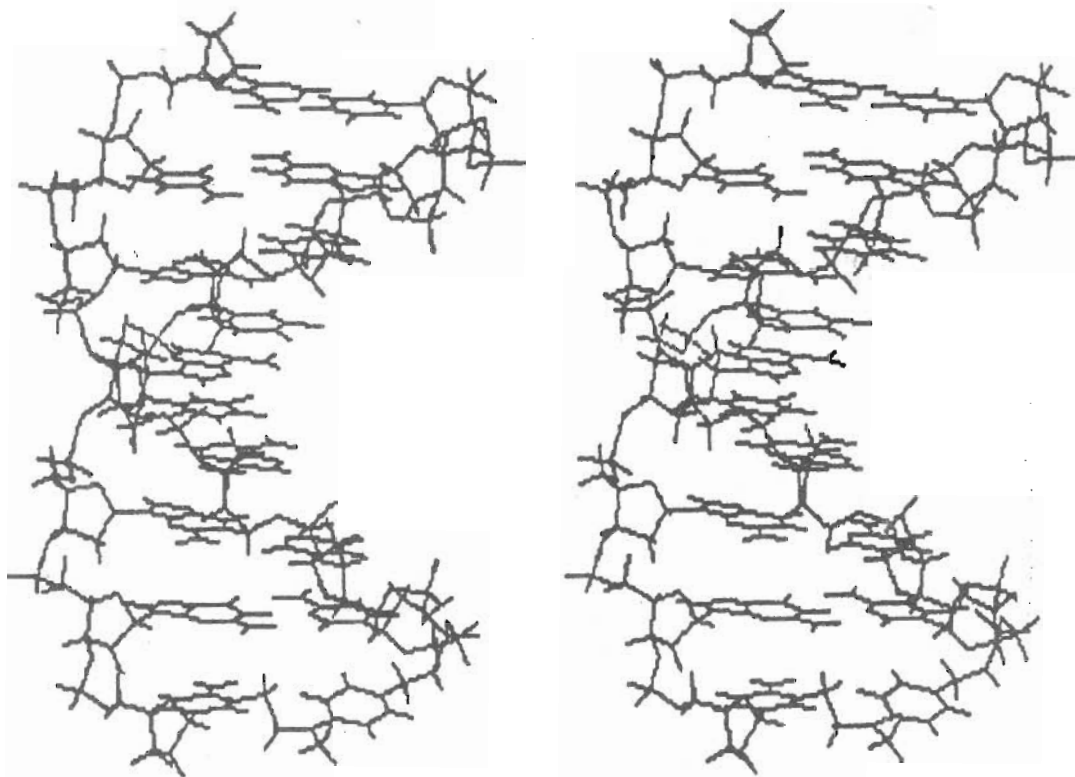


Рис. 2. Стереопара итоговой структуры ковалентного аддукта, S(Alk)8*, полученная в результате энергетической оптимизации стартовой структуры S(Alk)8 с учетом данных ЯМР.

рассчитанными для структуры S(Alk)8*, в большинстве случаев не превышают методической ошибки определения расстояний по методу двухспиновой аппроксимации. Однако в ряде случаев экспериментальные расстояния между бензил-амидной группой и остатком С-1 оказались существенно меньше, чем следует из оптимизированной структуры S(Alk)8* (например, расстояние Н6(С-1)–С(4)Н', табл. 3). Наиболее очевидное объяснение заключается в том, что подход двухспиновой аппроксимации без учета эффектов спин-диффузии, которые могут вносить значительный вклад в кросс-релаксацию метиленовых протонов через их взаимодействие с протонами Нb/Нb' фенильного кольца, в данном случае не вполне адекватен. Возможно также, что и потенциальные функции не вполне точно описывают взаимодействие фосфамидного фрагмента и линкера с другими частями молекулы. Тем не менее такие несоответствия в расстояниях в целом не могут существенно

повлиять на общие черты конформации ковалентного аддукта.

Конечно, было бы неверным рассматривать структуру S(Alk)8* в качестве единственно присутствующей в растворе конформации ковалентного аддукта. Наиболее вероятное состояние этого дуплекса, по-видимому, представляет популяцию конформеров (с высокой долей конформации S(Alk)8*), находящихся в быстром равновесии (в шкале времени ЯМР), что приводит к среднестатистической картине в спектрах ЯМР.

Анализ времени корреляции ароматических протонов модифицирующей группировки показал, что оно практически совпадает с временем корреляции ароматических протонов нуклеотидных звеньев С-1 и С-8, непосредственно взаимодействующих с этой группировкой (табл. 1). При этом значения τ_c этих протонов заметно короче, чем τ_c для внутренних цитидинов С-2 и С-6. Аналогичный эффект (табл. 1) наблюдался и в случае

Таблица 4. Конформационные энергии (E , ккал/моль) и среднеквадратичные отклонения экспериментальных и расчетных межпротонных расстояний (Δ^* , Å) для структур S(Alk)1* - S(Alk)8*

S(Alk)	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*
E	-130	-137	-135	-139	-130	-138	-125	-144
Δ^*	1.17	0.58	0.44	0.63	0.87	0.80	0.77	0.57

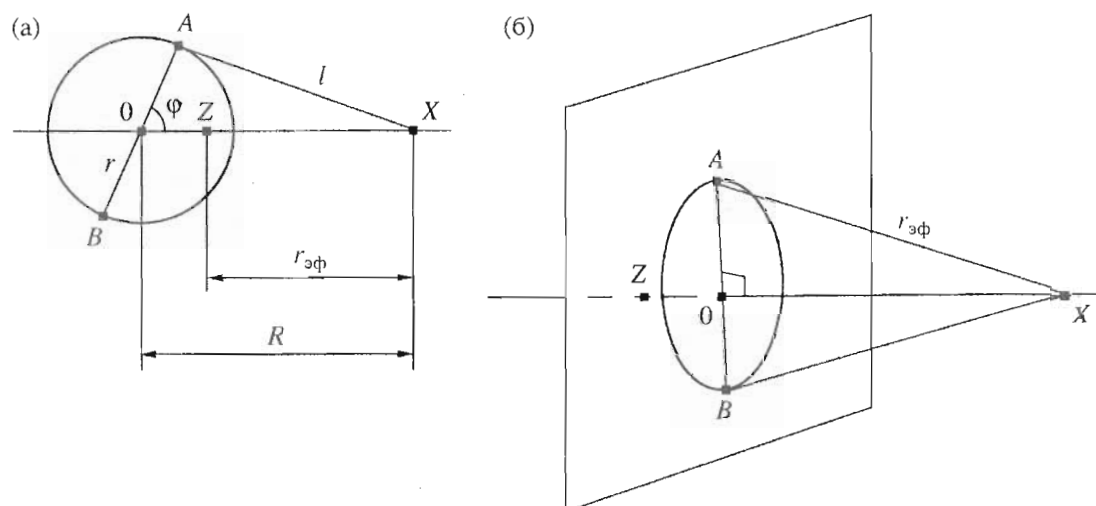


Рис. 3. Схематическое представление системы протонов, состоящей из произвольного протона X и двух вращающихся вокруг центра O магнитоэквивалентных протонов A и B. Показаны два возможных граничных случая взаимного расположения точки X и окружности, описываемой протонами A и B: а – прямая OX лежит в плоскости вращения; б – прямая OX перпендикулярна плоскости вращения протонов.

дуплекса с ковалентно присоединенным остатком феназина (Phn-NH-(CH₂)₂-NH)-pd(CCAAACA) · pd(TGTTTGGC), который исследовался в работе [11] (данные ранее не публиковались). Можно полагать, что уменьшение τ_c для звеньев C-1 и C-8 обусловлено влиянием модифицирующих группировок, а не концевым их расположением. Действительно, в немодифицированном дуплексе pd(CCAAACA) · pd(TGTTTGGC) τ_c для всех остатков цитидина одинаково (табл. 1).

Поскольку τ_c обратно пропорционально частоте внутренних колебаний данного фрагмента молекулы, более жесткие фрагменты будут обладать меньшим τ_c . Действительно, из механики известно, что характерная частота колебаний растет с ростом жесткости системы, в то время как амплитуда колебаний падает. Таким образом, наблюдаемый эффект, по-видимому, связан с уменьшением подвижности нуклеозидных звеньев C-1 и C-8, вызванным стабилизирующим ковалентным и/или стэкинг-взаимодействием с модифицирующей группировкой. Действительно, как было показано ранее [9, 16], модифицированные дуплексы имеют более высокую температуру плавления по сравнению с немодифицированным.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приготовление образца для записи ¹H-ЯМР-спектров подробно описано в работе [9].

Запись ¹H-ЯМР-спектров проводили по методикам, описанным в работах [10, 16].

Расчет эффективного расстояния $r_{эф}$ между магнитоэквивалентными протонами A и B с совпадающими химическими сдвигами и любым тре-

тым протоном i в расчетных структурах определяли, используя следующее соотношение:

$$\frac{1}{(r_{эф})^6} = \frac{1}{r_{iA}^6} + \frac{1}{r_{iB}^6}, \quad (3)$$

где r_{iA} и r_{iB} – расстояния от протона i до протонов A и B в расчетной структуре ковалентного аддукта.

ПРИЛОЖЕНИЕ

В данном Приложении рассматриваются вопросы, связанные с использованием ЯЭО для определения расстояний между парой протонов, имеющих в ЯМР-спектре совпадающие хим. сдвиги, и третьим произвольным протоном.

Рассмотрим следующие варианты:

1) протоны с совпадающими хим. сдвигами эквивалентны вследствие быстрого (в ЯМР-масштабе времени) вращения содержащей их группировки, примером могут служить пары протонов Na-Na' или Nb-Nb' бензиламидного фрагмента;

2) протоны с совпадающими хим. сдвигами входят в состав малоподвижных группировок и не являются эквивалентными. Наиболее характерный пример – протоны метиленовых групп.

Рассмотрим эти случаи последовательно.

1. Представим систему, состоящую из произвольного протона X и двух вращающихся вокруг центра O протонов A и B с совпадающими в ЯМР-спектре хим. сдвигами (рис. 3а). С использованием ЯЭО требуется определить расстояние от каждого из этих протонов до протона X при условии, что период вращения протонов A и B существенно меньше времени насыщения сигнала (t) в

ЯЭО-эксперименте. Из условия эквивалентности последних следует, что $\sigma_{AX} = \sigma_{BX}$. Тогда в условиях нестационарного режима (при $t < 150$ мс) скорость кросс-релаксации $\sigma_{\text{экср}}$, наблюдаемая в эксперименте при одновременном насыщении протонов А и В, будет представлять собой суммарный эффект процессов кросс-релаксации каждого из протонов А и В. Поэтому скорость кросс-релаксации, определяемая из эксперимента, удовлетворяет следующему соотношению:

$$\sigma_{\text{экср}} = \sigma_{AX} + \sigma_{BX} = 2\sigma_{AX} = 2\sigma_{BX}. \quad (4)$$

Таким образом, вклад каждого из эквивалентных протонов в величину кросс-релаксации, наблюдаемую экспериментально, равен $0.5\sigma_{\text{экср}}$.

Полная эквивалентность протонов А и В позволяет упростить систему, исключив из рассмотрения один из вращающихся протонов, например В. Очевидно, что все дальнейшие рассуждения, касающиеся расположения протона А относительно третьего протона Х, справедливы также для протона В.

Усредненное по времени положение протона А совпадает с центром его вращения О (рис. 3а). Однако, поскольку зависимость скорости кросс-релаксации от расстояния нелинейна, определяемое по σ_{AX} из соотношения (2) межпротонное расстояние $r_{\text{эф}}$ между протоном Х и вращающимся протоном А соответствует усредненному по вкладу положению последнего в воображаемой точке Z (такой, что произвольный неподвижный протон, помещенный в точку Z, имел бы с протоном Х скорость кросс-релаксации, равную σ_{AX}). Таким образом, получаемое из эксперимента значение $r_{\text{эф}}$ в общем случае не равно усредненному по времени "истинному" расстоянию ОХ.

Возможны два граничных случая взаимного расположения точки Х и окружности, описываемой протоном А:

1а) прямая ОХ лежит в плоскости вращения (рис. 3а);

1б) прямая ОХ перпендикулярна плоскости вращения протона А (рис. 3б).

В случае "1а" в любой момент времени расстояние l между протонами А и Х находится из соотношения

$$l = \sqrt{R^2 + r^2 - 2rR \cos \varphi}, \quad (5)$$

где $R = ОХ$ – расстояние от протона Х до усредненного по времени положения протона А; r – радиус вращения протона А; φ – угол между прямой ОХ и радиус-вектором протона А. Среднюю скорость

кросс-релаксации между вращающимся протоном А и протоном Х можно выразить в виде

$$\begin{aligned} \sigma_{AX} &= \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \frac{K}{l(\varphi)^6} d\varphi = \\ &= \frac{K}{\pi} \int_0^{\pi} \frac{d\varphi}{(R^2 + r^2 - 2rR \cos \varphi)^3}, \end{aligned} \quad (6)$$

где K – коэффициент пропорциональности, включающий в себя гиромагнитные отношения обоих протонов, постоянную Планка, эффективное время корреляции и рабочую частоту прибора. В то же время для воображаемого неподвижного протона, находящегося в точке Z, скорость кросс-релаксации определяется следующим образом:

$$\sigma_{XZ} = K \frac{1}{(r_{\text{эф}})^6}. \quad (7)$$

Поскольку точка Z выбирается таким образом, что $\sigma_{XZ} = \sigma_{AX}$,

$$\frac{1}{(r_{\text{эф}})^6} = \frac{1}{\pi} \int_0^{\pi} \frac{d\varphi}{(R^2 + r^2 - 2rR \cos \varphi)^3}. \quad (8)$$

После интегрирования получаем

$$\begin{aligned} (r_{\text{эф}})^6 &= \\ &= \frac{R^{10} - 5R^8 r^2 + 10R^6 r^4 - 10R^4 r^6 + 5R^2 r^8 - r^{10}}{R^4 + 4R^2 r^2 + r^4} \quad (9) \end{aligned}$$

Решая уравнение (8) относительно R (и отбрасывая отрицательный корень), находим неизвестное истинное расстояние от протона Х до усредненного по времени положения протона А. Например, для системы Нб-Нб' и протона Н1' звена С-1, в целом удовлетворяющих условию "1а", при значениях $r_{\text{эф}} \approx 3.5 \text{ \AA}$, $r = 2.16 \text{ \AA}$ (расстояние Нб-Нб' = 4.31 \AA) получаем $R = 1.3r_{\text{эф}}$.

В случае "1б" (рис. 3б) при любом повороте протонов А и В

$$AX = BX = XZ = \sqrt{R^2 + r^2}, \quad (10)$$

откуда

$$R = \sqrt{r_{\text{эф}}^2 - r^2}. \quad (11)$$

В этом случае для той же системы протонов Нб-Нб' и Н1' звена С-1 при аналогичных значениях r и $r_{\text{эф}}$ получаем $R \approx 0.75r_{\text{эф}}$.

Таким образом, в системах с вращающимися протонами вращение приводит к несовпадению экспериментально определяемого и истинного межпротонных расстояний. При этом в зависимости от взаимного расположения элементов системы возможно как экспериментальное занижение,

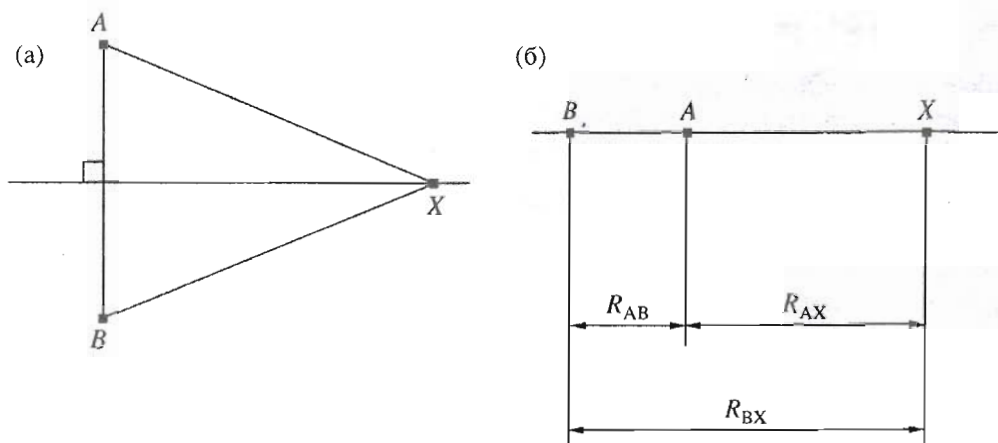


Рис. 4. Схематическое представление системы протонов, состоящей из произвольного протона X и двух протонов A и B входящих в состав малоподвижных группировок и в общем случае не являющимися эквивалентными. Представлены два возможных граничных положения протонов A и B по отношению к третьему протону X: а – протоны A и B равноудалены от протона X; б – один из протонов существенно ближе к протону X, чем второй, причем все три протона лежат на одной прямой.

так и завышение истинного значения расстояния, причем разброс может составлять $\pm 30\%$.

2. В случае протонов A и B с совпадающими хим. сдвигами, входящими в состав малоподвижных группировок и не являющихся эквивалентными, также возможны два граничных положения по отношению к третьему протону X:

2а) протоны A и B равноудалены от протона X (рис. 4а);

2б) один из протонов (например, A) существенно ближе к протону X, чем второй. Предельный случай – все три протона лежат на одной прямой в последовательности B–A–X (рис. 4б).

В случае “2а” $\sigma_{AX} = \sigma_{BX} = 0.5\sigma_{\text{эксп}}$.

В ситуации “2б” (рис. 4б) $R_{AX} > R_{BX}$ и, поскольку σ обратно пропорциональна шестой степени расстояния между взаимодействующими протонами, $\sigma_{AX} \gg \sigma_{BX}$. Вклад каждого из протонов A и B в $\sigma_{\text{эксп}}$ можно оценить следующим образом:

$$\frac{\sigma_{AX}}{\sigma_{BX}} = \left(\frac{R_{BX}}{R_{AX}}\right)^6 = \left(\frac{R_{AX} + R_{AB}}{R_{AX}}\right)^6 = \left(1 + \frac{R_{AB}}{R_{AX}}\right)^6 \quad (12)$$

Для протонов метиленовых групп $R_{AB} = 1.8 \text{ \AA}$. При $R_{AX} = 5.0 \text{ \AA}$ (максимальное расстояние, регистрируемое в ЯЭО-экспериментах) в соответствии с (8) $\sigma_{AX}/\sigma_{BX} = 6.3$, т.е. σ_{BX} составляет 13.6% от $\sigma_{\text{эксп}}$. Очевидно, что при уменьшении R_{AX} отношение σ_{AX}/σ_{BX} будет расти, что приводит к еще большему снижению вклада σ_{BX} в $\sigma_{\text{эксп}}$. Следовательно, процесс кросс-релаксации протона X будет протекать в основном на ближайшем протоне A, т.е. $\sigma_{AX} \approx \sigma_{\text{эксп}}$.

Поскольку истинное расположение протонов A, B и X заранее не известно, существует неопределенность при определении вклада каждого из протонов A и B в $\sigma_{\text{эксп}}$. Диапазон неопределенности по σ_{AX} ограничивается предельными случаями от $\sigma_{AX} = 0.5\sigma_{\text{эксп}}$ до $\sigma_{AX} = \sigma_{\text{эксп}}$. За счет этого возможно отклонение экспериментально определяемого расстояния от истинного не более чем в $\sqrt{2}$ раз, что составляет $\sim 12\%$. Таким образом, для протонов, соответствующих случаю “2”, суммарная ошибка ЯЭО-определения межпротонных расстояний дополнительно возрастает за счет неопределенности взаимного расположения протонов A, B и X.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Belikova A.M., Zarytova V.F., Grineva N.I. // *Tetrahedr. Lett.* 1967. № 37. P. 3557 - 3562.
2. Grineva N.I., Karpova G.G. // *FEBS Lett.* 1973. V. 32. P. 351 - 355.
3. Knorre D.G., Vlassov V.V. // *Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* 1985. V. 32. P. 291 - 320.
4. Vlassov V.V., Gaidamakov S.A., Gorn V.V., Grachev S.A. // *FEBS Lett.* 1985. V. 182. P. 415 - 418.
5. Vlassov V.V., Zarytova V.F., Kutiavin I.V., Mamaev S.V., Podymogin M.A. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. P. 4065 - 4076.
6. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Карпова Г.Г., Кнорре Д.Г., Пичко Н.П., Райт А.С., Стефанович Л.Е. // *Биоорган. химия.* 1981. Т. 7. С. 1512 - 1522.
7. Гимаутдинова О.И., Карпова Г.Г., Ломакина Т.С., Шелпакова Е.Л., Чемасова А.Н., Гринева Н.И. // *Биоорган. химия.* 1980. Т. 6. С. 70 - 80.
8. Беньмецкая Л.З., Гринева Н.И., Карпова Г.Г., Пичко Н.П., Чемасова Т.А. // *Биоорган. химия.* 1977. Т. 3. С. 903 - 913.

9. Биченкова Е.В., Абрамова Т.В., Мальцева Т.В., Лебедев А.В. // Биоорганич. химия. 1992. Т. 18. С. 1199 - 1213.
10. Биченкова Е.В., Воробьев Ю.Н., Кутявин И.В., Лебедев А.В., Мальцева Т.В., Тэннз Е.Ю. // Биоорганич. химия. 1990. Т. 16. С. 1236 - 1258.
11. Биченкова Е.В., Горинштейн Л.А., Воробьев Ю.Н., Тэннз Е.Ю., Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Мальцева Т.В., Лебедев А.В. // Биоорганич. химия. 1992. Т. 18. С. 901 - 910.
12. Clore G.M., Gronenborn A.M. // J. Magn. Reson. 1985. V. 61. P. 158 - 164.
13. Clore G.M., Gronenborn A.M. // Prog. NMR Spectrosc. 1985. V. 17. P. 1 - 32.
14. Clore G.M., Gronenborn A.M. // FEBS Lett. 1984. V. 172. P. 219 - 223.
15. Clore G.M., Gronenborn A.M. // FEBS Lett. 1984. V. 175. P. 117 - 124.
16. Биченкова Е.В., Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Лебедев А.В., Мальцева Т.В., Сальников Г.Е. // Биоорганич. химия. 1992. Т. 18. С. 398 - 412.

Study of the Spatial Structure of the Product of Intracomplex Octanucleotide pd[TGTTTGGC] Alkylation by the 4-[N-Methyl-N-(2-chloroethane)amino]benzyl-5'-Phosphamide Derivative of Heptanucleotide pd[CCAACA] in Aqueous Solution by ^1H NMR Spectroscopy and Constrained Molecular Mechanics

L. A. Gorenshtein, E. V. Bichenkova, Yu. N. Vorob'ev, and A. V. Lebedev

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

Abstract – Using one- and two-dimensional ^1H NMR spectroscopy (400 MHz), a detailed study of the spatial structure of the covalent adduct, a product of the intracomplex alkylation of octanucleotide pd[TGTTTGGC] by the 4-[N-methyl-N-(2-chloroethyl)amino]benzyl-5'-phosphamide derivative of heptanucleotide pd[CCAACA] in aqueous solution, was continued. The distances between closely spaced protons of oligonucleotides as well as between protons of the benzylamide fragment and protons of the nearest nucleotide units were determined by measurements of the nuclear Overhauser effect. Analysis of effective correlation times for some pairs of protons of the covalent adduct showed that the values of τ_c for the benzylamide fragment and nucleotide units C-1 and C-8, which directly interact with it, coincide and are smaller than those for the internal nucleotide units, suggesting the increased rigidity of the structure in the vicinity of the modification region. Using the method of constrained molecular mechanics, a probable state of the covalent adduct in solution is proposed that is in the best agreement with the experimentally obtained set of interproton distances. Problems connected with calculating the distance between a pair of protons with coincident chemical shifts and any third proton are considered.

Key words: oligodeoxynucleotides, duplexes, modification, NMR spectroscopy, nuclear Overhauser effect, structure, optimization.