



УДК 577.113.6.012:577.323.3

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ.
ИЗУЧЕНИЕ КОНФОРМАЦИОННОЙ СИТУАЦИИ
В ВОДНОМ РАСТВОРЕ АрА, АрС, СрА И СрС С ПОМОЩЬЮ
СКОРОСТЕЙ СПИН-РЕШЕТОЧНОЙ РЕЛАКСАЦИИ ПРОТОНОВ

Покровская М. Ю., Лысов Ю. П., Гнуцев Н. В.,

Флорентьев В. Л.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Измерены скорости спин-решеточной релаксации протонов нуклеинового основания и H^+ АрА, АрС, СрА и СрС (D_2O , рН 7) в зависимости от температуры. Рассчитаны времена вращательной корреляции DNP. На основе полученных данных и констант спин-спинового взаимодействия протонов определен состав закрытого состояния. Показано, что в растворе всех изученных DNP кроме канонического правозакрученного конформера присутствуют неканонические формы, различающиеся знаком закручивания и типом стекинг-контакта. Причем, если каноническая конформация практически равновероятна для любого димера, то возможность реализации той или иной неканонической формы в значительной степени определяется нуклеотидной последовательностью. Таким образом, можно ожидать, что различные нуклеотидные последовательности будут обладать разными неканоническими конформациями. Обсуждается возможная роль неканонических конформаций в процессах белково-нуклеинового узнавания.

Четыре года назад на основе изучения конформационного поведения методами конформационного расчета, КД и ЯМР нами было высказано предположение, что конформационные возможности полинуклеотидов не ограничены «каноническими» правоспиральными структурами типа А- и В-форм, но включают в себя и «неканонические» конформации, различающиеся закручиванием спирали и типом стекинг-взаимодействия, в том числе и левые спирали [1–3]. Одновременно появившаяся рентгеноструктурная работа [4] экспериментально продемонстрировала левую спираль ДНК, так называемую Z-форму. Исследования последующих лет, а это поистине были годы «конформационного бума», показали, что полиморфизм является отличительной особенностью поведения нуклеиновых кислот (см. обзоры [5, 6]). Не вызывает сомнения и связь полиморфизма нуклеиновых кислот с их биологическим функционированием, особенно в процессах специфического связывания с лигандами и белками.

Особый интерес представляют два аспекта полиморфизма нуклеиновых кислот. Во-первых, какие еще, кроме известных к настоящему времени, конформационные семейства возможны для полинуклеотидов? Во-вторых, как конформационные свойства полинуклеотидов зависят от нуклеотидной последовательности?

Уникальную информацию о конформационном поведении полинуклеотидов позволяют получить DNP. Именно они обладают максимальными конформационными возможностями в ряду олигонуклеотидов, именно в DNP наиболее четко проявляется зависимость конформационных свойств от нуклеотидной последовательности.

В настоящей работе предпринята попытка определить геометрию всех закрытых конформеров (ЗК), которые реализуются в растворе DNP. Закрытыми мы называем конформеры, отличающиеся стекинг-взаимодействием нуклеиновых оснований. В качестве объектов исследования были

Принятые сокращения: DNP – динуклеозидфосфат, CP – скорость спин-решеточной релаксации, KCCB – константа спин-спинового взаимодействия, OC, ЗС – открытое и закрытое состояния, ОК и ЗК – открытый и закрытый конформеры.

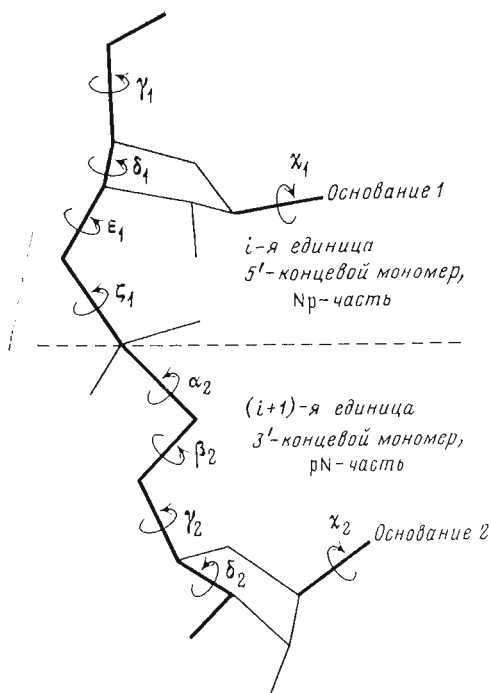


Рис. 1

Рис. 1. Двугранные углы, описывающие конформацию DNP

Рис. 2. Обозначение сторон нуклеинового основания нуклеозидов

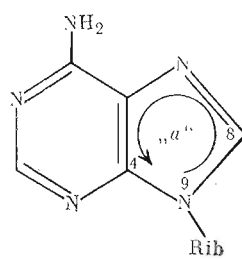
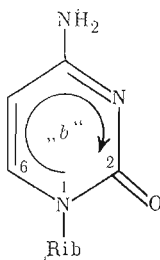


Рис. 2

выбраны АрА, АрС, СрА и СрС. Эти четыре димера моделируют пурипуриновый, пурипиримидиновый, пириимидин-пуриновый и пириимидин-пириимидиновый контакты однопочечных полинуклеотидов. Экспериментальной основой для анализа послужили скорости спин-решеточной релаксации протонов и константы скалярного спин-спинового взаимодействия $^3J_{NH}$ и $^3J_{PH}$. Именно эти параметры были выбраны из богатого арсенала ЯМР, поскольку CP и $KCCB$ поддаются количественному теоретическому расчету. Первые — на основе хорошо разработанной, изящной теории релаксационных процессов [7, 8], вторые — на основе обширной эмпирики в рамках классического или модифицированного уравнения Карплюса [9–11]. Очень важен и тот факт, что эти два параметра совершенно по-разному «видят» геометрию молекулы. Если vicinalные $KCCB$ зависят в основном от величины двугранного угла между взаимодействующими спинами, то CP определяются расстояниями от исследуемого спина до всех остальных. Такая «независимость» экспериментальных параметров, безусловно, повышает степень достоверности проведенного анализа.

Для достижения поставленной цели необходимо было последовательно решить ряд задач. Однако, прежде чем обсудить эти задачи, коротко остановимся на используемой в работе номенклатуре.

Номенклатура и предварительные замечания. Конформацию DNP однозначно описывают 10 двугранных углов — γ_1 , δ_1 , χ_1 , ϵ_1 , ξ_1 , α_2 , β_2 , γ_2 , δ_2 , χ_2 (рис. 1). Все углы определены в соответствии с рекомендациями IUPAC-IUB [12]. Положительные значения углов отсчитываются от ближайшей связи к дальней по часовой стрелке. Для качественного описания конформации сахарофосфатного остова использованы термины «*gauche*⁺» (g^+ , $\theta = 0-120^\circ$), «*trans*» (t , $\theta = 120-240^\circ$) и «*gauche*⁻» (g^- , $\theta = 240, 360^\circ$), для гликозидного угла — термины «*анти*» ($\chi = 180-280^\circ$), «*высокая анти*» ($\chi = 280-320^\circ$) и «*син*» ($\chi = 0-120^\circ$). Конформационный расчет [1], результаты которого использованы в настоящей работе, был проведен в приближении «жестких» конформаций углеводного цикла — $C2'$ -эндо и $C3'$ -эндо (соответственно $P = 164,8$ и $11,2^\circ$, а $\psi_m = 37,0$ и $37,6^\circ$ [13]). Таким образом, углы δ_1 и δ_2 могут принимать значения либо 143° ($C2'$ -эндо-конформация), либо 84° ($C3'$ -эндо-конформация).

Поскольку стороны нуклеинового основания в нуклеозиде стереохимически неэквивалентны, следует рассматривать восемь типов стекинг-контактов*: четыре правозакрученных, R^{aa} , R^{ab} , R^{ba} и R^{bb} , и четыре левозакрученных, L^{aa} , L^{ab} , L^{ba} и L^{bb} . В соответствии с принятой номенклатурой [1], если атомы N9, C8 и C4 пуринов или N1, C6, C2 пиримидинов в указанном порядке задают обход против часовой стрелки, то к смотрящему обращена сторона «а», если же по часовой стрелке — сторона «b» нуклеинового основания (рис. 2). Для стекинг-контакта, образованного i -й и $(i+1)$ -й мономерной единицей полинуклеотидной цепи (рис. 1), первая буква надстрочного индекса обозначает взаимодействующую сторону i -го, а вторая — $(i+1)$ -го нуклеинового основания. Отметим, что для канонических А- и В-форм характерен R^{ba} -тип стекинга, а для Z-формы — L^{ab} .

Модель и постановка задачи. В настоящее время в динамическом конформационном анализе общепринятой является модель двух состояний — открытого (ОС), в котором нуклеиновые основания разнесены в пространстве, и закрытого (ЗС), отличающегося стекинг-взаимодействием оснований:



Если каждому из состояний можно поставить в соответствие определенную величину $\alpha^{\text{ОС}}$ и $\alpha^{\text{ЗС}}$ экстенсивного экспериментального параметра α (таким параметром может быть УФ-поглощение, амплитуда КД, химический сдвиг, КССВ и СР в ЯМР и т. д.) и если предельные параметры $\alpha^{\text{ОС}}$ и $\alpha^{\text{ЗС}}$ не равны между собой и не зависят от температуры, то в рамках модели двух состояний (1) константа конформационного равновесия

$$K = \frac{\alpha^{\text{эксп}} - \alpha^{\text{ЗС}}}{\alpha^{\text{ОС}} - \alpha^{\text{ЗС}}} = \exp(-\Delta G^\circ/RT), \quad (2)$$

а

$$\Delta G^\circ = \Delta \bar{H}^\circ - T\Delta \bar{S}^\circ,$$

где $\alpha^{\text{эксп}}$ — экспериментально измеренная величина α .

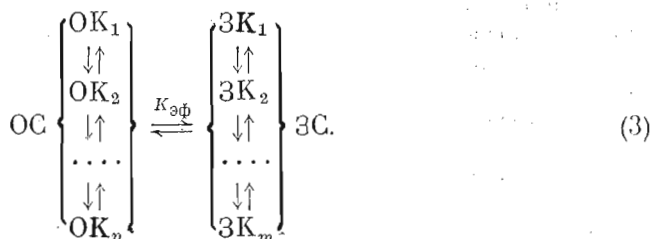
До недавнего времени как ОС, так и ЗС отождествляли с единственным конформером — соответственно ОК и ЗК. Эта точка зрения базировалась на достаточно серьезных аргументах.

Во-первых, методом быстрой кинетики (температурный скачок) было показано наличие в растворе СрС, СрА и АрС единственного релаксационного процесса, ассоциированного с конформационным переходом с характеристическим временем релаксации $\tau=30-40$ нс [14, 15]. Исключение составляет лишь АрА, но и для него данные противоречивы. Если в ранних работах (раствор АрА в 1 М NaCl) [16, 17] авторы интерпретировали эксперимент двумя релаксационными процессами с временами релаксации 50 и 700 нс (что соответствует трем состояниям), то в недавнем исследовании (0,05 М Na-какодилатный буфер, рН 7) [18] был обнаружен лишь один релаксационный процесс с τ 100 нс. Два конформационных состояния разделены достаточно высоким энергетическим барьером (для СрС ΔH^\ddagger прямой и обратной реакций равны соответственно 10,6 и 2,1 ккал/моль [14]).

Во-вторых, для зависимостей УФ- и КД-спектров DNP от температуры характерно наличие изобестических точек, а зависимость $\ln K$ от обратной температуры линейна в пределах экспериментальной ошибки [19].

Однако интенсивное исследование конформации DNP методом ЯМР показало, что и ОС и ЗС представляют собой смесь нескольких конформеров. Были предложены модели трех [20–23] и большего числа состояний [24, 25]. Во всех этих работах выбор модели был в значительной степени произвольным. Таким образом, следует расширить модель конформационного равновесия:

* В ранних работах [1–3] мы использовали для правой спирали индекс «Р» (плюс), а для левой — «М» (минус). В соответствии с рекомендациями [12] в этой работе они заменены на «R» и «L» соответственно.



Здесь нужно отметить, что все конформационные переходы являются быстрыми в шкале времени современных спектрометров ЯМР. Поэтому экспериментально измеряемый параметр $\alpha^{\text{эксн}}$, будь то химический сдвиг, КССВ, СР или ядерный эффект Оверхаузера, усреднен по всем конформерам:

$$\alpha^{\text{эксн}} = \sum_1^n p_i^{\text{OK}} \alpha_i^{\text{OK}} + \sum_1^m p_j^{\text{ЗК}} \alpha_j^{\text{ЗК}}, \quad (4)$$

где p_i^{OK} и $p_j^{\text{ЗК}}$ — мольные доли ОК и ЗК, а α_i^{OK} и $\alpha_j^{\text{ЗК}}$ — соответствующая им величина параметра α .

Интересно рассмотреть, при каких условиях многокомпонентная система (3) удовлетворяет экспериментальным данным (наличие изобестических точек на температурных зависимостях УФ- и КД-спектров и линейность зависимости Вант-Гоффа) и какой физический смысл имеет кажущаяся константа конформационного равновесия $K_{\text{эф}}$.

Нетрудно видеть, что наличие изобестических точек возможно при условии, что отношение концентраций компонентов, составляющих каждое из состояний, не меняется с изменением температуры, т. е.

$$p_i^{\text{OK}} / \sum_{\text{OC}} p_i^{\text{OK}} = \text{const} \quad \text{и} \quad p_j^{\text{ЗК}} / \sum_{\text{ЗС}} p_j^{\text{ЗК}} = \text{const}. \quad \text{Другими словами, температурной зави-}$$

симостью внутри состояний можно пренебречь по сравнению с температурной зависимостью между состояниями: $\Delta \bar{H}_i^0(\text{OK}) \approx \Delta \bar{H}_i^0(\text{ЗК}) \ll \ll \Delta \bar{H}_{\text{эф}}^0$. В этом случае термодинамические параметры, определяемые по уравнению Вант-Гоффа, действительно отражают стеклин-взаимодействие оснований в DNP.

Однако расчет термодинамических параметров по температурным зависимостям УФ- и КД-спектров в случае DNP затруднен тем, что из-за большой ширины перехода ОС — ЗС экспериментально удастся наблюдать лишь среднюю, практически прямолинейную часть кривой плавления. И при минимально (0°C), и при максимально (90°C) доступных температурах равновесная смесь содержит заметные количества ОС и ЗС соответственно. Тем не менее в рамках модели двух состояний были разработаны удобные итерационные методы расчета $\Delta \bar{H}^0$ и $\Delta \bar{S}^0$, основанные на температурных зависимостях УФ- [19], КД- [19, 20, 22, 26] и ЯМР-спектров [27]. Зная термодинамические параметры ОС — ЗС-равновесия, нетрудно экстраполировать экспериментальные кривые в область низких температур и, таким образом, рассчитать УФ-, КД- и ЯМР-спектры закрытого состояния, которые могут послужить основой для изучения конформации ЗС. Такое «приведение» экспериментальных данных к ЗС, впервые предложенное нами [2], в настоящее время широко используется в конформационном анализе олигонуклеотидов [21, 27, 28].

Очевидно, что число и тип ЗК нельзя определить a priori. Сверх того, именно экспериментальное определение числа и геометрии ЗК представляет одну из наиболее интересных проблем конформационного анализа DNP и является целью настоящей работы.

Теперь мы можем четко сформулировать задачи, поэтапное решение которых позволяет достичь поставленной цели:

- 1) экспериментальное определение параметров ЯМР (в настоящей работе это КССВ и СР) в зависимости от температуры;
- 2) определение независимым методом термодинамических параметров ОС — ЗС-равновесия;
- 3) «приведение» экспериментально определенных параметров ЯМР к ЗС (расчет α^{3C});
- 4) определение геометрии всех стерически разрешенных ЗК;
- 5) расчет теоретически ожидаемых параметров ЯМР для всех возможных ЗК (α_i^{3K});

6) определение компонентов ЗС и их относительного веса сравнением приведенных экспериментальных параметров (α^{3C}) с теоретически ожидаемыми ($\sum \alpha_i^{3K} \rho_i$).

Термодинамические параметры ОС — ЗС-равновесия были определены ранее из температурных зависимостей спектров КД [22, 26]. Стерически разрешенные ЗК и их геометрия были рассчитаны методом атом-атомных потенциалов [1].

Таким образом, для определения числа ЗК, составляющих ЗС, их геометрии и относительной стабильности остается решить задачи (1), (3), (5) и (6).

Экспериментальные данные. Измерены (см. «Экспериментальную часть») времена спин-решеточной релаксации (T_1) протонов Н1', Н8, Н5, Н6 в водном растворе (рН 7) АрА, АрС, СрА и СрС в зависимости от температуры в интервале 280—335 К (табл. 1). Константы спин-спинового взаимодействия 3J взяты из литературы [21, 29, 30].

Теоретический расчет КССВ и СР. Расчет КССВ и СР проводили для геометрии ЗК, рассчитанной методом атом-атомных потенциалов. Для анализа были отобраны ЗК, превышающие по энергии оптимальный не более чем на 5 ккал/моль. Таких ЗК оказалось для СрС — 10, для СрА — 22, для АрС — 20 и для АрА — 34.

Винциальные КССВ между протонами рассчитывали в двух вариантах: с помощью общепринятого в стереохимии нуклеозидов уравнения Карплуса [10] и с помощью модифицированного уравнения, полученного в работе [31]. Винциальные КССВ между протонами и ядрами ^{31}P вычисляли по уравнению Карплуса, приведенному в работе [10]. Для каждого ЗК было рассчитано по восемь КССВ: $J_{1'2'}$, $J_{2'3'}$, $J_{3'4'}$, $J_{4'5'1}$, $J_{4'5'2}$, $J_{5'1P}$, $J_{5'2P}$ и $J_{3'P}$.

Ранее нами было показано, что релаксационное поведение протонов в DNP при рабочей частоте спектрометра ЯМР 100 МГц удовлетворительно описывается приближением

$$R_i = 3/2 \gamma^4 \hbar^2 \tau_c \sum_j r_{ij}^{-6}, \quad (5)$$

где $R_i = 1/T_1$ — скорость спин-решеточной релаксации i -го протона, γ — гироманнитное отношение, \hbar — постоянная Планка, τ_c — время вращательной корреляции и r_{ij} — расстояние от изучаемого протона до всех остальных. Однако, поскольку величина τ_c изначально неизвестна и сама должна быть определена из экспериментальных данных, теоретический расчет R_i невозможен. В связи с этим были рассчитаны величины

$$V_i^{3K} = \frac{R_i}{\tau_c} = 3/2 \gamma^4 \hbar^2 \sum_j r_{ij}^{-6}, \quad (6)$$

т. е. скорости продольной релаксации, нормированные к единичному времени вращательной корреляции. V_i^{3K} были рассчитаны для Н1', Н8, Н5 и Н6 всех возможных ЗК.

«Приведение» экспериментальных данных к закрытому состоянию. В табл. 2 представлены термодинамические параметры ОС — ЗС-равновесия, определенные нами ранее из температурных зависимостей спектров

Измеренные времена спин-решеточной релаксации (T_1) протонов DNP (D_2O , pH 7)

DNP	Протон	T_1 , с при T, K														
		280	283	288	293	298	304,5	303,0	305	310,5	313	323	324	333	335	
ApC Ap	H8	0,66														
	H1'	0,76	0,91			1,18				1,63			2,24			
	H5	0,78	0,95			1,24				1,65			2,61			
	H6	0,26	0,99			1,39				1,96			2,98			
CpA Cp	H1'	0,90	0,36			1,58				2,08			3,40			
	H5		1,36							2,24						
	H6		0,49							0,83						
	H1'		0,87							2,08						
pA	H8		0,46							1,28						
	H1'		0,90							2,40						
	H5		1,36							1,80						
	H6		0,99							3,29						
CpC Cp	H5		0,99							1,70						
	H6		0,43							0,75						
	H1'		1,25							1,77						
	H5		1,28							2,16						
pC	H5		0,34							2,0						
	H6		1,34							0,80						
	H1'		1,38							2,40						
	H5		0,48							1,20						
ApA Ap	H1'		0,81							1,16						
	H8		0,96							1,60						
	H5		0,54							1,80						
	H1'		1,16							2,20						
			0,39							1,40						
		0,88								2,20						
										1,56						
										2,79						
										2,53						
										2,58						
										3,66						
										2,20						
										2,20						
										4,04						

Термодинамические параметры ОС-ЗС-равновесия в растворе АрА, АрС, СрА и СрС [22, 26]

DNP	K^{298}	$\Delta\bar{H}^\circ$, кДж/моль	$\frac{\Delta\bar{S}^\circ}{\text{Дж}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{К}^{-1}}$	T_m , °С
АрА	1,21	-26,8	-88,3	30
АрС	0,99	-26,2	-87,9	25
СрА	0,46	-24,3	-87,9	4
СрС	0,83	-25,1	-85,8	20

КД. Воспользовавшись этими величинами, нетрудно в предположении, что параметры ОС и ЗС не зависят от температуры, рассчитать параметр, соответствующий ЗС, имея экспериментальные данные хотя бы для двух температур. Однако такой способ расчета приводит к значительной погрешности в α^{3C} . Дело в том, что вследствие узости экспериментально доступного интервала (обычно не более 70°), изменение экспериментального параметра $\alpha_{T_1}^{\text{эксп}} - \alpha_{T_2}^{\text{эксп}}$ мало и относительная ошибка $\Delta\alpha/\alpha_{T_1}^{\text{эксп}} - \alpha_{T_2}^{\text{эксп}}$ достаточно велика. Так, при измерении КССВ разность $J_{T_1} - J_{T_2}$ обычно не превышает 1 Гц при точности измерения 0,2 Гц. Более достоверные результаты можно было бы получить, рассчитывая α^{3C} по $\alpha^{\text{эксп}}$ при самой низкой доступной температуре и α^{OC} :

$$\alpha^{3C} = \frac{\alpha^{\text{эксп}}(K + 1) - \alpha^{\text{OC}}}{K}, \quad (7)$$

где $\alpha^{\text{эксп}}$ — экспериментальный параметр при температуре T , а K — константа ОС — ЗС-равновесия при той же температуре.

Чтобы воспользоваться этой формулой, необходимо знать α^{OC} , который экспериментально определить не удастся. Однако, как было показано ранее [2, 32], ОС с хорошей степенью точности можно аппроксимировать составляющими DNP мононуклеотидами. Поэтому КССВ ЗС были рассчитаны по формуле (7), где α^{OC} — КССВ соответствующих мононуклеотидов.

В случае СР ситуация существенно сложнее. Как видно из уравнения (5), СР пропорциональна τ_c , которое само зависит от температуры. Кроме того, существовала опасность, что величина τ_c заметно различается для ОС и ЗС. В этом случае зависимость R_i от T могла оказаться весьма сложной, а задача нахождения τ_c ввиду большого числа переменных — неразрешимой. Очевидна необходимость упрощающих предположений. Следующие упрощения представляются достаточно разумными:

- 1) зависимость τ_c от температуры определяется выражением [33]:

$$1/\tau_c = 1/\tau_c^0 \exp(-E_a/RT); \quad (8)$$

- 2) величины τ_c и E_a одинаковы для ОС и ЗС:

$$\tau_c^{\text{OC}} = \tau_c^{\text{ЗС}} = \tau_c, \quad E_a^{\text{OC}} = E_a^{\text{ЗС}} = E_a. \quad (9)$$

Нетрудно показать, что если эти предположения верны, то $\lg R_i$ (или $\ln T_1$) должен линейно зависеть от обратной температуры. Действительно (рис. 3), наблюдается удовлетворительная линейная корреляция, что указывает на адекватность использованных предположений.

Тогда экспериментально измеренная СР i -го протона

$$R_i^{\text{эксп}}(T) = \tau_c(T) \left(\frac{V_i^{\text{OC}} + KV_i^{\text{ЗС}}}{K + 1} \right), \quad (10)$$

где в соответствии с (8) и (2)

$$\tau_c(T) = \tau_c^0 \exp(E_a/RT) \quad \text{и} \quad K = \exp(\Delta\bar{S}^0/R - \Delta\bar{H}^0/RT).$$

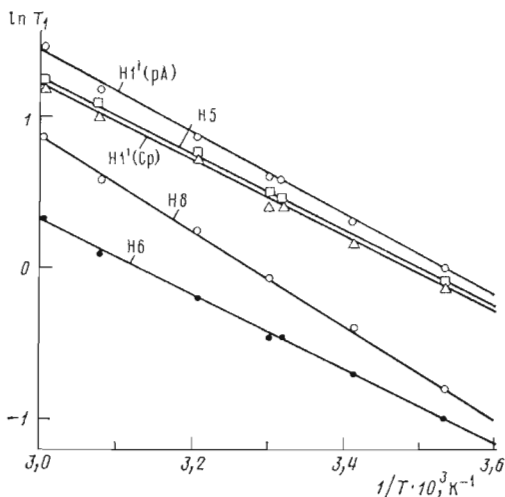


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость $\ln T_1$ от обратной температуры на примере CpA

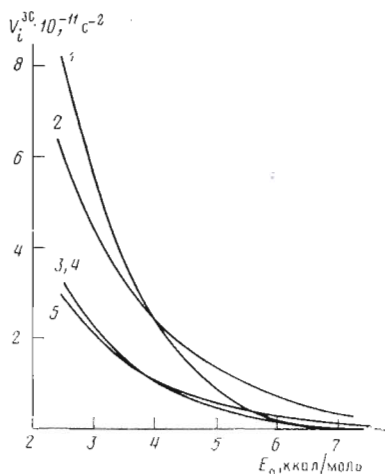


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость V_i^{3C} от E_a для CpA: 1 — H6(Cp); 2 — H8(pA); 3 — H1'(Cp); 4 — H5(Cp); 5 — H1'(pA)

Аппроксимируя ОС, как и в случае КССВ, составляющими DNP мономерами, можем записать для V_i^{OC} :

$$V_i^{OC} = \frac{R_i^{МОНО}}{\tau_c^{МОНО}} \quad (11)$$

Скорости продольной релаксации ($R_i^{МОНО}$) и времена вращательной корреляции ($\tau_c^{МОНО}$) соответствующих мононуклеотидов взяты из работы [32].

Таким образом, в уравнении (10) остаются неизвестными τ_c^0 , E_a и V_i^{3C} . Для их определения использовали стандартную процедуру, основанную на минимизации:

$$\chi^2 = \sum_k \sum_i \left[\frac{R_i^{ЭКСП}(T_k) - R_i(T_k, E_a, \tau_c^0, V_i^{3C})}{\Delta R_i^{ЭКСП}} \right]^2 \quad (12)$$

где $\Delta R_i^{ЭКСП}$ — погрешность в измерении $R_i^{ЭКСП}$, равная $0,1 R_i^{ЭКСП}$; R_i рассчитывали по формуле (10). Имеющиеся экспериментальные данные не позволяют однозначно определить все три параметра V_i^{3C} , τ_c^0 и E_a , но лишь взаимосвязь между ними. На рис. 4 приведена зависимость V_i^{3C} от E_a на примере CpA, а на рис. 5 (кривая 1) — зависимость τ_c^0 от E_a . Эта однопараметрическая неоднозначность была устранена на следующем этапе анализа.

Состав закрытого состояния. На этом этапе анализа мы ставили перед собой задачу определения E_a и мольных долей ЗК, составляющих ЗС. Одним из возможных подходов к решению этой задачи является сравнение рассчитанных на предыдущем этапе из экспериментальных данных $V_i^{3C} = f(E_a)$ с теоретически ожидаемыми значениями $V_i^{3C} = f(p_j)$:

$$V_i^{3C}(E_a) = \sum_j p_j V_{ij}^{3C} \quad (13)$$

где p_j — мольная доля j -го ЗК, а V_{ij}^{3C} — теоретически ожидаемый (см. уравнение (6)) параметр для i -го протона j -го ЗК.

Учитывая ограниченный объем экспериментальных данных по CpA и большое число подлежащих анализу ЗК (от 10 для CpC до 34 для ApA),

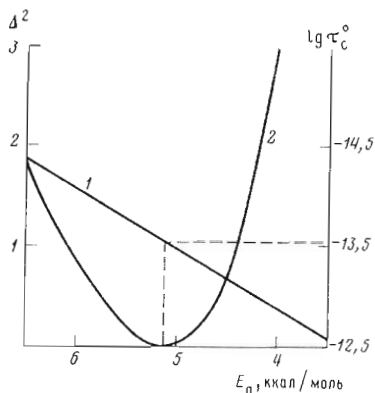


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость τ_c° (1) и Δ^2 (2) от E_a на примере СРА

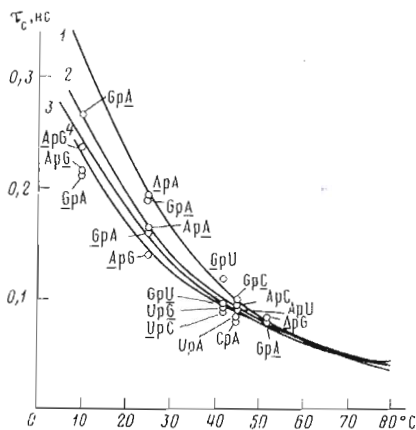


Рис. 6

Рис. 6. Рассчитанные в настоящей работе зависимости τ_c от температуры для АрА (1), СРА (2), АрС (3) и СРС (4) в сравнении с величинами τ_c , приведенными в литературе [34–37] (подчеркнута часть DNP, для которой определено τ_c)

кроме СР использовали также КССВ:

$$J_i^{3C} = \sum_j^1 p_j J_{ij}^{3K}, \quad (14)$$

где J_i^{3C} — экспериментальное значение i -й КССВ, приведенное к ЗС по уравнению (7), а J_{ij}^{3K} — теоретически ожидаемая величина i -й КССВ для j -го ЗК.

Здесь, на наш взгляд, следует более подробно объяснить, почему в дополнение к СР мы выбрали именно КССВ. Дело в том, что при несомненных преимуществах (наличие детальной теории, позволяющей определить межпротонные расстояния) релаксационные методики обладают одним существенным недостатком. Эти методики «близоруки». Поскольку релаксационные эффекты обратно пропорциональны шестой степени расстояния между ядрами, исследуемой протон «чувствует» изменения лишь в ближайшем окружении. В частности, в случае DNP с помощью одних лишь СР удастся определить только усредненную гликозидную конформацию мономерных единиц. Эффекты, связанные со стеклинг-взаимодействием и изменением конформации сахарофосфатного остова, обычно не превышают экспериментальной ошибки. Неудивительно, что для всех опубликованных к настоящему времени работ [34–37], посвященных изучению конформации DNP с помощью СР, характерно несоответствие между большим по объему и весьма трудоемким экспериментом и скудностью и неоднозначностью конформационных результатов. Очевидно, что полностью реализовать преимущества, заложенные в релаксационных методах, можно лишь с привлечением независимой информации о геометрии сахарофосфатного остова. Именно поэтому для анализа ЗС были использованы КССВ. В противоположность СР, КССВ не «видят» гликозидной конформации, но весьма чувствительны к изменению двугранных углов сахарофосфатного остова.

Анализ ЗС проводили, сравнивая правые и левые части уравнений (13) и (14). Кроме того, должны выполняться условия нормировки:

$$\sum_j^1 p_j = 1 \text{ и } 0 \leq p_j \leq 1. \quad (15)$$

Рассчитанные времена вращательной корреляции (τ_c) и энергии активации (E_a) для DNP в водном растворе, pH 7

DNP	$\tau_c^0 \cdot 10^{-10}$, с	$\tau_c^{298} \cdot 10^{-10}$, с	E_a , ккал/моль
СрС	5,32±0,1	1,32±0,12	4,63±0,15
СрА	3,03±0,06	1,70±0,14	5,11±0,15
АрС	3,07±0,06	1,43±0,12	5,00±0,15
АрА	0,66±0,015	1,99±0,16	6,11±0,15

Практически задача сводится к поиску минимума величины:

$$\Delta^2 = \sum_i \left(\sum_j p_j V_{ij}^{3K} - V_i^{3C}(E_a) \right)^2 + \lambda^2 \sum_i \left(\sum_j p_j J_{ij}^{3K} - J_i^{3C} \right)^2 + \mu^2 \left(\sum_j p_j - 1 \right)^2 \quad (16)$$

как функции p_j и E_a .

Вообще говоря, E_a и p_j зависят от λ и μ . Однако расчеты с $\lambda=1, 0,5$ и $0,25$ и $\mu=10, 100$ и 1000 обнаружили слабую зависимость E_a и p_j от λ и μ . Поэтому приведенные ниже результаты получены при фиксированных значениях $\lambda=1$ и $\mu=1000$, что соответствует равному весу СР и КССВ в формировании приближенного решения и практически точному выполнению условия нормировки (15).

Для решения этой задачи оказалась удобной программа численной минимизации функционалов методом линеаризации FUMILI [38]. Исследовали зависимость функции Δ^2 , минимизированной по параметрам p_j , от E_a . Полученные зависимости (рис. 5, 2) позволяют однозначно определить E_a , а значит, и τ_c^0 . Рассчитанные таким способом величины приведены в табл. 3.

Величины E_a и τ_c получены для наилучшего набора ЗК, и естественно, должны сильно зависеть от приближений модели. Возникает вопрос: насколько достоверны полученные нами величины или, другими словами, насколько адекватно принятая нами модель описывает конформационное поведение DNP?

Одну из возможностей проверки представляют имеющиеся в нашем распоряжении данные расчета теоретически ожидаемых СР для СрА. Для всех 22 стерически разрешенных ЗК V_5^{3K} менее чем на 10% отличаются от среднего значения $0,42 \cdot 10^{-10}$ с⁻². Таким образом, вне зависимости от того, какие конформеры и с каким относительным весом входят в ЗС, $V_5^{3C} = 0,42 \cdot 10^{-10}$ с⁻². Воспользовавшись приведенной на рис. 4 зависимостью, получаем для E_a величину 4,98 ккал/моль, которая в пределах ошибки совпадает с величиной E_a , рассчитанной на втором этапе (табл. 3).

К сожалению, литературные данные по E_a весьма ограничены. Так, в работе [33] для 5'-AMP величина E_a оценена в 6–7 ккал/моль. Единственной работой, в которой исследована зависимость τ_c DNP от температуры, является статья Чачати с сотр. [36]. Воспользовавшись приведенными в этой работе данными, мы рассчитали среднее значение E_a для АрС и СрА, которое оказалось равным $4,2 \pm 0,6$ ккал/моль, что удовлетворительно согласуется с данными табл. 3.

Как видно из рис. 6, известные из литературы величины τ_c для DNP удовлетворительно ложатся на рассчитанные в данной работе зависимости τ_c от температуры.

Наилучшие наборы ЗК, входящие в состав ЗС исследованных DNP, приведены в табл. 4.

Состав закрытого состояния. Рассмотрим сначала общие черты конформационного поведения изученных DNP. Согласно табл. 4, в растворе всех DNP преобладает «канонический» правозакрученный R^{ba} -конформер, обе нуклеотидные единицы которого имеют *анти*-конформацию нуклеино-

Состав закрытого состояния СрС, СрА, АрС и АрА в водном растворе при рН 7

DNP	ЗК	Относительный вес, %	ΔG^* , ккал/моль	$\Delta E_{\text{л.}}^*$, ккал/моль	Тип строения	Сахара **	Двугранные углы, град							ϕ^{**}			
							χ_1	δ_1^*	ϵ_1	ξ_1	α_2	β_2	γ_2		δ_2^*	χ_2	α_2^*
CpC	CpC-I	76	0,0	1,9	R ^{ba}	3-3	198	84	223	298	288	178	57	84	192	53	19
	CpC-II	14	1,0	2,9	L ^{bb}	3-3	209	84	187	57	77	193	74	84	225	-75	23
	CpC-III	10	1,2	0,0	L ^{bb}	3-2	219	84	193	58	152	152	53	143	112	-84	20
CpA	CpA-I	60	0,0	0,4	R ^{ba}	3-3	203	84	215	299	283	180	59	84	198	48	17
	CpA-II	16	0,8	0,3	R ^{ba}	3-2	214	84	195	285	286	188	71	143	252	7	28
	CpA-III	3	1,8	1,5	R ^{ba}	3-2	204	84	201	293	156	224	180	84	206	64	19
	CpA-IV	12	1,0	1,2	L ^{bb}	3-2	219	84	193	57	155	152	53	143	225	-85	13
	CpA-V	9	1,1	1,7	L ^{bb}	3-3	217	84	193	62	75	196	71	84	185	-64	27
ApC	ApC-I	75	0,0	0,0	R ^{ba}	3-3	182	84	224	298	288	179	55	84	194	54	4
	ApC-II	7	1,4	0,7	R ^{ba}	3-2	180	84	218	298	291	180	75	143	215	50	12
	ApC-III	7	1,4	1,6	L ^{bb}	3-3	223	84	179	46	92	187	66	84	186	89	20
	ApC-IV	6	1,5	0,6	L ^{bb}	3-2	226	84	189	56	153	152	54	143	211	87	17
	ApC-V	5	1,6	1,2	L ^{bb}	3-2	26	84	192	65	150	153	58	143	226	77	20
ApA	ApA-I	50	0,0	0,0	R ^{ba}	3-3	189	84	212	298	283	181	61	84	198	46	3
	ApA-II	6	1,3	0,6	R ^{ba}	3-2	183	84	213	298	289	181	77	143	218	45	10
	ApA-III	3	1,7	3,9	R ^{ba}	3-3	195	84	283	217	92	265	182	84	195	29	19
	ApA-IV	5	1,4	1,2	R ^{ba}	3-2	188	84	192	285	168	221	172	143	200	50	5
	ApA-V	2	1,9	4,4	R ^{ab}	2-2	197	143	272	89	85	234	189	143	56	52	34
	ApA-VI	3	1,7	1,6	R ^{ba}	2-3	196	143	278	96	73	222	181	84	234	54	6
	ApA-VII	2	1,9	2,2	R ^{ba}	2-3	55	143	267	286	281	148	54	84	265	73	37
	ApA-VIII	6	1,3	0,6	L ^{ba}	3-3	278	84	188	276	279	176	57	84	275	-16	15
	ApA-IX	3	1,7	0,2	L ^{ba}	3-2	284	84	189	280	284	184	62	143	313	-36	13
	ApA-X	8	1,1	1,1	L ^{ab}	3-3	33	84	187	60	85	153	58	84	216	-72	16
	ApA-XI	4	1,5	1,2	L ^{ab}	3-2	36	84	192	65	150	153	58	143	226	-77	20
	ApA-XII	4	1,5	1,5	L ^{bb}	3-2	230	84	190	57	153	153	55	143	223	-86	6
	ApA-XIII	4	1,5	2,2	L ^{bb}	3-3	229	84	181	48	89	187	69	84	191	-86	14

^{1a} Рассчитанная потенциальная энергия относительно оптимального ЗК [1]. ² - C^{2'}-эндио-3 - C^{3'}-эндио-3 - C^{3'}-эндио-3-конформации; первой приведена конформация рибозного пика Np-, второй - pN-части DNP. ^{3a} Конформационный расчет [1] проведен в приближении жесткой конформации рибозы (см. «Моменталтура»). ^{3b} Угол между гликозидной связью pN-части и проекцией гликозидной связи Np-части на плоскость основания pN-части. ^{4a} Угол между плоскостями оснований.

вого основания и $C3'$ -эндо-конформацию рибозного цикла. *гош*⁻-Конформация относительно P—O5'-связи (угол α_2) и *гош*⁻-конформация относительно O3'—P-связи (угол ξ_1) определяют геометрию фосфатной группы. Величина угла ϵ , (C3'—O3'-связь) лежит в пределах 212—224°. И наконец, связи O5'—C5' и C5'—C4' находятся в *транс*- и *гош*⁺-конформации соответственно. Угол спирального закручивания (α_z) изменяется от 46 для АрА-I до 54° для АрС-I. Интересно, что величина α_z полностью определяется природой 3'-концевого основания (рN-часть DNP). Изученные DNP четко разбиваются на две пары: СрС-I и АрС-I (α_z 53 и 54°) и СрА-I и АрА-I (α_z 48 и 46°). Угол спирального закручивания для наблюдаемых одноцепочечных ЗК заметно выше, чем для двухцепочечных (обычно 30—36°), что обеспечивает лучшее перекрывание оснований и большую энергию стекинг-взаимодействия. Этот результат согласуется с известным из литературы фактом, что одноцепочечные полирибонуклеотиды, такие, как poly(C) [39] и poly(m²'C) [40], имеют угол спирального закручивания, близкий к 60°, при сохранении канонической конформации сахарофосфатного остова.

Второй особенностью, общей для всех изученных DNP, является наличие в равновесной смеси неканонических ЗК. Эти минорные компоненты равновесия представляют особый интерес, поскольку позволяют оценить конформационные возможности полинуклеотидов.

Конформеры типа R^{ba}. Эти ЗК имеют канонический тип стекинг-контакта и *анти*-конформацию обоих нуклеиновых оснований. Они отличаются от канонического конформера либо конформацией сахара рN-части (C3'-эндо, C2'-эндо-сочетание конформации для СрА-II, АрС-II и АрА-II в табл. 4), либо *транс*-конформацией по C4'—C5'-связи (угол γ_2) (АрА-III), либо и тем и другим (СрА-III, АрС-III и АрА-IV).

Другие правозакрученные ЗК. Только в растворе АрА присутствуют правозакрученные конформеры, отличающиеся от канонического типом стекинг-контакта. Это ЗК типа R^{aa} и R^{ab}. В первых основание Np-части, а во вторых основания обеих частей димера перевернуты на 180° по сравнению с каноническим R^{ba}-типом. Для конформеров типа R^{aa} (АрА-VI и АрА-VII в табл. 4) характерно необычное C2'-эндо, C3'-эндо-сочетание конформаций рибозы. В АрА-VII оба основания находятся в *анти*-конформации, а углы ξ_1 и α_2 фосфатной группы лежат в области *гош*⁺. В АрА-VI *син*-конформация Np-части сочетается с *гош*⁻, *гош*⁻-конформацией фосфатной группы. Интересен конформер АрА-V (тип R^{ab}). По своим конформационным особенностям (*анти*, *син*-сочетание гликозидных конформаций, *гош*⁺, *гош*⁺-конформация фосфатной группы) он весьма близок к d(СрG)-последовательностям Z-формы [41].

Конформеры типа L^{bb}. Так же, как и канонические R^{ba}, конформеры типа L^{bb} реализуются в растворе всех изученных DNP (СрС-II, СрС-III, СрА-IV, АрС-III, СрА-V, АрС-IV, АрА-XII, АрА-XIII в табл. 4). Основание рN-части этих ЗК перевернуто на 180° по сравнению с каноническим *ba*-типом стекинга. Нуклеиновые основания обеих частей димера находятся в *анти*-конформации. Четко различимы два типа L^{bb}-конформеров. В одном C3'-эндо, C3'-эндо-сочетание конформаций рибозы коррелирует с *гош*⁺, *гош*⁺-конформацией фосфатной группы, в другом рибоза рN-части имеет C2'-эндо-конформацию, что сопровождается изменением конформации фосфатной группы *гош*⁺, *гош*⁺ (углы ξ_1 , α_2), характерной для первого типа, в *гош*⁺, *транс*. L^{bb}-конформация первого типа наблюдается в кристалле УрА [42].

Конформеры типа L^{ab}. Оба нуклеиновых основания конформеров этого типа повернуты на 180° по сравнению с R^{ba}-конформерами. L^{ab}-конформеры присутствуют только в растворе АрС и АрА (АрС-V, АрА-X, АрА-XI в табл. 4). Для них характерно *син*, *анти*-сочетание гликозидных конформаций и сахара либо в C3'-эндо, C3'-эндо-, либо в C3'-эндо, C2'-эндо-конформациях. Как и для L^{bb}-конформеров, в первом случае фосфатная группа имеет *гош*⁺, *гош*⁺-, а во втором — *гош*⁺, *транс*-конформацию. Конформация второго типа характерна для d(СрС)-последовательности Z-ДНК [41].

Возможные конформации димерного звена полирибонуклеотидов

Тип	Двугранные углы град				Под-тип	Гликозидные конформации		Конформация сахаров		Тип стейкинга	Последовательность *				
	ε ₁		α ₂			χ ₁	χ ₂	1	2						
	ε ₁	ε ₁ ⁻	α ₂	α ₂ ⁻											
I	транс 202(20)	гош ⁻ 288(10)	гош ⁻ 283(6)	транс 181(7)	гош ⁺ 62(10)	анти	анти	C3'-эндо	C3'-эндо	R ^{aa}	R-R, R-Y, Y-R, Y-Y				
												анти	анти	C2'-эндо	R-Y, Y-R, Y-Y
												высокая-анти	высокая-анти	C3'-эндо	Y-Y
												высокая-анти	высокая-анти	C2'-эндо	Y-Y
II	транс 186(6)	гош ⁺ 56(4)	гош ⁺ 83(9)	транс 192(5)	гош ⁺ 71(4)	анти	анти	C3'-эндо	C3'-эндо	L ^{bb}	R-R, R-Y, Y-R, Y-Y				
												син	анти	C3'-эндо	Y-R, Y-Y
III	транс 191(3)	гош ⁺ 60(5)	транс 152(2)	транс 153(1)	гош ⁺ 55(3)	анти	анти	C3'-эндо	C2'-эндо	L ^{bb}	R-R, R-Y, Y-R, Y-Y				
												син	анти	C3'-эндо	Y-R, Y-Y
IV	транс 197(4)	гош ⁻ 298(4)	транс 162(6)	транс 223(2)	транс 176(4)	анти	анти	C3'-эндо	C2'-эндо	R ^{ba}	R-Y, Y-Y				
V	гош ⁻ 273(5)	гош ⁺ 93(3)	гош ⁺ 79(6)	транс 228(6)	транс 185(4)	анти	анти	C2'-эндо	C3'-эндо	R ^{aa}	Y-Y				
												анти	син	C2'-эндо	R-Y, Y-Y
VI	гош ⁻ 267	гош ⁻ 286	гош ⁻ 281	транс 148	гош ⁺ 54	син	анти	C2'-эндо	C3'-эндо	R ^{aa}	Y-Y				
VII	гош ⁻ 283	транс 217	гош ⁺ 92	гош ⁻ 265	транс 185	анти	анти	C3'-эндо	C3'-эндо	R ^{ba}	Y-Y				

* R — пиримидиновый, Y — пуриновый, нуклеозид.

Конформация ЗК DNP или димерного звена полинуклеотидов по данным рентгеноструктурного анализа (РСА) или дисперсии рентгеновских лучей в ориентированных волокнах (ДРВ)

Структура	Димерное звено	Тип стейкинга	Сахара *	Двугранные углы								Метод	
				χ_1	δ_1	ε_1	ξ_1	α_2	β_2	γ_2	δ_2		χ_2
АрАрА+ [43]	АрА	R^{ba}	3-3	188	82	223	283	278	161	53	84	208	РСА
УрА [42]	УрА	L^{bb}	3-3	190	86	202	81	82	203	55	85	216	РСА
СрС [44]	СрС	R^{ba}	3-3	193	89	209	291	284	186	51	77	205	РСА
ДНК Z-I [41]	dCpdC	L^{ab}	3-2	68	99	256	291	223	221	56	138	201	РСА
	dCpdG	L^{ab}	2-3	201	138	266	80	47	179	195	99	68	
ДНК Z-II [41]	dCpdC	L^{ab}	3-2	62	94	181	55	146	164	66	147	212	РСА
	dCpdG	L^{ab}	2-3	212	147	260	74	92	193	157	94	62	
d(pApTpApT) [45]	dTpdA	R^{ba}	2-3	249	137	203	168	286	186	49	83	171	РСА
	dApdT	R^{ba}	3-2	171	83	212	284	301	171	64	139	255	
poly(C) [39]	СрС	R^{ba}	3-3	202	82	231	295	303	173	47	82	202	ДРВ
А-ГНК [46]		R^{ba}	3-3	202	82	207	289	292	178	54	82	202	ДРВ

* 3 — С3'-эндо- и 2 — С2'-эндо-конформация; первой приведена конформация угловидного цикла Np-, второй pN-части димера.

Конформеры типа L^{ba} . Реализуются только в растворе ApA (ApA-VIII и ApA-IX в табл. 4). Имеют канонический тип стекинг-контакта и каноническую конформацию сахарофосфатного остова. Переход из правой формы, характерной для канонических конформеров, в левую сопровождается увеличением гликозидного угла χ (оба основания находятся в *высокой-анти-конформации*).

Конформационные возможности полинуклеотидов. Проведенный в настоящем исследовании анализ конформационной ситуации в растворе DNP вместе с результатами предыдущих работ [2, 3, 22, 26] позволяет оценить конформационные возможности полирибонуклеотидов. Как видно из табл. 5, сахарофосфатный остов принимает конформации семи типов, причем внутри каждого типа возможны вариации конформаций рибозы и типа стекинг-контакта. Приведенные в табл. 5 димерные звенья могут служить основой регулярных (единица повторяемости — мононуклеотид), бирегулярных (единица повторяемости — динуклеотид) спиралей и структур еще более низкой регулярности (тетрарегулярных и т. д.). Тип Ia — каноническая конформация димерного звена — встречается в A-форме ДНК и РНК, в одноцепочечных полирибонуклеотидах и кристаллах двухцепочечных рибонуклеозидфосфатов (см. A-РНК, poly(C) и GpC в табл. 6). Такая конформация образует регулярную правую спираль, энергетически выгодную для любой нуклеотидной последовательности. Конформация Ib отличается от канонической лишь конформацией сахаров. Такую конформацию имеет последовательность d(ApT) в кристалле d(pApTpApT) (см. в табл. 6). Кроме двух правоспиральных конформаций при сохранении канонических углов сахарофосфатного остова могут существовать левоспиральные формы типа L^{ba} с сахарами в C3'-эндо-конформации (Iв) или с чередованием C3'-эндо- и C2'-эндо-конформаций рибозы (Iг). Поскольку все основания такой спирали находятся в *высокой-анти-конформации*, она может реализоваться лишь в случае полипуриновых последовательностей. Подробно левые спирали типа L^{ba} рассмотрены в одной из наших предыдущих работ [47].

Тип II сахарофосфатного остова отличается от канонической конформацией фосфатной группы: двугранные углы ξ_1 и α_2 лежат в области *gosh*⁺. Остов типа II всегда сочетается только с C3'-эндо-конформацией рибозы, но основания могут образовывать два типа стекинг-контакта — L^{bb} (IIa) и L^{ab} (IIб). В первом случае оба нуклеиновых основания находятся в *анти-конформации* (как видно из табл. 6, именно такую конформацию имеет в кристалле UrA), во втором случае основание 5'-концевого нуклеотида имеет *син-конформацию*. Именно поэтому тип IIa может реализоваться для любой нуклеотидной последовательности, а тип IIб — только для пурин-пиримидиновой и пурин-пуриновой.

Сахарофосфатный остов типа III отличается от типа II лишь конформацией P—O5'-связи (*транс-конформация*). Он также встречается в L^{bb} - и L^{ab} -типах стекинга, но всегда сочетается только с C3'-эндо, C2'-эндо-комбинацией сахаров. Конформация типа IIIб (L^{ab}) наблюдается для d(GpC)-последовательности Z-ДНК (см. табл. 6).

Характерной особенностью типов IV и VII является *транс-конформация* C4'—C5'-связи (угол γ_2).

Тип V сахарофосфатного остова близок к типу II (отличие составляет *транс-конформация* по углу γ_2). Интересно, что он всегда сочетается с C2'-эндо, C3'-эндо-комбинацией сахаров. Основания могут образовывать либо R^{aa} -тип (Va), либо R^{ab} -тип стекинг-контакта (Vб). Конформация типа Vб по своей геометрии весьма близка к d(CpG)-последовательности Z-ДНК (табл. 6). Конформации Vб и IIIб, поставленные одна за другой, образуют бирегулярную Z-подобную структуру, а конформации Va и IIIa — бирегулярную структуру, у которой каждое второе основание повернуто на 180° по сравнению с каноническим типом стекинга.

Анализ полученных результатов позволяет высказать очень важное, на наш взгляд, предположение.

С одной стороны, каноническая R^{ba} -форма реализуется для любой нуклеотидной последовательности и конформационные параметры этой

структуры слабо зависят от нуклеотидной последовательности, с другой — возможность реализации неканонических конформаций в значительной степени определяется нуклеотидной последовательностью (см. табл. 5).

Таким образом, различные специфические последовательности нуклеиновых кислот будут иметь близкие по геометрии канонические структуры, но принципиально различающиеся неканонические конформации. Такую возможность мы называем *конформационным кодированием*. Возможно, что специфическое белково-нуклеиновое узнавание осуществляется как раз на уровне неканонической конформации полинуклеотида. И хотя в растворе неканонические конформации энергетически менее выгодны, они могут стабилизироваться за счет взаимодействия с белковой молекулой.

Экспериментальная часть

Динуклеозидфосфаты были получены диэфирным методом по стандартной методике [22, 26]. Для очистки от парамагнитных ионов раствор пропускали через Chellex-100 (Na⁺-форма) (Bio-Rad, США), доводили pH до 7,2 и лиофилизировали. Навеску образца (20 мкмоль) и EDTA (2 мкмоль) растворяли в 1 мл 99,8% D₂O, лиофилизировали. Эту операцию повторяли еще раз, остаток растворяли в 0,7 мл 99,9% D₂O и помещали в ампулу диаметром 5 мм. Растворенный кислород удаляли вакуумированием объема над замороженным образцом до 10⁻⁴ мм рт. ст. с размораживанием в том же объеме (пять циклов), после чего ампулу запаивали в атмосфере инертного газа.

Спектры ЯМР снимали в импульсном режиме на спектрометре XL-100 (Varian, США) с фурье-преобразованием спада индуцированного сигнала на ЭВМ VDM 620L. Для измерения времен спи-решеточной релаксации T_1 использовали стандартную программу SSFT с импульсной последовательностью 180° — HSP — τ — 90°. Время задержки между импульсами τ варьировали в интервале 0,3—1,2 T_1 . Величины T_1 вычисляли в одноэкспоненциальном приближении методом наименьших квадратов на ЭВМ. Температуру измеряли с точностью $\pm 0,5^\circ$. Каждое измерение повторяли дважды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лысов Ю. П., Журкин В. Б., Тычинская Л. Ю., Флорентьев В. Л. Молекулярн. биология, 1979, т. 13, № 5, с. 1161—1187.
2. Бобрускин И. Д., Готтих Б. П., Крицын А. М., Лысов Ю. П., Покровская М. Ю., Тычинская Л. Ю., Флорентьев В. Л. Биофизика, 1980, т. 25, № 4, с. 774—788.
3. Покровская М. Ю., Лысов Ю. П., Тычинская Л. Ю., Флорентьев В. Л. Молекулярн. биология, 1980, т. 14, № 6, с. 1413—1419.
4. Crawford J. L., Koipak F. J., Quigley G. J., Wang A. H.-J., van Boom J. H., van der Marel G., Rich A. Nature, 1979, v. 282, № 5740, p. 680—686.
5. Флорентьев В. Л. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 7, с. 885—899.
6. Zimmerman S. B. Ann. Rev. Biochem., 1982, v. 51, p. 395—427.
7. Solomon I. Phys. Rev., 1955, v. 99, № 2, p. 559—565.
8. Noggle J. H., Schirmer R. E. In: The nuclear overhauser effect. Chemical Application / A. P. N. Y. — London, 1971.
9. Karplus M. J. Chem. Phys., 1959, v. 30, № 1, p. 11—19.
10. Davies D. B. Prog. NMR Spectrosc., 1976, v. 12, № 1, p. 135—225.
11. Haasnoot C. A. G., de Leeuw F. A. A. M., de Leeuw H. P. M., Altona C. Org. Magn. Reson., 1981, v. 15, № 1, p. 43—52.
12. Abbreviation and symbol for the description of polynucleotide chains. — Eur. J. Biochem., 1983, v. 131, № 1, p. 9—15.
13. Altona C., Sundaralingam M. J. Amer. Chem. Soc., 1972, v. 94, № 23, p. 8205—8212.
14. Pörschke D. Biochemistry, 1976, v. 15, № 7, p. 1495—1499.
15. Pörschke D. Biopolymers, 1978, v. 17, № 2, p. 315—323.
16. Pörschke D. Eur. J. Biochem., 1973, v. 39, № 1, p. 117—121.
17. Aubard J., Meyer J. J., Dubois J. E. Chem. Instrumentation, 1977, v. 8, № 1, p. 1—16.
18. Dewey T. G., Turner D. H. Biochemistry, 1980, v. 19, № 8, p. 1681—1685.
19. Powell J. T., Richards E. G., Gratzner W. B. Biopolymers, 1972, v. 11, № 2, p. 235—250.
20. Olsthoorn C. S. M., Bostelaar L. J., de Rooij J. F. M., van Boom J. H., Altona C. Eur. J. Biochem., 1981, v. 115, № 2, p. 309—321.
21. Olsthoorn C. S. M., Doornbos J., de Leeuw H. P. M., Altona C. Eur. J. Biochem., 1982, v. 125, № 2, p. 367—382.
22. Тычинская Л. Ю., Готтих Б. П., Крицын А. М., Лысов Ю. П., Щелкина А. К., Флорентьев В. Л. Молекулярн. биология, 1980, т. 14, № 5, с. 1159—1171.

23. Lee C.-H., Tinoco I. *Biochemistry*, 1977, v. 16, № 25, p. 5403-5414.
24. Dhingra M. M., Sarma R. H., Giessner-Prettre C., Pullman B. *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 26, p. 5815-5826.
25. Lee C.-H., Charney E., Tinoco I. *Biochemistry*, 1979, v. 18, № 25, p. 5636-5640.
26. Лысов Ю. П., Щелкина А. К., Тычинская Л. Ю., Флорентьев В. Л. *Молекулярн. биология*, 1978, т. 12, № 2, с. 443-455.
27. Hartel A. J., Lankhorst P. P., Altona C. *Eur. J. Biochem.*, 1982, v. 129, № 2, p. 347-357.
28. Olsthoorn C. S. M., Bostelaar L. J., van Boom J. H., Altona C. *Eur. J. Biochem.*, 1980, v. 112, № 1, p. 95-110.
29. Ezra F. S., Lee C.-H., Kondo N. S., Danyluk S. S., Sarma R. H. *Biochemistry*, 1977, v. 16, № 9, p. 1977-1987.
30. Lee C.-H., Ezra F. S., Kondo N. S., Sarma R. H., Danyluk S. S. *Biochemistry*, 1976, v. 15, № 16, p. 3627-3639.
31. de Leeuw F. A. A. M., Altona C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1982, p. 375-384.
32. Бобрускин И. Д., Кирпичников М. П., Покровская М. Ю., Флорентьев В. Л. *Био-орган. химия*, 1980, т. 6, № 8, с. 1163-1181.
33. Imoto T., Akasaka K., Hatano H. *Chem. Phys. Lett.*, 1975, v. 32, № 1, p. 86-89.
34. Chachaty C., Yokono T., Tran-Dinh S., Guschlbauer W. *Biophys. Chem.*, 1977, v. 6, № 1, p. 151-159.
35. Neumann J. M., Guschlbauer W., Tran-Dinh S. *Eur. J. Biochem.*, 1979, v. 100, № 1, p. 141-152.
36. Chachaty C., Perly B., Forchioni J., Langlet G. *Biopolymers*, 1980, v. 19, № 7, p. 1211-1239.
37. Tran-Dinh S., Neumann J. M., Borrel J. *Biochim. et biophys. acta*, 1981, v. 655, № 1, p. 167-180.
38. Нахождение минимумов функционалов методом линеаризации. Препринт ОИАИ, Д-810, Дубна, 1981.
39. Arnott S., Chandrasekaran R., Leslie A. G. W. *J. Mol. Biol.*, 1976, v. 106, № 4, p. 735-747.
40. Leslie A. G. W., Arnott S. *J. Mol. Biol.*, 1978, v. 119, № 3, p. 399-414.
41. Drew H. R., Dickerson R. E. *J. Mol. Biol.*, 1981, v. 152, № 4, p. 723-736.
42. Sussman J. L., Seeman N. C., Kim S.-H., Berman H. M. *J. Mol. Biol.*, 1972, v. 66, № 3, p. 403-421.
43. Suck D., Manor P. C., Saenger W. *Acta cryst. Sec. B*, 1976, v. B32, № 9, p. 1727-1737.
44. Rosenberg J. M., Seeman N. C., Day R. O., Rich A. J. *J. Mol. Biol.*, 1976, v. 104, № 1, p. 145-167.
45. Viswamitra M. A., Shakked Z., Jones P. G., Sheldrick G. M., Salisbury S. A., Kennard O. *Biopolymers*, 1982, v. 21, № 3, p. 513-533.
46. Arnott S., Chandrasekaran R., Hall I. H., Puigjaner L. C. *Nucl. Acids Res.*, 1983, v. 11, № 12, p. 4141-4155.
47. Лысов Ю. П., Журкин В. Б., Иванов В. И., Флорентьев В. Л. *Молекулярн. биология*, 1982, т. 16, № 5, с. 1063-1074.

Поступила в редакцию
27.III.1984

CONFORMATIONAL POSSIBILITIES OF POLYNUCLEOTIDES. PROTON SPIN-LATTICE RELAXATION STUDY OF ApA, ApC, CpA AND CpC CONFORMATION IN AQUEOUS SOLUTION

POKROVSKAYA M. Yu., LYSOV Yu. P., GNUCHEV N. V., FLORENTIEV V. L.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The temperature dependence of the spin-lattice relaxation rates of nucleic-base-protons and H1' of ApA, ApC, CpA and CpC was measured in D₂O at pH 7. On the basis of experimental data, including spin-spin coupling constants, the composition of the closed state was determined. Besides the right-handed «canonic» conformers, the «non-canonic» right- and left-handed conformers were shown to be present in the solution of all studied dinucleoside phosphates. Noteworthy, the «canonic» conformers are equally probable for all dimers, whereas the possibility of the realization of «non-canonic» conformers is determined by the nucleotide sequence. It may be expected that various nucleotide sequences should have different «non-canonic» conformations. Possible implication of «non-canonic» conformations in the protein-nucleic acid recognition is discussed.