



УДК 547.92:547.963.32:543.422.25

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА 3'- И 5'-ЭСТРОНОВЫХ ЭФИРОВ ТЕТРАНУКЛЕОТИДА ПО ДАННЫМ ДВУМЕРНОЙ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ И ОГРАНИЧЕННОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

© 1996 г. А. Ю. Денисов, Д. В. Пышный, И. А. Пышная, В. В. Васильев, Е. М. Иванова, В. Ф. Зарытова[#]

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 20.03.95 г.

Методом одно- и двумерной спектроскопии ^1H -, ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР исследовано пространственное строение тетрануклеотида с ковалентно присоединенным остатком эстрогена – по 3'- (pd(CAGC)p-EsS) или 5'-концевой фосфатной группе (EsS-pd(CAGC)). С использованием NOESY, ROESY, COSY и ^{13}C , ^1H -корреляционных спектров проведено отнесение всех сигналов в спектре ^1H -ЯМР указанных соединений. Найдено значительное уширение сигналов в спектре ^1H -ЯМР при комнатной температуре для 3'-производного тетрануклеотида по сравнению с его мононуклеотидным аналогом pdCp-EsS. С помощью метода молекулярной механики построено вероятное состояние данной молекулы, наилучшим образом удовлетворяющее экспериментальному набору межпротонных расстояний и величин торсионных углов. Совокупность результатов свидетельствует о существенном взаимодействии 3'-эстронового остатка с олигонуклеотидной цепью.

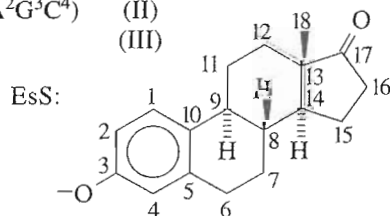
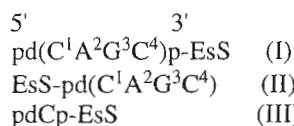
Ключевые слова: олигонуклеотиды, стероиды, эстроген, двумерный ЯМР, молекулярное моделирование.

Производные олигонуклеотидов широко рекомендовали себя как инструменты исследований многих молекулярно-биологических процессов, основанных на белково-нуклеиновом и нуклеино-нуклеиновом узнавании, протекаемых как *in vitro*, так и *in vivo* [1]. При этом большой интерес вызывают стероидные производные олигонуклеотидов, которые благодаря наличию в их структуре крупных гидрофобных группировок обладают повышенной способностью проникать в клетки и позволяют с большей эффективностью воздействовать на внутриклеточные нуклеиновые кислоты, в том числе НК вирусов [2]. Холестериновые производные олигонуклеотидов являются в настоящее время одними из наиболее эффективных агентов на основе олигонуклеотидов, подавляющих развитие ВИЧ в клетках [3, 4].

Однако введение в олигонуклеотид объемных стероидных остатков не может не сказываться на его свойствах. Изучение гибридизационных качеств стероидсодержащих олигонуклеотидов показало, что введение стероидных группировок по 5'-концевому фосфату не только не препятствует образованию комплементарных комплексов с ДНК-мишенями, но, напротив, приводит даже к увеличению стабильности таких комплексов. В то

же время соответствующая модификация 3'-концевых фосфатов вызывает некоторую дестабилизацию подобных комплексов, причем наиболее гидрофобный холестерин оказывает большее дестабилизирующее влияние, чем эстроген и тестостерон [5, 6]. Кроме того, недавно было показано, что введение двух и более остатков стероидов в различные олигонуклеотиды может в значительной степени способствовать стабилизации комплементарных комплексов, если при их образовании стероиды оказываются сближенными в пространстве [7 - 10].

С целью детального выяснения природы данных эффектов в настоящей работе в качестве первого шага изучена пространственная структура двух эфирных производных олигонуклеотида, несущих стероидный остаток эстрогена (EsS) на 3'- (I) или 5'-концевой (II) фосфатной группе:



[#] Автор для переписки.

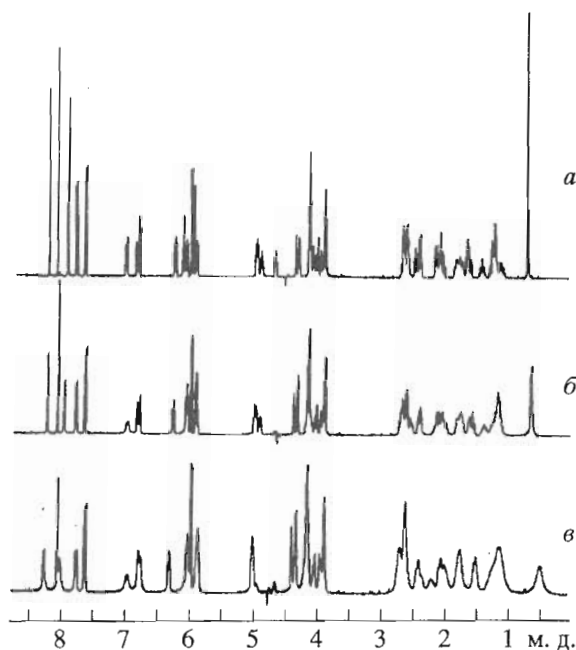


Рис. 1. Спектры ^1H -ЯМР соединения (I) при 45 (а), 35 (б) и 25°C (в). Спектры записаны с предварительным насыщением сигнала воды.

Общая методология проведения подобных исследований, включая обзор исследований, посвященных установлению пространственного строения олигонуклеотидных комплексов с ковалентно присоединенными к олигонуклеотидам разнообразными остатками, описана в работах [1, 11 - 14], что позволяет нам сразу перейти к изложению полученных в ходе работы результатов.

Исследование зависимости спектров ^1H -ЯМР от температуры. На первом этапе были изучены изменения в спектрах ^1H -ЯМР в диапазоне температур 25 - 50°C соединений (I) и (II) и (в качестве контроля) мононуклеотидного 3'-производного эстрона (III) в водном растворе при физиологических условиях (ионная сила 0.1 М, рН 7.0). При этом в спектрах соединений (II) и (III) существенных изменений, превышающих обычные температурные эффекты, практически не обнаружено, за исключением слабого уширения сигналов стероида на 1 - 3 Гц при понижении температуры в случае соединения (II).

Принципиально отличная от этого картина наблюдается для соединения (I) (рис. 1). Так, по сравнению с контрольным соединением (III) сигналы эстрона в соединении (I) (области 0.5 - 3.0 и 6.5 - 7.5 м. д.) при 25°C уширены на 7 - 20 Гц, а метильной группы - даже на 40 Гц. Также наблюдается смещение ряда сигналов в сильное поле, достигающее величины около 0.2 м. д. для метильной группы. Кроме того, в соединении (I) по сравнению с соединением (II) значительно уширяются (на 5 - 10 Гц) сигналы ароматических прото-

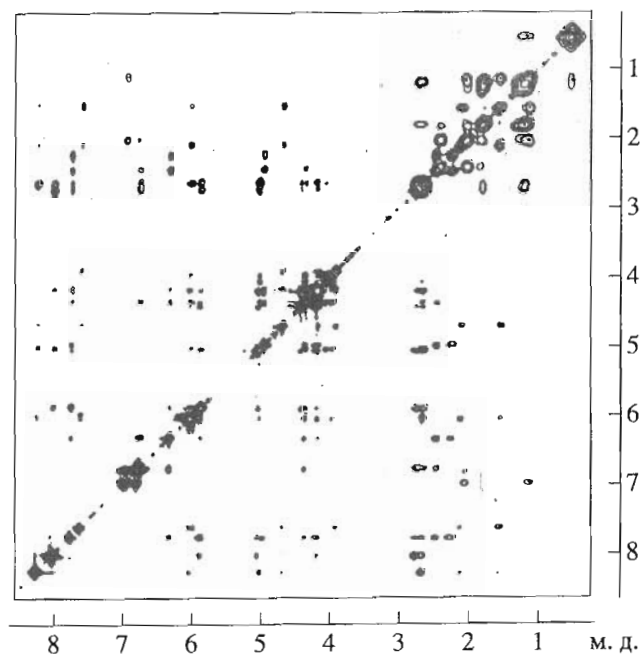


Рис. 2. Спектр NOESY ($\tau_m = 0.4$ с) соединения (I) при 25°C.

нов H6/H8 (область 7.5 - 8.5 м. д.) нуклеотидных оснований, кроме протонов остатка C' . Указанное поведение сигналов в спектре ^1H -ЯМР соединения (I) свидетельствует об ограничении подвижности эстрона в растворе вследствие, вероятно, его существенного взаимодействия с олигонуклеотидной цепью.

Отнесение сигналов необмениваемых протонов олигонуклеотида в двумерном спектре NOESY соединения (I) (рис. 2) проводили аналогично описанному в работах [11 - 13] по методике последовательного отнесения сигналов протонов для правозакрученных форм ДНК [1, 15 - 18], используя путь $(\text{H}2'\text{a}/\text{H}2'\text{b})_i - (\text{H}6/\text{H}8)_i - (\text{H}2'\text{a}/\text{H}2'\text{b})_{i-1}$ (рис. 3). Для отнесения сигналов протонов дезоксирибозы использовали также COSY-спектры. Данные представлены в табл. 1, там же приведены значения химических сдвигов ^{31}P , полученные с помощью анализа спектров ^{31}P -ЯМР с селективным подавлением протонов.

Для отнесения сигналов протонов эстрона в соединениях (I) - (III) помимо NOESY- и COSY-спектров использовали двумерную спектроскопию ^{13}C , ^1H -корреляций химических сдвигов, ибо в ряде случаев отнесение только на основании спектров ^1H -ЯМР стероида затруднено из-за перекрытия сигналов.

Химические сдвиги сигналов в спектрах ^{13}C -ЯМР эстрона соединений (I) - (III) различаются несущественно (менее чем на 0.5 м. д.), что позволяет легко провести их отнесение с помощью

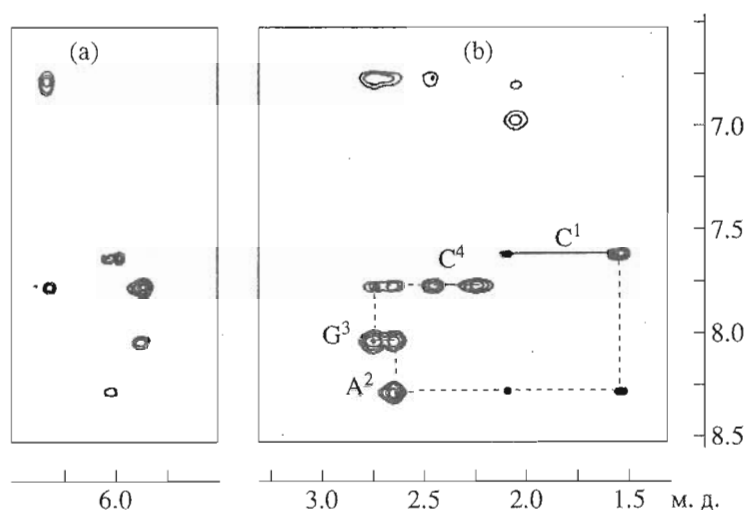


Рис. 3. Фрагменты спектра NOESY, представленного на рис. 2, содержащие области резонанса протонов H6/H8–H1'/H5 и H5/H8–H2'a/H2'b. Сплошными линиями соединены кросс-пики H6/H8–H2'a/H2'b для протонов одного нуклеотида, штриховой линией показан путь отнесения сигналов (H2'a/H2'b)_i – (H6/H8)_i – (H2'a/H2'b)_{i-1} для олигонуклеотида (*i* – номер нуклеотида). Символами (а) и (б) отмечены кросс-пики между H4(EsS)–H1'(C⁴) и H4(EsS)–H2'b(C⁴) соответственно.

литературных данных [19]. Использование результатов двумерных ¹³C, ¹H-корреляционных спектров ЯМР позволяет определить химические сдвиги сигналов всех протонов эстронов (рис. 4 и табл. 2). Отнесение α- и β-протонов H6, H7, H12, H15 и H16 выполнено на основе ROESY-эксперимента для соединения (III) и подтверждено анализом спектров гомоядерного двойного резонанса ¹H-ЯМР.

В результате в ROESY-спектре для соединения (III) обнаружены следующие кросс-пики: CH₃–H8, H11β, H12β, H15β и H16β; H8 – H6β, H7β и CH₃; H9 – H11α, H12α и H14, а также H14 – H9 и H15α.

Необходимость использования в случае соединения (III) ROESY-эксперимента вместо NOESY обусловлена практически нулевой величиной ядерного эффекта Оверхаузера (время τ_c близко к величине (5/4)^{1/2}ω⁻¹, равной в нашем случае 0.44 нс) согласно соотношениям (1) и (2) [17, 20]:

$$\sigma_{ij}^{\text{NOE}} = A\tau_c r_{ij}^{-6} (6/(1 + 4\omega^2\tau_c^2) - 1), \quad (1)$$

$$\sigma_{ij}^{\text{ROE}} = A\tau_c r_{ij}^{-6} (3/(1 + \omega^2\tau_c^2) + 2), \quad (2)$$

где σ_{ij} – скорость кросс-релаксации для протонов *i* и *j* (с⁻¹), τ_c – время корреляции, r_{ij} – расстояние

Таблица 1. Химические сдвиги сигналов ¹H и ³¹P для нуклеотидной части соединений (I)–(III) при 25°C (м. д.)

Нуклеотид	H6/H8	H5/H2	H1'	H2'a	H2'b	H3'	H4'	H5'a/H5'b	³¹ P*
Соединение (I)									
C ¹	7.60	5.96	6.02	1.52	2.09	4.67	4.16	3.90	1.99
A ²	8.25	8.04	6.01	2.63	2.63	5.00	4.33	3.95/4.05	-0.59
G ³	8.01	–	5.87	2.74	2.63	5.02	4.40	4.17	-0.60
C ⁴	7.75	5.85	6.31	2.22	2.43	4.95	4.35	4.17	-0.27
Соединение (II)									
C ¹	7.32	5.59	6.02	1.61	2.22	4.72	4.21	4.08	-4.07
A ²	8.25	8.06	6.08	2.62	2.69	4.97	4.36	3.96/4.07	-0.63
G ³	7.97	–	6.01	2.74	2.67	5.02	4.42	4.21	-0.64
C ⁴	7.72	5.81	6.26	2.25	2.36	4.56	4.15	4.12/4.23	-0.32
Соединение (III)									
C	7.94	6.10	6.30	2.20	2.30	4.94	4.32	3.99/4.03	2.24

* Представлены значения для 5'-фосфатных групп в соответствующих нуклеотидах; для 3'-фосфатных групп нуклеотида C⁴ в соединениях (I) и (III) значения равны -5.05 и -4.72 м. д. соответственно.

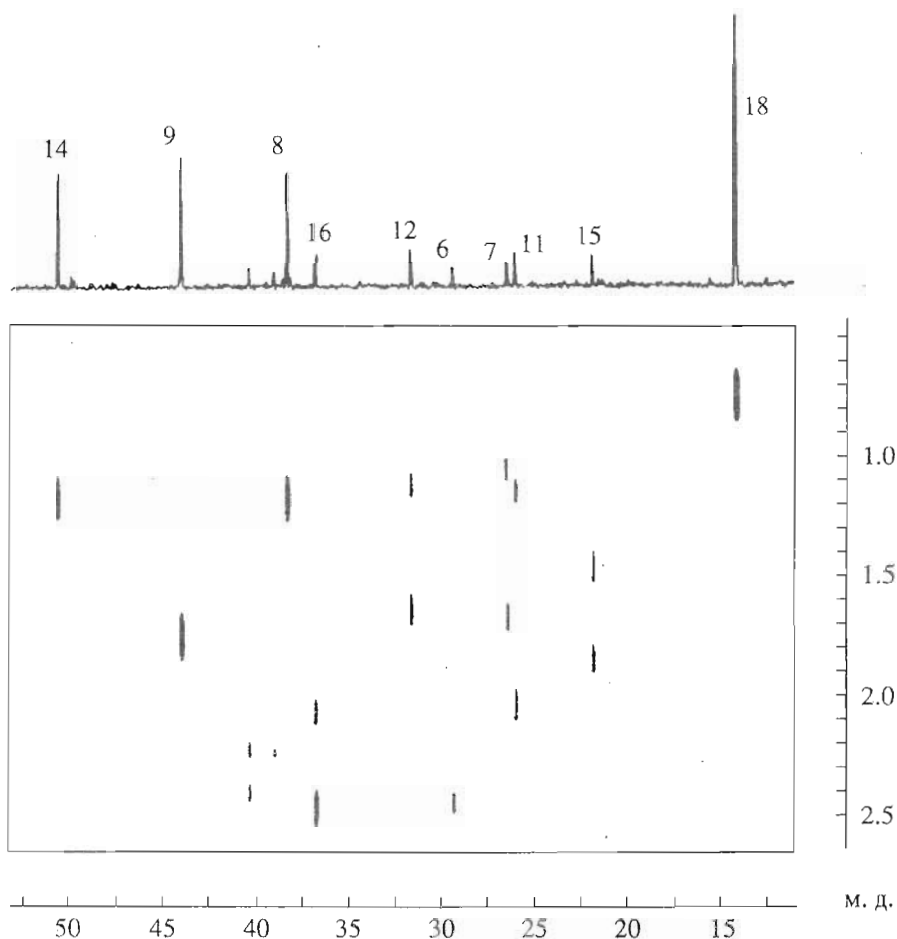


Рис. 4. Фрагмент двумерного ^{13}C , ^1H -корреляционного спектра для соединения (II) при 25°C в области резонанса алифатических атомов эстрона. Цифры на проекции спектра на ось химических сдвигов ^{13}C соответствуют нумерации атомов в эстроне.

между протонами, ω – рабочая частота спектрометра (рад/с), A – коэффициент, равный 5.70×10^{-50} ($\text{м}^6/\text{с}^2$).

Определение конформации дезоксирибозы. Конформационные состояния углеводных циклов изучаемых соединений можно определить с помощью констант спин-спиновой взаимодействия протонов дезоксирибозы, измеряемых в фазочувствительных спектрах COSY [1, 11 - 15]. Полученные значения констант $J_{\text{H-H}}$ (табл. 3) убедительно свидетельствуют о преимущественном *S*-типе (*2'*-эндо) конформации углеводных циклов дезоксирибозы. Так, согласно соотношению (3) из работы [21], доля фракции *S*-типа (*pS*) в нашем случае составляет около 80% и более, ибо сумма констант $J_{\text{C}^1-\text{H}^2\text{a}}$ и $J_{\text{C}^1-\text{H}^2\text{b}}$ изменяется в пределах от 14.4 до 15.5 Гц:

$$pS = 100\%(J_{\text{C}^1-\text{H}^2\text{a}} + J_{\text{C}^1-\text{H}^2\text{b}} - 9.8)/5.9. \quad (3)$$

Таким образом, следуя полученным результатам для правозакрученной формы тетрануклеотида и *2'*-эндо-конформации дезоксирибозы, можно пред-

полагать, что тетрануклеотид в соединениях (I) и (II) при комнатной температуре имеет конформацию, подобную *B*-форме ДНК.

Взаимодействие протонов эстрона с протонами олигонуклеотида и определение межпротонных расстояний. Анализ спектра NOESY соединения (I) показал, что наиболее сильные кросс-пики наблюдаются между ароматическим протоном $\text{H}4(\text{EsS})$ и протонами дезоксирибозы $\text{H}1'$, $\text{H}2'\text{b}$ соседнего нуклеотида C^4 (рис. 3). В то же время для соединения (II) отмечаются достаточно слабые взаимодействия для протонов $\text{H}2/\text{H}4(\text{EsS})$ с $\text{H}5'\text{a}/\text{H}5'\text{b}(\text{C}^1)$, $\text{H}4(\text{EsS})$ с $\text{H}6(\text{C}^1)/\text{H}2'\text{a}(\text{C}^1)$, соответствующие расстояниям более 3.5 Å согласно уравнению (4). Наряду со слабым уширением сигналов в спектре ^1H -ЯМР при понижении температуры до 25°C это свидетельствует о значительной подвижности эстрона в соединении (II), затрудняющей однозначное построение конформации этой макромолекулы. Поэтому пространственная структура моделировалась только для соединения (I).

Таблица 2. Химические сдвиги сигналов ^{13}C эстрона в соединении (III) и ^1H в соединениях (I) - (III) при 25°C (м. д.)

Атом	(III)		(I)	(II)	Атом	(III)		(I)	(II)
	^{13}C	^1H	^1H	^1H		^{13}C	^1H	^1H	^1H
1	127.5	7.24	6.95	6.86	11 α	26.2	2.31	2.02	2.02
2	118.4	6.99	6.78	6.71	11 β		1.34	1.11	1.13
3	150.5	-	-	-	12 α	31.8	1.37	1.10	1.10
4	121.1	6.96	6.74	6.58	12 β		1.79	1.52	1.62
5	139.6	-	-	-	13	49.4	-	-	-
6 α	29.7	2.85	2.72	2.47	14	50.6	1.42	1.15	1.16
6 β		2.79	2.63	2.39	15 α	22.0	1.99	1.80	1.83
7 α	26.7	1.29	1.16	1.05	15 β		1.58	1.26	1.44
7 β		1.92	1.77	1.66	16 α	36.8	2.18	1.99	2.04
8	38.5	1.45	1.15	1.15	16 β		2.52	2.38	2.44
9	44.2	2.10	1.77	1.73	17	229.6	-	-	-
10	136.9	-	-	-	18	14.2	0.82	0.52	0.72

 Таблица 3. Константы спин-спинового взаимодействия (Гц) ^1H - ^1H и ^{31}P - ^1H в дезоксирибозе соединений (I) - (III)*

Соединение	Нуклеотид	$^3J_{\text{H-H}}$					$^3J_{\text{H3-P}}$
		1'-2'a	1'-2'b	2'a-3'	2'b-3'	3'-4'	
(I)	C ¹	9.7	5.5	5.5	1.0	3.0	6.0
	A ²	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	5.0**
	G ³	9.8	5.5	5.5	1.5	3.5	6.0
	C ⁴	9.2	5.9	7.0	1.5	2.5	7.0
(II)	C ¹	8.9	5.5	5.0	1.5	3.5	6.5
	A ²	9.8	5.3	5.5	1.0	2.5	5.0
	G ³	9.3	5.5	5.5	1.5	3.0	6.0
	C ⁴	8.8	5.9	6.5	4.0	3.0	-
(III)	C	8.8	5.6	6.1	2.0	2.0	7.0

* $^2J_{2'a-2'b}$ равны 14.0 Гц.

** Протонные константы в нуклеотиде A² соединения (I) не определены из-за совпадения химических сдвигов H2'a и H2'b, однако сумма констант ($J_{1'-2'a} + J_{1'-2'b}$) = 15.5 Гц; константа $^3J_{\text{H3-P}}$ измерена в спектре ^{31}P -ЯМР.

Согласно соотношению (1), величина скорости кросс-релаксации для сближенных в пространстве протонов молекулы пропорциональна величине r_{ij}^{-6} , что позволяет определять межпротонные расстояния при прочих равных условиях с помощью соотношения (4) [1, 15 - 18]:

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

используя известные расстояния r_{kl} между базисной парой протонов k и l и измеряя экспериментальные величины скоростей σ из серии одномерных ^1H -ЯМР NOE-экспериментов [11 - 13, 22]. В качестве таких известных величин r_{kl} нами использованы расстояния между H5 и H6 в цитидинах и между H1 и H2 в ароматическом кольце э-

трона, которые приблизительно принимались равными 2.5 Å. Очевидно, что соотношения типа (4) выполнимы лишь в случае сравнимых по величине времен корреляции τ_c для различных частей молекулы.

Для выяснения данного вопроса нами были определены значения τ_c для базисных пар протонов согласно уравнению (1). Они оказались равны 0.8 и 1.2 нс для пары H5-H6 в остатках C¹ и C⁴ соответственно, 1.6 нс для H1-H2 в эстроне соединения (I), а также 0.7 - 0.9 нс для перечисленных пар в соединении (II). Сопоставление времен корреляции в рамках одной макромолекулы свидетельствует о большей подвижности в соединении (I) основания C¹, нежели C⁴, что, видимо, отражается в различной степени уширения их протонных

Таблица 4. Расстояния между протонами (r_{ij} , Å) в соединении (I)

H_i-H_j	r_{ij}	
	Эксперимент	Расчет (S(EsS)3)
H6-H1' (C ¹)	3.5	3.7
H6-H2'a (C ¹)	2.5	2.5
H1'-H2'b (C ¹)	2.4	2.4
H8-H1' (A ²)	3.7	3.9
H8-H2'a (A ²)	2.4	2.5
H1'-H2'b (A ²)	2.4	2.3
H8-H1' (G ³)	3.6	3.8
H8-H2'a (G ³)	2.4	2.5
H1'-H2'b (G ³)	2.4	2.4
H6-H1' (C ⁴)	3.5	3.7
H6-H2'a (C ⁴)	2.4	2.3
H1'-H2'b (C ⁴)	2.4	2.4
H8(A ²)-H2'b (C ¹)	3.6	3.4
H8(G ³)-H2'b (A ²)	3.2	3.1
H6(C ⁴)-H2'a (G ³)	3.4	3.4
H6(C ⁴)-H2'b (G ³)	3.0	2.9
H4(EsS)-H1' (C ⁴)	3.1	3.1
H4(EsS)-H2'b (C ⁴)	3.3	3.2

Таблица 5. Величины торсионных углов ϵ (град) в соединении (I)

Остаток	ϵ	
	Эксперимент	Расчет (S(EsS)3)
C ¹	200	192
A ²	195	186
G ³	200	189
C ⁴	207	221

Таблица 6. Относительная энергия и другие параметры для оптимальных конформаций соединения (I)

Параметр	Конформация			
	S(EsS)1	S(EsS)2	S(EsS)3	S(EsS)4
Энергия,* ккал/моль	29	14	0	-5
ϵ (C ⁴) _{экс} , град	0	120	207	272
ϵ (C ⁴) _{расч} , град	-6	150	221	278
$r_{H6\beta(EsS)-H1'}$ (C ⁴), Å	2.6	4.0	3.9	2.3

* Рассчитана относительно энергии структуры S(EsS)3; приведенные значения не включают энергию геометрического штрафа.

сигналов H6 при комнатной температуре (рис. 1). Кроме того, полностью подтверждается вывод о меньшей подвижности стероида в соединении (I), нежели в соединении (II). Также сопоставление величин τ_c с ранее известными величинами для цитидинов в составе дуплексов [12] указывает на их 2-4-кратное уменьшение в случае свободного олигонуклеотида.

Для расчета межпротонных расстояний в соединении (I) в качестве базисных пар протонов с фиксированным расстоянием использовали: H5-H6 (C¹) для внутринуклеотидных расстояний в остатке C¹, H5-H6 (C⁴) для остальных внутри- и межинуклеотидных расстояний в тетра- и тринуклеотиде и H1-H2 (EsS) для расстояний между протонами эстроны и концевого цитидина C⁴. Полученные расстояния (табл. 4), соответствующие наиболее сильным взаимодействиям (во избежание эффектов спиновой диффузии), дополнительно подтверждают наличие конформации олигонуклеотида, подобной B-форме [16], в то время как расстояния между протонами H4(EsS)-H1'(C⁴) и H4(EsS)-H2'b(C⁴) близки к величине 3 Å.

Пространственную структуру соединения (I) в растворе получили с помощью молекулярного моделирования методом ограниченной молекулярной механики AMBER [23], используя найденный набор межпротонных расстояний и ограничения на торсионные углы ϵ между (C4'-C3'-O-P), определенные по величине констант $^3J_{H3-P}$ (табл. 3) с помощью соотношений из работ [15, 24] (табл. 5). Для всех нуклеотидов, кроме C⁴, выбран B₁-тип конформации фосфатной группы ($\epsilon = 195^\circ - 200^\circ$), а для угла ϵ в остатке C⁴ в качестве возможных выбраны четыре средние величины: 0° , 120° , 207° и 272° .

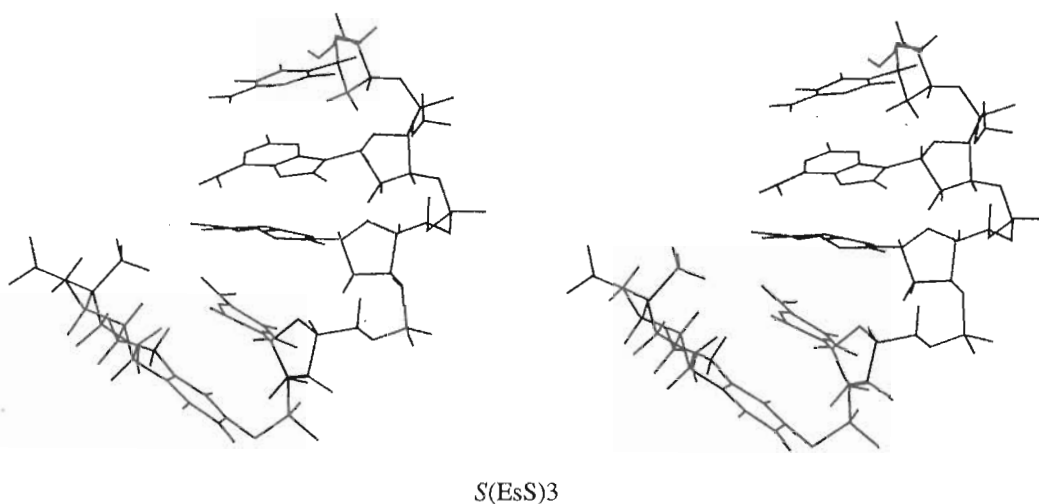
Оптимизацию проводили по функционалу, который является суммой полной энергии и штрафа за отклонение расчетных значений расстояний и углов от измеренных экспериментально. Энергию штрафа учитывали с помощью уравнений (5) и (6):

$$E_r = C_r(r_{ij} - r_{ij}^0)^2, \quad (5)$$

$$E_\epsilon = C_\epsilon(1 - \cos(\epsilon - \epsilon^0)), \quad (6)$$

где значения коэффициентов C_r выбраны 29, 13 и 7.5 ккал/(моль Å²) для измеренных r_{ij}^0 в диапазоне менее 2.6, 2.6-3.4 и более 3.4 Å соответственно (согласно [22]), а C_ϵ взято равным 30 ккал/моль. В качестве начальной структуры олигонуклеотида выбрана B-форма ДНК с 2'-эндо-конформацией дезоксирибозы.

Из полученных в результате расчета четырех возможных структур (табл. 6) конформации S(EsS)1 и S(EsS)2 энергетически невыгодны,



S(EsS)3

Рис. 5. Стереопара конформации S(EsS)3 соединения (I), полученной в результате оптимизации структуры методом молекулярной механики с учетом ограничений из данных ЯМР.

причем отклонение угла ϵ (C^4) в структуре S(EsS)2 от начального достигает 30° , что противоречит экспериментальной величине константы $^3J_{H\beta-p}$ (табл. 3). Структуры S(EsS)3 и S(EsS)4 лежат в пределах возможных отклонений для расчетов энергии (± 5 ккал/моль). Однако в структуре S(EsS)4 имеется малое расстояние (2.3 Å) между $H\beta(EsS)$ и $H1'(C^4)$, которое, по данным эксперимента, не может быть менее 3.7 Å. Таким образом, единственной наиболее вероятной конформацией соединения (I), обладающей низкой энергией и правильно описывающей все экспериментальные результаты, является структура S(EsS)3.

В структуре S(EsS)3 (рис. 5; табл. 4, 5) стероидный остаток ориентирован по направлению к олигонуклеотидной цепи, что, вероятно, способствует их взаимодействию. Очевидно, что построенная конформация является усредненной. Отметим также, что расстояние между протонами метильной группы эстрогена и ближайшими протонами NH_2 -группы (G^3) в структуре S(EsS)3 составляет 6.5 Å. При этом нет существенных энергетических ограничений для уменьшения этого расстояния до 3 - 4 Å.

Полученные для соединения (I) результаты свидетельствуют о взаимодействии стероидного остатка эстрогена с олигонуклеотидной цепью. Одна из возможных причин этого взаимодействия – гидрофобные свойства эстрогена, стремящегося к меньшему сольватационному окружению. В случае соединения (II) гидрофобных свойств стероида недостаточно для образования существенного контакта с тетра-нуклеотидом, например, из-за менее благоприятной геометрии макромолекулы или большей гибкости и длины цепочки, соединяющей стероид с циклом дезоксирибозы. Увеличе-

ние гидрофобности стероида должно приводить, вероятно, к более сильным контактам с олигонуклеотидной цепью.

Действительно, замена в соединении (I) эстронового остатка на холестерин приводит к уширению всех сигналов в спектре 1H -ЯМР при комнатной температуре и образованию сразу нескольких усредненных конформаций макромолекулы в растворе (данные будут опубликованы). При этом также наблюдается взаимодействие протонов холестерина с протоном $H2$ основания A^2 , что прямо свидетельствует о взаимодействии стероида с удаленными нуклеотидными звеньями.

Полученные данные по влиянию остатков стероидов, введенных по 3'-концевой фосфатной группе олигонуклеотида, на структуру макромолекулы способствуют лучшему пониманию свойств алкилирующих производных этого тетра-нуклеотида [10]. Так, при изучении модификации 20-звенного олигодезокси-нуклеотида 5'-алкилирующими производными $pd(CAGC)_p$ и его 3'-эстронового или 3'-холестеринового эфиров в присутствии эффекторов (дифеназиновых производных олигонуклеотидов) обнаружено [10], что введение в реагент на основе тетра-нуклеотида остатка эстрогена понижает его способность модифицировать мишень с 44 до 20%, а введение холестерина – до 6%. Такое падение активности, вероятно, связано с формированием «клубкообразной» структуры данных макромолекул, вызванным наличием остатка стероида, что может влиять на процесс взаимодействия реагента с мишенью. Таким образом, результаты настоящей работы дают полезную информацию, которую необходимо учитывать при конструировании ген-направленных реагентов на основе стероидсодержащих олигонуклеотидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез олигонуклеотидных производных (I) и (II), а также соединения (III) аналогичен представленному в работе [10]. Образцы для записи спектров ЯМР приготавливали по методике, описанной ранее [11]. Концентрация соединений (I) и (II) в D₂O (99.96%) – около 25 мМ, (III) – 40 мМ, буферный раствор содержал 0.1 М NaCl, 10 мМ NaD₂PO₄, 10 мкМ натриевую соль EDTA (рН 7.0).

Спектры ЯМР получены на спектрометре AM-400 (Bruker, ФРГ) с рабочей частотой 400.13 МГц для протонов. Все спектры, за исключением исследования зависимостей спектров ЯМР от температуры, получены при 25°C. Используются стандартные программы накопления фазочувствительных спектров NOESY ($\tau_m = 0.2$ и 0.4 с), COSY-DQF, а также двумерных ¹³C,¹H-корреляционных спектров (настройка на величину $^1J_{C-H} = 125$ Гц). Фазочувствительные спектры ROESY получены с помощью методики [25] ($\tau_m = 0.2$ с, $\gamma B_1/2\pi = 2$ кГц; 8000 импульсов $\beta = 18^\circ$ длительностью 2 мкс с задержкой между ними $\tau = 23$ мкс). Ширина протонных спектров 4000 Гц, размер матрицы данных для накопления в NOESY-, ROESY- и COSY-экспериментах – 512 × 2К, в ¹³C,¹H-корреляционных экспериментах – 128 × 8К для направлений t_1 и t_2 соответственно, задержка на релаксацию между накоплениями – 2.5 с, количество накоплений – 128 в протонных и 640 в гетероядерных экспериментах. В ходе двумерного фурье-преобразования для NOESY- и ROESY-спектров использовали фильтрацию с помощью квадратичной функции косинуса в обоих направлениях, коррекцию базовой линии и последующую симметризацию спектров относительно диагонали. Размер двумерных спектров после фурье-преобразования составлял 2К × 2К для NOESY и ROESY, 1К × 8К для COSY- и ¹³C,¹H-корреляционных спектров по направлениям f_1 и f_2 соответственно.

Химические сдвиги протонов измерены относительно сигнала внутреннего стандарта 3 мМ 4,4-диметил-4-силапентансульфоната натрия (DSS; $\delta_H = 0.015$ м. д.), ¹³C – относительно сигнала внешнего стандарта диоксана ($\delta_C = 67.4$ м. д., при этом сигнал стандарта DSS наблюдается при -1.8 м. д.), ³¹P – в слабом поле относительно внешнего стандарта 85% Н₃Р₄. Точность определения химических сдвигов ¹H и ³¹P – 0.01, ¹³C – 0.1 м. д., констант J_{C-H} и $J_{H-P} - 1.0$ Гц, за исключением $J_{C-2a,b} - 0.5$ Гц.

Для определения величины NOE в одномерных ¹H-ЯМР-экспериментах проводили селективное облучение низкой мощностью на частоте выбранного резонанса и вне резонанса. Время облучения равнялось 0.2 с, задержка между импульсами – 5 с. Разностный спектр получали, вычитая

из спектра, полученного с насыщением тестируемого сигнала, спектр без насыщения. Практически линейный участок зависимости NOE от времени облучения до 0.2 с соответствует приближению начальной скорости, что проверяли построением полной кривой NOE в диапазоне 0.1 - 1.0 с.

Расчет пространственной структуры проводили по программе ограниченной молекулярной механики AMBER [23] версии 4.0, предоставленной профессором Р.А. Kollman и адаптированной для персонального компьютера в нашем институте. Атомные заряды для фосфатного производного эстрона рассчитаны квантово-химическим методом AM1 [26] с использованием методологии работы [27].

Работа осуществлена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Lebedev A.V., Fedorova O.S. *Desing and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives*. Boca Raton: CRC Press, 1994.
2. Буторин А.С., Власов В.В., Гуськова Л.В., Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Кобец Н.Д., Райт А.С., Юрченко Л.В. // Молекуляр. биология. 1989. Т. 23. С. 1382 - 1390.
3. Letsinger R.L., Zhang G., Sun D.K., Ikeuchi T., Sarin P.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6553 - 6556.
4. Abramova T.V., Blinov V.M., Vlassov V.V., Gorn V.V., Zarytova V.F., Ivanova E.M., Konevets D.A., Plyasunova O.A., Pokrovsky A.G., Sandakhchiev L.S. // Nucleosides and Nucleotides. 1991. V. 10. P. 419 - 422.
5. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Часовских М.Н. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. С. 610 - 616.
6. Ivanova E.M., Amirkhanov N.V., Zarytova V.F. // Coll. Czech. Chem. Commun. 1990. V. 55. P. 217 - 220.
7. Letsinger R.L., Chaturvadi S.K., Farooquri F., Salunkhe M. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 7535 - 7536.
8. Gryaznov S.M., Lloid D.H. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 5909 - 5915.
9. Pyshnyi D.V., Pyshnaya I.A., Lokhov S.G., Ivanova E.M., Zarytova V.F. // Nucl. Acids Sympos. Ser. 1994. V. 31. P. 115 - 116.
10. Пышный Д.В., Пышная И.А., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // Биооргани. химия. 1995. Т. 21. С. 709 - 716.
11. Биченкова Е.В., Воробьев Ю.Н., Кутявин И.В., Лебедев А.В., Мальцева Т.В., Тэннэ Е.Ю. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. С. 1236 - 1258.
12. Bichenkova E.V., Gorenstein L.A., Denisov A.Yu., Lebedev A.V., Illangasekare N., Gorenstein D.G. // Appl. Magn. Reson. 1994. V. 7. P. 55 - 70.
13. Maltseva T., Sandstrom A., Ivanova E.M., Sergeyev D.S., Zarytova V.F., Chattopadhyaya J. // J. Biochem. Biophys. Methods. 1993. V. 26. P. 173 - 236.

14. Maltseva T.V., Agback P., Repkova M.N., Venyaminova A.G., Ivanova E.M., Sandstrom A., Zarytova V.F., Chattopadhyaya J. // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 5590 - 5599.
15. Hosur R.V., Govil G., Miles H.T. // Magn. Reson. Chem. 1988. V. 26. P. 927 - 944.
16. Wuthrich K. NMR of Proteins and Nucleic Acids. N.Y.: John Wiley, 1986.
17. Neuhaus D., Williamson M.P. Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis. N.Y.: VCH, 1989.
18. Gronenborn A.M., Clore G.M. // Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 1985. V. 17. P. 1 - 33.
19. Kalinowski H.O., Berger S., Braun S. Carbon-13 NMR Spectroscopy. Chichester: John Wiley, 1988.
20. Kessler H., Gehrke M., Griesinger C. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1988. V. 27. P. 490 - 536.
21. Rinkel L.J., Altona C. // J. Biomolec. Struct. Dyn. 1987. V. 4. P. 621 - 649.
22. Nigles M., Clore G.M., Gronenborn A.M., Piel N., McLaughlin L.W. // Biochemistry. 1987. V. 26. P. 3734 - 3744.
23. Weiner S.J., Kollman P.A., Case D.A., Singh U.C., Ghio C., Alagona G., Profeta S., Weiner P. // J. Am. Chem. Soc. 1984. V. 106. P. 765 - 784.
24. Kim S.G., Lin L.J., Reid B.R. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 3564 - 3574.
25. Kessler H., Griesinger C., Kerssebaum R., Wagner K., Ernst R.R. // J. Am. Chem. Soc. 1987. V. 109. P. 607 - 609.
26. Dewar M.J.S., Zebisch E.G., Healy E.F., Stewart J.J.P. // J. Am. Chem. Soc. 1985. V. 107. P. 3902 - 3909.
27. Vasilyev V.V., Bliznyuk A.A., Voityuk A.A. // Int. J. Quant. Chem. 1992. V. 44. P. 897 - 930.

Spatial Structures of 3'- and 5'-Estrone Esters of Tetranucleotide Refined by Two-Dimensional NMR Spectroscopy and Restrained Molecular Modeling

A. Yu. Denisov, D. V. Pyshnyi, I. A. Pyshnaya, V. V. Vasil'ev,
E. M. Ivanova, and V. F. Zarytova¹

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

Abstract—The spatial structure of a tetranucleotide with an estrone residue covalently linked to the 3'-terminal phosphate [pd(CAGC)p-EsS] or 5'-terminal phosphate [EsS-pd(CAGC)] was studied by one- and two-dimensional ¹H, ¹³C, and ³¹P NMR spectroscopy. The proton resonances were assigned by using NOESY, ROESY, COSY, and ¹³C, ¹H-correlation spectra. The proton resonances in the ¹H NMR spectrum at room temperature for the 3'-estrone derivative of the tetranucleotide were significantly broadened compared with its mononucleotide analog pdCp-EsS. A probable structure of this molecule that best fit the experimental set of interproton distances and torsion angles was simulated using the restrained molecular mechanics. The results suggest a considerable interaction between the 3'-estrone residue and the oligonucleotide chain.

Key words: oligonucleotides, steroids, estrone, two-dimensional NMR, molecular modeling.

¹ To whom correspondence should be addressed.