



УДК 547.963.3 : 543.422.23

ИССЛЕДОВАНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОГО ПОЛОЖЕНИЯ ОСНОВАНИЯ И САХАРНОГО КОЛЬЦА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ЦИТИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ МЕТОДОМ ЯДЕРНОГО ЭФФЕКТА ОВЕРХАУЗЕРА

Карнейский М. Я., Яковлев Г. И.

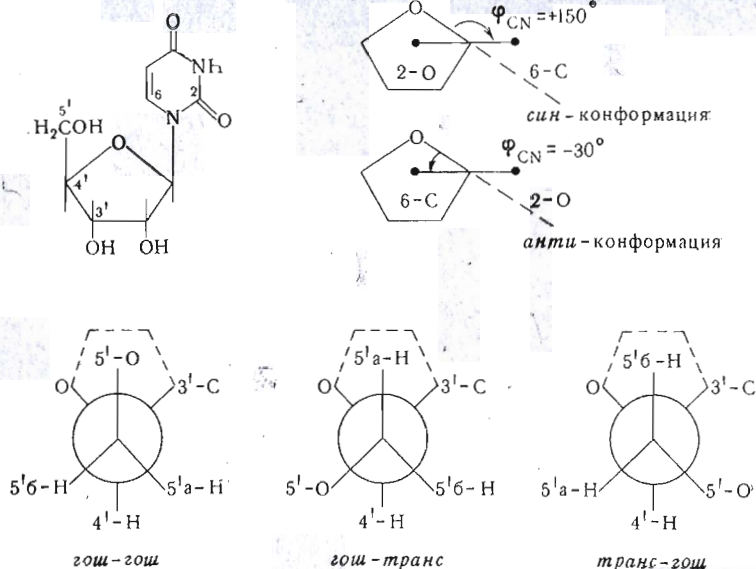
Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР, Пушкино

Методом ядерного эффекта Оверхаузера изучено взаимное положение оснований и сахарного кольца в водных растворах цитидиновых нуклеотидов. Показано, что для цитидина и цитидин-5'-фосфата преобладающей является *анти*-конформация основания, а для цитидин-2'-фосфата, цитидин-3'-фосфата и цитидин-2',3'-циклофосфата преобладает *син*-конформация. Сделан вывод, что основной вклад в изменение свободной энергии этих нуклеотидов при *син* — *анти* переходах вносит изменение энтропии.

Конформационные состояния нуклеозидов и нуклеотидов в водных растворах интенсивно исследуются в последние десять лет в связи с рядом биохимических проблем. Определенные успехи в этом направлении достигнуты за счет использования метода ЯМР [1—20]. Изучаемые детали структуры включают геометрию сахарного кольца, экзоциклических групп и относительное расположение основания, характеризуемое торсионным гликозидным углом (см. схему). При этом для анализа геометрии сахарного кольца, экзоциклической 5'-СН₂ОН и фосфатной групп используется зависимость вицинальных констант спин-спинового взаимодействия $J_{\text{H-C-C-H}}$ и $J_{\text{H-C-O-P}}$ от соответствующих двугранных углов. Для определения взаимного расположения гетероциклического основания и сахарного кольца используется ряд подходов. Для нуклеозидов пиримидинового ряда и их фосфорных эфиров общий вывод состоит в том, что в растворе существует равновесие между *син*- и *анти*-конформерами, которое зависит от структуры основания, природы растворителя и температуры. Однако выводы о преобладании того или иного конформера иногда базируются на экспериментальных данных, допускающих неоднозначную интерпретацию. Характерным примером могут служить работы по использованию влияния фосфатной или гидроксильной группы в положении 5' на химический сдвиг 6-Н протона пиримидинового цикла для определения преобладающей конформации относительно гликозидной связи.

В работах [1, 2] было показано, что в случае 5'-нуклеотидов 6-Н протон пиримидинового цикла испытывает специфическое дезэкранирующее влияние ионизованной 5'-фосфатной группы, что может служить доказательством реализации *анти*-конформации для указанных нуклеотидов.



Аналогичное влияние кислорода экзоциклической 5'-CH₂ОН группы показано для пиримидиновых нуклеозидов в работе [4]. Вывод о том, что нуклеозиды и 5'-нуклеотиды в водных растворах находятся преимущественно в анти-конформации, основывается на температурной зависимости химических сдвигов протонов 6-Н [5]. Предполагалось, что сдвиг в сильное поле протонов 6-Н при увеличении температуры обусловлен уменьшением доли анти-конформера, 6-Н протон которого испытывает дезэкранирующее влияние 5'-CH₂ОН группы. В работе [18] на основании сдвига в сильное поле протонов 6-Н цитидин-3'-фосфата и уридин-3'-фосфата при увеличении температуры и отсутствия подобного сдвига для 2',3'-циклофосфатов был сделан вывод о том, что преимущественная конформация цитидин- и уридин-3'-фосфата есть анти-конформация, а для цитидин- и уридин-2',3'-циклофосфата — син.

Однако температурная зависимость наблюдаемых химических сдвигов протонов 6-Н определяется как изменением соотношения анти- и син-конформеров, так и доли гош-гош-ротамеров 5'-CH₂ОН группы (относительно экзоциклической C_{4'}—C_{5'}-связи). Для нециклических нуклеотидов конформация гош-гош, т. е. состояние, в котором проявляется специфический эффект дезэкранирования 5'-CH₂ОН группой, является преобладающей [5, 10, 18] и приближается к равновесной (33%) с повышением температуры [10]. Для 2',3'-циклофосфатов пиримидиновых нуклеозидов доля гош-гош-ротамеров близка к равновесной уже при комнатной температуре [13, 18]. Это обстоятельство необходимо учитывать при интерпретации данных температурной зависимости. Вследствие небольшой величины барьера вращения вокруг C_{4'}—C_{5'}-связи уменьшение дезэкранирования 6-Н протона основания из-за уменьшения доли гош-гош-ротамеров должно вносить основной вклад в температурную зависимость химического сдвига 6-Н протона. Таким образом, сдвиг в сильное поле сигналов указанного протона не обязательно отражает изменение равновесия син-анти конформеров.

Определенные преимущества для конформационных исследований имеет использование ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) [11, 12, 22—25]. Величина ЯЭО, определяемая как относительное изменение интегральной интенсивности линии ЯМР, соответствующей одному из ядер молекулы при насыщении линии другого ядра, обратно пропорциональна шестой степени расстояния между ядрами [21]. Это позволяет использовать ЯЭО

для изучения геометрии молекул в растворах [11, 12, 22—25]. Так, например, методом ЯЭО показано, что 2',2'-О-изопропилиденуридин в диметилсульфоксиде существует преимущественно в *син*- [11], а 5'-галоидуридины — в *анти*-конформации [12].

В данной работе метод ЯЭО используется для изучения взаимного расположения основания и сахарного кольца в водных растворах цитидина, цитидин-2'-фосфата, цитидин-3'-фосфата, цитидин-5'-фосфата и цитидин-2',3'-циклофосфата. Интерес к подобному исследованию с нашей стороны был обусловлен изучением специфичности и механизма действия рибонуклеазы, субстратами и ингибиторами которой являются указанные соединения.

В распространенной методике для определения относительного изменения интенсивности некоторой линии d при насыщении линии s , т. е. величины ЯЭО $f_d(s)$, линия d регистрируется при медленном сканировании через соответствующую область спектра при уровнях радиочастотного поля, отвечающих отсутствию эффектов насыщения. Величина $f_d(s)$ определяется как отношение площадей линии d при насыщении линии s и в его отсутствие. Для повышения точности измерений ЯЭО проводятся многократные измерения с последующим усреднением полученных значений [11, 12, 23]. Точность таких определений величин ЯЭО недостаточна при значениях ЯЭО ниже 10%. Недавно было показано, что при достаточной стабильности резонансных условий ЯЭО можно регистрировать, измеряя амплитуду сигнала, а не его интегральную интенсивность [24]. В работах [26, 27] при обсуждении условий измерения ЯЭО отмечалось, что определенные преимущества должен иметь метод INDOR. С целью повышения точности измерений величин ЯЭО мы также использовали амплитудные измерения, осуществлявшиеся аналогично методу INDOR: фиксировалась частота наблюдения линии d , а область линии s сканировалась изменением частоты. Накопление изменений интенсивности в наших экспериментах при прохождении определенных участков спектра ЯМР позволило значительно повысить точность измерений ЯЭО.

Определение величины ЯЭО между двумя ядрами молекулы, представленными в спектре мультиплетами, но несвязанными между собой скалярным спин-спиновым взаимодействием, проводилось следующим образом. Измерялось изменение интенсивности одной из линий мультиплета при насыщении линий другого мультиплета, и общая величина ЯЭО определялась как сумма фракционных изменений интенсивности при прохождении каждой линии второго мультиплета.

Очевидно, что такое суммирование правомерно в случае невязких жидкостей и при отсутствии перекрывания между собой линий насыщаемого мультиплета. Величина ЯЭО, получаемая насыщением протона 6-Н гетероциклического основания, была одинаковой для различных линий мультиплетов, представлявших 1'-Н, 2'-Н и 3'-Н протоны рибозного кольца цитидина и его фосфорных эфиров. Таким образом, экспериментально регистрируемое изменение интенсивности одной из линий мультиплета в данном случае представляло собой величину ЯЭО для соответствующего протона. Правомерность такого подхода была установлена нами при исследовании веществ с большими абсолютными значениями ЯЭО. Величины ЯЭО, полученные измерением интегральных интенсивностей и описываемым в статье способом, оказались одинаковыми для растворов пиридоксаминфосфата в *d*-пиридине и $^2\text{H}_2\text{O}$.

Величины радиочастотного насыщающего поля выбирались следующим образом. Определялась оптимальная величина радиочастотного поля, при которой интенсивность линий, насыщаемых в экспериментах по ЯЭО, максимальна при записи ЯМР спектра образца. При проведении экспериментов по ЯЭО найденное значение увеличивалось примерно в 5 раз; дальнейшее увеличение радиочастотного поля не изменяло величину ЯЭО. Результаты измерений величин ЯЭО для протонов рибозного кольца при на-

Значения ЯЭО для протонов сахарного кольца и экзоциклической группы $\text{C}_2\text{H}_2\text{OH}$ при насыщении линии протонов 6-Н в водных растворах нуклеотидов *
 Для всех нуклеотидов $f_{4'}(6) \approx 0$; pH 5,5; 34°

Соединение	$f_{1'}(6)$	$f_{2'}(6)$	$f_{3'}(6)$	$f_{5'a}(6)$	$f_{5'b}(6)$
Цитидин	0,140	0,092	0,061	0,009	0,016
Цитидин-5'-фосфат	0,061	0,097 *		0,006	0,014
Цитидин-2'-фосфат	0,127	0,052	$\leq 0,003$	$\leq 0,002$	$\leq 0,002$
Цитидин-3'-фосфат	0,102	0,050	$\leq 0,004$	$\leq 0,002$	$\leq 0,002$
Цитидин-2',3'-дифосфат	0,175	0,040	$\leq 0,004$	$\leq 0,002$	$\leq 0,002$

* Линии протонов 2'-Н и 3'-Н в спектре ЯМР перекрываются; приведенный результат относится к суммарной линии этих протонов.

сыщении линий протонов 6-Н основания представлены в табл. 1. Видно, что значения $f_{3'}(6)$ и $f_{5'b}(6)$ для цитидина и цитидин-5'-фосфата заметно отличаются от аналогичных величин для цитидин-2'-фосфата, цитидин-3'-фосфата и цитидин-2',3'-дифосфата. Поскольку измеряемые нами величины ЯЭО определяются расстоянием между протоном 6-Н основания и протонами 5'-Н, 2'-Н, и 3'-Н рибозного кольца, то очевидно, что минимальное взаимодействие должно наблюдаться для трех последних соединений. Следовательно, вероятность нахождения этих соединений в *анти*-конформации, когда рассматриваемые протоны пространственно сближены, должна быть минимальной. Точная количественная интерпретация экспериментов по ЯЭО для нуклеотидов затруднительна ввиду многообразия реализующихся в растворе конформационных состояний рибозного цикла и конформаций экзоциклических заместителей — группы $\text{C}_2\text{H}_2\text{OH}$ и гетероциклического основания. Для оценки вероятности пребывания изученных соединений в *син*- и *анти*-состояниях ($P_{\text{син}}$ и $P_{\text{анти}}$) мы использовали метод расчета, аналогичный тому, который был применен для интерпретации результатов измерения ЯЭО водных растворов гуанозинмонофосфатов [24]. Согласно этому методу вероятность нахождения гуанозинмонофосфата в *син*-конформации определяется выражением:

$$P_{\text{син}} = \frac{3f_8(1')}{3f_8(1') + f_8(2') + f_8(3')},$$

где $f_8(i')$ — величина ЯЭО для протона 8-Н гуанозина при насыщении линии i' -го протона рибозного кольца. Коэффициенты при $f_8(i')$ определяются отношением минимальных расстояний ($r_{i, \text{мин}}$) между 8-Н и i -Н, достигаемых при вращении вокруг гликозидной связи. Величины минимальных расстояний определялись из рассмотрения молекулярных моделей. В работе [24] было показано, что значения $r_{i, \text{мин}}$, взятые из молекулярных моделей и рассчитанные с использованием полученных вероятностей из выражения $\langle r_i \rangle^{-6} \approx r_{i, \text{мин}} \cdot P_{\text{син}}$, близки между собой. Следовательно, предложенный авторами метод расчета дает надежные результаты применительно к изучаемому классу веществ. В приведенной формуле величина $\langle r_i \rangle$ представляет собой среднее во времени значение расстояния между протонами 8-Н и i -Н. Численное значение этой величины для гуанозина и его фосфорных эфиров было найдено из экспериментально измеренных величин ЯЭО по формуле

$$\langle r_i \rangle^{-6} = f_8(i) / \gamma^4 \hbar^2 \tau_c,$$

где γ — гиромагнитное отношение протонов, \hbar — постоянная Планка, τ_c — время корреляции для диполь-дипольного взаимодействия меж-

Значения вероятностей $P_{\text{син}}$ и отношений $P_{\text{син}}/P_{\text{анти}}$ для нуклеотидов цитидинового ряда в водных растворах при pH 5,5 и 34°, вычисленные по величинам ЯЭО (в скобках даны значения вероятностей $P_{\text{син}}$ с учетом предельно возможных значений $f_{3'}$ (6), допускаемых ошибкой измерений)

Соединение	Плоская конформация рибозы		3'-эндо-конформация рибозы	
	$P_{\text{син}}$, %	$P_{\text{син}}/P_{\text{анти}}$	$P_{\text{син}}$, %	$P_{\text{син}}/P_{\text{анти}}$
Цитидин	35	0,54	21	0,27
Цитидин-5'-фосфат *	10	0,11	19	0,23
Цитидин-2'-фосфат	95	19	95	19
	(≥ 81)		(≥ 83)	
Цитидин-3'-фосфат	95	19	95	19
	(≥ 73)		(≥ 83)	
Цитидин-2',3'-циклофосфат	98	49	98	49
	(≥ 83)		(≥ 90)	

* Значения $f_{2'}(6) = 0,13$ и $f_{3'}(6) = 0,06$ были приняты путем сравнения $f_{3'a}(6)$ и $f_{3'b}(6)$ для цитидина и цитидин-5'-фосфата.

ду протонами 8-Н и 1'-Н, 2'-Н, 3'-Н. Для рассматриваемого нами случая

$$P_{\text{син}} = \frac{r_{1'-6} \cdot f_{1'}(6)}{\sum_{i'=1',2',3'} r_{i'-6} \cdot f_{i'}(6)}, \quad \text{а } P_{\text{анти}} = 1 - P_{\text{син}}.$$

Значения $r_{i'-6, \text{мин}}$ были определены для двух моделей: с плоской и 3'-эндо-конформациями сахара. Для построения модели с плоской конформацией сахара использовались рентгеноструктурные данные для цитидин-2',3'-циклофосфата [28]. Модель с 3'-эндо-конформацией получалась из предыдущей за счет вывода из плоскости сахарного кольца атома 3'-С на 0,35 Å. При этом были найдены следующие отношения межатомных расстояний:

- 1) $r_{1'-6, \text{мин}} : r_{2'-6, \text{мин}} : r_{3'-6, \text{мин}} = 1,91 : 1,33 : 2,72$,
- 2) $r_{1'-6, \text{мин}} : r_{2'-6, \text{мин}} : r_{3'-6, \text{мин}} = 1,91 : 1,33 : 2,40$.

Для определения влияния конформации рибозы на конечный результат мы провели расчет вероятности син- и анти-состояний как по той, так и по другой модели для каждого соединения. Результаты представлены в табл. 2. Видно, что различия между двумя моделями мало сказываются на результатах расчета вероятностей.

Модель с плоским рибозным кольцом должна быть более адекватна для цитидина и его монофосфорных эфиров в растворе, для которых показано существование набора равновероятных конформаций рибозного цикла, находящихся в быстром динамическом равновесии, и преобладание *gauche-gauche*-конформации относительно $C_4'-C_5'$ -связи (см. табл. 3 и 4 и данные работы [18]). Для цитидин-2',3'-циклофосфата преобладающей конформацией в растворе является 3'-эндо (см. табл. 3 и данные работы [13]) и соответственно для этого соединения более подходящей должна быть вторая модель.

Из табл. 2 видно, что для цитидин-2'-фосфата, цитидин-3'-фосфата и цитидин-2',3'-циклофосфата син-конформация является преобладающей, тогда как для цитидина и цитидин-5'-фосфата основной является анти-конформация.

Анализ данных ЯЭО можно провести более детально подобно тому, как это сделано в работах [11, 12]. Для этого следовало бы сопоставить

Константы спин-спинового взаимодействия протонов цитидиновых нуклеотидов и соответствующие двугранные углы при рН 5,5 и 3,4°

Величины двугранных углов рассчитывали согласно уравнению [25]:
 $J_{m,n} = J_0 \cos^2 \Phi_{m,n} - 0,28$, где $J_0 = 9,27$ Гц для $0^\circ < \Phi < 90^\circ$ и $J_0 = 10,36$ Гц для $90^\circ < \Phi < 180^\circ$

Соединение	$J_{1'-2'}$, Гц	$\Phi_{\text{H}-1-\text{C}-1-\text{C}-2'-\text{H}-2'}$, °	$J_{2'-3'}$, Гц	$\Phi_{\text{H}-2'-\text{C}-2'-\text{C}-3'-\text{H}-3'}$, °	$J_{3'-4'}$, Гц	$\Phi_{\text{H}-3'-\text{C}-3'-\text{C}-4'-\text{H}-4'}$, °	$J_{5'a-5'b}$, Гц	$J_{4'-5'a}$, Гц	$J_{4'-5'b}$, Гц
Цитидин	3,8	129	6,0	38	5,2	137	12,5	2,9	3,9
Цитидин-5'-фосфат*	3,4	127	—	—	—	—	—	—	—
Цитидин-2'-фосфат	5,4	139	5,4	40	4,9	135	12,7	3,1	4,4
Цитидин-3'-фосфат	4,2	131	5,5	41	4,6	139	13,0	3,0	3,8
Цитидин-2',3'-циклофосфат	2,4	120	6,8	29	5,1	136	12,5	3,7	5,2

* Кроме $J_{1'-2'}$ другие константы не определялись.

Таблица 4

Вероятности *гош-гош*-(P_1), *гош-транс*-(P_2), *транс-гош*-(P_3) ротамеров относительно $C_{(4')}-C_{(5')}$ -связи и *гош-гош*-ротамеров относительно $C_{(5')}-O_{(5')}$ -связи (P_4) в процентах

Вероятности рассчитывались согласно работе [20] по константам $J_{5'a-5'b}$, $J_{4'-5'a}$ и $J_{4'-5'b}$, приведенным в табл. 3

Соединение	P_1 , %	P_2 , %	P_3 , %	P_4 , %
Цитидин	65	23	12	96
Цитидин-5'-фосфат	56*	—	—	82*
Цитидин-2'-фосфат	57	30	13	86
Цитидин-3'-фосфат	65	22	13	96
Цитидин-2',3'-циклофосфат	39	39	22	84

* По данным работы [20].

экспериментально полученные величины ЯЭО с теоретически рассчитанными. Для теоретического расчета необходимо использовать следующие формулы [23]:

$$f_d(s)_i = \sum_s \frac{\gamma_s}{2\gamma_d} \cdot \frac{\rho_{ds}(i)}{R_d} - \sum_j \frac{\gamma_j}{2\gamma_d} \cdot \frac{\rho_{dj}(i)}{R_d} f_j(s)_i,$$

$$f_d(s) = \sum_i P_i f_d(s)_i,$$

где индекс d относится к наблюдаемому ядру, s — к насыщаемому ядру, j — к другим ядрам молекулы; i относится к конформации с определенным гликозидным углом; P_i — вероятность конформации с данным гликозидным углом,

$$\rho = \gamma_d^2 \cdot \gamma_s^2 \hbar^2 \tau_{c(d,s)} / r_{(d,s)}^6;$$

R_d — вероятность релаксационных процессов в системе спинов d при отсутствии корреляций их движений [23].

Ввиду того, что определенному значению $f_d(s)$ отвечает ряд значений $f_d(s)_i$ при различных P_i , соответствие между теоретическими и эксперимен-

тальными величинами ЯЭО достигается в довольно большой области значений гликозидных торсионных углов. При $i \geq 2$ получаемая информация носит по существу качественный характер. Поэтому мы провели сравнение, используя зависимости $f_{1'}$ (6), $f_{2'}$ (6) и $f_{3'}$ (6) от гликозидного торсионного угла, рассчитанные в работе [11] для 2,3-О-изопропилиденуридина. Такой подход тем более допустим, что геометрические параметры нашей 3'-С-эндо-модели близки к параметрам модели, использованной в [11]. Поскольку в этой работе результаты приведены для определенного значения релаксационного параметра R_d , мы провели сравнение отношений $f_{i'}$ (6), а не самих значений $f_{i'}$ (6). Оказалось, что для цитидин-2'-фосфата, цитидин-3'-фосфата и цитидин-2',3'-циклофосфата имеется хорошее соответствие между экспериментальными данными и рассчитанными для $P_i \approx 1$ и $\varphi_{CN} \approx 150^\circ$. Для цитидина и цитидин-5'-фосфата экспериментальные результаты не соответствуют теоретическим при $P_i \approx 1$ во всей области возможных значений φ_{CN} , т. е. необходимо задаваться по крайней мере двумя значениями P_i . Очевидно, в этом случае получаемые значения φ_{CN} могут иметь только ориентировочное значение.

С целью получения сведений о термодинамике конформационных переходов при вращении вокруг гликозидной связи была изучена температурная зависимость ЯЭО. Было найдено, что для водных растворов цитидин-2'-фосфата, цитидин-3'-фосфата и цитидин-2',3'-фосфата в диапазоне температур 34—80° при рН 5,5 отношение

$$r_{1'-6}/r_{1'}(6) / \sum_{i'=1',2',3'} r_{i'-6}/r_{i'}(6)$$

не изменяется в пределах экспериментальных ошибок. Это указывает на то, что основным вкладом в изменение свободной энергии этих систем при *син-анти*-переходах является изменение энтропии. Действительно

$$\begin{aligned} \Delta G^0 &= -RT \ln K = -RT \ln (P_{\text{син}}/P_{\text{анти}}), \\ \ln (P_{\text{син}}/P_{\text{анти}}) &= -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}, \\ \ln (P_{\text{син}}/P_{\text{анти}})_{t=34-80^\circ} &\approx \text{const} \\ \text{при } \frac{\Delta H^0}{RT} &\ll \frac{\Delta S^0}{R}. \end{aligned}$$

Определяющее влияние энтропийного члена свободной энергии позволяет объяснить изменение конформации цитидин-3'-фосфата при переходе к твердому состоянию, для которого характерной является *анти*-конформация [29, 30]. Кристаллизация цитидин-3'-фосфата из водных растворов сопровождается уменьшением энтропии на 8,28 кал/моль·град [31]. Напротив, для цитидин-2',3'-циклофосфата, имеющего *син*-конформацию как в водных растворах, так и в кристалле [28], процесс кристаллизации сопровождается увеличением энтропии на 8,22 кал/моль·град [31].

Экспериментальная часть

В работе использовали хроматографически чистые образцы цитидина, цитидин-2'-фосфата, цитидин-3'-фосфата, цитидин-5'-фосфата и цитидин-2',3'-циклофосфата. Образцы для анализа методом ЯМР приготавливали в виде 0,1 М растворов нуклеотидов в D₂O, содержащих ЭДТА в концентрации 0,01 М. Необходимое значение рН устанавливали добавлением DCl или NaOD. Измерения рН проводили непосредственно в ампулах с образцами с помощью специально изготовленных микроэлектродов на рН-метре ЛПУ-01 (СССР). Дегазирование образцов не производили. Для того чтобы предотвратить поглощение H₂O из воздуха, ампулы герметизировали после измерения рН образца. В качестве внутреннего стандарта

использовали *трет*-бутанол в количестве $\sim 2\%$ по объему. Все измерения спектров ЯМР проводили на спектрометре HA-100D («Varian», США). Для сравнения величин химических сдвигов, полученных в данной работе, с опубликованными ранее данными к экспериментальным значениям химических сдвигов прибавляли 1,62 м. д. Эта величина соответствует значению химического сдвига *трет*-бутанола в образцах, измеренному относительно тетраметилсилана как внешнего стандарта. Отнесение линий в спектрах ЯМР исследованных соединений проводили методом INDOR и сопоставлением с литературными данными. Эксперименты по ЯЭО проводили следующим образом. От вспомогательного генератора звуковой частоты Muirhead 890-B (США) подавали напряжение на катушки модуляции и фазовый детектор аналитического канала спектрометра. Частота модуляции соответствовала резонансной частоте линии, изменение интенсивности которой за счет ЯЭО измеряли. Остальная область спектра медленно сканировалась при высоком уровне радиочастотного поля генератором частотной развертки спектрометра. Полученный таким образом спектр ЯЭО (для связанных спин-спиновым взаимодействием ядер — спектр INDOR) либо непосредственно регистрировали на бланке, либо накапливали с помощью накопителя C-1024 («Varian», США). Дополнительная модернизация спектрометра позволила проводить сканирование при накоплении любого по ширине участка спектра независимо от ширины общего диапазона развертки.

Авторы благодарны С. М. Дудкину, любезно предоставившему хроматографически чистые образцы нуклеотидов, использованных в данной работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schweizer M. P., Broom A. D., Ts'o P. O. P., Hollis D. P. (1968) J. Amer. Chem. Soc., 90, 1042—1055.
2. Danyluk S. S., Hruska F. E. (1968) Biochemistry, 7, 1038—1043.
3. Smith I. T. P., Blackburn B. J., Yamane T. (1969) Can. J. Chem., 47, 513—515.
4. Prestegard J. H., Chan S. I. (1969) J. Amer. Chem. Soc., 91, 2843—2852.
5. Blackburn B. J., Grey A. A., Smith I. C. P., Hruska F. E. (1970) Can. J. Chem., 48, 2866—2870.
6. Hruska F. E., Grey A. A., Smith I. C. P. (1970) J. Amer. Chem. Soc., 92, 4088—4094.
7. Hruska F. E., Smith I. C. P., Dalton J. G. (1971) J. Amer. Chem. Soc., 93, 4334—4336.
8. Hruska F. E. (1971) Can. J. Chem., 49, 2111—2118.
9. Schweizer M. P., Witkowski J. T., Bolins R. K. (1971) J. Amer. Chem. Soc., 93, 277—279.
10. Schleich T., Blackburn B. J., Lapper R. D., Smith I. C. P. (1972) Biochemistry, 11, 137—145.
11. Schirmer R. E., Davis J. P., Noggle J. H., Hart P. A. (1972) J. Amer. Chem. Soc., 94, 2561—2572.
12. Hart P. A., Davis J. P. (1972) J. Amer. Chem. Soc., 94, 2572—2577.
13. Lapper R. D., Smith I. C. P. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 2880—2884.
14. Lapper R. D., Mautsch H. H., Smith I. C. P. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 2878—2880.
15. Schweizer M. P., Kreishman G. P. (1973) J. Mag. Res., 9, 334—337.
16. Deslauriers R., Smith I. C. P. (1973) Can. J. Chem., 51, 833—838.
17. Schweizer M. P., Banta E. B., Witkowski J. T., Robins R. K. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 3770—3778.
18. Lavalley D. K., Coulter C. L. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 576—581.
19. Altona C., Sandaralingam M. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 2333—2344.
20. Wood D. J., Mynott R. J., Hruska F. E., Sarma R. H., (1973) FEBS Lett., 34, 323—326.
21. Solomon I. (1955) Phys. Rev., 99, 559—564.
22. Bell R. A., Saunders J. K. (1970) Can. J. Chem., 48, 1110—1122.
23. Noggle J. H., Schirmer R. E. (1971) The Nuclear Overhauser Effect. Chemical Applications, Academic Press, N. Y. and London.
24. Tran Dinh Son, Guschlbauer W., Gueron M. (1972) J. Amer. Chem. Soc., 94, 7903—7911.
25. Tran-Dinh Son, Chachaty C. (1973) Biochim. et biophys. acta, 335, 1—13.
26. Kaiser R. (1963) J. Chem. Phys., 39, 2435—2442.

27. Быстров В. Ф., Степанянц А. У. (1967). Радиоспектроскопические и квантовомеханические методы в структурных исследованиях, стр. 174, «Наука», М.
28. Coulter C. L. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 570—575.
29. Sandaralingam M., Jensen L. H., (1965) J. Mol. Biol., 13, 914—929.
30. Bugg S. E., Marsh R. E. (1967) J. Mol., Biol., 25, 67—82.
31. Bart J. T., Cathon R. E., Hammes G. G. (1965) J. Biol. Chem., 240, 3372—3378.

Поступила в редакцию
15.XI.1974

NUCLEAR OVERHAUSER EFFECT STUDY ON BASE
AND SUGAR RELATIVE ARRANGEMENT IN AQUEOUS SOLUTIONS
OF CYTIDINE NUCLEOTIDES

KARPEISKY M. Ya., YAKOVLEV G. I.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow, Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

An INDOR method has been used to measure the proton-proton Overhauser enhancements with high precision and sensitivity. The Overhauser enhancements of pyrimidine 6-H upon saturation of various sugar protons were measured. The preferable conformation of cytidine and cytidine 5'-phosphate in aqueous solution was shown to be «anti». The «syn» conformation was proved to be predominant for the cytidine 2'-phosphate, cytidine 3'-phosphate and cytidine 2',3'-cyclic phosphate. The Overhauser enhancements of 6-H were independent of temperature in 34—80° range, which allowed to assume that changes in free energy on syn-anti transitions are due to the entropy contribution.
