



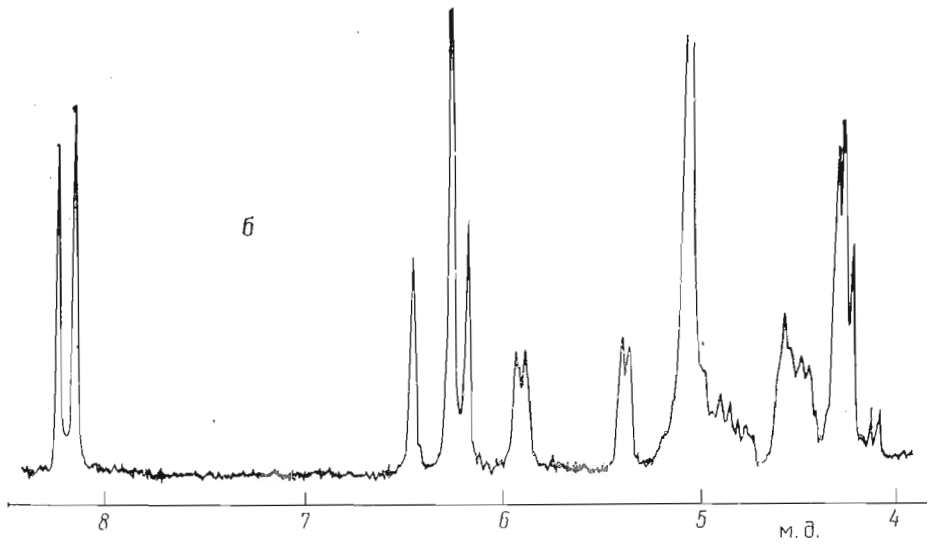
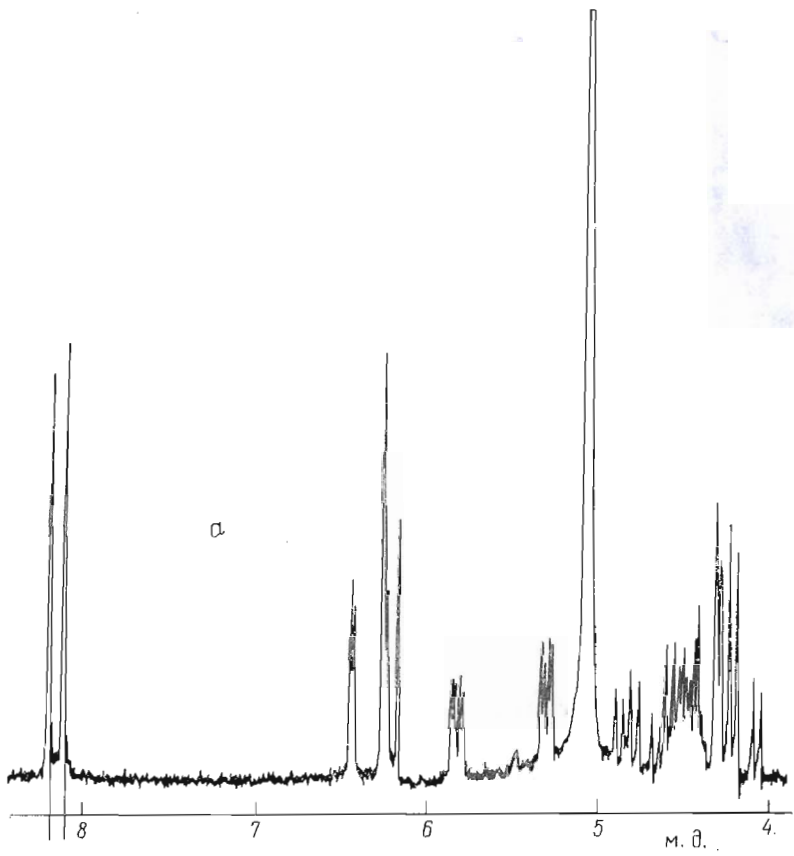
УДК 547.962.32 : 541.63

О КОНФОРМАЦИИ ФОСФОРИЛИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
2'-ДЕЗОКСИ-2'-ФТОРУРИДИНА В РАСТВОРЕАнтонов И. В., Дудкин С. М., Карнейский М. Я.,
Яковлев Г. И.*Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;**Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР, Пушкино*

Методом протонного магнитного резонанса исследованы конформационные состояния 2'-дезоксидефторуридина, 2'-дезоксидефтор-3'-уридинмонофосфата и его метилового эфира и 2'-дезоксидефторуридилил-(3' → 5')-аденозина в водных растворах. Показано, что конформационное состояние 2'-дезоксидефторрибозных остатков этих соединений сдвинуто в сторону *N*-типа. Различие в свободной энергии *N*- и *S*-типов конформаций составляет ~ 1 ккал/моль при 32°. Конформационные состояния оксиметильной и фосфатной групп близки к состояниям соответствующих рибоаналогов уридина. Для 2'FU_дРА фракция «стеклинг»-конформации при 32° составляет 18%. Изученные соединения конформационно подобны соответствующим рибонуклеотидам и могут быть использованы для исследования структуры ферментов, расщепляющих фосфодиэфирные связи РНК.

Наиболее важные результаты для понимания структурных основ механизма действия и специфичности панкреатической рибонуклеазы были получены при исследовании структуры и свойств этого фермента с непреращущимся фосфонатным аналогом субстрата [1, 2]. Однако различие в геометрии и электронных свойствах фосфатной и фосфонатной групп ограничивает возможные применения этого аналога для анализа структуры основного и переходного состояний в реакции трансэтерификации.

По-видимому, достаточно перспективными для подобного рода исследований являются аналоги субстратов, содержащие вместо оксигруппы в 2'-положении рибозного кольца атом фтора. Из данных, полученных методом ПМР [3, 4], следует, что конформация пиримидиновых 2'-дезоксидефторрибонуклеозидов близка к конформации соответствующих рибонуклеозидов. Аналогичный вывод был сделан в работе [5] при сравнении температурной зависимости спектров КД динуклеозидфосфатов, содержащих остаток 2'-дезоксидефторуридин-3'-фосфата и соответствующих рибо- и дезоксирибопроизводных. Интерес к аналогам такого рода обусловлен также тем, что, как известно, константы спин-спинового взаимодействия и диапазон изменения химических сдвигов ядер фтора по величине значительно превосходят соответствующие параметры для протонов, а ядро ¹⁹F обладает высокой чувствительностью к изменению окружения [6]. Поэтому ядро фтора может служить эффективной «репортерной группой» при изучении комплексов нуклеаз с фторированными нуклеотидами методом ¹⁹F-ЯМР.



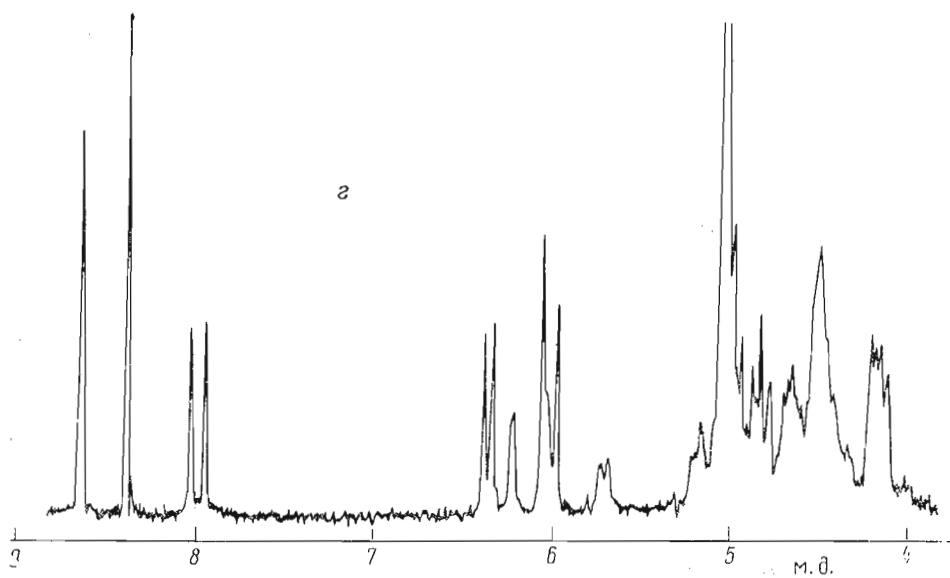
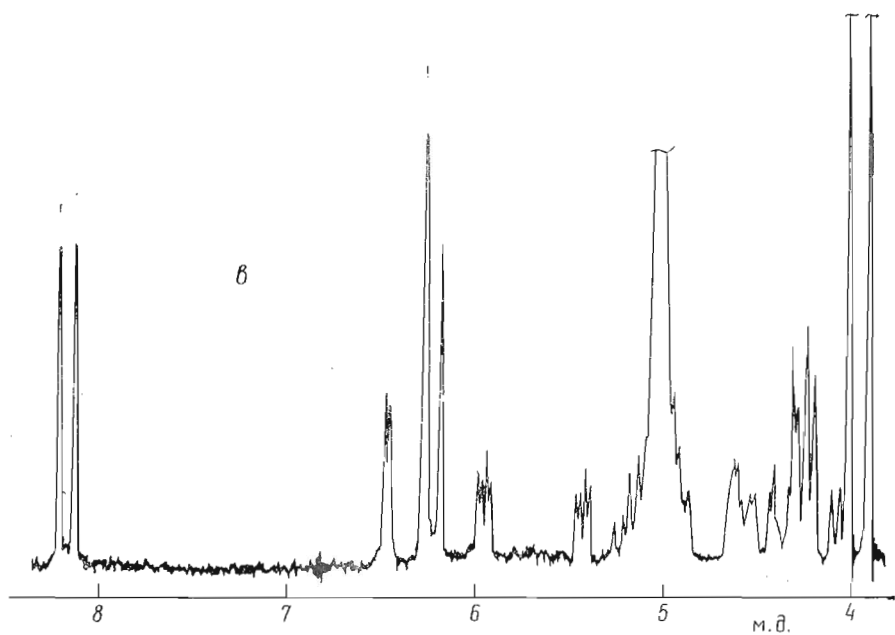
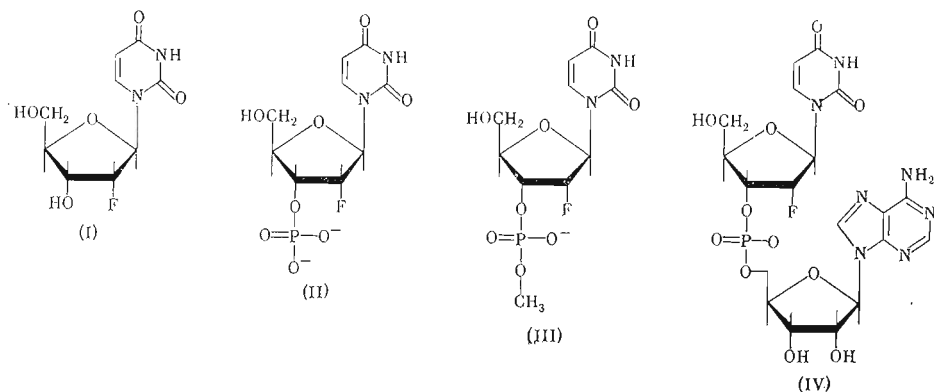


Рис. 1. Спектры ПМР $2'FU_d$ (а), $2'FU_{dP}$ (б), $2'FU_{dP}(OMe)$ (в) и $2'FU_{dPA}$ (z) при 32° , pH 5,5 и концентрации образцов $\sim 0,1$ М относительно внешнего стандарта, гексамтилдсилоксана

Целью настоящей работы было изучение методом ПМР конформаций в растворе фосфорилированных производных уридина, содержащих вместо оксигруппы в 2'-положении рибозного кольца атом фтора (I)—(IV).



Выбор этих соединений обусловлен тем, что метиловый эфир нуклеотида (III) является аналогом самого «медленного» субстрата панкреатической рибонуклеазы, а динуклеозидфосфат (IV) — аналогом одного из самых «быстрых» субстратов этого фермента [7]. Соединения типа (II) часто используются для моделирования переходного состояния ферментативной реакции.

Спектры ПМР 2'-дезоксид-2'-фторуридина при рН 5,5 (а), 2'-дезоксид-2'-фторуридин-3'-фосфата при рН 5,5 и 9,0 (б), метилового эфира 2'-дезоксид-2'-фторуридин-3'-фосфата при рН 5,5 (в) и 2'-дезоксид-2'-фторуридил-(3' → 5')-аденозина при рН 5,5 (г) приведены на рис. 1. Представленные спектры являются спектрами практически первого порядка, и поэтому их отнесение было выполнено с использованием мультиплетности сигналов и химических сдвигов.

Химические сдвиги протонов соединений (I) — (IV) и величины констант спин-спинового взаимодействия суммированы в табл. 1 и 2. Видно, что введение фосфатной группы в 3'-положение 2'-дезоксид-2'-фторрибозного цикла нуклеозида влияет на величину химических сдвигов протонов, находящихся в геминальном и вицинальном положениях относительно С3'. Однако константы спин-спинового взаимодействия протонов при этом изменяются незначительно, и, следовательно, фосфорилирование не вызывает существенных изменений в конформации сахарного кольца нуклеозида аналогично тому, как это было показано для перехода от рибонуклеозидов к соответствующим нуклеотидам [8].

Конформация нуклеотидов определяется геометрией фуранозного цикла, относительным положением его и гетероциклического основания, фосфатной и 5'-оксиметильной групп. В случае динуклеотидов описание их состояния включает кроме конформаций мономерных единиц относительное положение оснований.

Конформационное состояние 2'-дезоксид-2'-фторрибозного кольца может быть оценено по величинам констант спин-спинового взаимодействия вицинальных протонов. Использование уравнения Карплуса [9]

$$J_{ij} = J_0 \cos^2 \Phi_{ij} - 0,28, \quad (1)$$

(J_0 9,27 Гц для $0^\circ < \Phi_{ij} < 90^\circ$ и J_0 10,36 Гц для $90^\circ < \Phi_{ij} < 180^\circ$) и табл. 2 дает значение двугранных углов, приведенных в табл. 3. Анализ полученных величин показывает, что конформация остатка 2'-дезоксид-2'-фторрибозы во всех изученных соединениях может быть описана одной из несимметричных *twist*-конформаций типа С3'-*эндо*—С2'-*экзо* (3T_2) или С3'-*эндо*—С4'-*экзо* (3T_4) с преобладающим выводом из плоскости 2'-дез-

Таблица 1

Химические сдвиги (δ , м.д.) 2'-дезоксид-2'-фторуридина и его производных в 0,2 М растворах D₂O при 32° и pD 5,5

Протоны	2'FU _d (I)	2'FU _d p(II)		2'FU _d p(OMe)(III)	2'FU _d pA(IV)	
		pD 5,5	[pD 9,0		остатка уридина	остатка аденозина
5-H	6,20	6,21	6,21	6,23	6,01	8,63 (8-H)
6-H	8,15	8,20	8,18	8,18	7,98	8,37 (2-H)
1'-H	6,33	6,45	6,36	6,37	6,15	6,37
2'-H	5,55	5,64	5,79	5,40	5,46	5,01
3'-H	4,72	4,98	4,97	5,01	*	4,85
4'-H	4,49	4,59	4,55	4,60	4,46	4,70
5' a-H	4,35	4,36	4,38	4,38	4,28	*
5'-H	4,43	4,48	4,80	4,22	4,09	*
CH ₃	—	—	—	3,97	—	—

* Значение не определено.

Таблица 2

Константы спин-спинового взаимодействия протонов 2'-дезоксид-2'-фторуридина и его производных в 0,2 М растворах D₂O при 32° и pD 5,5, Гц *

J	(I)	(II)		(III)	(IV)	
		pD 5,5	pD 9,0		остатка уридина	остатка аденозина
5,6	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	—
1', F	19,5	19,1	19,4	19,5	19,0	—
2', F	52,8	52,8	52,2	52,3	53,3	—
3', F	20,6	21,0	22,6	18,5	**	—
4', F	1,9	**	**	**	**	—
1', 2'	1,5	1,2	1,2	1,8	1,5	4,6
2', 3'	4,3	4,3	4,3	4,6	5,1	5,1
3', 4'	8,6	8,4	8,2	8,0	8,3	5,0
4', 5'a	2,4	2,6	2,6	2,6	2,4	**
4', 5'b	4,4	3,9	3,8	3,9	3,8	**
5'a, 5'b	12,9	12,9	13,2	13,0	13,3	**
3', p	—	8,7	9,4	8,0	**	—
CH ₃ , p	—	—	—	10,8	—	—

* Знаки констант не определялись.

** Значение не определено.

Таблица 3

Величина диэдральных углов сахарных остатков 2'-дезоксид-2'-фторуридина и его производных, рассчитанных из величин констант спин-спинового взаимодействия протонов

Φ_{ij}°	2'FU _d (I)	2'FU _d p (II)		2'FU _d pA(OMe) (III)	2'FU _d pA (IV)	
		pD 5,5	pD 9,0		остатка уридина	остатка аденозина
1'2'	114	112	112	117	114	133
2'3'	45	45	45	43	40	40
3'4'	157	156	155	153	156	135

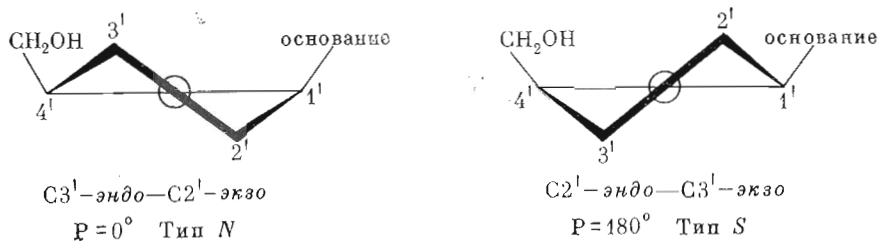


Рис. 2. Предельные конформационные состояния остатка рибозы: $C3'$ -эндо— $C2'$ -экзо (тип *N*) и $C2'$ -эндо— $C3'$ -экзо (тип *S*)

окси-2'-фторрибозы атома $C3'$. Вычисленные значения двугранных углов рибозного цикла, связанного с аденином для соединения (IV), отвечают суперпозиции по крайней мере двух состояний с различным направлением выхода из плоскости кольца атомов $C2'$ и $C3'$.

Величины двугранных углов сахарного остатка нуклеозидов и их фосфатов, формально рассчитанные по уравнению (1), представляют собой огибающую непрерывно переходящих друг в друга конформаций [10]. Поскольку они не являются средними арифметическими двугранных углов каждого из конформеров, находящихся в равновесии, использование их для описания состояния нуклеозидов и их производных в растворе ограничено случаями, когда равновесие практически нацело сдвинуто в сторону одного из конформеров.

Более плодотворна концепция «псевдовращения», разработанная применительно к нуклеозидам и нуклеотидам Алтоной и Сундаралингамом [11, 12]. Согласно этой концепции, все возможные конформации фуранозного кольца, определяемые взаимодействием валентно не связанных атомов и торсионными напряжениями, могут быть описаны как распространение деформации плоского кольца вдоль образующих его связей (псевдовращение) с некоторой амплитудой и фазой. В качестве исходной конформации, относительно которой отсчитывается фазовый угол (фазовый угол псевдовращения $P = 0^\circ$), принята симметричная *twist*-конформация $C3'$ -эндо — $C2'$ -экзо (3T_2). В соответствии с величиной P все конформации сахарного кольца разделены на два типа: тип *N* с $P \approx 0 \pm 90^\circ$ и тип *S* с $P = 180 \pm 90^\circ$ (рис. 2). Показано, что для нуклеотидов, являющихся производными β -аномеров сахаров, из всех возможных значение P (от 0 до 360°) как в кристалле, так и в растворе реализуются две узкие области, соответствующие *N*- и *S*-типу, разделенные между собой потенциальными барьерами. Центры этих областей имеют значения, близкие к $P = 0$ и 180° , а вершины барьеров $P = 90$ и 270° . Используя эту концепцию, авторы показали также [11, 12], что константы спин-спинового взаимодействия вицинальных протонов сахарных остатков отражают параметры псевдовращения и позволяют оценить распределение молекул по *N*- и *S*-типам конформаций, используя линейные отношения между наблюдаемыми константами и константами, отвечающими определенному типу конформера. Результаты такого детального анализа констант спин-спинового взаимодействия протонов рибозы и дезоксирибозы 2'-, 3'- и 5'-нуклеозидмонофосфатов приведены в работах Дэвиса и Данилюка [8, 13].

Анализ констант спин-спинового взаимодействия протонов остатка 2'-деокси-2'-фторрибозы в соединениях (I) — (IV) (табл. 2) показывает, что значения $J_{2', 3'}$ и $J_{1', 2'} + J_{3', 4'}$ мало изменяются в этом ряду. Постоянство $J_{2', 3'}$ и $J_{1', 2'} + J_{3', 4'}$ в ряду соединений является необходимым условием для анализа конформации их сахарных остатков в рамках концепции псевдовращения. Среднее значение $(J_{1', 2'} + J_{3', 4'}) = 9,8$ Гц близко к величине $9,5 \pm 0,3$ Гц, найденной Дэвисом и Данилюком для 2'(3')-рибонуклеотидов [8], и 10,1 Гц, определенной Алтоной и Сундаралингамом [12], что, по-видимому, говорит о небольшой величине индуктивного

Значения молярных фракций конформации N -типа χ_N , констант равновесия $K = \chi_S / \chi_N$ и разность свободных энергий N - и S -состояний ΔG° для производных 2'-дезоксид-2'-фторуридина

Соединения	2'FU _d (I)	2'FU _{dP} (II)		2'FU _{dP} (OMe) (III)	2'FU _{dP} A (IV)	
		pD 5,5	pD 9,0		остатка уридина	остатка аденозина
χ_N %	85	88	88	82	85	53
K	0,48	0,14	0,14	0,22	0,18	0,89
$\Delta G_{32^\circ}^\circ$, ккал/моль	1,0	1,2	1,2	0,9	1,0	0,07

эффекта, связанного с заменой оксигруппы на атом фтора. Средняя величина $J_{2',3'}$ 4,5 Гц более заметно отличается от соответствующей величины (5,2 Гц) для рибонуклеотидов [8]. Вероятно, это следствие уменьшения амплитуды деформации цикла на величину $\sim 4\%$ [13].

Используя указанное среднее значение $J_{1',2'} + J_{3',4'}$, соотношение между N - и S -типами конформеров можно найти из следующих выражений [8, 12]:

$$J_{1',2'} = (1 - \chi_N) 9,8, \quad (2)$$

$$\chi_S = 1 - \chi_N,$$

где χ_N и χ_S — молярные фракции N - и S -конформеров. Рассчитанные величины χ_N , соответствующие константы равновесия (K) и разница в свободных энергиях для N - и S -состояний (ΔG) приведены в табл. 4. Видно, что для 2'-дезоксид-2'-фторуридина и его производных конформационное равновесие значительно смещено в сторону N -конформера. Различие в свободной энергии N - и S -конформаций в данном случае составляет ~ 1 ккал/моль в пользу N -конформаций, что примерно в 20 раз превышает соответствующую величину для фосфатов уридина [8].

Таким образом, конформация 2'-дезоксид-2'-фторрибозы в изученных соединениях более рибозоподобна, чем конформация рибозы в соответствующих рибонуклеотидов, так как известно, что в различных формах РНК остаток сахара находится исключительно в 3'-*эндо*-конформации [14]. В связи с этим можно ожидать для нуклеаз, специфически связывающих производные пиримидиновых рибонуклеозидов в 3'-*эндо*-конформации при комплексобразовании с производными 2'-дезоксид-2'-фторуридина, более высоких констант ассоциации.

Конформационное состояние рибозного остатка аденозина в 2' FU_{dP}A (IV) также можно рассматривать в терминах равновесия N - и S -конформеров, так как возможность такого подхода была продемонстрирована для ряда нуклеозид-5'-фосфатов [13]. Молярные фракции N - и S -форм можно было бы выразить соотношениями, аналогичными уравнениям (2). Однако ранее было показано, что величина констант $J_{1',2'}$ и $J_{3',4'}$ для динуклеозидфосфатов в отличие от мономеров существенно зависит от температуры, а величина $J_{2',3'}$ при этом остается постоянной [15—17]. Сравнив зависимости величин этих констант от температуры с данными, полученными оптическими методами, Алтона и Сундаралингам предположили, что для динуклеозидфосфатов, находящихся в стеклинг (свернутой) конформации, равновесие в растворе нацело смещено в сторону N -конформера [12]. Для молекул, которые не находятся в стеклинг-конформации, для остатков рибозы существует равновесие $N \rightleftharpoons S$, как и для соответствующих мономеров. Тогда для расчета фракции молекул 2'-дезоксид-2'-фторуридил-лилиз-(3' → 5')-аденозина, находящейся в стеклинг-конформации

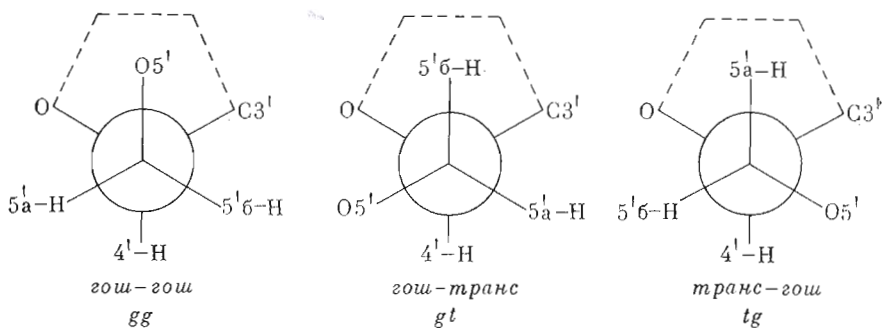


Рис. 3. Конформации экзоциклической CH_2OH -группы относительно негликозидной связи

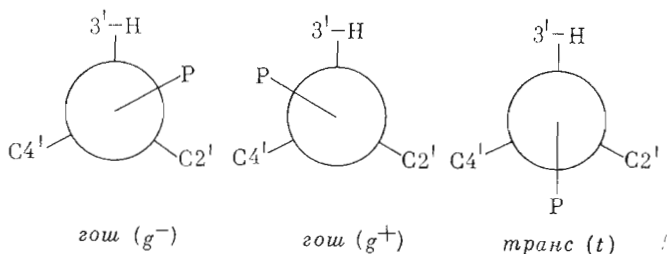


Рис. 4. Ротамеры фосфатной группы относительно $\text{C3}'\text{-O3}'$ -связи

$f_{\text{ст}}$, можно использовать уравнение

$$J_{1',2'}/(J_{1',2'} + J_{3',4'}) = (1 - f_{\text{ст}})K/(1 + K), \quad (3)$$

где K — константа равновесия для разбавленных растворов аденозин-5'-фосфата. Подставляя в уравнение значение констант и K 1,4 [13] (это значение K было определено для 0,02 М раствора и 27° [18], но для разбавленных растворов оно не изменяется для 32° [13]), получили $f_{\text{ст}}$ 18%. Этот результат хорошо согласуется с данными, найденными методом КД [5], из которых следует, что для $2'\text{FUdPA}$ $f_{\text{ст}} \sim 20\text{--}30\%$.

Таким образом, проведенный анализ состояния $2'$ -дезоксид- $2'$ -фторуридил- $(3' \rightarrow 5')$ -аденозина показывает, что его конформация близка к конформации соответствующих рибонпроизводных. Однако максимальное соответствие должно, по-видимому, наблюдаться при увеличении степени межплоскостного взаимодействия гетероциклических оснований, когда конформационное равновесие в рибозном цикле аденозинового фрагмента будет смещено в сторону N -конформера. Этот вывод, сделанный на основе анализа констант спин-спинового взаимодействия протонов остатка сахара в $2'\text{FUdPA}$, находится в соответствии с тем фактом, что спектры КД $2'\text{FUdPA}$ наиболее близки к спектрам КД UrA при низких температурах, когда степень стеклинга гетероциклических оснований увеличивается [5].

Найденные значения $f_{\text{ст}}$ позволяют уточнить значения χ_N и K для сахарного остатка уридина в $2'\text{FUdPA}$. Расчет с использованием K 0,22 [значение для $2'\text{FUdPA}(\text{OMe})$] дает значение χ_N 0,85, совпадающее с ранее найденным.

Конформация экзоциклической группы $-\text{CH}_2\text{OH}$ может быть определена в терминах трех классических ротамеров gg , gt и tg [19—21] (рис. 3). Величина констант $J_{4',5'a}$ и $J_{4',5'b}$ отражает относительную вероятность этих конформеров. Она была рассчитана с использованием следующей системы уравнений:

$$\begin{aligned} J_{4',5'a} &= P_{gg}J_g + P_{tg}J_t + P_{gt}J_g, \\ J_{4',5'b} &= P_{gg}J_g + P_{tg}J_g + P_{gt}J_t, \\ P_{gg} + P_{gt} + P_{tg} &= 1, \end{aligned} \quad (4)$$

где P_{gg} , P_{tg} и P_{gt} — относительные вероятности gg -, tg - и gt -конформеров. Значения констант J_g 2,04 и J_t 11,77 Гц были выбраны согласно работе [8]. Результаты расчета даны в табл. 5. Видно, что, как и в случае рибонуклеотидов [8], в 2'-дезоксидеокси-2'-фторрибонуклеотидах вероятность существования ротамеров располагается в порядке $P_{gg} > P_{tg} > P_{gt}$. Аналогичным образом проводился анализ конформации фосфатной группы. Ротамеры фосфатной группы относительно С3'—О3'-связи показаны на рис. 4. Определяя только константу спин-спинового взаимодействия атомов ^{31}P и 3'-H, мы имели возможность провести сравнение величин P_t и $P_{g-} + P_{g+}$. Для их расчета использовались значения J_g 1,8 и J_t 20,9 Гц [8]. Результаты даны в табл. 6. Сравнение их с данными для рибонуклеотидов уридина показывает, что состояние фосфатной группы даже для моонуклеотидов с 2'-дезоксирибозой приближается к poly(U) , что является, по-видимому, следствием преобладания N -типа конформации сахарного остатка.

В ряде работ было отмечено, что в кристаллическом состоянии существует корреляция между конформацией фуранозного цикла и торсионным углом относительно гликозидной связи $\varphi_{\text{СН}}$ [11, 22—24]. Если подобная корреляция существует для растворов, то преобладание определенной конформации сахара должно сопровождаться преобладанием конформации с определенным торсионным углом. С целью выявления такой корреляции было проведено изучение конформационного состояния гетероциклического основания для 2'-дезоксидеокси-2'-фторуридина методом ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО). Анализ результатов измерений (табл. 7) показал, что существуют по крайней мере два вида конформеров с существенно различными углами $\varphi_{\text{СН}}$, отвечающими *син*- и *анти*-состояниям основания. Это явление для нуклеотидов уже отмечалось в ряде работ [25—27]. Последовательный анализ распределения населенностей по этим состояниям затруднителен. Однако качественный результат может быть

Таблица 5

Вероятности существования ротамеров $\text{СН}_2\text{ОН}$ -группы производных 2'-дезоксидеокси-2'-фторуридина

Соединение	P_{gg}	P_{gt}	P_{tg}
2'FU _d (I)	0,72	0,04	0,24
2'FU _d P (II)	0,75	0,06	0,19
Up *	0,74	0,08	0,18
2'FU _d P(OMe) (III)	0,75	0,06	0,19
2'FU _d PA (IV)	0,78	0,04	0,18

* Данные работы [8].

Таблица 6

Вероятности существования ротамеров фосфатной группы производных 2'-дезоксидеокси-2'-фторуридина

Соединение	P_t	$P_{g-} + P_{g+}$
2'FU _d P (II)	0,36	0,64
2'FU _d P(OMe) (III)	0,32	0,68
Up *	0,31	0,69
poly(U) *	0,41	0,59

* Данные работы [8].

Измеренные значения ЯЭО для протонов сахарного кольца 2'-дезоксигуанидина при насыщении протонов основания 6-Н

<i>i</i> -Н	1'-Н	2'-Н	3'-Н	5'-а-Н	5'-б-Н
$f_i(6) \cdot 10^3$	84 \pm 9	34 \pm 6	33 \pm 5	4 \pm 2	8 \pm 2

получен из следующего рассмотрения. Расчет максимально возможных значений ЯЭО в зависимости от φ_{CN} дает $f_{1'(6)}$ 0,42 ($\varphi_{\text{CN}} = 125^\circ$) и $f_{2'(6)}$ 0,45 ($\varphi_{\text{CN}} = 245^\circ$) для модели 2'-дезоксигуанидина, построенной с использованием рентгеноструктурных данных для 3',5'-диацетил-2'-дезоксигуанидина [28]. Углы, соответствующие максимальным значениям ЯЭО для 1'-Н- и 2'-Н-протонов при насыщении линии 6-Н-протонов, отвечают *син*- и *анти*-конформациям основания. Поскольку максимальные значения $f_{1'(6)}$ и $f_{2'(6)}$ близки между собой и изменения величин ЯЭО в окрестности указанных углов невелики, а соответствующие экспериментальные значения различаются немногим более чем в 2 раза, можно считать, что населенности *син*- и *анти*-состояний соизмеримы между собой с незначительным преобладанием *син*-конформации.

Таким образом, изучение конформации производных 2'-дезоксигуанидина показало, что эти соединения конформационно подобны соответствующим рибонуклеотидам и, следовательно, могут быть использованы для анализа структуры фермент-субстратных комплексов, т. е. ферментов, которые катализируют расщепление фосфоэфирных связей в РНК.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР снимали на спектрометре HA-400D (Varian, США) при температуре 32° в D₂O с использованием образцов с концентрацией ~0,1 М и pH 5,5. Константы спин-спинового взаимодействия измерены методом INDORE с точностью $\pm 0,1$ Гц. Химические сдвиги измерены относительно внешнего стандарта гексаметилдисилоксана с точностью $\pm 0,005$ м. д.

УФ-спектры снимали на спектрофотометре Specord UV-VIS (ГДР). Электрофорез проводили на бумаге FN-18 (ГДР) в 0,05 М аммонийкарбонатном буфере, pH 9,0. Для колоночной хроматографии использовали DEAE-целлюлозу (Whatman, Англия). Электрофоретическую подвижность (E_{UP}) определяли относительно уридин-3'-фосфата.

2'-Дезокси-2'-фтор-β-D-рибофуранозилурацил, 2'FU_d(I) получали по методу Дауэрр и Фокса [30] из 2,2'-ангидроуридина с безводным HF в диоксане. Выход не превышал 60% вследствие образования в качестве побочного продукта арабинозилуридина; т. пл. 148—150°, λ_{макс} 260 нм при pH 7,0 (ε 9800).

5'-О-Тритил-2'-дезоксигуанидин-2'-фтор-β-D-рибофуранозилурацил, 5'OTr2'FU_d(Ia). 1 г (0,004 М) нуклеозида (I) упаривали с сухим пиридином (3 × 10 мл), добавляли 1,2 г трифенилхлорметана, нагревали 1 ч при 100° и выливали в 1 л H₂O при 0°. Через 30 мин осадок отфильтровывали, растворяли в минимальном количестве сухого бензола и выливали в сухой петролейный эфир. Переосаждение повторяли и осадок сушили над P₂O₅. Выход 65%, 1,25 г.

2'-Дезокси-2'-фтор-3'-уридинмонофосфат, 2'FU_dp (IV). Смесь 1 ммоль нуклеозида (Ia) (0,5 г) и 2 мл 1 М раствора β-цианэтилфосфата упаривали в вакууме досуха, упаривали с абсолютным пиридином (3 × 5 мл), добавляли 0,65 г (3 ммоль) мезитилсульфохлаорида и перемешивали 4 ч

без доступа влаги воздуха. К раствору добавляли 10 мл H_2O , перемешивали еще 2 ч, упаривали, добавляли 10 мл 80% CH_3COOH и кипятили 15 мин, затем добавляли 30 мл холодной воды, трифенилкарбинол отфильтровывали, фильтрат упаривали до отсутствия запаха CH_3COOH , разбавляли до 100 мл водой и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (50 × 400 мм, 700 мл) в HCO_3^- -форме. Разделение проводили в линейном градиенте концентрации NH_4HCO_3 от 0 до 0,12 М (9 л). Нуклеотид (IV) элюировался при концентрации буфера 0,06—0,065 М. Фракцию упаривали с водой (5 × 20 мл). Остаток растворяли в 5 мл 2 М NaOH, выдерживали 5 мин и доводили pH до 7,5 с помощью даукса-50 (H^+). Смолу промывали водой и фильтрат упаривали. Выход 0,25 г (80%). E_{UP} 0,98, λ_{max} 260 нм при pH 7,0 (ϵ 9700).

Метилловый эфир 2'-дезоксидеокси-2'-фтор-3'-уридинмонофосфат, 2'FU_{ар}(OMe) (III). 2 ммоль N,N'-дициклогексилкарбодиимида добавляли к раствору 0,3 ммоль (120 мг) пиридиниевой соли (II) в 100 мл абс. MeOH, выдерживали 5—6 сут при комнатной температуре, упаривали, встряхивали со смесью эфир — вода, 50 : 50 (~200 мл). Водный экстракт пропускали через фильтр с дауксом-50 (H^+), собирая элюат в 5% раствор аммиака. Раствор упаривали, остаток растворяли в минимальном количестве метанола, после чего вещество осаждали, добавляя раствор метанола по каплям к ~200 мл эфира. Выход 100 мг (86%). E_{UP} 0,56, λ_{max} 260 нм при pH 7,0 (ϵ 9800).

2'-Дезокси-2'-фторуридил-3' → 5'-аденозин, 2'FU_{ар}A (IV). 1 ммоль нуклеозида (Ia) (0,5 г) и 1,5 ммоль 2',3',N⁴-триацетил-5'-аденозинмонофосфата упаривали при 30° с абс. пиридином (4 × 10 мл), добавляли 3 ммоль мезитилсульфохлаорида (0,65 г) и перемешивали 4 ч без доступа влаги воздуха. При охлаждении добавляли 10 мл воды и перемешивали еще 2 ч. Раствор упаривали, к остатку добавляли 10 мл 80% CH_3COOH и кипятили 15 мин. Трифенилкарбинол отфильтровывали, фильтрат упаривали и оставляли на ночь в 50 мл полунасыщенного аммиаком метанола. Метанол упаривали. Разделение проводили на колонке с DEAE-целлюлозой (50 × 400 мм, 700 мл) в HCO_3^- -форме в линейном градиенте концентрации NH_4HCO_3 от 0 до 0,12 М (9 л.) Динуклеозидмонофосфат элюировался при концентрации буфера ~0,065 М. Элюат упаривали с водой (5 × 10 мл) и лиофилизировали. Выход 250 мг (41%). E_{UP} 0,46, λ_{max} 262 при pH 7,0 (ϵ 19 000).

ЛИТЕРАТУРА

1. Jones G. H., Albrecht H. P., Damodaran N. P., Moffat J. G. (1970) J. Amer. Chem. Soc., **92**, 5510—5511.
2. Griffin J. H., Shechter A. N., Cohen J. S. (1973) Ann. N. Y. Acad. Sci., **222**, 693.
3. Blandin M., Son T.-D., Guschlbauer W., Cushley P. J. (1974) Biochim. et biophys. acta, **361**, 249—256.
4. Codington J. F., Fox J. J. (1968) Can. J. Chem., **46**, 1131—1140.
5. Catlin J. C., Guschlbauer W. (1975) Biopolymers, **14**, 51—72.
6. Dwek R. A. (1973) Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry, Clarendon Press, Oxford.
7. Richards F. M., Wickoff H. W. (1971) The Enzymes, **4**, 647—806.
8. Davies D. B., Danyluk S. S. (1975) Biochemistry, **14**, 543—554.
9. Karplus M. (1959) J. Chem. Phys., **30**, 11—15.
10. Evans F. E., Sarma R. H. (1974) J. Biol. Chem., **249**, 4754—4759.
11. Altona C., Sundaralingam M. (1972) J. Amer. Chem. Soc., **94**, 8205—8212.
12. Altona C., Sundaralingam M. (1973) J. Amer. Chem. Soc., **95**, 2333—2344.
13. Davies D. B., Danyluk S. S. (1974) Biochemistry, **13**, 4417—4434.
14. Arnott S., Dover S. D., Wonacott A. J. (1969) Acta crystallogr., **B25**, 2192.
15. Danyluk S. S., Hruska F. E. (1968) Biochemistry, **7**, 1038—1043.
16. Fang K. N., Kondo N. S., Miller P. S., Ts'o P. O. P. (1971) J. Amer. Chem. Soc., **93**, 6647—6656.
17. Ts'o P. O. P., Kondo N. S., Schweizer M. P., Hollis D. P. (1969) Biochemistry, **8**, 997—1029.
18. Feldman I., Agarwal R. D. (1968) J. Amer. Chem. Soc., **90**, 7329—7333.

19. Hruska F. E., Grey A. A., Smith J. C. P. (1970) *J. Amer. Chem. Soc.*, **92**, 4088 — 4094.
20. Grey A. A., Smith J. C. P., Hruska F. E. (1971) *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 1765 — 1769.
21. Blackburn B. J., Grey A. A., Smith J. C. P., Hruska F. E. (1970) *Can. J. Chem.*, **48**, 2866—2870.
22. Blackburn B. J., Lapper R. D., Smith J. C. P. (1973) *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 2873—2878.
23. Haschemeyer A. E. V., Rich A. (1967) *J. Mol. Biol.*, **27**, 369—384.
24. Sundaralingam M. (1968) *Biopolymers*, **7**, 821—860.
25. Sundaralingam M. (1973) *Conformations of Biological Molecules and Polymers, Proceeding of the Vth Jerusalem Symposium* (Bergmann E. D., Pullman B., eds.), p. 381, Acad. Press, N. Y.
26. Rhodes L. H., Schimmel P. R. (1971) *Biochemistry*, **10**, 4426—4433.
27. Son T.-D., Guschlbauer W., Gueron M. (1972) *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 7903—7911.
28. Son T.-D., Chachaty C. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **335**, 1—3.
29. Suck D., Saenger W., Main P., Germain G., Declercq J. P. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **361**, 257—265.
30. Doer I. R., Fox J. J. (1967) *J. Org. Chem.*, **32**, 1462—1471.

Поступила в редакцию
30.III.1976.

ON CONFORMATION OF PHOSPHORYLATED DERIVATIVES OF 2'-DEOXY-2'-FLUOROURIDINE IN SOLUTION

ANTONOV I. V., DUDKIN S. M., 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*

The conformational states of 2'-deoxy-2'-fluorouridine, 2'-deoxy-2'-fluorouridine 3'-phosphate and its methyl ester, as well as 2'-deoxy-2'-fluorouridyl (3'-5') adenosine have been studied by ¹H-NMR. The conformational equilibrium of the 2'-deoxy-2'-fluororibose moiety was shown to be shifted in favor of *N*-type form. A difference in free energy of *N*- and *S*-conformational types is ca. 1 kcal/mol at 32°. The conformational state of hydroxymethyl and phosphate groups was found to resemble that of the corresponding ribouridine analogs. The fraction of «stacked» conformation for the fluoro analog of UpA was calculated to be about 18% at 32°. The conclusion was reached, that the compounds studied and corresponding ribonucleotides should have similar conformational properties.