



УДК 547.963.32:543.422.23

ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОМ ЯМР КОНФОРМАЦИОННОЙ СИТУАЦИИ  
В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ НУКЛЕОЗИДОВ И НУКЛЕОТИДОВБобрускин И. Д., Курпичников М. П., Покровская М. Ю.,  
Флорентьев В. Л.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Предложен метод определения эффективного времени вращательной корреляции  $\tau_c$ , основанный на измерении скорости спин-решеточной релаксации Н(5) пиримидиновых нуклеозидов и нуклеотидов. В случае пуриновых соединений для этой цели использована скорость продольной релаксации Н(1') после обмена Н(8) на дейтерий. Предложено эмпирическое приближение, позволяющее учесть вклад быстро релаксирующих между собой ядер Н(2') и Н(2'') 2'-дезоксирибозного цикла в продольную релаксацию Н(1'). Рассчитанные величины  $\tau_c$  использованы для определения констант *син-анти*-равновесия в растворе нуклеозидов и нуклеотидов рибо- и 2'-дезоксирибоза. Показано, что 5'-нуклеотиды существуют преимущественно в *анти*-состоянии. Преобладание *анти*-популяции наблюдается также в случае пиримидиновых нуклеозидов и пиримидиновых 3'-нуклеотидов. В то же время константа *син-анти*-равновесия в растворе пуриновых нуклеозидов близка к 1, а в растворе 3'-АМР равновесие сдвинуто в сторону *син*-состояния. Рассчитаны усредненные во времени значения гликозидного торсионного угла в *анти*-состоянии изученных соединений. Обсуждаются причины организации конформационной ситуации в растворе нуклеозидов и нуклеотидов и возможная корреляция внутримолекулярных движений.

Ключевой проблемой конформационной ситуации в растворе нуклеозидов и нуклеотидов является конформация относительно гликозидной связи. Особая роль гликозидной конформации определяется следующими причинами.

1. Как показывает накопленный к настоящему времени экспериментальный материал, химические и физико-химические свойства нуклеозидов и нуклеотидов в значительной степени определяются относительным расположением нуклеинового основания и углеводного цикла.

2. Взаимопревращение гликозидных конформаций является самым медленным внутримолекулярным движением. Остальные конформационные переходы протекают на его фоне.

3. Наконец, биологическое функционирование нуклеозидов и нуклеотидов связано с относительной стабильностью гликозидных конформаций.

Исследованию конформационных свойств гликозидной связи посвящено большое число работ, однако до настоящего времени эта область конформационного анализа нуклеотидов остается наименее изученной, изобилующей противоречивыми результатами и концепциями.

---

Принятые сокращения: ЯЭО — ядерный эффект Оверхаузера;  $R$  и  $T$ , — скорость и время спин-решеточной релаксации.

Делались попытки применить для решения задачи о гликозидной конформации все классические методики ЯМР (см. обзор [1] и ссылки в нем). Использование химических сдвигов протонов позволяет получить лишь качественную и не всегда достоверную информацию. Дальние константы спин-спинового взаимодействия протонов  ${}^4J_{1,6}$  и  ${}^5J_{1,5}$  вследствие недостатков теории также дают качественный ответ. К тому же область их применения ограничена пиримидиновыми соединениями с незамещенным 5-м положением. Не удастся определить количественное соотношение гликозидных конформаций и с помощью констант спин-спинового взаимодействия H(1') и ядер  ${}^{13}\text{C}$  в 6-м и 2-м положениях пиримидиновых или в 8-м и 4-м положениях пуриновых нуклеотидов.

Для количественного изучения *син-анти*-равновесия в растворе нуклеозидов и нуклеотидов были использованы попы лантанидов [1–3], ядерный эффект Оверхаузера [1, 4] и скорости спин-решеточной релаксации. Применение первого метода ограничено нуклеотидами. Кроме того, до настоящего времени нет однозначных ответов на такие важные вопросы, как координация ионов лантанидов с нуклеиновым основанием и их влияние на конформацию нуклеотидов. ЯЭО лишен этих недостатков, характеризуется резко выраженной зависимостью величины эффекта от гликозидного торсионного угла. Однако этот метод имеет относительно низкую чувствительность (возрастание интегральной интенсивности сигнала обычно составляет лишь 10–20%).

В последние годы, после пионерской работы Имото, Акасаки и Хатано [5], в динамическом конформационном анализе нуклеозидов и нуклеотидов используются скорости спин-решеточной релаксации. Этот метод обладает достаточно высокой чувствительностью к изменению гликозидного угла и позволяет работать при низких концентрациях порядка  $10^{-3}$  М и ниже, что очень важно, учитывая склонность изучаемых соединений к самоассоциации. Широкое использование метода сдерживается принципиально присущим ему недостатком. Для количественной интерпретации результатов необходимо знать время вращательной корреляции  $\tau_c$ , экспериментальное определение которого сопряжено со значительными трудностями.

В настоящем сообщении описываются разработанные нами подходы к определению  $\tau_c$  и констант *син-анти*-равновесия в растворе нуклеозидов и нуклеотидов.

## Теория

Исходя из системы уравнений, предложенной Соломоном [6] для описания поведения во времени вектора продольной намагниченности системы двух спинов, в случае многоспиновой системы для  $i$ -го ядра можно записать [7]:

$$\frac{d \langle I_i(t) \rangle}{dt} = \rho_i (\langle I_i^0 \rangle - \langle I_i(t) \rangle) + \sum_j \sigma_{ij} (\langle I_j^0 \rangle - \langle I_j(t) \rangle), \quad (1)$$

где  $\langle I^0 \rangle$  и  $\langle I(t) \rangle$  — интегральная продольная намагниченность системы спинов соответственно в равновесном состоянии и в момент времени  $t$ .

Если выполняются следующие условия: а) релаксация осуществляется за счет диполь-дипольного взаимодействия, б) для любых  $i$  и  $j$  времена вращательной корреляции вектора, соединяющего ядра, совпадают с временем вращательной корреляции всей молекулы  $\tau_c$ , в)  $\omega^2 \tau_c^2 \ll 1$  ( $\omega$  — рабочая частота спектрометра ЯМР, равная в нашем случае  $6,28 \cdot 10^8$  рад·с $^{-1}$ ), то для спинов с одинаковым гиромагнитным отношением ( $\gamma_i = \gamma_j$ ) скорость спин-решеточной релаксации  $i$ -го ядра в приближении парной аддитивности

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

где  $r_{ij}$  — расстояние между спинами  $i$  и  $j$ .

Тщательное исследование нуклеозидов и нуклеотидов [8—13] показало, что перечисленные выше условия удовлетворительно выполняются при температурах выше 20°С.

Приближение (2) удовлетворительно описывает релаксацию  $i$ -го ядра, если оно взаимодействует с соседними ядрами сильнее, чем последние между собой. В случае 2'-дезоксинуклеотидов соседями исследуемого ядра Н(1') являются быстро релаксирующие протоны Н(2') и Н(2'').

Частный случай релаксации спина  $I$  в системе спинов  $I$ ,  $S$  и  $T$  при условии равенства  $r_{IS}$  и  $r_{IT}$  рассмотрен в работе [14]. Анализ полученного решения [15] указывает на то, что скорость продольной релаксации спина  $I$  может быть выражена уравнением

$$R_I = C \gamma^4 \hbar^2 \tau_c r_{IS}^{-6}. \quad (3)$$

Величина коэффициента  $C$  зависит от отношения  $r_{IS}/r_{ST}$ . В частности, при величине отношения, лежащей в пределах 1,15—1,35, коэффициент  $C$  равен  $\sim 2$ . Этот интервал охватывает возможные вариации расстояний между Н(1'), Н(2') и Н(2'') в 2'-дезоксирибозе, но поскольку равенство расстояний  $r_{1,2'}$  и  $r_{1,2''}$  не соблюдается ни в  $N$ -, ни в  $S$ -конформациях дезоксирибозы, адекватность такого приближения должна быть показана эмпирически. Проведенное нами исследование [15] подтвердило, что релаксация Н(1') в 2'-дезоксинуклеотидах удовлетворительно описывается в рамках приближения

$$R_{1'} = \gamma^4 \hbar^2 \tau_c \left( {}^{3/2} \sum_{j=2', 2''} r_{1'j}^{-6} + \sum_{i=2', 2''} r_{1'i}^{-6} \right). \quad (4)$$

Рассмотренные выше положения накладывают некоторые ограничения на методику измерения и расчета  $T_1$ . Из уравнения (4) следует, что в общем случае зависимость интегральной продольной намагниченности  $\langle I_i(t) \rangle$  от времени представляет собой суперпозицию некоторого числа экспоненциальных функций с неравными показателями. В связи с этим измерение  $T_1$  проводили на достаточно коротком начальном участке  $0 < \tau < < 1,5 T_1$ , где в пределах ошибки опыта зависимость  $\langle I_i(t) \rangle$  от времени можно аппроксимировать одной экспонентой.

Наконец, следует проявлять осторожность в отношении самоассоциации, к которой склонны в водных растворах нуклеозиды и нуклеотиды. Проведенные нами ранее исследования [9, 16] позволили выбрать условия эксперимента, при которых побочные эффекты самоассоциации пренебрежимо малы. Во всех случаях измерения проводили при концентрациях  $\sim 3 \cdot 10^{-2}$  М и 37°С.

### Определение времени вращательной корреляции

Один из самых распространенных методов определения времени вращательной корреляции  $\tau_c$  основан на измерении скорости продольной релаксации ядер  $^{13}\text{C}$  [13]. Однако низкая чувствительность ядер  $^{13}\text{C}$ , помноженная на низкое природное содержание, заставляет проводить измерения в концентрациях, существенно более высоких, чем в случае  $^1\text{H}$ , что чревато значительными ошибками, поскольку показано, что  $\tau_c$  резко зависит от концентрации вследствие изменения вязкости раствора [17] и процессов самоассоциации. Кроме того, рассчитанная величина  $\tau_c$  весьма чувствительна к расстоянию  $^1\text{H}$ — $^{13}\text{C}$ . Ошибка всего лишь в 5% в выборе  $r_{CH}$  приводит к 30%-ной ошибке в определении  $\tau_c$ .

Предложенный для пуриновых нуклеотидов метод определения  $\tau_c$  по скорости релаксации  $^2\text{H}$  после обмена  $^1\text{H}$ (8) на дейтерий [18, 19] не дает

Экспериментально измеренные скорости релаксации Н(1') после обмена Н(8) пуриновых или Н(5) и Н(6) пиримидиновых, скорости релаксации Н(5) пиримидиновых нуклеозидов и нуклеотидов и рассчитанные величины  $\tau_c$  при 37° С в сравнении с литературными данными

Соединение	$R_1^{обм}, c^{-1}$	$R_s, c^{-1}$	Метод определения $\tau_c^*$	$\tau_c \cdot 10^9, c$	Литературные данные $\tau_c \cdot 10^{9**}$ , ссылка
Ado	0,17		А	0,67	0,57 [19]
dAdo	0,25		А	0,49	
Guo	0,13		А	0,50	
dGuo	0,25		А	0,48	
5'-AMP	0,25		А	0,87	0,77 [10], 1,0 [22]
5'-dAMP	0,40		А	0,77	
3'-AMP	0,22		А	0,78	0,81 [19]
5'-GMP	0,22		А	0,87	0,79 [10]
5'-dGMP	0,40		А	0,77	
Cyd	0,13	0,20	А	0,48	0,48 ( $\alpha$ -Cyd, 0,44) [23]
			Б	0,49	
dCyd	0,19	0,18	А	0,41	
			Б	0,45	
5'-CMP		0,27	Б	0,66	0,62 [10]
5'-dCMP		0,24	Б	0,59	
3'-CMP		0,28	Б	0,68	

\* Определено А — по  $R_1^{обм}$ , Б — по  $R_s$ .

\*\* Определено по релаксации  $^{13}C$  [22], по релаксации  $^2H$  [19], по релаксации  $^1H$  [10, 23].

\*\*\* Для удобства сравнения величины  $\tau_c$  приведены к 37° С с использованием  $\Delta H^{\ddagger} = 6$  ккал/моль [13].

особых преимуществ перед первым, но в той или иной мере обладает перечисленными недостатками.

Заманчивым представлялось использовать для расчета  $\tau_c$  скорости спин-решеточной релаксации протонов молекулы нуклеотида, поскольку в этом случае можно проводить измерения при той же концентрации, что и основной эксперимент (в той же ампуле).

Однако для реализации этой идеи необходимо знать, во-первых, расстояние между протонами во всех конформерах, участвующих в равновесии, во-вторых, к протону, скорость релаксации которого используется для расчета  $\tau_c$ , предъявляются противоречивые требования. С одной стороны, его релаксация должна обеспечиваться внутримолекулярными взаимодействиями, с другой — скорость релаксации не должна зависеть от величины гликозидного торсионного угла.

Первую задачу можно решить в рамках динамической конформационной модели. Объективным основанием для такой модели в настоящее время могут быть лишь данные рентгеноструктурного анализа.

В основу модели были положены усредненные по данным рентгеноструктурного анализа координаты тяжелых атомов [20, 21]. Атомы водорода располагали по биссектрисе валентных углов тяжелых атомов. Расстояние С—Н во всех случаях равно 1,08 Å.

Вторая задача наиболее просто решается в случае пиримидиновых соединений. Скорость релаксации Н(5) определяется взаимодействием с Н(6) и в пределах точности эксперимента не зависит от конформации молекулы, а для рибо- и 2'-дезоксинуклеозидов и нуклеотидов

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

Соотношение *N*- и *S*-популяций и популяций ротамеров экзоциклических заместителей в растворе изученных соединений (литературные данные, см. обзор [1] и ссылки в нем)

Соединение	Рибоза			C(4')-C(5')				C(5')-O(5')			C(3')-O(3')		
	<i>N</i>	<i>S</i>	$K_{\Phi}$	гоп <sup>+</sup>	гоп <sup>-</sup>	транс	$K_{\Sigma}$	гоп <sup>+</sup>	гоп <sup>-</sup>	транс	гоп <sup>+</sup>	гоп <sup>-</sup>	транс
Ado	0,40	0,60	0,67	0,61	0,14	0,25	1,56						
dAdo	0,33	0,67	0,49	0,53	0,18	0,29	1,13						
Guo	0,54	0,46	1,17	0,60	—	—	1,50						
dGuo	—	—	—	0,49	0,20	0,31	0,96						
5'-AMP	0,40	0,60	0,67	0,76	0,10	0,14	3,17	0,11	0,15	0,74			
3'-AMP	0,36	0,64	0,56	0,74	0,08	0,18	2,85				0,09	0,38	0,53
5'-dAMP	0,35	0,65	0,54	0,66	—	—	1,94	—	—	0,71			
5'-GMP	0,39	0,61	0,64	0,72	0,12	0,16	2,57	0,12	0,16	0,72			
5'-dGMP	0,33	0,67	0,49	0,70	—	—	2,53	—	—	0,72			
Cyd	0,60	0,40	1,50	0,57	0,14	0,29	1,33						
dCyd	0,40	0,60	0,67	0,44	0,19	0,37	0,79						
5'-CMP	0,56	0,44	1,27	0,86	0,05	0,09	6,14	0,10	0,17	0,73			
5'-dCMP	0,60	0,40	1,50	0,68	0,07	0,25	2,13						
3'-dCMP	0,38	0,62	0,61	0,65	0,15	0,20	1,86	0,14	0,20	0,66			

где  $R_s$  — экспериментально определяемая скорость продольной релаксации Н(5) (табл. 1).

Задача усложняется при переходе к пуриновым соединениям, так как в молекуле отсутствуют протоны, скорость релаксации которых не зависит от гликозидной конформации. Однако после обмена Н(8) на дейтерий такими свойствами обладает Н(1'), поскольку вклад Н(2) в скорость релаксации Н(1') пренебрежимо мал при любых значениях гликозидного угла. Тогда в условиях быстрого обмена

$$R_{1'}^{\text{обм}} = \sum_i p_i R_{1'}^i, \quad (6)$$

где  $R_{1'}^{\text{обм}}$  — экспериментальная скорость релаксации Н(1') после обмена Н(8) на дейтерий,  $p_i$  — мольная доля  $i$ -го конформера, отличающегося конформацией углеводного цикла и экзоциклического заместителя, а  $R_{1'}^i$  — скорость релаксации Н(1') в этом конформере.

При этом возникает неопределенность, связанная с отсутствием данных об относительном весе каждой из популяций. Однако предварительный анализ показывает, что  $R_{1'}^{\text{обм}}$  в пределах экспериментальной ошибки зависит не от конформации экзоциклических заместителей, а лишь от соотношения *N*- и *S*-популяций.

Относительный вес *N*- и *S*-состояний легко определить по константам спин-спинового взаимодействия протонов углеводного цикла [1]. Литературные данные о соотношении конформаций углеводного цикла и экзоциклических групп собраны в табл. 2.

Решая совместно уравнения (2), (4) и (6), получаем

$$\tau_c = \frac{R_{1'}^{\text{обм}}}{\gamma^4 \hbar^2 \sum_{N(S)} p_{N(S)} \left( \frac{3}{2} \sum_{j \neq 2', 2'', 8}^{N(S)} r_{1'j}^{-6} + C \sum_{j=2', 2''}^{N(S)} r_{1'j}^{-6} \right)} \quad (7)$$

Коэффициент  $C$  равен  $3/2$  в случае рибо- и 1 в случае 2'-дезоксинуклеозидов и нуклеотидов.

В настоящем исследовании *N*-состояние аппроксимируется *S*(3')-эндо-конформацией с фазовым углом псевдообращения  $P$   $11,2^\circ$  и максимальным

торсионным углом  $\tau_m$   $37,6^\circ$ , а  $S$ -состояние —  $C(2')$ -эндо-конформацией с  $P$   $164,8^\circ$  и  $\tau_m$   $37,0^\circ$ .

Возникает вопрос: можно ли одни и те же конформации использовать для описания поведения различных соединений, и если можно, то насколько выбранные конформации удовлетворяют экспериментальным данным?

Анализ литературных данных [1] указывает на то, что конформационное поведение углеводного цикла нуклеозидов и нуклеотидов в водном растворе хорошо описывается в модели двух состояний, причем рассчитанные  $P$  и  $\tau_m$  близки между собой как в  $N$ -, так и в  $S$ -области.

Одним из аргументов в пользу модели двух состояний является линейная зависимость независимых экспериментальных параметров, отражающих данное равновесие. Хорошая линейная зависимость  $J_{1,2'}$  от  $J_{3,4'}$ , найденная для широкого круга нуклеозидов и нуклеотидов [1, 26], подтверждает применимость одной и той же модели к анализу различных соединений.

Для выбранных в настоящей работе конформаций по общепринятым уравнениям Карплуса были рассчитаны  $J_{1,2'}^N$ ,  $J_{1,2'}^S$ ,  $J_{3,4'}^N$  и  $J_{3,4'}^S$  как для рибозы, так и для дезоксирибозы и затем рассчитана ожидаемая зависимость  $J_{1,2'}$  от  $J_{3,4'}$ . Сравнение с экспериментальными данными (рис. 1) показывает, что выбранная модель удовлетворительно описывает поведение как рибо-, так и  $2'$ -дезоксисоединений.

Рассчитанные по формуле (7) величины  $\tau_c$  представлены в табл. 1. Хорошее соответствие данным независимых методов указывает на разумность использованной модели.

Наконец, в случае  $Cyd$  и  $dCyd$  проведен обмен  $H(5)$  и  $H(6)$  на дейтерий и  $\tau_c$  определено по скорости релаксации  $H(1')$  в соответствии с формулой (7). Хорошее совпадение величин  $\tau_c$ , рассчитанных по формуле (7) и (5), дополнительно подтверждает корректность определения  $\tau_c$  по  $R_3$  пиримидиновых соединений и приближения (4).

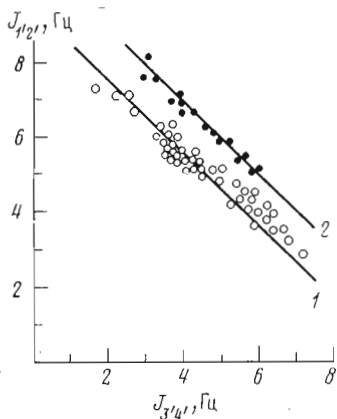


Рис. 1. Ожидаемая в принятой модели зависимость  $J_{1,2'}$  от  $J_{3,4'}$  в сравнении с экспериментальными данными [1]

#### Определение констант син-анти-равновесия

В данной работе для описания конформационного поведения гликозидной связи использовали модель двух состояний: *син* и *анти*. Коротко остановимся на аргументах в пользу этой модели.

1. Еще в 1963 г. Питха, Хладак и Смерт [27] показали, что интерпретация ИК-спектров нуклеозидов в растворе возможна лишь в предположении равновесия двух конформаций относительно гликозидной связи.

2. При воздействии ультразвука на растворы  $Ada$  и  $5'$ - $AMP$  [28—30] и аденозин- $3'$ ,  $5'$ -циклофосфата [31] наблюдается один

релаксационный процесс, не зависящий от концентрации. Авторы отнесли его к *син-анти*-переходу. Для  $Ado$  активационный барьер такого перехода определен в  $6,2$ — $6,6$  ккал/моль [28, 30].

3. В спектрах ЯМР производных нуклеозидов, несущих большие по объему заместители, при понижении температуры до  $-120^\circ C$  наблюдаются два набора сигналов, соответствующих *син*- и *анти*-конформациям [32—36].

4. Статистический анализ рентгеноструктурных данных (рис. 2; данные из обзорных работ [37—40]) указывает, что стерически разрешены

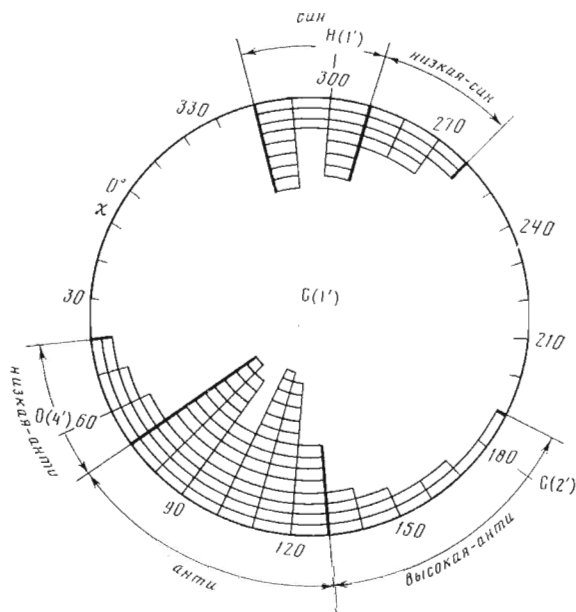


Рис. 2. Распределение гликозидных конформаций по данным рентгеноструктурного анализа [37-40]. Каждая клетка — отдельная структура

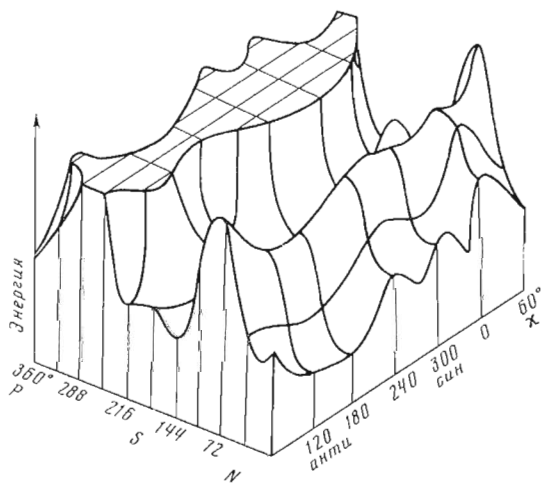


Рис. 3. Поверхность потенциальной энергии аденозина в пространстве гликозидного торсионного угла и фазового угла псевдowращения по данным квантовохимического расчета [44]

три области гликозидных углов — анти ( $\chi^*$  от 70 до 130°), син (290–320°) и высокая-анти (130–190°), причем последняя реализуется только в пуриновых соединениях.

5. К аналогичным выводам приводят результаты теоретического конформационного анализа (см., например, [41–44]).

\* Угол между C(1')—C(2')-связью и N(1)—C(2)-связью пиримидиновых или N(9)—C(4)-связью пуриновых нуклеозидов при проекции вдоль гликозидной связи. Отсчитывается по часовой стрелке от ближней связи к дальней [20].

Разрешенные по данным рентгеноструктурного и теоретического конформационного анализа конформации нуклеотидов

Рибозный цикл	Гликозидная связь		C(4')—C(5')			C(5')—O(5')			C(3')—O(3')		
	<i>анти</i>	<i>син</i>	<i>гош+</i>	<i>транс</i>	<i>гош-</i>	<i>гош+</i>	<i>транс</i>	<i>гош-</i>	<i>гош+</i>	<i>транс</i>	<i>гош-</i>
<i>N</i>	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
<i>S</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	ω 240°	

На основании приведенного выше анализа мы рассматривали равновесие гликозидных конформаций в рамках модели двух состояний: *син* ( $\chi$  от 70 до 130°) и *анти* ( $\chi$  от 290 до 320°).

Поскольку константа *син-анти-равновесия*

$$K = \frac{R_i^c - R_i^{\text{акс}}}{R_i^{\text{акс}} - R_i^a} \quad (8)$$

( $R_i^{\text{акс}}$  — экспериментально определяемая скорость релаксации *i*-го протона,  $R_i^a$  и  $R_i^c$  — скорости релаксации данного протона соответственно в *анти*- и *син*-состоянии), задача сводится к расчету  $R_i^a$  и  $R_i^c$  с использованием полученных выше величин  $\tau_c$ .

Однако на этом пути стоят две трудности. Первая связана с тем, что известно не усредненное во времени значение торсионного угла  $\chi$  в *анти*- и *син*-состояниях, а лишь широкие области наиболее вероятных значений, вторая — с недостатком наших знаний относительно возможных корреляций разных типов внутримолекулярных движений в молекуле нуклеотида. Действительно, корреляция гликозидных конформаций с конформациями других частей молекулы нуклеотида четко прослеживается по данным рентгеноструктурного и теоретического конформационного анализа (табл. 3). Приведенная на рис. 3 поверхность потенциальной энергии в конфигурационном пространстве гликозидного торсионного угла  $\chi$  и фазового угла псевдотворчения *P* наглядно демонстрирует взаимосвязь гликозидных конформаций с конформациями углеводного цикла. В то же время, несмотря на многочисленные ЯМР-исследования корреляции внутримолекулярных движений в растворах нуклеотидов [11, 12, 23, 25, 45–51], до настоящего времени не существует единой точки зрения на эту проблему. Если одни авторы [11, 12, 49, 50] настаивают на жесткой корреляции *N*- и *анти*-конформаций, то другие [23, 25, 51] отрицают наличие такой связи.

Очевидно, что первую трудность можно обойти, выбрав для измерения такой протон, скорость релаксации которого слабо зависит от  $\chi$  как в *син*-, так и в *анти*-области. Одновременно необходимо, чтобы средние скорости релаксации в *син*- и *анти*-областях существенно различались (см. ур-ние (8)). Как видно из рис. 4, этим условиям лучше всего удовлетворяет атом H(1') углеводного цикла. Дополнительным преимуществом в этом случае является то, что скорость продольной релаксации H(1'), как было показано выше, в пределах экспериментальной ошибки не зависит от конформаций экзоциклических заместителей. А это не только упрощает расчеты, но и исключает ошибки, связанные с недостатком данных о взаимосвязи конформаций экзоциклических заместителей с конформацией углеводного цикла и нуклеинового основания.



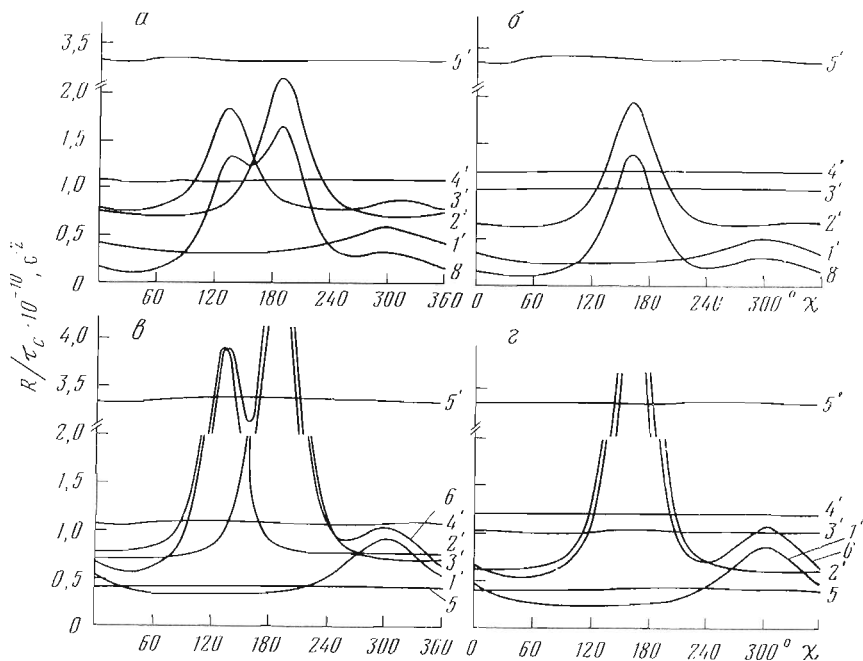


Рис. 4. Зависимость скорости спин-решеточной релаксации ядер атомов водорода рибонуклеотидов от торсионного угла  $\chi$  (во всех случаях экзоциклические группы закреплены в наиболее вероятных конформациях с  $\omega$  240,  $\xi$  60 и  $\theta$  180°): а — пуриновые нуклеотиды, C(3')-эндо-конформация рибозы; б — пуриновые нуклеотиды, C(2')-эндо-конформация рибозы; в — пиримидиновые нуклеотиды, C(3')-эндо-конформация рибозы; г — пиримидиновые нуклеотиды, C(2')-эндо-конформация рибозы.

Тогда динамическую модель можно упростить:

$$\left\{ \begin{array}{c} N\text{-син} \\ \updownarrow K_c \\ S\text{-син} \end{array} \right\} \xrightleftharpoons{K} \left\{ \begin{array}{c} N\text{-анти} \\ \updownarrow K_a \\ S\text{-анти} \end{array} \right\}$$

Эффективная константа равновесия

$$K = \frac{p_N^a + p_S^a}{p_N^c + p_S^c}, \quad (9)$$

где  $p_N^a$ ,  $p_S^a$ ,  $p_N^c$  и  $p_S^c$  — мольные доли *N-анти*-, *S-анти*-, *N-син*- и *S-син*-подсостояний, а  $K_c$  и  $K_a$  — константы, отражающие корреляцию между *N*-, *S*- и *син*-, *анти*-конформациями, причем

$$K_c = \frac{p_N^c}{p_S^c} \text{ и } K_a = \frac{p_N^a}{p_S^a}. \quad (10)$$

В условиях быстрого обмена

$$R_{1'}^{\text{экс}} = p_N^a R_N^a + p_S^a R_S^a + p_N^c R_N^c + p_S^c R_S^c. \quad (11)$$

Для рибонуклеотидов расчет скорости релаксации H(1') проводили в приближении (2), для 2'-дезоксинуклеотидов — в приближении (4) (табл. 4).

Поскольку экспериментально определяемая (табл. 2) эффективная константа равновесия *N*- и *S*-состояний

$$K_{\Phi} = \frac{p_N^a + p_N^c}{p_S^a + p_S^c}, \quad (12)$$

Теоретически рассчитанные для четырех подсостояний и экспериментально измеренные скорости продольной релаксации  $H(1')$  и константы *син-анти*-равновесия в растворе нуклеозидов и нуклеотидов

Соединение	$R_{1'}^{\text{экс}},$ с <sup>-1</sup>	$R_N^a,$ с <sup>-1</sup>	$R_S^a,$ с <sup>-1</sup>	$R_N^c,$ с <sup>-1</sup>	$R_S^c,$ с <sup>-1</sup>	$K^*$	$\rho^{a**}$
Ado	0,27	0,22	0,17	0,40	0,34	1,1	0,52
dAdo	0,36	0,3	0,25	0,42	0,36	0,4	0,30
Guo	0,2	0,17	0,12	0,29	0,25	1,3	0,57
dGuo	0,32	0,3	0,25	0,41	0,36	1,0	0,52
5'-AMP	0,26	0,29	0,22	0,51	0,44	24,0	0,96
5'-dAMP	0,45	0,48	0,40	0,65	0,58	9,0	0,90
3'-AMP	0,39	0,26	0,19	0,46	0,39	0,2	0,14
5'-GMP	0,29	0,29	0,22	0,51	0,44	4,5	0,82
5'-dGMP	0,49	0,48	0,4	0,65	0,58	2,0	0,67
Cyd ***	0,2	0,16	0,12	0,46	0,41	4,6	0,82
dCyd ***	0,24	0,24	0,20	0,44	0,39	7,3	0,88
5'-CMP ***	0,24	0,22	0,17	0,61	0,56	9,0	0,90
3'-CMP ***	0,29	0,22	0,17	0,61	0,56	3,2	0,76
5'-dCMP ***	0,33	0,37	0,31	0,67	0,60	—	1,00

\* Ошибка 20%. \*\* Ошибка 10%. \*\*\* Подтверждено измерением  $^5J_{1'5}$ .

достаточно знать величину корреляционной константы  $K_a(K_c)$ , чтобы определить константу *син-анти*-равновесия. Однако, как уже указывалось, данные относительно взаимосвязи конформации фуранозного цикла и гликозидной конформации весьма противоречивы. Для выяснения последствий, вызванных неправильной оценкой такой взаимосвязи, интересно проанализировать зависимость  $K$  от  $K_a$  при заданной  $K_\phi$ . Решая совместно уравнения (9) — (12), получаем

$$K = \frac{R_{1'}^{\text{экс}} - R_N^c \frac{K_\phi}{1 + K_\phi} - R_S^c \frac{1}{1 + K_\phi}}{(R_N^a - R_N^c) \frac{K_a}{1 + K_a} + (R_S^a - R_S^c) \frac{1}{1 + K_a} - R_{1'}^{\text{экс}} + R_N^c \frac{K_\phi}{1 + K_\phi} + R_S^c \frac{1}{1 + K_\phi}} \quad (13)$$

Очевидно, что если  $(R_N^a - R_N^c) \approx (R_S^a - R_S^c)$ , то  $K$  практически не зависит от  $K_a$ . Данные табл. 4 указывают, что для  $H(1')$  это условие выполняется удовлетворительно.

Тогда уравнение (13) упрощается до

$$K = \frac{R_{1'}^{\text{экс}}(1 + K_\phi) - R_N^c K_\phi - R_S^c}{R_N^a K_\phi + R_S^a - R_{1'}^{\text{экс}}(1 + K_\phi)} \quad (14)$$

(см. табл. 4).

В случае пиримидиновых соединений измерены дальние константы спин-спинового взаимодействия  $^5J_{1'5}$ . Ранее было показано, что величина этой константы зависит от гликозидной конформации и значения 0,3—0,5 Гц соответствуют *анти*-положению пиримидинового основания [1].

Для всех изученных соединений  $^5J_{1'5}$  равна 0,4—0,5 Гц (рис. 5), что независимо подтверждает результаты релаксационного исследования. Следует отметить, что измерение  $^5J_{1'5}$  для незамещенных цитозинового нуклеозидов и нуклеотидов осуществлено нами впервые. До настоящего времени такие измерения не удавались из-за уширения сигнала  $H(5)$  вследствие, вероятно, присутствия парамагнитных примесей [52].

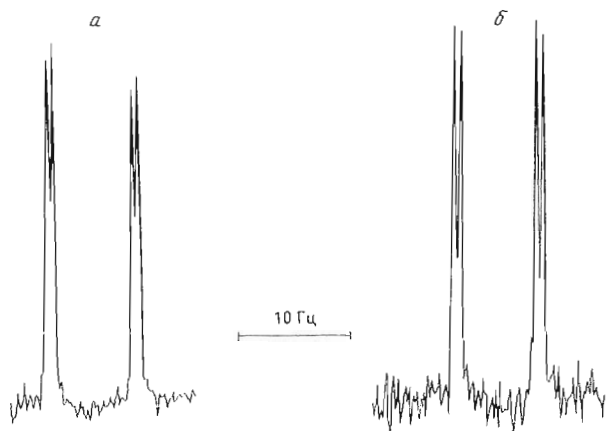


Рис. 5. Сигналы Н(5) в спектре ПМР цитидина (а) и 2'-дезоксцитидина (б)

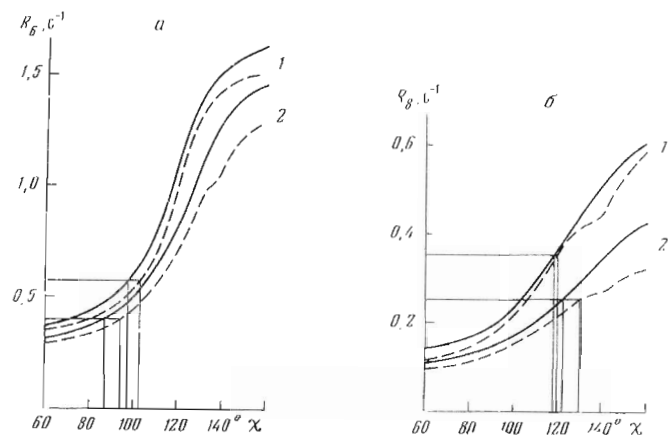
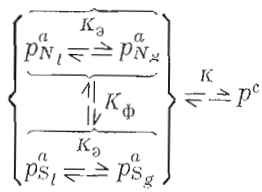


Рис. 6. Рассчитанные в приближении уравнений (2) (сплошная линия) и (4) (пунктир) зависимости скорости продольной релаксации от угла  $\chi$  в *анти*-области в сравнении с экспериментальными данными: а – атом Н(6) 5'-dCMP (1) и 2'-дезоксцитидина (2); б – атом Н(8) 5'-dGMP (1) и 2'-дезоксгуанозина (2)

#### Определение гликозидного торсионного угла $\chi$ в *анти*-состоянии

Для расчета усредненного во времени значения  $\chi$  в *анти*-состоянии была использована скорость спин-решеточной релаксации Н(8) пуриновых или Н(6) пиримидиновых нуклеотидов.

Расчет проводили в рамках динамической модели:



Экспериментально измеренные скорости спин-решеточной релаксации Н(8) или Н(6) нуклеозидов и нуклеотидов и рассчитанные значения  $\chi_{анти}$  в сравнении с литературными данными

Соединение	$R_{8(6)}^{ЭКС}$ , с <sup>-1</sup>	$\chi_{анти}$ , град				
		Данная работа *	Литературные данные **			В
			А [37—40]	Б [3]		
				$\chi_N$	$\chi_S$	
Ado	0,32	121	70; 103			
dAdo	0,28	120	71			
Guo	0,3	118	72; 107			
dGuo	0,26	132	148; 153			
5'-AMP	0,42	112	85; 129	120	100	70—80 [14] 120 [51]
3'-AMP	0,5	<i>высокая-анти</i>	64			
5'-dAMP	0,32	114	63; 123	120	60	
5'-GMP	0,46	117	72	180	120	120 [51]
5'-dGMP	0,35	120	54; 114	160	120	
Cyd	0,35	70	78			95 [25]
dCyd	0,40	94	60			
5'-CMP	0,77	110	100; 107	90	100	115 [51]
3'-CMP	0,79	120	102; 99			
5'-dCMP	0,56	112	54	100	120	

\* Ошибка  $\pm 7\%$ .

\*\* А — данные рентгеноструктурного анализа; Б — ЯМР в водном растворе, рН 7,6 с применением лантанидных сдвигающих реагентов; В — по скоростям продольной релаксации, водный раствор, рН 7.

Эффективная константа

$$K_3 = \frac{p_g}{p_i} = \frac{p_g}{1 - p_g}, \quad (15)$$

где  $p_g \equiv p_{ром}$ , а  $p_i = p_{ром} + p_{транс}$ .

Ожидаемая зависимость скорости релаксации Н(8) или Н(6) от  $\chi$  в *анти*-области при фиксированных значениях  $K$ ,  $K_\Phi$  и  $K_3$  (табл. 2) описывается выражением

$$R(\chi) = \frac{K[R_{S_i}(\chi) + R_{S_g}(\chi)K_3 + R_{N_i}(\chi)K_\Phi + R_{N_g}(\chi)K_3K_\Phi]}{(1+K)(1+K_\Phi)(1+K_3)} + \frac{1}{1+K} \bar{R}^c. \quad (16)$$

Сравнивая экспериментальную скорость продольной релаксации Н(8) или Н(6) с  $R(\chi)$ , определяли усредненное во времени значение  $\chi$  в *анти*-состоянии. Поскольку существует теоретическая неопределенность, связанная с наличием быстро релаксирующих между собой ядер Н(5'), Н(5'') и Н(2'), Н(2''), расчет проводили как в приближении (2), так и в приближении (4). Как видно из рис. 6, оба метода расчета дают близкие значения гликозидного угла.

Определенные по предложенной процедуре величины  $\chi_{анти}$  приведены в табл. 5 в сравнении с литературными данными. Учитывая использование приближений, полученным величинам следует придавать полуколичественный характер. Они правильно отражают относительное изменение  $\chi_{анти}$  в ряду близких по строению соединений.

В табл. 6 приведены результаты настоящего исследования в сравнении с литературными данными. Бросается в глаза существенное различие результатов количественных исследований, полученных разными авторами. Так, величины мольной доли *анти*-состояния колеблются от 0,96 до 0,20 в случае 5'-AMP и от 0,75 до 0,05 в случае 3'-CMP. Для ответа на

Соотношение *син*- и *анти*-популяций в водном растворе (рН 7) изученных соединений в сравнении с литературными данными

Соединение	Данная работа				Литературные данные: р <sup>а</sup>					Скорость релаксации
	К	р <sup>а</sup> ± 5%	ΔJ <sup>1/2</sup> , Гц	Химические сдвиги * [1]	J <sup>2</sup> , НвС [1]	ЯЭО [1]	Ионы лантанидов * [3]			
Ado	1,0	0,52		<i>анти/син</i>	<i>син/анти</i>	0,12–0,19 <sup>2*</sup>				
dAdo	0,4	0,30		<i>син/анти</i>	<i>син/анти</i>	0,31 <sup>3*</sup>				
Guo	1,3	0,57		<i>анти/син</i>	<i>син/анти</i>	0,56 <sup>2*</sup>	0,19 <sup>3*</sup>			
dGuo	1,0	0,52		<i>анти/син</i>	<i>анти/син</i>					
5'-AMP	24,0	0,96		<i>анти</i>	<i>анти</i>	0,76		<i>анти</i>	0,33–0,53 [14] 0,20 [51]	
3'-AMP	0,2	0,14		<i>син/анти</i>	<i>син/анти</i>	0,28		0,6 <sup>4*</sup>		
5'-dAMP	9,0	0,90		<i>анти</i>	<i>анти</i>			<i>анти</i>		
5'-GMP	4,5	0,82		<i>анти</i>	<i>анти</i>	0,54		<i>анти</i>	0,16 [51]	
5'-dGMP	2,0	0,67		<i>анти</i>	<i>анти</i>			<i>анти</i>		
Cyd	4,56	0,82	0,4	<i>анти</i>	<i>анти</i>		<i>син/анти</i> 0,79 <sup>5*</sup>		0,5 [25]	
dCyd	7,3	0,88	0,5	<i>анти/син</i>	<i>анти/син</i>					
5'-CMP	9,0	0,90	0,4	<i>анти</i>	<i>анти</i>		0,81 <sup>5*</sup>	<i>анти</i>	0,32 [51]	
3'-CMP	3,2	0,76	0,4	<i>анти/син</i>	<i>анти/син</i>		0,05 <sup>5*</sup>			
5'-dCMP	—	1,00	0,4	<i>анти/син</i>	<i>анти/син</i>			<i>анти</i>		

\* При качественной оценке равновесия термин «анти» означает значительное преобладание этой популяции, «анти/син» и «син/анти» — близкие относительные веса популяций с небольшим преобладанием соответственно *анти* или *син*.  
<sup>2\*</sup> Раствор в DMSO-d<sub>6</sub>.  
<sup>3\*</sup> Раствор в DMSO-d<sub>6</sub>.  
<sup>4\*</sup> Данные из работы [1].  
<sup>5\*</sup> Данные из работы [4].

Сравнение конформационных параметров нуклеозидов и нуклеотидов  
рибо- и дезоксирида (водный раствор, рН 7).  
Для гликозидной связи приведены результаты настоящего исследования,  
а в скобках — литературные данные (см. табл. 1 и 6)

Нуклеозид	Параметр	5'-Нуклеотиды	Нуклеозиды	3'-Нуклеотиды
Ado	$p^a$	0,96 (0,60 *, 0,76)	0,52	0,14 (0,28)
	$p_N$	0,40	0,40	0,36
	$p_g$	0,76	0,61	0,74
dAdo	$p^a$	0,90	0,20	( <i>син/анти</i> )
	$p_N$	0,35	0,33	0,31
	$p_g$	0,66	0,53	0,62
Guo	$p^a$	0,82 (0,54; 0,35 *)	0,57	( <i>син/анти</i> )
	$p_N$	0,39	0,54	0,41
	$p_g$	0,72	0,60	0,74
dGuo	$p^a$	0,67	0,52	( <i>син/анти</i> )
	$p_N$	0,33	—	0,32
	$p_g$	0,70	0,49	0,76
Cyd	$p^a$	0,90 (0,81; 0,76 *)	0,82 (0,79; 0,89 *)	0,76
	$p_N$	0,56	0,60	0,60
	$p_g$	0,86	0,57	0,68
dCyd	$p^a$	1,00	0,88	( <i>син/анти</i> )
	$p_N$	0,38	0,40	0,30
	$p_g$	0,65	0,44	0,47
Urd	$p^a$	(0,83)	( <i>анти</i> )	( <i>анти</i> )
	$p_N$	0,49	0,54	0,58
	$p_g$	0,89	0,65	0,70
dThd	$p^a$	( <i>анти</i> )	( <i>анти/син</i> )	( <i>син/анти</i> )
	$p_N$	0,32	0,39	0,36
	$p_g$	0,66	0,44	0,46

\* Пересчитанные данные, см. текст.

вопрос о применимости релаксационных методик для изучения гликозидной конформации следует тщательно проанализировать методики, используемые в цитированных работах, и провести сравнение с результатами независимых методов.

Измерение  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -констант спин-спинового взаимодействия для всех изученных в данной работе цитозиновых соединений указывает на усредненную во времени *анти*-ориентацию нуклеинового основания. Этот вывод подтверждается величинами  $^3J_{1'3}$ , поскольку показано, что значения 0,4–0,5 Гц однозначно коррелируют с преобладанием *анти*-популяции в равновесной смеси. Таким образом, результат, полученный методом ЯЭО [4] для 3'-СМР ( $p^a$  0,05), следует, вероятно, отнести к разряду артефактов. В случае Cyd и 5'-СМР данные этих авторов в пределах ошибки совпадают с полученными в настоящей работе.

Использование методики, описанной в работах французских авторов [23, 25, 51], приводит к систематически заниженным величинам  $p^a$ , которые группируются в области 0,1–0,3 независимо от природы основания. Значительное преобладание *син*-популяции ( $p^c$  0,8–0,9) получено этими авторами и для пуриннуклеозидтрифосфатов [23], для которых результаты

других методов указывают на *анти*-ориентацию основания. На наш взгляд, такое несоответствие связано с недостатками математической процедуры.

Как видно из табл. 2 и 4, полученные в этих работах величины  $\tau_c$  и углов  $\chi$  хорошо совпадают с полученными в настоящей работе и независимыми методами.

Некорректность возникает при вычислении  $K$ . Но если, воспользовавшись экспериментальными скоростями релаксации  $H(1')$  и величинами  $\tau_c$ , приведенными в этих работах, рассчитать  $K$  по предложенному нами методу, то результаты (табл. 7, в скобках помечены звездочкой) удовлетворительно согласуются с данными нашей работы и других методов.

Анализ конформационных параметров (табл. 7), а также результатов рентгеноструктурного и теоретического конформационного анализа позволяет выдвинуть ряд постулатов, характеризующих конформационную ситуацию в растворе нуклеозидов и нуклеотидов.

1. С точки зрения ван-дер-ваальсовых взаимодействий *син*- и *анти*-конформации пуриновых соединений приблизительно равновероятны. Энергетическая яма, соответствующая *анти*-области гликозидных углов, относительно широкая, с пологими краями. Стерически разрешены конформации со значениями  $\chi$  в области  $130-180^\circ$  (*высокая-анти*-конформация).

2. Пиримидиновые соединения характеризуются узкими потенциальными ямами с крутыми склонами. Энергетически более выгодна *анти*-конформация. *Высокая-анти*-конформация запрещена.

3. Углеродный цикл играет ключевую роль в организации конформационной ситуации. Именно через него перераспределяются взаимодействия экзоциклических заместителей.

4. *N*- и *S*-состояния углеродного цикла характеризуются близкими значениями стандартного химического потенциала. Соотношение популяций в случае природных соединений изменяется от  $2/3$  до  $3/2$ .

5. Соотношение *N*- и *S*-популяций зависит от природы основания и сахарного остатка. Относительный вес *S*-популяции увеличивается при переходе от пиримидиновых к пуриновым и от рибо- к  $2'$ -дезоксисоединениям.

6. Несмотря на малую разность стандартных химических потенциалов между *N*- и *S*-состояниями, возможность перераспределения энергии взаимодействий экзоциклических групп по большому числу степеней свободы (торсионные и валентные углы и длины связей) формально проявляется в тенденции к сохранению равновесного состояния («псевдожесткость» углеродного цикла).

7. Если рассматривать конформацию относительно  $C(4')-C(5')$ -связи, то *гош*<sup>+</sup>-конформация более выгодна в *N*-состоянии рибозного цикла, поскольку  $5'-CH_2OH$ -группа расположена на псевдоэкваториальной связи.

8. *Анти*-состояние пуриновых и пиримидиновых соединений, не замещенных по 8-му (6-му) положению, стабилизирует электростатическое притяжение между положительно заряженным фрагментом молекулы  $C(8)-N[C(6)-N]$  и отрицательным зарядом  $5'$ -фосфата или  $5'$ -ОН-группы.

9. *Син*-состояние пуриновых нуклеозидов, не несущих заместителя при  $N(3)$ , стабилизировано  $5'$ -ОН... $N(3)$ -водородной связью.

10. В водном растворе отсутствует водородная связь между карбонилем во 2-м положении пиримидинового цикла и  $5'$ -ОН-группой.

11. Оба «стягивающих» взаимодействия, электростатическое притяжение и внутримолекулярная водородная связь, в силу одипаковой направленности стабилизируют *гош*<sup>+</sup>-популяцию  $C(4')-C(5')$ -связи и равновесное состояние углеродного цикла.

Рассмотрим поведение нуклеозидов и нуклеотидов с точки зрения предложенной концепции.

*Пуриновые нуклеозиды и нуклеотиды.* В растворе  $5'$ -нуклеотидов как рибо-, так и дезоксирида следует ожидать преобладания *анти*-популяции,

поскольку она стабилизирована сильным кулоновским взаимодействием (ионизованная фосфатная группа), в то время как стабилизация *син*-состояния водородной связью невозможна. При переходе к пури nukлеозидам доля *син*-состояния должна возрастать: с одной стороны, уменьшается энергия кулоновских взаимодействий, стабилизирующих *анти*-состояние, с другой — химический потенциал *син*-состояния понижается за счет водородной связи. Действительно, как показывают квантовохимические расчеты [53], положительный заряд на фрагменте C(8)—N достигает величины  $\sim 0,2$ . Отрицательный заряд уменьшается от  $-2$  до  $\sim -0,25$  при переходе от 5'-нуклеотидов к нуклеозидам. Для 3'-фосфатов можно ожидать дальнейшего увеличения доли *син*-популяции. Электростатическое притяжение 3'-фосфатной группы в *анти*-конформации заставляет основание поворачиваться имидазольным циклом в сторону C(2') (*высокая-анти*-конформация), где ван-дер-ваальсовы контакты менее благоприятны, что приводит к повышению энергии *анти*-состояния, в то время как *син*-состояние стабилизировано водородной связью.

Рассмотрим конформационное поведение углеводного цикла. В растворе 5'-нуклеотидов равновесное состояние углеводного цикла стабилизировано лишь в *анти*-состоянии. В *син*-состоянии водородная связь отсутствует и преобладают эффекты пространственного отталкивания, что должно приводить к увеличению веса *S*-популяции, так как в этом случае основание находится в менее пространственно затрудненном экваториальном положении. Однако поскольку относительный вес *син*-популяции весьма мал, ее влияние не скажется заметно на интегральной оценке *N-S*-равновесия углеводного цикла.

В растворе нуклеозидов равновесное состояние углеводного цикла стабилизировано и в *анти*-, и в *син*-состоянии. Таким образом, в случае пури нуклеозидов не следует ожидать существенной зависимости соотношения *N*- и *S*-популяций от константы *син-анти*-равновесия. В то же время, учитывая ослабление электростатического притяжения в *анти*-состоянии по сравнению с 5'-нуклеотидами, не следует удивляться небольшому уменьшению содержания *N*-конформации, коррелирующему с увеличением относительного веса *анти*-состояния.

Наконец, в 3'-нуклеотидах равновесное состояние углеводного цикла стабилизировано водородной связью в *син*-состоянии. Но поскольку относительный вес *анти*-состояния (*высокая-анти*-конформация) мал, экспериментально не наблюдается изменений в положении *N-S*-равновесия по сравнению с нуклеозидами и 5'-нуклеотидами.

Таким образом, следует ожидать, что в ряду пуриновых соединений с незамещенными 8-м и 3-м положениями соотношение *N*- и *S*-популяций будет оставаться постоянным независимо от наличия и места присоединения фосфатной группы.

Поскольку и электростатическое притяжение, и водородная связь стабилизируют *гош*<sup>+</sup>-конформацию C(4')—C(5')-связи, не следует ожидать существенной зависимости доли *гош*<sup>+</sup>-популяции от константы *син-анти*-равновесия в ряду пуриновых соединений.

Максимальное содержание *гош*<sup>+</sup>-популяции должно наблюдаться в 5'-фосфатах (сильное электростатическое притяжение в *анти*- и малая доля *син*-состояния) и 3'-фосфатах (стабилизация водородной связью в *син*- и малая доля *анти*-состояния). В случае нуклеозидов можно ожидать снижения доли *гош*<sup>+</sup>-популяции вследствие существенного уменьшения кулоновского взаимодействия в *анти*-состоянии, вклад которого в равновесие достаточно велик, т. е. меньшее содержание *гош*<sup>+</sup>-популяции соответствует меньшей доле *син*-состояния.

Наконец, может наблюдаться уменьшение  $p_g$  при переходе от рибок соответствующим 2'-дезоксисоединениям, что коррелирует с уменьшением доли *N*-состояния.



Как видно из табл. 7, приведенный анализ хорошо объясняет экспериментальные данные.

Однако поведение 8-замещенных аналогов пуриновых нуклеозидов, которые в растворе существуют преимущественно в *син*-конформации, на первый взгляд противоречит сделанным выше выводам. В этом случае наблюдается увеличение относительного веса *S*-популяции (см. обзор [1]):

	Ado	8-BrAdo	5'-AMP	8-Br-5'-AMP
$p_S$	0,60	0,72	0,60	0,62
$p_g$	0,61	0,74	0,76	0,19

Но это кажущееся противоречие. Внимательное рассмотрение показывает, что поведение 8-бромаденозинов хорошо объясняется в рамках предложенной концепции.

*Син-гош*<sup>+</sup>-популяция нуклеозида стабилизирована водородной связью. В *анти*-состоянии эффективный объем основания существенно больше, чем в случае Ado, как за счет большего объема атома брома по сравнению с водородом, так и за счет электростатического отталкивания. В соответствии с предложенной концепцией поведение 8-BrAdo можно приближенно описать равновесием *син-гош*<sup>+</sup>-*N(S)*- и *анти-транс(гош*<sup>-</sup>)-*S*-конформеров. Поскольку *син*-конформер существенно преобладает, можно ожидать некоторого увеличения  $p_g$  по сравнению с Ado. Возрастание же доли *S*-популяции отражает не увеличение веса *син*-состояния, а, наоборот, тот факт, что равновесная смесь содержит ощутимое количество *анти*-состояния. По величинам  $p_S$  и  $p_g$  можно оценить долю *син*-популяции, которая, вероятно, равна ~0,9.

В 8-Br-5'-AMP водородная связь в *син*-состоянии невозможна. Следствие этого — резкое снижение доли *гош*<sup>+</sup>-популяции, что и наблюдается экспериментально.

*Пиримидиновые нуклеозиды и нуклеотиды.* С точки зрения предложенной концепции пиримидиновые нуклеозиды и нуклеотиды, не несущие заместителя в положении 6 гетероциклического основания, должны существовать преимущественно в *анти*-состоянии, причем наибольшего содержания *анти*-, *N*- и *гош*<sup>+</sup>-популяций следует ожидать в растворе 5'-фосфатов. При переходе к нуклеозидам относительный вес *гош*<sup>+</sup>-популяции несколько уменьшается вследствие ослабления электростатического притяжения в преобладающей *анти*-конформации. Поскольку в *син*-состоянии отсутствует стабилизирующая водородная связь, в случае пиримидиновых соединений заметное уменьшение доли *гош*<sup>+</sup>-конформации коррелирует с увеличением относительного веса *син*-популяции. Сохранение доли *гош*<sup>+</sup>-популяции при переходе от нуклеозидов к 3'-нуклеотидам позволяет утверждать, что в противоположность пуриновым соединениям в этом не наблюдается увеличения содержания *син*-конформации.

Таким образом, в ряду природных пиримидиновых соединений «5'-нуклеотиды — нуклеозиды — 3'-нуклеотиды» конформационная ситуация меняется мало. Во всех случаях преобладает *анти*-состояние.

Предложенная нами концепция удовлетворительно описывает конформационную ситуацию в растворе нуклеозидов и нуклеотидов и позволяет глубже понять причины и следствия взаимосвязи внутримолекулярных движений.

### Экспериментальная часть

В работе использованы рибонуклеотиды и нуклеозиды (Reanal, Венгрия), 2'-дезоксирибонуклеозиды (Sigma, США) и 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-фосфаты (СКТБ БАВ, Новосибирск).

Для очистки от парамагнитных ионов нуклеозиды перекристаллизовывали из H<sub>2</sub>O, содержащей 10<sup>-2</sup> М EDTA, а нуклеотиды пропускали через

Chellex-100 (Na<sup>+</sup>-форма) (Bio-Rad, США), доводили pH до 7,2 и лиофилизовали. Навеску образца (20 мкмоль) и EDTA (2 мкмоль) растворяли в 1 мл 99,8%-ной <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, лиофилизовали, эту операцию повторяли еще раз, остаток растворяли в 0,7 мл 99,9%-ной <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O и помещали в ампулу объемом 5 мл. Растворенный кислород удаляли вакуумированием объема над замороженным образцом до 10<sup>-4</sup> мм рт. ст. с размораживанием в том же объеме (5 циклов), после чего ампулу запаивали в атмосфере инертного газа.

Спектры ЯМР снимали в импульсном режиме на спектрометре XL-100-15A (Varian, США) с фурье-преобразованием спада индуцированного сигнала на ЭВМ VDM 620L (США). Для измерения времен спин-решеточной релаксации T<sub>1</sub> использовали стандартную программу SSFT с импульсной последовательностью «180° — HSP — τ — 90°». Каждое измерение повторяли дважды. Время задержки между импульсами τ варьировали в интервале 0 < τ < 1,5T<sub>1</sub>. Величины T<sub>1</sub> вычисляли в одноэкспоненциальном приближении методом наименьших квадратов на ЭВМ VDM 620L в системе «Adapts». Все измерения проводили при 38° С.

Обмен Н(8) на дейтерий осуществляли нагреванием ампулы с образцом 12 ч при 70° С.

Обмен Н(5) и Н(6) в цитидине и 2'-дезоксцитидине проводили по модифицированному методу Раби и Фокса [54]. К раствору 4 мкмоль нуклеозида в 10 мл гексадейтеродиметилсульфоксида добавляли 4 мл 2,5 М раствора MeONa в MeO<sup>2</sup>H и смесь нагревали 20 ч при 60° С. Охлажденный раствор наносили на колонку с дауэксом-50 (H<sup>+</sup>-форма, 25 мл). Промывали водой до окончания УФ-поглощения и нуклеозид элюировали 5%-ным водным аммиаком. Элюат упаривали в вакууме досуха и остаток перекристаллизовывали из водного спирта. Выход 62—67%.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Davies D. B. (1978) *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **12**, 135—225.
2. Gerald C. F. G. C., Williams R. J. P. (1978) *Eur. J. Biochem.*, **85**, 463—470.
3. Dobson Ch. M., Gerald C. F. G. C., Ratcliffe G., Williams R. J. P. (1978) *Eur. J. Biochem.*, **88**, 259—266.
4. Карпейский М. Я., Яковлев Г. И. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 749—757.
5. Imoto T., Akasaka K., Hatano H. (1974) *Chem. Letters*, 73—74.
6. Solomon I. (1955) *Phys. Rev.*, **99**, 559—565.
7. Noggle J. H., Schirmer R. E. (1971) *The Nuclear Overhauser Effect. Chemical Application*, Acad. Press, N. Y.—London.
8. Bock K., Hall L. D. (1977) *J. Carbohydr., Nucleosides, Nucleotides*, **4**, 83—92.
9. Бобрускин И. Д., Гуляев Н. Н., Кирпичников М. П., Северин Е. С., Туницкая В. А., Флорентьев В. Л. (1979) *Молекулярн. биология*, **13**, 118—130.
10. Chachaty C., Zemb T., Langlet G., Son T.-D., Buc H., Morange M. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **62**, 45—53.
11. Lüdemann H.-D., Westhof E., Röder O. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **49**, 143—150.
12. Westhof E., Röder O., Croneiss I., Lüdemann H.-D. (1975) *Z. Naturforsch.*, **30c**, 131—140.
13. Imoto T., Akasaka K., Hatano H. (1975) *Chem. Phys. Letters*, **32**, 86—89.
14. Son T.-D., Neumann J.-M., Thierry J.-M., Tom H.-D., Igolen J., Guschlbauer W. (1977) *J. Amer. Chem. Soc.*, **99**, 3267—3273.
15. Бобрускин И. Д., Покровская М. Ю., Кирпичников М. П., Флорентьев В. Л. (1979) *Молекулярн. биология*, **13**, 1407—1412.
16. Бобрускин И. Д., Кирпичников М. П., Крицын А. М., Михайлов С. Н., Мишарин А. Ю., Флорентьев В. Л. (1976) *Молекулярн. биология*, **10**, 1111—1115.
17. Lüdemann H.-D., Röder O. (1975) *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 4402—4403.
18. Saito H., Mantsch H., Smith I. C. P. (1973) *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 8453—8455.
19. Zens A. P., Fogle P. T., Bryson T. A., Dunlap R. B., Fisher R. R., Ellis P. D. (1976) *J. Amer. Chem. Soc.*, **98**, 3760—3764.
20. Arnott S., Hukins D. W. L. (1972) *Biochem. J.*, **130**, 453—465.
21. Arnott S., Smith P. J. C., Chandrasekharan R. (1976) *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology (3rd edn.)*, Nucleic Acids, **11**, 411—422.
22. Imoto T., Shibata S., Akasaka K., Hatano H. (1977) *Biopolymers*, **16**, 2705—2721.
23. Son T.-D., Chachaty C. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **500**, 405—418.
24. Inagaki F., Tasumi M., Miyazawa T. (1978) *Biopolymers*, **17**, 267—289.
25. Neumann J. M., Borrel J., Thierry J. M., Guschlbauer W., Son T.-D. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **479**, 427—440.

26. Rabczenko A., Jankowski K., Davies D. B. (1978) *Stud. biophys.*, **67**, 33-34.
27. Pitha J., Chladek S., Smrt J. (1963) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **28**, 1622-1624.
28. Rhodes L. M., Schimmel P. R. (1971) *Biochemistry*, **10**, 4426-4433.
29. Hemmes P., Oppenheimer L., Jordan F. (1974) *J. Amer. Chem. Soc.*, **96**, 6023-6025.
30. Брагинская Ф. И. (1976) Материалы 3-й Всес. конф. по вопросам ультразвуков. спектроскопии, Вильнюс, 1976. Каунас, 1976, с. 35-38.
31. Hemmes P., Oppenheimer L., Jordan F. (1976) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 929-930.
32. Jochims J. C., Pfeleiderer W., Kobayashi K., Ritzmann G., Hutzenlaub W. (1973) *Chem. Ber.*, **106**, 2975-2981.
33. Woithenburg von H., Skrzalewski A., Jochims J. C., Pfeleiderer W. (1974) *Tetrahedron Lett.*, 4063-4066.
34. Pfeleiderer W., Ritzmann G., Harzer K., Jochims J. C. (1973) *Chem. Ber.*, **106**, 2982-2991.
35. Jochims J. C., Woithenburg von H., Wegner G. (1978) *Chem. Ber.*, **111**, 1693-1708.
36. Depmeier K., Woithenburg von H., Jochims J. C. (1978) *Chem. Ber.*, **111**, 2010-2020.
37. Sundaralingam M. (1969) *Biopolymers*, **7**, 821-860.
38. Sundaralingam M. (1972) *Jerusalem Symp. Quantum Chem. Biochem.*, **4**, 73-101
39. Sundaralingam M. (1973) *Jerusalem Symp. Quantum Chem. Biochem.*, **5**, 417-456.
40. Sundaralingam M. (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **225**, 3-42.
41. Lakshminarayanan A. V., Sasisekharan V. (1969) *Biopolymers*, **8**, 475-488.
42. Lakshminarayanan A. V., Sasisekharan V. (1969) *Biopolymers*, **8**, 489-503.
43. Kister A. E., Dashevsky V. G. (1976) *Biopolymers*, **15**, 1009-1013.
44. Saran A., Perahia D., Pullmann B. (1973) *Theor. chim. acta*, **30**, 31-44.
45. Hruska F. E., Smith J. C. P., Dalton J. G. (1971) *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 4334-4338
46. Wood D. J., Mynott R. J., Hruska F. E., Sarma R. H. (1973) *FEBS Lett.*, **34**, 323-326.
47. Sarma R. H., Mynott R. J., Wood D. J., Hruska F. E. (1973) *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 6457-6459.
48. Lee C.-H., Evans F. E., Sarma R. H. (1975) *J. Mol. Biol.*, **250**, 1290-1296.
49. Plach H., Westhof E., Lüdemann H.-D., Mengel R. (1977) *Eur. J. Biochem.*, **80**, 259-304.
50. Lüdemann H.-D., Röder O., Westhof E., Goldammer von E., Müller A. (1975) *Biophys. Struct. Mechan.*, **1**, 121-137.
51. Chachaty C., Langlet G. (1976) *FEBS Lett.*, **68**, 181-186.
52. Hruska F. E., Mak A., Singh H., Shugar D. (1973) *Can. J. Chem.*, **51**, 1099-1106.
53. Renugopalakrishnan V., Lakshminarayanan A. V., Sasisekharan V. (1971) *Biopolymers*, **10**, 1159-1167.
54. Rabi J. A., Fox J. J. (1973) *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 1628-1632.

Поступила в редакцию  
29.X.1980

## NMR STUDY OF CONFORMATION SITUATION IN AQUEOUS SOLUTIONS OF NUCLEOSIDES AND NUCLEOTIDES

BOBRUSKIN I. D., KIRPICHNIKOV M. P., POKROVSKAYA M. Yu.,  
FLORENTIEV V. L.

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

The method for determining the apparent rotation correlation time ( $\tau_c$ ) based on measuring the spin-lattice relaxation rate of H(5) atom of pyrimidine nucleosides and nucleotides was proposed. With purine compounds, the H(1') relaxation rate after H(8) exchange for deuterium was used for this purpose. For calculation of the contribution of the H(2') and H(2'') nuclei rapid relaxation to the H(1') relaxation rate, the empirical approximation was suggested. The calculated  $\tau_c$  values were used for determination of the *syn-anti*-equilibrium constants in nucleoside and nucleotide aqueous solutions. Both ribo- and 2'-deoxy-5'-nucleotides were demonstrated to exist mainly in the *anti*-state. The predominance of *anti*-population was also observed for pyrimidine nucleosides and pyrimidine 3'-nucleotides. The *syn-anti* equilibrium constants in solutions of pyrimidine nucleosides are close to 1, whereas in the 3'-AMP solution the equilibrium is shifted towards the *syn*-state. The time-averaged values of glycosidic torsional angle in the *anti*-state were calculated. The conformational situation in the nucleoside and nucleotide aqueous solutions and a possible correlation of intramolecular motions were discussed.