



УДК 547.857.7'522.06

**НОВЫЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПОЛОЖЕНИЯ *СИН-АНТИ*-РАВНОВЕСИЯ В РАСТВОРЕ
ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ И НУКЛЕОТИДОВ***Завгородний С. Г., Флорентьев В. Л.***Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Предложен простой метод определения относительного веса *син*-популяции в растворе пуриновых нуклеозидов и нуклеотидов, основанный на трех параметрах спектров ЯМР: разности химических сдвигов $H_{2'}$ и $H_{3'}$, константе спин-спинового взаимодействия $J_{1'2'}$ и сумме констант $J_{4'5'a}$ и $J_{4'5'b}$. Метод обладает достаточной универсальностью. Он применим к пуриновым нуклеозидам, 5'-дезоксинуклеозидам, 5'-нуклеотидам, включая ди- и трифосфаты, 2'- и 3'-нуклеотидам, 3', 5'- и 2', 3'-цикло-нуклеотидам, содержащим как природные нуклеиновые основания, так и модифицированные по положениям 2, 6 и 8. Положенная в основу описанного метода модель может быть распространена на модифицированные по сахару и пиримидиновые нуклеозиды.

Положение *син-анти*-равновесия является наиболее важным аспектом конформационной ситуации в растворе нуклеозидов и нуклеотидов. Очевидно, что, поскольку гликозидная конформация в значительной степени определяет химические и физические свойства таких соединений, именно к ней обращаются исследователи в своих далеко не всегда успешных попытках связать биологические свойства нуклеозидов с их конформационным поведением.

В настоящее время в динамическом конформационном анализе нуклеозидов и нуклеотидов наблюдается острый дефицит простых и достаточно универсальных методов определения относительного веса гликозидных популяций. Методы, основанные на круговом дихроизме [1] или константах скалярного спин-спинового взаимодействия (КССВ) $H_{1'}$ и ядер ^{13}C в положениях 2 и 6 пиримидиновых или положениях 8 и 4 пуриновых нуклеозидов [2], позволяют получить лишь качественную информацию. Для количественного определения используют скорости спин-решеточной релаксации протонов [3], ядерный эффект Оверхаузера [2, 4] и возмущение спектров ЯМР в присутствии ионов лантанидов [2, 5]. Однако эти методы предъявляют жесткие требования к подготовке образца, весьма трудоемки и сопряжены с обработкой результатов на ЭВМ. Кроме того, применение релаксационных методик ограничено 8-незамещенными пуриновыми или 6-незамещенными пиримидиновыми соединениями, а применение лантанидов — нуклеотидами.

Заманчиво использовать для определения доли *син*-популяции положение и мультиплетность сигналов протонов. Современные спектрометры ЯМР позволяют определить химические сдвиги и КССВ быстро и с высокой точностью в широком интервале концентраций и температур при относительно мягких требованиях к частоте и подготовке образца.

Однако если релаксационные методики базируются на хорошо разработанной, изящной теории, то количественный расчет химических сдвигов, несмотря на интенсивные исследования в этой области (см., например, [6, 7]), все еще остается делом будущего. В настоящее время можно с уверенностью говорить лишь о характере зависимости химических сдвигов от конформационных параметров. Поэтому использование химических сдвигов возможно лишь на эмпирической основе.

* Корреспонденцию просим адресовать указанному автору.

Впервые попытку такого рода предприняла еще в 1960 г. К. Джардетская [8]. Для качественной оценки положения *син-анти*-равновесия она использовала зависимость химического сдвига Н8 пуриновых 5'-нуклеотидов от рН. Несмотря на очевидные недостатки и ограниченную применимость (только к 5'-нуклеотидам), этот метод широко использовался в 60-е годы, хотя и тогда уже было ясно, что химические сдвиги протонов сахарного кольца более информативны. С появлением более совершенных спектрометров и методов симуляции спектров определение химических сдвигов протонов углеводного цикла превратилось из сложной, не всегда решаемой задачи в рутинную процедуру. Благодаря в основном работам Швейцера с сотр. [9] были выявлены основные эмпирические закономерности влияния анизотропии пуринового цикла на химические сдвиги протонов рибозы:

1) основной вклад в дезэкранирование протонов рибозы вносит N3-атом пуринового цикла;

2) замещение при C2 и C6 практически не сказывается на химических сдвигах протонов рибозы;

3) заместители в положении 8 непосредственно влияют лишь на химический сдвиг Н1', на остальные же протоны — опосредованно, через сдвиг конформационного равновесия;

4) увеличение доли *син*-популяции проявляется в сильном дезэкранировании Н2'; химические сдвиги Н3', Н4' и Н5' меняются незначительно (обычно слегка уменьшаются).

Таким образом, положение сигнала Н2' в принципе может служить мерой соотношения *син*- и *анти*-популяций. Однако химический сдвиг Н2' зависит не только от положения *син-анти*-равновесия, но и от величины гликозидного угла в *син*- и *анти*-области, конформации рибозы и 5'-СН₂ОН-группы, природы заместителей в нуклеиновом основании, растворителя и т. д. и поэтому годится лишь для качественной оценки относительного веса гликозидных конформаций. Одна из возможностей перехода на количественный уровень заключается в использовании разности химических сдвигов ($\Delta\delta$) Н2' и какого-либо протона, который в общем случае может и не принадлежать исследуемой молекуле. Поведение $\Delta\delta$ должно удовлетворять следующим требованиям:

1) сама $\Delta\delta$ должна сильно зависеть от положения *син-анти*-равновесия;

2) влияние конформации других частей молекулы (сахар, экзоциклическая группа) на $\Delta\delta$ должно поддаваться количественному описанию;

3) смена растворителя и замещение в нуклеиновом основании не должны существенно изменять $\Delta\delta$.

До настоящего времени были предприняты две попытки использовать $\Delta\delta$ для описания конформационного поведения пуриновых нуклеозидов [10—12]. Следует сразу отметить, что обе эти попытки были скорее полунтуитивными, не основанными на осмысленной физической модели. В первой попытке во главу угла положена разность химических сдвигов Н1' и Н2' [10]. Нетрудно видеть, что выбор сигнала сравнения неудачен, поскольку химический сдвиг Н1' непредсказуемо зависит от заместителей в пуриновом цикле (особенно по положению 8) и растворителя. Неудивительно, что авторам пришлось ограничиться констатацией факта, что величина $\Delta\delta_{1'-2'}$ больше 1 м.д. соответствует преобладанию *анти*-, а меньше 1 м.д. (~0,7 м.д.) — *син*-популяции. Неудивительно также, что применимость этого правила оказалась весьма ограниченной. Сошлемся хотя бы на 8-сульфопроизводные аденозина [13], для которых преобладание *син*-популяции проявляется в увеличении $\Delta\delta_{1'-2'}$ до 1,2—1,5 м.д.

Вторая попытка основывалась на разности химических сдвигов Н2' исследуемого и «стандартного» соединений [11, 12]. Авторы полностью игнорировали влияние на $\Delta\delta_{2'-2'}$ конформации рибозы, ошибочно относя его к эффектам второго порядка. Кроме того, этому подходу внутренне присуща неоднозначность в выборе «стандартного» соединения.

На наш взгляд, удобной мерой относительного веса *син*-популяции может служить разность химических сдвигов Н2' и Н3'. Этот параметр

наилучшим образом удовлетворяет перечисленным выше требованиям. Он так же сильно зависит от изменения константы *син-анти*-равновесия, как и химический сдвиг Н2'. Характер зависимости $\Delta\delta_{2'-3}$ от конформации углеродного цикла и 5'-СН₂ОН-группы легко вывести из общих стереохимических соображений. Наконец, принадлежность Н2' и Н3' одной исследуемой молекуле, их пространственная близость и сходный характер окружения позволяют надеяться, что и третье требование будет удовлетворяться достаточно хорошо.

В дальнейшем для удобства мы будем обозначать разность химических сдвигов Н2' и Н3' символом α .

Учитывая, что химические сдвиги Н2' и Н3' зависят от конформаций нуклеинового основания, рибозного цикла и оксиметильной группы, следовало бы рассмотреть равновесие по крайней мере 12 конформеров. В приближении быстрого обмена экспериментально наблюдаемая разность химических сдвигов Н2' и Н3'

$$\alpha = \sum_{i=1}^{i=12} \alpha^i p^i,$$

где α^i — параметр *i*-го конформера, а p^i — его мольная доля. По обсуждавшимся выше причинам параметры α^i можно определить лишь эмпирически. Подбор столь большого числа параметров делает поставленную задачу практически неразрешимой. Необходимо путем разумных приближений сократить число параметров.

Рассмотрим сначала зависимость α от конформации рибозного цикла и нуклеинового основания. В С3'-*эндо*-конформации (³*E*) рибозы атом Н3' расположен на аксиальной связи, а атом Н2' — на экваториальной. Первый приближен к нуклеиновому основанию, а второй удален (расстояние от атома Н3 в *син*-конформации до атома Н3' ~2,5, а до Н2' ~3,6 Å). Поскольку оба протона находятся в конусе отрицательного экранирования, сигнал Н3' будет сдвигаться в слабое поле сильнее, чем сигнал Н2', что приведет к уменьшению α . Наоборот, в С2'-*эндо*-конформации (²*E*) на аксиальной связи расположен Н2', на экваториальной — Н3' (расстояние от атома Н3 в *син*-конформации до атомов Н3' и Н2' соответственно ~4,9 и ~2,9 Å). В этом случае должно наблюдаться увеличение α . Кроме того, дезэкранирующее влияние шестичленного кольца пуринового основания больше, чем пятичленного. Таким образом, для описания влияния конформации рибозного цикла и нуклеинового основания необходимо и достаточно четырех параметров, которые в порядке уменьшения их величины можно расположить в ряд:

$$\alpha^{cS} > \alpha^{aS} > \alpha^{aN} > \alpha^{cN},$$

где *cS*, *aS*, *aN* и *cN* — *син*-С2'-*эндо*-, *анти*-С2'-*эндо*-, *анти*-С3'-*эндо*- и *син*-С3'-*эндо*-конформации.

К сожалению, влияние оксиметильной группы нельзя оценить а priori. В связи с этим были исследованы три модели, в которых влияние экзоциклического заместителя описывали: а) одним параметром (β), пропорциональным мольной доле *гош*⁺-конформации (p^s); б) двумя параметрами β и β' , пропорциональными p^s и сумме мольных долей *транс*- и *гош*⁻-популяций $(1-p^s)$ соответственно; в) всеми шестью параметрами, соответствующими *гош*⁺-С3'-*эндо*- (β^{N^+}), *гош*⁺-С2'-*эндо*- (β^{S^+}), *гош*⁻-С3'-*эндо*- (β^{N^-}), *гош*⁻-С2'-*эндо*- (β^{S^-}), *транс*-С3'-*эндо*- (β^{N^r}) и *транс*-С2'-*эндо*-конформации (β^{S^r}); основываясь на результатах квантовохимических расчетов [7], полагали $\beta^{N^r} = \beta^{S^r} = 0$, $\beta^{N^+} = \beta^{N^-}$ и $\beta^{S^+} = -\beta^{S^-}$; для простоты считали $p^r = p^s$, что является удовлетворительным приближением.

Анализ этих моделей показал, что наилучшим образом соответствует экспериментальным данным модель «б». В рамках этой модели экспериментально наблюдаемая разность химических сдвигов Н2' и Н3'

$$\begin{aligned} \alpha = & \alpha^{aN} (1-p^c) (1-p^s) + \alpha^{aS} (1-p^c) p^s + \alpha^{cN} p^c (1-p^s) + \\ & + \alpha^{cS} p^c p^s + \beta p^s + \beta' (1-p^s), \end{aligned} \quad (1)$$

где параметры α' и β' имеют смысл, определенный выше, а p^c , p^s и p^z — мольные доли *син*-, *С2'-эндо*- и *гош*⁺-популяций соответственно.

Мольная доля *син*-популяции

$$p^z = \frac{\alpha - \alpha^{aN} - \beta' + (\alpha^{aN} - \alpha^{as}) p^s + (\beta' - \beta) p^c}{p^s (\alpha^{aN} - \alpha^{as} - \alpha^{cN} + \alpha^{cs}) - \alpha^{aN} + \alpha^{cN}}. \quad (2)$$

В приведенном выше обсуждении не рассмотрен вопрос о возможной взаимосвязи внутримолекулярных движений. Однако легко заметить, что уравнение (1) составлено в предположении отсутствия корреляции между конформациями отдельных частей молекулы. Как было показано нами ранее [3], такое приближение удовлетворительно описывает конформационное поведение пуриновых нуклеозидов в растворе.

Для определения параметров α^{aN} , α^{as} , α^{cN} , α^{cs} , β и β' использовали следующие экспериментальные данные.

1. Аденозин: $\alpha=0,36$ м.д., $p^s=0,63$, $p^z=0,7$ [11, 14], $p^c=0,48$ [3]. Подставляя в уравнение (1), получаем

$$0,36=0,185\alpha^{aN}+0,315\alpha^{as}+0,185\alpha^{cN}+0,315\alpha^{cs}+0,7\beta+0,3\beta'. \quad (3)$$

2. 8-*трет*-Бутилгуанозин: $\alpha=0,89$ м.д., $p^s=0,65$, $p^z=0,4$ [12]. Учитывая большой объем заместителя при С8, p^c полагали равной 1. Тогда из уравнения (1) получаем

$$0,89=0,35\alpha^{cN}+0,65\alpha^{cs}+0,4\beta+0,6\beta'. \quad (4)$$

3. 8,1'-Ангидро-8-окси-9-(2- β -*D*-психофуранозил)аденин: $\alpha=0,36$ м.д., $p^s=0,44$, $p^z=0,55$ *. Это соединение представляет для нас особый интерес, поскольку, с одной стороны, конформационное поведение рибозного цикла сходно с поведением рибозы природных нуклеозидов, а с другой — нуклеиновое основание закреплено в *син*-конформации, т. е. $p^c=1$. Из уравнения (1) получаем

$$0,36=0,56\alpha^{cN}+0,44\alpha^{cs}+0,55\beta+0,45\beta'. \quad (5)$$

4. (*S*)-8,5'-Ангидро-5'-оксиаденозин: $\alpha=-0,18$ м.д. [12]. Для определения параметров, соответствующих *анти*-состоянию, заманчиво было бы использовать 8,5'-ангидроаденозины, основание которых закреплено в *анти*-конформации. Основная трудность заключается в том, что указанный ангидронуклеозид имеет необычную *E*-конформацию рибозы, в которой атомы Н2' и Н3' находятся на биссектральных связях в заслоненной конформации. Поскольку биссектральное положение является средним между аксиальным и экваториальным, такую конформацию рибозы в рамках принятой модели разумно аппроксимировать равновесием *С3'-эндо*- и *С2'-эндо*-популяций с константой, равной 1. Конфигурация 5'-оксиметиленовой группы соответствует *транс*-конформации СН₂ОН-группы природных нуклеозидов. Квантовохимические расчеты [7] показывают, что влияние спиртового кислорода в *транс*-конформации на химические сдвиги Н2' и Н3' достаточно мало и им разумно пренебречь. Тогда

$$-0,18=1/2\alpha^{aN}+1/2\alpha^{as}. \quad (6)$$

5. (*R*)-8,5'-Ангидро-5'-оксиаденозин: $\alpha=0,46$ м.д. [12]. Учитывая аргументацию пункта 4 и тот факт, что конфигурация оксиметиленовой группы имитирует *гош*⁻-конформацию 5'-оксиметильной группы нуклеозидов, можно записать

$$0,46=1/2\alpha^{aN}+1/2\alpha^{as}+\beta'. \quad (7)$$

6. 2',3'-*O*-Этоксиметилен-3-бромаденозин: $\alpha=0,41$ м.д., $p^z=1,0$. Известно, что 2',3'-ацетальные производные пуриновых нуклеозидов в хлороформе образуют сильную $O5'-H \cdots N3$ водородную связь, которая стабилизирует *син*-конформацию нуклеинового основания и *гош*⁺-конформацию оксиметильной группы [12]. Остается проблема модельного представления конформации рибозного цикла. Ранее нами было показано [15], что КССВ

* В тех случаях, когда не указан литературный источник, анализ спектра ЯМР проведен в настоящей работе.

Эмпирически определенные параметры в сравнении с теоретическими значениями, полученными из квантово-химических расчетов [16]

Параметр	Эмпирическое значение, м. д.	Теоретическое значение *, м. д.	
		A **	B ***
α^{aN}	-0,75	-0,59	-0,95
α^{aS}	0,42	0,30	0,32
α^{cN}	-0,75	-1,13	-1,90
α^{cS}	1,20	0,66	1,20
β	-0,12		
β'	0,70		

* Рассчитано для гликозидных углов χ (C4-N9-C1'-O4') 80 (син) и 240° (анти).

** Вклад кольцевых токов аденина.

*** Сумма вкладов кольцевых токов и диамагнитной анизотропии.

протонов рибозного цикла указанных соединений хорошо согласуются с моделью трех состояний — двух канонических (C2'-эндо и C3'-эндо), относительный вес которых невелик, и неканонического (O4'-экзо), которое является основным компонентом равновесия. Учитывая аргументацию пункта 4, разумно представить конформацию рибозы равновесием равных мольных долей N- и S-популяций, хотя в данном случае это будет более грубым приближением. Тогда

$$0,11 = \frac{1}{2}\alpha^{cN} + \frac{1}{2}\alpha^{cS} + \beta. \quad (8)$$

Решая совместно уравнения (3)–(8), получаем искомые параметры, которые в сравнении с теоретически ожидаемыми представлены в табл. 1.

Если учесть приближенный характер квантовохимических расчетов и определенный волюнтаризм в выборе величины гликозидного угла, то следует признать соответствие эмпирических величин теоретически ожидаемым очень хорошим.

Поскольку параметры β^i представляют собой средневзвешенные величины, им нельзя поставить в соответствие какой-либо из теоретических параметров. Для проверки этих параметров можно использовать лишь экспериментальные данные.

Параметр β' был получен непосредственно из экспериментальных данных для (R)-8,5'-ангидро-5'-оксиаденозина (см. выше пункт 5). Удобной моделью для проверки параметра β может служить 8,5'-ангидро-8-оксиаденозин, адениновый цикл которого закреплён в анти-конформации, а ангидроцикл имитирует $gosh^+$ -конформацию оксиметильной группы. В рамках принятой модели для этого соединения

$$\alpha = \frac{1}{2}\alpha^{aN} + \frac{1}{2}\alpha^{aS} + \beta.$$

Подставляя параметры из табл. 1, получаем ожидаемую разность химических сдвигов H2' и H3' $\alpha = -0,28$ м.д. Экспериментальная разность химических сдвигов (0,24 [12]) близка к вычисленной по абсолютной величине, но противоположна по знаку. Либо неверны рассчитанные нами параметры, либо в литературе укоренилось ошибочное соотношение сигналов H2' и H3' 8,5'-ангидро-8-оксиаденозина. Для выяснения причин расхождения был проведен анализ спектра ЯМР указанного ангидронуклеозида. Как видно из рис. 1, соотношение сигналов нельзя сделать тривиальными способами, поскольку ввиду малости констант $J_{1'2'}$ и $J_{3'4'}$ сигнал H1' представляет собой слегка уширенный синглет, а сигналы H2' и H3' — AB-квартет. С помощью двойного резонанса были определены КССВ H1' с A- и B-протонами; последующая симуляция позволила провести полный анализ спектра ЯМР. Оказалось, что $J_{1'A} = 0,2$, $J_{1'B} = 0,75$, $J_{4'A} = 0,8$ и $J_{4'B} = 0,3$ Гц. Поскольку КССВ через четыре ординарные связи при взаимном располо-

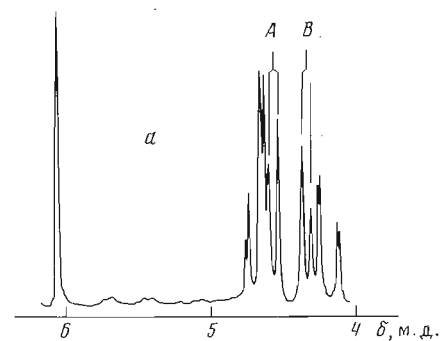


Рис. 1

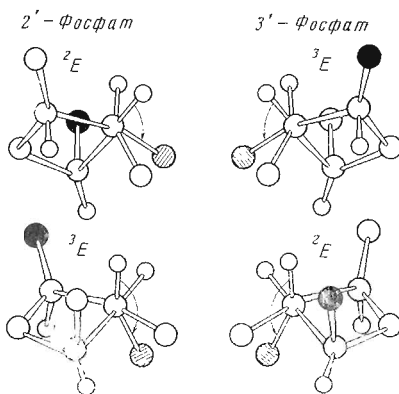


Рис. 3

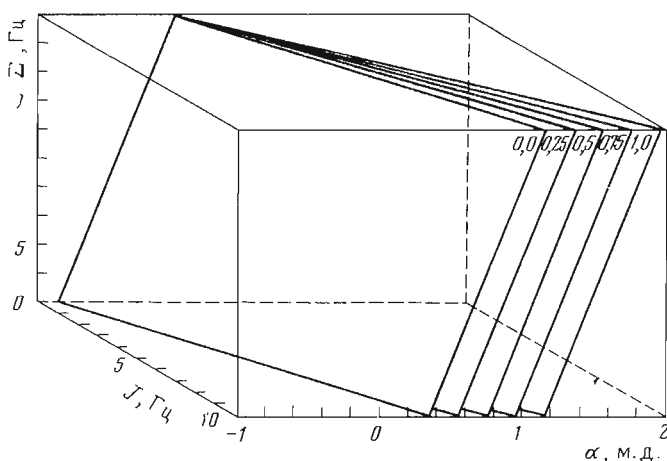


Рис. 2

Рис. 1. Экспериментальный (а) и симулированный (б) спектры ЯМР (область сигналов протонов рибозы) 8,5'-ангидро-8-оксиаденозина ($5 \cdot 10^{-2}$ М, 5% D_2O в $DMSO-d_6$, $39^\circ C$)

Рис. 2. Изоконформационные плоскости в пространстве экспериментальных параметров

Рис. 3. Положение в пространстве атомов $H2'$ и $H3'$ относительно фосфатной группы в $C2'$ -эндо- $(^2E_3)$ и $C3'$ -эндо-конформациях (3E_2) рибозного цикла ($2'$ - и $3'$ -нуклеотидов (зачернены атомы N9, заштрихованы атомы кислорода, соединенные с фосфатной группой)

жения протонов, определяемом конформацией рибозного цикла (4T [15]), не может превышать 0,4 Гц [17], полученные данные позволяют однозначно отнести сигнал А к $H3'$, а сигнал В — к $H2'$. Таким образом, принятое до настоящего времени соотношение действительно ошибочно, а разность химических сдвигов $H2'$ и $H3'$ равна $-0,22$ м.д. Этот пример наглядно показывает предсказательные возможности предлагаемой модели.

Формулы для расчета относительного веса *син*-популяции в растворе пуриновых нуклеозидов и нуклеотидов

Тип соединения	Расчетная формула *
Нуклеозиды (общая формула)	$p^c = \frac{12,4\alpha + 13,7 - 1,5J - \Sigma}{J} \quad (A)$
2',3'-О-Ацетали	$p^c = 2,56\alpha + 1,32 - 0,2\Sigma \quad (B)$
5'-Дезоксинуклеозиды	$p^c = \frac{12,4\alpha - 1,5J}{J} \quad (B)$
5'-Нуклеотиды	$p^c = \frac{12,4\alpha + 5 - 1,5J + 0,08\Sigma}{J} \quad (Г)$
5'-Ди- и 5'-трифосфаты	$p^c = \frac{12,4\alpha + 6,75 - 1,5J + 0,07\Sigma}{J} \quad (Д)$
3'-Нуклеотиды	$p^c = \frac{12,4\alpha + 9,3 - \Sigma}{J} \quad (E)$
2'-Нуклеотиды	$p^c = \frac{12,4\alpha + 3,8 - \Sigma}{J} \quad (Ж)$
2',3'-Циклофосфаты	$p^c = \frac{12,4\alpha + 13,7 - 1,5(J + 0,6) - \Sigma}{J + 0,6} \quad (З)$
3',5'-Циклофосфаты	$p^c = -2,7\alpha - 0,08 \quad (И)$

* $\alpha = \delta N2' - \delta N3'$, м. д., $J = J_{1',2'}$, Гц, $\Sigma = J_{4',5'} + J_{4',5''}$, Гц.

Подставляя параметры из табл. 1 в уравнение 2, получаем формулу для расчета мольной доли *син*-популяции в растворе пуриновых нуклеозидов:

$$p^c = \frac{1,28\alpha + 0,07 - 1,5p^s + p^e}{p^s} \quad (9)$$

Однако формула в мольных долях неудобна в практическом пользовании, поскольку требует предварительного перевода экспериментальных параметров ЯМР в мольные доли *S*- и *gosh*⁺-популяций. К тому же разные авторы пользуются несколько отличными способами расчета мольных долей. В связи с этим формула была преобразована к виду, включающему в себя лишь экспериментальные параметры α , $J_{1',2'}$ (J) и $J_{4',5'} + J_{4',5''}$ (Σ), позволяющему определить относительный вес *син*-популяции непосредственно из спектра ЯМР, не прибегая к дополнительным процедурам (формула А в табл. 2).

Коротко проанализируем полученную формулу. Нетрудно видеть, что каждому значению p^c отвечает плоскость в пространстве экспериментальных параметров α , J и Σ (рис. 2). Множество изоконформационных плоскостей пересекается по одной прямой, причем значения параметров, соответствующие этой прямой ($\alpha = -0,36 + 0,08k$ м. д., $J = 0$ Гц и $\Sigma = 3 + k$ Гц, где $0 \leq k \leq 10$), составляют область неопределенных решений. При точности измерения $\alpha = 0,01$ м. д., а J и $\Sigma = 0,1$ Гц ошибка рассчитанной величины p^c составляет $\pm 0,04$.

Результаты применения формулы А к ряду пуриновых нуклеозидов представлены в табл. 3.

Важным достоинством обсуждаемого подхода является возможность распространения модели на широкий круг пуриновых нуклеозидов и нуклеотидов, причем модификация основной формулы 9 не требует перерасчета параметров α^i , а производится путем простых и логичных действий.

2',3'-О-Ацетальные производные нуклеозидов. Как уже указывалось в рамках принятой модели, конформацию рибозного цикла 2',3'-О-аце-

Экспериментальные значения параметров ЯМР и рассчитанные относительные веса *сис*-популяции в растворе пуриновых нуклеозидов и нуклеотидов

Тип соединения (расчетная формула) *	Соединение	Параметры ЯМР **						Мольная доля <i>сис</i> -попу- ляции
		Растворитель	Температура, °C	α , м.д.	J , Гц	Σ , Гц	Ссылка	
Нуклеозиды (А)	Ado	D ₂ O	+25	0,36	6,1	6,0	[11]	0,49
		DMSO- <i>d</i> ₆	+25	0,45	6,5	6,6	[11]	0,45
		ND ₃	+40	0,29	5,0	6,9	[18]	0,58
			-60	0,27	5,1	6,8	[18]	0,51
	Ino	DMSO- <i>d</i> ₆	+25	0,35	5,7	7,3	[12]	0,38
			+40	0,37	5,5	6,5	[18]	0,64
		-60	0,31	5,6	6,3	[18]	0,51	
	Guo	DMSO- <i>d</i> ₆	+25	0,30	6,3	6,5	[12]	0,23
			+40	0,30	5,7	6,3	[18]	0,45
		-60	0,23	5,6	6,1	[18]	0,37	
	Xan	ND ₃	+40	0,30	5,9	6,2	[18]	0,40
			-60	0,20	5,7	6,0	[18]	0,29
	9-(β-D-Рибофуранозил) пурин	ND ₃	+40	0,31	5,1	7,0	[18]	0,57
			-60	0,33	5,0	6,7	[18]	0,72
	9-(β-D-Рибофуранозил)-2-аминопурин	ND ₃	+40	0,27	5,3	7,1	[18]	0,38
			-60	0,27	5,6	7,1	[18]	0,28
	8-Бром-Ado	D ₂ O	+25	0,56	7,2	5,1	[12]	0,66
			+40	0,91	6,8	9,0	[18]	0,85
		-60	1,07	7,4	11,0	[18]	0,66	
	8-Бром-Guo	ND ₃	+40	0,84	7,1	6,8	[18]	0,94
-60			0,88	7,8	6,6	[18]	0,81	
8-(α-Оксипропил)-Ado	DMSO- <i>d</i> ₆	+25	0,76	7,1	6,5	[11]	0,84	
		+25	0,61	7,5	5,5	[11]	0,60	
8-Сульфо-Ado	D ₂ O	+39	0,55	5,9	6,5	***	0,88	
8-трет-Бутил-Guo	DMSO- <i>d</i> ₆	+25	0,89	6,3	9,0	[12]	1,00	
		+40	0,38	6,9	6,2	[18]	0,27	
Формидин	ND ₃	+40	0,39	8,2	5,9	[18]	0,04	
		-60	0,39	8,2	5,9	[18]	0,04	
8,1'-Ангидро-8-окси-9-(2-β-D-пикофуранозил) аденин	DMSO- <i>d</i> ₆	+39	0,36	4,3	7,5	***	0,98	
2',3'-О-Ацетали (В)	2',3'-О-Изопропилиден-Ado	DMSO- <i>d</i> ₆	+25	0,37	-	9,0	[11]	0,47
		CDCl ₃	+25	0,10	-	3,0	[11]	0,98
	2',3'-О-Изопропилиден-8-(α-оксипропил)-Ado	DMSO- <i>d</i> ₆	+25	0,38	-	8,8	[11]	0,53
			+39	0,41	-	8,6	***	0,65
	2',3'-О-Этоксиметилден-8-бром-Ado	DMSO- <i>d</i> ₆	+39	0,71	-	11,4	***	0,86
			CDCl ₃	+39	0,11	-	3,0	***
	2',3'-О- <i>n</i> -Метоксибензилиден-8-сульфо-Ado	D ₂ O	+39	0,40	-	7,1	***	0,92
5'-Дезокси- нуклеозиды (В)	5'-Дезокси-Ado	D ₂ O	+60	0,59	4,8	-	[19]	0,02
			+40	0,57	4,8	-	[19]	-0,03
		ND ₃	+40	0,64	4,1	-	[19]	0,44
			-60	0,69	4,8	-	[19]	0,28
	5'-Дезокси-8-бром-Ado	D ₂ O	+60	0,91	5,2	-	[19]	0,67
+10			0,90	5,3	-	[19]	0,61	
5'-Нуклеотиды (Г)	5'-AMP	D ₂ O	+25	0,26	5,8	6,5	[12]	0,01
			+25	0,26	5,8	7,0	[12]	0,01
	8-трет-Бутил-5'-GMP	D ₂ O	+25	0,69	6,3	10,8	[12]	0,79
			+25	0,69	6,3	10,8	[12]	0,79

Таблица 3 (окончание)

Тип соединения (расчетная формула) *	Соединение	Параметры ЯМР **						Ссылка	Мольная доля син-попу- ляции
		Растворитель	Температура, °С	α , м.д.	J , Гц	Σ , Гц			
5'-Дв- и 5'-трифосфаты (Д)	8-Бром-5'-АМР	D ₂ O	+25	0,68	6,1	10,9	[12]	0,84	
	8-(α -Оксинизопротил)-5'-АМР	D ₂ O	+25	0,61	5,9	10,5	[12]	0,77	
	8-Метилтио-5'-АМР	D ₂ O	+30	0,55	6,2	10,8	[20]	0,55	
	8-Сульффо-5'-АМР	D ₂ O	+39	0,72	5,9	11,0	***	1,01	
	5'-АТР	D ₂ O	+30	0,18	5,7	6,1	[21]	-0,01	
	5'-GTP	D ₂ O	+30	0,15	5,3	6,3	[21]	-0,04	
	8-Сульффо-5'-АТР	D ₂ O	+39	0,71	5,7	10,0	***	0,99	
	3'-Нуклеотиды (Е)	3'-АМР	D ₂ O	+20	0,10	6,3	6,0	[22]	0,72
		3'-GMP	D ₂ O	+20	0,05	5,2	6,6	[22]	0,64
		8-Бром-3'-АМР	D ₂ O	+39	0,32	6,6	6,8	***	0,98
8-Сульффо-3'-АМР		D ₂ O	+39	0,36	6,8	7,0	***	0,99	
2'-Нуклеотиды (Ж)	2'-АМР	D ₂ O	+20	0,46	6,0	6,2	[22]	0,55	
	2'-GMP	D ₂ O	+20	0,52	5,2	7,1	[22]	0,61	
	8-Бром-2'-АМР	D ₂ O	+39	0,68	7,1	6,5	***	0,81	
2',3'-Цикло- нуклеотиды (З)	2',3'-АМР	D ₂ O	+30	0,22	4,4	7,3	[23]	0,33	
	2',3'-GMP	D ₂ O	+30	0,24	3,7	8,4	[23]	0,47	
	8-Сульффо-2',3'-АМР	D ₂ O	+39	0,42	3,6	8,4	***	1,00	
3',5'-Цикло- нуклеотиды (И)	3',5'-АМР	D ₂ O	+23	-0,03	—	—	[24]	0,00	
	3',5'-GMP	D ₂ O	+23	-0,03	—	—	[24]	0,00	
	8-Бром-3',5'-АМР	D ₂ O	+39	-0,25	—	—	***	0,59	
	8-Сульффо-3',5'-АМР	D ₂ O	+39	-0,40	—	—	***	1,00	

* См. табл. 2.

** $\alpha = \delta\text{H}2' - \delta\text{H}3'$, $J = J_{1'2'}$, $\Sigma = J_{4'5'} + J_{4'5''}$.

*** Анализ спектра проведен в настоящей работе.

тальных производных нуклеозидов аппроксимировали равновесием эквимолярных количеств С2'-эндо- и С3'-эндо-популяций. Подставляя в формулу 9 $p^s=0,5$, получаем формулу **B** (табл. 2). В табл. 3 приведены рассчитанные по этой формуле относительные веса син-популяции в растворе 2',3'-ацетальных производных нуклеозидов.

5'-Дезоксинуклеозиды. В идеале формула для 5'-дезоксинуклеозидов должна автоматически получаться, если β и β' приравнять нулю. На самом деле это не так вследствие упрощающих приближений, введенных нами при описании влияния 5'-CH₂OH-группы на химические сдвиги H2' и H3'. Отличие используемой модели от «идеальной» можно учесть, заменив параметры β и β' одним параметром β^0 . Формула для расчета син-популяции в растворе 5'-дезоксинуклеозидов, приведенная в табл. 2 (получена при $\beta^0=0,75$ м.д.), наилучшим образом описывает экспериментальные данные (см. табл. 3).

5'-Нуклеотиды. Очевидно, что замещение по 5'-гидроксилу не скажется на параметрах α^i , но существенно изменит параметры β^i . Для вычисления этих параметров использовали спектры ЯМР 5'-АМР ($\alpha=0,26$ м.д., $p^s=0,61$, $p^e=0,65$ [12], $p^c=0,0$ [3]) и 8-сульфо-5'-АМР ($\alpha=0,72$ м.д., $p^s=0,60$, $p^e=0,20$, $p^c=1,0$). Параметры β_3 и β_5 оказались равными 0,33 и 0,27 м.д. соответственно. Подстановка этих величин в уравнение 2 дает формулу **Г** в табл. 2. Рассчитанные по формуле **Г** относительные веса син-популяции приведены в табл. 3.

Конформационное поведение 5'-ди- и трифосфатов удовлетворительно описывается (см. табл. 3) параметрами β_3 и β_5 , равными 0,23 и 0,29 м.д. Расчетная формула **Д** приведена в табл. 2.

3'-Нуклеотиды и 2'-нуклеотиды. По сравнению с нуклеозидами в 3'-нуклеотидах появляется новый фактор — анизотропия фосфатной группы. Влияние фосфатной группы на химический сдвиг $H3'$ определяется в основном величиной валентного угла $H3'-C3'-O3'$ и, следовательно, слабо зависит от конформации рибозного цикла (для простоты мы будем пренебрегать этой зависимостью). В противоположность этому влияние фосфатной группы на химический сдвиг $H2'$ определяется конформацией рибозы. Оно максимально в $C3'$ -эндо-конформации ($H2'$ и $O3'$ находятся на экваториальных связях, двугранный угол $H2'-C2'-C3'-O3' \sim 80^\circ$) и минимально в $C2'$ -эндо-конформации (оба заместителя на аксиальных связях, двугранный угол $\sim 160^\circ$). Таким образом, изменение разности химических сдвигов $H2'$ и $H3'$ в 3'-нуклеотидах при конформационных превращениях рибозного цикла определяется только сдвигом сигнала $H2'$. Логично описать влияние 3'-фосфатной группы параметрами γ_3^N и γ_3^S , соответствующими $C3'$ -эндо- и $C2'$ -эндо-конформациям рибозы. В то же время параметры α^i и β^i не должны изменяться при этерификации гидроксила. Тогда модификация модели сводится к введению члена $[\gamma_3^N(1-p^S) + \gamma_3^S p^S]$ в правую часть уравнения 1.

Из общих стереохимических соображений можно записать следующие соотношения между параметрами, описывающими влияние 3'- и 2'-фосфата на разность химических сдвигов $H2'$ и $H3'$:

$$\gamma_3^N = -\gamma_2^S \text{ и } \gamma_3^S = -\gamma_2^N,$$

где подстрочные цифры указывают место присоединения фосфатной группы. Действительно, как было показано выше, изменение разности химических сдвигов при $N-S$ -взаимопревращениях рибозного цикла 3'-фосфатов определяется сдвигом сигнала $H2'$; естественно, что в случае 2'-фосфатов определяющим будет положение сигнала $H3'$. Очевидно также, что одинаковые по величине и направлению смещения сигналов $H2'$ и $H3'$ вызовут одинаковое по величине, но противоположное по знаку изменение разности химических сдвигов $H2'$ и $H3'$. Как видно из рис. 3, положение $H2'$ и $H3'$ относительно фосфатной группы практически одинаково в $C3'$ -эндо-конформации 3'- и $C2'$ -эндо-конформации 2'-нуклеотидов, что должно привести к одинаковому по величине, но противоположному по знаку изменению $\delta H2' - \delta H3'$. Аналогичные соотношения верны и для двух других конформаций (рис. 3). Для расчета параметров γ_3^N и γ_3^S были использованы экспериментальные данные для 3'-АМР ($\alpha=0,1$ м.д., $p^S=0,65$, $p^e=0,7$ [22] и $p^e=0,7$ [25]) и 2'-АМР ($\alpha=0,46$ м.д., $p^S=0,62$, $p^e=0,68$ [22] и $p^e=0,6$ [25]). Параметры γ_3^N и γ_3^S оказались равными 0,37 и $-0,80$ м.д. соответственно. Расчетные формулы **Е** и **Ж** приведены в табл. 2, а рассчитанные по ним молярные доли *син*-популяции — в табл. 3.

2',3'-Циклофосфаты. Поскольку в циклофосфатах фосфатный остаток непосредственно соединен и с $O2'$ и с $O3'$, влияние фосфатной группы на химический сдвиг $H2'$ и $H3'$ одинаково и не зависит от конформации рибозного цикла. Таким образом, конформационное поведение 2',3'-циклофосфатов должно описываться общей формулой **А** (табл. 2). Но поскольку конформации рибозного цикла в циклофосфатах и природных нуклеотидах существенно различаются, возникает проблема адаптации модели к реальной геометрии молекулы. Как показывает проведенный недавно в работе [26] тщательный анализ конформации рибозного цикла 2',3'-циклофосфатов, такая адаптация может быть осуществлена простым увеличе-

нием экспериментально наблюдаемых КССВ $J_{1,2}$ на 0,6 Гц. Расчет по модифицированной таким образом формуле А (формула З в табл. 2) приводит к удовлетворительным результатам (табл. 3), что еще раз подтверждает адекватность использованной модели.

3',5'-Циклофосфаты. Эти соединения обладают жесткой 3_4T -конформацией сахара, которую нельзя адаптировать к принятой нами модели. Однако именно ввиду конформационной жесткости разность химических сдвигов Н2' и Н3' зависит только от положения *син-анти*-равновесия. Известно, что аденозин-3',5'-циклофосфат ($\alpha = -0,03$ м.д.) [24] существует в *анти*-конформации [27]. Учитывая, что 8-сульфо-3',5'-АМР ($\alpha = -0,40$ м.д.) вследствие электростатического отталкивания отрицательно заряженных фосфатной и сульфогрупп существует в *син*-конформации, нетрудно получить формулу **У** (табл. 2) для расчета относительного веса *син*-популяции в растворе 3',5'-циклофосфатов (табл. 3).

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР сняты на приборе XL-100 (Varian, США). Симуляцию спектров проводили по стандартной программе.

8,1'-Ангидро-8-окси-9-(2- β -D-псикофуранозил)аденин получили по описанному ранее методу [28], 8-сульфоаденозин, 2',3'-O-*n*-метоксibenзил-иден-8-сульфоаденозин, 2'-, 3'- и 5'-фосфаты 8-сульфоаденозина, 8-сульфоаденозин-2',3'-циклофосфат, 8-сульфоаденозин-3',5'-циклофосфат, 8-бром-аденозин-2'- и 3'-фосфаты — по методу [13], 8,5'-ангидро-8-оксиаденозин — по методу [15].

Образцы для съемки спектров ЯМР готовили как описано в работе [3].

Авторы благодарят М. Ю. Покровскую и С. В. Мешкова за помощь при съемке и симуляции спектров ЯМР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Флорентьев В. Л. В кн.: Итоги науки и техники. Молекулярная биология. Изд. ВИНТИ, 1976, т. 8, ч. 1, с. 162–229.
2. Davies D. V. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., 1978, v. 12, № 1, p. 135–225.
3. Бобрускин И. Д., Куртчииков М. П., Покровская М. Ю., Флорентьев В. Л. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 8, с. 1163–1181.
4. Карпейский М. Я., Яковлев Г. И. Биоорган. химия, 1975, т. 1, № 4, с. 749–757.
5. Galdes C. F. G. C., Williams R. J. P. Eur. J. Biochem., 1978, v. 85, № 3, p. 749–757.
6. Prado F. R., Giessner-Prettre C., Pullman B. J. Theor. Biol., 1978, v. 74, № 2, p. 259–277.
7. Giessner-Prettre C., Pullman B. In: Nuclear magnetic resonance spectroscopy in molecular biology/Ed. Pullman B. Dordrecht: Reidel Pub. Co., 1978, p. 161–181.
8. Jardetsky C. D. J. Amer. Chem. Soc., 1960, v. 84, № 1, p. 62–66.
9. Schweizer M. P., Robins R. K. In: Conformations of biological molecules and polymers/Eds Bergmann E. D., Pullman B. Acad. Press, 1973, p. 329–347.
10. Jordan F., Niv H. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 476, № 1, p. 265–271.
11. Dudycz L., Stolarski R., Pless R., Shugar D. Z. Naturforsch., 1979, B. 34c, № 2, S. 359–373.
12. Stolarski R., Dudycz L., Shugar D. Eur. J. Biochem., 1980, v. 108, № 1, p. 111–121.
13. Загородний С. Г., Цилевич Т. Л., Флорентьев В. Л. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 10, с. 1371–1375.
14. Lee C.-H., Sarma R. H. J. Amer. Chem. Soc., 1976, v. 98, № 12, p. 3541–3548.
15. Загородний С. Г., Гущев Н. В., Гогрих В. П., Дяткина Н. Б., Флорентьев В. Л. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 5, с. 681–695.
16. Giesner-Prettre C., Pullman B. J. Theor. Biol., 1977, v. 65, № 1, p. 189–201.
17. Schleicher T., Lusebrink T., Gross B. P., Johnson N. P. Nucl. Acids Res., 1975, v. 2, № 2, p. 459–469.
18. Westhof E., Plach H., Cuno I., Lüdemann H.-D. Z. Naturforsch., 1975, B. 30c, № 1, S. 131–140.
19. Westhof E., Plach H., Cuno I., Lüdemann H.-D. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 4, p. 939–953.
20. Sarma R. H., Lee C.-H., Evans F. E., Yathindra N., Sundaralingam M. J. Amer. Chem. Soc., 1974, v. 96, № 24, p. 7337–7342.
21. Son T.-D., Chachaty C. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 500, № 2, p. 405–418.
22. Davies D. B., Danyluk S. S. Biochemistry, 1975, v. 14, № 3, p. 543–553.
23. Lapper R. D., Smith I. P. C. J. Amer. Chem. Soc., 1973, v. 95, № 9, p. 2880–2884.
24. Lee C.-H., Sarma R. H. J. Amer. Chem. Soc., 1976, v. 98, № 11, p. 3541–3548.

25. Gueron M., Chachaty C., Tran-Dinch S. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1973, v. 222, № 2, p. 307-316.
26. Davies D. B., Sadikot H. J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 1983, № 8, p. 1251-1258.
27. Бобрускин И. Д., Гуляев Н. Н., Курпичников М. П., Северин Е. С., Туницкая В. А., Флорентьев В. Л. Молекулярн. биология, 1979, т. 13, № 1, с. 118-128.
28. Zavgorodny S. G. Tetrahedron Lett., 1981, v. 22, № 31, p. 3003-3007.

Поступила в редакцию
9.I.1984

A NOVEL METHOD FOR QUANTIFYING THE *syn-anti* EQUILIBRIUM FOR PURINE NUCLEOSIDES AND NUCLEOTIDES IN SOLUTION

ZAVGORODNY S. G., FLORENTIEV V. L.

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

A facile procedure for estimation of the relative contribution from the *syn*-population in the solutions of purine nucleosides and nucleotides has been proposed. It utilizes the following three parameters of the NMR spectra: the difference of H2' and H3' chemical shifts, coupling constant $J_{1'2'}$, and the sum of $J_{4'5'a}$ and $J_{4'5'b}$ coupling constants. The method is applicable to purine nucleosides, 5'-deoxynucleosides, 5'-, 2'- and 3'-nucleotides, as well as to 3', 5'- and 2', 3'-cyclophosphates containing either naturally occurring nucleic bases or those modified at 2,6 and 8 positions.