



УДК 547.962.32 + 541.65

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРОВ КД НУКЛЕОЗИДОВ
В БОРАТНОМ БУФЕРЕ*Усатый А. Ф., Сидоров Г. В., Мясоедов Н. Ф.**Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва*

Исследована связь между оптической активностью природных нуклеозидов и их конформационными изменениями в водном растворе и боратном буфере. Показано, что боратный буфер является эффективным средством изменения конформации нуклеозидов и нуклеотидов в растворе. Определены константы связывания боратов с нуклеозидами.

В последние годы появилась серия работ, в значительной степени проясняющих оптические свойства природных нуклеозидов, нуклеотидов и их производных [1—6]. И в настоящее время интерес к этой теме не уменьшается. Исследователи изучают, в какой степени оптические свойства нуклеиновых кислот обусловлены оптическими характеристиками их компонентов, а также связь этих свойств, в особенности оптической активности нуклеозидов и нуклеотидов, с конформационными состояниями этих молекул.

Исследования оптических свойств различных замещенных нуклеозидов и нуклеотидов, влияния на них различных растворителей позволяют количественно связать оптические изменения с конформационными. Из всех попыток такого рода, обобщающих исследования методами ЯМР, рентгеноструктурного анализа и оптической активности в эмпирические правила октантов [5], правило Ульбрихта [7] и т. д., наибольшей предсказующей силой, по-видимому, обладает полумпирическая зависимость молярной эллиптичности пиримидиновых нуклеозидов от угла поворота основания вокруг гликозидной связи (φ_{CN}) представленная Эйрингом и др. [4]. В тех случаях, когда заместители в рибофуранозном кольце и/или окружающие молекулы растворителя не влияют существенным образом на направление и соотношение вкладов различных оптических переходов хромофора [8], подход Эйринга и др. [4] может иметь предсказующую силу при сопоставлении φ_{CN} с интенсивностью и знаком V_{2u} каттон-эффекта. В этой связи хотелось бы отметить глубокое родство воздействия неполярных объемистых заместителей с влиянием молекул растворителей, обладающих определенным сродством к различным химическим группам основания и сахара. Образование сольватных комплексов различной степени связанности должно приводить к изменению распределения энергетически наиболее вероятных конформеров. Мы поставили перед собой задачу исследования изменений оптической активности нуклеозидов в боратных буферах различной концентрации.

Известно, что бораты образуют в растворе комплексы с сахарами и другими полиоксисоединениями [9—12]. Наиболее устойчивы пяти-

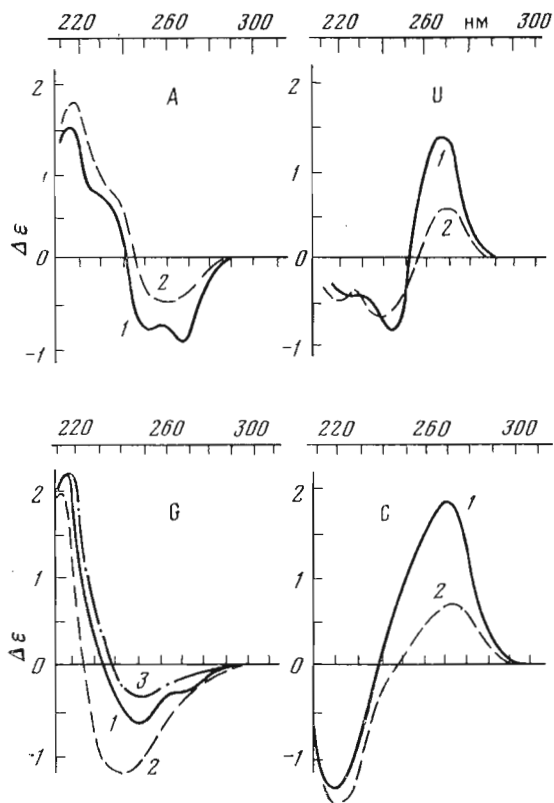


Рис. 1. Спектры КД рибонуклеозидов в воде (1), 0,05 М (2) и 0,025 М (3) боратном буфере. Концентрация А — 0,1, U — 0,15, G — 0,11, С — 0,17 мМ

шести- и семичленные хелатные циклы [10]. При этом из всех изомерных пентафураноз *D*-рибоза — самый сильный хелатообразователь с борной кислотой [13]. Как отмечают авторы этой работы, хелатообразование облегчается при наличии двух *цис*-гидроксильных групп во втором и третьем положениях молекулы пентозы. Таким образом, β -*D*-рибофуранозная часть молекул нуклеозидов и нуклеотидов является очень удобным объектом для модифицирования боратами.

Спектры КД нуклеозидов аденозина, гуанозина, уридина и цитидина в воде и боратном буфере представлены на рис. 1. Спектры КД всех нуклеозидов в водном растворе совпадают по форме и амплитуде с известными в литературе. Во всех случаях в выбранном нами спектральном диапазоне мы регистрируем три катон-эффекта, соответствующие π - π^* -переходам в полосах V_{2u} , V_{1u} и E_{1ua} . Для нуклеозидов эти полосы локализируются при длинах волн: (А) 265, 240, 232 и 216 нм (E_{1ua}); (U) 267, 243 и 223 нм; (G) 273, 250 и 216 нм; (С) 271, 250 (?) и 220 нм. В боратном буфере спектры КД всех изученных нуклеозидов претерпевают значительные изменения: наиболее существенно меняются V_{2u} - и V_{1u} -коттон-эффекты, в аденозине, уридине и в насыщении эффекта они уменьшаются примерно вдвое; в гуанозине при малых концентрациях боратного буфера длинноволновые полосы сначала уменьшаются по абсолютной величине, затем существенно увеличиваются (рис. 1). При концентрации боратного буфера более 0,05 М спектры КД не зависят от концентрации буфера.

В дезоксиуридине не наблюдается никаких изменений, в дезоксицитидине при малых концентрациях бората происходит существенное увеличение длинноволновых полос КД (V_{2u} (275) и V_{1u} (245)) и уменьшение полос КД E_{1ua} (218 нм) (рис. 2, б).

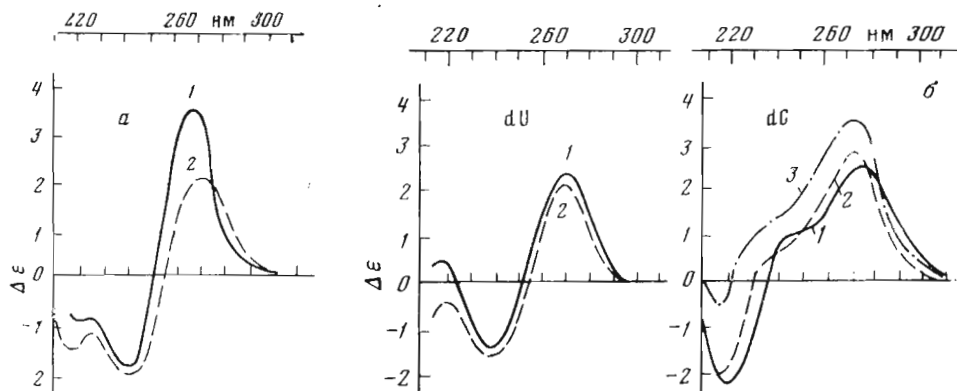


Рис. 2. Спектры КД дезоксирибонуклеозидов и UMP в воде (1), 0,05 М (2) и 5 мМ (3) боратном буфере. Концентрация dU — 0,152, dC — 0,083, UMP — 0,13 мМ

На уридин-5'-фосфат (UMP) боратный буфер производит то же действие, что и на уридин, но изменения амплитуды происходят в меньшей степени (рис. 2, а).

Исследование спектров оптического поглощения изученных нами соединений показало, что в пределах точности регистрации никаких изменений при переходе к боратному буферу не происходит. Это позволяет нам предположить, что все наблюдаемые изменения обязаны конформационным перестройкам молекул при образовании комплексов нуклеозидов с боратным буфером. При изменении концентрации боратного буфера в широком диапазоне начальный и конечные спектры КД производных урацила пересекаются, и в этих случаях (рис. 1, 2) концентрационные зависимости характеризуются изобестическими точками (252 и 277 нм соответственно). Следовательно, мы вправе предположить, что при образовании комплекса реализуются вполне определенные конфигурации нуклеозида.

Из кинетического уравнения комплексообразования

$$\frac{d[\text{HB}]}{dt} = k_1[\text{H}][\text{B}] - k_2[\text{HB}] = k_1[\text{H}_0][\text{B}] - (k_1[\text{B}] + k_2)[\text{HB}] \quad (1)$$

при условии достижения равновесия мы можем определить стационарную концентрацию комплексов

$$[\text{HB}] = [\text{H}_0] \frac{K[\text{B}]}{1 + K[\text{B}]}, \quad (2)$$

где $[\text{H}]$ и $[\text{B}]$ — концентрации свободных нуклеозидов и боратного буфера в растворе, $[\text{H}_0]$ — исходная концентрация нуклеозида, k_1 и k_2 — константы образования и распада комплекса, $K = k_1/k_2$ — константа связывания. Если обозначить долю связанных молекул нуклеозида $\alpha = [\text{HB}]/[\text{H}_0]$, то константу связывания в области концентраций $[\text{B}]$, когда доля комплексов $\alpha < 1$, можно определить как

$$K = \frac{1}{[\text{B}]} \frac{\alpha}{1 - \alpha}. \quad (3)$$

Таким образом, из концентрационной зависимости, например величины амплитуды полосы КД, можно определить $[\text{HB}] = f([\text{B}])$ (рис. 3, 1), учитывая, что $\alpha = \frac{\Delta\epsilon_0 - \Delta\epsilon}{\Delta\epsilon_0 - \Delta\epsilon_{\text{уп}}}$. Определенные таким образом константы связывания для всех изученных нами нуклеозидов представлены в таблице.

Для гуанозина и дезоксицитидина концентрационная зависимость амплитуд КД носит немонотонный характер, и константы связывания

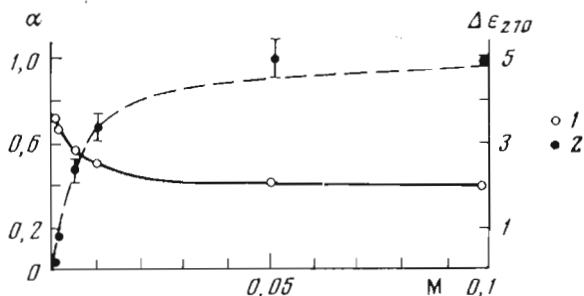
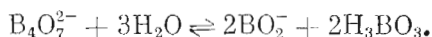


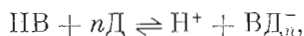
Рис. 3. Зависимость от концентрации боратного буфера величины $\Delta\epsilon_{270}$ в спектре КД 0,130 мМ раствора УМР (1) и α (2). Пунктир — расчетная кривая при $K = 200$

оценивались с невысокой точностью по начальным изменениям при низких концентрациях буфера. Для аденозина малая точность определения K связана с его слабой оптической активностью при сравнительно высоком оптическом поглощении.

Известно, что тетрабораты в водном растворе гидролизуются [14]:



При образовании комплексов с гидроксильными группами реакционно-способной частицей является борная кислота [11]. Сахара с борной кислотой образуют нестойкие комплексы. Так, например, константы ассоциации фруктозоборной и глюкозоборной кислот равны соответственно 52 800 238 M^{-1} [15]. В работе [16] предложено следующее уравнение комплексообразования:



где HB — борная кислота, D — сахарид (в описываемом случае D — рибоза). Было также определено [11], что борная кислота с D-рибозой образует комплекс в соотношении 1 : 2. Образование такого комплекса с фуранозным кольцом должно приводить в результате стереических взаимодействий к увеличению двугранного угла между плоскостями сахара и основания в нуклеозиде. При этом в зависимости от характера присоединения возможно осуществление таких межатомных контактов, для которых область существования наиболее вероятных поворотных изомеров смещается в сторону иных, нежели в исходном нуклеозиде, углов поворота основания вокруг гликозидной связи (φ_{CN}). Такая ситуация осуществляется, например, в 6-метилцитидине [3]. Сопоставляя изменения оптических свойств нуклеозидов с рассмотренными выше конформационными изменениями, Эйринг и др. [3] относят все изменения в амплитудах КД $V_{2\omega}$ полос за счет изменения только φ_{CN} . Однако анализ накопленных к настоящему времени экспериментальных данных в рентгеноструктурных исследованиях различных производных оснований [17] показывает, что, во-первых, имеется существенный разброс вокруг полуэмпирической кривой Эйринга $[\theta] = f(\varphi_{CN})$ [3] и, во-вторых, явная тенденция к уменьшению молярной эллиптичности $[\theta]$ с увеличением двугранного угла при примерно одинаковых φ_{CN} . Действительно, исходя из общих представле-

Константы связывания (K, M^{-1}) борат ионов с нуклеозидами

| U | UMP | C | dC | A | G | dU |
|-----|-----|-----|------------|------------|------------|----------|
| 700 | 200 | 500 | ≥ 500 | ≥ 500 | ≥ 500 | ~ 0 |

ний, развиваемых, например, Тиноко [18], следует, что величина вращательной силы нуклеозидов зависит от угла между направлениями соответствующих электронных переходов в рибозе и основании, т. е. зависит как от угла поворота вокруг гликозидной связи, так и от двугранного угла между плоскостями этих частей молекулы. Данные по влиянию на оптическую активность нуклеозидов различных растворителей также наводят на мысль, что сольватирование рибозы и основания должно приводить к увеличению двугранного угла, т. е. «раскрытию» молекулы, что в большинстве случаев вызывает существенное уменьшение или обращение знака КД V_{21} -полосы.

Полученные нами данные по спектрам КД нуклеозидов в боратном буфере подтверждают сказанное выше: связывание борной кислоты с рибозой способствует «раскрытию» молекулы нуклеозида, что также приводит к уменьшению эллиптичности длинноволновых полос КД. Тот факт, что при этом не происходит изменений в спектрах поглощения и в локализации области рН, в которой происходят оптические изменения при щелочном титровании, позволяет отнести эти изменения к чисто конформационным.

Вопрос о точной локализации боратов на молекуле нуклеозида пока не ясен. Помимо рибозы в различных нуклеозидах, по-видимому, могут быть и другие группы, имеющие сродство к боратам. Об этом, в частности, говорит немоцотонный характер концентрационной зависимости оптических изменений в гуанозине и дезоксицитидине, имеющих положительно заряженные группы в гетероциклическом основании. Наличие заряженных групп может существенно сказываться на характере связывания, в частности в случае УМР влияние отрицательного заряда фосфатной группы приводит как к уменьшению константы связывания (таблица), так и к меньшему стерическому влиянию комплекса борной кислоты с рибозой из-за электростатического расталкивания. В дезоксиуридине практически никаких изменений при замене воды на боратный буфер не происходит. Это связано с отсутствием необходимой для образования комплекса *цис*-гликольной группировки в молекуле 2'-дезоксирибозы.

В заключение можно отметить, что процесс комплексообразования с молекулами растворителя или соответствующими компонентами раствора, типа водного раствора тетрабората натрия, может явиться эффективным средством изменения конформаций нуклеотидов и нуклеозидов в растворе. Моделирование этого процесса на молекулярных моделях, определение конформации другими структурными методами позволит провести корреляции между конформацией и оптической активностью нуклеозидов в растворе.

Экспериментальная часть

Использовали нуклеозиды и уридин-5'-монофосфат (Reanal, Венгрия) с содержанием основного вещества $\geq 98\%$. Натрий тетраборнокислый (х. ч.) очищали перекристаллизацией из воды и сушили на воздухе 3 дня (до постоянного веса). рН буферных растворов $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{—HCl}$ была равной $8,00 \pm 0,05$ и контролировалась с помощью рН-метра рН-340.

Спектры оптического поглощения регистрировали на спектрофотометре Perkin-Elmer.

Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре (Cary-60) с приставкой для измерения кругового дихроизма — 6001. Измерения проводились в основном в кювете длиной 1 см при температуре 27° и постоянной времени регистрации 10 с. Программа щели устанавливалась на постоянное разрешение 15 Å во всем используемом диапазоне длин волн (210—300 нм).

ЛИТЕРАТУРА

1. Miles D. W., Robins R. K., Eyring H. (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **57**, 1138—1145.
2. Miles D. W., Hahn S. J., Robins R. K., Eyring H. (1968) J. Phys. Chem., **72**, 1483—1491.
3. Miles D. W., Robins M. J., Robins R. K., Winkley M. W., Eyring H. (1969) J. Amer. Chem. Soc., **91**, 824—831.
4. Miles D. W., Robins M. J., Robins R. K., Winkley M. W., Eyring H. (1969) J. Amer. Chem. Soc., **91**, 831—838.
5. Delabar J. M., Guschlbauer W. (1973) J. Amer. Chem. Soc., **95**, 5729—5735.
6. Tougard P., Chantot J. F., Guschlbauer W. (1973) Biochim. et biophys. acta, **308**, 9—16.
7. Emerson T. R., Swan R. J., Ulbricht T. L. V. (1967) Biochemistry, **6**, 843—850.
8. Delabar J. M., Guschlbauer W., Shneider Ch., Thiery J. (1972) Biochimie, **54**, 1040—1048.
9. Ikehara M., Ohtsuka E. (1964) Chem. Pharm. Bull., **12**, 145—150.
10. Balaban A. T. (1970) Colloq. internat. CNRS, **191**, 233—239.
11. Acree T. E. (1971) Carbohydrates Solution Symp. Amer. Chem. Soc., Washington, D. C., 208—219.
12. Frostell R., Antikainen P. J. (1967) Suomen kem., **40**, B86—B88.
13. Antikainen P. J., Huttunen E. (1973) Suomen kem., **46**, B184—B190.
14. Шварц Е. М., Вямба С. Г. (1957) Ж. общ. химии, **27**, 23—28.
15. Назаренко В. А., Ермак Л. Д. (1967) Ж. неорганич. химии, **12**, 2472—2475.
16. Weser U. (1967) Z. Naturforsch., **22b**, 457—458.
17. Ts'o P. O. P. (1970) Monomeric Units of Nucleic Acids, Ch. 2, p. 113.
18. Tinoco I. (1962) Advances Chem. Phys., **4**, 113—160.

Поступила в редакцию
22.VI.1978

После доработки
1.IX.1978

CD STUDIES OF NUCLEOSIDES IN BORATE BUFFER

USATYI A. F., SIDOROV G. V., MYASOEDOV N. F.

Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The relationship was examined between the optical activity and conformational changes of naturally occurring nucleosides both in water and in borate buffer. It was shown that borate anions profoundly affect the solution conformation of nucleosides and nucleotides. The binding constants for nucleoside-borate association were determined.
