

Język Boryla

P O L S K A A K A D E M I A N A U K
INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ
ZAKŁAD STEREOCHEMII PRODUKTÓW NATURALNYCH

SYNTEZA, STRUKTURA I WŁASNOŚCI
TRANSFEROWYCH
KWAŚÓW RYBONUKLEINOWYCH

(Oddziaływanie tRNA z enzymami, izolacja
rzadkich nukleozydów, chemiczna synteza
i rozdział kwasów nukleinowych)

MATERIAŁY KONFERENCJI NAUKOWEJ W BOSZKOWIE
W KWIETNIU 1973 ROKU

POZNAŃ 1976

KIEROWNIK NAUKOWY
Maciej Wiewiórowski

REDAKTORZY NAUKOWI
Włodzimierz Krzyżosiak
Henryk Koroniak
Paweł Serafinowski

WYDAWNICTWO NAUKOWE UNIWERSYTETU IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU

Wydanie I. Nakład 200+80 egz.
Papier wkłęsłodruk., V kl. 65 g
Zamówienie 26/74/75 - F-4/861

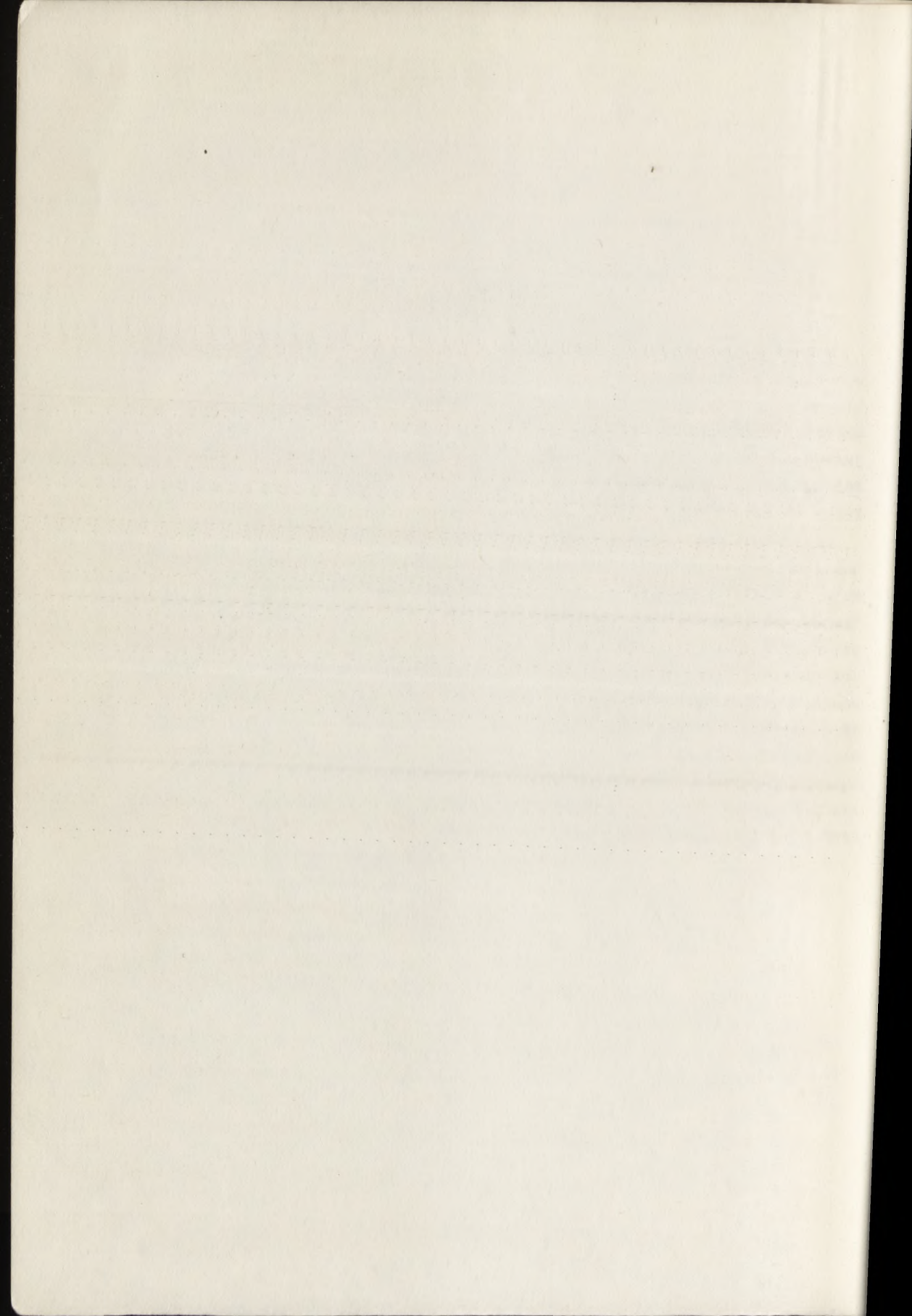
Ark. wyd. 22,50, ark. druk. 24,00
Oddano do druku w październiku 1974
Druk ukończono w czerwcu 1976

Wykonano w ZAKŁADZIE GRAFICZNYM UAM, Poznań, Al. Stalingradzka 1

WSTĘP

Ważnym zadaniem biologii molekularnej jest wyjaśnienie istoty życia w oparciu o znajomość budowy przestrzennej cząsteczek enzymów i kwasów nukleinowych. Problem ten, również ważny jak trudny, rozwiązywany jest obecnie metodami chemicznymi i fizycznymi. Na aktualnym etapie badań konieczne jest opracowanie metody umożliwiającej jednoznaczne ustalenie struktury. Największe nadzieje wiąże się z metodami spektroskopowymi pozwalającymi badać strukturę makrocząsteczek w roztworze.

Poprzednie dwa tomy poświęcone były głównie zagadnieniom syntezy, własnościom chemicznym i biologicznym kwasów nukleinowych. Niniejszy tom obejmuje referaty wygłoszone na ogólnopolskiej konferencji naukowej na temat: "Metody spektroskopowe w badaniach struktury kwasów nukleinowych, ich komponentów i analogów", która odbyła się w grudniu 1973 roku w Boszkowie koło Leszna. Celem referatów przygotowanych i wygłoszonych głównie przez słuchaczy Studium Doktoranckiego Instytutu Chemii UAM było zapoznanie młodego zespołu z najnowszymi osiągnięciami literaturowymi z tej dziedziny. Konferencja zorganizowana została przez Zakład Stereochemii Produktów Naturalnych Instytutu Chemii Organicznej PAN, Zespół Syntezy i Fotochemii Kwasów Nukleinowych Instytutu Chemii UAM i Koło Młodych Pracowników Nauki SZSP przy Instytucie Chemii UAM.



Włodzimierz Krzyżosiak, Piotr Barczyński

ANALIZA KONFORMACYJNA NUKLEOTYDÓW

STRESZCZENIE

W rozdziale tym zawarte są ogólne problemy analizy konformacyjnej nukleotydów, konwencje nomenklaturowe oraz wyniki badań krystalograficznych ze szczególnym uwzględnieniem konformacji pierścienia rybofuranozy. Przedstawione tutaj rezultaty stanowią dogodny materiał porównawczy do rozważań konformacji nukleotydów w roztworze i w niektórych przypadkach przyczyniły się do uściślenia reguł służących do interpretacji danych spektroskopowych.

WSTĘP

Jednym z intensywnie badanych i nie wyjaśnionych do dzisiaj problemów jest zagadnienie trójwymiarowej struktury kwasów nukleinowych, a szczególnie kwasów transferowych, które odgrywają kluczową rolę w procesie przekazywania informacji genetycznej.

Obecnie już wiadomo, że konformacje niektórych strukturalnych regionów kwasów nukleinowych są bardzo podobne w polimerach i ich monomerycznych jednostkach. W związku z tym uważa się, że siły określające przestrzenną strukturę polinukleotydów manifestują się już częściowo na poziomie monomerów. Celowe jest więc prowadzenie równoległych badań stereochemii nukleotydów, nukleotydów i wielkocząsteczkowych kwasów nukleinowych. Dla przykładu analiza krystalograficzna monomerycznych jednostek daje precyzyjne długości wiązań i precyzyjne kąty wiązań, które są ważnymi informacjami w rozważaniach stereochemii polimeru. Najbardziej jednak cenne dla biochemika są metody pozwalające określić konformację w roztworze wodnym, czyli w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. Należy od razu zaznaczyć, że takiej metody, porównywalnej precyzją z metodą rentgenograficzną jeszcze nie ma i przy interpretacji danych spektroskopowych korzysta się z

mniej lub bardziej przybliżonych reguł empirycznych oraz teoretycznie uzasadnionych korelacji np. równanie Karplusa.

W analizie konformacyjnej nukleotydów zarysowują się wyraźnie trzy drogi:

1. Badania krystalograficzne
2. Badania spektroskopowe w roztworze
3. Obliczenia teoretyczne

Chemicy teoretycy potrafią obecnie obliczać najbardziej uprzywilejowane konformacje. W swych rozważaniach energetycznych korzystają z dokładnych opisów geometrii cząsteczek podanych przez krystalografów. Optymistycznie nastroja fakt, że wyniki obliczeń teoretycznych pozostają w dobrej zgodzie z rezultatami badań spektroskopowych w roztworze.

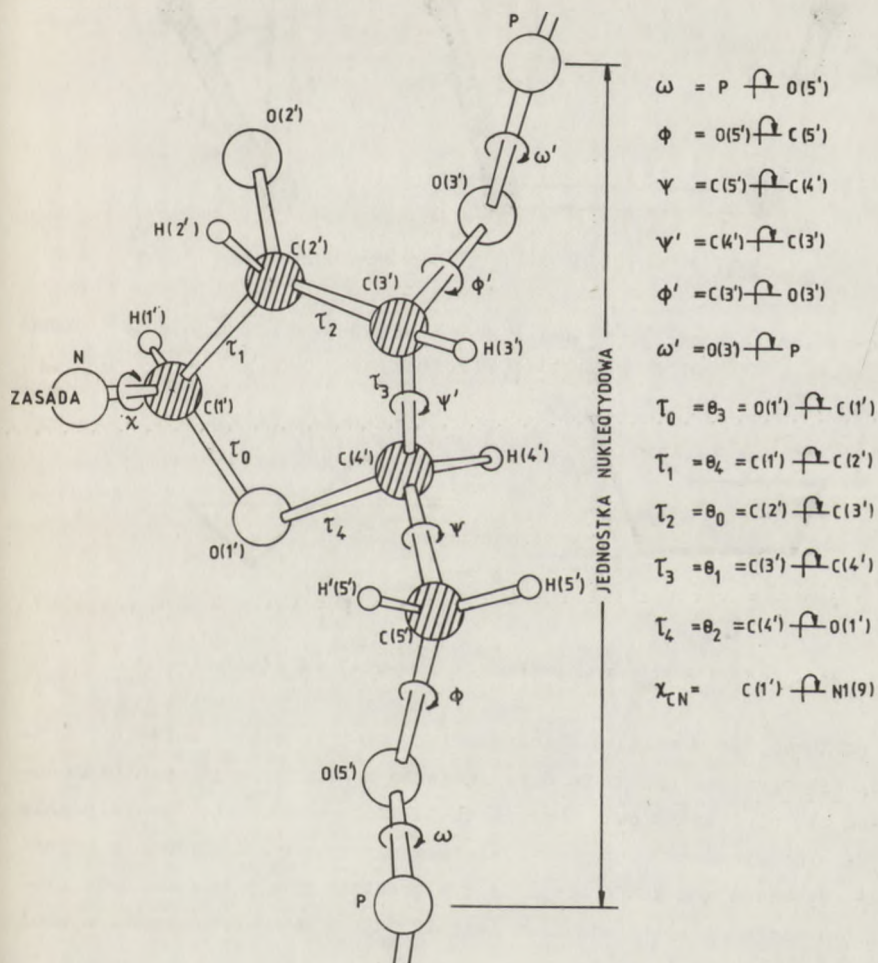
STRUKTURA NUKLEOZYDÓW I NUKLEOTYDÓW W KRYSZTALE. PROBLEMY NOMENKLATUROWE

Jak wiadomo, obrót wokół wiązań pojedynczych C-C, C-O, C-N i O-P w związkach organicznych nie jest całkowicie swobodny i z niezliczonej liczby teoretycznie możliwych konformacji realizowane są tylko niektóre charakteryzujące się niższymi wartościami energii potencjalnej. Trwałość tej czy innej konformacji cząsteczki zależy od sił odpychania (typu Van der Waalsa) między sąsiednimi, niezwiązanymi kowalencyjnie atomami i od sił przyciągania pomiędzy różnymi grupami funkcyjnymi na skutek oddziaływań dipolowych lub wiązania wodorowego [1].

Dokładnie zdefiniowane konformacje związków chemicznych uzyskuje się na podstawie znajomości kątów skręcenia wynikających z obrotu wokół wiązań pojedynczych. Do pełnego opisu konformacji jednostki nukleotydowej wymagana jest znajomość wartości i znaku dwunastu kątów [2] (rys. 1).

Pokazane na rysunku 1 dwanaście kątów przybiera wartość dodatnią w przypadku prawoskrętnego obrotu, kiedy patrząc wzdłuż jakiegoś wiązania, wiązanie dalsze obraca się zgodnie z ruchem wskazówek zegara w stosunku do wiązania bliższego. Kąty skręcenia przyjmują wartość zerową w przypadku konformacji naprzeciwległej (kryjącej) (rys. 2).

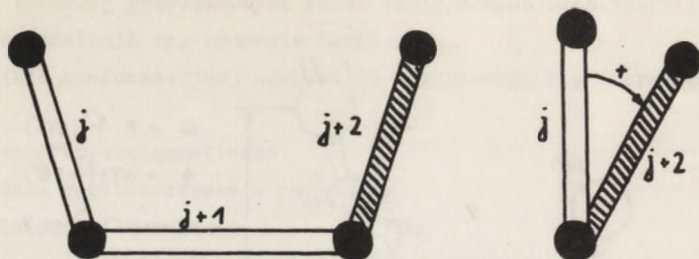
Przedmiotem dalszych rozważań będą trzy najważniejsze problemy w analizie konformacyjnej nukleotydów: wzajemne rozmieszczenie pierścienia cukrowego i zasady, konformacje egzocyklicznej grupy hydroksymetylenowej i konformacje pierścienia pentofuranozowego.



Ryc. 1. Oznakowanie kątów skręcenia w jednostce nukleotyduj

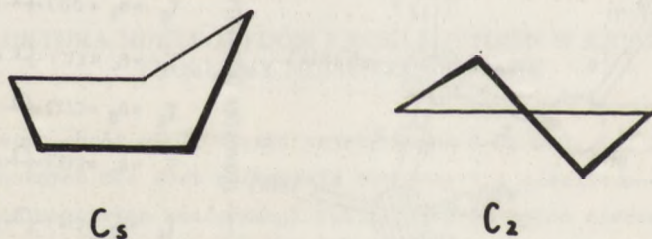
1. KONFORMACJE PIERŚCIENIA RYBOFURANOZY, KONCEPCJA PSEUDOROTACJI

W cyklopentanie najbardziej trwałe są te konformacje, w których jeden atom węgla jest poza płaszczyzną pozostałych czterech, albo dwa sąsiednie atomy węgla znajdują się po przeciwnych stronach płaszczyzny utworzonej



Rys. 2. Definicja obrotu i znaku kąta skręcenia

przez pozostałe trzy atomy. Te dwa sposoby pofałdowania pierścienia oznaczono symbolami C_s i C_2 [3] (rys. 3).

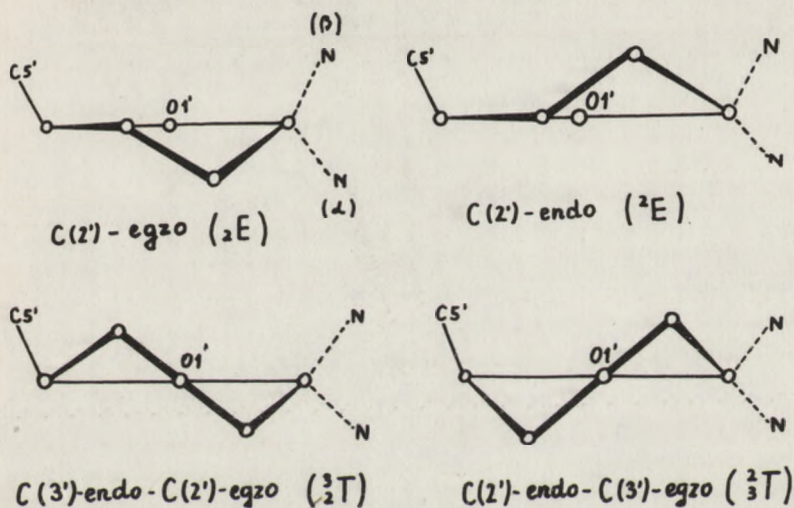
Rys. 3. Konformacje cyklopentanu C_s (koperta) i C_2 (półkrzesło)

Należy pamiętać, że w związku z zaburzeniem symetrii każdej z dwóch konformacji cyklopentanu odpowiada dziesięć różnych konformacji pentofuranozy. Można się więc spodziewać dwudziestu jakościowo różnych, teoretycznie możliwych symetrycznych konformacji pierścienia rybozy. Konformacje rybofuranozy odpowiadające konformacji C_s cyklopentanu przyjęto oznaczać symbolem E (envelope), a odpowiednikiem symbolu C_2 jest w pentofuranozie symbol T (twist) [4] (rys. 4.).

Indeks przy symbolu E lub T wskazuje, który lub które atomy znajdują się poza płaszczyzną pierścienia. Umieszczenie np. indeksu 2 u dołu symbolu E oznacza, że atom węgla C (2') jest wychylony z płaszczyzny pozostałych czterech atomów w kierunku przeciwnym (egzo) niż grupa hydroksymetylenowa na atomie węgla C (4').

Trzeba zaznaczyć, że niektóre z dwudziestu możliwych konformacji będą bardziej uprzywilejowane a inne mniej. Występujący w rybofuranozie atom tlenu posiada wolną parę elektronową a skądinąd wiadomo, że para elektronów nie wykazuje dużych sterycznych oddziaływań i dlatego nie może być mowy o istotnych oddziaływaniach typu kryjącego tej właśnie pary elektronowej z podstawnikami przy sąsiednich atomach węgla C (4') i C (1'). W związku z

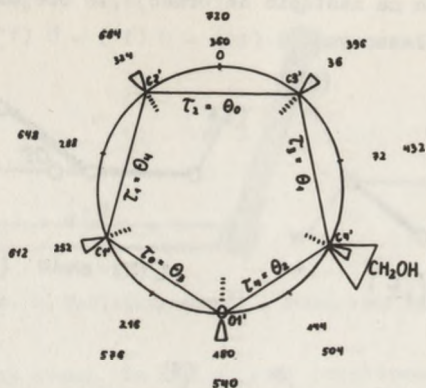
tym, jeżeli w cząsteczce ma nastąpić deformacja, to obejmie ona prawdopodobnie inne regiony niż płaszczyzna $C(4') - O(1') - C(1')$.



Rys. 4. Zasady oznaczania konformacji pierścienia pentofuranozy

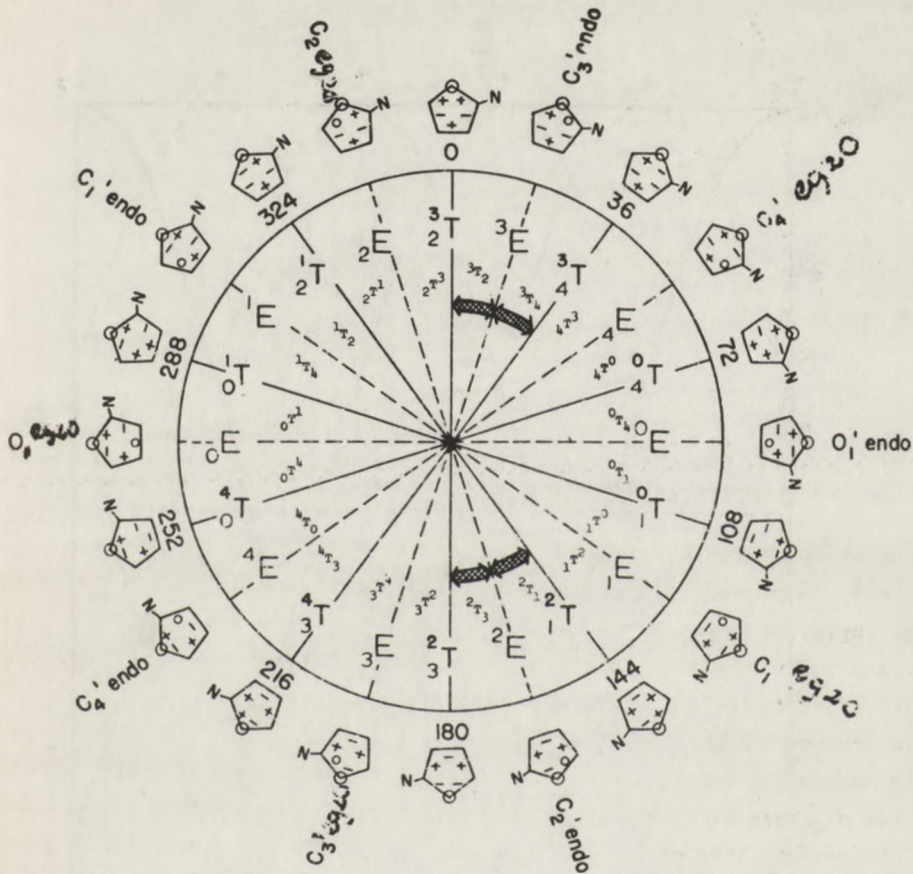
Przedstawiony powyżej zapis konformacji rybofuranazy oparty jedynie na własnościach symetrii pierścienia okazał się niewystarczający, gdyż nie pozwalał na zastosowanie koncepcji ciągłych zmian konformacji w ramach jednej krzywej energii potencjalnej. Nowy ulepszony zapis przedstawili Altona i Sundaralingam [5, 6]. Ich koncepcja pozwala na jednoznaczne określenie konformacji pierścienia furanozy przy pomocy dwóch parametrów: kąta fazowego pseudorotacji (P) i amplitudy pofałdowania (τ_m). Samo zjawisko pseudorotacji jest znane dla cyklopentanu już od dawna, a potwierdza je teoria [7, 8, 9] i doświadczenie [3, 10]. Polega ono na ciągłym przesuwaniu się kąta maksymalnego pofałdowania wokół pierścienia bez przeszkody w postaci wyraźnej bariery entalpii swobodnej. W niepodstawionym cyklopentanie kolejne konformacje posiadają w przybliżeniu równą energię, ale różnią się kątami skręcenia i kątami wiązań. Sytuacja ulega zmianie w przypadku czterohydrofuranu lub pentofuranozy, gdzie niektóre konformacje będą zdecydowanie bardziej uprzywilejowane energetycznie od innych.

W koncepcji Altony i Sundaralingama kąt fazowy pseudorotacji (P) jest parametrem konformacyjnym definiującym wszystkie kąty skręcenia i kąty wiązaniowe. Amplituda pofałdowania (τ_m) jest parametrem geometrycznym określającym maksymalny dla danego pierścienia kąt skręcenia.



Rys. 5. Istota pseudorotacji pierścienia pentofuranozy. Symbole u dołu podają kolejność pojawiania się poszczególnych konformacji na pseudorotacyjnym kole

Sens pseudorotacji pierścienia furanozowego przedstawia rys. 5. Jako konformację o zerowej wartości kąta fazowego pseudorotacji ($P=0$) przyjęto taką sytuację przestrzenną, w której atom C (3') jest wychylony z płaszczyzny w kierunku zgodnym z kierunkiem wiązania C (4') - C (5'), a atom C (2') jest wychylony w tym samym stopniu w kierunku przeciwnym. Jest to symetryczna konformacja C (3') endo - C (2') egzo (3_2T), charakteryzująca się maksymalną dodatnią wartością kąta τ_2 . Można teraz rozpatrywać przesuwanie się kąta maksymalnego pośladowania w kierunku zgodnym z ruchem wskazówek zegara. Atom węgla C (2') powraca do płaszczyzny pierścienia i przy kącie $\Delta = 36^\circ$ realizuje się konformacja C (3') endo (3E). Dalej można sobie wyobrazić sytuację, że atom węgla C (3') pozostaje poza płaszczyzną pierścienia, a atom C (4') wychyla się w kierunku przeciwnym i przy kącie $\Delta = 72^\circ$ tworzy się konformacja C (3') endo - C (4') egzo (3_4T) itd. W podobny sposób w odstępach $\Delta = 36^\circ$ jest możliwe tworzenie się siedemnastu pozostałych konformacji. Dopiero po dwukrotnym przejściu koła konformacyjnego ($\Delta = 720^\circ$) powraca się do wyjściowej konformacji (3_2T). Dla bardziej przejrzystego przedstawienia wszystkich konformacji na jednym kole zastąpiono parametr Δ kątem fazowym pseudorotacji (P) (przy czym $P = \Delta / 2$) i kolejna konformacja pojawia się nie co 36° a co 18° (rys. 6). Ciągłe zmiany konformacji cząsteczki, podobnie jak inny ruch periodyczny, mogą być opisane przez funkcję cosinusową wiążącą wartości pierścieniowych kątów skręcenia z kątem fazowym pseudorotacji (P) i amplitudą pośladowania (θ_m).



Rys. 6. Koło konformacyjne. Symbole (+) i (-) określają znak kątów skręcenia ($\tau_0, \tau_1, \tau_2, \tau_3, \tau_4$) w każdej z dwudziestu wyidealizowanych konformacji

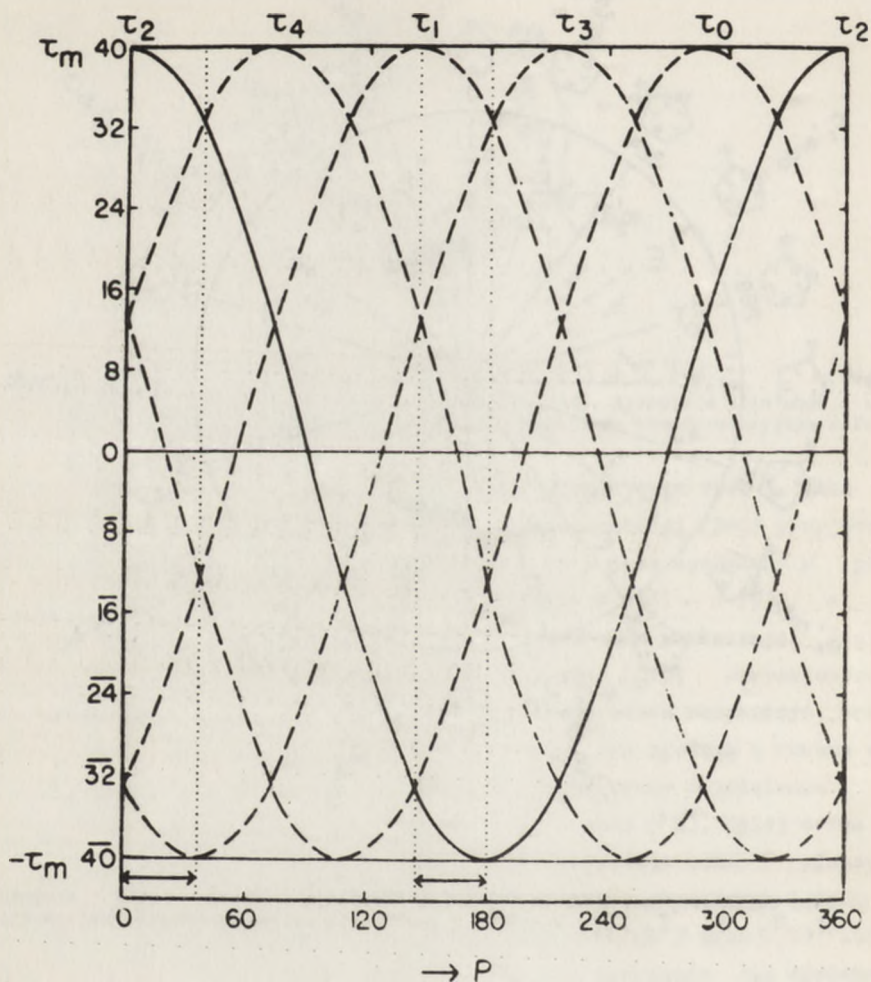
$$\theta_j = \theta_m \cos (P + j\sigma) \quad (1)$$

gdzie $j = 0-4$ $\sigma = 144^\circ$

dla $j = 0$ równanie (1) redukuje się do postaci

$$\theta_0 = \theta_m \cos P \quad (2)$$

Z równania (2) wynika, że kąt skręcenia θ_0 (τ_2) przyjmuje wartości $\theta_m, 0, -\theta_m, 0, \theta_m$ w miarę jak wartość parametru P zmierza od 0° do 360° . Kolejne kąty skręcenia $\theta_1, \theta_2, \theta_3$ i θ_4 osiągają maksymalną dodatnią wartość odpowiednio przy $\Delta = 144^\circ, 288^\circ, 432^\circ, 576^\circ$, które to kąty są wielokrotnościami $\sigma = 144^\circ$.



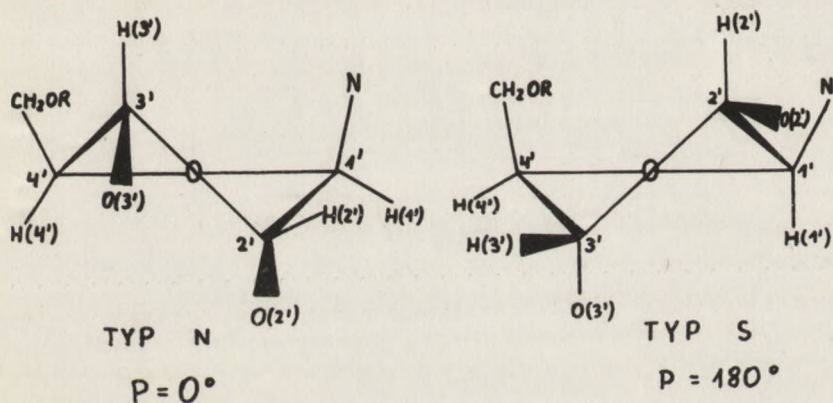
Rys. 7. Zależność kątów skręcenia $\tau_0 - \tau_4$ od P

Z równania (1) można wyprowadzić wzór na parametr P :

$$\operatorname{tg} P = \frac{(\theta_2 + \theta_4) - (\theta_1 + \theta_3)}{2 \theta_0 (\sin 36^\circ + \sin 72^\circ)} \quad (3)$$

W ten sposób dysponując wartościami wszystkich pięciu kątów skręcenia można wyliczyć kąt fazowy pseudorotacji i umieścić dany związek w odpowied-

nim punkcie drogi pseudorotacyjnej. Północna połowa pseudorotacyjnego koła oznaczona ogólnym symbolem N zawiera wszystkie konformacje charakteryzujące się dodatnią wartością kąta skręcenia $\theta_0 = \tau_2$ ($P = 0 \pm 90^\circ$). Na południowej połowie koła znajdują się konformacje z ujemnymi kątami τ_2 ($P = 180^\circ \pm 90^\circ$).



Rys. 8. Konformacje $(\frac{3}{2}T)$ i $(\frac{2}{3}T)$ zajmujące środki zakresów N i S

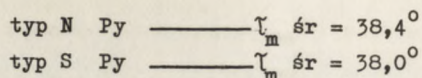
Na podstawie badań krystalograficznych sześćdziesięciu nukleozydów i nukleotydów stwierdzono, że β -cukry zajmują dwa wąskie zakresy pseudorotacyjnej drogi (rys. 6). Zdecydowana większość pierścieni rybozy i deoksyrybozy charakteryzuje się kątami fazowymi pseudorotacji w zakresie $0-36^\circ$ lub $144-180^\circ$.

Reszty cukrowe typu N w prawie wszystkich β -glikozydach pirymidynowych posiadają wartość P w zakresie $2-25^\circ$. W konformacjach typu S β -glikozydy pirymidynowe wykazują większą rozpiętość P leżącą w zakresie $139-175^\circ$. W pochodnych purynowych z pewnym przybliżeniem sytuacja przedstawia się podobnie.

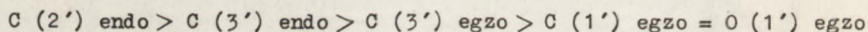
Amplituda pofałdowania θ_m (τ_m) w większości badanych związków mieści się w zakresie $30-45^\circ$ przyjmując wartość średnią 39° . Na wartość τ_m mają wpływ takie czynniki, jak efekt upakowania w kryształach lub wiązanie wodorowe, które powodują spłaszczenie pierścienia (τ_m małe) lub zwiększają pofałdowanie (duże τ_m).

Zauważono nieznaczne różnice w wartościach τ_m dla pochodnych puryny i pirymidyny:

$$\begin{array}{l} \text{typ N Pu} \text{ ————— } \tau_m \text{ śr} = 39,7^\circ \\ \text{typ S Pu} \text{ ————— } \tau_m \text{ śr} = 39,5^\circ \end{array}$$



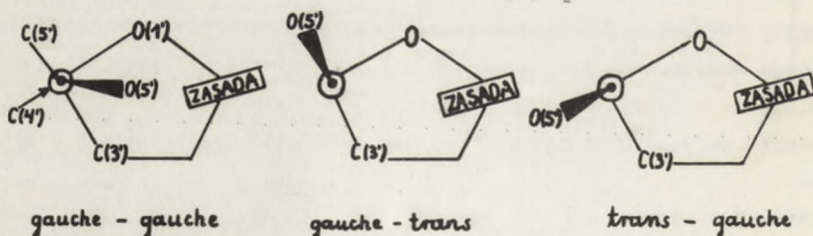
Srednia amplituda pofałdowania jest zawsze większa w konformacjach typu N. Również pochodne purynowe charakteryzują się większym pofałdowaniem pierścienia niż pochodne pirymidynowe. Na podstawie sześćdziesięciu przebadanych β -nukleozydów i β -nukleotydów można ustalić szereg przedstawiający częstotliwość występowania poszczególnych konformacji w stanie kryształicznym:



Przez symbole C(2') endo i C(3') endo rozumie się w tym przypadku nie tylko konformacje kopertowe 2E i 3E , ale również konformacje półkrzesła sąsiadujące z nimi na pseudorotacyjnym kole. W kryształach α -nukleozydów stwierdzono występowanie konformacji 3T , 2E , 4T i 4E , przy czym dwie pierwsze konformacje występują tylko w pochodnych rybozy a dwie pozostałe w pochodnych dezoksyrybozy.

2. KONFORMACJE EGZOCYKLICZNEJ GRUPY HYDROKSYMETYLENOWEJ

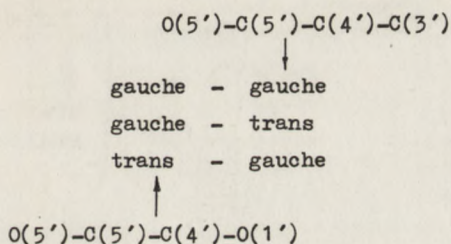
Podczas obrotu wokół wiązania C(4') - C(5') kąt skręcenia przyjmuje trzy uprzywilejowane wartości odpowiadające konformacjom gauche-gauche, gauche-trans i trans-gauche (rys. 9)



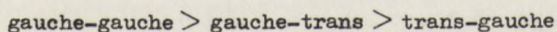
Rys. 9. Grupa 5' hydroksylowa w konformacjach gg, gt, tg

W tych trzech naprzemianległych konformacjach występują najmniejsze oddziaływania niewiązaniowe grupy 5' hydroksylowej z pozostałymi atomami cukrowymi. Położenie grupy 5' hydroksylowej określane jest w stosunku do

pierścieniowego atomu tlenu O (1') i pierścieniowego atomu węgla C (3').
Stąd niezbędne są dwa symbole do opisu jednej konformacji. Np.



W kryształach nukleozydów stwierdzono znaczne uprzywilejowanie dla rotameru gauche-gauche, a ilościowy udział poszczególnych struktur rotamerowych przedstawia się podobnie w α i β glikozydach.



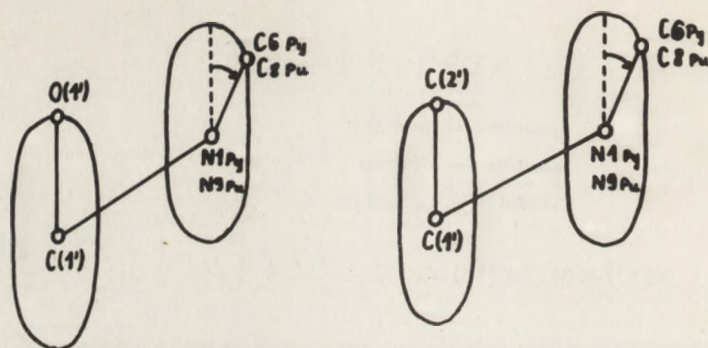
Uprzywilejowanie konformacji gg w β nukleozydach próbowano tłumaczyć oddziaływaniem atomu O(5') z grupą C(8)-H w nukleozydach purynowych lub z grupą C(6)-H w nukleozydach pirymidynowych. To tłumaczenie nie wytrzymuje krytyki, gdyż w nukleozydach - α , gdzie ze względów strukturalnych oddziaływanie takie nie może zachodzić, przeważa również rotamer gg. Obecnie uważa się, że oddziaływania typu dipol-dipol między atomami O(1') i O(5') są bardziej korzystne w konformacji gg niż w pozostałych konformacjach [4].

3. KONFORMACJE SYN-ANTI NUKLEOZYDÓW

Dla określania konformacji wynikających z obrotu wokół wiązania glikozydowego C-N proponowano kilka definicji. Istniały różnice w wyborze odpowiedniej czteroatomowej płaszczyzny mającej tworzyć zerową wartość χ_{CN} . Nie było też zgodności co do zakresów syn i anti.

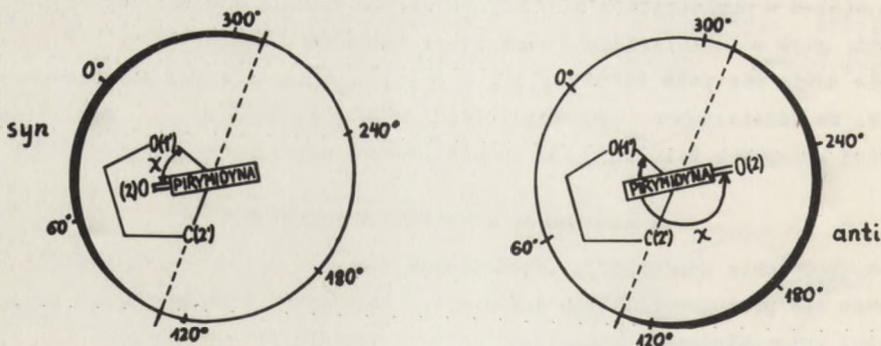
W definicji Sundaralingama [2] pierścieniowy atom tlenu O(1') użyty jest jako punkt odniesienia. Kąt skręcenia χ_{CN} przyjmuje wartość zerową wtedy, gdy wiązanie N(1)-C(6) w pochodnych pirymidyny lub wiązanie N(9)-C(8) w pochodnych puryny znajduje się w konformacji naprzeciwległej w stosunku do wiązania C(1') - O(1'). Przedział kątów $\chi_{\text{CN}} = 0 \pm 90^\circ$ odpowiada konformacji anti, a zakres $\chi_{\text{CN}} = 180^\circ \pm 90^\circ$ opisuje konformacje syn.

Według koncepcji Seangera i Scheita [11] punktem odniesienia jest pierścieniowy atom węgla C(2'). Kąt skręcenia χ_{CN} opisany jest atomami C(2')-C(1')-N(1)-C(6) w pochodnych pirymidynowych lub atomami C(2')-C(1')-N(9)-



Rys. 10. Zasady wyboru zerowego kąta χ_{CN} według definicji Sundaralingama (a) i Saengera i Scheita (b)

-C(8) w pochodnych purynowych. Kąty χ_{CN} w zakresie od 0 do +180° odpowiadają konformacji syn, a od 0 do -180° konformacji anti.



Rys. 11. Nowa definicja kąta χ_{CN} i zakresów syn i anti

B. Pullman, W. Saenger, V. Sasisekharan, M. Sundaralingam i H. Wilson [12] podali niedawno nową definicję zerowego kąta skręcenia χ_{CN} i zakresów syn-anti. Przy wyborze zerowej wartości χ_{CN} punktem odniesienia jest atom O(1'). Kąt χ_{CN} wynosi 0, gdy atomy O(1')-C(1')-N(1)Py(9)Pu-C(2)Py(4)Pu leżą w jednej płaszczyźnie, przy czym O(1') jest ułożone cis do C(2)(4). Granicą zakresów syn i anti jest zerowa wartość kąta skręcenia utworzonego przez płaszczyznę $\hat{C}(2)_{Py(4)Pu}-N(1)_{Py(9)Pu}-C(1')-C(2')$. Kąty skręcenia χ_{CN} w zakresie od 290° poprzez zero do 110° przedstawiają konformacje syn, a

kąty od 110° do 290° odpowiadają konformacji anti. Ogromna większość kryształicznych nukleozydów i nukleotydów znajduje się w konformacji anti. Kąt χ_{CN} przybiera wartości w zakresie od -90° do $+90^\circ$ (definicja Sundaralingama). Wyjątkiem jest np. 4-tiourydyna znajdująca się w konformacji syn.

LITERATURA

- [1] Koczetkow N.K., Budowski E.J., Swieridłow E.D., Simukowa N.A., Turczyński M.F., Szibajew W.J., "Chemia organiczna kwasów nukleinowych" wyd. Chemia, Moskwa 1970.
- [2] Sundaralingam M. 7 821-860 (1969) Biopolymers.
- [3] Eliel E.L., Alinger N.L., Angyal G.A., Morrison G.A., "Conformational Analysis" Wiley N.Y. 1965.
- [4] Sundaralingam M., J.Am.Chem.Soc. 93 6644 9 (1971).
- [5] Altona C., Sundaralingam M., *ibid.* 94 8205 (1972).
- [6] Altona C., Sundaralingam M., *ibid.* 95 2333 (1973).
- [7] Kilpatrick J.E., Pitzer K.S., Spitzer R., *ibid.* 69 2483 (1947), *ibid.*, 69, 211 (1947).
- [8] Pitzer K.S., Donath W.E., *ibid.* 81 3213 (1969).
- [9] Hendickson J.B., *ibid.* 83 4537 (1961), *ibid.* 85 4059 (1963).
- [10] Altona C., Buys H.R., Haringa E., Rec.Trav.Chim. 85 973 (1966) *ibid.*, 85 983 (1966), *ibid.*, 85 998 (1966).
- [11] Saenger W., Scheit K.H., J.Mol.Biol. 50 153 (1970).
- [12] Pullman, B., Saenger W., Sasisekharan V., Sundaralingam M., Wilson M.R., V. Jerusalem Symposium on Quantum Chemistry and Biochemistry (1972) za Saenger W., Angew.Chem. (1973) 680.

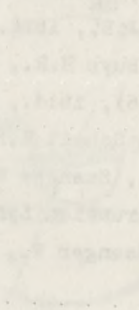
DYSKUSJA

W dyskusji głos zabrali mgr A. Jaworski i mgr M. Remin, którzy zwrócili uwagę na niektóre braki koncepcji pseudorotacji, wprowadzonej przez Altonę i Sundaralingama do analizy konformacyjnej nukleozydów. Podkreślono ryzykowność stosowania danych uzyskanych w oparciu o krystalografię do identyfikacji struktury w roztworze metodą PMR.

1947-1948
1949-1950
1951-1952
1953-1954
1955-1956
1957-1958
1959-1960
1961-1962
1963-1964
1965-1966
1967-1968
1969-1970
1971-1972
1973-1974
1975-1976
1977-1978
1979-1980
1981-1982
1983-1984
1985-1986
1987-1988
1989-1990
1991-1992
1993-1994
1995-1996
1997-1998
1999-2000
2001-2002
2003-2004
2005-2006
2007-2008
2009-2010
2011-2012
2013-2014
2015-2016
2017-2018
2019-2020
2021-2022
2023-2024
2025-2026
2027-2028
2029-2030
2031-2032
2033-2034
2035-2036
2037-2038
2039-2040
2041-2042
2043-2044
2045-2046
2047-2048
2049-2050
2051-2052
2053-2054
2055-2056
2057-2058
2059-2060
2061-2062
2063-2064
2065-2066
2067-2068
2069-2070
2071-2072
2073-2074
2075-2076
2077-2078
2079-2080
2081-2082
2083-2084
2085-2086
2087-2088
2089-2090
2091-2092
2093-2094
2095-2096
2097-2098
2099-2100



1947-1948
1949-1950
1951-1952
1953-1954
1955-1956
1957-1958
1959-1960
1961-1962
1963-1964
1965-1966
1967-1968
1969-1970
1971-1972
1973-1974
1975-1976
1977-1978
1979-1980
1981-1982
1983-1984
1985-1986
1987-1988
1989-1990
1991-1992
1993-1994
1995-1996
1997-1998
1999-2000
2001-2002
2003-2004
2005-2006
2007-2008
2009-2010
2011-2012
2013-2014
2015-2016
2017-2018
2019-2020
2021-2022
2023-2024
2025-2026
2027-2028
2029-2030
2031-2032
2033-2034
2035-2036
2037-2038
2039-2040
2041-2042
2043-2044
2045-2046
2047-2048
2049-2050
2051-2052
2053-2054
2055-2056
2057-2058
2059-2060
2061-2062
2063-2064
2065-2066
2067-2068
2069-2070
2071-2072
2073-2074
2075-2076
2077-2078
2079-2080
2081-2082
2083-2084
2085-2086
2087-2088
2089-2090
2091-2092
2093-2094
2095-2096
2097-2098
2099-2100



1947-1948
1949-1950
1951-1952
1953-1954
1955-1956
1957-1958
1959-1960
1961-1962
1963-1964
1965-1966
1967-1968
1969-1970
1971-1972
1973-1974
1975-1976
1977-1978
1979-1980
1981-1982
1983-1984
1985-1986
1987-1988
1989-1990
1991-1992
1993-1994
1995-1996
1997-1998
1999-2000
2001-2002
2003-2004
2005-2006
2007-2008
2009-2010
2011-2012
2013-2014
2015-2016
2017-2018
2019-2020
2021-2022
2023-2024
2025-2026
2027-2028
2029-2030
2031-2032
2033-2034
2035-2036
2037-2038
2039-2040
2041-2042
2043-2044
2045-2046
2047-2048
2049-2050
2051-2052
2053-2054
2055-2056
2057-2058
2059-2060
2061-2062
2063-2064
2065-2066
2067-2068
2069-2070
2071-2072
2073-2074
2075-2076
2077-2078
2079-2080
2081-2082
2083-2084
2085-2086
2087-2088
2089-2090
2091-2092
2093-2094
2095-2096
2097-2098
2099-2100

Henryk Koroniak, Barbara Nowak

ZALEŻNOŚĆ WICYNALNYCH STAŁYCH SPRĘŻENIA $J_{HH'}$ OD KĄTÓW DWUŚCIENNYCH $\Phi_{HH'}$ W RYBOFURANOZIE. RÓWNANIE KARPLUSA I JEGO MODYFIKACJE

STRESZCZENIE

W referacie przedstawiono koncepcje opisania stałej sprzężenia wicyalnych protonów $J_{HH'}$ jako funkcji kąta dwuściennego $\Phi_{HH'}$. Przedstawiono przykładowo metodę uściślenia empirycznych stałych równania Karplusa dla rybonukleozydów i ich analogów. Przedyskutowano zakres stosowalności i wielkości błędów wynikające ze stosowania zależności Karplusa.

Ustalanie przestrzennego rozmieszczenia atomów w dużych cząsteczkach polimerów biologicznych ma ogromne znaczenie przy ustalaniu ich funkcji. Aby jednak w sposób jednoznaczny określić strukturę badanego związku konieczna jest do tego metoda umożliwiająca wniknięcie w tę strukturę. W przypadku wydzielonych w postaci krystalicznej cząsteczek polimerów np. tRNA czy też ich fragmentów otrzymanych syntetycznie (nukleozydy, nukleotydy etc.) problem jest możliwy do rozwiązania przy pomocy metod rentgenograficznych. Dotyczy to ogromnej większości przypadków. Problem ustalenia jednoznacznej struktury komplikuje się jednak zasadniczo, gdy mamy do czynienia nie z substancją krystaliczną, ale z jej roztworem. Badania materiałów biologicznych w roztworach mają kapitalne znaczenie ze względu na fakt, że są to warunki najbardziej zbliżone do tych, w jakich występują w żywych organizmach. Szczególnie cenną w tym zakresie okazała się metoda NMR, zwłaszcza że czynione są próby ściśle teoretycznego ujęcia i interpretacji wyników badań uzyskanych tą drogą.

NMR jest szczególnie pomocny przy ustaleniu struktury pierścienia cukrowego i jego konformacji. Z danych uzyskanych z widm NMR można wyciągnąć wnioski dotyczące struktury pierścienia cukrowego. Jednym z najciekawszych

problemów związanych bezpośrednio z ustaleniem konformacji jest interpretacja danych i wyciąganie wniosków na podstawie stałych sprzężenia protonów przyłączonych do sąsiednich atomów węgla (wicynalnych).

Problem ten został w sposób teoretyczny rozwiązany przez Karplusa [1]. Rozważania swe Karplus przedstawił, bazując na teorii wiązań walencyjnych, dla prostych cząsteczek organicznych: etanu i etylenu będącymi w pewnym sensie związkami modelowymi w tych rozważaniach.

Najprościej sprzężenie wicynalnych protonów można opisać następująco:

$$\Delta E_{HH'} = \hbar J_{HH'} I_H I_{H'} \quad (1)$$

gdzie ΔE jest energią oddziaływania między protonami o spinach $I_H, I_{H'}$, a $J_{HH'}$ jest stałą sprzężenia. Aby z powyższego równania uzyskać wartość $J_{HH'}$, należy wyznaczyć (lub opisać funkcjami zawierającymi mierzone parametry) pozostałe czynniki występujące we wzorze (1). Do wyznaczenia ΔE konieczne były założenia poczynione przez Karplusa, a mianowicie: przyjęcie założeń teorii wiązań walencyjnych, przyjęcie idealnej hybrydyzacji sp^3 (dla etanu) lub sp^2 (dla etylenu) oraz długości wiązań C-C równych $1,543 \text{ \AA}$ i C=C równych $1,353 \text{ \AA}$.

Po szeregu przekształceniach matematycznych i przedstawieniu wartości stałej sprzężenia w formie funkcji cyklicznej podał Karplus następującą zależność:

$$J_{HH'} = A \cos^2 \Phi_{HH'} + B \quad (2)$$

gdzie:

$$A = 9,5 \quad \text{dla} \quad 0 \leq \Phi \leq 90$$

$$A = 8,5 \quad \text{dla} \quad 90 \leq \Phi \leq 180$$

$$B = -0,28$$

We wzorze (2) $\Phi_{HH'}$ jest kątem dwuściennym zawartym między płaszczyznami wyznaczonymi przez HCC i CCH'. Rozważania teoretyczne wyprowadzone przez Karplusa były w dobrej zgodności jakościowej z danymi eksperymentalnymi uzyskanymi dla etanu i etylenu [1], (tab. 1).

Brak ilościowej zgodności sam Karplus upatrywał w przejściu doś radicalnych ograniczeń w założeniach. Nie dyskutuje on wpływu zaburzenia przyjętej hybrydyzacji, ani też nie rozważa możliwości drgań całej cząsteczki. Tego typu zmiany obserwuje się przez przyłączenie podstawnika zmieniającego w zasadniczy sposób gęstość elektronową cząsteczki. Problemy te zostały jednak przedyskutowane przez Karplusa w późniejszej pracy [2]. Podaje on

T a b e l a 1

Wartości stałych sprzężenia $J_{HH'}$, wicynalnych protonów dla etanu i etylenu

$\Phi_{HH'}$	$J_{HH'}$, - teoret. [Hz]	$J_{HH'}$, - eksp. [Hz]
Etan		
60°	1,7	2 - 4
180°	9,2	5 - 8
Etylen		
0° - cis	6,1	6 - 11
180° - trans	11,9	13 - 18

także inną formę uznania ujmującego zależność stałej sprzężenia $J_{HH'}$ od kąta dwuściennego $\Phi_{HH'}$:

$$J_{HH'} = A \cos 2 \Phi + B \cos \Phi + C \quad (3)$$

gdzie przy przyjęciu założeń, że C-C = 1,543 Å, hybrydyzacja sp^3 i średnio $\Delta E = 9$ eV [patrz wzór (1)] otrzymuje się wartości dla A=4,5 B=-0,5, C=4,22 Hz.

Równanie to wykazuje również tylko jakościową zgodność z eksperymentalnymi wynikami.

Tak jak rozważania Karplusa dotyczyły związków prostych, jednocześnie pojawiają się dane o stałych sprzężenia wicynalnych protonów w cząsteczkach bardziej złożonych.

Lemieux i współpracownicy po przebadaniu dużej liczby acetylowanych aldo-piranoz wykazali, że stałe sprzężenia między wicynalnymi aksjalnymi protonami są dwa do trzech razy większe niż stałe sprzężenia dla każdej innej pary protonów [3]. Dane te zostały później uściślone [4-10] (tabela 2).

Ważnym elementem w dalszym rozwoju badań nad sprzężeniem wicynalnych protonów było przyjęcie koncepcji pofałdowania pierścienia furanozowego [11, 12]. Możliwość istnienia całkowicie płaskiej struktury rybofuranozy wykluczono już na podstawie badań modeli cząsteczkowych z powodu:

1. nieuprzywilejowanej konformacji kryjącej w wypadku płaskiej struktury pierścienia,

2. oddziaływań $O(2')$ - $O(3')$, gdyż z badań modeli cząsteczkowych wynikało, że odległość $O(2')$ - $O(3')$ wynosi $2,6 \text{ \AA}$, podczas gdy promień van der Waalsa dla tlenu wynosi $1,4 \text{ \AA}$.

T a b e l a 2

Stałe sprzężenia wicynalnych protonów $J_{HH'}$, dla pochodnych cukrów (forma krzeselkowa)

Sprężenie	Zakres wartości $J_{HH'}$ [Hz]	Wartość średnia $J_{HH'}$ [Hz]	Ilość przebadanych związków
J_{aa}	8,6-11,5	9,63	50
J_{ee}	0,6- 3,5	1,54	44
J_{ea}	1,5- 5,8	3,66	74

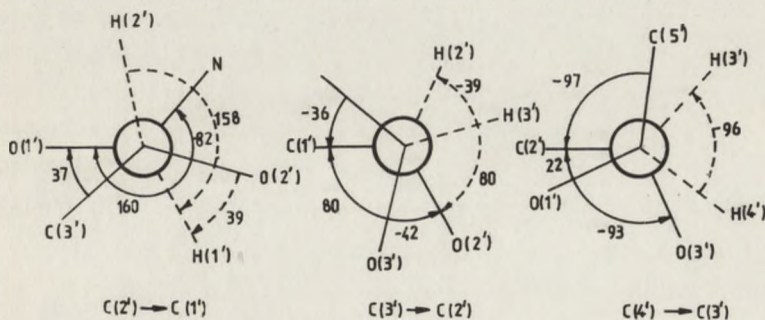
Stwierdzić należy, że znajomość stałych sprzężenia wicynalnych protonów w pierścieniu rybofuranozy (gdyż do rybofuranozy ograniczę dalsze rozważania) pozwala w sposób mniej lub bardziej dokładny określić konformację pierścienia. Klasyczne podejście do ustalenia struktury polega na tym, że z badań modeli wyznacza się wartości kątów dwuściennych $\Phi_{HH'}$ dla poszczególnych par protonów, a następnie z równania Karplusa liczy się stałe sprzężenia "teoretyczne" i porównuje z eksperymentalnymi. Stwierdzić trzeba, że metodyka ta nie jest zbyt wyrafinowana w badaniu nieznannej struktury. Dalsze rozważania wymagają pewnego uzupełnienia. Istniejące w roztworze cząsteczki nie są cząsteczkami sztywnymi, lecz mogą zmieniać swoją konformację. Należy założyć, że w roztworze istnieje równowaga dynamiczna między dwoma trwałymi konformacjami. Odwołać należy się tutaj do badań rentgenograficznych, które pozwoliły ustalić, że w kryształach wszystkie dotychczas znane pochodne nukleozydów i nukleotydów z serii rybozy występują tylko w dwóch konformacjach: $C(3')$ endo (typ N) i $C(2')$ endo (typ S) [12]. Dane rentgenograficzne podają także, że konformacja taka nie musi być idealna ze względu na oddziaływania innego typu. Generalnie można przyjąć, że tylko te dwie konformacje są energetycznie uprzywilejowane, a inne oddziaływania (np. grup hydroksylowych) wykluczają możliwość istnienia innych trwałych konformerów. Aby jednak dojść do ilościowych wniosków konieczne jest dokładniejsze zapoznanie się z metodyką badań. Dokładną strukturę większości cząsteczek można określić przy pomocy metod rentgenograficznych. Pozwalają one podać współrzędne poszczególnych atomów w

komórce krystalograficznej. Ustalając konformację związku w kryształach należy możliwie jak najdokładniej określić położenie wszystkich atomów, w tym także wodoru, który jest najmniej widoczny w badaniach rentgenograficznych. Na podstawie analizy gęstości elektronowej w cząsteczce można przyjąć średnią wartość współrzędnych dla atomów wodoru, jednak błąd tej metody jest stosunkowo duży i szacowany na około $\pm 10^\circ$ odchylenia dwuosiennego kąta Φ_{HH} (metoda A). Inne podejście opiera się na tym, że po wyznaczeniu wszystkich atomów (oprócz wodoru) przyjmuje się, że wiązanie C-H leży na dwuosiennej kąta między dwoma pozostałymi wiązaniami przy tym samym węglu np. CC, CN, CO. Błąd tej metody jest mniejszy i ocenia się go na $\pm 1^\circ$ odchylenia dwuosiennego kąta Φ_{HH} (metoda B). Dokładniej widać to w projekcji Newmana (rys. 1 i 2). Dla porównania tabela 3 podaje wartości kątów Φ_{HH} znalezione każdą z tych metod [13, 15].

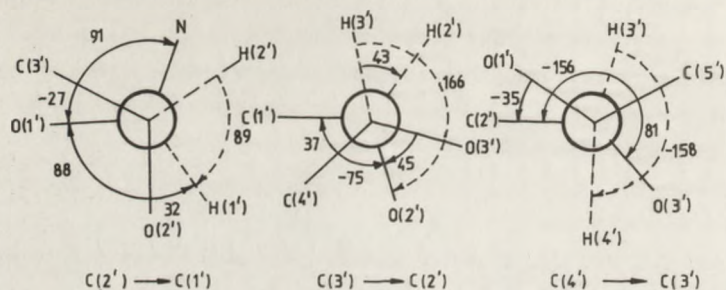
T a b e l a 3

Kąty dwuosienne Φ_{HH} dla D-rybonukleozydów i nukleotydów otrzymane różnymi metodami

Typ konformeru	Metoda	$\Phi_{1'2'}$ [deg]	$\Phi_{2'3'}$ [deg]	$\Phi_{3'4'}$ [deg]
N	B	89	43	- 158
N	A	92	41	- 162
N	Modeli mech.	105	45	- 165
S	B	158	- 39	- 96
S	A	155	- 39	- 100
S	Modeli mech.	165	- 45	- 105



Rys. 1. Kąty dwuosienne w projekcji Newmana wzdłuż wiązań C(1') - C(2'), C(2') - C(3') i C(3') - C(4') dla konformeru N



Rys. 2. Kąty dwusienne w projekcji Newmana wzdłuż wiązań $C(1') - C(2')$, $C(2') - C(3')$ i $C(3') - C(4')$ dla konformera S

Równanie Karplusa podaje korelacje między $J_{HH'}$ i $\Phi_{HH'}$, tylko w sposób jakościowy. Aby formułę tę uściślić i nadać jej bardziej ilościowy charakter konieczna jest weryfikacja stałych występujących w równaniu (A, B, C) dla różnych klas związków. Stałe te różnią się między sobą w sposób dość znaczny, co potwierdziły inne badania [14].

W 1973 roku Altona i Sundaralingam zaproponowali ciekawą modyfikację równania Karplusa [15].

Rozważając podane wcześniej równanie

$$J_{HH'} = A \cos^2 \Phi_{HH'} - B \cos \Phi_{HH'} + C \quad (4)$$

zaproponowali, aby przyjąć, że wartość stałej C równa się 0, co oznacza fizycznie, że przy kącie dwusennym $\Phi_{HH'} = 90^\circ$ stała sprzężenia $J_{HH'} = 0$. Jest to o tyle słuszne, że dotychczasowa wartość podana przez Karplusa dla $C = -0,28$ nie miała sensu fizycznego, a stanowiła jedynie teoretyczną wartość dla stałej sprzężenia. Z innych rozważań teoretycznych (na podstawie teorii MO) [16] wyliczono minimalną wartość $J_{HH'}$, równą $C = +0,2$. Założenie poczynione przez Altonę i Sundaralingama ma charakter nadania wartości C w równaniu (4) realnego sensu fizycznego. Do wyznaczenia pozostałych semiempirycznych współczynników A i B należy podać dwa liniowo niezależne równania opisujące zależność między A i B. Pociąga to za sobą znalezienie dwóch par wartości $J_{HH'}$, przy określonej wartości kąta $\Phi_{HH'}$, co napotyka na spore trudności, gdy założymy istnienie równowagi konformacyjnej N/S.

W przypadku pierścienia rybozy możliwe jest znalezienie dość łatwo dwóch takich równań, co przedstawił Altona i Sundaralingam [15]. Analizując

dane z tabeli 3 należy stwierdzić, że kąt dwuścienny $\Phi_{2'3'cis}$ ma praktycznie taką samą wartość dla konformerów NiS - odpowiednio 43° i 39° . Można więc przyjąć, że zmierzona stała sprzężenia $J_{2'3'}$ powinna wykazywać nieznaczną zależność od udziału konformerów w badanym roztworze (N/S). Z danych eksperymentalnych dla dużej liczby nukleozydów i nukleotydów serii rybozy mamy średnią wartość stałej sprzężenia $J_{2'3'} = 5,1$ Hz (dane te waha-ają się w zakresie 4,8 do 5,5 Hz) (tabela 4) [17-23]. Można powiedzieć, że średnia wartość stałej sprzężenia $J_{2'3'} = 5,1$ Hz będzie reprezentować mieszaninę konformerów w stosunku 1 : 1.

T a b e l a 4

Stałe sprzężenia wicynalnych protonów J_{HH} , dla niektórych
D-rybo-nukleozydów i nukleotydów [Hz]

Związek		$J_{1'2'}$	$J_{2'3'}$	$J_{3'4'}$	$J_{1'2'}$ $J_{3'4'}$	Temp. °C
Fosforan 5' - adenozy (5' - AMP)	/17	5,3	4,8	3,8	9,1	27
Fosforan 5' - adenozy (5' - AMP)	/18	5,0	5,0	4,5	9,5	27
Urydyna	/19	4,4	5,3	5,5	9,9	28
Urydyna	/20	4,8	5,2	5,4	10,2	23
Urydyna	/20	5,1	5,2	5,1	10,2	80
β - pseudourydyna ($\beta\Psi U$)	/21	5,0	5,0	5,2	10,2	30
β - pseudourydyna ($\beta\Psi U$)	/21	5,2	5,0	5,2	10,4	70
Fosforan 3' - urydyny (3' - UMP)	/20	4,8	5,2	5,5	10,3	23
Fosforan 3' - urydyny (3' - UMP)	/20	5,0	5,3	5,5	10,5	88
4 - tiourydyna (4 - SU)	/22	3,9	5,4	5,6	9,5	25
Orotydyna (O)	/23	3,6	6,3	7,0	10,6	50
Fosforan 5' - β - pseudo- urydyny	/20	5,3	5,3	5,5	10,8	23
Fosforan 5' - β - pseudo- urydyny	/20	5,5	5,5	5,6	11,1	75

Nie jest to ścisłe, ale gdyby nawet przy tej wartości stałej sprzężenia stosunek N/S bardzo różnił się od jedności, nie będzie to miało widocznego

wpływu na zmianę przyjętych wartości. Tak więc można po podstawieniu do równania Karplusa otrzymać wyrażenia

$$5,1 = 0,57 A - 0,75 B \quad \text{dla } \Phi_{HH'} = 40^\circ. \quad (5)$$

Stałe sprzężenia $J_{1'2'}$ i $J_{3'4'}$ zależą nie tylko od geometrii pierścienia rybozy, lecz w dużym stopniu od udziału poszczególnych konformacji znajdujących się w równowadze.

Możemy więc napisać po przyjęciu w dalszym ciągu wartości kątów dwuściennych $\Phi_{HH'}$ z tabeli 3, że:

$$J_{1'2'} = X_N J_{89} + (1 - X_N) J_{158} \quad (6)$$

$$J_{3'4'} = X_N J_{158} + (1 - X_N) J_{96} \quad (7)$$

X_N - jest ułamkiem określającym zawartość konformacji N w stanie równowagi. Po przekształceniach rachunkowych można podać, że

$$J_{1'2'} + J_{3'4'} = X_N J_{89} + J_{158} + J_{96} - X_N J_{96}. \quad (8)$$

Z powodu niewielkich wartości bezwzględnych J_{96} i J_{89} (leżą blisko minimum krzywej Karplusa równym w założonym wypadku 0) otrzymamy:

$$J_{1'2'} + J_{3'4'} = J_{158}. \quad (9)$$

Oznacza to, że praktycznie suma $J_{1'2'} + J_{3'4'}$ jest stała. Przyjmując średnią wartość dla tej sumy (tabela 4) możemy napisać, że:

$$J_{1'2'} + J_{3'4'} = 10,1 \text{ Hz}$$

$$10,1 = 0,68 A + 0,93 B \quad (10)$$

Z równań (5) i (10) można znaleźć stałe $A = 10,5 \text{ Hz}$, $B = 1,2 \text{ Hz}$. Przykładowe dane zależności $J_{HH'}$ od $\Phi_{HH'}$ dla układu pięciocłonowego zamieszczone w literaturze podaje tabela 5.

Należy stwierdzić, że równanie Karplusa ciągle jeszcze ma charakter wybitnie jakościowej formuły ujmującej zależność między $J_{HH'}$, a $\Phi_{HH'}$. Wynika to z faktu pominięcia w rozważaniach teoretycznych szeregu oddziaływań powo-

dujących perturbacje w założonej idealnej budowie cząsteczki. Próby znalezienia dobrej zgodności ilościowej czynione są głównie w kierunku weryfikowania semiempirycznych stałych dla poszczególnych klas związków.

T a b e l a 5

Krzywe Karplusa dla pierścienia pięciocząłonowego
(wartości $J_{HH'}$, w Hz)

Literat,	J_{0°	J_{30°	J_{60°	J_{90°	J_{120°	J_{150°	J_{180°
15	9,3	-6,8	2,0	0	3,2	8,9	11,7
19	9,0	6,7	2,0	-0,3	2,7	8,7	11,7
14	9,0	6,7	2,0	-0,3	2,3	7,5	10,1
24	9,4	7,1	2,5	0,4	3,0	8,0	10,4

Ostatnio pojawiają się coraz częściej prace podejmujące próby opisanie równaniem zależności stałych sprzężenia wicynalnych protonów, gdzie sprzężenie następuje także przez atomy różne od węgla np. tlenu lub azotu [25]. Takie wzory można przytoczyć:

$$\text{dla układu HCNH}' : J_{HH'} = 12 \cos^2 \Phi_{HH'} + 0,2 \quad (11)$$

$$\text{dla układu HCOH}' : J_{HH'} = 10 \cos^2 \Phi_{HH'} - 1,0 \quad (12)$$

W przypadku równania (12) dla układu HCOH' znaleziono także inną formułę dobrze ujmującą zależność stałych sprzężenia od kąta dwuściennego $\Phi_{HH'}$ dla steroli:

$$J_{HH'} = 10,4 \cos^2 \Phi_{HH'} - 1,5 \cos \Phi_{HH'} + 0,2 \quad (13)$$

Zaznaczyć należy, że podobne formuły jak dla protonów wicynalnych można także w sposób półempiryczny napisać dla sprzężeń dalekiego zasięgu - poprzez 4 lub więcej wiązań [26].

LITERATURA

- [1] M. Karplus; J.Chem.Phys; 30, 11 (1959).
[2] M. Karplus; J.Amer.Chem.Soc., 85, 2870, (1963).

- [3] R.V. Lemieux, R.K. Kullnig, H.I. Bernstein, W.G. Schneider; J.Amer. Chem.Soc., 80, 6098 (1958).
- [4] B. Coxon; Tetrahedron, 22, 2281 (1966).
- [5] B. Coxon; L. Hough, Carbohydr. Res., 8, 379 (1968).
- [6] B. Coxon; Carbohydr.Res., 14, 9 (1970).
- [7] B. Coxon; Carbohydr.Res., 8, 125 (1968).
- [8] B. Coxon; Carbohydr.Res., 1, 357 (1966).
- [9] B. Coxon; H.G. Fletcher IR. Chem.Ind. (London) 662, (1964).
- [10] B. Coxon; Tetrahedron, 21, 3481 (1965).
- [11] Ch. Jardetzky; J.Amer.Chem.Soc., 82, 229 (1970).
- [12] C. Altona, M. Sundaralingam; J.Amer.Chem.Soc., 94, 8205 (1972).
- [13] M. Smith, Ch.D. Jardetzky, J.Mol.Spectrosc., 28, 70 (1968).
- [14] L.J. Abraham, D.L. Hall, L. Hough, K.A. McLaughlan, J.Chem.Soc., 3699 (1962).
- [15] C. Altona, M. Sundaralingam; J.Amer.Chem.Soc., 95, 2333 (1973).
- [16] R.C. Fahey, G.C. Graham, R.L. Piccioni, J.Amer.Chem.Soc., 88, 193 (1966).
- [17] I. Feldman, R.P. Agarwal, J. Amer.Chem.Soc., 90, 7329 (1968).
- [18] S. Fujiwara, M. Uetsuki; Recent Development of Magnetic Resonance in Biological Systems; S. Fujiwara, L.H. Piette, E.D., Hiroka Publishing CO. Tokyo (1968).
- [19] B.J. Blackburn, A.A. Grey, I.C.P. Smith, F.E. Hruska; Can.J.Chem., 48, 2866 (1970).
- [20] T. Schleich, B.J. Blackburn, R.D. Lapper, I.C.P. Smith; Biochemistry, 11, 137 (1972).
- [21] F.E. Hruska, A.A. Grey, I.C.P. Smith; J.Amer.Chem.Soc., 92, 4088 (1970).
- [22] F.E. Hruska, K.K. Oglivie, A.A. Smith, H. Wayborn; Can.J.Chem., 49, 2449 (1971).
- [23] F.E. Hruska; J.Amer.Chem.Soc., 93, 1795 (1971).
- [24] C. Altona, H.R. Buys, H.J. Hageman, E. Havinga, Tetrahedron, 23, 2265 (1967).
- [25] M. Partfield, M. Karplus; J.Amer.Chem.Soc., 91, 1 (1969).
- [26] V.F. Bystrov, A.U. Stepanyants, J.Mol.Spectrosc., 21, 241 (1966).

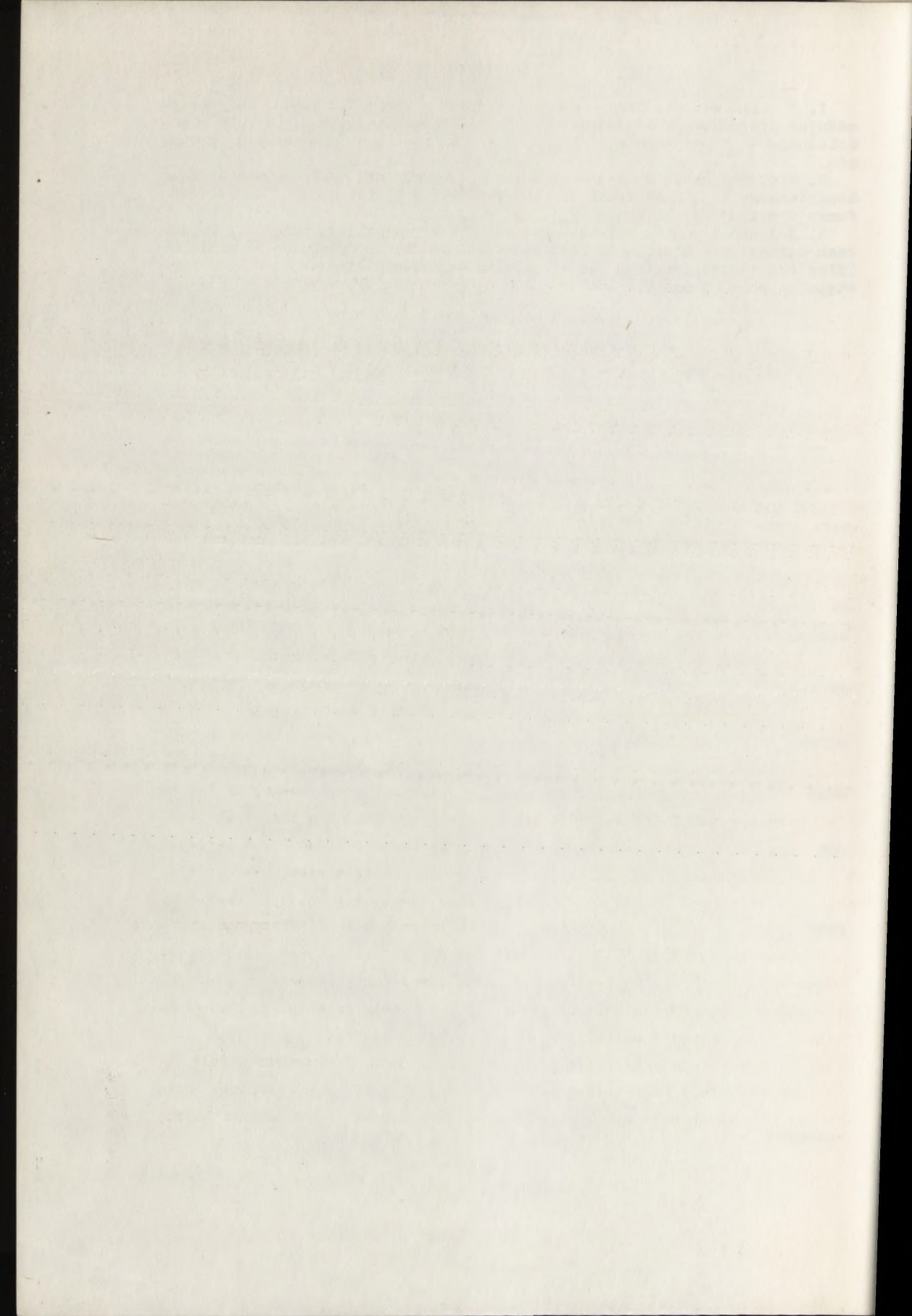
DYSKUSJA

W dyskusji zabrali głos m.in. mgr M.Remin i mgr A.Pohorille. Poruszono następujące problemy:

1. W jakim stopniu równanie Karplusa jest słuszne dla każdej pary wycy-
nalnych protonów w cząsteczce, tzn. czy zależność stałej J_{HH} od kąta dwu-
ściennego Φ_{HH} , ma zawsze tę samą postać dla dowolnych wycylnalnych proto-
nów.

2. Wielkość błędu stałej sprzężenia J_{HH} , zależy nie tylko od błędu kąta
dwuściennego Φ_{HH} , ale także od wartości Φ_{HH} . Wynika to z charakteru
funkcji opisującej zależność J_{HH} od Φ_{HH} .

3. Jednakowa postać matematyczna funkcji we wszystkich znanych wypad-
kach dowodzi, że uściślenie równania Karplusa dla poszczególnych protonów
(klas cząsteczek) powinno iść w kierunku uściślenia stałych A, B i C wy-
stępujących w równaniu.



Piotr Barczyński, Włodzimierz Krzyżosiak

BADANIE RÓWNOWAG KONFORMACYJNYCH PIERŚCIENIA RYBOFURANOZY W NUKLEOZYDACH I NUKLEOTYDACH

STRESZCZENIE

W artykule przedstawiono możliwości zastosowania metody p.m.r. do określania konformacji pierścienia rybofuranozy w nukleozydach i nukleotydach. Przeanalizowano sposoby jakościowego i ilościowego oznaczania położenia stanu równowagi w roztworze między najbardziej trwałymi konformacjami.

Cząsteczka mononukleozydu jest zbudowana z pierścienia furanozowego, do którego przyłączone są łańcuchy boczne (zasada, dwie grupy OH i jedna grupa CH_2OH). Każdy z łańcuchów bocznych pierścienia furanozowego (który może występować w konformacji N lub S) jest zdolny, przynajmniej teoretycznie, orientować się albo na dwa (zasada), albo na trzy (grupy OH i CH_2OH) jakościowo różne sposoby przypuszczalnie o różnych wartościach entalpii swobodnej. Konformacja nukleozydu jest sumą konformacji poszczególnych miejsc rotamerowych i konformacji pierścienia cukrowego, które na siebie wzajemnie oddziałują. W sensie formalnym istnieją 324 różne konformery, jeśli rozważyć wszystkie możliwe kombinacje położenia rotamerowych w rybonukleozydach. Duża liczba tych konformerów będzie występować w śladowych ilościach z powodu ich nieprzychylnej zawartości entalpii swobodnej w porównaniu z formami dozwolonymi. Przy czym trudno rozstrzygnąć, które konformery sklasyfikować jako "dozwolone" czy "zabronione". Jasno sprezyowanej odpowiedzi nie potrafi dać tutaj również eksperyment. Stwierdzone w strukturach krystalicznych pewne uprzywilejowane kombinacje cech konformacyjnych przyjęto uważać jako dozwolone w roztworze.

Tabela 1 prezentuje konformery typu syn i /lub anti oraz gauche-gauche i /lub gauche-trans i /lub trans/ gauche, które występują w strukturach krystalicznych mononukleozydów purynowych i pirymidynowych oraz podaje liczbę

dozwolonych kombinacji między tymi położeniami rotamerowymi a konformacją pierścienia furanozowego typu S i N.

T a b e l a 1

Liczba dozwolonych konformerów mononukleozydów
wg danych uzyskanych dla stanu stałego [11]

Mononukleozyd	Zasada		C(5')-O(5')			Liczba dozwolonych kombinacji
	ANTI	SYN	gg	gt	tg	
Purynowy typu N	+	-	+	+	-	2
Purynowy typu S	+	+	+	+	-	4
Całkowita liczba dozwolonych konformerów						6
Pirymidynowy typu N	+	(-)*	+	-	-	1
Pirymidynowy typu S	+	-	+	+	+	3
Całkowita liczba dozwolonych konformerów						4

* Zaobserwowano tylko jeden przypadek

Znak plus oznacza, że dany konformer spotykano w co najmniej dwóch strukturach krystalicznych badanych związków, a znak minus, że nie znaleziono żadnego przypadku jego występowania. W nukleozydach purynowych typu S w stanie krystalicznym zasada wykazuje orientację bądź anti bądź syn (mniej więcej w porównywalnych ilościach przypadków); ponadto orientacja zarówno anti jak i syn pozwala na istnienie rotamerów gauche-gauche (gg) i gauche-trans (gt) wokół wiązania C(4')-C(5'). Stąd typ S nukleozydów purynowych może istnieć w co najmniej czterech różnych konformacjach i w wielu więcej jeżeli weźmiemy pod uwagę szereg możliwych rotamerów wokół wiązań C(2')-O(2'), C(3')-O(3'), C(5')-O(5'). Z drugiej strony, typ N nukleozydów purynowych preferuje orientację anti w stanie stałym, ale występują konformery zarówno gg jak i gt. Wynika z tego, że można się spodziewać istnienia w roztworze przynajmniej sześciu różnych konformerów mononukleozydu purynowego.

Podobnie liczba dozwolonych kombinacji w nukleozydach pirymidynowych nie uwzględniając możliwych rotamerów grup OH wynosi cztery.

Te ograniczenia w konformacji istniejące już na poziomie nukleozydu wynikają ze wzajemnych zależności zachodzących między występowaniem różnych rotamerów w cząsteczce nukleozydu i konformacją pierścienia furanozowego[1].

Podstawienie grupy fosforanowej w pozycji 5' znacznie zmniejsza konformacyjną elastyczność cząsteczki nukleotydu w porównaniu z nukleozydem. Zaobserwowano, że 5'-nukleotydy występują (z nielicznymi wyjątkami np. 5'-GMP, gdzie uprzywilejowana jest kombinacja syn-gg) w stanie stałym tylko w konformacji anti wokół wiązania glikozydowego i gauche-gauche wokół egzocyklicznego wiązania C(4')-C(5') niezależnie czy konformacja pierścienia furanozowego jest typu C(2')-endo czy C(3')-endo (choć z obliczeń energetycznych wynika, że prawdopodobieństwo występowania konformacji syn jest większe dla pierścienia furanozowego w formie C(2')-endo niż C(3')-endo [2]). Ponadto uprzywilejowana konformacja wokół wiązania C(5')-O(5') w wolnych nukleotydach, jak i oligo- i polinukleotydach, odpowiada w ograniczonym zakresie kątom konformacji (gg)'.

Rozważania te sugerują, że jednostka nukleotydoma może być uważana jako konformacyjnie "sztywna". N. Yathindra i M. Sundaralingam [2] zakładają dwie podstawowe konformacje nukleotydomowe (mianowicie jednostkę nukleotydomową C(3')-endo i jednostkę nukleotydomową C(2')-endo) określone przez dwa zasadnicze sposoby pośladowania pierścienia cukrowego. Przejście od jednego konformeru pierścienia furanozowego do drugiego (tzn. od jednej jednostki nukleotydomowej do drugiej) wywołuje duże zmiany strukturalne w naturalnie występujących kwasach nukleinowych (np. B-DNA, C(2')-endo i RNA, C(3')-endo) i ma ważny wpływ na ich funkcje biologiczne.

Bariery entalpii swobodnej przeciwstawiające się pełnej swobodnej rotacji wokół każdego łańcucha bocznego w cząsteczce nukleozydu (nukleotydu) są na tyle małe w roztworze, że pozwalają na wzajemne przejścia między konformerami. Przejścia te zachodzą szybko w skali czasowej NMR tak, że obserwowane widmo jest czasowo uśrednionym obrazem zachodzącej równowagi. Do przybliżonego opisu tej równowagi wymagana jest znajomość:

1. równowagi rotamerowej egzocyklicznej grupy hydroksymetylenowej
2. równowagi konformacyjnej wokół egzocyklicznego wiązania C(4')-C(5')
3. równowagi konformacyjnej pierścienia furanozowego.

W artykule przedstawiono zastosowanie metody p.m.r. do określania konformacji pierścienia rybofuranozy w nukleozydach i nukleotydach w roztworze i jej możliwości wykorzystania do opisu nie tylko jakościowego, ale ilościowego, zachodzącej w roztworze równowagi konformacyjnej pierścienia rybofuranozy. Zasada zastosowania spektroskopii p.m.r. do określania stereochemii pierścienia cukrowego polega na powiązaniu przy pomocy równania Karplusa odczytanych z widma wartości stałych sprzężenia między wicynalnymi

mi protonami z odpowiednimi kątami dwuściennymi między wiązaniami C-H przy sąsiednich atomach węgla w pierścieniu, których wartość zależy od sposobu i rozmiaru pofałdowania pierścienia cukrowego.

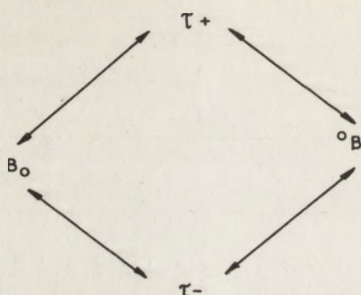
Pierwsze, mające znaczenie badania konformacji pierścienia furanozowego metodą protonowego rezonansu magnetycznego, które jednak ze względu na ograniczone możliwości aparaturowe nie mogły właściwie opisać obserwowanych zależności, przedstawiono w pracach Jardetzky [3, 4].

Analiza modeli cząsteczkowych (modeli Dreidinga) pierścienia furanozowego pozwoliła na zaproponowanie 20 teoretycznie możliwych symetrycznych form pofałdowania pierścienia powstałych przez wychylenie jednego lub dwóch atomów z płaszczyzny określonej przez pozostałe atomy w pierścieniu [5]. Wykazano [3, 4], że obecność podstawników w pierścieniu furanozowym w nukleozydach i nukleotydach stabilizuje zwłaszcza te konformacje, które powstają przez wybicie węgla C(2') i /lub C(3') w konwencji endo-egzo z płaszczyzny opisanej przez pozostałe atomy pierścienia.

W tabeli 2 przedstawiono wartości stałych sprężenia dla 4 podstawowych struktur pierścienia oraz dla formy płaskiej (Hruska i in. [7a]). Ponieważ żadna z proponowanych form pofałdowania pierścienia nie odzwierciedlała rzeczywistej geometrii pierścienia rybofuranazy, w badanych nukleozydach i nukleotydach (tabela 2), zaproponowano istnienie równowagi dynamicznej w roztworze między różnymi stanami konformacyjnymi pierścienia. Obserwowane stałe sprężenia są zatem wielkościami uśrednionymi w czasie i ich wartość zależy od uprzywilejowania jednego konformeru nad drugim w mieszaninie równowagowej, tj. od położenia tej równowagi.

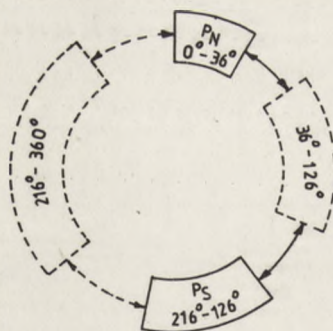
Dotychczas prezentowany opis konformacji pierścienia rybofuranazy jest jedynie mocno przybliżony. Znaczne ograniczenia wynikają z zastosowania modeli cząsteczkowych do wyznaczania 3- i 4-atomowych płaszczyzn opisujących w sposób statyczny 5-członowy pierścień.

Altona i Sundaralingam [12] zastosowali koncepcję pseudorotacji do opisu konformacji pierścienia furanozowego w nukleozydach i nukleotydach. Autorzy wyznaczyli parametry pseudorotacji (kąt fazowy pseudorotacji, P i amplituda pofałdowania, τ_m) dla pierścieni furanozowych w dużej liczbie badanych nukleozydów i nukleotydów, opierając się na uzyskanych z badań rentgenostrukturalnych wartościach kątów skręcenia τ_0 , τ_1 , τ_2 , τ_3 i τ_4 między odpowiednimi wiązaniami w pierścieniu. Okazało się, że wszystkie badane nukleozydy i nukleotydy występują w dwóch wąskich zakresach pseudorotacji na kole pseudorotacyjnym skoncentrowanych wokół konformacji odpowiednio C(3')-endo i C(2')-endo.



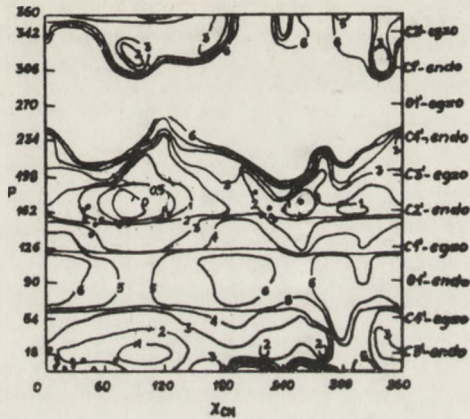
Rys. 1. Strefy konformacyjne na drodze pseudorotacyjnej pierścienia cukrowego w nukleozydach wg Hruski i in. 14

Saran, Perahia i Pullman [1] zaproponowali niesymetryczne, w przeciwieństwie do symetrycznego według Hruski i in., przedstawienie występującej w roztworze równowagi między dwoma konformerami pierścienia furanowego, które lepiej opisuje rzeczywistą sytuację zachodzącą w nukleozydach i nukleotydach (rys. 2),



Rys. 2. Strefy konformacyjne na drodze pseudorotacyjnej pierścienia w nukleozydach wg Saran'a, Perahia i Pullmana 1

Autorzy wykorzystując w swoich obliczeniach koncepcję Altony i Sundaralingama [12] odnośnie modelu pseudorotacji wykazali, że dwa prawie równocenne (różnica około 1 kcal/mol) minima energetyczne występujące przy kącie fazowym $P = 18^\circ$ i 162° (co odpowiada konformacjom pierścienia furanowego C(3')-endo i C(2')-endo) są oddzielone barierami energetycznymi, które w nukleozydach przyjmują różne wartości. Rys. 3 przedstawia przykładową mapę energetyczną wykazującą zależność stanu pseudorotacji pierścienia cukrowego od wartości kąta skręcenia χ_{CN} wokół wiązania glikozydowego dla rybozydów β - purynowych.



Rys. 3. Konformacyjna mapa energetyczna (P, X_{CN}) dla rybozydów β - purynowych
• dane eksperymentalne z badań rentgenostrukturalnych

Przejście między konformerem typu C(3')-endo (τ_+ wzgl. N) i C(2')-endo (τ_- wzgl. S) w roztworze powinno zachodzić drogą wyznaczoną przez pośrednią konformację C(4')-egzo - C(1')-egzo, gdyż bariera energetyczna jest tutaj stosunkowo niska (około 5 kcal/mol); przejście wzdłuż drogi wyznaczonej przez konformację C(3')-egzo - C(2')-egzo jest praktycznie zabronione, gdyż związane byłoby z pokonaniem wysokiej bariery energetycznej. Zaznaczone na mapie energetycznej (P, X_{CN}) punkty reprezentują dane eksperymentalne uzyskane z badań rentgenostrukturalnych kryształów β - nukleozydów i β - nukleotydów purynowych. Wszystkie one są skupione wokół czy w sąsiedztwie obliczonego całkowitego i najniższego energetycznie lokalnego minimum.

Altona i Sundaralingam [11] podali sposób wyznaczenia procentowego udziału konformerów typu N i S w mieszaninie równowagowej $N \rightleftharpoons S$, stosując zwykłą zależność liniową między wartością stałej sprężenia wyznaczoną z widma a przewidywanymi stałymi sprężenia dla każdego znajdującego się w równowadze konformeru N i S. Zależność tę podaje równanie (1):

$$J_{obs.} = X_S J_S + X_N J_N \quad (1)$$

gdzie suma ułamków molowych $X_S + X_N = 1$

Autorzy zebrali wszystkie wartości kątów skręcenia między wiązaniami w pierścieniu furanozowym uzyskane z badań rentgenostrukturalnych krystalicznych β - nukleozydów i β - nukleotydów i wyznaczyli ich średnie war-

tości. Te statystycznie uśrednione wartości kątów skręcenia przypisano "idealnym" konformacjom pierścienia furanozowego typu N i S zajmującym środki naturalnie występujących przedziałów pseudorotacyjnych i posiadającym średnią amplitudę pofałdowania $\tau_{m \text{ sr.}} = 38^\circ$. Następnie wykorzystano równanie Karplusa o nowych parametrach (równ. 2) do

$$J_{HH} = 10,5 \cos^2 \Phi_{HH} - 1,2 \cos \Phi_{HH} \quad (2)$$

obliczenia przewidywanych stałych sprzężenia dla tych "idealnych" konformacji typu N i S (tabela 3).

T a b e l a 3

Przewidywane stałe sprzężenia dla "idealnych" konformacji typu N i S

Konformer	P, stop.	$J_{1'2'}$	$J_{2'3'}$	$J_{3'4'}$	$J_{1'2'} + J_{3'4'}$
Typu N	10	0,0 (cis)	4,7 (cis)	10,1 (trans)	10,1
Typu S	165	10,1 (trans)	5,4 (cis)	0,2 (cis)	10,3

Wartości stałych sprzężenia $J_{1'2'}$ i $J_{3'4'}$, zmieniają się wyraźnie przy przejściu od konformacji typu N do S, natomiast stałe sprzężenia $J_{2'3'}$ i suma $J_{1'2'} + J_{3'4'}$ pozostają prawie niezmienione. Wstawiając do równania (1) odczytane z widma wartości stałych sprzężenia $J_{1'2'}$ lub $J_{3'4'}$ oraz odpowiadające im stałe sprzężenia przewidywane dla idealnych konformacji typu S i N można obliczyć przybliżoną procentową zawartość obu konformerów w mieszaninie równowagowej. Dla celów praktycznych procentowy udział konformeru S oblicza się jako $10 \times J_{1'2'}$ lub $10 \times (10,1 - J_{3'4'})$.

Oczywiście przewidywane stałe sprzężenia dla konformacji odchylnych od "idealnych" będą nieco inne. Aby sprawdzić wpływ pseudorotacji na stałe sprzężenia wybrano dla każdego konformeru typu N i S wartości kąta fazowego P, reprezentujące dolną granicę, centrum i górną granicę naturalnie występujących obszarów pseudorotacyjnych zajmowanych przez reszty rybozy w stanie krystalicznym. Przy ustalonej średniej wartości $\tau_m = 38^\circ$ obliczono, stosując równanie (3), wartości endocyklicznych kątów skręcenia τ_1, τ_2 i τ_3 dla każdej konformacji typu S i N reprezentującej jeden z wybranych pun-

$$\tau_j = \tau_m \cos [P + (j - 2) 144] \quad (3)$$

któw P na kole pseudorotacyjnym oraz przy pomocy równania Karplusa (2) odpowiadające im stałe sprzężenia. Tabela 4 podaje przewidywane stałe sprzężenia dla różnych składów równowagi konformacyjnej typu $N \rightleftharpoons S$ dla środków (przypadek A) i dla wszystkich możliwych kombinacji końców przedziałów P_N i P_S . Dane te wykazują, że na skutek możliwych zmian w wartościach P znajomość stałej sprzężenia $J_{1,2}$ pozwala zebrać skład równowagowy w zakresie błędu $\pm 5\%$ (zakładając brak błędu wartości odczytanej z widma).

Tabela 4

Przewidywane stałe sprzężenia $^3J_{HH}$ (Hz) dla różnych składów konformacyjnej mieszaniny równowagowej 11

P_N stop.	% N % S	100 0	80 20	60 40	40 60	20 80	0 100	P_S stop.	Przy- padek
10	$J_{1,2}$	0,0	2,0	4,0	6,1	8,1	10,1	162	A
	$J_{2,3}$	4,7	4,8	5,0	5,1	5,3	5,4		
	$J_{3,4}$	10,1	8,1	6,1	4,2	2,2	0,2		
	$J_{1,2} + J_{3,4}$	10,1	10,1	10,1	10,3	10,3	10,3		
3	$J_{1,2}$	0,1	2,1	4,2	6,2	8,3	10,4	145	B
	$J_{2,3}$	4,6	4,9	5,2	5,6	5,9	6,2		
	$J_{3,4}$	9,9	8,1	6,4	4,7	2,8	1,1		
	$J_{1,2} + J_{3,4}$	9,9	10,2	10,6	10,9	11,1	11,5		
25	$J_{1,2}$	0,3	2,1	4,0	5,8	7,7	9,5	175	C
	$J_{2,3}$	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2	5,1		
	$J_{3,4}$	10,5	8,4	6,3	4,2	2,1	0,0		
	$J_{1,2} + J_{3,4}$	10,8	10,5	10,3	10,0	9,8	9,5		
3	$J_{1,2}$	0,0	1,9	3,8	5,7	7,6	9,5	175	D
	$J_{2,3}$	4,6	4,7	4,8	4,9	5,0	5,1		
	$J_{3,4}$	9,9	7,9	5,9	4,0	2,0	0,0		
	$J_{1,2} + J_{3,4}$	9,9	9,8	9,7	9,7	9,6	9,5		
25	$J_{1,2}$	0,3	2,3	4,3	6,4	8,4	20,4	145	E
	$J_{2,3}$	5,2	5,4	5,6	5,8	6,0	6,2		
	$J_{3,4}$	10,5	8,6	6,7	4,9	3,0	1,1		
	$J_{1,2} + J_{3,4}$	10,8	10,9	11,0	11,3	11,4	11,5		

Pewne uściślenia odnośnie do stanu pseudorotacji konformeru będącego w przewodzie można uzyskać poprzez dokładną analizę pozostałych dwóch stałych

sprężenia. Np. jeśli równowaga jest przesunięta w kierunku konformeru typu N tzn. $J_{1,2'} < 4\text{Hz}$ to odpowiednio duże wartości stałej sprężenia $J_{2,3'}$ i sumy $J_{1,2'} + J_{3,4'}$ prowadzą do wniosku, że typ N pierścienia rybozy preferuje prawdopodobnie wyższy koniec przedziału P_N .

Jednocześnie pewną komplikację stanowić będzie wpływ amplitudy pofałdowania τ_m jako drugiego parametru pseudorotacji na różne stałe sprężenia, który może przeciwstawiać się efektowi pseudorotacji. Zgodnie z równaniem (3) zmiana w wartości τ_m powoduje proporcjonalne zmiany wszystkich kątów skręcenia τ_j w pierścieniu. Ogólnie, bardziej "pofałdowane" pierścienie rybozy (duże τ_m) będą posiadały bardzo małe wartości stałych sprężenia $J_{2,3'}$ i sumy $J_{1,2'} + J_{3,4'}$; "spłaszczenie pierścienia" (małe τ_m) będzie powodowało wzrost tych wartości.

Tabela 5 podaje wartości stałej sprężenia $J_{1,2'}$, obliczone składy równowagowe oraz różnice swobodnej entalpii ΔG_{25}^0 w D_2O dla kilku β - nukleozydów i nukleotydów purynowych i pirymidynowych.

T a b e l a 5

Przykłady wartości stałych sprężenia $J_{1,2'}$ dla β - nukleozydów i β - nukleotydów purynowych i pirymidynowych, obliczone składy równowagowe oraz różnice swobodnej energii ΔG_{25}^0 w D_2O [11]

Związek	$J_{1,2'}$ *	% N	ΔG_{25}^0
	Puryny		
Adenozyna	6,1	40	- 0,25
5' - fosforan adenozyny	5,6 5,1 5,3	48	- 0,07
3' - fosforan adenozyny	5,8 5,6	43	- 0,17
inozyna	5,6	45	- 0,12
średnia wartość dla 11 związków	5,6	45	- 0,12
	Pirymidyny		
5 - jodocytydyna	2,8	72	+ 0,56
5'+ fosforan cytydyny	3,2	68	+ 0,45
cytydyna	3,4 4,0	60	+ 0,25
Urydyna	4,4 4,5 4,8	52	+ 0,05
5'- fosforan urydyny	4,6 4,8	53	+ 0,07
3'- fosforan urydyny	4,3 4,3 4,8	52	+ 0,05
β - pseudourydyna	5,0 5,0	50	0,0
średnia wartość dla 12 związków	4,3	57	+ 0,16

* dane z różnych źródeł literaturowych

Rybozydy purynowe wykazują nieznaczne lub wyraźne uprzywilejowanie konformeru typu S ($\Delta G_{sr}^{\circ} = -0,12$ kcal/mol), podczas gdy w serii pirymidynowej trwalszy jest konformer typu N ($\Delta G_{sr}^{\circ} = +0,16$ kcal/mol). Ponieważ badania zależności temperaturowej stałych sprzężenia [6-9] dla szeregu nukleozydów i nukleotydów wykazują nieznaczne tylko zmiany w ich wartościach zakłada się, że różnice energetyczne między konformerami typu N i S muszą być niewielkie. (Ogólnie zmiana temperatury nie będzie miała wpływu na stałą równowagi, kiedy różnica entalpii ΔH° ma wartość zero). Pomiaru stałych sprzężenia dla mononukleozydów i mononukleotydów w roztworze w szerokim zakresie temperatur pozwolą na dokładne poznanie i rozdzielenie ich czynników entropii i entalpii [16]. Da to być może podstawy do wytłumaczenia różnic w zachowaniu się pochodnych urydyny i cytydyny w roztworze (tabela 5). Urydyna i jej 3' - i 5' - fosforany mają stałą równowagi zbliżoną do jedności; trzy związki pochodne cytydyny mają równowagę przesuniętą wyraźnie w kierunku konformeru typu N ($\Delta G_{25}^{\circ} = 0,25$ do 0,56 kcal/mol). Strukturalne różnice między rozważanymi związkami są zlokalizowane w pozycjach 4 i 5 zasady, a więc odległych od pierścienia rybozy.

LITERATURA

- [1] Saran A., Perahia D., Pullman B.; *Theoret.Chim.Acta*, 30, 31 (1973).
- [2] Yathindra N., Sundaralingam M.; *Biopolymers* 12, 297, (1973).
- [3] Jardetzky C.D.; *J.Am.Chem.Soc.*, 82, 229, (1960).
- [4] Jardetzky C.D.; *J.Am.Chem.Soc.*, 84, 62, (1962).
- [5] Smith M., Jardetzky C.D.; *J.Mol.Spectrosc.*, 28, 70, (1968).
- [6] Blackburn B.J.; Grey A.A.; Smith I.P.P., Hruska P.E.; *Can.J.Chem.*, 48, 2866, (1970).
- [7a] Hruska F.E., Grey A.A.; Smith I.C.P., *J.Am.Chem. Soc.*, 92, 4088, (1970).
- [b] Grey A.A.; Smith I.C.P., Hruska F.E.; *J.Am.Chem.Soc.*, 93, 1765, (1971).
- [c] Hruska F.E., Grey A.A.; Smith I.C.P., *J.Am.Chem.Soc.*, 92, 214, (1970).
- [d] Schleich T., Blackburn B.J., Lapper R.D.; Smith I.C.P., *Biochem.*, 11, 137, (1972).
- [8] Hruska F.E., Ogilvie K.K., Smith A.A., Wayborn H.; *Can.J.Chem.*, 49, 2449, (1971).
- [9] Dugas H., Blackburn B.J., Robins K.K., Deslauries R., Smith I.C.P.; *J. Am.Chem.Soc.*, 93, 3468, (1971).
- [10] Sarma R.H., Mynott R.J.; *J.Am.Chem.Soc.*, 95, 1641, (1973).

- [11] Altona C., Sundaralingam M.; J.Am.Chem.Soc., 95, 2333, (1973).
- [12] Altona C., Sundaralingam M.; J.Am.Chem.Soc., 94, 8205, (1972).
- [13] Hruska F.E.; Coformation of Biological Molecules and Polymers. The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry, 1973.
- [14] Saran A., Perahia D., Pullman B.; Theoret.Chim.Acta 30, 31 (1973) odn. (18) - w przygotowaniu do druku.
- [15] Sundaralingam M.; Biopolymers, 7, 821, (1969).
- [16] Altona C., Sundaralingam M.; J.Am.Chem.Soc., 95, 2333, (1973) odn.(55) - w przygotowaniu do druku.

DYSKUSJA

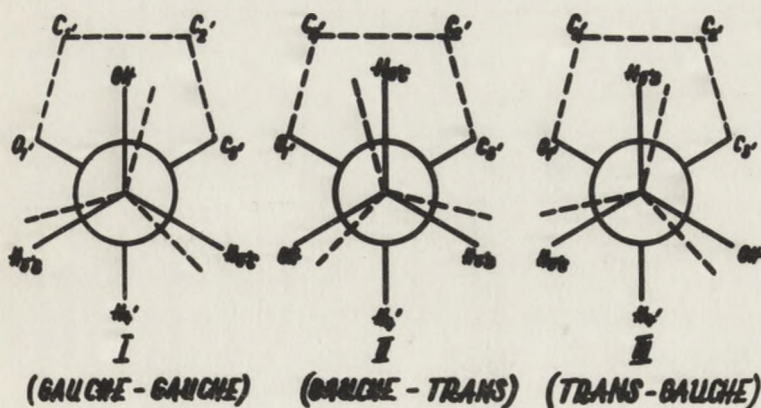
W dyskusji zabrali głos mgr M. Remin i mgr W. Krzyżosiak. Zastanawiano się nad możliwością zaobserwowania w niskich temperaturach sygnałów pochodzących od poszczególnych konformacji występujących w równowadze. Stwierdzono, że jeżeli taka równowaga rzeczywiście istnieje, to bariery energetyczne oddzielające różne konformacje furanozydów są zbyt niskie, co uniemożliwia rozróżnienie konformerów.

OKREŚLANIE POPULACJI STRUKTUR ROTAMEROWYCH EGZOCYKLICZNEJ GRUPY CH₂OH

STRESZCZENIE

W rozdziale przedstawiono przegląd metod umożliwiających określenie udziału struktur rotamerowych egzocyklicznej grupy hydroksymetylenowej. Przedyskutowano wpływ modyfikacji zasady oraz pofałdowania pierścienia cukrowego na konformację tej grupy.

Interesującym elementem struktury nukleozydów i nukleotydów jest położenie egzocyklicznej grupy CH₂OH. Dyskusję nad jej konformacją ułatwiają wzory projekcyjne Newmana. Przedstawiają one trzy klasyczne, 60°, naprzemianległe izomery konformacyjne, odpowiadające minimum energetycznym, występującym podczas rotacji dookoła wiązania C(4')-C(5').



Rys. 1. Trzy możliwe konformacje egzocyklicznej grupy CH₂OH wokół wiązania C(4') - C(5') nukleozydu. Przerwaną linię oznaczają 15° odchylenia od klasycznych 60° rotamerów

Badania rentgenostrukturalne wykazały, że rotamer gauche-gauche, w którym wiązanie C(5')-O(5') leży powyżej pierścienia, w krystalicznych nukleozy-

dach i nukleotydach, występuje znacznie częściej niż rotamery gauche-trans czy trans-gauche [1]. Także obliczenia energetyczne i badania modeli przestrzennych wskazują, że ten rotamer powinien być najbardziej uprzywilejowanym spośród wyżej wymienionych.

Do określenia konformacji egzocyklicznej grupy CH_2OH w roztworze najbardziej przydatna jest metoda protonowego rezonansu magnetycznego. Wykorzystanie bowiem równania Karplusa do analizy stałych sprzężenia wicynalnych atomów wodoru, uzyskanych z widm PMR, pozwala określić względną populację struktur rotamerowych występujących podczas obrotu dookoła wiązania $\text{C}(4')\text{-C}(5')$.

Zakładając szybkie wzajemne przejścia między trzema naprzemianległymi konformerami oraz porównując wicynalne stałe sprzężenia $J_{4'5'B}$ i $J_{4'5'C}$ między protonami $4' - 5'$ i $4' - 5''$ Blackburn i współpracownicy [2] określili względną populację każdego rotameru stosując zależności:

$$J_{4'-5'B} = P_I J_{IB} + P_{II} J_{IIB} + P_{III} J_{IIIB}$$

$$J_{4'-5'C} = P_I J_{IC} + P_{II} J_{IIC} + P_{III} J_{IIIC}$$

$$P_I + P_{II} + P_{III} = 1$$

gdzie P_I , P_{II} i P_{III} są ułamkami molowymi każdego z izomerów rotacyjnych, J_{IB} , J_{IIB} , J_{IIIB} są stałymi sprzężenia między protonami $4'$ i $5'B$, przy założeniu, że cząsteczka występuje całkowicie jako klasyczny, 60° , naprzemianległy rotamer I, II i III. Podobnie zostały zdefiniowane stałe sprzężenia dla protonów $4' - 5'C$.

Lemieux opierając się na danych uzyskanych ze skręcalności optycznej sugerował, że klasyczne rotamery nie odpowiadają minimum energetycznym. W rozważaniach bowiem należy uwzględnić odpychanie między atomem tlenu grupy hydroksymetylenowej $\text{O } 5'$ i atomem tlenu pierścienia cukrowego $\text{O } (1')$.

Ponieważ nie można precyzyjnie określić kąta, przy którym występuje minimum energetyczne, obliczenia udziału struktur rotamerowych przeprowadza się dla klasycznych, 60° rotamerów, jak również dla tych, w których uwzględniono odpychanie między atomami tlenu, wprowadzając 15° poprawki. Wartości stałych sprzężenia występujące w równaniach podanych przez Blackburna [2] obliczono stosując zaproponowaną przez Karplusa zależność między stałą sprzężenia wicynalnych atomów wodoru a kątem dwuściennym ϕ pomiędzy płaszczyznami, w których one leżą [3]:

$$J_{HH} = J_0 \cos^2 \phi + c$$

$$c = - 0,28 \text{ Hz}$$

Stałej J_0 przypisuje się wartości w szerokim zakresie - od 8 do 16 Hz [4]. Abraham [5] proponował natomiast, aby stałej J_0 przypisać wartości:

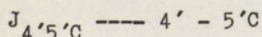
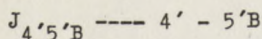
$$J_0 = 9,27 \text{ Hz dla } 0^\circ \leq \phi \leq 90^\circ$$

$$J_0 = 10,36 \text{ Hz dla } 90^\circ \leq \phi \leq 180^\circ$$

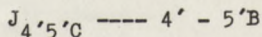
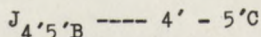
Z kolei Lemieux sugerował, aby dla stałej J_0 przyjąć wartość 12 Hz wówczas, gdy kąt dwuścienny $\phi = 180^\circ$.

W widmie PMR nukleozydów obserwujemy sygnały pochodzące ze sprzężenia atomów wodoru 4' z 5'B i 4' z 5'C. Jednak na skutek szybkiej rotacji wokół wiązania C4'-C5' protony 5'B i 5'C są nierozróżnialne i w konsekwencji tego nie wiadomo, którą z wartości $J_{4'5'B}$ i $J_{4'5'C}$ przypisać sprzężeniu protonu 4' z 5'B, a którą 4' z 5'C. Wobec tego obliczenia populacji struktur rotamerowych przeprowadza się przypisując stałe na dwa sposoby:

A.



B.



Blackburn, Grey i Smith [2] określając względną populację grupy CH_2OH w urydynie przeprowadzili obliczenia dla rotamerów klasycznych i dla tych, w których przyjęto 16° poprawki w kącie dwuściennym. Przyjęli jednocześnie dwie górne granice dla stałej $J_0/10.36$ i 12 Hz/, a eksperymentalne stałe sprzężenia przypisywali na dwa sposoby, uzyskując 8 serii wyników.

Z danych przedstawionych w tabeli 1 wynika, że niezależnie od sposobu przypisania stałych sprzężenia, wyboru stałej J_0 , czy też uwzględnienia oddziaływań między atomami tlenu, w przewodzie występuje rotamer gauche-gauche. Jego przewaga jest niezależna od oznaczenia atomów H5'B i H5'C, natomiast oznaczenie to wpływa bardzo wyraźnie na udział izomerów gauche-trans i trans-gauche. A zatem ocena indywidualnych udziałów izomerów rotacyjnych gauche-trans czy trans-gauche wymaga absolutnego oznaczenia protonów 5'B i 5'C. Remin i Shugar [6] wykonali to oznaczenie wprowadzając w

Względne populacje izomerów rotacyjnych urydyny wokół wiązania C(4')-C(5')

J_O dla $0^\circ \leq \phi \leq 90^\circ$ J_O dla $90^\circ \leq \phi \leq 180^\circ$	Klasyczne naprzemian- legie rotamery				Rotamery z 15° poprawką			
	9.27 10.36	9.27 10.36	9.27 12.00	9.27 12.00	9.27 10.36	9.27 10.36	9.27 12.00	9.27 12.00
$J_{4'5'B}$	3.00	4.40	3.00	4.40	3.00	4.40	3.00	4.40
$J_{4'5'C}$	4.40	3.00	4.40	3.00	4.40	3.00	4.40	3.00
P_I	0.58	0.58	0.65	0.65	0.46	0.46	0.58	0.58
P_{II}	0.30	0.12	0.25	0.10	0.24	0.08	0.16	0.02
P_{III}	0.12	0.30	0.10	0.25	0.29	0.45	0.25	0.39

pozycję 3' grupę fosforanową i porównując wartości przesunięć chemicznych w nukleozydach i nukleotyдах. Zaobserwowano, że obecność grupy fosforanowej w cząsteczce nukleotydu ma znaczny wpływ na przesunięcia protonów 5'B i 5'C.

Tabela 2

Przesunięcia chemiczne protonów 5'B i 5'C

Związek	5'B	5'C
U	3.907	3.803
3'-UMP	3.898	3.852
β - Ψ	3.840	3.726
3'- β - Ψ MP	3.850	3.785

Porównanie danych dla urydyny i 3' monofosforanu urydyny oraz β -pseudo-urydyny i 3' monofosforanu β -pseudourydyny dowodzi, że proton H5'C jest bardziej przesłaniany w nukleozydach niż w nukleotyдах, natomiast protony H5'B w obu parach związków mają bardziej zbliżone przesunięcia chemiczne. Stwierdzono, że we wszystkich tych związkach dominuje rotamer gauche-gauche, a więc proton H5'C w przeciwieństwie do H5'B dłuższy okres czasu znajduje się w sąsiedztwie grupy fosforanowej i ze względu na jej odsłaniający efekt leży przy niższym polu. Autorzy wywnioskowali, że tylko przypisanie stałych wg sposobu A jest zgodne z selektywnym wpływem grupy fosforanowej na przesunięcia chemiczne protonu H5'C.

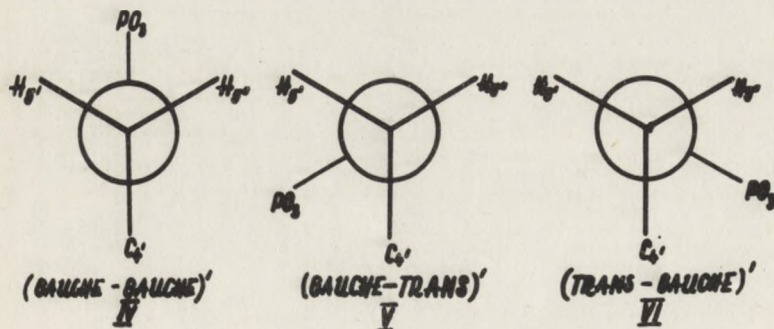
Schweitzer i Witkowski oraz Lapper i Smith uważają, że sposób oznaczenia protonu H5'B i H5'C przedstawiony przez Remina i Shugara budzi pewne wątpliwości [7, 8]. Nie zostało bowiem ono przedstawione dla związków, w których dominują rotamery *gauche-trans* lub *trans-gauche*.

Znacznie prostszą drogą prowadzącą do obliczenia populacji struktur rotamerowych grupy hydroksymetylenowej jest analiza sumy stałych sprzężenia $J_{4'5'B} + J_{4'5'C}$ [9, 10], którą odczytujemy z widma. W tym przypadku nie ma konieczności rozróżnienia protonów H5'B i H5'C. Zastosowanie w obliczeniach sumy sprzężeń $J_{4'5'B} + J_{4'5'C}$ opiera się na fakcie, że występujące podczas rotacji wokół egzocyklicznego wiązania C4' - C5' sprzężenie *trans* H-H wicynalnych protonów jest większe (8-10 Hz) niż sprzężenie *gauche*-H-H protonów (2-4 Hz). Suma ta pozwala na obliczenie względnego udziału rotameru *gauche-gauche* i łącznego udziału rotamerów *gauche-trans* i *trans-gauche*. Jakikolwiek wzrost populacji konformeru *gauche-gauche* powinien więc prowadzić do zmniejszenia zmierzonej eksperymentalnie sumy $J_{4'5'B} + J_{4'5'C}$ podczas gdy wzrost udziału rotameru *gauche-trans* czy *trans-gauche*, oczywiście kosztem *gauche-gauche*, powinien wpływać na wzrost wartości tej sumy. Względny udział rotameru *gauche-gauche* - P_{GG} oblicza się wykorzystując zależność [12]:

$$P_{GG} \approx (12 - \Sigma)/8$$

gdzie $\Sigma = J_{4'5'B} + J_{4'5'C}$

W analogiczny sposób można śledzić udziały rotamerów (*gauche-gauche*)' (*gauche-trans*)' i (*trans-gauche*)', wynikające z obrotu wokół wiązania C5' - O5' w serii 5' nukleotydów.



Rys. 2. Trzy izomery rotacyjne nukleotydów wokół wiązania C(5')-O(5')

W rotamerze (gauche-gauche) atom fosforu jest w położeniu gauche w stosunku do obu atomów wodoru grupy metylenowej, więc suma $J_{P-5'B} + J_{P-5'C}$ ma stosunkowo niewielką wartość (około 6 Hz) w porównaniu z sumą stałych sprzężenia dla rotameru (gauche-trans) czy (trans-gauche) (około 24 Hz), w których atom fosforu jest w położeniu trans w stosunku do jednego z 5' atomów wodoru [11, 12, 13]. Udział rotameru (gauche-gauche) - $P_{g'g'}$ określa następujące równanie:

$$P_{g'g'} \approx (24 - \Sigma')/18$$

gdzie $\Sigma' = J_{P-5'B} + J_{P-5'C}$

WPLYW MODYFIKACJI ZASADY NA KONFORMACJE EGZOCYKLICZNEJ GRUPY CH₂OH

Hruska i współpracownicy [12, 13] przeprowadzili metodą PMR porównawcze badania urydyny, 5' monofosforanu urydyny oraz 6-aza urydyny i 5' monofosforanu 6-aza urydyny, które miały dać odpowiedź, jaki wpływ na konformację egzocyklicznej grupy hydroksymetylenowej ma zastąpienie atomu węgla w pozycji 6-uracylu atomem azotu. Udział struktur rotamerowych obliczono na podstawie sumy $J_{4'5'B} + J_{4'5'C}$.

T a b e l a 3

S u m a	U	aza U	5' - UMP	5'-aza UMP
$J_{4'5'B} + J_{4'5'C}$	7,4	8.8	5.5	10.7
$J_{P-5'B} + J_{P-5'C}$	-	-	8.3	11.7

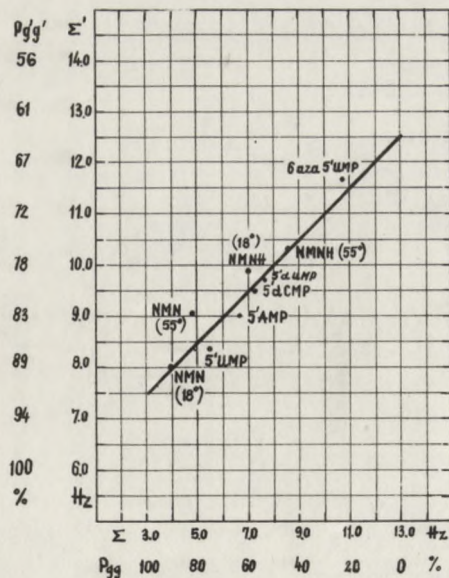
Porównanie wartości tych sum dla urydyny i 6-aza urydyny wskazuje, że obecność atomu azotu w pozycji 6-uracylu ma wyraźnie destabilizujący wpływ na konformację gauche-gauche (obniżenie udziału). Zamiana atomu węgla w zasadzie uracylowej 5' monofosforanu urydyny ma jeszcze większy wpływ na zmniejszenie udziału konformeru gauche-gauche w 5' monofosforanie 6-aza-urydyny. Procentowy udział formy gauche-gauche przedstawia się następująco:

U - 60% 5 UMP - 80%

6aza - U - 40% 5'aza UMP - 15%

Zmniejszenie udziału rotameru gauche-gauche w 5' aza UMP można wyjaśnić elektrostatycznym oddziaływaniem między atomem azotu w pozycji 6 i ujemnym ładunkiem grupy fosforanowej. Potwierdziły to obliczenia teoretyczne [14] gęstości ładunku, które wykazały, że pozycja 6-urydyny jest centrum dodatnim, natomiast w 6-aza-urydynie ujemnym, co w połączeniu z ujemnym ładunkiem grupy fosforanowej powoduje destabilizację rotameru gauche-gauche. W przypadku konformerów gauche-trans czy trans-gauche oddziaływanie takie nie występuje i te właśnie rotamery są uprzywilejowane dla 6-aza UMP. Również oddziaływaniem elektrostatycznym można interpretować wzrost populacji gauche-gauche w 5' monofosforanie urydyny w stosunku do urydyny. W nukleotydzie bowiem występuje przyciąganie między centrum dodatnim zasady - węglem C6 a grupą fosforanową, powodując wzrost udziału rotameru gauche-gauche. Ponadto mniejszy udział struktury rotamerowej gauche-gauche w 6-aza-urydynie niż w urydynie wskazuje na istniejące odpychanie między atomem azotu w pozycji 6 a grupą 5' hydroksymetylenową. Stwierdzenie przewagi rzadko spotykanej konformacji trans wokół wiązania C4' - C 5' dla 5' monofosforanu 6-aza-urydyny potwierdziło wcześniejsze obserwacje poczynione przez Saengera i Sucka [14] dla krystalicznego nukleotydu.

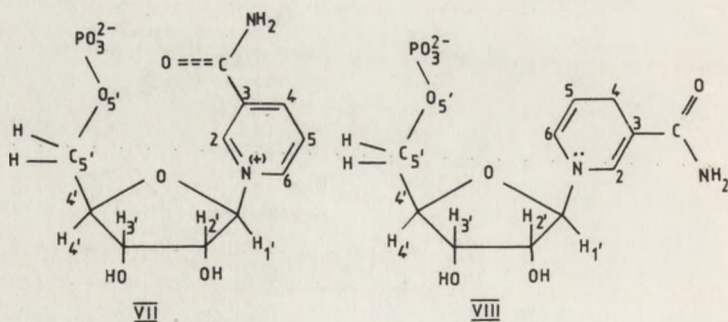
Hruska i współpracownicy [15] przedstawili zależność między udziałem rotameru gauche-gauche i (gauche-gauche)' w formie wykresu, odkładając na osi rzędnych $P_{g'g'}$ i $\Sigma'(J_{P-5'B} + J_{P-5'C})$, a na osi odciętych P_{gg} i $\Sigma(J_{4'5'B} + J_{4'5'C})$.



Rys. 3. Wykres zależności między udziałem rotameru (gauche-gauche)' - $P_{g'g'}$ a (gauche-gauche) - P_{gg}

Analiza tej zależności wykazuje w przypadku 5' nukleotydów jednoczesny wzrost P_{gg} i $P_{g'g'}$, co świadczy o tym, że wraz ze wzrostem udziału konformeru gauche-gauche wokół wiązania C4' - C5' zwiększa się również udział rotameru (gauche-gauche)' wokół wiązania C5' - O5'. A więc kiedy cząsteczka przyjmuje orientację gauche-gauche rotamery (gauche-trans)' i (trans-gauche)' występują w niewielkim stopniu (np. 5' monofosforan urydyny). Po przejściu cząsteczki w rotamer trans-gauche czy gauche-trans konformacja (gauche-gauche)' nie jest konieczna, ale np. w przypadku 5' monofosforanu 6-aza-urydyny ten właśnie rotamer ma duży udział. Wnioski wyciągnięte z analizy wykresu zostały potwierdzone przez badanie modeli przestrzennych cząsteczek. Okazuje się, że gdy którykolwiek z 5' nukleotydów przyjmuje konformację gauche-gauche to wówczas obrót wokół wiązania C5' - O5' prowadzi do powstania form (trans-gauche)' lub (gauche-trans)', w których występują niekorzystne oddziaływania między atomami tlenu grupy fosforanowej a cząsteczką furanozy i zasadą. Gdy z kolei 5' nukleotyd przyjmuje konformację gauche-trans lub trans-gauche dominuje forma (gauche-gauche)', co tłumaczy się niekorzystnym oddziaływaniem między atomem fosforu a atomami H4', O1' i H3' i OH3'.

Analiza zależności $P_{g'g'}$ od P_{gg} potwierdziła także spostrzeżenia Sarma i Mynotta [16] dotyczące udziału rotameru gauche-gauche w β -5' nukleotydzie nikotynoamidowym. - β NMN (VII) i jego zredukowanej formie β NMNH (VIII). Stwierdzili oni, że rotamer gauche-gauche w β NMN (VII) występuje w przewodzie (93%) w stosunku do β NMNH, gdzie jest go tylko 50% (przy pH 8).



Wniosek ten opierał się na fakcie, że formalny dodatni ładunek na atomie azotu w β -NMN stabilizuje na skutek przyciągania grupy $\text{CH}_2\text{CPO}_3^{-2}$ sterycznie uprzywilejowaną konformację gauche-gauche. W związku β NMNH konformer gauche-gauche ma mniejszy udział, gdyż brak dodatniego ładunku na azo-

Stwierdzono, że większemu udziałowi rotameru gauche-gauche odpowiada wzrost konformacji C(3') endo, natomiast konformacja C(2') endo występuje w przewadze wtedy, gdy zwiększa się udział rotamerów gauche-trans czy trans-gauche.

Punkty znajdujące się na krzywej odpowiadają cząsteczkom, które mają wspólne cechy budowy. Mianowicie wszystkie są β -anomerami grupy CH i CO, występują w pozycji orto zasady, a większość z nich występuje w konformacji anti. Punkty leżące poza krzywą np. O-orotydylna, β -RCA - rybozyd kwasu cyanourynowego czy 6-aza-U odpowiadają związkom, które mają objętościową grupę keto blisko pierścienia cukrowego lub w których atom węgla zasady został zastąpiony atomem azotu (6-aza-cytydyna, 6-aza-urydyna). Z wykresów wynika jasno, że w związkach, które leżą poza krzywą konformacja pierścienia C2' endo ma bardzo mały udział.

Wszystkie te wnioski są zgodne z informacjami uzyskanymi z badań rentgenostrukturalnych przez Wilsona i Rahmana [19].

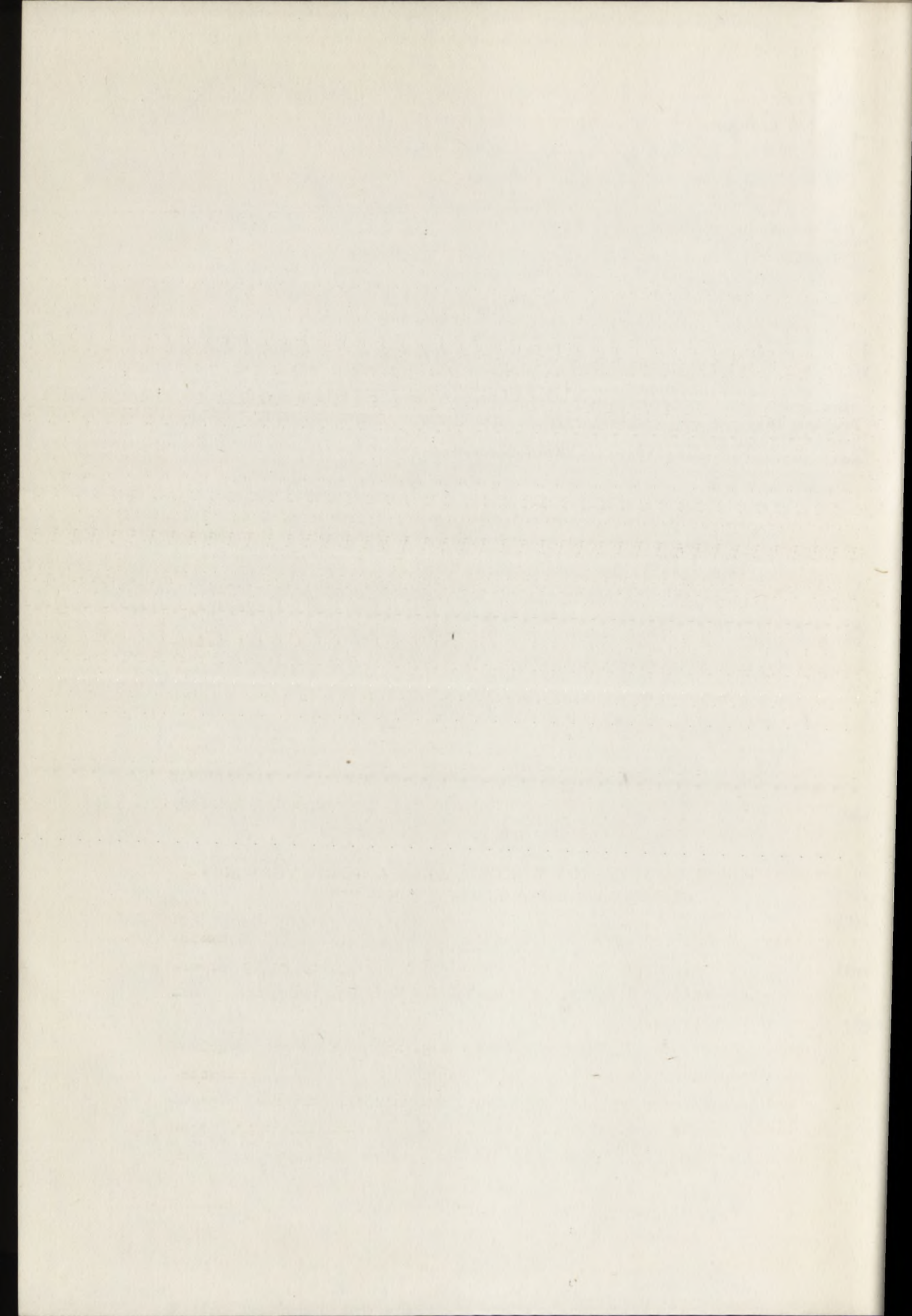
LITERATURA

- [1] Sundaralingam M., Jensen L.H.; *J.Mol.Biol.* 13, 914 (1965).
- [2] Blackburn B.J., Grey A.A., Smith I.C.P., Hruska F.E.; *Can.J.Chem.* 48 2866 (1970).
- [3] Karplus M.; *J.Chem.Phys.* 30, 11 (1959).
- [4] Sternhell S.; *Quart.Rev.* 23, 86 (1969).
- [5] Abraham R.J., Hall L.D., Hough L., Mc Lauchlan K.A.; *J.Chem.Soc.*, 3699 (1962).
- [6] Remin M., Shugar D.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 48, 636 (1972).
- [7] Witkowski J.P., Banda E.B., Schweitzer M.P., Robins R.K.; *J.Am. Chem. Soc.* 95, 3770, (1973).
- [8] Lapper D., Smith C.P.; *J.Am.Chem.Soc.*, 95, 2880 (1973).
- [9] Hruska F.E., Smith A.A., Dalton J.G.; *J.Am.Chem.Soc.* 94, 4334 (1971).
- [10] Hruska F.E., Grey A.A., Smith I.C.P.; *J.Am.Chem.Soc.* 92, 4088 (1970).
- [11] Hall L.D., Malcolm R.B.; *Chem.Ind.* 92, (1968).
- [12] Wood J.D., Mynott R.J., Hruska F.E., Sarma R.H.; *Can.J.Chem.* 51, 2571 (1973).
- [13] Hruska F.E., Wood D.J., Mynott R.J., Sarma R.H.; *FEBS Letters* 31, 153 (1973).
- [14] Saenger W., Suck D., *Nature in press.*

- [15] Wood D.J., Mynott R.J., Hruska F.E., Sarma R.H.; *FEBS Letters* 34, 525 (1969).
- [16] Sarma R.H., Mynott R.J.; *J.Am.Chem.Soc.* 95, 1641 (1973).
- [17] Hall L.D., Malcolm R.B.; a. *Can.J.Chem.* 50, 2092 (1971).
b. *Can.J.Chem.* 50, 2102 (1972).
- [18] Hruska F.E., Sarma R.H., Wood D.J.; *J.Am.Chem.Soc.* 95, 6457 (1973).
- [19] Wilson H.R., Rahman A., *J. Mol.; Biol.* 56, 129 (1971).

DYSKUSJA

Głos w dyskusji zabrał mgr M. Remin, który ustosunkował się do zarzutu stawianego przez Witkowskiego i Schweitzera [7] oraz Lappera i Smitha [8]. Problem dotyczył metody identyfikacji protonów 5' i 5'' opisanej przez Remina i Shugara [6]. Stwierdził, że w wyniku dalszych badań uzyskano dowody potwierdzające wyniki wcześniej publikowane.



Józef Bujarski

OKREŚLANIE KONFORMACJI ROTAMEROWEJ SYN-ANTI NUKLEOZYDÓW I NUKLEOTYDÓW METODĄ PMR

STRESZCZENIE

Referat stanowi możliwie wyczerpujący przegląd literaturowy metod protonowego rezonansu magnetycznego, stosowanych przy określaniu wzajemnego ułożenia cukru i zasady w nukleozydach i nukleotydach. Omówiono również bardzo ogólnie metody teoretyczne (głównie kwantowo-mechaniczne), które pozwalają na poznanie energetyki obrotu cukru i zasady względem siebie.

Ważnym elementem, jaki należy uwzględnić przy opisie konformacji nukleotydów, monomerowych jednostek kwasów nukleinowych, jest wzajemne położenie cukru i zasady wokół wiązania glikozydowego. Wiązanie to jest pojedyncze i dlatego istnieje możliwość rotacji obu komponentów względem siebie. Położenie zasady w stosunku do reszty cukrowej, jak wiadomo, określa [25] tzw. kąt skręcenia χ_{CN} . Istnieje kilka aktualnie stosowanych konwencji opisu tego kąta. Zgodnie z [25] w niniejszym referacie będziemy posługiwali się definicją przedstawioną w pracy Saengera [1].

1. CHARAKTER ROTACJI ZASADY WOKÓŁ WIĄZANIA GLIKOZYDOWEGO - DEFINICJA KONFORMACJI SYN-ANTI

Swobodny obrót wokół wiązania glikozydowego jest ograniczony. Rozważanie modeli przestrzennych [3, 8] oraz obliczenia teoretyczne [4-7] prowadzone różnymi metodami pokazały, że w cząsteczce istnieją określone oddziaływania utrudniające ten obrót.

Donohue i Trueblood [7], badając zmiany odległości między poszczególnymi atomami przy obrocie wokół wiązania glikozydowego w oparciu o rozważania na modelach przestrzennych - sugerowali dwa najkorzystniejsze przedziały wartości kąta skręcenia χ_{CN} jaki mogą przybierać nukleozydy. W jednym przedziale węgiel C(2) pirymidyny lub C(4) puryny znajdują się nad

pierścieniem rybozy (przedział syn), a w drugim - te atomy węgla znajdują się poza pierścieniem (przedział anti). Szczególnie silne oddziaływania występują w nukleozydach pirymidynowych, gdzie karbonylowy atom tlenu przy C(2) oraz atom wodoru przy C(6) oddziałują z podstawnikami przy C(2'), C(3') i z O(1') pierścienia furanozy.

Określenie cząsteczkowej konformacji szeregu nukleozydów i nukleotydów w stanie krystalicznym metodami rentgenowskimi pozwoliło dokładnie obliczyć długości wiązań i kąty skręcenia między wiązaniami. Na tej podstawie Haschemeyer i Rich [4] mogli obliczyć odległości pomiędzy niezwiązanymi atomami cukru i zasady jako funkcje kąta skręcenia χ_{CN} i pofałdowania pierścienia rybozy. Zakładając znaczne oddziaływania (odpychanie), gdy odległość między dwoma atomami jest mniejsza niż suma ich promieni van der Waalsa - można było określić bariery rotacji i uprzywilejowane zakresy kątów skręcenia poszczególnych nukleozydów.

Wnioski ogólne są tutaj następujące:

1. w wyniku silnych oddziaływań atomów O(2) i H(6) z protonami H(2'), H(3') oraz z tlenem O(1') w nukleozydach pirymidynowych obserwujemy uprzywilejowanie konformacji anti ($\chi_{CN} = +75$ do $+155^\circ$) niezależnie od pofałdowania pierścienia rybozy,

2. oddziaływania między N(3) i H(8) puryny a H(2') i H(3') rybozy są o wiele słabsze i w związku z tym bariery rotacji są mniejsze niż w nukleozydach pirymidynowych - mniejsze jest zatem uprzywilejowanie konformacji anti.

Dokładniejsze rozważania teoretyczne problemu zahamowania swobodnej rotacji wokół wiązania glikozydowego uwzględniają zależność całkowitej energii potencjalnej cząsteczki nukleozydu od kąta skręcenia χ_{CN} . Obliczenia takie przeprowadzono w oparciu o dane krystalograficzne różnymi metodami kwantowo-mechanicznymi (zwykle metody orbitali molekularnych [5, 6] w różnych odmianach), przy uwzględnieniu szeregu czynników wpływających na energię potencjalną, jak: oddziaływania van der Waalsa, oddziaływania elektrostatyczne (coulombowskie) oraz potencjał skręcenia [8].

Wyniki tych obliczeń potwierdzają koncepcję zahamowanej rotacji zasady oraz związane z tym istnienie dwóch najbardziej energetycznie uprzywilejowanych konformacji (syn i anti). Można było obliczyć wysokość bariery energetycznej oddzielającej obie konformacje. W zależności od stosowanej metody bariera ta dla nukleozydów pirymidynowych wynosi od 7 do 3 kcal/mol na korzyść konformacji anti (4, 9-11). Przedziały kątów torsyjnych definiujące obie konformacje przedstawiono w referacie 25 zgodnie z pracą Saengera [1]. Zgodnie z tym konformacja syn jest dla kątów χ_{CN} od 290° poprzez 0° do 110° , a konformacja anti - od 110° do 290° .

Z obliczeń Yathindra i Sundaralingama [8] przeprowadzonych na 5'-AMP wynika, że istnieje ścisły związek pomiędzy pofałdowaniem pierścienia rybozy, konformacją rotamerową egzocyklicznej grupy $(5')\text{CH}_2\text{PO}_4^-$ a ułożeniem zasady w stosunku do cukru.

Jeżeli uzależnić energię potencjalną cząsteczki od kąta χ_{CN} oraz kąta ψ (który obrazuje obrót grupy egzocyklicznej wokół wiązania C(4') - C(5')), to okazuje się, że najbardziej faworyzowana jest konformacja trans - gauche - gauche. Podobne wyniki dla (5')TMP, (5')CMP i (5')UMP sugerują stosunkowo dużą sztywność konformacyjną (5')-nukleotydów w porównaniu z odpowiednim nukleozydem, gdzie w znacznie większym stopniu dopuszcza się możliwość istnienia innych konformacji.

2. BADANIE UPZYWILEJOWANIA KONFORMACJI SYN-ANTI W ROZTWORZE

Konformacja, jaką przybiera dany nukleozyd w ciele stałym, jest wynikiem minimalizacji energii wewnątrzcząsteczkowej i energii oddziaływań międzycząsteczkowych. Energia wewnątrzcząsteczkowa jest w przybliżeniu równa w ciele stałym, jak w roztworze. Natomiast oddziaływania międzycząsteczkowe są oczywiście w obu stanach inne. Wpływają one w sposób istotny na konformację cząsteczki [12]. Ogólnie w roztworze cząsteczka jest konformacyjnie bardziej "swobodna". Istnieje więc możliwość rotacji zasady względem cukru. Cząsteczka nukleozydu w roztworze znajduje się w równowadze rotamerowej syn - anti, która dla pirymidyn przesunięta jest prawie całkowicie, a dla puryn tylko w znacznym stopniu - w stronę anti.

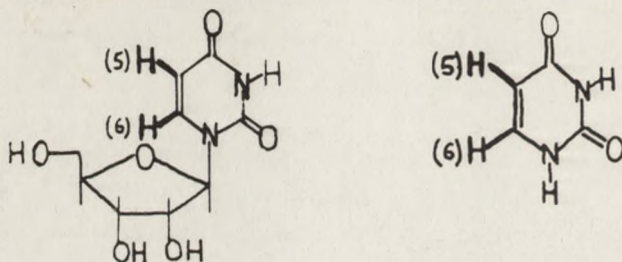
Do jakościowego określenia położenia równowagi konformacyjnej syn-anti w roztworze stosowano szereg metod instrumentalnych, jak: spektroskopia NMR, IR, ORD, CD czy pomiary momentów dipolowych [13-14].

W niniejszym referacie zajmujemy się zastosowaniem spektroskopii protonowego rezonansu magnetycznego (PMR) do określenia preferencji syn - anti w roztworach nukleozydów i nukleotydów.

2.1. PMR W BADANIACH KONFORMACJI SYN - ANTI NUKLEOZYDÓW

Uprzywilejowanie konformacji syn lub anti w nukleozydach pirymidynowych określano metodą PMR, wykorzystując szereg obserwacji porównawczych. Sposób ułożenia zasady względem cukru wpływa na przesunięcia chemiczne poszczególnych protonów nukleozydu. Znając konformację i odpowiadające jej przesunięcia chemiczne jednego nukleozydu pirymidynowego, możemy z pewnym przybliżeniem wnosić o konformacji innych nukleozydów (w podobnych warunkach rozpuszczalnika i temperatury - rozpuszczalnik poprzez solwatację określonych ugrupowań w cząsteczce specyficznie wpływa na położenie cukru

względem zasady [15], a temperatura przesuwą równowagę syn-anti). Prestegard i Chan [15] zbadali wpływ obecności pierścienia rybozy na protony H(5) i H(6) w urydynie w stosunku do uracylu (rys. 1).

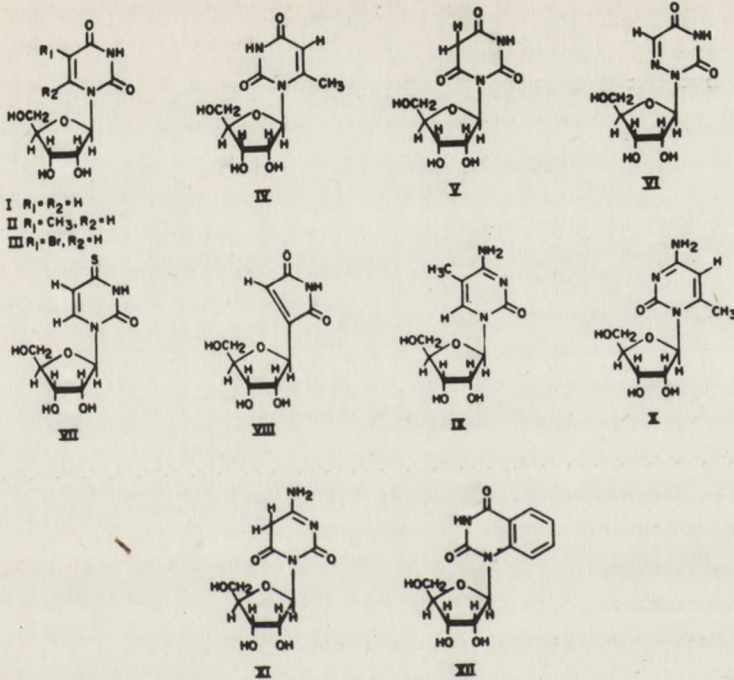


Rys. 1. Wpływ odsłaniający pierścienia rybofuranozy na proton H(6) w urydynie (1) w stosunku do uracylu (2)

Przesunięcie chemiczne H(6) w uracylu było o 0,34 ppm mniejsze niż w urydynie. Ten wyraźny efekt odsłaniający pierścienia rybozy wskazuje, że proton H(6) musi znajdować się w sferze oddziaływania pierścienia rybozy, czyli nad pierścieniem (im proton H(6) jest bardziej oddalony od pierścienia, tym wpływ anizotropii magnetycznej oraz wpływ elektryczny tlenu eterowego w pierścieniu na H(6) jest mniejszy). Fakt ten sugeruje dla urydyny konformację anti. Potwierdzają to również badania zależności przesunięcia chemicznego H(6) od temperatury [23]. Ze wzrostem temperatury wzrasta prawdopodobieństwo przejścia zasady z położenia anti w położenie syn; w związku z tym sygnał H(6) przysuwa się w kierunku wyższych pól jako wynik likwidacji odsłaniającego działania grupy (5) CH_2OH .

W latach 1971-1973 do określania konformacji syn-anti zaczęto wykorzystywać wpływ anizotropii magnetycznej grupy karbonylowej (2)C=O pierścienia pirymidynowego na przesunięcia chemiczne protonów rybozy. Przesunięcia chemiczne tych protonów w urydynie czy w cytydynie, które to nukleozydy, jak wiemy, wykazują w roztworze konformację anti - traktuje się jako wartości wzorcowe. Jeżeli jakikolwiek inny nukleozyd pirymidynowy będzie w konformacji syn, to grupa (2)C=O znajdzie się nad pierścieniem cukru. Wpływ anizotropii magnetycznej tej grupy spowoduje zmiany w przesunięciach chemicznych protonów rybozy, uzależnione od kształtu anizotropowego stożka odsłaniania grupy karbonylowej. Prócz tego na te przesunięcia chemiczne mogą wpływać inne efekty np. elektrostatyczne [17].

Witkowski i współpracownicy [16-17] przebadali w ten sposób kilkanaście nukleozydów pirymidynowych (rys. 2)(tabl. 1).



Rys. 2. Nukleozydy badane przez Witkowskiego i współpracowników [17]

Tabela 1

Przesunięcia chemiczne (ppm) dla różnych nukleozydów pirymidynowych*

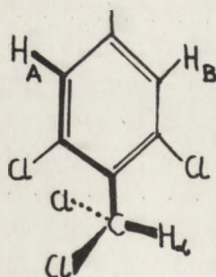
Nukleozyd	H-6	H-5	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5', 5''
Cytydyna	8,25	6,46	6,33	4,65	4,65	4,65	4,32
5-Me-Cyd(Ix)	8,18	-	6,40	4,71	4,71	4,71	4,30
6-Me-Cyd(X)	-	6,31	6,15	5,30	4,86	4,48	4,31
6-Oxo-Cyd(XI)	-	-	6,61	5,16	4,80	4,42	4,27 4,13
Urydyna (I)	8,34	6,33	6,36	4,81	4,69	4,62	4,42 4,22
5-Me- U(II)	8,15	-	6,36	4,69	4,69	4,69	4,34
6-Me- U(IV)	-	6,19	6,10	5,27	4,85	4,46	4,30
6-Oxo- U(V)	-	-	6,57	5,10	4,85	4,48	4,20
6-Aza- U(VI)	-	8,05	6,56	5,03	4,82	4,56	4,31
5-Br- U(III)	8,80	-	6,30	4,69	4,69	4,69	4,44
4-Thio-U(VII)	8,23	7,01	6,33	4,74	4,74	4,74	4,36
Szołdomycyna (VIII)	-	7,14	5,23	4,60	4,60	4,60	4,24
Rybozyd hinazolino-2,4- -dionu (XII)	-	-	6,55	4,93	4,54	4,22	4,10

* Mierzone względem TMS w kapilarze - 10% roztwór w D_2O

Porównanie przesunięć chemicznych protonów rybozy w U, 5MeU, 6MeU oraz w odpowiednich cytydynach pokazuje, że w 6-metylopo pochodnych protony H(2') i H(3') są przesunięte w kierunku pól niższych, a H(1') i H(4') oraz H(5') i H(5'') - w kierunku wyższych pól o kilka dziesiątych części ppm. Badania modeli przestrzennych 6MeU wykazały bliskie oddziaływania między grupą 6-metylo- a 5'-CH₂OH, co skutecznie przesuwają równowagę rotamerową w kierunku syn. Ten sam typ zmiany przesunięć chemicznych protonów rybozy obserwowano we wszystkich nukleozydach pirymidynowych, w których z tych czy innych względów grupa (2) C=O znajduje się nad pierścieniem cukru. Np. w 6-okso-U, 6-okso-C oraz β-rybozydzie kwasu cyjanurowego - jedna z grup karbonylowych ((2)CO lub (6) C=O) musi znajdować się nad pierścieniem.

Z danych o przesunięciach chemicznych protonów rybozy, nie znając precyzyjnie charakteru anizotropii grupy karbonylowej [17, 24], możemy jedynie sugerować, że w przypadkach, gdzie nie obserwujemy znacznych zmian w przesunięciach chemicznych w stosunku do nukleozydów porównawczych - mamy do czynienia z konformacją anti. Wnioski te mają charakter wybitnie jakościowy i przybliżony.

Cushley i współpracownicy [18] oraz Hruska [19] obserwowali w różnych nukleozydach pirymidynowych sprzężenia spinowo - spinowe dalekiego zasięgu między H(1') i H(5') lub między H(1') i F(5) (odpowiednie stałe tego sprzężenia oznaczamy przez $^5J_{H(1')-H(5)}$ i $^5J_{H(1')-F}$). Są to tzw. sprzężenia typu meta-benzylowego obserwowane np. między H_A i H_C w 2,6-dwuchloro-1-metylodwuchloro-benzenie (rys. 3) w niskich temperaturach.



Rys. 3. Sprzężenie między H_A i H_C - sprzęgającą drogę wiązań łączących oba protony pogrubiono

Rozważania teoretyczne [18-19] pokazują, że sprzężenie meta-benzylowe jest maksymalne wtedy, gdy oba sprzężone atomy łączą wiązania ułożone koplanarnie w "zygzak", a zmniejsza się w miarę odchylenia wiązań od koplanarności.

Ogólnie rzecz biorąc stałe tego sprzężenia są rzędu 0,5 Hz. W nukleozy-

dach pirymidynowych protony H(5) i H(1') połączone są drogą "zygzak", gdy zasada ustawiona jest w stosunku do cukru w położeniu anti.

W tablicy 2 znajdują się wartości $^5J_{\text{H}(5)-\text{H}(1')}$ dla kilku nukleozydów pirymidynowych.

T a b l i c a 2

Obserwowane $^5J_{\text{H}(5)-\text{H}(1')}$ w nukleozydach pirymidynowych w $\text{D}_2\text{O}(\text{pD}=8)^*$

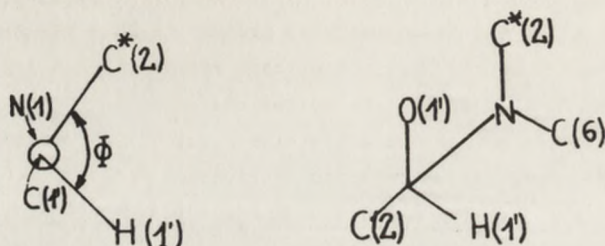
Związek	Przesunięcie H-6	chem(ppm) H-5	Stała sprzężenia (Hz)	
			$^5J_{5-1'}$	$^4J_{6-1'}$
Urydyna(pD=11,2)	7,660	5,796	0,41	0,2
2-dezoksy-Urydyna(pD=12,2)	7,666	5,801	0,45	0,2
6-aza - Urydyna(pD=10,0)	-	7,403	0,61	-
6-aza - Cytydyna(=10,4)	-	7,719	0,52	-
Orotydyna(=12,0)	-	5,751	0,1	-

* Środowisko alkaliczne zapewnia lepsze rozdzielenie sygnałów H(5) i H(1') [19] w wyniku zmiany ich przesunięć chemicznych

Obserwowane wartości $^5J_{\text{H}(5)-\text{H}(1')}$ sugerują konformację anti dla U, 2-dezoksy U, 6-aza U i 6-aza C, a dla orotydyny - konformację syn. Hruska [19] obserwował również czterowiązaniowe sprzężenia $^4J_{\text{H}(6)-\text{H}(1')}$ w α -pseudourydynie i β -pseudourydynie. Po przeprowadzeniu rozważań teoretycznych sugeruje konformację anti w obu anomerach. Warunki geometryczne sprzężenia między F(5)-H(1') są podobne do tych dla sprzężenia H(5)-H(1'). Na tej podstawie Cushley [18] doszedł do analogicznych wniosków dla 5-fluoro-pirymidyno-nukleozydów.

Przy określaniu konformacji syn - anti ważną rolę odgrywają pomiary stałych sprzężenia $^{13}\text{C}-^1\text{H}$. Lemieux [20] skorelował wielkość stałej sprzężenia $^3J_{\text{C}(2)-\text{H}(1')}$ w nukleozydach pirymidynowych znaczonej w pozycji 2 węglem ^{13}C z wartością glikozydowego kąta C(2)-N(1)-C(1)-H(1') (rys. 4). Pozwoliło to potwierdzić uprzywilejowanie konformacji anti dla urydyny w roztworze wodnym. Stałe sprzężenia tego typu można znajdować w widmach PMR (stosując związki znaczone) lub w widmach CMR.

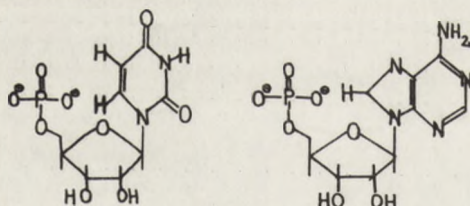
Dotychczas brak w literaturze systematycznych badań metodami PMR uprzywilejowania konformacji syn - anti w nukleozydach purynowych.



Rys. 4. Kąt torsyjny $C(2)-N(1)-C(1)-H(1')$ (A) w nukleozydach pirymidynowych (A).
Pozycję znaczoną węglem ^{13}C w pirymidynie zaznaczono gwiazdką(B)

2.2. PMR W BADANIU KONFORMACJI NUKLEOTYDÓW W ROZTWORZE

Określenie konformacji wokół wiązania glikozydowego nukleotydów jest stosunkowo proste, jeśli mamy do czynienia z 5'-mononukleotydem. Jeżeli występuje on w konformacji anti, to proton H(6) (nukleotydy pirymidynowe) lub H(8) (nukleotydy purynowe) znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie ujemnie naładowanej grupy fosforanowej (rys. 5.)



Rys. 5. Wpływ grupy 5'-fosforanowej na proton H(6) w 5'-UMP(A) oraz na H(8) w 5'-AMP (B)

Wpływ pola elektrostatycznego grupy fosforanowej na te protony manifestuje się w zmianie ich przesunięć chemicznych w zależności od wielkości ładunku na fosforanie.

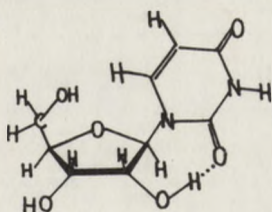
Schweizer i współpracownicy [20] badali wpływ grupy fosforanowej na protony H(8) i H(6) w 5', 3' oraz w 2'-fosforanach nukleotydów purynowych i pirymidynowych. Wpływ ten można wykazać w oparciu o następujące obserwacje:

- zmieniając pD (pH+0,4) roztworu nukleotydu można uzyskać różny stopień jonizacji grupy fosforanowej: forma niezjonizowana - monoanion - dwu-

anion. Zmiana pD w zakresie od 5,9 do 7,4 powoduje wzrost formy dwuanionowej z 10% do 90%. Wiąże się z tym zmiana stopnia przesłaniania H(8) lub H(6). Przy pD = 7,4 dla 5'-nukleotydów protony te są o około 0,1 ppm odsłonięte w stosunku do pD = 5,9. Identyczna zmiana stopnia jonizacji w 3'-fosforanach i w 2'-fosforanach nie wpływa odsłaniająco na interesujące nas protony. Brak wpływu odsłaniającego wynika ze struktury cząsteczki: grupy 3'-lub 2'-fosforanowa są tak oddalone od protonów H(8) czy H(6), że nie wpływają odsłaniająco;

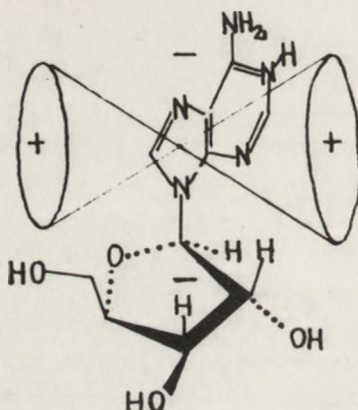
2. porównując przesunięcia chemiczne protonów zasadowych w nukleotydach z odpowiednimi nukleozydami przy tym samym pD stwierdzono odsłanianie H(8) czy H(6) o około 0,12 ppm w przypadku 5'-fosforanów; 3'-fosforany nie wykazują żadnego wpływu grupy fosforanowej na protony zasady. W 2'-fosforanach obserwowano przesłanianie protonów H(2) w purynie (0,05 do 0,08 ppm) lub H(6) w pirymidynie (0,05 do 0,06 ppm);

3. istnieją różne pośrednie dowody na istnienie wiązania wodorowego w nukleozydach i nukleotydach pirymidynowych pomiędzy grupą karbonylową (2)C=O a (2')OH (rys. 6), które w dużym stopniu mogłoby stabilizować konformację anti (to wiązanie może istnieć tylko dla formy anti). Usunięcie tego wiązania np. w 2'-dezoksynukleotydach spowoduje zmniejszenie udziału rotameru anti w roztworze, a co za tym idzie - zmniejszenie wpływu odsłaniającego grupy 5'-fosforanowej na proton H(6) przy zmianie pD od 5,9 do 7,4. Rzeczywiście w serii 2'-dezoksy ten efekt odsłaniający jest o 60 do 70% mniejszy niż w serii rybo;



Rys. 6. Wiązanie wodorowe O(2)...H-O(2') w urydynie

4. protony H(2') i H(3') w 2'-dezoksy purynonukleotydach są przesunięte ku niższemu polom o około 0,3 ppm w stosunku do 2'-dezoksy pirymidynonukleotydów. Jest to prawdopodobnie wynikiem odsłaniającego efektu anizotropowego pięcioczłonowego pierścienia puryny, gdy ten znajdzie się w płaszczyźnie obu protonów (rys. 7). Ma to miejsce tylko w konformacji anti. Obli-



Rys. 7. Wpływ odsłaniający pięciocząłowego pierścienia adeniny na protony H(2') i H(3')

czenia gęstości elektronowej pięcio- i sześciocząłowego pierścienia w adeninie i guaninie wykazują, że jedynie pierścień pięciocząłowy ma podobny rozkład gęstości elektronów w obu nukleozydach, a więc i podobny prąd pierścieniowy. Ponieważ przesunięcia chemiczne protonów H(2') i H(3') w 5'-dezoksy GMP i 5'-dezoksy AMP są podobne - wnosimy z tego, że pozostają one pod wpływem pierścienia pięciocząłowego, a więc posiadają konformację anti.

Badania przeprowadzone przez Smitha i współpracowników [23] nad zależnością przesunięcia chemicznego protonów H(6) w 5'-nukleotydach pirymidynowych od temperatury wskazują, że ze wzrostem temperatury zanika wpływ odsłaniający grupy 5'-fosforanowej na H(6) (zmiana przesunięcia chemicznego H(6) o około 0,3 ppm w kierunku wyższych pól przy przejściu od temperatury 15° do 53° C). Potwierdza to silnie uprzywilejowanie konformacji anti.

3. WNIOSKI

1. Z obliczeń teoretycznych w oparciu o dane rentgenograficzne, jak i z rozważań na modelach wynika, że rotacja zasady względem cukru jest zahamowana. Istnieją dwa przedziały kąta skręcenia χ_{CN} energetycznie korzystne. Przedział anti charakteryzuje się zwykle niższą energią.

2. Nie można rozważać konformacji syn-anti bez uwzględnienia wpływu pofałdowania pierścienia czy struktury rotamerowej wokół wiązania C(4')-C(5')-czynniki te są wzajemnie powiązane.

3. Większość nukleozydów i nukleotydów wykazuje w stanie krystalicznym konformację anti.

4. W roztworze możemy mówić jedynie o równowadze syn-anti przesuniętej na korzyść jednej z form.

5. Nukleozydy pirymidynowe preferują w roztworze konformację anti bardziej niż nukleozydy purynowe (1).

6. Spektroskopia FMR dostarcza jedynie jakościowych danych o preferencji jednej z form w roztworze.

7. Podstawienie grupy fosforanowej w pozycję 5' wpływa usztywniająco na konformację cząsteczki. Konformacja anti uprzywilejowana jest wtedy silniej niż w nukleozydach.

LITERATURA

- [1] Saenger W.; *Angew. Chem.* 85 (16), 680, 1973.
- [2] Pullman B., Hruska F.E.; *Symposium Jeruzalem (V)* 1973.
- [3] Kochetkov; *Chemia organiczna kwasów nukleinowych*, Moskwa 1970 s. 132.
- [4] Haschenmeyer A.E.V., Rich A.; *J.Mol.Biol.* 27, 369, 1967.
- [5] Berthold H.; Pullman B.; *Biochim.Biophys.Acta* 232, 595, 1971.
- [6] Kang S.; *J.Mol.Biol.* 58, 297, 1971.
- [7] Donohue J., Trueblood K.N.; *J.Mol.Biol.* 2, 263, 1960.
- [8] Yathindra N., Sundaralingam M.; *Biopolymers* 12, 297, 1973.
- [9] Lakshminarayanan A.V., Sasisekharan V.; *Biochim.Biophys.Acta* 204, 49, 1970.
- [10] Jordan F., Pullman B.; *Theoret.Chim.Acta (Berlin)*, 9, 242, 1968.
- [11] Tinoco J., Davis R.C., Jaskunas S.R.; *Molecular Association in Biology*, ed. B.Pullman, New York, s. 77, 1968.
- [12] Schirmer A., Davis W., Noggle C., Hart G.; *J.Am.Chem.Soc.* 94 (8), 2561, 1972.
- [13] Berthold H., Pullman B.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 46 (1) 125, 1972.
- [14] Kułakowska J., Rabczenko A., Shugar D.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 48 (1), 65, 1972.
- [15] Prestegard J.H., Chan S.I.; *J.Am.Chem.Soc.* 91 (11), 2843, 1969.
- [16] Schweiser M.P., Witkowski J.T., Robins R.K.; *J.Am.Chem.Soc.* 93, 277, 1971.
- [17] Schweizer M.P., Banta E.B., Witkowski J.T., Robins R.K.; *J.Am.Chem.Soc.* 95, 3770, 1973.
- [18] Cuschley R., Wempen I., Fox, J.J.; *J.Am.Chem.Soc.* 90, 709, 1968.

- [19] Hruska F.E.; Can.J.Chem. 49, 2111, 1971.
- [20] Schweizer M.P., Broom A.D.; POP Ts'o, Hollis D.P.; J.Am.Chem.Soc. 90, 1042, 1968.
- [21] Dugas H., Blackburn B.J., Robins R.K.; Smith I.C.P.; J.Am.Chem. Soc. 93, 3468, 1971.
- [22] Sternhell S.; Quart.Review (London) 23, 236, 1969.
- [23] Shmith I.C.P., Blackburn B.J., Yamane T.; Can.J.Chem. 47, 513, 1969.
- [24] Karabatsos G.J., Sonnichsen G.C., Hsi N., Fenoglio D.J.; J.Am. Chem. Soc. 89 (19), 5097, 1967.
- [25] Krzyżosiak W.J.; Analiza konformacyjna nukleotydów - Boszkowo 1973, s.5.

DYSKUSJA

W dyskusji głos zabrali m.in. mgr E. Frass, mgr M. Remin. Zwrócono uwagę, że w niektórych przypadkach trudno jest na podstawie przesunięć chemicznych określać konformację syn-anti. Np. twierdzenie Chana [15], że w urydynie pierścień zasady znajduje się nad pierścieniem cukrowym jest o tyle bezpodstawne, że nie uwzględnił on wpływu anizotropii magnetycznej wiązania glikozydowego N-C na przesunięcie chemiczne protonu H-6.

Dokładne badania wielkości stałej sprzężenia $^5J_{H-5, H-1'}$ w nukleotydach mogłyby rzucić nowe światło na zagadnienie sztywności tych układów w porównaniu z nukleozydami. Wzrost wartości tej stałej sugerowałby wzrost usztywnienia konformacji.

Za pomocą spektroskopii IR można by badać występowanie wiązania wodorowego w nukleozydach typu O(2)-H ...O(2').

Teresa Duda

ZASTOSOWANIE NMR DO OKREŚLANIA ANOMERYCZNEJ KONFIGURACJI

STRESZCZENIE

W artykule omówiono metody NMR stosowane do określania anomerycznej konfiguracji nukleozydów, a mianowicie:

- 1) porównanie stałych sprzężenia protonu H_1' z H_2' ,
- 2) porównanie przesunięć chemicznych sygnału protonu H_1' ,
- 3) porównanie przesunięć chemicznych sygnałów grup acetylowych w acetylowanych nukleozydach;
- 4) porównanie stałych sprzężenia dalekiego zasięgu protonu H_1' z atomem fluoru w pozycji 5 zasady;
- 5) efekt Overhausera wzmocnienia sygnałów protonów zasady;
- 6) magnetyczny rezonans węgla ^{13}C .

Do określania anomerycznej konfiguracji szeroko stosowano izorotacyjną regułę Hudsona, która koreluje skręcalność optyczną i anomeryczną konfigurację. Mówi ona, że dla D-glikozydów bardziej prawoskrętny (lub mniej lewoskrętny) anomer jest odmianą α . Skręcalność mierzono przy długości fali odpowiadającej żółtej linii D sodu. Jednakowoż wiele przykładów dezoksynukleozydów zaprzecza tej regule. Lemieux i Hoffer [1] stwierdzają, że skręcalność właściwa pewnych α -dezoksynukleozydów pirymidynowych przybiera wartości bardziej ujemne niż w odpowiednich anomerach β .

Stwierdzono natomiast, że z powodzeniem, do określania anomerycznej konfiguracji stosować można metody NMR. Wykorzystuje się w tym celu:

- 1) stałe sprzężenia protonu $H(1')$ z protonem $H(2')$,
- 2) przesunięcia chemiczne protonu $H(1')$,
- 3) przesunięcia chemiczne sygnałów grup acetylowych w acetylowanych nukleozydach,
- 4) stałe sprzężenia dalekiego zasięgu $J_{H(1')-F}$ w pozycji 5 zasady,

- 5) magnetyczny rezonans ^{13}C ,
 6) efekt Overhausera wzmocnienia sygnałów protonów zasady.

T a b e l a 1

Przykłady skręcalności niektórych nukleozydów

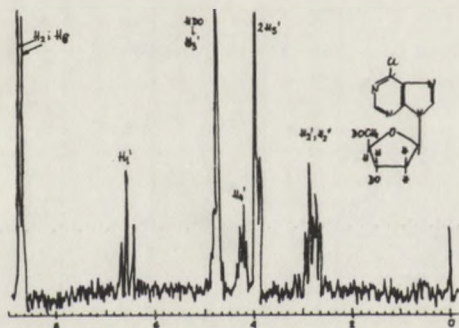
Nukleozyd	$[\alpha]_D$	Rozpuszczal.
1-(2' - dezoksy - α - D - rybofurano- zylo) - 5 - metylouracyl	- 21	woda
	+ 20,5	N,N - dwumetylo- formamid
4-(2' - dezoksy - β - D - rybofurano- zylo) - 5 - metylouracyl	+ 37	woda
	+ 48,6	N,N - dwumetylo- formamid
4-(2' - dezoksy - α - D - rybofurano- zylo) - 3,5 - dwu-O-P-toluilouracyl	- 72,5	pirydyna
	- 69,2	N,N - dwumetylo- formamid
4-(2' - dezoksy - β - D - rybofurano- zylo) - 3,5 - dwu-O-P-toluilouracyl	- 47	pirydyna
	- 4	N,N - dwumetylo- formamid

Każda z wymienionych metod zostanie w referacie omówiona. Zaobserwowano, że stała sprzężenia między sąsiednimi atomami wodoru jest nie tylko zależna od kąta dwuściennego utworzonego przez płaszczyzny, w których się one znajdują, ale także od innych efektów, m.in. od rodzaju podstawników innych niż atomy wodorów na wicynalnych atomach węgla. Jardetzky [1] podaje widma PMR wykonane na aparacie o częstotliwości 60 MHz dla różnych dezoksynukleozydów. W każdym przypadku anomeryczny proton $\text{H}(1')$ daje sygnał w postaci trypletu o szerokości $13,0 \pm 1$ Hz i stałej sprzężenia $6,5 \pm 0,5$ Hz. Wynika z tego, że $J_{1',-2'} = J_{1',-2''}$, i że różnica przesunięć chemicznych między protonami $\text{H}_{2'}$ i $\text{H}_{2''}$ jest mała (rzędu 1-3 Hz), a stała sprzężenia $J_{2',-2''}$ jest większa niż $J_{1',-2'}$ lub $J_{1',-2''}$. Ponieważ $J_{2',-2''}$ może być rzędu 13-tu Hz, jak stwierdzono również dla układów steroidowych, dlatego w każdym przypadku sygnał $\text{H}(1')$ jest w formie trypletu.

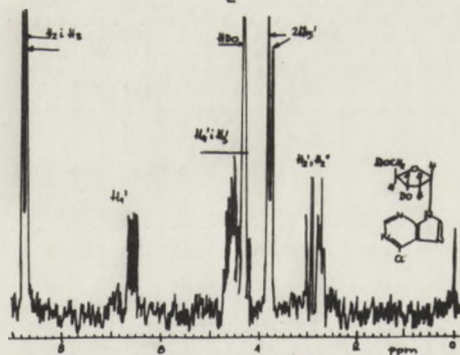
Wartość stałej sprzężenia trypletu $6,5 \pm 0,5$ Hz jest zgodna z przewidzianą w równaniu Karplusa, a wynoszącą 6,0 Hz. Ponadto, zgodność tych wartości wskazuje na odpowiednią orientację protonu na $\text{C}(1')$ w stosunku do protonu na $\text{C}(2')$ w 2' - dezoksy - β - D - rybozowym pierścieniu i otoczenie elektronowe protonu anomerycznego. Inni badacze otrzymali wartość tej stałej sprzężenia 7,0 Hz. W innym przypadku anomeryczny proton dawał sygnał w postaci kwartetu, a stałe sprzężenia protonu $\text{H}(1')$ z $\text{H}(2')$ i $\text{H}(2'')$ były odpowiednio $7,2 \pm 0,2$ Hz i $3,8 \pm 0,2$ Hz. Porównanie więc widm PMR anome-

rów 2' - dezoksyrybofuranozylowych pozwala na wyciągnięcie wniosku, że β anomery są charakteryzowane jako tryplety dla protonu H(1'), ze stałą sprzężenia 6.0 ± 0.3 Hz i szerokością sygnału 13.7 ± 0.5 Hz; natomiast α -anomery jako kwartety ze stałymi sprzężenia 3.1 ± 0.4 Hz i 7.2 ± 0.3 Hz i szerokością sygnału 10.4 ± 0.4 Hz.

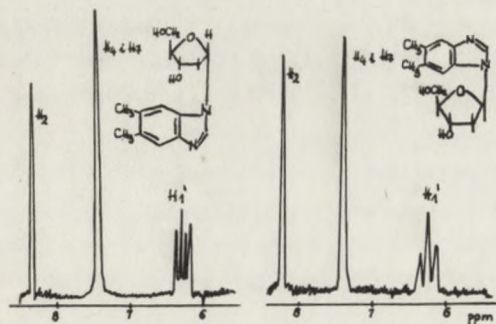
Widma PMR anomerów nukleozydów purynowych



Rys. 1. Widmo w D_2O wzorec DSS 60 MHz



Rys. 2. Widmo w D_2O wzorec DSS 60 MHz



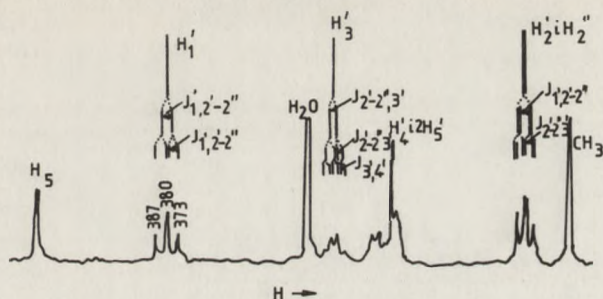
Rys. 3. Widmo w DMSO, wzorec DSS 60 MHz

Porównanie stałych sprzężenia α i β - anomerów

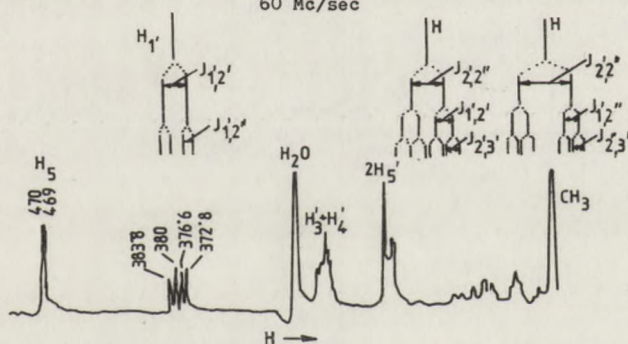
Pochodna 2'-dezoksy- -D-rybofuranocyloza	Sygn.	α - anomer		β - anomer		Rozp.
		$J_{H_1'}$ (cps)	szer. piku (cps)	$J_{H_1'}$ (cps)	szer. piku (cps)	
6-amino-9-(2'-dezoksy- α - -D-rybofuranocylo) puryna	Q	3.3;7.5	10.8			DMSO
6-chloro-9-(2'-dezoksy- β - -D-rybofuranocylo) puryna	T			6.7	13.5	DMSO
6-chloro-9-(2'-dezoksy- α - -D-rybofuranocylo) puryna	Q	3.3;7.0	10.3			D ₂ O
9-(2'-dezoksy- α -D-rybofura- nozylo) puryna	Q	3.5;7.1	10.6			D ₂ O
9-(2'-dezoksy- β -D-rybofura- nozylo) puryna	T			6.7	13.5	DMSO
6-amino-2chloro-9(2'-dezoksy- α -D-rybofuranocylo) puryna	Q	2.8;7.2	10.0			d ₆ DMSO
6-metylo-9-(2'-dezoksy- α - -D-rybofuranocylo) puryna	Q	3.0;7.0	10.0			D ₂ O

Wszystkie związki podane w tej tabeli mają konfigurację ustaloną na podstawie danych PMR. Dodatkowo zostały one sprawdzone przez Ulbrichta i stwierdzono, że α - anomery wykazują dodatni efekt Cottona, β - natomiast ujemny. Z dostępnych danych wynika, że w ten sposób można ustalić również anomeryczną konfigurację 2'-dezoksynukleozydów posiadających inne heterocykliczne zasady, które nie zmieniają zasadniczo konformacji pierścienia furanowego. Metoda ta wprowadza nową stałą fizyczną dla anomerycznej identyfikacji tych pochodnych i determinującą kryterium czystości anomerycznej. Lemieux [4] oznaczył anomeryczną konfigurację tymidyny i jej α - anomeru za pomocą teoretycznego rozważania modelowego sprzężenia protonów w części cukrowej cząsteczki.

W naturalnie występującej tymidynie stwierdzono niewielkie przesunięcie chemiczne między dwoma atomami wodorów H(2') i H(2''). Z tej racji sygnał protonu H(1') występuje w postaci trypletu (stała sprzężenia 7.0 ± 0.2 Hz), który odbija średnie sprzężenie protonu H(1') z H(2') i H(2'') (wielkość stałej sprzężenia $J_{H(1')-H(2')} \approx 5\text{Hz}$, natomiast $J_{H(1')-H(2'')} \approx 9\text{Hz}$).



Rys. 4. Eksperymentalne i teoretyczne widmo PMR tyminy 20% roztwór w D_2O , $25^\circ C$ TMS, 60 Mc/sec



Rys. 5. Eksperymentalne i teoretyczne widmo PMR α -anomeru tyminy 20% roztwór w D_2O , $25^\circ C$, TMS, 60 Mc/sec

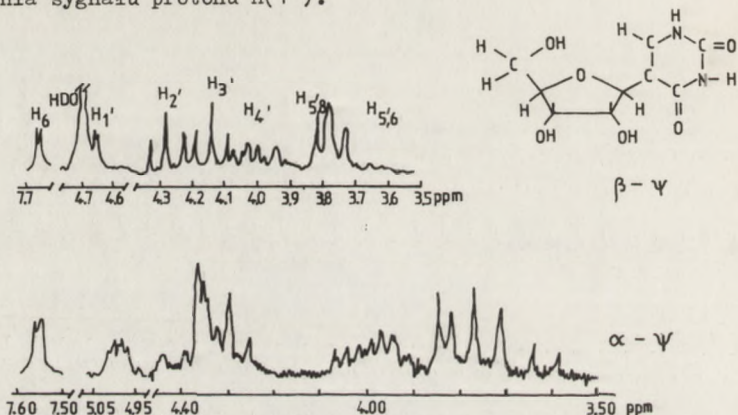
Natomiast widmo anomeru tyminy syntezowanego przez Hoffera dostarcza świadectwa jego konfiguracji i konsekwentnie dowodu konfiguracji tyminy występującej w naturalnych nukleotydach. Należy jednak przyjąć dwa założenia:

- 1) że badane związki są konformacyjnie czyste w warunkach pomiaru, tj. w roztworze D_2O , w tem. $25^\circ C$,
- 2) że każda zmiana w konformacji cząsteczki wywołuje zmianę w stałych sprzężenia.

Lemieux mając widmo anomeru tyminy wyliczył z niego stałe sprzężenia protonu $H(1')$ z $H(2')$ i $H(2'')$. Wynosiły one odpowiednio 7.2 ± 0.2 Hz i 3.8 ± 0.2 Hz. Sygnał $H(1')$ pojawiał się jako kwartet. Następnie, dla poszczególnych możliwych teoretycznie kątów między płaszczyznami, w których znajdują się protony $H(1')$, $H(2')$ i $H(2'')$ obliczał stałe sprzężenia i porównywał je z danymi eksperymentalnymi. Metodą eliminacji ustalił, że anomer tyminy musi mieć konfigurację α . Jest to prawdziwe nie tylko na podstawie faktu, że interpretacja widma jest możliwa na podstawie tej kon-

figuracji, ale również dlatego, że konfiguracja ta umieszcza związek w dogodnej konformacji.

Konfigurację Ψ -urydyny w roztworze wodnym Hruska [5, 6] oznaczył przez analizę położenia sygnału protonu H(1').



Rys. 6. Widma PMR α - 1 β - Ψ w D_2O , $pD = 6.7$, $0.12M$, $30^\circ C$, DSS, 100 MHz

Parametry spektralne α i β - Ψ - urydyny porównywano z odpowiednimi wartościami dla urydyny. Dublet przy niskim polu 7.660 ppm dla anomeru β i 7.561 ppm dla anomeru α przypisano protonowi H(6) pierścienia pirymidynowego. Małe rozszczepienie 0.8Hz dla anomeru β jest spowodowane spinowo-spinowym sprzężeniem dalekiego zasięgu z protonem H(1'). Dla anomeru α obserwuje się rozszczepienie 1.2 Hz. Sygnał anomerycznego protonu H(1') w anomerze występuje w postaci kwartetu przy 4.674 ppm. Napromieniowanie pasma około 7.660 ppm 4.279 i 4.141 ppm pozwalało przypisać je odpowiednio protonom H(6), H(1'), H(2') i H(3'). Wyznaczona stała sprzężenia $J_{1'-2}$, wynosiła 5 Hz dla anomeru β i 3.2 Hz dla anomeru α . Stwierdzono jednak, że anomeryczną konfigurację z dużą pewnością można oznaczyć jedynie wówczas, gdy stała sprzężenia wicynalnych protonów H(1')-H(2') jest mniejsza od 1 Hz. Przy większych wartościach stałej sprzężenia $J_{1'-2}$, jest trudno określić czy zmiany stałej sprzężenia są wynikiem zmiany konfiguracji, czy też konformacji cząsteczki. Jest to poważne ograniczenie w wykorzystywaniu stałych sprzężenia $J_{1'-2}$, do określania konfiguracji na węglu anomerycznym nukleozydów. W związku z tym okazało się niemożliwe przypisanie tą metodą konfiguracji anomerom Ψ - urydyny. Jest natomiast możliwe dokonanie tego oznaczenia przez porównanie przesunięcia chemicznego protonu H(1'). Sygnał H(1') w β - anomerze jest przesunięty o 0.232 ppm w kierunku wyższego pola w stosunku do sygnału H(1') w α -anomerze.

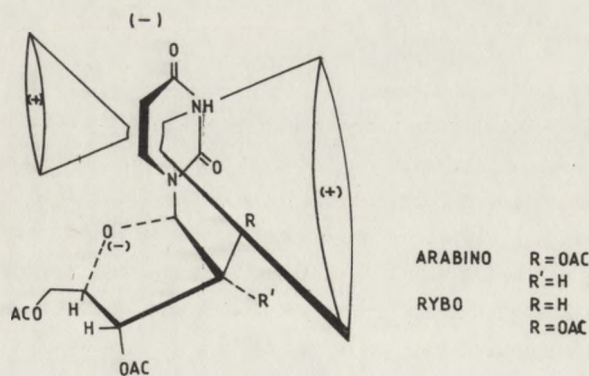
Analiza dużej liczby furanozydów sugeruje, że różnica przesunięć chemicznych protonu H(1') (0.22-0.30 ppm) w α i β - anomerach jest wynikiem większego przysłaniania protonu H(1') przez grupę 2' - OH w anomerze β .

T a b e l a 3

Porównanie przesunięć chemicznych i stałych sprzężenia protonów α - i β - Ψ urydyny

proton	Przesunięcia chemiczne protonów $\alpha - \Psi$ i $\beta - \Psi$ w 30°C		Stałe sprzężenia (w hercach) $\alpha - \Psi$ i $\beta - \Psi$ w 30°C		
	$\alpha - \Psi$	$\beta - \Psi$	stała sprzężenia	$\alpha - \Psi$	$\beta - \Psi$
H6	7.561	7.660	J _{61'}	1.3	0.8
H _{1'}	4.991	4.674	J _{1'2'}	3.3	5.0
H _{2'}	4.358	4.279	J _{2'3'}	4.2	5.0
H _{3'}	4.328	4.141	J _{3'4'}	7.9	5.2
H _{4'}	3.998	4.009	J _{4'5'B}	2.4	3.2
H _{5'B}	3.881	3.840	J _{4'5'C}	5.7	4.6
H _{5'}	3.708	3.726	J _{5'85'C}	-12.7	-12.7

Cushley i Watanabe [7,8] zaproponowali stosowanie do oznaczenia anomerycznej konfiguracji porównanie przesunięć chemicznych sygnałów acetylowych w acetylowanych nukleozydach uracylu i tyminy (związki cytozyny mogą być badane po deaminacji do odpowiednich pochodnych uracylu).

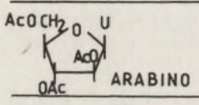
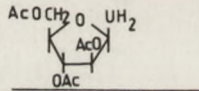
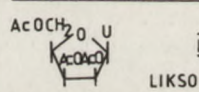
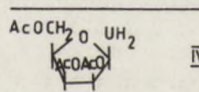
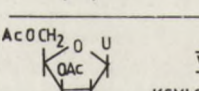
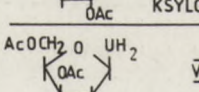
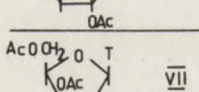
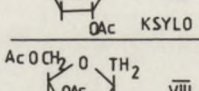


Rys. 7. Schemat przesłaniania podstawników na C_{2'} przez podwójne wiązanie 5,6

Uprzywilejowaną konformacją tych związków jest ta, w której podwójne wiązanie 5,6 - aglikonu jest nad pierścieniem cukrowym. Grupa cis - acetoksy jest w stożku dodatniego przesłaniania przez podwójne wiązanie 5,6.

T a b e l a 4

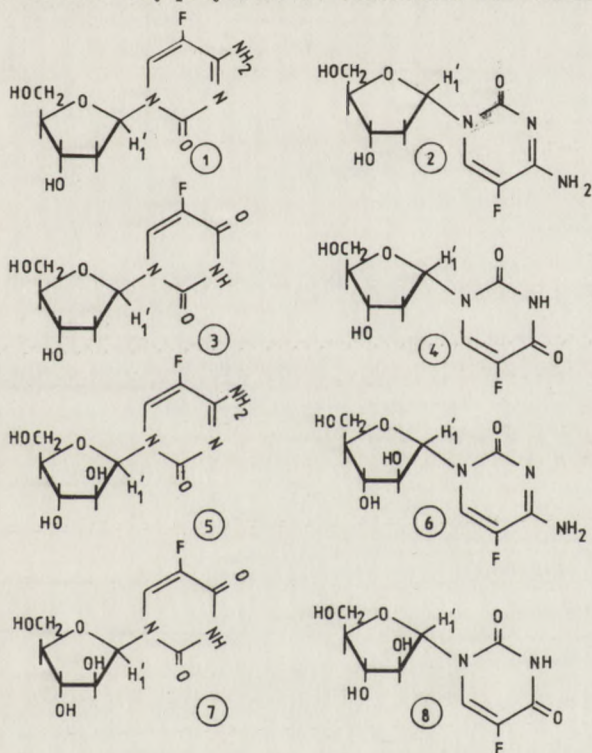
Przesunięcia chemiczne sygnałów grup acetylenowych

	7.85	7.90	7.95	8.00	8.05	8.10	8.15	8.20	τ
 I ARABINO			C ₃ C ₅			C ₂			
 II			C ₃ C ₅			C ₂			
 III LIKSO			C ₃ C ₅					C ₂	
 IV			C ₃ C ₅			C ₂			
 V KSYLO									
 VI (2)									
 VII KSYLO (2)									
 VIII (2)									

Porównanie dwóch par C(1')-C(2') - cis nukleozydów i dwuwodoronukleozydów (arabino I i II i likso III i IV) wskazuje, że C(2') acetoksy rezonans jest przesunięty o 0.05 i 0.10 ppm w kierunku niższych pól odpowiednio po hydrogenacji. W parach rybo- i ksylo- nukleozydów (ksylo V, VI i VII, VIII), gdzie podstawniki C(1') - C(2') są trans, obserwowane jest przesunięcie do wyższych pól sygnałów grupy C(2') -acetoksy po uwodornieniu wiązania podwójnego 5,6. Badania te można uogólnić i zastosować do określania konfiguracji nukleozydów. W opinii autorów metoda ta może być stosowana do określania anomerycznej konfiguracji nukleozydów pirymidynowych, ponieważ

do badań wymagany jest tylko jeden anomer, który przez acetylowanie i uwodornienie przeprowadzany jest w konieczną pochodną.

Również wprowadzenie atomów fluoru w pozycję C(5) w nukleozydach pirymidynowych okazało się przydatne do określania ich konfiguracji.



Rys. 8. Przykłady 5-fluoropochodnych nukleozydów pirymidynowych

W przedstawionych na rysunku nukleozydach 5-fluoropirymidynowych obserwowano sprzężenie dalekiego zasięgu między atomem F na C-5 i anomerycznym protonem H(1').

T a b e l a 5

Stałe sprzężenia w 5-fluoronukleozydach

Związek	Cukier	Zasada	$J_{H_1',-F(H_2')}$	Sygnal $H_{1'}$
1	2	3	4	5
1	β - dezoksyrybo	5 - fluorocytozyna	1.6	T-D
2	α - dezoksyrybo	5 - fluorocytozyna	1.3	D-Q
3	β - dezoksyrybo	5 - fluorouracyl	1.7	T-D

ciąg dalszy tabeli 5.

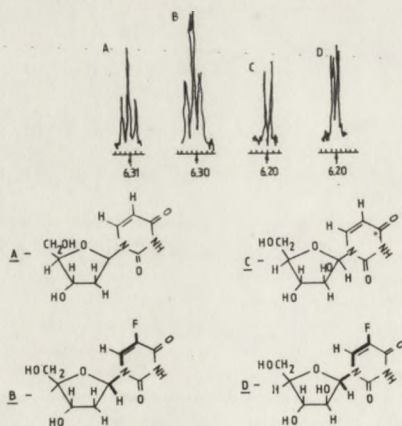
1	2	3	4	5
4	α - dezoksyrybo	5 - fluorouracyl	1.4	D-Q
5	β - arabino	5 - fluorocytozyna	1.8	D-D
6	α - arabino	5 - fluorocytozyna	1.3	Q
7	β - arabino	5 - fluorouracyl	1.7	D-D
8	α - arabino	5 - fluorouracyl	1.0	D-D

Tabela 6

Multipletowość sygnału $H_{1'}$ w niefluorowanych nukleozydach

Związek	Cukier	Zasada	Sygnał $H_{1'}$
9	β - dezoksyrybo	tymina	T
10	β - dezoksyrybo	cytozyna	T
11	β - dezoksyrybo	uracyl	T
12	β - arabino	cytozyna	D
13	β - arabino	uracyl	D

W tabeli 5 przedstawione są fluoropochodne, natomiast w tabeli 6 ich niepodstawione analogi. Analiza tabeli 6 wykazuje, że w każdym przypadku rozszczepienie sygnału protonu $H(1')$ znika w przypadku niefluorowanych związków. Rozszczepienie sygnału protonu anomerycznego przedstawia rysunek.



Rys. 9. Porównanie sygnałów anomerycznego protonu $H_{1'}$ w nukleozydach i ich 5-fluoro-analogach (D_2O, DSS)

Sprężenie zachodzi poprzez 5 wiązań (zaznaczonych na rysunku grubszą linią). Sygnał H(1') na rysunku A jest trypletem spowodowanym sprzężeniem z dwoma protonami na C(2'). Z drugiej strony, anomeryczny sygnał dla jego 5-fluoroanalogów (rys. B) jest trypletem dubletów spowodowanym sprzężeniem dalekiego zasięgu z atomem fluoru na C(5). Podobnie związek C wykazuje sygnał przy δ 6,20 ppm w postaci dubletu, powodowany sprzężeniem z H(2'), a jego 5-fluoropochodna D - dublet dubletów wynikający również ze sprzężenia z atomem fluoru. Sprężenia dalekiego zasięgu dla tych przypadków były również potwierdzone przez spektroskopię ^{19}F NMR.

Aby przy tym sprawdzaniu wykluczyć ewentualną możliwość sprzężenia atomów fluoru z protonem H(3') widma wykonano w D_2O . Zastosowanie D_2O jako rozpuszczalnika wyeliminowało możliwość rozszczepienia, które byłoby spowodowane sprzężeniem protonu H(1') z protonem H(3'). Rozszczepienie sygnału anomerycznego protonu H(1') przez proton H(6) jest niemożliwe, ponieważ:

- 1) sygnał protonu H(6) jest nierozszczepiony przez proton H(1'),
- 2) widmo 5-fluoro - 6-deuterourydyny wykazuje rozszczepienie w sygnale H(1').

Zauważono również, że dla par α i β nukleozydów 5-fluoropirymidynowych wielkość stałych sprzężenia dalekiego zasięgu jest zależna od anomerycznej konfiguracji związków. Dla czterech β - anomerów wielkość $^5J_{\text{H}(1')-\text{F}}$ jest od 1,6 do 1,8 Hz, natomiast dla α -anomerów od 1,0 do 1,4 Hz.

Ogólnie można przyjąć, że w roztworze D_2O nukleozydy 5-fluoropirymidynowe serii α posiadają stałe sprzężenia dalekiego zasięgu $^5J_{\text{H}(1')-\text{F}} < 1,5 \text{ Hz}$, podczas gdy związki serii β posiadają te stałe większe od 1,5 Hz. Tak więc, określenie wielkości sprzężenia dalekiego zasięgu może być dogodną metodą do określania anomerycznej konfiguracji nukleozydów 5-fluoropirymidynowych o nieznannej strukturze. Przedmiotem wielu badań i teoretycznych rozważań był sposób, w jaki sprzężenie to jest realizowane. Opierając się na badaniach mechanizmów sprzężenia dalekiego zasięgu prowadzonych na układach steroidowych oraz fluorowanych związkach aromatycznych z łańcuchami bocznymi, dla których jest przyjęty mechanizm sprzężenia przez prestrzeń, Cushley rozpatrywał możliwość zaakceptowania go do tej serii związku. Z badań na modelach wynika, że dla 5-fluoronukleozydów bardziej uprzywilejowana jest konformacja, w której wiązanie podwójne 5,6 leży nad pierścieniem cukru, co powoduje, że atomy fluoru i proton H(1') są ułożone w konfiguracji "ZIG-ZAG" lub "W", a która jest najkorzystniejsza dla wystąpienia sprzężenia dalekiego zasięgu. Odległości międzyatomowe protonu H(1') i atomu fluoru dla konfiguracji, w których podwójne wiązanie 5,6 le-

żało nad lub pod pierścieniem cukru wynosiły odpowiednio 5,28 Å i 4,61 Å. Obie te wartości są większe niż suma promieni van der Waalsa protonu i fluoru ($\sim 2,55\text{Å}$).

Gdyby przyjąć mechanizm sprzężenia przez przestrzeń, nie powinno się obserwować różnic przy zmianie anomerycznej konfiguracji od α do β , a w rzeczywistości zmiany te są obserwowane.

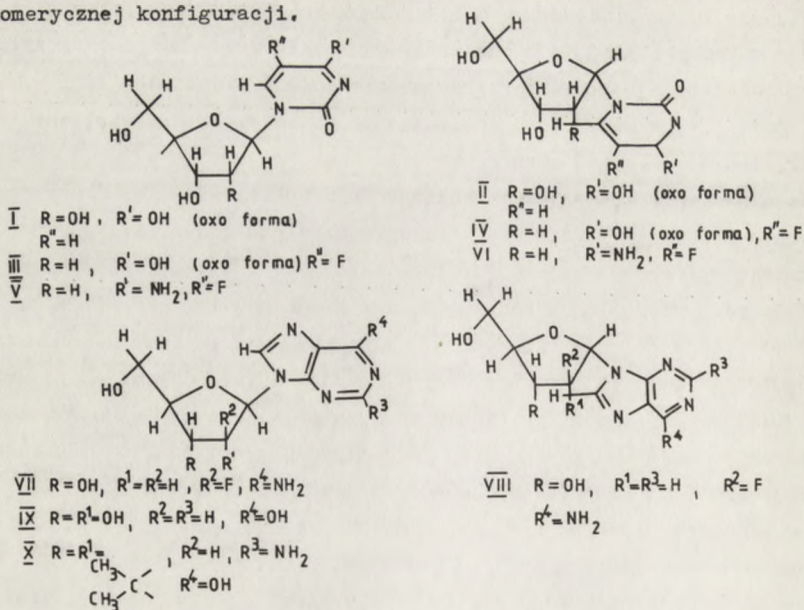
Rozpatrując dodatkowo wpływ objętościowych podstawników w pozycji 2' na konformację związku Cushley stwierdził, że mechanizm sprzężenia przez przestrzeń jest niemożliwy do przyjęcia.

W 5-fluoronukleozydach obserwujemy więc sprzężenia dalekiego zasięgu zrealizowane przez wiązania.

Spektroskopię ^{13}C NMR stosowano również do ustalania anomerycznej konfiguracji [10]. Różnica przesunięć $\delta\alpha - \delta\beta$ dla sygnału $^{13}\text{C}-1'$ wynosi 3,55 - 3,75 ppm, natomiast dla $^{13}\text{C}-4'$ różnica ta jest od 0 - 0,75 ppm. Na przesunięcie chemiczne $^{13}\text{C}-2'$ wpływa głównie efekt indukcyjny podstawników, a nie anomeryczna konfiguracja.

Ponieważ spektroskopia ^{13}C będzie przedmiotem osobnych rozważań, w tym miejscu chciałam tylko zasygnalizować możliwość jej wykorzystania do tego typu badań strukturalnych.

W najnowszych pracach [11] stosowano efekt Overhausera do oznaczania anomerycznej konfiguracji.



Rys. 10. Przykłady nukleozydów pirymidynowych i purynowych badanych za pomocą efektu Overhausera

Porównanie wzmocnień sygnałów protonów

Związek	Rozpuszcz.	% wzmocnienia H ₆ w pirymidynie			
		H ₅ ' naświetlany		H ₄ ' naświetlany	
I (β)	D ₂ O	5		-	
II (α)	D ₂ O	0		13	
III (β)	D ₂ O	6.7		0	
IV (α)	D ₂ O	- 3		9	
V (β)	D ₂ O	5		1	
		7.8		2	
VI (α)	D ₂ O	2		16	
		% wzmocnienia H ₈ , H ₂ w purynach			
		H ₅ ' naświetlany		H ₄ ' naświetlany	
		H ₈	H ₂	H ₈	H ₂
VII (β)	d ₆ DMSO	0	10	0	0
VIII (α)	d ₆ DMSO	0	0	10	6
IX (β)	d ₆ DMSO	14-17	7-9	0-4	3-5
		% wzmocnienia H ₈ w purynie			
		H ₅ ' naświetlany		H ₄ ' naświetlany	
X (β)	d ₆ DMSO	10		2	

Analiza tabeli wykazuje, że naświetlanie protonu H(4') jego częstością rezonansową w α - nukleozydach (II, IV, VI, VIII) powoduje wzmocnienie sygnału protonu H(6) w pirymidynie oraz H(2) i/lub w purynach, podczas gdy naświetlenie protonu H(5') jego częstością rezonansową nie powoduje wzmocnienia sygnałów tych protonów zasady.

We wszystkich przypadkach dwa protony H (5') były magnetycznie równoważne i na widmie pojawiły się w postaci dubletu. Dla związków serii β (I, III, V, VII, IX, X) obserwowano wzmocnienie sygnałów tych protonów podczas naświetlania protonu H(5') jego częstością rezonansową. Naświetlenie protonu H(4') jego częstością rezonansową nie dawało efektu w postaci wzmocnienia sygnałów. Wyjątkiem była tutaj inozyna (IX), w której naświet-

lanie protonu H(4') jego częstotliwością rezonansową powodowało jednak niewielkie wzmocnienie sygnałów protonów H(2) i H(8).

Jest to niewątpliwie wynikiem częściowego naświetlania protonu H(2') lub H(3') spowodowanego sąsiedztwem sygnałów tych protonów w widmie w stosunku do sygnału protonu H(4').

Kiedy siła rozprzęgająca była mniejsza niż 5 dB, naświetlanie prot. H(4') jego częstotliwością rezonansową dawało 0% wzmocnienia dla sygnałów protonów H(2) i H(8), natomiast naświetlanie H(5') jego częstotliwością rezonansową powodowało wzmocnienie 5% i 7% odpowiednio dla sygnałów protonów H(2) i H(8).

Niemniej duża intensywność osiągnięta dla sygnałów protonów H(2) i H(8) (14-17% i 7-9%) po naświetlaniu H(5') jego częstotliwością rezonansową jasno dowodzi β -konfiguracji inozyny.

Jak wynika z dokonanego przeglądu metod stosowanych do oznaczenia anomerycznej konfiguracji, każda jest w pewien sposób ograniczona, ponieważ wymaga bądź obu anomarów, których konfigurację ustala się poprzez porównanie danych spektralnych, bądź otrzymywania dodatkowo ich acetylowanych i uwodornionych pochodnych. Najbardziej dogodną wydaje się być metoda stosująca efekt Overhausera. W tym przypadku do badań wystarczy jeden anomer, który nie musi być przeprowadzany w odpowiednie pochodne. Warunkiem powodzenia tej metody jest jednak stosowanie wysokorozdzielczych spektrofotometrów.

LITERATURA

- [1] Lemieux R.U., Hoffer M.; *Can.J.Chem.Soc.* 39, 110 (1961).
- [2] Jardetzky Ch.D.; *J.Am.Chem.Soc.* vol 83, 2919 (1961).
- [3] Robins M.J., Robins R.K.; *J.Am.Chem.Soc.* vol. 87, 4934 (1965).
- [4] Lemieux R.U.; *Can.J.Chem.* vol. 39, 116-120 (1961).
- [5] Hruska F.E., Grey A.A.; Smith I.C.P.; *J.Am.Chem.Soc.* 92, 4088 (1970).
- [6] Grey A.A., Smith I.C.P., Hruska F.R.; *J.Am.Chem.Soc.* 93, 1765 (1971).
- [7] Cushley R.J., Watanabe; JJ Fox, *Chem.Commun.* 598 (1966).
- [8] Cushley R.J., Watanabe K.A., Fox J.J.; *J.Am.Chem.Soc.* 89, 394 (1967).
- [9] Cushley R.J., I. Wempen I., Fox J.J.; *J.Am.Chem.Soc.* 90, 709 (1968).
- [10] Breitmaier E., Voelter W.; *Tetrahedron* 29, 227 (1972).
- [11] Cusley R.J., Blitzer B.L., Lipsky R.S.; *BBRC* 48 (6) 1482 (1972).

Jan Milecki

ZASTOSOWANIE JĄDROWEGO EFEKTU OVERHAUSERA I REAGENTÓW PRZESUNIĘCIA W BADANIACH STRUKTURALNYCH NUKLEOTYDÓW I NUKLEOZYDÓW

STRESZCZENIE

Za pomocą efektu Overhausera badano szereg nukleotydów i ich fosforanów [2', 3' - izopropylidenoinozynę (i-I), 2', 3' - izopropylidenourydynę (i-U) (2), urydynę, cytydynę, tymidynę (7), 2', 3', 5' - monofosforany guanozyny (6)]. We wszystkich przypadkach stwierdzono przewagę konformacji syn wiązania glikozydowego. Dla GMP, i-I oraz i-U obliczono ilościowe udziały konformerów syn i anti.

Za pomocą reagentów przesunięcia (chlorki Eu, Ho, Gd) badano konformacje 5'-fosforanu adenozy (AMP) i 5'-fosforanu 2'-dezoksytymidyny (d-TMP). Uzyskano bardzo dokładne dane, pozwalające na ilościowe określenie konformacji tych nukleotydów w roztworach wodnych. W obydwu metodach korzystano z komputerowej analizy otrzymanych widm.

WSTĘP

Niewątpliwa wiodąca rola spektroskopii NMR w badaniach konformacyjnych ograniczona jest względami aparaturowymi. Spektrometry bardzo wysokiej rozdzielczości, pracujące na częstotliwościach 220 czy 300 MHz są aparatami niezwykle kosztownymi, skomplikowanymi, trudnymi w obsłudze i nie należą do standardowego wyposażenia laboratoriów badawczych.

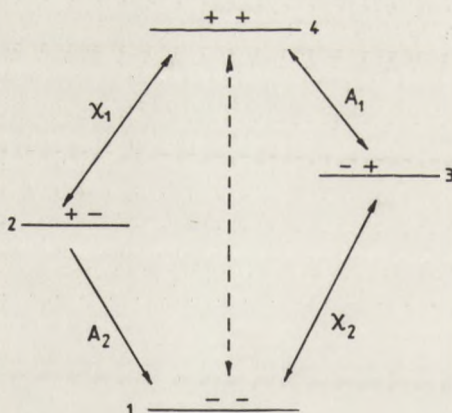
Jednak i zwykłe, pracujące na 60 czy 100 MHz, aparaty dają się wykorzystać do bardzo wnikliwych i subtelnych badań strukturalnych przy zastosowaniu dodatkowych technik, a zwłaszcza przy komputerowej analizie otrzymanych widm. Przedstawione zostaną dwie z tych technik, stosunkowo proste i nie nastroczające większych trudności w zastosowaniu. Są to: jądrowy efekt Overhausera (NOE - Nuclear Overhauser Effect) oraz reagenty przesunięcia (shift reagents).

NOE

I. TEORIA

Efekt Overhausera wynika z zaburzenia procesów relaksacji, które prowadzą do równowagi termicznej między różnymi stanami spinowymi jądra. Relaksacja spinów zachodzi poprzez oddziaływania z lokalnymi fluktuacjami pola magnetycznego próbki. Fluktuacje te mogą być wywołane przez oddziaływanie jąder między sobą, z ciałami paramagnetycznymi rozpuszczonymi w próbce, oddziaływania kwadrupolowe, dipolowe z rozpuszczalnikiem itp. W szczególności relaksacja może zachodzić przez oddziaływanie dipol-dipol z innym jądrem. Udział danego jądra w relaksacji drugiego zależy od odległości między jądrami (r) i to bardzo silnie, bo maleje z r^6 .

Rozważamy przypadek dwóch jąder A i X, w których relaksacja zachodzi głównie drogą oddziaływania dipolowego między nimi.



Ponieważ każdy proton może znajdować się w jednym z dwóch stanów spinowych, przy dwóch protonach daje to 4 możliwe stany spinowe pary jąder A i X: 1(--), 2(+ -), 3(- +), 4(+ +). Relaksacja powoduje przejścia takie, jak 1 \leftrightarrow 2, 2 \leftrightarrow 4 itp., ale dzięki oddziaływaniom dipolowym między jądrami ważne jest także przejście 1 \leftrightarrow 4. Jeżeli sygnał protonu X zostanie nasycony przez przyłożenie pola o częstotliwości radiowej, równej częstotliwości rezonansowej X, to taka sama ilość jąder X będzie w stanie + co w -. Stąd populacje stanów 1 i 3 oraz 2 i 4 będą równe. Dzięki przejściu 1 \leftrightarrow 4, dążącemu do utrzymania równowagi termicznej, populacja stanu 1 (a zatem i stanu 3) będzie większa niż populacja stanów 2 i 4. Ponieważ wielkość sygnału rezonansowego protonu A zależy od różnicy populacji stanów 1 i 2 oraz 3 i 4 efektem będzie wzrost intensywności sygnału protonu A. Wzrost ten

będzie tym większy, im silniejsze będzie przejście 1 — 4, a przejście to będzie tym większe im silniejsza będzie wzajemna relaksacja dipolowa jąder A i X. Ponieważ relaksacja zależy od odległości między jądrami, badając wzmacnienie sygnału można wnioskować o tych odległościach. Z dalszych rozważań teoretycznych wynika, że wzmacnienie sygnału A może wynosić do 50%. Jeżeli w relaksacji jądra X biorą udział jeszcze inne jądra lub łączy inne mechanizmy relaksacji, wzmacnienie będzie odpowiednio mniejsze.

Z tego mechanizmu wynikają ograniczenia metody [1]:

1. Spiny powinny ulegać relaksacji tylko przez wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania dipolowe. By to osiągnąć należy stosować roztwory rozcieńczone (małe oddziaływania międzycząsteczkowe), wolne od substancji paramagnetycznych (rozpuszczony tlen) i w rozpuszczalnikach o niskim momencie magnetycznym (CCl_4 , CS_2 , rozpuszczalniki deuterowane).

2. Sygnał napromieniowany powinien być wystarczająco daleko od obserwowanego, by pole nasycające nie zakłócało obserwowanych zmian intensywności.

3. Udziały spinów innych jąder w relaksacji powinny być małe.

4. Wszystkie jądra sprzężone z obserwowanym spinem powinny dawać sygnały w odległości od niego znacznie większej niż stała sprzężenia.

II. ZASTOSOWANIE METODY DO BADAŃ NUKLEOZYDÓW I NUKLEOTYDÓW

Z powodu przytoczonych ograniczeń NOE najbardziej nadaje się do badania kąt skręcenia wiązania glikozydowego γ [2]. Kąt ten definiujemy jako kąt między wiązaniem C8-X8 w purynach (lub płaszczyzną wiązania podwójnego w pirymidynach) a płaszczyzną wiązań glikozydowego i C1' - X1' mierzony zgodnie z ruchem wskazówek zegara. Kąt powiązany jest z inaczej definiowanymi kątami ϕ_{CN} [3] i χ [4] zależnością:

$$\gamma = \phi_{\text{CN}} - 120^\circ$$

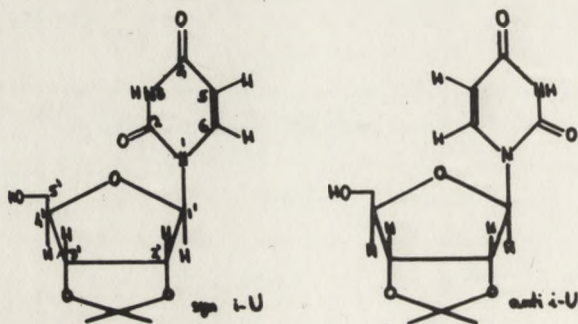
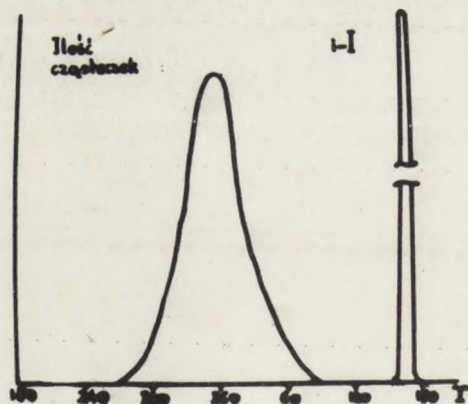
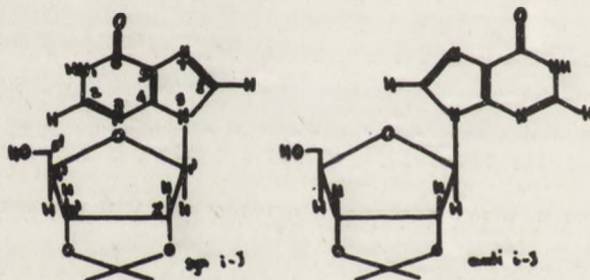
$$\gamma = -\chi - 120^\circ$$

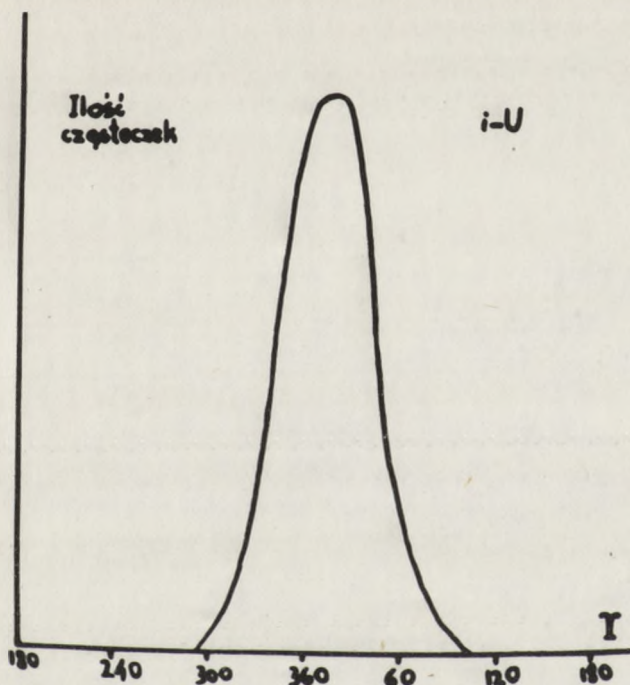
Bardzo dobrze nadaje się do badań metodą NOE sygnał protonu H-8 w purynach. Znajduje się on daleko od innych sygnałów, nie jest sprzężony, odległość protonu H-8 od innych protonów mocno zależy od wartości γ : np. $r_{\text{H}1', \text{H}8}$ zmienia się od 1,8 Å dla $\gamma = 0^\circ$ (konformacja syn) do 3,4 Å dla $\gamma = 180^\circ$ (konformacja anti) [5]. W pirymidynach podobnymi zaletami odznacza się proton H-6. Badania metodą NOE mogą dawać wyniki nie tylko jakościowe, ale i ilościowe. Jeżeli otrzymane widma poddać analizie komputerowej jako rezultat dostaje się uprzywilejowane kąty skręcenia oraz procent cząsteczek znajdujących się w odpowiadającej tym kątom konformacji.

Możliwe są dwie drogi postępowania:

1. Wylicza się wzmocnienia, jakie wystąpią przy różnych konformacjach, a następnie porównuje się je z otrzymanymi eksperymentalnie. Ponieważ wzmocnienie może być wypadkowym wzmocnieniem pochodzącym od paru różnych konformacji, należy też dopuścić taką sytuację. Konformacje, które dają efekt wyliczony najbliższy doświadczalnemu, przyjmuje się za występujące w rzeczywistości. Badano w ten sposób 2', 3' izopropylidenoizozynę (i-I) oraz 2', 3'- izopropylidenurydynę (i-U) [2].

Wyniki uzyskane wskazują, że około 80% i-I jest w konformacji syn w okolicy $\gamma = 355^\circ$, a 20% w konformacji anti w okolicy $\gamma = 166^\circ$; i-U znajduje się w jednej konformacji (syn, w okolicy $\gamma = 15^\circ$).





2. Zakłada się dużą swobodę rotacji wokół wiązania glikozydowego. Ponieważ wówczas kolejno protony $H1'$, $H2'$, $H3'$, $H5'$ i $H5''$ będą w najmniejszej odległości od $H8$, obserwowane wzmocnienie sygnału będzie sumą udziałów poszczególnych protonów we wzmacnianiu. Udział protonu będzie tym większy im dłuższy czas (p) spędza proton $H8$ w pobliżu tego protonu i im mniejsza jest minimalna odległość między protonami (r_{\min}). Po analizie danych z widm $5'$ fosforanu guanozyny otrzymano następujące wyniki [6]:

Odległości $H8$ od $H1'$, $H2'$ i $H3'$ Guo- $5'$ -P

	$H1'$	$H2'$	$H3'$
1. % wzmocnienia	10,5	18	9,5
2. Odległość efektywna $r_{\min} p^{1/6}$, nm	0,25	0,22	0,25
3. Składniki odległości efektywnej			
a. p	0,5	0,3	0,2
b. r_{\min} , nm	0,22	0,18	0,19
4. r_{\min} , wynikająca z modeli cząst., nm	0,23	0,18	0,19
5. Wartość I , wzięta z modeli cząst., deg	0	+120	+170
6. Schematyczna konformacja, widok z góry			

I tutaj widać, że preferowanym rotamerem jest rotamer syn.

Populacja rotamerów okazała się zależna od pD, choć nie w tym samym stopniu dla różnych fosforanów.

Ułamek czasu spędzany w konformacji syn (p(syn))

	pD	p(syn)	p(syn)/p(anti)
Guo - 2' - P	8,7	0,63	1,7
	1,2	0,80	4,0
Guo - 3' - P	8,9	0,72	2,6
	1,4	0,78	3,5
Guo - 5' - P	8,4	0,59	1,1
	1,3	0,49	1,0

Prócz tych dokładnych badań ilościowych często dokonuje się jakościowych oznaczeń, polegających jedynie na rozstrzygnięciu, która z konformacji syn czy anti jest uprzywilejowana. Z badań tych wynika preferencja konformacji syn zarówno nukleozydów czy nukleotydów purynowych [5], jak i pirymidynowych [7].

REAGENTY PRZESUNIĘCIA

I. TEORIA

Jeżeli jon lantanowca zostanie związany z cząsteczką organiczną, powoduje zmiany w jej widmie NMR. Zmiany te polegają bądź na przesunięciu sygnałów (stąd "reagenty przesunięcia"), bądź na ich poszerzeniu. Zmiany zależne są od pozycji jaką proton, odpowiadający danemu sygnałowi, zajmuje względem jonu lantanowca, więc ze zmian widma wnosić można o geometrii cząsteczki.

Jony lantanowców pod względem ich własności magnetycznych podzielić można na trzy klasy:

1. Jony typu Eu(III) i Nd(III), posiadające krótkie czasy relaksacji elektronowej. Ich oddziaływanie z protonem powoduje zmiany w przesunięciu chemicznym tego protonu, ale nie poszerza (lub prawie nie poszerza) linii rezonansowej.

2. Jony typu Eu(II) i Gd(III) o długich czasach relaksacji elektronowej, powodujące poszerzenie sygnałów.

3. Jony typu Ho(III) o średnich czasach relaksacji, powodujące poszerzenie linii i zmiany przesunięć chemicznych.

W odróżnieniu od metali przejściowych, jak Mn(II) i Cu(II), lantanowce posiadają niesparowane elektrony na dobrze osłoniętej powłoce wewnętrznej

4f, więc nie zachodzi oddziaływanie tych elektronów niesparowanych z elektronami wiązań cząsteczki ligandu. Elektrony niesparowane oddziałują swym momentem magnetycznym jedynie poprzez przestrzeń, nie poprzez wiązania chemiczne. Upraszcza to interpretację wyników, mamy bowiem do czynienia jedynie z oddziaływaniem pseudokontaktowym [8], wyrażonym równaniem:

$$\frac{\Delta \nu_i}{\nu_0} = D \left\langle \frac{3 \cos^2 \chi_i - 1}{r_i^3} \right\rangle$$

gdzie: \vec{r}_i - wektor łączący i-ty proton ligandu z jonem lantanowca, χ - kąt między \vec{r}_i a główną osią symetrii jonu, D-funkcja temperatury i magnetycznych własności kompleksu, stała w warunkach pomiaru, $\Delta \nu_i$ - zmiana przesunięcia chemicznego, ν_0 - standardowe przesunięcie chemiczne.

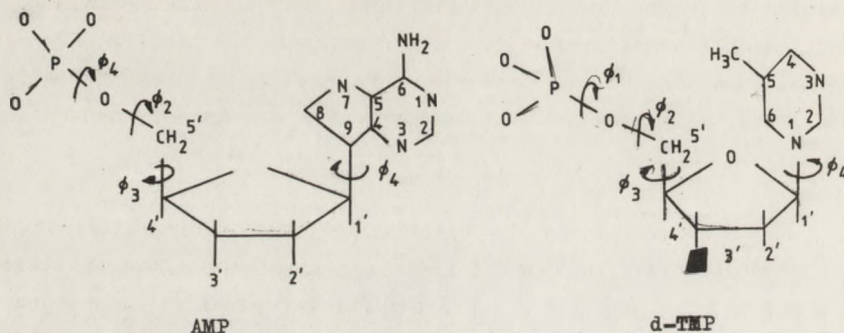
Widać stąd, że pomiary zmian przesunięć chemicznych dają informacje liniowe i kątowe.

W przypadku jonów drugiej klasy otrzymane poszerzenie linii jest odwrotnie proporcjonalne do szóstej potęgi odległości protonu i jonu lantanowca. Dostajemy więc informację liniową.

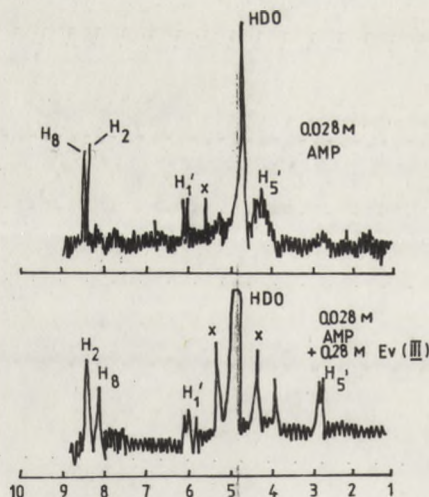
Jony grupy trzeciej używane mogą być równocześnie na obydwu sposoby.

2. Zastosowanie do badania nukleozydów i nukleotydów

Zasadniczą przeszkodą w stosowaniu reagentów przesunięcia do badań nukleozydów i nukleotydów jest niemożność stosowania rozpuszczalników niepolarnych. W rozpuszczalnikach polarnych (D_2O , dwumetylosulfotlenek) jon lantanowca asocjuje głównie z rozpuszczalnikiem, a w znikomym tylko stopniu z badanym związkiem i efekt przesunięcia jest zbyt mały, aby być użytecznym. Stąd też przy użyciu klasycznych odczynników przesunięcia [9], jakimi są kompleksy lantanowców z β -dwuketonami, można było badać jedynie nukleotydy o zablokowanych (np. zacetylowanych) grupach hydroksylowych i ewentualnych aminowych [10]. Na szczęście jony lantanowców posiadają właściwość wiązania się z grupami o charakterze kwasowym (a więc np. z grupą fosforanową), nawet w roztworach wodnych. Nic zatem nie stoi na przeszkodzie, by badać przy użyciu reagentów przesunięcia mono- czy nawet oligonukleotydy. W dodatku można tu stosować proste sole lantanowców, a nie ich kompleksy chelatowe. Podejście do rozwiązania problemu przedstawię na podstawie badań konformacji dwóch mononukleotydów: 5' fosforanu adenozy (AMP) i 5' fosforanu 2' dezoksytymidyny (d-TMP).



Z wzorów obu związków widać, że każdy z nich posiada możliwość rotacji wokół czterech wiązań, co daje ogromną ilość konformerów. Dodatek jonów europu do AMP w stosunku molowym 10:1 powoduje przesunięcie sygnału bez widocznego ich poszerzenia.



Obliczano stosunek przesunięcia sygnału każdego protonu do przesunięcia sygnału przyjętego za standard (H_{5'}). Stosunki te były stałe dla zmieniającego się stężenia Eu(III), Ho(III), Nd(III). Wynika stąd, że można założyć możliwość kontaktowego mechanizmu przesunięcia. Otrzymano zbiór stosunków przesunięć, wyrażonych wzorem:

$$R_1 = \frac{\Delta \nu_i}{\Delta \nu_0} = \frac{\langle \frac{3 \cos^2 \chi_i - 1}{\tau_i^3} \rangle}{\langle \frac{3 \cos^2 \chi_0 - 1}{\tau_0^3} \rangle}$$

Odpowiednio przy badaniu poszerzenia linii rezonansowych (użycie Gd(III)) otrzymano zbiór stosunków poszerzeń (tabela 1). Ze zbiorami tymi postępowano dalej następująco:

Założono sposób kompleksowania jonu lantanowca z anionem fosforanu. Z otrzymanych stosunków przesunięć obliczono kąty i odległości protonów od jonu i sprawdzano, czy zgadzają się one ze stosunkami poszerzeń. Jeżeli nie, zakładano następną konformację itd. Oczywiście przerasta to możliwości ręcznego wykonania tych operacji przez pomiary na modelach. Nie jest to łatwe nawet drogą analizy komputerowej. Można jednak ograniczyć ilość konformacji zadanych komputerowi do przebadania przez odrzucenie tych, które w sposób oczywisty są nie do przyjęcia. W tym celu do programu włączono zakaz zbliżania do siebie atomów na odległość mniejszą niż ich promienie van der Waalsa. By uniknąć przypadkowego odrzucenia konformacji jednak realnych, przyjęto promienie van der Waalsa mniejsze od zazwyczaj uznawanych (tabela 2). Takie ograniczenie wymagało przebadania konformacji wynikających jedynie z obrotu wokół wiązania C4' - C5' (zmiana kąta ϕ_3), a nie wszystkich, zaś pozwoliło odrzucić bardzo wiele konformacji bez konieczności ich badania (patrz tabela 3). Pozostałe konformacje przebadano pod kątem zgodności z otrzymanymi stosunkami przesunięć. Pozostała bardzo niewielka liczba konformacji (tabela 3), które sprawdzono pod względem zgodności ze stosunkami poszerzeń. Po każdym takim cyklu komputer "odsuwał" nieco jon lantanowca od cząsteczki i cykl się powtarzał. Granice założono bardzo szerokie, uzyskując pewność, że nie opuści się żadnej z konformacji wchodzących w grę. Stosowanie wyżej opisanych "filtrów" programu, w odpowiedniej kolejności, umożliwiło znaczne skrócenie czasu obliczeń. Poszczególne kąty skręcenia ($\phi_1, \phi_2, \phi_3, \phi_4$) zmieniały się skokami do 4° , wypróbowano też dwie możliwości mechanizmu kompleksowania lantanowca przez anion grupy fosforanowej.

Zadowolające rezultaty dawał jedynie mechanizm kompleksowania jonu przez dwa atomy tlenu, a nie, jak można by się spodziewać, przez trzy atomy. Wszystkie konformacje, zgodne z kolejnymi filtrami programu, tworzyły układ bliźniaczo niemal podobnych struktur, co dodatkowo potwierdza wiarygodność otrzymanego wyniku.

Stosunki przesunięć i poszerzeń

		AMP			
		H8/H5'	H2/H5'	H1'/H5'	
Przesunięcia	stosunek	0,29	0,00		0,08
	tolerancja	0,32-0,27	-0,02-+0,02		0,10-0,07
Poszerzenie	stosunek	1,0	-		-
	tolerancja	$\pm 0,5$	-		-
		d-TMP			
		H6/H5'	H5/H5'	H1'/H5'	H2'/H5'
Przesunięcia	stosunek	0,39	0,00	0,07	0,20
	tolerancja	0,41-0,38	+0,15--0,15	0,09-0,06	0,31-0,10
Poszerzenie	stosunek	1,0	-	-	-
	tolerancja	$\pm 1,0$	-	-	-

T a b e l a 2

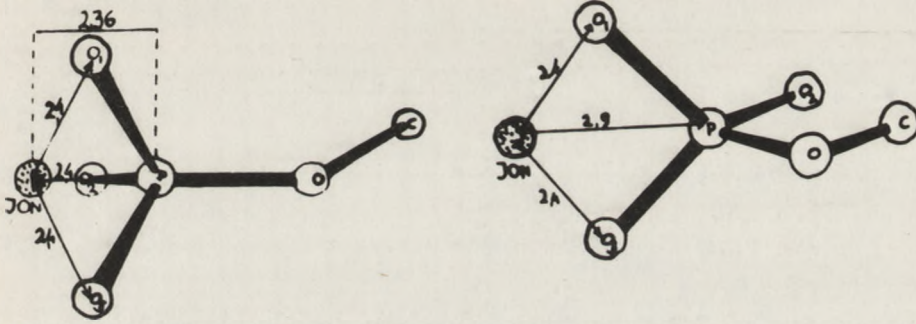
Minimalne odległości atomów w Å

	C	N	O	P	H
C	2,8	2,6	2,6	3,2	2,3
N	2,6	2,5	2,5	3,0	2,2
O	2,6	2,5	2,5	3,0	2,1
P	3,2	3,0	3,0	3,2	2,4
H	2,3	2,2	2,1	2,4	1,9

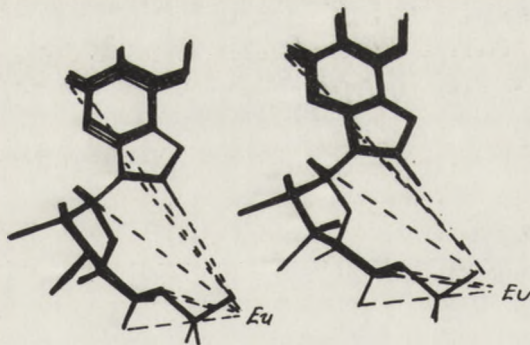
T a b e l a 3

Tok analizy komputerowej

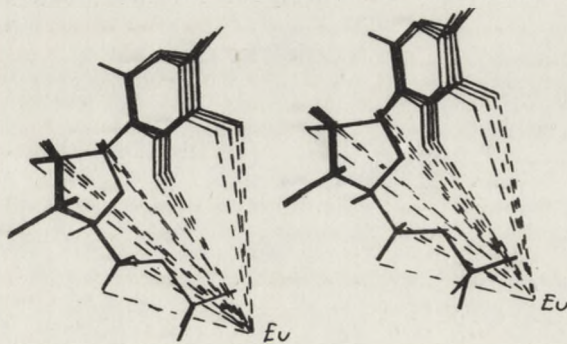
	AMP	d-TMP
Ilość obserwowanych protonów	5	7
Ilość wiązań ze swobodną rotacją (N)	4	4
Skok kąta stopniach (A)	4	4
Ilość konformacji $(360/A)^N$	64×10^6	
Ilość konformacji po "filtrze" $\Phi 3$	32×10^3	14×10^3
Ilość konformacji zgodnych ze stosunkami przesunięć	195	38
Ilość konformacji zgodnych ze stosunkami poszerzeń	12	4
Czas obliczeń	2h	1h



Dwa możliwe mechanizmy kompleksowania lantanowca przez fosforan



Konformacje AMP w rzucie przestrzennym



Konformacje d-TMP w rzucie przestrzennym

W ten sam sposób badano również fosforany dwunukleotydów, uzyskując podobnie dokładne wyniki [12].

LITERATURA

- [1] Shirmer R.E., Noggle J.H., Davis J.P., Hart P.A.; *J.Am.Chem.Soc.* 92, 3266, (1970).
- [2] Shirmer R.E., Noggle J.H., Davis J.P., Hart P.A.; *ibid.*, 94, 2561, (1972).
- [3] Donohue J., Trueblood K.N.; *J.Mol.Biol.* 2, 363, (1960).
- [4] Sundaralingam M.; *Biopolymers* 7, 821, (1969).
- [5] Hart P.A., Davis J.P.; *J.Am.Chem.Soc.* 91, 512, (1969).
- [6] Tran-Dinh Son, Gulschbauer W., Gueron M.; *J.Am.Chem.Soc.* 94, 7903, (1972).
- [7] Hart P.A., Davis J.P.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 34, 733, (1969).
- [8] McConnel M.M., Robertson R.E.; *J.Chem.Phys.* 29, 1361, (1958).
- [9] Hinckley C.O.; *J.Am.Chem.Soc.* 91, 5160, (1969).
- [10] Butterworth R.F., Pernet A.G., Hanessian S.; *Can.J.Chem.* 49, 987, (1971).
- [11] Barry C.D., North A.C., Glasel J.A., Williams R.J.P., Xavier A.V.; *Nature* 232, 236, (1971).
- [12] Barry C.D., North A.C., Glasel J.A., Williams R.J.P., Xavier A.V.; *Biochem.Biophys. Acta* 262, 101, (1972).

DYSKUSJA

W dyskusji wysunięto szereg zastrzeżeń do obu metod, zwracając uwagę na konieczność ostrożnego i krytycznego przyjmowania otrzymanych wyników. W odniesieniu do NCE podniesiono następujące zarzuty:

1. O ile teoretyczna strona efektu Overhausera jest dobrze opracowana i kalkulacje wzmocnień sygnałów odznaczają się dokładnością rzędu kilku procent, to dotychczasowe wyniki obarczone są stosunkowo dużym błędem. Na błąd ten wpływa wiele czynników, a więc uzyskanie naprawdę powtarzalnych wyników jest trudne. Problem ten podnoszą wszyscy autorzy cytowanych prac.

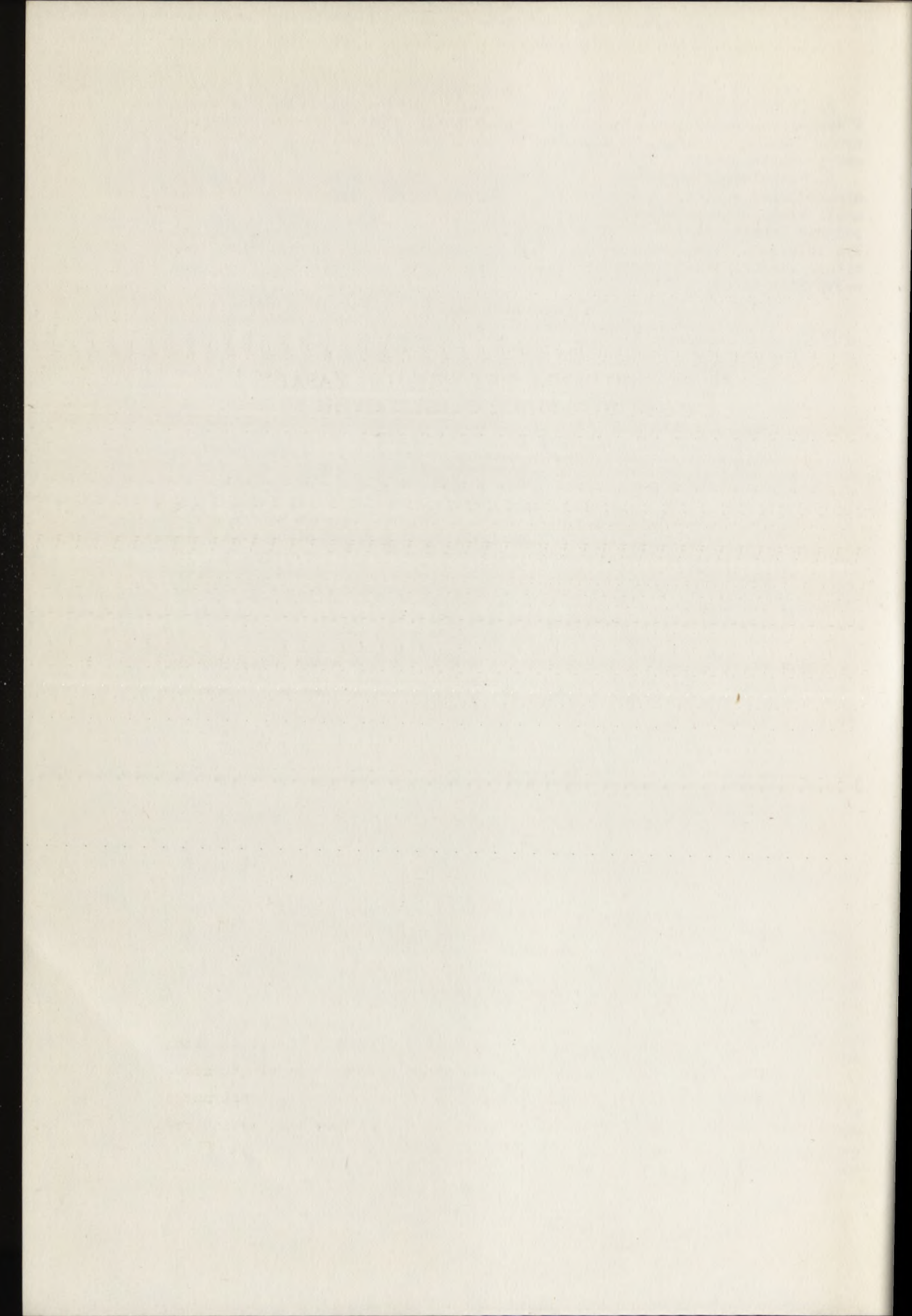
2. Metoda ta, nawet po uwzględnieniu dużego błędu, stwierdza niewątpliwie większy procent formy syn zarówno w nukleozydach, jak i w nukleotydach, niż wszystkie inne metody. Wytłumaczenie tego faktu jest trudne, brak też jego dyskusji w pracach oryginalnych.

Metoda reagentów przesunięć spotkała się z bardziej poważnymi zarzutami:

1. Nie wiadomo czy asocjacja silnie kompleksującego jonu lantanowca z grupą fosforanową nie wpływa na konformację nukleozydu. Zaangażowanie ujemnego ładunku grupy 5'- fosforanowej w asocjację może mocno zmienić oddziaływanie tej grupy z zasadą, co w sposób oczywisty wpływa na zmianę konformacji.

2. Do obliczeń przyjęto sztywną konformację pierścienia rybozy (3'-endo) i zasady, a rozpatrywano tylko możliwość rotacji wokół wiązań egzocyklicznych. Skądinąd wiadomo, że konformacja cukru może wpływać na konformację całej cząsteczki.

3. Wątpliwości budzi sam program komputera. "Startowano" z konformacji stwierdzonej w stanie krystalicznym. Otrzymano wynik bardzo bliski konformacji właśnie stanu krystalicznego. Bardzo możliwe, że komputer znalazł jedynie lokalne minimum w pobliżu konformacji stanu krystalicznego, w całym zbiorze możliwych struktur. Należałoby raczej zacząć obliczenia od wybitnie niekorzystnej konformacji, by wymusić rozważanie przez komputer wszystkich struktur.



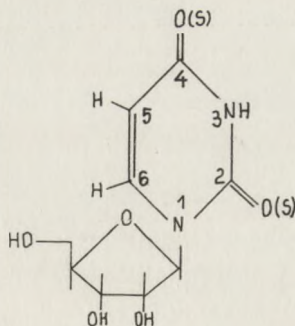
Józef Bujarski

WPŁYW SUBTELNEJ MODYFIKACJI ZASADY NA KONFORMACJĘ NUKLEOZYDU

STRESZCZENIE

W referacie przedstawiono wyniki badań własnych dotyczące konformacji tiourydyn w roztworze. Stwierdzono ogólnie, że wszystkie badane tutaj tiourydy nie wykazują znacznych różnic konformacyjnych w porównaniu z niepodstawioną urydyną. Bardzo małe, aczkolwiek zauważalne różnice zaobserwowano w przypadku, gdy atom siarki znajdował się w położeniu 2 (2-tiouraz 2,4 dwutiourydyna).

Celem referatu jest przedyskutowanie wpływu strukturalnej zmiany zasady na konformację nukleozydów w roztworze. Problem ten omówimy na przykładzie tiourydyn:



Urydyna i tiourydyny

Podstawienie atomu tlenu karbonylowego urydyny w położeniu 2 lub 4, albo jednocześnie 2 i 4 przez atomy siarki jest swego rodzaju "subtelną" modyfikacją reszty uracylowej. Taka modyfikacja może wpływać na konformację cząsteczki w roztworze. Wpływ zamiany tlenu na siarkę może być spowodowany zasadniczo dwoma czynnikami:

1) czynnik geometryczny - promień atomowy $O = 0,66 \text{ \AA}$, $S = 1,04 \text{ \AA}$

2) czynnik elektronowy - elektroujemność $O = 3,5$; $S = 2,5$

Omawiając konformację nukleozydów należy, jak wiadomo, uwzględnić główne trzy momenty:

1. sposób połażenia pierścienia rybofuranozowego,
2. wzajemne ułożenie cukru i zasady wokół wiązania glikozydowego - czyli tzw. konformacja syn - anti,
3. konformacja egzocyklicznej grupy $5'CH_2OH$.

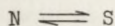
Do określenia tych czynników zastosowano metodę PMR. Badania tego typu prowadzi się zwykle w roztworze wodnym. Jednak, ze względu na niewystarczającą rozpuszczalność wszystkich badanych związków w wodzie lub w metanolu - zastosowano inne rozpuszczalniki: DMSO- d_6 i pirydynę- d_5 (w przypadku 2,4 - dwutiourydyny również CD_3OD). Pirydyna nie jest dogodnym rozpuszczalnikiem, zwłaszcza do badań temperaturowych, ze względu na jej aromaticzność. Prąd pierścieniowy pirydyny indukowany przez zewnętrzne pole magnetyczne wpływa różnie na przesunięcia chemiczne protonów substancji badanej w zależności od temperatury. Wpływ ten można jednak oddzielić od przesunięć chemicznych wynikających ze zmiany konformacji. Z drugiej strony pirydyna umożliwia prowadzenie badań w niskich temperaturach

I. OPIS STOSOWANEJ METODY EKSPERYMENTALNEJ

Widma wykonano na aparacie Jeol - 100 MHz; rozpuszczalniki (pirydyna- d_5 , DMSO- d_6 i CD_3OD) używano bez dodatkowych oczyszczających (odczynnik ampużkowane). Temperaturę skalowano na podstawie przesunięć chemicznych metanolu.

II. OKREŚLENIE KONFORMACJI PIERŚCIENIA RYBOZY

Cząsteczkę nukleozydu w roztworze cechuje stosunkowo duża swoboda konformacyjna. Altona i Sundaralingam [1] opisują konformację reszty cukrowej w β - nukleozydach za pomocą równowagi między dwoma typami konformerów: typ N i typ S



Koncepcja pseudorotacji przewiduje kilka możliwych połażeń pierścienia w obrębie obu typów konformerów. Reprezentatywnym przykładem konformacji typu N jest konformacja $C3'$ - endo, a typu S - C_2' - endo. Położenie równowagi $N \rightleftharpoons S$ można określić z dokładnością do 5% [1] na podstawie wielkości stałej sprzężenia między protonem $H1'$ i $H2'$ ($J_{1,2}$). Tabela 1 przedstawia stałe sprzężenia $J_{1,2}$, oraz odpowiadające jej położenie równowagi $N \rightleftharpoons S$

T a b e l a 1

Rozpuszcz.	T/°C	Urydyna				4-tiourydyna				2-tiourydyna				2,4-tiourydyna			
		-30	+24	+90	120	-30	+24	+90	+120	-30	+24	+90	+120	-30	+24	+90	+120
DMSO	J _{1'2'}		4,5		5,0		4,0		4,5		3,5		3,5		2,5		2,5
	%N		55		50		60		55		65		65		75		75
Piry- dyna	J _{1'2'}	1,0	3,5	4,0		1,0	3,0	3,5		0,0	1,5	2,5		0,0	1,5	2,0	
	%N	90	65	60		90	70	65		100	85	75		100	85	80	

Nasuują się tutaj następujące wnioski:

1. podstawienie atomu siarki w pozycję 2 powoduje przesunięcie równowagi pofałdowania w kierunku formy N (C3' - endo): ilość konformerów C3'-endo wzrasta w temperaturze pokojowej w przybliżeniu o 20%;

2. równowaga $N \rightleftharpoons S$ zależy od rozpuszczalnika - pirydyna preferuje konformację typu N bardziej niż DMSO. Może tu odgrywać rolę większa zdolność DMSO do solwatacji ($\mu = 3,9$ D) grup hydroksylowych pierścienia rybozy niż pirydyny ($\mu = 2,3$ D);

3. znaczna przewaga konformacji typu N występuje nawet w temperaturach +90° (pirydyna) i +120° (DMSO) szczególnie w tiourydynach posiadających atom siarki w położeniu 2;

4. równowaga przesunęła się prawie całkowicie w kierunku C3'-endo (100% N) już przy -30°. Również w metanolu w tej temperaturze dla 2,4 dwutiourydyny obserwowano to samo zjawisko. Zmiany J_{1'2'} z temperaturą silnie potwierdzają koncepcję dynamicznej równowagi konformacyjnej pierścienia rybofuranozy - im niższa temperatura, tym większa przewaga formy energetycznie korzystniejszej.

III. KONFORMACJA WOKÓŁ EGZOCYKLICZNEGO WIĄZANIA C4' - C5'

Jak wiadomo, obrót grupy (5') - CH₂OH nie jest w pełni swobodny. Możliwe są trzy najkorzystniejsze energetycznie "rotamery": gauche-gauche (gg), gauche - trans (gt) i trans-gauche (tg). Ze stałych sprzężenia między protonem H4' i obydwooma protonami H5' i H5'' (J_{4',5'} i J_{4',5''}) (stanowiących układ typu ABX) można wyliczyć względne obsadzenie tych izomerów rotacyjnych w roztworze. Ponieważ trudno było tutaj przypisać odpowiednie pasma protonom H5' i H5'' - skorzystano z metody Wooda i współpracowni-

ków [3], która pozwala wyliczyć procentowy udział rotameru gg (i sumę tg + gt) z dokładnością do 5% w oparciu o wzór

$$P_{gg} \approx [12 - (J_{4,5'} + J_{4,5''})] : 8$$

W tabeli 2 przedstawiono wartości $J_{4,5'}$ i $J_{4,5''}$ (odczytane z widma) oraz wyliczone udziały rotameru gg(%). Niestety zbyt niska rozdzielczość aparatu PMR nie pozwoliła na odczytanie odpowiednich stałych sprzężenia w niskich temperaturach. Niemniej jednak analiza tabeli 2 prowadzi do następujących wniosków:

1. podstawienie siarki w pozycję 2 lub 4 znacznie zwiększa udział rotameru gg (o 15 do 20%) w stosunku do urydyny;

2. wzrost temperatury obniża udział rotameru gg; w pirydynie konformacja gg jest bardziej uprzywilejowana niż w DMSO;

3. zgodnie ze stwierdzeniem Hruski i Daltona [4] istnieje związek między pofałdowaniem pierścienia rybozy i równowagą konformacyjną egzocyklicznej grupy $5'-CH_2OH$ - taki, że wzrost udziału formy N pociąga za sobą wzrost udziału rotameru gg. Jeżeli uzależnić procent gg od procentu N - wyraźnie widać proporcjonalną zależność obu wielkości. Nachylenie krzywej $\% gg = f(\% N)$ jest miarą wzajemnego powiązania obu wielkości. Trudno tutaj wyciągać jakieś ilościowe wnioski ze względu na zbyt małą ilość odpowiednich stałych sprzężenia w różnych temperaturach. Ogólnie jednak można powiedzieć, że podstawienie atomu siarki w miejsce tlenu zmienia wyżej omawianą zależność. Np. w przypadku 2-tiourydyny musi być większa przewaga konformeru N', ażeby uzyskać określoną zawartość rotameru gg niż w urydynie.

T a b e l a 2

	Urydyna			4-tiouradyna			2-tiourydyna			2,4-dwutiourydyna		
	DMSO	pirydyna		DMSO	pirydyna		DMSO	pirydyna		DMSO	pirydyna	
°C	120	24	90	120	24	90	120	24	90	120	24	90
$J_{4,5'}$	3,0	3,0	3,0	3,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	-	2,5	2,5
$J_{4,5''}$	4,0	3,0	3,0	2,5	2,5	3,0	3,0	2,0	3,0	-	1,5	2,5
% gg	62	75	75	75	88	81	81	94	81	-	100	88
% N	50	65	60	55	70	65	65	85	75	75	85	80

IV. OKREŚLENIE WZAJEMNEGO UŁOŻENIA CUKRU I ZASADY (KONFORMACJA SYN-ANTI)

Zasada w stosunku do cukru może się ułożyć na dwa sposoby: syn i anti. W roztworze istnieje równowaga między obu konformerami - zwykle przesunięta wyraźnie w kierunku jednej z form. Aby określić, która z konformacji przeważa w przypadku badanych tutaj nukleozydów, wykorzystano następujące dane PMR:

1. wiadomo, że w roztworze wodnym i w DMSO urydyna występuje w konformacji anti (grupa 2CO znajduje się poza pierścieniem cukrowym). Badanie przesunięć chemicznych protonów rybozy w nukleozydach, w których grupa karbonylowa $2C = O$ znajduje się nad pierścieniem cukru (np. w orotydydzie) wykazało, że protony $H2'$ i $H3'$ są przesunięte w kierunku niższych pól o około 0,5 ppm, a $H1'$ i $H4'$ - w kierunku pól wyższych o około 0,2 ppm [5]. Podobnie działa grupa $2C = S$ [8].

W tabeli 3 przedstawiono przesunięcia chemiczne poszczególnych protonów czterech badanych związków w DMSO i pirydynie w temperaturze 24°C.

T a b e l a 3

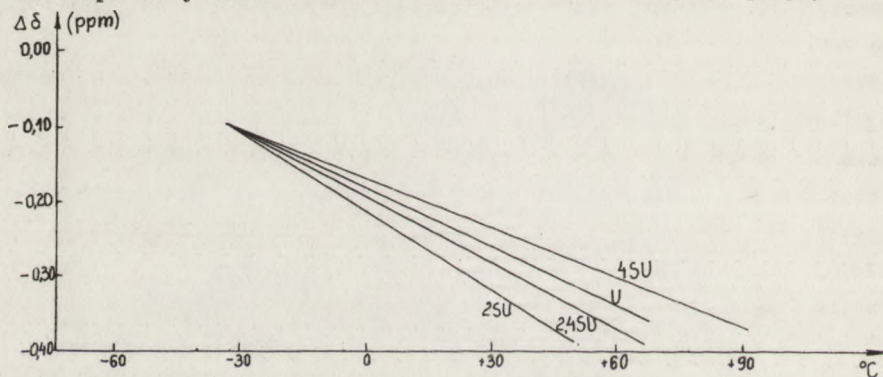
H	Urydyna		4-tiourydyna		2-tiourydyna		2,4-dwutiourydyna	
	Pirydyna	DMSO	Pirydyna	DMSO	Pirydyna	DMSO	Pirydyna	DMSO
6	8,55	7,98	8,57	7,94	8,91	8,20	8,85	8,16
5	5,72	5,63	6,52	6,31	6,05	5,99	6,79	6,60
1'	6,67	5,79	6,61	5,74	7,37	6,55	7,16	6,39
2'	4,79	3,98	4,81	3,95	4,88	4,11	4,87	4,08
3'	4,79	3,98	4,81	3,95	4,88	4,11	4,87	4,08
4'	4,57	3,88	4,64	3,90	4,68	3,67	4,73	3,78
5'	4,26	3,60	4,33	3,70	4,38	3,67	4,41	3,69
5''	4,09	3,60	4,16	3,70	4,21	3,67	4,24	3,69

Porównując przesunięcia chemiczne protonów $H2'$, $H3'$ i $H4'$ nie stwierdzamy w żadnym z rozpatrywanych przypadków typowego odszaniiania o wielkości 0,5 ppm, co sugeruje silnie konformację anti. Obserwuje się natomiast charakterystyczne odszaniianie protonu $H1'$ o około 0,5 ppm w 2-tio i w 2,4-dwutiourydydzie, wynikające z zamiany tlenu na siarkę [6]. Podobny wpływ odszaniiający wykazuje grupa $4C = S$ na proton $H5$ (w 4-tio- i w 2,4-dwutiourydydzie).

2. Smith i Blackburn [7] obserwując wpływ temperatury na zmianę przesunięcia chemicznego protonu $H6$ w urydydzie sugerowali odszaniiające działa-

nie grupy 5'OH na ten proton. Działanie takie jest możliwe jedynie wtedy, gdy proton H6 i grupa 5'OH znajdują się blisko siebie, czyli gdy nukleozyd występuje w konformacji anti. Wzrost temperatury powoduje zmniejszenie udziału formy anti - przejawia się to w likwidacji efektu odsłaniającego.

Na rysunku przedstawiono zależność przesunięcia chemicznego protonu H6 od temperatury dla czterech nukleozydów rozpuszczonych w pirydynie.



Zależność δ H6 od temperatury w tiourydynach i w urydynie

Obserwuje się dla wszystkich związków przesuwanie protonu H6 w kierunku wyższych pól, gdy temperatura wzrasta. Podobne efekty uzyskano w DMSO. Potwierdza to konformację anti wszystkich trzech badanych tiourydyn w obu rozpuszczalnikach.

Śledzenie zmian przesunięcia chemicznego protonu H6, w rozpuszczalnikach takich jak metanol, umożliwi zgodnie z sugestią Lavallo [9] określenie bariery entalpii swobodnej i entropii w nukleozydach. Tego typu badania przeprowadzono tutaj dla 2,4-dwutiourydyny w zakresie temperatur od -80 do +50 °C. Jednak zbyt mała liczba obserwacji temperaturowych nie pozwala na ekstrapolację, a w związku z tym na wyciągnięcie ilościowych wniosków.

V. OCENA BŁĘDÓW STOSOWANEJ METODY

Przesunięcia chemiczne mierzono z dokładnością do 0,02 ppm. W związku z tym wnioski dotyczące konformacji syn/anti są poprawne. Natomiast pomiar stałych sprzężenia $J_{1'2'}$, $J_{4'5'}$ i $J_{4'5''}$ przeprowadzono z dokładnością 0,5 Hz. Wprowadza to 5% przedział niepewności w wartościach % N i % gg. Zważywszy dodatkowo błąd 5% wynikający z przyjętych założeń stosowanych tutaj metod - podane w tabelach 1 i 2 wartości obarczone są błędem dochodzącym do 10%. Dlatego też wnioski, jakie z tych badań można wyciągnąć, będą raczej natury jakościowej. Zastosowanie techniki komputerowej symulacji widm PMR prawdopodobnie wydatnie poprawi dokładność wyników.

VI. PODSUMOWANIE

1. Subtelna modyfikacja reszty uracylowej, jaką stanowi podstawienie siarki w miejsce tlenu, nie wpływa na zmianę uprzywilejowanej dla urydyny konformacji anti.

2. Wpływ siarki na pofałdowanie pierścienia rybofuranozowego i na równowagę rotamerową egzocyklicznej grupy 5'-CH₂OH zaznacza się wyraźnie jedynie wtedy, gdy atom siarki znajduje się w pozycji 2 (zwiększenie udziału formy N i rotameru gg o około 20%). Wpływ ten zaznacza się o wiele silniej w pirydynie niż w DMSO.

3. Ogólna konformacja 4-tiourydyny jest bardzo zbliżona do konformacji urydyny.

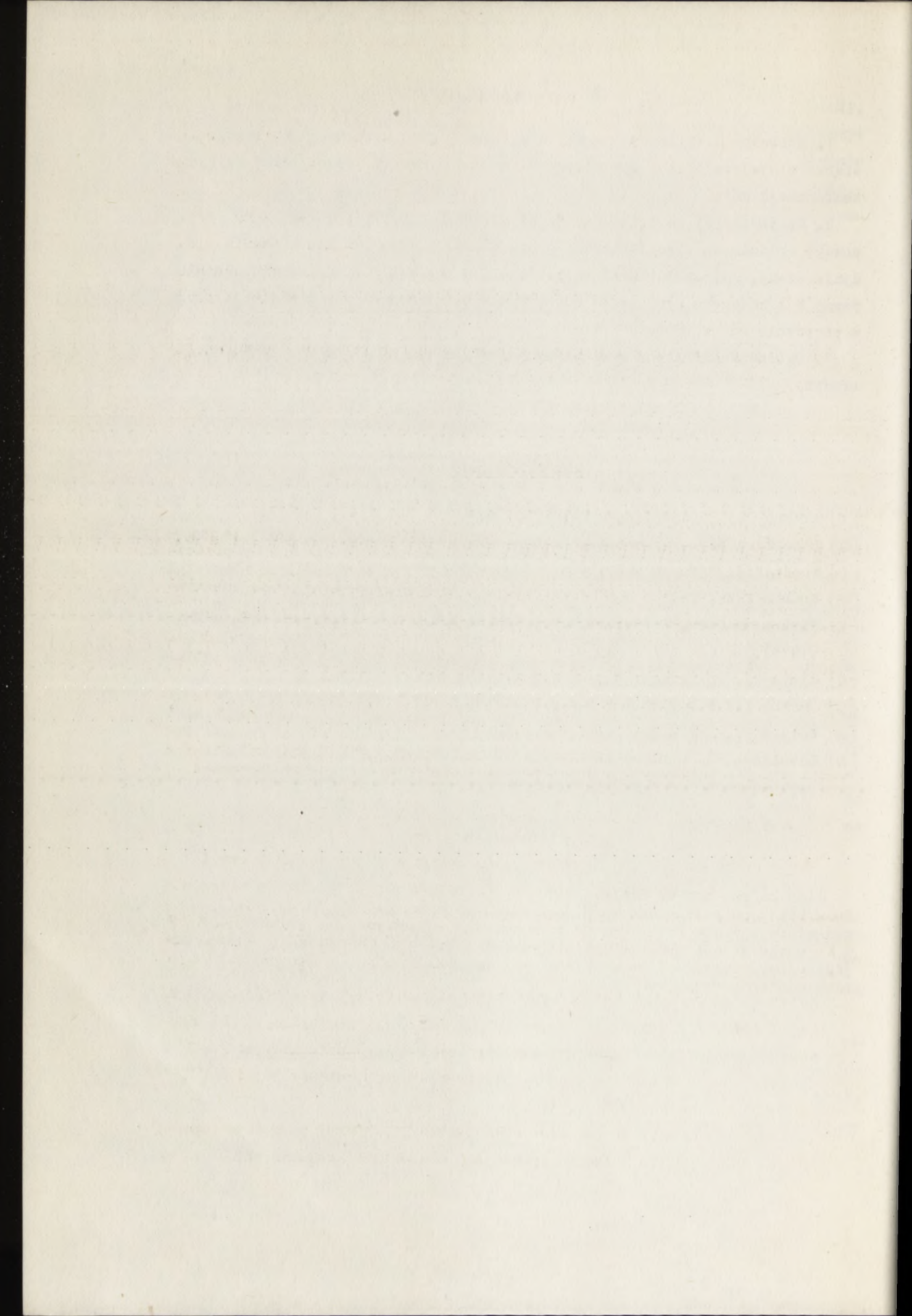
LITERATURA

- [1] Altona C., Sundaralingam M.; J.Am.Chem.Soc. 95, 2333, (1973).
- [2] Blackburn B.J., Grey A.A., Smith I.C.P.; Can.J.Chem. 48, 2867, (1970).
- [3] Wood D.J., Hruska F.E.; Can.J.Chem. 51, 2571, (1973).
- [4] Hruska F.E., Dalton J.G.; J.Am.Chem.Soc. 93, 4334, (1971).
- [5] Witkowski J.T., Schweizer M.P., Robins R.K.; J.Am.Chem.Soc. 95, 3770, (1973).
- [6] Cleve C., Vorbrüggen H.; Chem.Ber. 106, 3062, (1973).
- [7] Smith, I.C.P., Blackburn B.J.; Can.J.Chem. 47, 513, (1969).
- [8] Walter W., Rue K.P.; Liebigs Ann.Chem 743, 167, (1971).
- [9] Lavalley D.K., Coulter Ch.L.; J.Am.Chem.Soc. 95, 576, (1973).

DYSKUSJA

Głos zabrał mgr M. Remin.

Podkreślił on stosunkowo małą dokładność odczytu stałych sprzężenia bezpośrednio z widma PMR. Rzutuje to w znaczny sposób na błąd obliczenia % N i % gauche-gauche tak, że wyniki przedstawione w referacie mają charakter jakościowy. Sugerował on możliwość zastosowania metod symulacyjnych w celu udokładnienia wyników.



Danuta Rasafa, Ewa Biała

ZASTOSOWANIE MAGNETYCZNEGO REZONANSU JĄDROWEGO DO BADANIA KONFORMACJI 2', 3' i 3', 5'- CYKLICZNYCH NUKLEOTYDÓW

STRESZCZENIE

Analiza danych PMR dla 3', 5'-cyklicznych nukleotydów wskazuje, że pierścień cukrowy i fosforanowy są usztywnione w jednej konformacji, w przeciwieństwie do 2'3'-cyklicznych nukleotydów, w których stwierdzono równowagę konformacyjną. Obecność pierścienia fosforanowego w pewnym sensie usztywnia konformację pierścienia rybozy. Udział poszczególnych konformerów w równowadze konformacyjnej 2', 3'-cyklicznych nukleotydów jest różny dla nukleotydów purynowych i pirymidynowych. W serii 2', 3'-cyklicznych nukleotydów pirymidynowych przedyskutowano konformację zasady względem pierścienia rybozy oraz konformacje egzocyklicznych grup CH_2OH .

Informacje uzyskane z przesunięć chemicznych i stałych sprzężeń otrzymanych na drodze ^{13}C NMR są mniej pewne od uzyskanych na drodze PMR. W serii 3', 5'-cyklicznych nukleotydów otrzymane dane konformacyjne na drodze NMR pokrywają się z danymi uzyskanymi z badań rentgenograficznych, natomiast w serii 2', 3'-cyklicznych nukleotydów nie obserwuje się takiej zgodności.

WSTĘP

Wiele uwagi poświęcono badaniom konformacyjnym techniką NMR w serii 2', 3'-i 3', 5'-cyklicznych nukleotydów. Wcześniejsze badania w oparciu o niepełną analizę widm PMR przy 60 i 100 MHz [1, 2, 3] określały konformację rybozy dla 3', 5'-cyklicznych nukleotydów jako C(3')-endo-C(4')-egzo, nie dawały jednoznacznych informacji dotyczących konformacji pierścienia fosforanowego. Sugerowano, że pierścień fosforanowy występuje w skróconej konformacji łódkowej. Dzięki zastosowaniu PMR 220 MHz, "decouplingu" i komputerowej analizy widm można uzyskać pewniejsze dane konformacyjne [4-7], które pozostają w zgodzie z danymi analizy rentgenostrukturalnej dla 3', 5'-cyklicznych nukleotydów [8, 9, 10].

Fakt, że pewne dwuacylowe pochodne cyklicznego 3', 5'-AMP są bardzo ważne, z biologicznego punktu widzenia, spowodował konieczność dokładnych badań w

tej dziedzinie. Przede wszystkim należało zweryfikować proponowaną konformację, przez całkowitą analizę spektralną, co z kolei doprowadziło do przedstawienia bardzo szczegółowego modelu konformacyjnego.

Badania w serii cyklicznych nukleotydów dotyczą następujących problemów:

- a) konformacji pierścienia fosforanowego,
- b) konformacji pierścienia rybozy,
- c) wpływu obecności pierścienia fosforanowego na konformację pierścienia rybozy,
- d) konformacji egzocyklicznych grup CH_2OH
- e) konformacji zasady względem pierścienia cukrowego, które są rozwiązywane na drodze oddzielnych badań dla 2', 3'-i 3', 5'-cyklicznych nukleotydów ze względu na różnice w ich budowie.

1. BADANIA KONFORMACYJNE W SERII 3', 5' CYKLICZNYCH NUKLEOTYDÓW

Budowa 3', 5'AMP została wyjaśniona w fazie stałej na drodze badań rentgenostrukturalnych [10] w prostych kryształach. Wykazano, że w komórce elementarnej znajdują się dwie cząsteczki, z których jedna posiada zasadę w konformacji anti, a druga w syn względem pierścienia cukrowego. Obie cząsteczki mają pierścień fosforanowy w konformacji krzeselkowej, również konformacja pierścienia cukrowego jest identyczna w obu cząsteczkach. Węgiel C4' znajduje się w odległości około 0,6 Å od 4-atomowej płaszczyzny pierścienia, co w tym przypadku odpowiada konformacji pierścienia C(3')-endo C(4')-egzo, w takiej konformacji grupa fosforanowa jest trans względem C2' i gauche względem C4'.

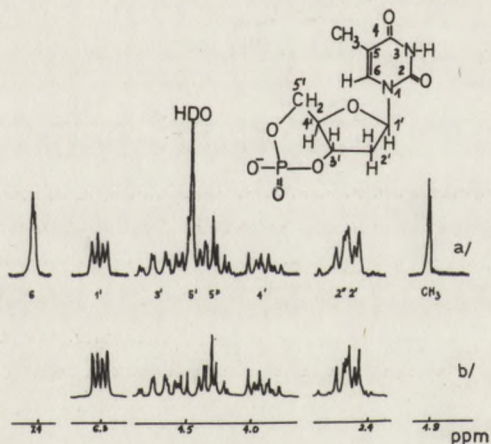
W 3', 5'-UMP też są dwie cząsteczki w komórce elementarnej; w obu zasadach jest w konformacji anti względem cukru, konformacja rybozy po wielu dyskusjach została określona jako C4'-endo.

Modele cząsteczkowe 3', 5'-cyklicznych nukleotydów wskazują, że pierścień rybozy jest mało podatny na zmiany konformacyjne. Dowód, że w tej grupie cukier jest usztywniony, uzyskano metodą PMR i ^{13}C NMR. Bardzo szczegółowe badania zostały przeprowadzone dla cyklicznego 3', 5'-AMP i jego dwubutyrylowej pochodnej oraz 3', 5'-TMP [4,5]. Wykazano, że wicynalne stałe sprzężenia między protonami i stałe sprzężenia $J_{\text{P}(31)\text{-H}(1)}$ można stosować do potwierdzenia konformacji w tej klasie związków. Przyjmując J_{t} i J_{g} odpowiednio 10,1 i 2,2 Hz dla $J_{\text{H-H}}$ [11, 12] i 21 oraz 2 Hz dla $J_{\text{P-H}}$ [13, 14], można znaleźć stałe, które potwierdzają konformacje otrzymane z modelu cząsteczkowego i są w przybliżeniu zgodne z danymi doświadczalnymi. Rozbieżności są rzędu 1 Hz, co jest prawdopodobnie związane z tym, że kąty i długości wiązań w tych cząsteczkach różnią się od odczytanych z modelu cząsteczkowego dla węgla sp^3 , a obecność podstawnika może również zmieniać poszczególne stałe sprzężenia.

Bliżej zajęto się omówieniem widm 3', 5'-AMP, jego dwubutyrylowej pochodnej oraz 3', 5'-TMP.

W przypadku pochodnych 3', 5' AMP [4] widma otrzymane na aparatach przy 100 i 220 MHz są zbyt skomplikowane, aby dokonać analizy bez pewnych oszacowań dla stałych sprzężeń J_{H-H} i J_{P-H} .

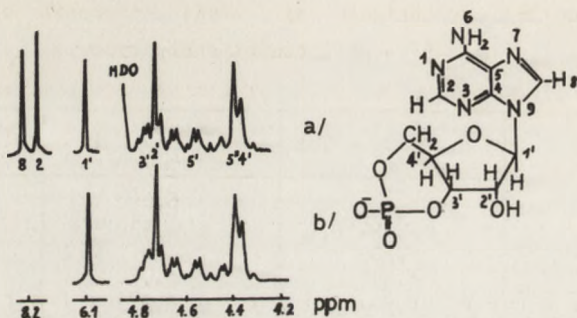
W przypadku 3', 5'-TMP [4] analiza jest mniej złożona, ponieważ sygnał protonu w pozycji H2' jest przesunięty w kierunku sygnału protonów grupy CH₃. Widmo PMR dla 3', 5'-TMP przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Widmo 100 MHz PMR 3', 5'-TMP (0,2 M w D₂O, pD = 7,2, t = 50°C) względem DSS, a) obserwowane; b) obliczone

W widmie tym sygnał protonu 2'-CH₂ jest przy ok. 2,5 ppm, protony grupy 5-CH₃ są przy 1,9 ppm, H1' jest przy 6,3 ppm, proton H6 zasady przy 7,4 ppm, natomiast sygnały między 3,8 i 4,8 ppm pochodzą od protonów H3', H4', H5' i H5''. Określenie przesunięć chemicznych poszczególnych protonów stało się możliwe dzięki porównaniu otrzymanych widm z widmami dezoksyurydyny, dezoksyadenozyny i tymidyny oraz dzięki rozprzężeniu spinów $^1H-^1H$ i $^{31}P-^1H$.

Określenia stałych sprzężenia $^3J_{P-H}$ uzyskano na drodze badania modelu cząsteczkowego oraz znajomości faktu, że trans i gauche $^3J_{P-H}$ są odpowiednio równe 19-24 i 3Hz. W oparciu o analizę układów spinowych H2' H2'' H3' H1' i H5', H5'' H4' H3' oraz dodatnią wartość stałej sprzężenia dalekiego zasięgu $^3J_{H1', -H3'}$, nie można otrzymać wyliczonego widma dla ośmiospinowego układu, które pokrywałoby się z widmem doświadczalnym. Zastosowanie analizy komputerowej Laocnplta [15] dla 8-spinowego układu pozwala taki układ rozwiązać. Dokładność dla wszystkich parametrów jest rzędu $\pm 0,05$ Hz. Chemiczne przesunięcia dla protonu i stałe sprzężenia podano w tablicy I. Na rysunku 2 pokazano widmo 3', 5'-AMP.



Rys. 2. Widmo 220 MHz PMR 3', 5'-AMP (0,2 M w D₂O, pD = 7,2, t = 23°C) względem DSS, a) obserwowane; b) obliczone

Analiza I rzędu 100 i 220 MHz widm PMR tych związków wykonanych w temperaturze 30°C nie była możliwa ze względu na małą czytelność stałych sprzężenia spowodowaną poszerzeniem sygnałów. Na podstawie faktu, że stała sprzężenia $J_{H1' - H2'}$ jest mała, określono przesunięcie chemiczne protonu H2' (przewidywana stała sprzężenia jest rzędu 0,4 Hz). Należy podkreślić, że dla 3', 5'-AMP sygnał protonu H2' jest w rejonie wyższych pól niż protonu H3', przeciwnie do nisko położonego sygnału 3' - niecyklicznych nukleotydach. Zastosowanie wyżej cytowanej analizy komputerowej do widm 100 i 220 MHz dało widmo podobne do obserwowanych. Końcowe najlepsze parametry podano w tabelicy I. Otrzymane wartości nie są tak dokładne jak w przypadku 3', 5'-TMP, bowiem precyzja oznaczeń jest rzędu + 0,1 Hz ze względu na dużą złożoność widm oraz znaczną szerokość linii nawet w 50°C, a także z powodu małych wartości stałych sprzężenia P z H1', H2' i H4'.

"Decoupling" P powoduje obniżenie szerokości sygnałów dla H1' i H2' do tego stopnia, że można zauważyć małą stałą sprzężenia P-H. Jak twierdzą autorzy opisana analiza jest dla 3', 5'-AMP analizą kompletną.

1. 1. K o n f o r m a c j a p i e r ś c i e n i a f o s f o r a n o w e g o

W tabelicy I podano stałe sprzężenia P - H dla $J_{H5' - P}$, $J_{H5'' - P}$, i $J_{H3' - P}$. Wartości $J_{H5' - P}$ są zgodne z oczekiwanymi dla sprzężeń transwicylnalnych, podczas gdy wartości $J_{H5'' - P}$ i $J_{H3' - P}$ są zgodne z wartościami dla sprzężeń gauche - wicylnalnych. Badania cząsteczkowego modelu 3'-5' cyklicznych nukleotydów wskazują na to, że takie wartości stałych sprzężeń można otrzymać dla pierścienia fosforanowego istniejącego w konformacji krzeselkowej

Chemiczne przesunięcia a) i stałe sprzężenia b) dla
3', 5' - cyklicznych nukleotydów

	3', 5' - TMP	3', 5' - AMP	Dwubutyrylo 3', 5' - AMP
1'	6,301	6,090	6,393
2'	2,497	4,712	5,780
2''	2,589		
3'	4,697	4,752	5,281
4'	3,907	4,373	4,380
5'	4,446	4,600	4,626
5''	4,291	4,392	4,469
2		8,141	8,499
6	7,436		
8		8,206	8,700
CH ₃	1,903		
J _{H-H}			
1'2'	2,4	0,8	0,6
1'2''	8,9		
1'3'	- 0,3	c	c
2'2''	-13,3		
2'3'	8,0	5,2	5,5
2''3'	10,8		
3'4'	9,2	8,9	9,7
4'5'	4,7	4,8	4,6
4'5''	10,6	10,7	10,3
5'5''	- 9,5	- 9,7	- 9,8
6 CH ₃	1,2		
J _{H-P}			
1'P	0,5	c	c
2'P	0,5	c	c
2''P	0,5	c	c
3'P	1,7	2,0	2,4
4'P	< 0,1	c	c
5'P	20,4	21,4	20,8
5''P	2,2	1,7	1,0

Objaśnienia: a) chemiczne przesunięcia podano w ppm względem DSS
b) stałe sprzężenia w Hz
c) niemierzalne.

lub łódkowej skręconej. Pierścień fosforanowy może się znajdować w jednej konformacji lub ulegać szybko przemianie między dwoma konformerami, o czym winny wnosić stałe $J_{H5' - P}$ i $J_{H5'' - P}$, natomiast $J_{H3' - P}$ nie powinna ulegać zmianom. Gdyby pierścień fosforanowy występował w konformacji łódkowej skręconej, musiałyby wystąpić również w normalnej konformacji łódkowej, a co za tym idzie kąty $P-O-C(5')$ - $H5'$ i $P-O-C(5'')$ - $H5''$ mogłyby się zmieniać odpowiednio do 120° do 180° i od 120° do 60° . Stąd obserwowane

czasowo uśrednione wartości dla $J_{H5'-P}$ i $J_{H5''-P}$ winny być mniejsze lub większe niż wartości związane z ${}^3J_{J_t}$ i 3J_g . Fakt, że obserwowana stała sprzężenia jest zgodna z 3J_t i 3J_g pozwala wnioskować, że pierścień fosforanowy znajduje się w konformacji krzeselkowej i nie wykazuje tendencji do istnienia w konformacji łódkowej. White i Verkade [4] otrzymali zależność wicynalnych stałych sprzężeń POCH od kąta dwuściennego dla cyklicznych fosforanów i związków podobnych. Podstawiając do równania Karplusa średnie wartości dla 3J_t i 3J_g , dla omawianych poprzednio 3', 5'-cyklicznych nukleotydów odpowiednio 20,9 Hz i 1,8 Hz i zaniedbując trzecią stałą, otrzymano zależność:

$${}^3J_{H-P} = 16,3 \cos^2 \psi - 4,6 \cos \psi,$$

która winna być stosowana ostrożnie i tylko do badań półilościowych oraz do układów acyklicznych posiadających wicynalne stałe sprzężenia J_{H-P} .

1. 2. K o n f o r m a c j a p i e r ś c i e n i a c u k r o w e g o

Badania cząsteczkowego modelu 3', 5'-cyklicznych nukleotydów wskazują, że pierścień furanozy jest usztywniony na skutek obecności pierścienia fosforanowego. W przypadku gdy pierścień fosforanowy jest w konformacji krzeselkowej liczba możliwych konformacji pierścienia cukrowego jest ograniczona. Dane podano w tabelicy II, cytowane kąty dwuścienne zostały zmierzane dla modelu cząsteczkowego. Stałe sprzężenia ${}^3J_{H-H}$ odpowiadające dokładnej konformacji obliczono z równania:

$$J_{i,j} = J_o \cos^2 \phi - B$$

gdzie: $J_o = 9,27 \text{ Hz}$ ($0^\circ < \phi < 90^\circ$)

$J_p = 10,36 \text{ Hz}$ ($90^\circ < \phi < 180^\circ$);

$B = 0,28 \text{ Hz}$

Porównując stałe sprzężenia ${}^3J_{H-H}$ w tabelicy I i obliczone w tabelicy II należy stwierdzić, że pierścień furanozowy 3', 5'-AMP i jego dwubutyrylowej pochodnej występuje w konformacji opisanej najlepiej jako C3' - endo - C4'-egzo, podczas gdy 3', 5' TMP jako C4'-egzo. Należy podkreślić, że w tym ostatnim przypadku obserwowane $J_{H2'-H3'}$ i $J_{H2''-H3'}$ są większe, niż oczekiwane dla tych konformacji, co jednak nie jest sprzeczne z przyjętym modelem. Zastosowanie bowiem powyższego równania dla dezoksyrybozy jest możliwe przy niewielkiej modyfikacji stałych J_o i B.

Zależność między konformacją pierścienia rybozy a konformacją pierścienia fosforanowego winna być też potwierdzona przez stałe sprzężenia $J_{H4'-H5'}$ i $J_{H4'-H5''}$. Fakt, że stała $J_{H4'-H5''}$ jest zgodna ze stałą oczekiwaną dla sprzężeń trans i jednocześnie, że stała $J_{H4'-H5'}$ (4,6 - 4,8 Hz) jest większa niż oczekiwana z równania cytowanego dla konformacji gauche (2,0 Hz), nie jest sprzeczny z wyżej wspomnianą zależnością konformacyjną. Otrzymane z pomiarów PMR wnioski są zgodne z danymi krystalograficznymi dla fazy stałej. Trudno jest określać metodą PMR konformację syn - anti w 3', 5'-cyklicznych nukleotydach. Metodą PMR badano również inne 3', 5' cykliczne nukleotydy takie jak: 3', 5'-CMP, 3', 5'-UMP, 3', 5'-GMP, ale w tych przypadkach, ze względu na niewystarczającą czytelność widm, analiza konformacyjna okazała się niemożliwa.

T a b l i c a II

Kąty dwuścienne dla różnych możliwych konformacji rybozy oraz oczekiwane stałe sprzężenia J_{H-H} dla 3', 5' cyklicznych nukleotydów

Konformacja	$[\circ] \phi$	J_{H-H} [Hz]
0 - endo		
1' 2'	150	7,5
1' 2''	30	6,7
2' 3'	0	9,0
2'' 3'	120	2,3
3' 4'	170	9,8
C(3')-endo		
1' 2'	100	0,0
1' 2''	20	7,9
2' 3'	40	5,2
2'' 3'	160	8,9
3' 4'	170	9,8
C(4')-egzo		
1' 2'	120	2,3
1' 2''	0	9,0
2' 3'	30	6,7
2'' 3'	150	7,5
3' 4'	170	9,8
C(3')-endo - C(4')-egzo		
1' 2'	110	0,9
1' 2''	10	8,7
2' 3'	35	5,9
2'' 3'	155	8,2
3' 4'	170	9,8
C(4')-egzo - 0-endo		
1' 2'	135	4,9
1' 2''	15	8,4
2' 3'	15	8,4
2'' 3'	135	4,9
3' 4'	170	9,8

1. 3. Dane ^{13}C NMR

Parametry uzyskane z danych ^{13}C NMR są zgodne z otrzymanymi z pomiarów PMR. Fakt, że w 3', 5'-cyklicznych nukleotydach pierścieni rybozy zachowuje swoją konformację stanowi doskonały model do określenia i badania zależności $^3J_{^{13}\text{C}-^{31}\text{P}}$ od kąta dwusciennego między płaszczyznami $^{31}\text{P}-\text{O}-\text{C}$ i $\text{O}-\text{C}-^{13}\text{C}$ [3]. Jest interesujące, że $^2J_{^{13}\text{C}-^{31}\text{P}}$ dla C3' i C5' są różne i tak 2J wynosi odpowiednio $4,2 \pm 0,5$ Hz i $7,2 \pm 0,2$ Hz i jest prawie stałe w badanej grupie nukleotydów: 3', 5'-UMP, 3'5'-CMP, 3', 5'-AMP, 3'5'-GMP, 3', 5'-GMP i ich pewnych pochodnych [3]. Te różne wartości wskazują na różne otoczenie atomów węgla C3' i C5', we wszystkich bowiem niecyklicznych 3' lub 5' nukleotydach wartości 2J są prawie równe i wynoszą około $5,0 \pm 0,6$ Hz [3]. Informacje otrzymane z danych ^{13}C NMR i stałych sprzężeń $J_{^{13}\text{C}}$ są mniej pewne i dlatego do potwierdzenia wniosków wyprowadzonych na tej drodze konieczna jest korelacja z danymi PMR. Jest to związane z faktem, że w technice ^{13}C NMR cytowane stałe sprzężenia zmieniają się w mniejszym przedziale wartości (0-10 Hz) niż $J_{\text{H-P}}$ w PMR (0, -22 Hz), a poza tym jest tu odpowiednio mniejsza podatność zależności wicynalnych stałych sprzężeń $J_{^{13}\text{C-P}}$ od kąta dwusciennego. Zaletą techniki ^{13}C NMR jest możliwość uzyskania sygnałów w szerszym zakresie przesunięć chemicznych.

T a b l i c a III

Dane ^{13}C NMR dla 3', 5'-cyklicznych nukleotydów (25,2-MHz
 ^{13}C NMR, sole sodowe w D_2O , 3'5' - UMP - sól barowa względem TMS

Węgiel	U	C	A	G	T
	Przesunięcia chemiczne				
1'	95,67	96,18	92,69	93,20	86,53
2'	73,03	73,37	73,47	73,27	35,71
3'	72,90	72,91	72,91	73,93	76,01
4'	78,16	78,28	78,48	78,30	77,48
5'	68,32	68,50	68,54	68,60	68,40
2	152,22	158,18	153,82	154,84	152,51
4	167,21	167,18	149,05	152,23	167,33
5	103,42	97,38	119,52	117,65	112,96
6	143,36	143,08	156,20	159,86	138,91
8			140,78	139,19	
Jądro	Stałe sprzężenia [Hz]				
C1'P	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
C2'P	8,0	7,8	7,8	7,8	8,3
C3'P	4,5	4,3	4,3	3,8	4,8
C4'P	4,5	4,5	4,5	4,8	4,5
C5'P	7,0	7,0	7,0	7,3	7,0

Tę zaletę widać szczególnie w przypadku 3', 5'-UMP, 3'5'-CMP i 3', 5'-GMP, gdzie uzyskuje się mało dokładne informacje techniką PMR. Z danych ^{13}C NMR na podstawie korelacji z przesunięciami chemicznymi 3'-5' cyklicznych nukleotydów, można wnioskować o konformacji związków dających słabo czytelne widma PMR, których widma PMR są czytelne, a ^{13}C NMR dostępne (tablica III). Ze wszystkich otrzymanych danych wynikają podobne konformacje dla 3'5'-AMP i jego pochodnej, co sugeruje, że ich różnic w aktywności biologicznej nie należy dopatrywać się w różnicach konformacyjnych.

2. BADANIA KONFORMACYJNE 2',3' - CYKLICZNYCH NUKLEOTYDÓW

Do niedawna dysponowano tylko danymi rentgenostrukturalnymi dla 2', 3' cyklicznych nukleotydów [8]. Dane te charakteryzowały kryształy nukleotydów, a więc tym samym nie odzwierciedlały sytuacji w roztworach wodnych. Ustalenia konformacji dla tychże nukleotydów [6, 7] dokonano przy pomocy PMR, ^{13}C NMR, przeprowadzając analizę spektralną metodami standardowymi i przy zastosowaniu programu komputerowego Laocnplt [5].

2', 3' - cykliczne nukleotydy były badane w postaci soli sodowych, barowych i pirymidynowych.

Uzyskane wartości stałych sprzężenia przesunięć chemicznych dla 2', 3' - cyklicznych nukleotydów metodą PMR, ^{13}C NMR zostały zebrane w tablicach IV i V.

Tablica IV

Dane PMR dla 2', 3' - cyklicznych nukleotydów

Proton	Z w i ą z e k				
	U(Ba)	C(Na)	A(Na)	G(Na)	G(Py)
a) przesunięcia chemiczne w ppm względem DSS					
1'	5.898	5.851	6.132	6.106	6.171
2'	5.139	5.136	5.303	5.404	5.419
3'	4.917	4.947	5.084	5.164	5.169
4'	4.297	4.312	4.445	4.451	4.496
5'	3.895	3.920	3.909	3.940	3.944
5''	3.815	3.846	3.855	3.884	3.900
2			7.973		
5	5.857	6.014			
6	7.699	7.671			
8			8.147	7.937	8.207
b) stałe sprzężenia w Hz					
Jądro					
1'2'	3.0	2.7	4.4	3.7	3.4
2'3'	6.9	6.7	6.8	6.8	6.8
3'4'	5.5	5.4	3.9	4.4	4.2
4'5'	3.6	3.6	2.5	3.6	2.5

1	2	3	4	5	6
4'5''	5.7	5.7	4.8	4.8	5.8
5'5''	-12.5	-12.4	-12.7	-12.6	-12.8
5'6	8.1	7.5			
2'P	6.9	6.5	10.6	8.9	9.1
3'P	11.5	12.1	7.6	9.5	9.3
(2'P+3'P)	18.4	18.6	18.2	18.4	18.4

T a b l i c a V

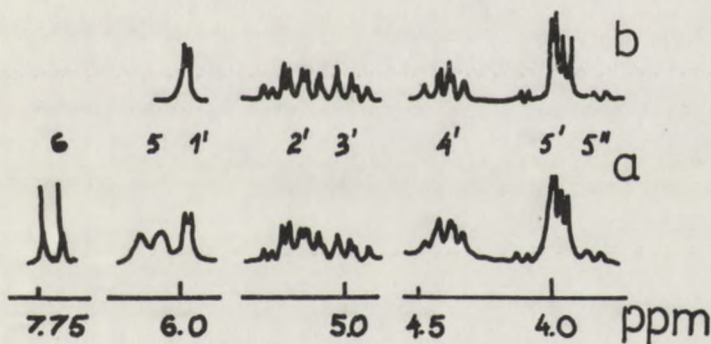
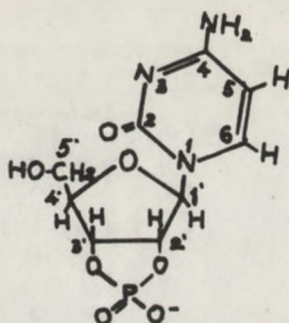
Dane ^{13}C NMR dla 2'3' - cyklicznych nukleotydów

Węgiel	C z ą s t e c z k a			
	U(Ba)	C(Na)	A(Na)	G(Na)
a) przesunięcie chemiczne w ppm względem TMS				
1'	93.74	94.97	90.60	90.24
2'	81.74	82.11	81.56	81.60
3'	78.26	78.54	78.78	78.73
4'	86.25	86.37	86.43	86.47
5'	62.12	62.32	62.40	62.32
2	152.42	158.23	153.70	154.85
4	167.41	167.77	149.24	152.15
5	103.46	97.30	119.83	117.49
6	144.79	144.91	156.40	159.70
8			141.69	139.35
Jądro	b) stałe sprzężenia w Hz			
1'P	6.8	6.3	3.8	4.8
2'P	2.5	2.5	1.8	2.3
3'P	0.7	0.5	1.0	1.0
4'P	2.5	2.2	4.3	3.5
5'P	0.2	0.2	0.2	0.2

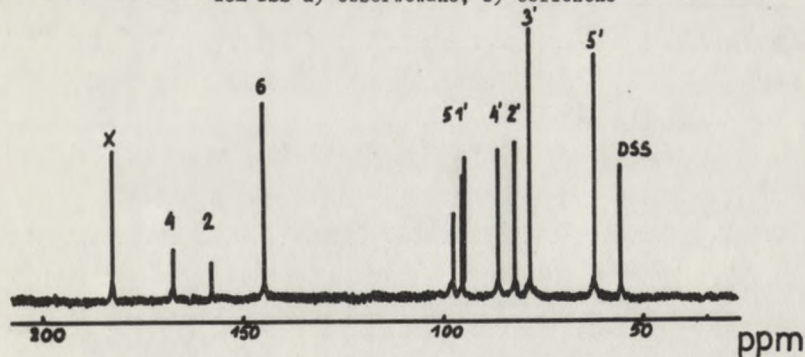
Widma PMR i ^{13}C NMR dla 2', 3' - CMP przedstawiono odpowiednio na rysunkach 3 i 4.

Dane uzyskane z widm PMR i ^{13}C NMR wykorzystywane są w ustaleniu zależności konformacyjnych:

- egzocyklicznej grupy - CH_2OH ,
- konformacji zasady względem pierścienia rybozy,
- konformacji pierścienia rybozy i cyklicznego fosforanu.



Rys. 3. Widmo 100 MHz PMR 2', 3'-CMP (Et₄N) (0.05M w D₂O, pD = 7.25 t=32°) względem DSS a) obserwowane, b) obliczone

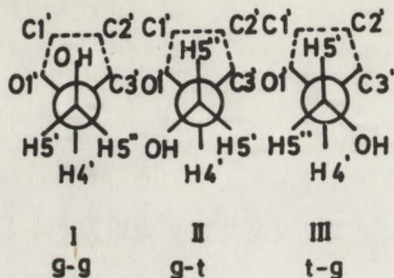


Rys. 4. Widmo 25.2 MHz ¹³C NMR 2', 3'-CMP (Na) (0.15 M w D₂O + 0.08 DSS) pD = 7.2, t = 37° względem TMS

2.1. Konformacja egzocyklicznej grupy - CH₂OH

W 2', 3' - cyklicznych nukleotydach, podobnie jak w nukleozydach i nukleotydach [11, 12, 17 - 19], egzocykliczna grupa - CH₂OH na skutek ro-

tacji wokół wiązania C(4') - C(5') może dać trzy różne rotamery, w których O(5') jest odpowiednio gauche lub trans w stosunku do O(1') i gauche lub trans do C(3'), jak przedstawiono na rys. 5.



Rys. 5. Schematy izomerów rotacyjnych wokół wiązania C(4') - C(5')

Zmiany stałych sprzężenia $J_{H,H}$ można stosować do badania kątów dwuściennych między H(4') a H(5') i H(4'') a H(5''). Zależność między kątem dwuściennym protonów przy wicynalnych atomach węgla a stałą sprzężenia określa równanie Karplusa:

$$J_{H,H'} = J_0 \cos^2 \phi - 0.28 \text{ Hz}$$

Stosowane zazwyczaj wartości dla J_0 są w granicach 8-16 Hz. Próbowano zmodyfikować wartości J_0 dla 2', 3' - cyklicznych nukleotydów stosując w przypadku $J_{0^\circ} = 7.16 \text{ Hz}$ i $J_{180^\circ} = 10.1 \text{ Hz}$. Rozwiązanie równań podanych przez Blacburne'a [11]

$$J_{4',-5'} = P_I J_{60^\circ} + P_{II} J_{60^\circ} + P_{III} J_{180^\circ}$$

$$J_{4',-5''} = P_I J_{60^\circ} + P_{II} J_{180^\circ} + P_{III} J_{60^\circ}$$

$$P_I + P_{II} + P_{III} = 1$$

P_I - oznacza udział molowy rotameru gauche-gauche,

P_{II} - oznacza udział molowy rotameru gauche-trans,

P_{III} - oznacza udział molowy rotameru trans-gauche,

przy podstawieniu wartości $J_0 = 9.27 \text{ Hz}$ dla $0^\circ < \phi < 90^\circ$ i $J_0 = 10.36 \text{ Hz}$ dla $90^\circ < \phi < 180^\circ$, jak i wartości zmodyfikowanych, uzyskano wyniki, które pozwoliły określić uprzywilejowanie danego rotameru dla 2', 3' - cyklicznych nukleotydów.

T a b l i c a VI

Obliczone współczynniki trzech klasycznych rotamerów
egzocyklicznej grupy - CH₂OH. Dane w nawiasach uzyskano
przy zastosowaniu zmodyfikowanej wartości J₀

Nukleotyd	P _I	P _{II}	P _{III}
2', 3' - UMP	0.35 (0.26)	0.46 (0.49)	0.19 (0.25)
2', 3' - CMP	0.35 (0.25)	0.46 (0.47)	0.19 (0.28)
2', 3' - AMP	0.60	0.34	0.06
2'3' - GMP(Na)	0.47	0.34	0.19

P_I - gauche-gauche, P_{II} - gauche-trans, P_{III} - trans-gauche

Z tablicy widać, że grupa egzocykliczna - CH₂OH w przypadku 2', 3'-cyklicznych nukleotydów pirymidynowych wykazuje uprzywilejowanie dla rotamerów trans-gauche lub gauche-trans. Jednoznaczne określenie jest możliwe tylko w przypadku przyporządkowania sygnałów H(5') i H(5'') odpowiednim protonom. 2'3' - cykliczne nukleotydy purynowe preferują natomiast rotamer gauche-gauche, w którym kwestia rozróżnienia protonów H(5') i H(5'') jest zbędna.

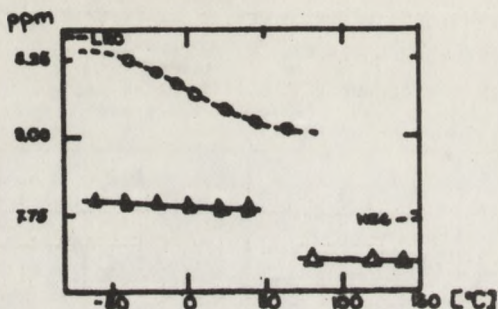
2.2. K o n f o r m a c j a z a s a d y w z g l ę d e m p i e r ś c i e n i a r y b o z y

Jak sugerowali Donohue i Truenblood [20] w nukleozydach i nukleotydach istnieją dwie uprzywilejowane konformacje zasady wokół wiązania glikozydowego, konformacja syn i anti. Przeprowadzone badania wykazały uprzywilejowanie konformacji anti dla nukleozydów i nukleotydów, zarówno w ciele stałym jak i w roztworze. Schirmer [21] stosując jądrowy efekt Overhausera wykazał, że 2', 3' - izopropylidenourydyna w dwumetylosulfotlenku istnieje zasadniczo w konformacji syn.

Zakłada się, że badania NMR w szerokim zakresie temperatury mogą wykazać zmianę przesunięcia chemicznego dla H(6), protonu, który najpełniej odzwierciedla zmiany konformacji syn - anti. Wykonano badania dla 2', 3'-CMP i 3'-CMP w szerokim zakresie temperatury, używając metanolu i glikolu etylenowego jako najodpowiedniejszych rozpuszczalników.

Jak wnioskowano uprzednio [8], 2', 3'-CMP w stanie krystalicznym istnieje w konformacji syn. Dla 2'-, i 3'-nukleotydów pirymidynowych istnieje steryczna bariera rotacji, ale fakt, że równocześnie z rotacją ma miejsce

zmiana konformacji pierścienia cukru, powoduje, że bariera rotacji jest obniżona.



Rys. 6. Różnice przesunięcia chemicznego protonu H(6) w zależności od temperatury dla 3'-CMP i 2', 3'-CMP: o 3'-CMP w CD₃OD; ▲ 2', 3'-CMP w CD₃OD; △ 2', 3'-CMP w glikolu etylenowym. Wartość przesunięcia chemicznego w CD₃OD i glikolu etylenowym - mierzona względem TMS. δ_{LEC} i δ_{HEC} - oszacowane wartości przesunięcia chemicznego dla konformeru nisko- i wysokoenergetycznego 3'-CMP w CD₃OD.

Rysunek 6 przedstawia wartości przesunięcia chemicznego dla protonu H(6) 2', 3'-CMP(Et₄N) i 3'-CMP (Et₄N) w różnych temperaturach. Dane dla 3'-CMP(Et₄N) mogą być przyjęte przy założeniu istnienia równowagi między dwoma konformerami. Przy obniżaniu temperatury zwiększa się ilość niższej energetycznego konformeru (anti), co potwierdza przesunięcie chemiczne. W temperaturze wyższej bariera rotacji maleje, co prowadzi do istnienia dwóch konformerów w stanie równowagi. Stąd wartość przesunięcia chemicznego w temp. wyższej będzie średnią wartością dla dwóch konformerów. Ekstrapolacja krzywej wartości przesunięcia chemicznego obserwowanego w zakresie temperatur od - 50 do 150° pozwala otrzymać wartości dla wysoko- i niskoenergetycznych konformerów. Udział konformerów w danej temperaturze może być obliczony z równania:

$$\delta_{\text{obser.}} = \delta_A^{P_A} + \delta_S^{P_S}$$

gdzie: δ_A - przesunięcie chemiczne protonu H(6) konformeru anti,
 P_A - udział konformeru anti,
 δ_S - przesunięcie chemiczne protonu H(6) konformeru syn,
 P_S - udział konformeru syn.

Ponieważ jest to proces równowagowy, może być rozpatrywany przy użyciu równań:

$$\Delta G = - RT \ln K = - RT \ln (P_A/P_S)$$

$$\ln (P_A/P_S) = - \Delta H/RT + \Delta S/R$$

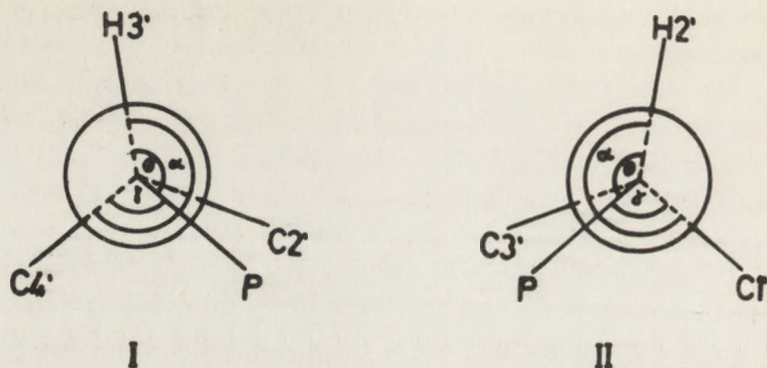
Nachylenie krzywej $\ln(P_A/P_S)$ względem $1/T$ daje ΔH , a wielkość odcięta na osi rzędnych - ΔS . Wartości δA i δS otrzymane z ekstrapolowanych krzywych pozwalają uzyskać wartości ΔH i ΔS . Wartość przesunięcia chemicznego protonu H(6) dla wyżej energetycznego konformeru 3'-CMP (δ_{HEC}) jest bliska wartości przesunięcia chemicznego protonu H(6) 2', 3'-CMP. Podobieństwo to sugeruje te same konformacje dla 2', 3'-CMP i 3'-CMP. Ekstrapolacja wartości przesunięcia chemicznego dla 3'-CMP w wyższych temperaturach daje wartość średnią leżącą między δ_{HEC} i δ_{LEC} . Zmiana wartości przesunięcia chemicznego protonu H(6) dla 2', 3'-CMP z temperaturą jest znacznie mniejsza niż dla 3'-CMP. Mała zmiana przesunięcia chemicznego z temperaturą odpowiada albo sztywnej konformacji wokół wiązania glikozydowego, albo bardzo szybkiej przemianie konformeru syn-anti. Szybka przemiana jednego konformeru w drugi, która nie powoduje wyraźnej zmiany w przesunięciu chemicznym, nawet w szerokim zakresie temperatur (-60 do 150°) wymagałaby niskiej bariery energii i prawie równej energii dla obu konformerów. Ponieważ w tym wypadku udział obu konformerów byłby prawie równy, wartość przesunięcia chemicznego byłaby średnia. Jeżeli przyjąć, że pierścień pirymidynowy jest usztywniony, to przesunięcie chemiczne będzie takie, jak w stanie krystalicznym - czyli konformacja syn. Zgodność wartości przesunięcia chemicznego krystalicznego 2', 3'-CMP i δ_{HEC} potwierdza konformację syn dla 2', 3'-CMP w roztworze. Podobieństwo (tablica IV) wartości przesunięcia chemicznego protonu H(6) dla 2', 3'-CMP i 2', 3'-UMP wykazuje, że 2', 3'-UMP jest także w konformacji syn.

Przypuszcza się też, że sygnały innych protonów ulegną również zmianie w zależności od udziału konformerów syn i anti [22, 23], lecz w stopniu mniejszym niż sygnał protonu H(6). Witkowski [22] przewiduje, że ze wzrostem udziału konformeru syn następuje zmiana przesunięcia chemicznego protonów H(4') i H(1'). Szczegółowe porównanie protonów rybozy 2'3'-CMP i 3'-CMP jest trudne z powodu nieznanymi efektów wywołanych różną orientacją grupy fosforanowej.

2.3. Konformacja pierścienia rybozy i cyklicznego fosforanu

Konformacje pierścienia furanozy i cyklicznego fosforanu można określić z zależności między następującymi kątami dwuściennymi:

- $H_{1'} - C_{1'} - C_{2'} - H_{2'}$, $\phi(C_{1'}, C_{2'})$; $H_{2'} - C_{2'} - C_{3'} - H_{3'}$,
 $\phi(C_{2'}, C_{3'})$; $H_{3'} - C_{3'} - C_{4'} - H_{4'}$, $\phi(C_{3'}, C_{4'})$
- $P-O_{2'} - C_{2'} - H_{2'}$, $\theta(O_{2'}, C_{2'})$; $P-O_{3'} - C_{3'} - H_{2'}$, $\theta(O_{3'}, C_{3'})$
- $P-O_{2'} - C_{2'} - C_{1'}$, $\gamma(O_{2'}, C_{2'})$; $P-O_{3'} - C_{3'} - C_{4'}$, $\gamma(O_{3'}, C_{3'})$



Rys. 7. Kąty dwuściennie w pierścieniu cyklicznego fosforanu; I wokół wiązania O_3' , C_3' , kąty $\theta(O_3', C_3')$, $\gamma(O_3', C_3')$, $\alpha(O_3', C_3')$; II wokół wiązania O_2' , C_2' , kąty $\theta(O_2', C_2')$, $\gamma(O_2', C_2')$, $\alpha(O_2', C_2')$

i stałymi sprzężenia $J_{H,H'}$, $J_{H,P'}$, $J_{C,P'}$

Porównując z tablicy VI stałe sprzężenia $J_{H,H}$ dla pierścienia furanozy 2', 3' - cyklicznych nukleotydów, należy przyjąć, że sztywna konformacja (zarówno pofałdowana jak i płaska) [2, 12, 18] jest niemożliwa. Sugeruje się, że pierścień furanozy jest elastyczny, podobnie jak w większości nukleotydów [11, 12, 17-19] i nukleotydów [18] oraz znajduje się w równowadze konformacyjnej. W przypadku 2', 3' - cyklicznych nukleotydów przechodzenie jednej konformacji w drugą jest w pewnym stopniu utrudnione obecnością cyklicznego fosforanu. Porównanie stałych sprzężenia $J_{H,H}$ dla pierścienia furanozy (tablica VI) ze stałymi obliczonymi dla sztywnych konformacji płaskiej lub pofałdowanych, wykazuje występowanie równowagi konformacyjnej dla 2', 3' - CMP i 2', 3' - UMP, przesuniętej w kierunku konformacji C(3') - - endo - C(2') - egzo. Dla 2', 3' - cyklicznych nukleotydów purynowych nie można wykazać w tym samym stopniu podobieństwa do jednej ze sztywnych konformacji. Wszystkie 2', 3' - cykliczne nukleotydy wykazują stałą sprzężenia $J_{2',3'}$ w przybliżeniu równą 6,8 Hz. Ten fakt potwierdza skrócenie pierścienia furanozowego wokół wiązania C(2'), C(3') na skutek obecności cyklicznego fosforanu, który wywołuje w przybliżeniu tę samą wartość skrócenia dla wszystkich cyklicznych nukleotydów. Modele cząsteczkowe wykazują, że maksimum odchylenia od konformacji kryjącej [C(2'), C(3') = 0] w kącie dwuściennym ϕ C(2'), C(3') może być $\pm 20^\circ$. Dalszych informacji udzielają stałe sprzężenia $J_{H,P}$ i $J_{C,P}$.

W wyprowadzonych przez White'a i Verkade'a [24] zależności między $^3J_{H,P}$ i kątami dwuściennymi θ

$$^3J_{H,P} = 16,3 \cos^2 \theta - 4,6 \cos^2 \theta$$

i odpowiednio $^3J_{C,P}$ i kątami dwuściennymi γ

$$^3J_{C,P} = J_0 \cos^2 \gamma = 8 \cos^2 \gamma$$

obliczono wartości kątów dwuściennych (tablica VIIA), które porównano z obliczonymi z modeli cząsteczkowych dla konformacji usztywnionych (tablica VII B)

T a b l i c a VII

Kąty dwuścienne

Nukleotydy	A. Obliczone na podstawie stałych sprzężenia:					
	$J_{H,P}$			$J_{C,P}$		
	$\theta(02'C2')$	$\theta(03'C3')$	$\gamma(02'C2')$	$\gamma(03'C3')$	$\alpha(02'C2')$	$\alpha(03'C3')$
2', 3'-UMP	122	136	157	124	279	260
2', 3'-CMP	121	137	153	122	274	259
2', 3'-AMP	133	124	134	137	267	261
2' - 3'-GMP	128	130	141	142	269	262
Konformacje pierścienia rybozy	B. Obliczone dla sztywnej konformacji pierścienia rybozy i cyklicznego fosforanu					
	$\theta(02'C2')$	$\theta(03'C3')$	$\gamma(02'C2')$	$\gamma(03'C3')$	$\alpha(02'C2')$	$\alpha(03'C3')$
2'-endo	135	105	105	135	240	240
2'-egzo	105	135	135	105	240	240
3'-endo	105	135	135	105	240	240
3'-egzo	135	105	105	135	240	240
Płaska	120	120	120	120	240	240

Ponieważ stałe sprzężenia atomu fosforu z protonami H(2') i H(3') (tablica IV) nie są identyczne (jak powinno być w przypadku konformacji płaskiej pierścienia furanozowego) stąd pierścień furanozy musi istnieć w formie pofałdowanej. Obliczone z równych wartości kątów dwuściennych są uśrednione i wynikają z szybkiej przemiany jednego konformeru w drugi.

Z tablicy VII wynika, że dane dla purynowych i pirymidynowych cyklicznych nukleotydów są różne i zależą od typu zasady. Stałe sprzężenia $J_{H,P}$

i kąty dwuosienne wykazują, że istniejące w stanie szybkiej równowagi konformacyjnej pierścienie rybofuranozy w nukleotydach pirymidynowych uprzywilejowują formę C(3')-endo - C(2')-egzo, podczas gdy 2', 3'-AMP (wprawdzie w stopniu mniejszym) - formę C(2')-endo - C(3')-egzo. Dla 2', 3'-GMP nie stwierdzono uprzywilejowania żadnej z form.

Chociaż powyższe rozważania dotyczące stałych sprzężenia $J_{H,P}$ i $J_{C,P}$ są przybliżone, pokrywają się z wnioskami wysuniętymi odnośnie stałych sprzężeń $J_{H,H}$. Okazuje się jednak, że obliczone z równań kąty dwuosienne są większe niż sugerowano na podstawie analizy modeli cząsteczkowych form C(3')-endo, C(2')-endo i konformacji płaskiej pierścienia rybozy. Porównując wartości kąta $\alpha (= \theta + \delta)$, odnoszącego się do wiązań O(2'), C(2') i O(3'), C(3') można wysnuć pewne ciekawe wnioski. Kąt α H(3')-O(3')-C(3') - C(4'), odnoszący się do wiązania O(3'), C(3') posiada wartość stałą dla wszystkich cyklicznych nukleotydów, podczas gdy kąt α H(2')-O(2')-C(2') - C(1') odnoszący się do wiązania O(2'), C(2') - dla nukleotydów pirymidynowych jest większy niż dla purynowych. Ten fakt sugeruje, że zaburzenie w otoczeniu C(3') jest stałe dla wszystkich 2', 3' - cyklicznych nukleotydów. Większe zaburzenie w otoczeniu C(2') dla 2', 3' - cyklicznych nukleotydów pirymidynowych odzwierciedlone większą wartością kąta α , tłumaczy się oddziaływaniem atomu H(2') z atomem tlenu O(2) grupy karbonylowej zasady, będącym nad pierścieniem rybozy w przypadku konformacji syn wokół wiązania glikozydowego. Tego typu oddziaływanie jest niemożliwe w 2', 3' - cyklicznych nukleotyдах purynowych. Występowanie pierścienia furanozowego w równowadze konformacyjnej potwierdzają wyniki badań 2', 3' - cyklicznych nukleotydów w zakresie temperatury od 30 do 75°C. Wartości stałych sprzężeń $J_{H,P}$ dla nukleotydów purynowych i pirymidynowych w tym zakresie temperatury obrazują zmiany konformacyjne w kierunku jednej czasowo uśrednionej konformacji płaskiej pierścienia rybozy, odpowiadającej równoważnym ilościom czterech podstawowych pofałdowanych konformacji pierścienia rybozy.

3. WNIOSKI

Badania NMR wykazały, że w serii 3', 5' - cyklicznych nukleotydów pierścień cukrowy i fosforanowy są usztywnione. Pierścień fosforanowy występuje w konformacji krzeselkowej, natomiast ilość możliwych konformacji rybozy jest już z góry ograniczona obecnością pierścienia fosforanowego. W grupie 2', 3' - cyklicznych nukleotydów pierścień fosforanowy i cukrowy występują w równowadze konformacyjnej między czterema pofałdowanymi formami.

W nukleotydach pirymidynowych istnieje tendencja do uprzywilejowania konformeru C(3')-endo - C(2')-egzo, natomiast w serii nukleotydów purynowych - C(2')-endo - C(3')-egzo. Równowaga konformacyjna jest w pewnym stopniu ograniczona obecnością pierścienia fosforanowego. Brak zmiany przesunięcia chemicznego protonu H(6) w widmach PMR, wykonanych w szerokim zakresie temperatury, potwierdza konformację syn zasady pirymidynowej. Egzocykliczna grupa CH₂OH w serii nukleotydów pirymidynowych uprzywilejowuje trans-gauche lub gauche-trans, podczas gdy w purynowych gauche-gauche.

W serii 3', 5'-cyklicznych nukleotydów dane konformacyjne otrzymane z widm NMR są zgodne z danymi krystalograficznymi. W serii 2', 3'-cyklicznych nukleotydów zgodność taka nie występuje.

LITERATURA

- [1] Jardetzky C.D.; J.Am.Chem.Soc. 84, 62 (1962).
- [2] Jardetzky C.D.; J. Mol.Spectrosc., 28, 70 (1968).
- [3] Lapper R.D., Mantsch H.H., Smith I.C.P.; J.Am.Chem.Soc., 94, 6243, (1972).
- [4] Blackburn B.J., Lapper R.D., Smith I.C.P.; J.Am.Chem.Soc., 95, 2873, (1973).
- [5] Lapper R.D., Mantsch H.H., Smith I.C.P.; J.Am.Chem.Soc., 95, 2878, (1973).
- [6] Lapper R.D., Smith I.C.P.; J.Am.Chem.Soc., 95, 2880 (1973).
- [7] Lavalley D.K., Coulter Ch.L.; J.Am.Chem.Soc., 95, 576, (1973).
- [8] Coulter Ch.L.; J.Am.Chem.Soc., 95, 570, (1973).
- [9] Sundaralingam M., Abola J.; J.Am.Chem.Soc., 94, 5070, (1972).
- [10] Watenpangk K., Dow J., Jensen L.M., Ferberg S.; 159, 206, (1968).
- [11] Blackburn B.J., Grey A.A., Smith I.C.P., Hruska F.E.; Canad.J.Chem. 48, 2866, (1970).
- [12] Hruska F.E., Grey A.A., Smith I.C.P.; J.Am.Chem.Soc., 92, 4088 (1970).
- [13] Hall L.D., Malcolm R.B.; Chem.Ind. (London) 92 (1968).
- [14] Kainosho M., Nakamura A., Tsuboi M.; Bull.Chem.Soc.Japan, 42, 1713, (1969).
- [15] Castellano S., Botheur-By A.A.; J.Chem.Phys. 41, 3868 (1964).
- [16] Hruska F.E., Grey A.A., Smith I.C.P.; J.Am.Chem.Soc. 92, 214, (1970).
- [17] Schleich T., Blackburn B.J., Lapper R.D.; Biochemistry 11, 137 (1972).
- [18] Lapper R.D., Smith I.C.P.; J.Am.Chem.Soc. 94, 6243 (1972).
- [19] Donohue J., Treblood K.N.; J.Mol.Biol. 2, 363 (1960).

- [20] Schirmer R.E., Davis J.P.; J.Am.Chem.Soc. 94, 2561 (1972).
[21] Schweizer M.P., Witkowski J.T.; J.Am.Chem.Soc. 93, 277 (1971).
[22] Dugas H., Blacburn B.J., Smith J.C.; J.Am.Chem.Soc. 93, 3468 (1971).
[23] Withe D.W., Verkede J.G.; J. Magn Resonanse 3, 111 (1970).

DYSKUSJA

W dyskusji głos zabrali: mgr M. Remin, mgr A. Jaworski, mgr J. Bujarski, mgr A. Pohorille.

Odnosnie 3', 5'-cyklicznych nukleotydów mgr M. Remin zwrócił uwagę na możliwość przewidzenia konformacji tych układów, co pozwala empiryzować relację Karplusa. Z badań własnych nad konformacją dezoksynukleotydów mgr M. Remin wyciągnął wniosek, że nie można stosować jednakowych relacji Karplusa do poszczególnych wiązań 1'2', 2'3', 3'4'. Tym niemniej prace w serii 3'5'-cyklicznych nukleotydów rozwiązują szereg trudności wynikających z dopasowania parametrów z relacji Karplusa. Jeśli chodzi o 2'3' - cykliczne nukleotydy podkreślił, że wnioski wpływające z pracy Coultera dotyczące konformacji pierścienia cukrowego nie są zbieżne z wnioskami uzyskanymi przez Smitha. Coulter przyjmuje, że konformacja pierścienia cukrowego jest raczej płaska i na tej podstawie wyciąga wnioski odnośnie parametrów w równaniu Karplusa. Obecnie trudno jednak jednoznacznie odpowiedzieć na powyższe pytania.

Wiesław Gessner

ZASTOSOWANIE METODY PMR DO BADAŃ KONFORMACYJNYCH OLIGONUKLEOTYDÓW. ASOCJACJA WARSTWOWA ZASAD AZOTOWYCH

STRESZCZENIE

Znajomość struktury i oddziaływań w cząsteczkach oligo- i polinukleotydów jest niezbędna dla pełnego zrozumienia czynników wpływających na stabilność konformacji kwasów nukleinowych w roztworach. Ponieważ wyniki badań na poziomie polinukleotydów są trudne do interpretacji, prowadzi się badania modelowe na poziomie dwunukleotydów, a uzyskane wyniki ekstrapoluje się na wyższe oligo- i polinukleotydy. Stosunkowo najwięcej informacji na temat struktury i oddziaływań w cząsteczkach dwunukleotydów można uzyskać z danych PMR.

W referacie przedstawiono tok badań i dyskusję wyników dla dwunukleotydów purynowo-purynowych i purynowo-pirymidynowych, jak również wyniki badań dla dwunukleotydów serii dezoksy. Szczególny nacisk położono na badania oddziaływań typu asocjacji warstwowej (Stacking) w cząsteczkach dwunukleotydów. Przedstawiono również najnowszą koncepcję trójstanowego modelu równowagi dynamicznej dla cząsteczek dwunukleotydów w roztworze.

1. WSTĘP

O ile badania komponentów kwasów nukleinowych są stosunkowo proste na poziomie mononukleotydów czy też mononukleotydów, o tyle w wypadku badań większych fragmentów łańcucha DNA lub RNA sprawa jest bardziej skomplikowana. Związane jest to z rozlicznymi oddziaływaniami wewnątrz i międzycząsteczkowymi, jakie mają miejsce w roztworach oligorybo- i oligodezoksyrybonukleotydów. Oddziaływania te bardzo często są ze sobą wzajemnie powiązane, co powoduje dodatkowe trudności związane z odseparowaniem od siebie poszczególnych oddziaływań, w celu określenia ich siły i znaczenia w tworzeniu danej konformacji oligonukleotydów. Chociaż ilościowe podejście do problemu jest trudne, można jednak z całą pewnością powiedzieć, że na konformację oligonukleotydów wpływają w zasadniczym stopniu oddziaływania typu asocjacji warstwowej (Stacking), co zostanie szczegółowo omówione w dalszej części referatu.

W badaniach konformacyjnych oligonukleotydów duże zastosowanie mają metody optyczne - UV, ORD, CD - szczególnie przydatne do określenia wielkości asocjacji warstwowej [14]. Jednak najwięcej informacji możemy uzyskać ze spektroskopii PMR [1-8].

2. METODYKA BADAŃ OLIGONUKLEOTYDÓW METODĄ PMR

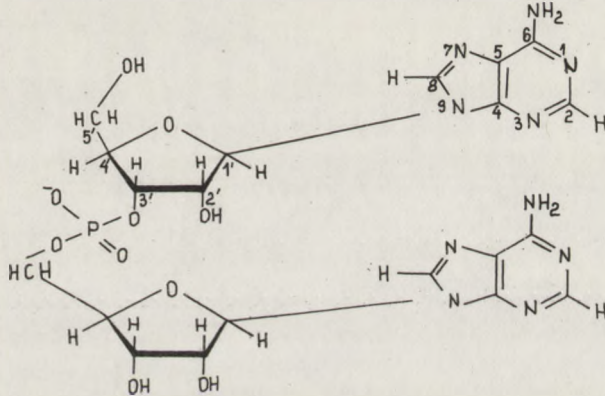
Badania oligonukleotydów metodą PMR były prowadzone przeważnie na poziomie 3', 5'-dwunukleozydomonofosforanów (ApA, CpA, ApU, CpC, dApdA, dAprA itp.). Wyniki takich badań modelowych były z jednej strony stosunkowo proste w interpretacji, a z drugiej strony można je ekstrapolować dla wyższych analogów oligonukleotydów. Z badań PMR-u możemy wyciągnąć wiele cennych informacji na temat konformacji dwunukleotydów, a mianowicie: na temat konformacji pierścieni cukrowych w poszczególnych składnikach dwunukleotydu, na temat konformacji zasady względem pierścienia cukru, siły i rozległości asocjacji warstwowej zasad w dwunukleotydzie, wielkości agregacji w roztworze dwunukleotydu oraz na temat powiązania konformacji pierścienia cukru i konformacji zasady z asocjacją warstwową. Taką dużą ilość informacji można było otrzymać metodą PMR dzięki odpowiedniej metodycy badań. Widma wykonywano przeważnie w roztworze D₂O na aparatach NMR 100 i 220 MHz. Badano zależności przesunięcia chemicznego poszczególnych protonów zasad oraz protonu H₁, rybozy, jak również zależności stałych sprzężenia protonów cukrowych od temperatury pomiaru, stężenia i pD roztworu. Przeprowadzono również podstawienie izotopowe w cząsteczce zasady, celem przyporządkowania danego sygnału odpowiedniemu protonowi oraz badano wpływ jonów Mn⁺² na poszerzenie sygnałów poszczególnych protonów. W celu lepszego wyjaśnienia siły i rozległości asocjacji warstwowej zasad, badano wpływ dodanej puryny na przesunięcie sygnałów protonów zasady przy różnym stężeniu roztworu dwunukleotydów.

3. WYNIKI BADAŃ

Jak już wspomniano na wstępie referatu, oddziaływania typu asocjacji warstwowej wydają się odgrywać decydującą rolę w tworzeniu danej konformacji dwunukleotydu [1-5]. W dyskusji wyników chciałbym zwrócić uwagę na zależność wielkości tych oddziaływań od rodzaju zasad obecnych w cząsteczce dwunukleotydu, jak również od tego, czy mamy do czynienia z rybo- czy z dezoksyrybonukleotydami. Pewną rolę odgrywa także sekwencja zasad w cząsteczce dwunukleotydu np. CpA i ApC różnią się nieco siłą wewnętrznych oddziaływań, jednak różnice te nie są zbyt duże [2].

3.1. KONFORMACJA RYBONUKLEOTYDÓW PURYNOWO-PURYNOWYCH

Na początku rozważmy przypadek gdy oddziaływanie zasada-zasada jest stosunkowo duże. Mamy do czynienia z tym przypadkiem wtedy, gdy obydwie zasady są purynami. Przykładem takiego dwunukleozydomonofosforanu jest ApA [1].

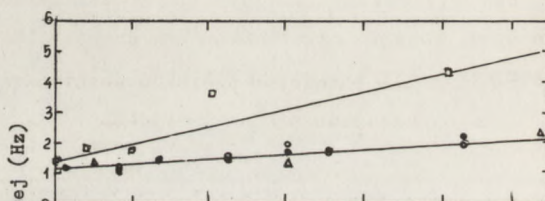


Rys. 1. Adenylo (3'-5') adenozyzna

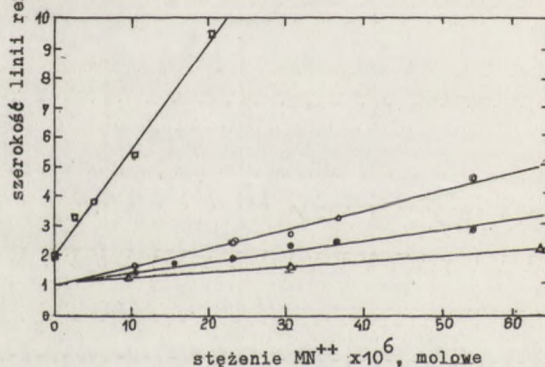
W widmie ApA, w rejonie, w którym występują sygnały pochodzące od adeniny obserwujemy cztery sygnały - dwa sygnały dla H_2 i dwa dla H_8 adeniny (wzajemne przesunięcie sygnału dla analogicznych protonów występuje ze względu na asymetryczne podstawienie cząsteczki rybozy grupą fosforanową). Sygnały od protonów H_8 odróżniono od sygnałów dla protonów H_2 za pomocą wymiany wodorów z pozycji H_8 na deuter przy pomocy D_2O w podwyższonej temperaturze. Na podstawie badań temperaturowych i obserwacji poszerzenia poszczególnych sygnałów pod wpływem jonów Mn^{+2} stwierdzono, że sygnały protonów nukleozydu zestryfikowanego w pozycji 3' położone są przy wyższym polu (mniejsze wartości przesunięcia chemicznego) w porównaniu z protonami 5' - fosforanu nukleozydu.

Przyporządkowanie protonów H_8 odpowiednich sygnałów na podstawie eksperymentu z zastosowaniem jonów Mn^{+2} bazowało na oddziaływaniach typu dipol-dipol, zależnych od odległości ($\sim 1/r^6$). Jon Mn^{+2} ulega asocjacji z grupą fosforanową. W związku z tym będzie poszerzał sygnał protonu H_8 nukleozydu 5' w większym stopniu niż nukleozydu 3' (pod warunkiem, że zasada znajduje się w położeniu anti w stosunku do pierścienia rybozy). Rezultaty doświadczeń z Mn^{+2} podano na wykresie:

- H_2 -5'-AMP
- △ H_2 -cykl. 3',5'-AMP
- H_2 -ApA (sygnał dolnopol)
- H_2 -ApA (sygnał górnopol)



- H_8 -5'-AMP
- △ H_8 -cykl. 3',5'-AMP
- H_8 -ApA (sygnał dolnopol)
- H_8 -ApA (sygnał górnopol)



Rys. 2. Zależność szerokości linii widmowych od stęż. Mn^{++}

Zależności są prostoliniowe. Selekttywne poszerzenie sygnału protonu H_8 , położonego przy niższym polu wskazuje, że jest to H_8 (5') i dodatkowo, że zasada jest w położeniu anti. Przebadano przesunięcie chemiczne protonów zasad dla ApA, ApU, UpA, 2'-AMP, 3'-AMP, 5'-AMP, cyklicznego 3', 5'-fosforanu adenozyne oraz dla samej adenozyne.

Ogólnie można stwierdzić, że w przeciwieństwie do protonów H_8 , przesunięcie chemiczne dla protonów H_2 jest mało czułe na zmiany w pozycji 5' (fosforylacja, zmiana pD). Interesujące są wartości przesunięć chemicznych dla cyklicznego fosforanu - są położone przy wyższym polu, niż dla którejkolwiek z mononukleotydów. Wiąże się to ze zmianą konformacji pierścienia cukru z 2'-endo na 3'-endo (w cyklicznym fosforanie).

Sygnały protonów H_2 w ApA występują przy wyższym polu niż spektralne pozycje protonów w ApU, UpA i mononukleotydach. Te przesunięcia można powiązać z magnetyczną anizotropią prądu pierścieniowego drugiej zasady ade-

ninowej. To wskazuje na silną asocjację warstwową w cząsteczce ApA w temperaturze pokojowej.

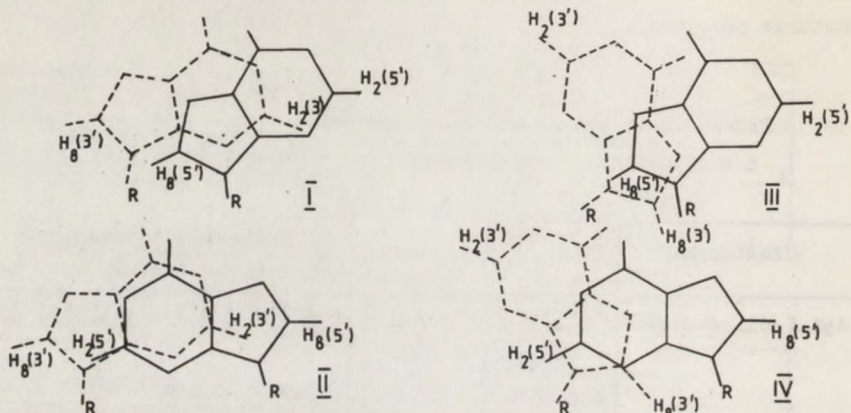
T a b e l a I

Przesunięcia chemiczne protonów adeninowych w ApA, ApU, UpA i w odpowiednich mononukleozydach i nukleotydach w 31°

Cząsteczka	Stęż., M	pD roztw.	Przesunięcia chemiczne ppm			
			H ₈ (5')	H ₈ (3')	H ₂ (5')	H ₂ (3')
ApA (sól sodowa)	0.01	7-8	8.69	8.65	8.57	8.43
	0.0003	7-8	8.70	8.67	8.60	8.47
	skr.rozc.	7-8	8.71	8.68	8.61	8.48
ApU (sól sodowa)	0.01	7.7	...	8.77	...	8.63
	0.003	7-8	...	8.80	...	8.66
	0.001	7-8	...	8.80	...	8.67
UpA (sól sodowa)	0.01	7-8	8.84	...	8.66	...
	0.003	7-8	8.85	...	8.67	...
3'-AMP	0.01	5.8	...	8.79	...	8.68
	0.01	11.0	...	8.70	...	8.68
5'-AMP	0.009	6.2	8.92	...	8.68	...
	0.01	10.0	9.06	...	8.70	...
2'-AMP	0.01	5.0	8.79		8.68	
3', 5'-fosforan cykl. adenozyne	0.01	...	8.67		8.67	
Adenozyne	0.003	...	8.76		8.68	

Na rysunku przedstawiono 4 możliwe konformacje cząsteczki ApA (na podstawie modelu)

Konformacje: I (3'-anti, 5'-anti), II (3'-anti, 5'-syn), III (3'-syn, 5'-anti) i IV (3'-syn i 5'-syn) mogą być otrzymane przez obrót cząsteczki zasady wokół wiązania glikozydowego. Konieczne jest także pewne skrócenie szkieletu cukrowo-fosforanowego w celu otrzymania konformacji II i III z konformacji I. Rzeczywiste konformacje mogą się nieco różnić od tych modelowych. Niemożliwe jest dokładne określenie kąta dwuściennego między zasadami, ponieważ amplituda wibracji pierścieni zasad jest duża, a minimum energetyczne oddziaływań typu asocjacji warstwowej rozmyte. Z rysunku wynika, że H₂(3') znajduje się pod wpływem dużego efektu anizotropii magnetycznej pierścienia zasady 5'-fosforanu nukleozydu tylko wtedy, gdy 3'-zasada jest w położeniu anti.



Rys. 3. Cztery możliwe konformacje dla zasocjowanej warstwowo cząsteczki ApA

Podanie dla przesłaniania $H_2(5')$ - 5' zasada musi być w położeniu syn, dla przesłaniania $H_8(3')$ - 3' zasada musi być w położeniu syn i dla $H_8(5')$ -5' zasada musi być w położeniu anti.

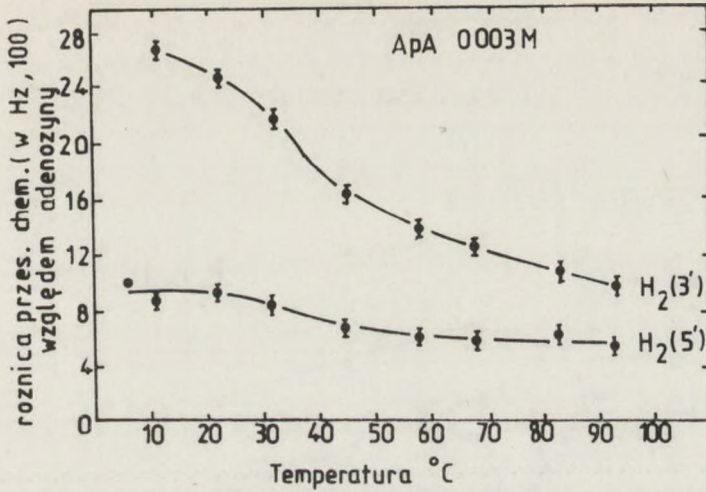
Na wykresie 4 podano zmiany przesunięcia chemicznego protonów H_2 i H_8 pod wpływem zmiany temperatury.

Otrzymane wyniki wskazują na to, że tylko proton H_2 dający sygnał przy wyższym polu i proton $H_8(5')$ zmieniają położenie sygnału ze zmianą temperatury. Z tego wynika, że obydwie zasady adeninowe są zorientowane w konformacji anti oraz, że proton H_2 dający zmianę przesunięcia chemicznego pod wpływem temperatury musi być protonem $H_2(3')$.

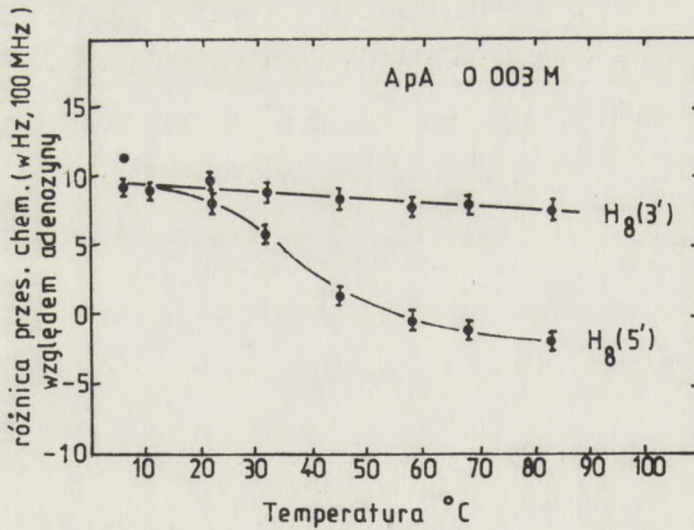
W roztworach wodnych ApA powinna występować asocjacja cząsteczek dwunukleotydu w większe agregaty. W celu określenia charakteru i rozległości tej agregacji przebadano zależność przesunięcia chemicznego protonu zasad ApA od stężenia roztworu.

Obserwuje się przesunięcie sygnałów wszystkich protonów w stronę niższego pola wraz ze wzrostem stężenia. Te zmiany mogą być przyporządkowane zmianom asocjacji warstwowej w cząsteczkach ApA - przy większych stężeniach mamy do czynienia z agregacją molekularną. Na rysunku 6 przedstawiono szereg modeli asocjacji cząsteczkowej.

Jeżeli dwunukleotyd jest silnie powiązany wewnątrzcząsteczkowo (konformacja fałdowa), to możliwa jest tylko asocjacja zewnętrzna z drugą cząsteczką dwunukleotydu. Ten przypadek zachodzi szczególnie dla dwunukleotydów purynowo-purynowych. Natomiast w wypadku słabych oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych w cząsteczce dwunukleotydu, możliwe jest także wprowadze-

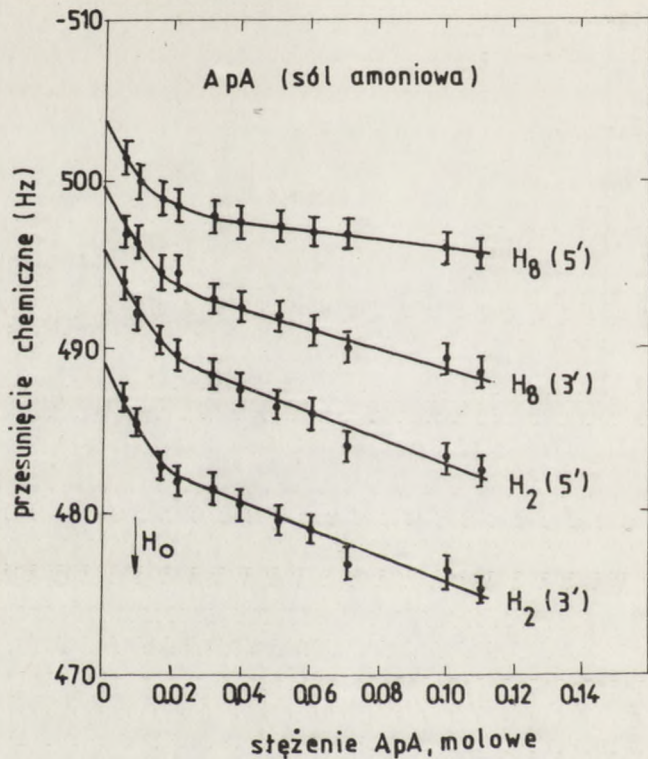


Rys. 4 a. Temperaturowa zależność przesunięcia chemicz. prot. H₂ ApA

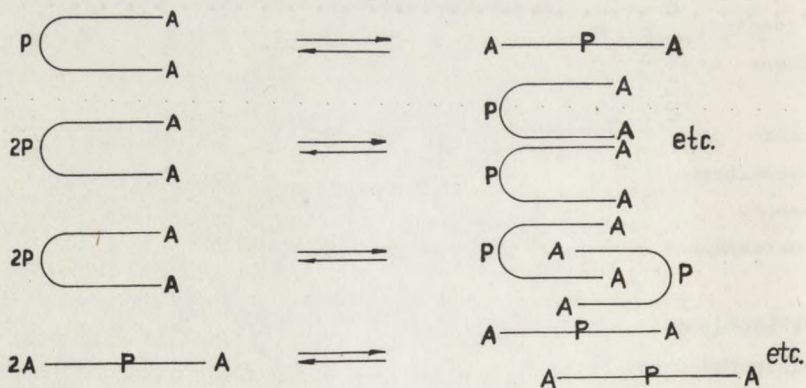


Rys. 4 b. Temperaturowa zależność przesunięcia chemicz. prot. H₈ ApA

nie zasady jednej cząsteczki dwunukleotydu między dwie zasady drugiej cząsteczki dwunukleotydu znajdującej się w konformacji fałdowej. Ten przypadek zachodzi często dla dwunukleotydów purynowo-pirymidynowych i pirymidynowo-pirymidynowych.

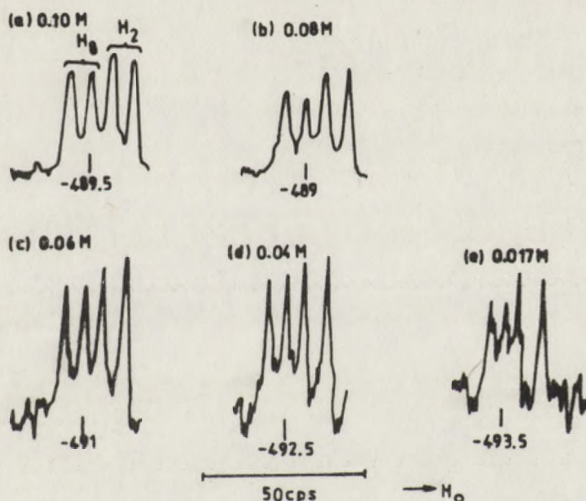


Rys. 5. Zależność przesunięcia chemicznego protonów adeninowych ApA od stęż. roztw. (D_2O , 60 MHz, $40^\circ C$, TMS zewn.)



Rys. 6. Przykłady możliwych agregacji cząsteczek dwunukleotydów

Większa lub mniejsza tendencja danego dwunukleotydu do tworzenia agregatów włączeniowych daje pewne informacje na temat siły asocjacji warstwowej. Dla obliczenia względnego udziału tego typu asocjacji w ogólnej ilości agregatów cząsteczkowych badano wpływ stężenia ApA na szerokość sygnałów protonów adeniny.



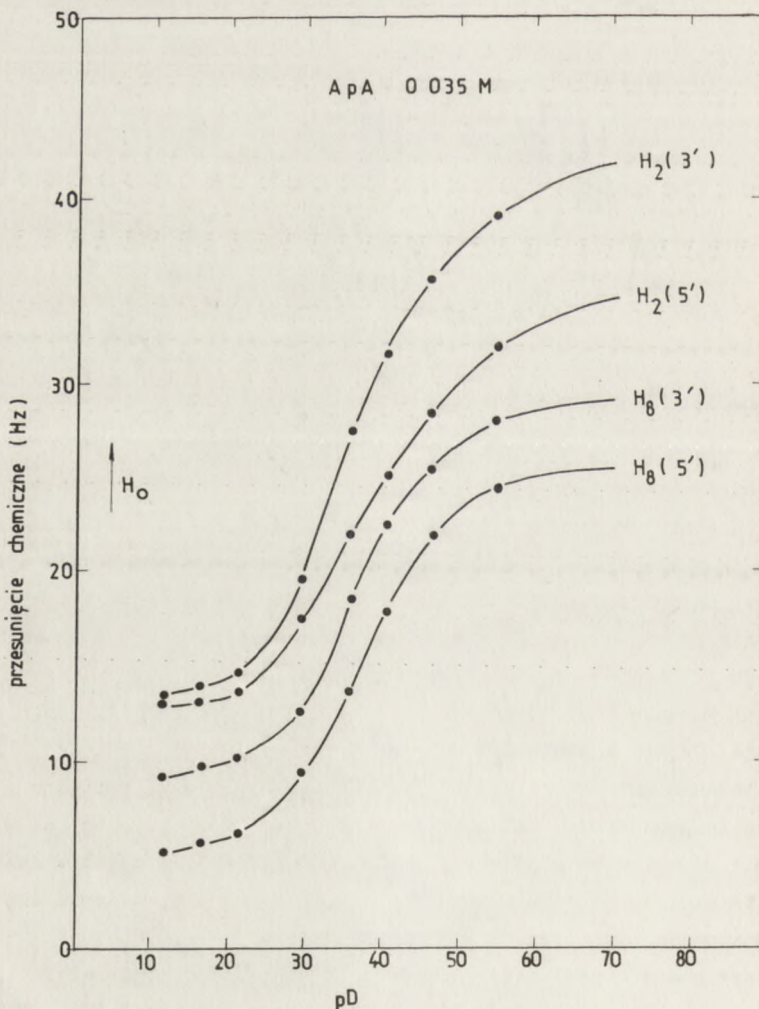
Rys. 7. Widma ApA (60 MHz) w różnych stęż.roztw. TMS zewnętrz., 40°C ApA w postaci soli amonowej

W przeciwieństwie jednak do UpA i innych dwunukleotydów purynowo-pirymidynowych nie stwierdzono wyraźnego poszerzenia sygnałów, co wskazuje, że w wypadku dwunukleotydów purynowo-purynowych agregacja cząsteczek zachodzi głównie na drodze asocjacji zewnętrznej. Stwierdzono już w tym referacie, że dwie zasady adeninowe w ApA są związane ze sobą oddziaływaniami typu asocjacji warstwowej. Należało zatem przestudiować to oddziaływanie w zmiennych warunkach, co mogło pozwolić na określenie rozmiaru tego oddziaływania. Często badaniami, z których można wyciągnąć najwięcej informacji, są badania zależności przesunięć chemicznych od pH roztworu oraz zależności temperaturowe. Badania takie przeprowadzono również w wypadku ApA. Jeżeli pH roztworu obniża się, następuje protonacja zasad w dwunukleotydzie. Ze względu na oddziaływania elektrostatyczne spodziewać się należy zaniku asocjacji warstwowej w tych warunkach.

Najwyższe pKa dla protonacji ApA powinno odpowiadać protonacji pierścienia adeniny. Dla pierścienia 3'-AMP pKa wynosi 3.56 do 3.70, dla 5'-AMP 3.74-3.98. Tak więc, w wypadku ApA należy oczekiwać protonacji co najmniej

jednego pierścienia adeninowego przy pK_a w granicach 3-4. Przy $pH \approx 4$ więcej cząsteczek ApA występuje w formie monoprotowanej ($ApAH^+$, H^+ApA), a przy $pH \approx 3$ obydwie zasady są sprotonowane. Protonacja grup fosforanowych nie zachodzi w tym rejonie pH ($pK_a \approx 1$). Każdy pierścień adeninowy jest tylko monoprotowany przy pH 1.5-4.0, ale miejsce protonacji nie jest określone (być może, że szereg monoprotowanych adenin jest obecny we wzajemnej równowadze). Najbardziej podatne na protonację miejsca to N_1 , N_3 i N_5 .

Efekt pH dla czterech sygnałów protonów pierścienia adeninowego przedstawiono na rysunku:



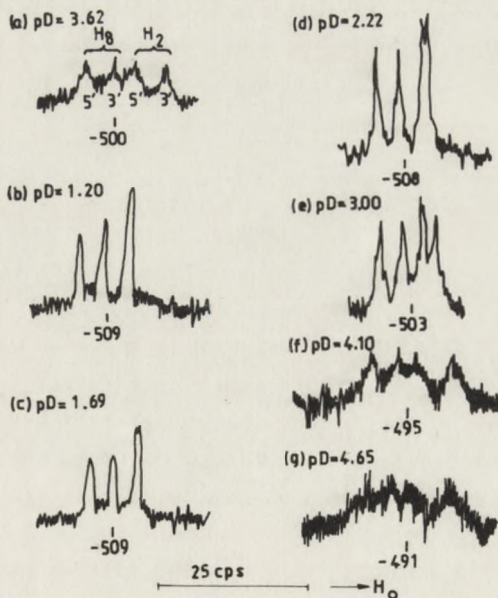
Rys. 8. Zależność przesunięcia chemicznego protonów adeniny w cząst. ApA od pD roztw. Roztwór 0.035 M, 60 MHz

Zgodnie z oczekiwaniem, wszystkie sygnały są przesunięte w dół pola razem z obniżeniem pD. Z kształtów krzywych wynika, że pKa monoprotonowanej cząsteczki ApA jest w granicach 3.7. Krzywe nie reprezentują procesu pojedynczej protonacji, ponieważ obecnych jest szereg będących we wzajemnej równowadze cząsteczek mono- i dwuprotonowanych, będących w stanie asocjacji warstwowej i nie posiadających tego typu wewnętrznych oddziaływań.

Przesunięcia ze względu na protonację możemy ogólnie ująć jako:

1. zmiany w gęstości π - elektronowej pod wpływem protonacji,
2. zmiana anizotropii magnetycznej wolnej pary elektronowej na azocie, który jest protonowany.

Interesujący jest fakt, że sygnały dla dwóch protonów H_2 łączą się w jeden sygnał przy niskim pD. Ponieważ te protony są oddalone od grupy fosforanowej, magnetyczna równocенność przy niskim pD jest dowodem na to, że magnetyczna nierównocенność występująca przy pD neutralnym jest wynikiem wewnątrzcząsteczkowego oddziaływania dwóch nierównocennych zasad adeninowych. Podobne łączenie sygnałów dla protonów H_8 nie występuje przy niskim pD ze względu na asymetryczne przyłączenie grupy fosforanowej do jednostek nukleozydowych (protony H_8 znajdują się w pobliżu grup fosforanowych w wypadku konformacji anti, jaka jest preferowana). W studiach zależności oddziaływań typu asocjacji warstwowej od pD roztworu zauważono także interesujące zmiany szerokości linii widmowych w widmie ApA.



Rys. 9. Widma PMR protonów adeniny ApA przy różnym pD, 0.035 M ApA w formie kwasowej 60 MHz, TMS zewnątrz

Do roztworu ApA w formie kwasowej ($pD \approx 3.92$) dodano 0,3 N HCl w celu obniżenia pD . Widmo ApA przy $pD \approx 3.62$ wykazuje znaczne poszerzenie sygnału. Dodanie następnych porcji kwasu powoduje obniżenie pD roztworu do wartości około 1.2. Sygnały przy tym pD stają się powtórnie ostre. Następnie dodawano porcjami 0,4 N NaOH obserwując zachowanie się sygnałów przy wzroście pD .

O ile przy niskich wartościach pD sygnały protonów adeninowych są ostre, o tyle przy wyższych wartościach pD 3.5 do 4.5 następuje wyraźne poszerzenie linii widmowych. Związane jest to z tworzeniem kompleksów wiązań niowych przez monoprotynowane cząsteczki ApA. Dalsze obniżenie pD powoduje dalszą protonację, w wyniku czego w roztworze obecne są wyłącznie cząsteczki dwuprotynowane, które nie mogą już oddziaływać ze sobą - stąd sygnały stają się ostre.

Powyzsza zależność nie występuje przy niskich stężeniach ApA, co potwierdza hipotezę, że poszerzenie sygnałów pochodzi od wzajemnych oddziaływań międzycząsteczkowych.

Dla otrzymania ilościowych informacji na temat energetycznej strony asocjacji warstwowej studiowano pozycję sygnałów protonów adeniny jako funkcję temperatury. Zmiany przesunięcia chemicznego dla protonów ApA odosobniono do zmian przesunięcia chemicznego protonów adenozyiny w roztworze o tym samym stężeniu, pD i temperaturze, w celu wykluczenia przesunięcia sygnałów wpływających ze zmian w oddziaływaniach rozpuszczalnik - substancja rozpuszczona, zmieniających się ze zmianą temperatury.

Temperaturowe przesunięcia obserwowane dla protonów adeniny w ApA (0.0030 M) przedstawiono na rysunku 4 - strona 129.

Badania były przeprowadzone w zakresie temperatur od 5 do 95°. Wzrost temperatury roztworu prowadzi do przesunięcia wszystkich sygnałów w dół pola, jednak wielkości tych przesunięć są różne dla różnych protonów. Te temperaturowe zmiany przesunięcia chemicznego wywodzą się prawdopodobnie ze zmian względnych konformacji dwóch zasad adeninowych. Ponieważ protony H_2 są oddalone od grupy fosforanowej i od pierścienia rybozy, temperaturowe zmiany obserwowane dla tych protonów muszą wynikać ze zmian w magnetycznej anizotropii drugiej zasady adeninowej. Przy temperaturze 5°, $H_2(3')$ i $H_2(5')$ są przesunięte o wartości 28 Hz i 10 Hz w górę pola względem protonu adenozyiny. $H_2(3')$ jest więc o wiele bardziej przesłaniany przez efekt magnetycznej anizotropii niż $H_2(5')$. Jednak z obliczeń dla modelu wynika, że przesunięcie w wypadku $H_2(3')$ powinno być większe niż obserwowane w rzeczywistości, podobnie dla $H_2(5')$ przesunięcie powinno być mniejsze od wartości obserwowanych. Stąd wynika wniosek, że istnieją także inne konformacje ApA oprócz preferowanej anti-anti (występują także konformacje II,

III i IV), jednak względne populacje tych konformerów są znacznie mniejsze niż konformeru I.

Interpretacja zmian przesunięcia chemicznego protonów H_8 jest znacznie trudniejsza, szczególnie dla protonu $H_8(5')$ ze względu na nakładające się efekty odsłaniania przez grupę fosforanową i przesłaniania przez efekt anizotropowy sąsiedniej adeniny. Ze względu na obszerność tych zagadnień nie będzie to dokładniej omówione [1].

Interesującym wydaje się fakt, że przy 95° sygnały H_2 w ApA są jeszcze przy znacznie wyższym polu niż sygnał H_2 w adenozylinie (+10 Hz dla $H_2(3')$ i 6 Hz dla $H_2(5')$). Wskazuje to na to, że w tej temperaturze obecne są jeszcze szcążkowe oddziaływania zasada-zasada, co świadczy o dużej sile tych oddziaływań.

Prawdopodobnie, zmiany przesunięcia chemicznego ze zmianą temperatury wpływają głównie ze zmian odległości między pierścieniami zasady i zmian kąta dwuściennego między tymi zasadami.

Wiele informacji na temat siły oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych i względnej konformacji obydwóch zasad w dwunukleotydach dostarczyły badania nad wiązaniem puryny przez cząsteczki dwunukleotydu w różnych warunkach eksperymentalnych. Jednak z uwagi na rozległość tego tematu nie będzie on poruszany w niniejszym referacie [1].

3.2. KONFORMACJA RYBONUKLEOTYDÓW PURYNOWO-PIRYMIDYNOWYCH

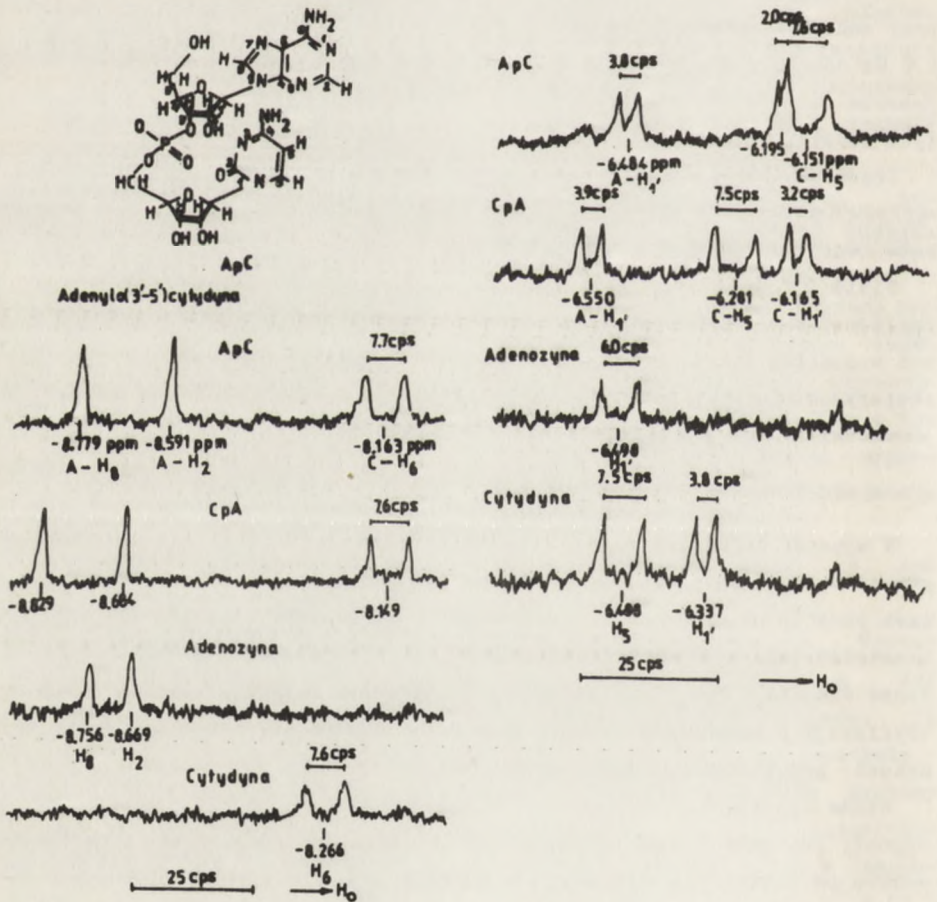
W wypadku dwunukleotydów purynowo-pirymidynowych oddziaływania zasada-zasada są zgodnie z oczekiwaniami mniejsze od oddziaływań w dwunukleotydach purynowo-purynowych. Przeprowadzono szereg badań dla różnych dwunukleotydów tego typu, z czego w referacie będą porównane badania przeprowadzone dla CpA i ApC [2]. Ponieważ ApC różni się od CpA tylko miejscem estryfikacji w poszczególnych nukleozydach, ta strukturalna różnica może ukazać pewne efekty zależności sekwencyjnych.

Widma CpA i ApC przedstawiono na rysunku 10.

Sygnały protonów H_8 odseparowano od sygnałów protonów H_2 na drodze wymiany wodoru na deuter. Okazało się, że leżą one przy najniższym polu. H_6 i H_5 są ze sobą sprzężone i dają dublety z $J_{H_5-H_6}$ około 7,6. Sygnały H_1 są dubletami na skutek sprzężenia z H_2 . Pozostałe protony nie będą rozpatrywane.

Wszystkie sygnały ApC i CpA są przesunięte w porównaniu z komponentami nukleozydowymi. Jest to spowodowane obecnością naładowanej grupy fosforanowej. Sygnały tych samych protonów w ApC i CpA różnią się położeniem ze względu na różną sekwencję połączenia z grupą fosforanową. Oprócz wpływu

grupy fosforanowej na przesunięcie chemiczne protonów ma także wpływ sąsiadująca zasada, przy czym efekt ten jest duży w przypadku adeniny, a mały dla cytozyny [2]. Mamy tu do czynienia ze wzajemnym powiązaniem konformacji zasady, konformacji cukru i asocjacji warstwowej.



Rys. 10. Widma PMR 100 MHz 0.010 M roztworów ApC, CpA, adenozyzny i cytydyny

Tabela podsumowuje badania nad CpC, CpA i ApC

T a b e l a II

Przesunięcia chemiczne (w ppm) protonów cytydynowych
w ApC, CpA, CpC (stężenie 0.010 M)

	H ₆		H ₅		H _{1'}	
	3'	5'	3'	5'	3'	5'
ApC		-8.163		-6.151		-6.195
CpA	-8.149		-6.281		-6.165	
CpC	-8.308	-8.358	-6.400	-6.408	-6.242	-6.331
Różn.przes.	+0.159	+0.195	+0.119	+0.257	+0.077	+0.136

Przesunięcia w górę pola obserwowane dla protonów H₅ w ApC i CpA względem CpC muszą mieć źródło w efekcie anizotropowym adeniny, ponieważ sygnały tych protonów są nieczułe na zmiany konformacji pierścienia rybozy i położenia zasady względem pierścienia cukru. Inaczej jest w wypadku protonów H₆, na których przesunięcie chemiczne wpływa także konformacja pierścienia cukru i konformacja zasady. Zaobserwowano równoczesną zmianę położenia sygnału H₆ i zmianę wielkości stałej sprzężenia J_{H1' - H2''}. Przesunięcie sygnału protonu H₆ w górę pola jest związane ze zmniejszeniem wartości J_{H1' - H2''}, co z kolei oznacza zmianę konformacji rybozy z 2'-endo na 3'-endo [9]. Zmiana konformacji pierścienia powoduje zmianę kąta skręcenia zasady, co z kolei daje zmianę oddziaływań H₆ - O_{1'}.

Badania na modelach Coreya - Paulinga - Koltuna wykazały, że dla efektywnego nakładania się zasada-zasada kąt χ_{CN} musi być bliski przedziałowi od 0 do -10°. Tak więc, jeśli nakładanie zasada-zasada stanowi ważne kryterium dla oczekiwanej asocjacji warstwowej, należy oczekiwać, że im proton H₆ będzie bliższy położeniu konformacji kryjącej, tym silniejsze będzie oddziaływanie.

W CpC, gdzie także występuje asocjacja warstwowa, sygnał H₆ w 3'-fosforanie nukleozydu jest przesunięty w dół pola o wartość 0.06 ppm w porównaniu z monomerem; wraz ze wzrostem temperatury następuje przesunięcie sygnału w górę pola. Ponieważ zasada cytozynowa daje tylko mały efekt anizotropowy, te obserwacje można zinterpretować jako następstwa wpływu asocjacji warstwowej na orientację cytozyny względem pierścienia rybozy.

Efekt asocjacji warstwowej jest mniejszy w CpC niż w ApC lub CpA, co powinno wywołać jeszcze większe przesunięcie w dół pola sygnałów protonów H₆ w ApC i CpA. Jednak protony te leżą przy wyższym polu, co jest dowodem na działanie efektu anizotropii magnetycznej pochodzącego od adeniny.

Czynniki wpływające na przesunięcie chemiczne protonu H_1 , w ApC i CpA są także złożone. Oprócz efektu przesłaniania przez sąsiednią zasadę (większy dla protonu H_1 , cytydyny), istnieje także zależność przesunięcia chemicznego H_1 , od konformacji pierścienia rybozy i konformacji zasady względem pierścienia cukru.

Zależność od konformacji pierścienia rybozy jest konsekwencją małej odległości protonu H_1 , i grupy hydroksylowej 2'-OH (która wykazuje efekt odsłaniający w stosunku do H_1). Ponieważ odległość między H_1 , a 2'-OH jest mniejsza w konformacji 3'-endo niż 2'-endo, zmiana z 2'-endo do 3'-endo powoduje przesuwanie sygnału H_1 , w górę pola.

Zależność przesunięcia chemicznego H_1 , od położenia zasady względem pierścienia cukru wynika z oddziaływania protonu H_1 , z grupy ketonową zasady pirymidynowej (efekt odsłaniania), co powoduje przesuwanie sygnału w górę pola. Wpływ cytozyny na protony adeninowe w CpA i ApC może być ustalony przez porównanie przesunięcia chemicznego tych protonów w ApC i CpA [2] z przesunięciem chemicznym w 5'- i 3'-AMP [10]. Efekt ten silnie zależy od stężenia i dlatego niezbędne jest ekstrapolowanie wyników do roztworów nieskończenie rozcieńczonych.

T a b e l a III

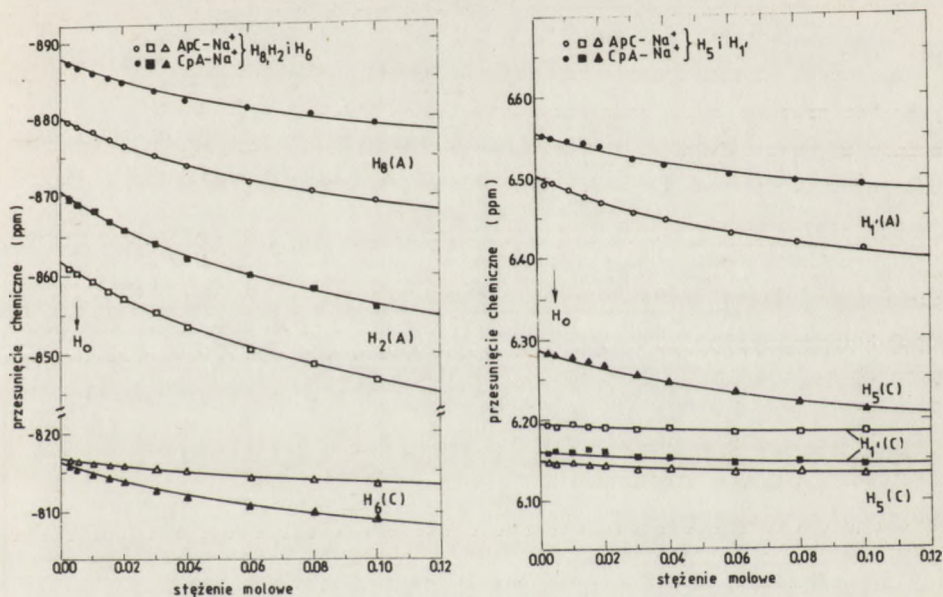
Przesunięcia chemiczne (w ppm) protonów adenozytowych

	H_8	H_2	H_1
ApC	-8.800	-8.619	-6.501
3'-AMP- Na^+ x	-8.805	-8.697	-6.530
Różnica przesunięć chem.	+0.005	+0.078	+0.029
CpA	-8.874	-8.706	-6.556
5'-AMP- Na^+ x	-8.957	-8.705	-6.578
Różnica przesunięć	+0.083	+0.001	+0.022

Wyniki pokazują, że przyłączenie cytydyny do 3'-AMP i 5'-AMP powoduje przesunięcie sygnału H_2 w ApC i H_8 w CpA (które są przesuwane w górę pola o około 0.08 ppm), a ma tylko niewielki wpływ na inne protony. Świadczy to o bardzo małym efekcie anizotropowym cytozyny w porównaniu z efektem anizotropowym adeniny.

W celu określenia stopnia rozległości włączeniowej asocjacji i dla określenia wpływu tej asocjacji na przesunięcia chemiczne poszczególnych protonów przebadano przesunięcia chemiczne w ApC i CpA w różnych stężeniach

niach roztworu. Przebadano zakres stężeń 0.0025 - 0.100 M w temperaturze 29°. Rezultaty tych badań podano na rysunku.

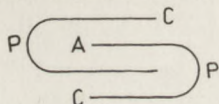


Rys. 11. Zależność przesunięć chemicznych protonów ApC i CpA od stężenia roztworu w temp. 29° w D₂O, TMS zewnątrz

Wszystkie sygnały ze wzrostem stężenia przesuwają się w kierunku wyższego pola. Wartości przesunięcia chemicznego przy stężeniu nieskończenie małym i stężeniu 0.10 M podano w tabeli IV na stronie 140.

Przesunięcie w górę pola ze wzrostem stężenia sugeruje międzycząsteczkową asocjację CpA i ApC. Duże przesunięcia sygnałów protonów adeninowych wskazują na szczególnie duże oddziaływania A-A w międzycząsteczkowej asocjacji. Protony cytozyny wykazują znacznie mniejsze zmiany w przesunięciu chemicznym protonów, co sugeruje, że oddziaływania A-C zachodzą w mniejszym stopniu. Obserwujemy także dość nieoczekiwaną zależność sekwencyjną - zmiany przesunięcia chemicznego H₅ i H₆ są znacznie większe dla CpA niż dla ApC. Różnice te wpływają z różnic geometrycznych w cząsteczkach ApC i CpA i ze związanymi z tym efektami sterycznymi. Możemy mieć do czynienia z dwoma rodzajami asocjacji cząsteczek dwunukleotydów - asocjacją zewnętrzną (gdy oddziaływania zasada - zasada w cząsteczce dwunukleotydu są

silne) lub z asocjacją włączeniową (gdy oddziaływania takie są słabe). W tym ostatnim przypadku, ze względu na silniejszą tendencję do oddziaływań A-A należy oczekiwać włączenia adeniny do fałdy cząsteczki dwunukleotydu. Powstający dimer dla ApC możemy zapisać jako:



T a b e l a IV

Ekstrapolowane wartości przesunięć chemicznych dla roztworów nieskończenie rozcieńcz. i wart. przes. chem. dla 0.10 M roztworów ApC i CpA w 29°

Proton	Przes.chem. dla roztw. nieskończ. rozcieńcz.		Przes.chem. dla roztw. 0.10 M	
	ApC	CpA	ApC	CpA
H ₈ (A)	-8.800	-8.874	0.107	0.082
H ₂ (A)	-8.619	-8.706	0.152	0.146
H ₆ (C)	-8.167	-8.163	0.031	0.069
H ₁ ,(A)	-6.501	-6.556	0.091	0.066
H ₅ (C)	-6.149	-6.287	0.013	0.075
H ₁ ,(C)	-6.194	-6.161	0.008	0.016

Na bazie zależności stężeniowych nie jest możliwe określenie względnej ważności różnych kompleksów agregacyjnych, które mogą wpływać na zmiany przesunięcia chemicznego protonów. Jednak jest prawdopodobne, że w roztworze dwunukleotydu mamy do czynienia z obydwoimi typami takich kompleksów.

Chociaż monofosforany dwunukleozydów, jak również pojedyncze zasady, nukleozydy i mononukleotydy mogą asocjować tworząc dimery, trimery, tetramery itd. w roztworach wodnych [11, 12], to przy stężeniach dwunukleotydu poniżej 0.1 M mogą występować wyłącznie dimery. Taka sytuacja występuje zwłaszcza w wypadku dwunukleotydu pirymidynowo-purynowych ze względu na faworyzowane oddziaływania puryna-puryna i odpowiednio słabe oddziaływanie pirymidyna-pirymidyna.

Zgodnie z tym zinterpretowano przesunięcia stężeniowe w pojęciach równowagi dimerów i monomerów [2].

Wobec takich założeń przesunięcie chemiczne jest dane równaniem:

$$\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{M}} = (\delta_{\text{D}} - \delta_{\text{M}}) \cdot \left\{ \frac{(4 K_{\text{M}} + 1) - (1 + 8 K_{\text{M}})^{\frac{1}{2}}}{4 K_{\text{M}}} \right\}$$

- gdzie: δ_{obs} - wielkość obserwowana przesunięcia chemicznego
 δ_{M} - wielkość przesunięcia chemicznego dla monomeru (odniesiona do roztworu nieskończonego rozcieńczonego)
 δ_{D} - wielkość przesunięcia chemicznego dla dimeru
 K - stała agregacji, 1/mol
 m - stechiometryczne molowe stężenie dwunukleotydów

Wyliczone przez komputer wartości K podano w tabeli:

T a b e l a V

Wartości stałej dimeryzacji K (1/mol)

Proton	ApC			CpA		
	K_b	$K_{\text{śred.}}$	Przes. dimer.	K_b	$K_{\text{śred.}}$	Przes. dimer.
H ₈ (A)	2.7	2.5	0.40	4.0	2.7	0.30
H ₂ (A)	2.4		0.57	2.5		0.51
H _{1'} (A)	3.3		0.35	2.2		0.24
H ₆ (C)			0.11	4.5	2.7	0.26
H ₅ (C)			0.05	1.6		0.26
H ₁ (C)			0.04			0.05

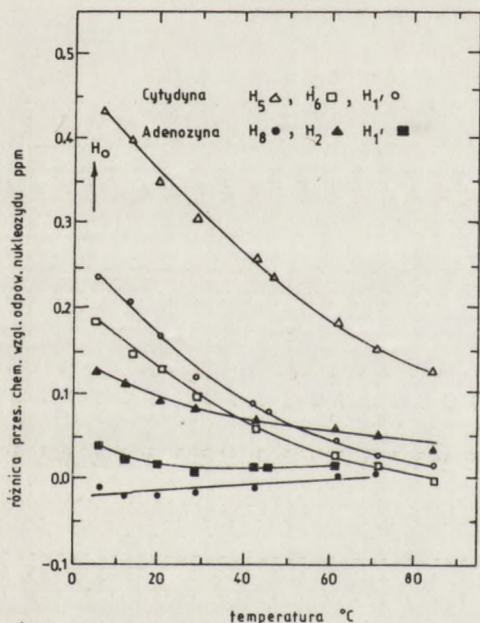
K_b - wybrana wartość K dająca najmniejszą rozbieżność z danymi doświadczalnymi

W tej analizie najlepszy rezultat wartości K został określony przez traktowanie ($\delta_{\text{D}} - \delta_{\text{M}}$) jako parametru uzgodnionego, a K było zmieniane w granicach od 0,5 do 8,0 1/mol przy wzroście o 0,1 1/mol. Wartości K dające najmniejsze różnice dla danego protonu były wybrane jako "najlepsze K " - K_b . Następnie wyliczono K średnie i z niego δ_{D} dla poszczególnych protonów.

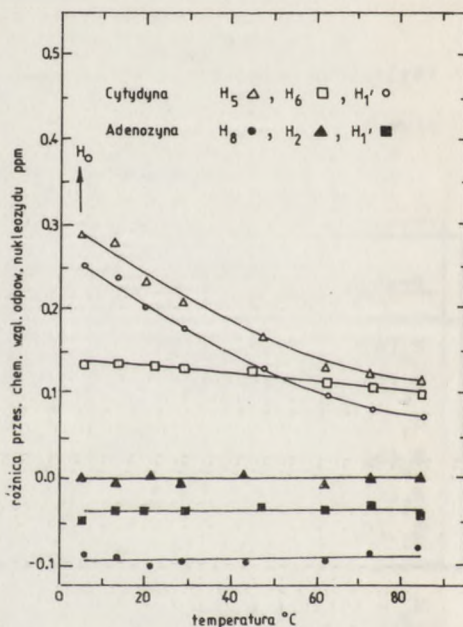
Dane otrzymane z tych obliczeń wykazały, że K dla ApC \approx 2,5, a dla CpA \approx 2,7 1/mol. Mamy więc do czynienia z podobnymi tendencjami do agregacji w wypadku obydwóch dwunukleotydów. Przy stężeniu 0,1 M 25-30% dwunukleotydów jest zdimeryzowanych. Z tego można wyciągnąć wniosek, że efekt wewnętrznej asocjacji warstwowej w cząsteczkach tych dwunukleotydów należy badać przy niskich stężeniach, aby nie był on przesłaniany przez efekt asocjacji międzycząsteczkowej.

W celu lepszego poznania oddziaływań typu asocjacji warstwowej w cząsteczkach ApC i CpA badano zależności temperaturowe na widmach tych dwunukleotydów. Badania prowadzono przy stężeniach 0,01 M. Jako odczynnik zastosowano roztwory adenozyiny i cytydyny w zbliżonych stężeniach. Zakres pomiarów 6-86°.

Zależności temperaturowe przesunięcia chemicznego dla H_8 , H_2 i H_1 , adenozyiny oraz H_6 , H_5 i H_1 , cytydyny w ApC i CpA względem odpowiednich protonów mononukleozydów przedstawiono na rysunku:



Rys. 12a. Zależność przesunięcia chemicznego protonów ApC o temp. 100 MHz, odniesione od wart. przes. chem. odpowiednich nukleozydów roztwór 0.010 M



Rys. 12b. Zależność przesunięcia chemicznego protonów CpA od temp., warunki jak 12a

Zgodnie z oczekiwaniami obserwuje się przesunięcie wszystkich sygnałów cytydyny w dół pola. W badanym zakresie H_5 , H_6 i H_1 , są przesuwane w dół pola o 0.33, 0.19, 0.24, ppm w ApC i 0.16, 0.03, i 0.18 ppm w CpA.

Przesunięcie sygnału H_2 jest bardzo małe (w wypadku ApC 0,09 ppm). Te zmiany przesunięcia chemicznego wywołane są nie tylko zmianą efektu anizotropowego sąsiedniej zasady, lecz także należy brać pod uwagę zmiany konformacji rybozy i zmiany konformacji zasady względem pierścienia cukru. Czułym wskaźnikiem zmian konformacji pierścienia rybozy są zmiany wartości $J_{H_1'-H_2}$. Wartości te dla adenozyiny i cytydyny w ApC i CpA podano w tabeli VI na str. 143.

Ponieważ $J_{H_1'-H_2}$ są faktycznie niezależne od temperatury w mononukleozydach i mononukleotydach, obserwowane zmiany wartości w ApC i CpA muszą odzwierciedlać zmiany asocjacji warstwowej. Dane temperaturowe wskazują, że konformacja rybozy nukleozydów cytydyny i adenozyiny cząsteczek ApC i

CpA występuje w większym stopniu w konformacji 3'-endo, gdy mamy do czynienia z oddziaływaniami typu asocjacji warstwowej.

T a b e l a VI

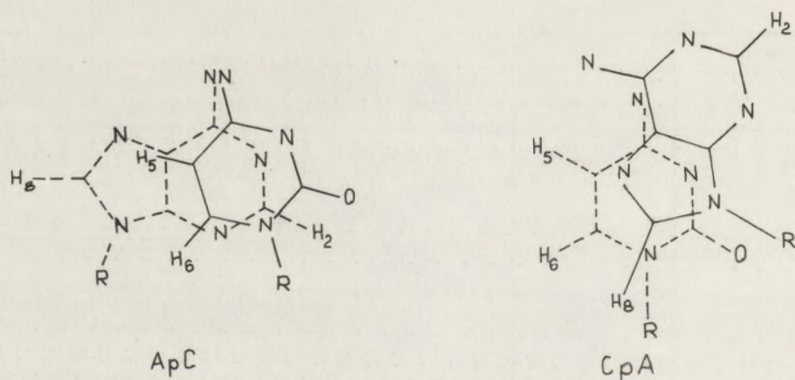
Temperaturowa zależność stałej sprzężenia $J_{H_1, -H_2}$,
dla dwóch jednostek dimerów ApC i CpA

Temp. (°C)	$J_{H_1, -H_2}$			
	ApC		CpA	
	A	C	A	C
6	2.5	1.8	2.8	2.1
13	3.1	2.0	3.0	2.5
20			3.4	2.7
21	3.3	2.4		
29	3.9		3.8	3.3
43	4.1	2.6		
46	4.3	2.8	4.4	3.6
62	4.5	3.5	4.7	4.2
72	4.7	3.0		
74			4.8	3.7
86	4.8		4.8	4.4

Z punktu widzenia dużych zmian konformacyjnych w szkielecie cukrowo fosforanowym, przez asocjację warstwową i możliwe dodatkowe efekty związane ze zmianami konformacji zasady względem pierścienia rybozy, można stwierdzić, że tylko zmiany temperaturowe dla protonów H_5 cytydyny i H_2 adenyzy mogą być interpretowane jako spowodowane wyłącznie zmianą oddziaływania typu asocjacji warstwowej. Obserwowane przesunięcie sygnału $H_5(C)$ dla ApC wynosi 0,46 ppm w porównaniu z cytydyną (w 6°C), co wskazuje na duży efekt asocjacji warstwowej. Przy maksymalnym nakładaniu się zasad przesunięcie powinno się wahać w granicach od 0,5 do 0,6 ppm. Stąd można wnioskować, że w 6°C około 75% ApC występuje jako cząsteczka z zasadami powiązanymi ze sobą efektem asocjacji warstwowej. Dla $H_5(C)$ w CpA obserwuje się mniejsze przesunięcie w stosunku do cytydyny, wynoszące 0,28 ppm w 6°C.

Obserwowane przesunięcie $H_2(A)$ w ApC wskazuje na mały efekt anizotropowy cytozyny. Podobnego efektu nie obserwuje się dla CpA. W 86°C obserwuje się dla CpA i ApC przesunięcie sygnałów protonów H_5 o około 0,15 ppm w stosunku do cytydyny, co świadczy, że w tej temperaturze asocjacja warstwowa ma jeszcze miejsce.

Różnice w przesunięciu dla CpA i ApC wpływają z różnic w budowie tych cząsteczek. Temperaturowe zmiany są mniejsze dla CpA niż dla ApC. Z rozważań modeli CPK wynika, że jest to spowodowane możliwością nakładania się zasad w ApC niż w CpA.



Rys. 13. Najbardziej prawdopodobne konformacje dla zasocjowanych cząsteczek ApC i CpA

Z modeli wynika ponadto, że ze względu na steryczne warunki zasady pirymidynowe muszą znajdować się w konformacji anti, a purynowe w preferowanej konformacji anti lub w konformacji syn.

Obserwowany duży efekt zmiany przesunięcia chemicznego $H_{1,(C)}$ nie może być tłumaczony efektem anizotropowym, ponieważ żaden z tych protonów nie leży w obszarze oddziaływań z adeniną. Tłumaczy się to raczej zmianą konformacji pierścienia rybozy (ze zmianą temperatury zmniejsza się ilość konformeru 3'-endo) i zmianą położenia zasady względem pierścienia rybozy. Obydwa te efekty powinny dawać odsłanianie $H_{1,(C)}$ ze wzrostem temperatury. Z badań temperaturowych przesunięcia chemicznego protonu H_6 wynika, że w wyższych temperaturach CpA jest skoniugowany w większym stopniu niż CpA (różnica w przesunięciu chemicznym protonu H_6 w CpA i cytydynie w 86° jest znacznie większa niż różnica między przesunięciem chemicznym protonu H_6 w ApC i cytydynie).

3.3. PODSUMOWANIE BADAŃ NAD OLIGORYBONUKLEOTYDAMI

W podsumowaniu badań oligorybonukleotydów można wyciągnąć szereg interesujących wniosków.

Z zamieszczonych rozważań jasno wynika, że oddziaływania typu asocjacji

warstwowej w sposób zasadniczy wpływają na zmianę konformacji dwunukleotydów. O ile np. preferowaną konformacją rybozy dla mononukleotydów purynowych jest konformacja S, o tyle w cząsteczkach 3', 5'-dwunukleozydomonofosforanów zasocjowanych wewnętrznie możliwa jest wyłącznie konformacja typu N pierścienia rybozy. Podobnie asocjacja warstwowa w cząsteczkach dwunukleotydów preferuje w sposób wyraźny konformację anti dla obydwóch zasad cząsteczki dwunukleotydu. Tę zależność konformacji rybozy od stopnia asocjacji warstwowej można najlepiej obserwować na podstawie zmian stałych sprzężenia protonów rybozy [2, 3, 5, 13] wraz ze zmianą temperatury. W przeciwieństwie do dwunukleotydów, zmiany takie nie występują w wypadku monomerów, co sugeruje ścisłe powiązanie asocjacji warstwowej ze zmianami temperaturowymi stałych sprzężenia. Obliczone na podstawie stałej sprzężenia $J_{H1' - H2'}$ udziały procentowe pierścienia rybozy typu N przedstawiono w tabeli.

T a b e l a VII

Wartości stałych sprzężenia $J_{H1' - H2'}$ dla niektórych dwunukleotydów (Hz)

Temp.	Rozpuszczalnik	$J_{H1' - H2'}$	% N	$J_{H1' - H1'}$	% N
	A3'p5'A	część A3'		część A5'	
4	D ₂ O	2.5	75	2.0	80
30	D ₂ O	3.2	68	3.5	65
60	D ₂ O	4.5	55	4.1	59
30	DMSO	6.6	35	5.8	43
	A3'p5'C	część A3'		część C5'	
4	D ₂ O	2.4	76		
39	D ₂ O	3.7	63	2.0	80
60	D ₂ O	4.5	55	3.0	70
	A2'p5'A	część A2'		część A5'	
4	D ₂ O	4.5	55	3.0	70
30	D ₂ O	4.5	55	2.7	73
60	D ₂ O	5.2	49	4.0	60
30	DMSO	5.9	42	5.8	43
	A2'p5'C	część A2'		część C5'	
4	D ₂ O	6.7	34	< 1	> 90
30	D ₂ O	6.6	35	< 1	> 90
60	D ₂ O	6.6	35	< 1	> 90
30	DMSO	5.4	47		

Z danych tych wynika, że A3' p5' A zawiera około 75 - 80% pierścieni rybozy typu N w temperaturze 4°, podczas gdy dane UV, ORD i CD sugerują, że asocjacja warstwowa w tej temperaturze obejmuje jedynie około 70% cząsteczek [14]. Wraz ze wzrostem temperatury udział konformeru typu N zmniejsza się, zmniejsza się również ilość zasocjowanych wewnętrznie cząsteczek. Te obserwacje sugerują, że gdybyśmy obniżyli temperaturę aż do uzyskania 100% zasocjowanych cząsteczek, mielibyśmy do czynienia wyłącznie z konformerem typu N, a ściślej mówiąc typu N_s (N-Stacked). Natomiast konformację pierścienia rybozy cząsteczek dwunukleozydu pozbawionych asocjacji warstwowej, których ilość wzrasta wraz ze wzrostem temperatury, możemy oznaczyć jako S_u (S-Unstacked). Oprócz tego możemy mieć także do czynienia z formą N_u (N-Unstacked). W temperaturze, gdzie występuje prawie zupełny brak asocjacji warstwowej mamy do czynienia z równowagą między konformerami między S_u i N_u. Ponieważ oddziaływania między jednostkami 3' i 5' dimeru, w którym występuje brak asocjacji warstwowej są bardzo małe, termodynamiczne własności równowagi N_u ⇌ S_u części 3' i 5' dwunukleotydu mogą być opisane przez własności równowagi N ⇌ S odpowiednich mononukleotydów. Przedstawiona powyżej propozycja opisu równowagi w cząsteczkach dwunukleotydów została zaproponowana przez Altonę i Sundaralingama [4]. Jest to próba stworzenia trójstanowego dynamicznego modelu równowagi w miejsce dotychczas stosowanego modelu dwustanowego [1, 15]. W obecnym modelu mamy do czynienia z formą S_u, będącą w równowadze z N_u, która z kolei jest w równowadze z N_w konformerem, występującym w RNA i formie A DNA. W pierwszym przybliżeniu nowy trójstanowy model nie jest zgodny z danymi UV, CD i ORD, w których nie mogą istnieć więcej niż dwa konformery o różnych własnościach optycznych. Jednak badania CD nukleotydów pirymidynowych wykazały, że zmiana konformacji rybozy z N do S nie wywołuje wyraźnych zmian w efekcie Cottona, jeżeli zasada jest w położeniu anti.

Tak więc metody optyczne wykazują jedynie zmiany konformacji z N_u na N_s i odwrotnie. W związku z tym model trójstanowy jest zgodny z danymi optycznymi, w przeciwieństwie do modelu dwustanowego, którego założenia nie zgadzają się z wynikami uzyskanymi za pomocą metod optycznych. Potwierdzeniem tej hipotezy może być fakt, że krystaliczna U3' p5'A istnieje w formie niezasocjowanej warstwowo, mimo że zawiera obydwa pierścienie rybozy w konformacji N.

Przyjrzyjmy się pozostałym danym zamieszczonym w tabeli VII. W formie zasocjowanej A3' p5' C pierścienie rybozy występują w konformacji N. W 60° ilość konformerów N_s wynosi tylko 15% (jak wynika z danych optycznych). Pozostała ilość konformeru N obecnego w 60° reprezentuje formę N_u. Tak

więc stosunek N_u/S_u wynosi 65:35, co jest zgodne z danymi równowagi dla monomeru 5'-CMP.

W tabeli podane są również dane dla innego typu dwunukleotydu niż dotychczas rozważonych 3', 5' fosforanów dwunukleozydów. W wypadku 2', 5' - dimerów np. A2' p 5'C mamy do czynienia z nieco inną sytuacją. Asocjacja warstwowa w tym wypadku jest znacznie silniejsza niż dla analogicznych dwunukleotydydów 3', 5', a zmiany temperaturowe stałych sprzężenia bardzo małe. Jak wynika z dotychczasowych prac nad 2', 5' - fosforanami dwunukleozydów, pierścień rybozy w części 5' zasocjowanej cząsteczki wyraźnie preferuje formę N, przy czym uprzywilejowanie jest większe niż dla 3', 5' dimerów (w 60° obecne jest najmniej 10% S_u i 20% N_u , a pozostałe 70% to forma N_s). Natomiast nukleozyd 2' w A2' p5' A i A 2'p5'C zawiera więcej konformeru S niż wynikałoby z obliczeń, jeśli założymy, że asocjacja warstwowa jest możliwa tylko w wypadku, gdy obydwie części cząsteczki dwunukleotydu mają konformację N. To prowadzi do wniosku, że istnieje możliwość występowania dwóch typów zasocjowanych cząsteczek opisanych jako A(N)2'p5' A(N) i A(S)2'p5'A(N) i podobnie A(N)2' p5'C(N) i A(S)2'p5'C(S).

3.4. BADANIA OLIGODEZOKSYRYBONUKLEOTYDÓW

Dotychczas opublikowano niewiele prac dotyczących 2'-dezoksyrybo-dwunukleotydydów [3, 16]. Przeprowadzone przez Ts'ó i współpracowników badania dA3' p5'dA wykazały pewne różnice między stereochemią cząsteczek dwunukleotydydów serii rybo i dezoksy.

Autorzy ci, na podstawie zmierzonych stałych sprzężenia, obliczyli z równania Karplusa kąty $\Phi_{H1'-H2'}$ (cis) $\Phi_{H1'-H2'}$ (trans) $\Phi_{H2'-H3'}$ (cis) $\Phi_{H2'-H3'}$ (trans) i porównali je z wynikami analizy stereochemicznej, przeprowadzonej przez Smitha i Jardetzky'ego [17]. Na podstawie tych badań wyprowadzili oni wnioski, że konformacja furanozy dla 3'dAMP i części dAp - w dApDA jest typu S (C2'-endo lub C2'-endo-C3'-egzo). Natomiast konformacja furanozy dla 5'-dAMP i części - pDA w dApDA jest szybką równowagą między formami S(C2'-endo) i N(C3'-endo).

W przeciwieństwie do ApA wartości $J_{H1'-H2'}$ (cis) i $J_{H1'-H2'}$ (trans) dApDA nie są czułe na zmianę temperatury lub zmianę rozpuszczalnika z D_2O na DMSO - d_6 . Ponadto stałe sprzężenia $J_{H1'-H2'}$, $J_{H1'-H2''}$, $J_{H2'-H3'}$, $J_{H2''-H3''}$ są bardzo podobne do analogicznych stałych sprzężenia odpowiednich monodezoksynukleotydydów.

Te wszystkie rezultaty sugerują, że tworzenie wewnętrznego oddziaływania typu asocjacji warstwowej w cząsteczce dApDA nie pociąga za sobą zmiany konformacji pierścienia furanozowego.

Wpływ temperatury i rozpuszczalnika na wartości przesunięcia chemicznego i stałej sprzężenia protonu H_1 , monofosforanów mono-, dwurybo- i-dezoksyrybonukleotydów

Temp. °C	5'-dAMP		5'-AMP		dApdA				rAprA			
	J	δ	J	δ	dAp		pdA		rAp		prA	
					J	δ	J	δ	J	δ	J	δ
6	6.6	6.804			8.8,5.6	6.457	6.4	6.605	2.5	6.20	2.0	6.31
28	6.8	6.897	5.6	6.51	8.5,5.5	6.535	6.4	6.718	3.2	6.29	3.5	6.41
60			5.6	6.62	7.9,6.0	6.669	6.7	6.860	4.5	6.43	4.1	6.555
70	6.8											
82			5.5	6.63								
92	6.7											
DMSO-d ₆	6.8	6.788	5.5	6.28	7.9,5.7	6.682	6.1	6.721	6.8	6.23	5.2	6.29

Te zdecydowanie inne własności wynikają z różnic w budowie szkieletu cukrowo-fosforanowego w wypadku dezoksy- i rybodwunukleotydów. W celu lepszego zrozumienia przyczyn tych różnic przebadano metodami NMR i CD [18] dimery 2'-O-metylowe. Z otrzymanych tymi metodami danych wynika, że własności dwunukleotydów rybozylowych i 2'-O-metylorybozylowych są prawie identyczne. Czyli różnice w zachowaniu dwunukleotydów dezoksy- i rybozylowych nie wynikają z wiązania wodorowego związanego z grupą 2'-OH.

Bangerter i Chan wysunęli hipotezę [2], że niewiązaniowe odpychanie między grupą 2'-hydroksylową w części rNp dimeru a zasadą i atomem tlenu furanozy części prN dimeru prowadzi do sterycznych przeszkód w asocjacji warstwowej dwunukleotydu rybozylowego. Przeszkody takie powinny być zredukowane do minimum w wypadku dezoksydwunukleotydu.

Prawdopodobnie z w/wym. przyczyn również obserwujemy silniejszą asocjację warstwową dwunukleotydów serii dezoksy w porównaniu z analogicznymi dwunukleotydami serii rybo.

Jeśli chodzi o konformację zasad w dezoksydwunukleotydach, to stwierdzono, że podobnie jak w wypadku rybodwunukleotydów obydwie zasady znajdują się w położeniu anti.

4. PODSUMOWANIE

Nawet pobieżne zapoznanie się z wynikami badań dwunukleotydów metodą PMR pozwala na stwierdzenie, że metoda ta daje wyjątkowo dużo cennych in-

formacji na temat struktury poszczególnych komponentów dwunukleotydów i ich wzajemnego powiązania. Odpowiednia metodyka badań pozwala również na określenie charakteru i siły wewnątrzcząsteczkowej asocjacji warstwowej, jak również na temat wielkości agregacji i struktury powstających w roztworach agregatu. Zdecydowana większość spotykanych prac dotyczy jednak oligonukleotydów serii rybo, a tylko nieliczne prace traktują na temat dezoksyoligonukleotydów. Wydaje się więc celowe przeprowadzenie dokładnych studiów dezoksyrybonukleotydów, co pozwoli lepiej zrozumieć oddziaływania występujące w naturalnym DNA i w pełni poznać jego strukturę.

LITERATURA

- [1] Chan S.I., Nelson J.H.; J.Am.Chem.Soc. 91, 168 (1969).
- [2] Bangerter B.W., Chan S.I.; J.Am.Chem.Soc. 91, 3910 (1969).
- [3] Fang K.N., Kondo N.S., Miller P.S.; P.O.P.Ts'o, J.Am.Chem.Soc. 93, 6647 (1971).
- [4] Altona C., Sundaralingam M.; J.Am.Chem.Soc. 95, 2334 (1973).
- [5] Hruska F.E., Danyluk S.S.; J.Am.Chem.Soc. 90, 3266 (1968).
- [6] Broom A.D., Schweizer M.P.; P.O.P.Ts'o, J.Am.Chem.Soc. 89, 3612 (1967).
- [7] Chan S.I., Schweizer M.P.; P.O.P.Ts'o, Helmkamp F.K.; J.Am.Chem. Soc. 86, 4182 (1964).
- [8] Schweizer M.P., Chan S.I.; P.O.Ts'o, J.Am.Chem.Soc. 87, 5241 (1965).
- [9] Jardetzky C.D.; J.Am.Chem.Soc. 84, 62 (1962).
- [10] P.O.P.Ts'o, Melvin I.S., Olson A.C.; J.Am.Chem.Soc. 85, 1289 (1963).
- [11] Schweizer M.P., Broom A.D.; P.O.P.Ts'o, J.Am.Chem.Soc. 90, 1042 (1968).
- [12] Van Holde K.E., Rossetti G.P.; Biochemistry, 6, 2189 (1967).
- [13] Hruska F.E., Danyluk S.S.; Biochemistry 7, 1038 (1968).
- [14] Powell J.T., Richards E.G., Gretzer W.B.; Biopolymers 11, 235 (1972).
- [15] Brahm J., Maurizot J.C., Michelson A.M.; J.Mol.Biol. 25, 481 (1967).
- [16] Mc Donald C.C., Philips W.D., Lazar J.; J.Am.Chem.Soc. 89, 4166 (1967).
- [17] Smith M., Jardetzky C.D.; J.Mol.Spectrosc. 28, 70 (1968).
- [18] Bobst A.M., Rottman F.E., Cerutti P.A.; J.Am.Chem.Soc. 91, 1246, 4696 (1969).

DYSKUSJA

W dyskusji głos zabrali: mgr A. Pohorille I.B.B. PAN Warszawa, mgr M. Remin I.B.B. PAN Warszawa.

Pierwszy z dyskutantów zwrócił uwagę, że informacje dotyczące energetyki procesu stackingu są tylko jakościowe, a ilościową stronę procesu doskonale obrazują inne metody; szczególnie dużo informacji uzyskać można z metod optycznych.

Drugi dyskutant poinformował o nie opublikowanych jeszcze pracach badaczy rosyjskich, które dotyczyły badania zmian przesunięcia chemicznego protonów zasad w oligonukleotydach od zmiany stężenia roztworu. Badacze ci przebadali dosyć dokładnie dość duży zakres stężeń, a uzyskane w ten sposób wykresy zależności różnią się nieco od wykresów uzyskanych przez Chana i Ts'o. Nie ma jednak jeszcze dobrej interpretacji tych wyników.

Tytus Dzięgielewski

ZASTOSOWANIE NMR WYSOKIEJ CZĘSTOTLIWOŚCI DO BADANIA STRUKTURY tRNA

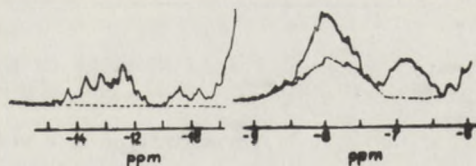
STRESZCZENIE

W referacie przedstawiono wyniki badań II i III rzędowej struktury tRNA w roztworze, za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego wysokiej częstotliwości.

Omówiono różnice występujące w konformacji tRNA^{Leu} z drożdży w stanie natywnym i zdenaturowanym, konformację naładowanego i nienaładowanego tRNA^{Phe} z drożdży.

Wyniki badań NMR wysokiej częstotliwości porównano z danymi uzyskanymi innymi metodami badania struktury tRNA.

Widmo NMR tRNA w roztworze wodnym (pokazano na przykładzie drożdżowego tRNA^{Phe}) w zakresie między -6 a -15 ppm. przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Widmo NMR 220 MHz roztworu tRNA^{Phe} z drożdży. W wodzie (—), w D₂O (---), temp. 35°C, stężenie 2mM, 0.1 M NaCl, 5mM Mg⁺², pH 5.0

Zakres ten można podzielić na trzy regiony:

Region I od -6 do -9 ppm.*

Region II od -11 do -15 ppm.

Region III od -9 do -11 ppm.

* Wartości (-ppm.) oznaczają pozycje pasm absorpcji leżących w kierunku niższych pól od wzorca, którym był DSS.

REGION I: OD -6 DO -9 PPM.

Badania NMR [1] sugerują występowanie 3 typów różnych pasm absorpcji obserwowanych w tym regionie. Absorbują tutaj:

- nie wymienialne protony związane z zasadami, tj. adeniną H(8) i H(2), guaniną H(8) i pirymidyną H(6) [2, 3, 4],
- wolne protony grup aminowych z zasad nie sparowanych [4],
- wodorowo związane protony grup aminowych z par zasad [5, 6].

Wymienialne protony jest łatwo odróżnić od niewymienialnych, przez porównanie widm otrzymanych w H₂O i D₂O (patrz rys. 1).

Z porównania tych widm z wewnętrznym standardem [7] została określona ogólna liczba nie wymienialnych protonów w tym regionie. Otrzymany rezultat 89[±]4 bardzo dobrze zgadza się z wartością 89 obliczoną ze składu zasad tRNA^{Phe} drożdżowego.

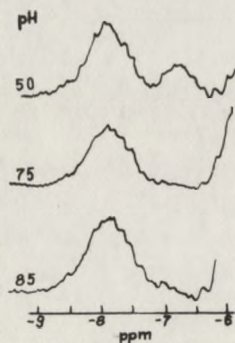
Oznaczenie i ogólną ilość protonów aromatycznych uzyskano przez porównanie z wymienialnymi protonami obserwowanymi w zakresie między -6 a -9 ppm. w widmach w wodzie i D₂O (patrz tab. 1).

T a b l i c a 1

Liczba wymienialnych protonów obserwowanych w różnych regionach widma

pH	-6 do -7.4 ppm	-7.4 do -9.0 ppm	razem od -6 do -9 ppm
5.0	45	67	112
7.5	6	67	73
8.5	0	63	63

Na rys. 2. przedstawiono zależność widma w wodzie od pH, a różnice ilościowe podano w tab. 1.



Rys. 2. Widmo NMR 220 MHz tRNA^{Phe} z drożdży. Zależność widma od pH temp. 35°C

Porównanie widm w wodzie i D₂O przedstawione na rys. 1 wskazuje, że istnieją dwie klasy wymienialnych protonów obserwowanych w regionie od -6 do -9 ppm.: klasa powyżej i poniżej -7.4 ppm. (w punkcie tym widma w wodzie i D₂O zachodzą na siebie).

Widma pokazane na rys. 2 wskazują na dwie grupy pasm zależnych od pH. Pasma występujące pomiędzy -7.4 a -8.7 ppm. są mniej zmienne od pH (w granicach od 5 do 8) niż pasma występujące pomiędzy -6.3

z -7.4 ppm. W zakresie od -6.3 do -7.4 ppm. pasma znikają przy wyższych wartościach pH. W drugiej części I regionu określono 89 nie wymiennalnych aromatycznych protonów (błąd oznaczenia $\pm 10\%$).

Dla pozycji pasm zależnych od pH (tzn. od -6.3 do -7.4 ppm.) znaleziono wolne protony pochodzące z grup aminowych, z nie związanej adeniny, guaniny i cytozyny. Opierano się na fakcie, że wolne mononukleotydy mają podobne wartości pozycji pasm absorpcji w wodnych jak i w nie wodnych roztworach, co przedstawiono w tabelicy 2:

T a b l i c a 2

Pozycje pasm absorpcji protonów grup NH_2 (w ppm.)

Zasada	H_2O	R o z p u s z c z a l n i k		Para zasad
		CHCl_3	DMSO	
Adenina	-6.6	-6.0(=)	-7.2(=)	
Guanina	-6.4		-6.4(§) -6.5(=)	-7.7(§) -7.4(=)
Cytozyna	-7.0(*)		-7.3(=)	-7.9(=) -7.9

(*) dublet z sygnałami -6.8 i 7.2 ppm.

(§) F.Schweihardt, C.Moll, N.Li (1970). J.Mag.Resonance 2, 35

(=) patrz literatura, pozycja nr 5

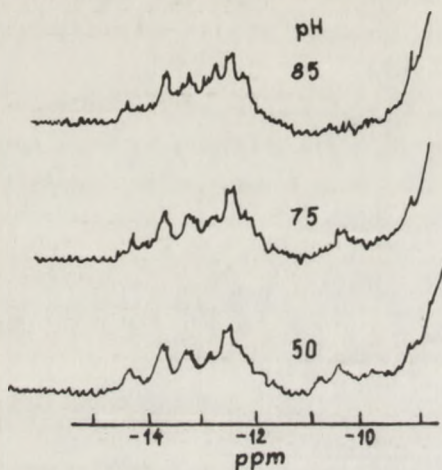
Jednakże protony grup aminowych z tRNA są bardziej stabilne w pH 5, podczas gdy pasma pochodzące od grup aminowych pewnych mononukleotydów wykazują różnice w zależności od pH [8].

Pasma pochodzące od wymiennalnych protonów z tRNA, występujących pomiędzy -7.4 a -9.0 ppm., wskazują na wodorowo związane protony w zasadach (patrz porównanie z układem modelowym w tab. 2).

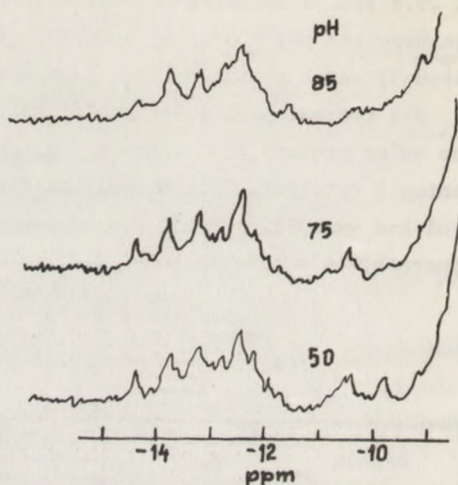
Szybkość wymiany jest mniej zależna od pH, ponieważ wiązania wodorowe generalnie są mniej czułe na wymianę z wodą.

REGION II: OD -11 DO -15 PPM.

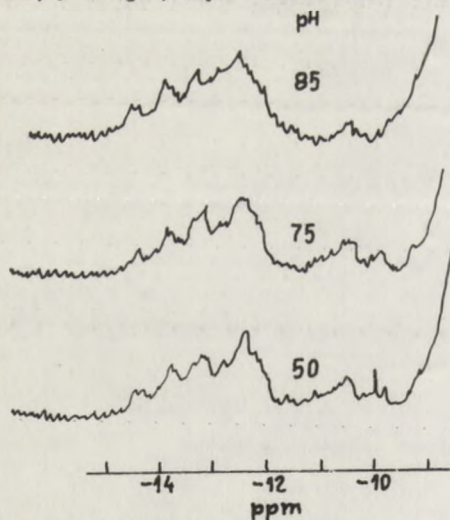
Na rysunkach 3, 4, 5 przedstawiono zależność widma w niskich polach od pH i temperatury.



Rys. 3. Widmo NMR 220 MHz tRNA^{Phe} z drożdży. Zakres od -9 do -15 ppm, temp. 48°C, pH 5.0, 7.5, 8.5, 0.1 M NaCl, 5 mM Mg²⁺, stęż. tRNA 2 mM



Rys. 4. $t=35^{\circ}\text{C}$, pH=5.0, 7.5, 8.5



Rys. 5. $t=5^{\circ}\text{C}$, pH=5.0, 7.5, 8.5

Widzimy, że proton z wodorowo związanych par zasad (N—H...N) absorbuje przy -12.5 ppm. dla G-C i -13.5 ppm dla A-U lub A-T.

Interesujący jest fakt, że widma wykonywane w różnych warunkach pH ($5 \leq \text{pH} \leq 8.5$) i temperatury (5°C , 35°C , 48°C) wykazują małe różnice w intensywności i ogólnym wyglądzie (rys. 3-5).

Widma NMR 220 MHz tRNA^{Phe} z drożdży. Zakres od -9 do -15 ppm., inne warunki patrz rys. 3.

Pasma występujące w tym regionie przypisuje się protonowi ugrupowania NH tworzącego wiązania wodorowe z azotem pierścienia komplementarnej zasady [7, 9]. Każdy proton odpowiada jednej parze zasad, ponieważ jedna para zasad Watsona-Cricka zawiera akurat jeden proton z ugrupowania NH, tj.: U₃H lub G₁H. Wyniki te otrzymano przez porównanie z pasmami związków modelowych (tablica 3).

Zestawienie pozycji pasm absorpcji protonów ugrupowania NH tworzącego wiązania wodorowe z drugim pierścieniem w parach zasad w różnych układach modelowych (w ppm.)

Para zasad	(A _P) ₅ +poli U	oligomer d(A·T)	ΔAACAA ΔTTGTT	monomer
A-T		-13.5	-13.5	
A-U	-13.5			
G-C			-12.5	-12.5

Liczbę protonów występujących w tym regionie określono na dwóch drogach:

1. Poszczególne intensywności sygnałów rezonansowych porównywano z sygnałami rezonansowymi grupy metylowej z MbCN [10] $A_{260} = 1.03 \times 10^4$ dla MbCN [11] i $A_{260} = 5.25 \times 10^5$ dla tRNA^{Phe} z drożdży (21 $A_{260} = 1$ mg/ml). Ponieważ powtarzalność widma na aparacie Varian 220 MHz, na którym wykonywano widmo jest lepsza niż 5%, konieczne było tylko porównanie intensywności pasma w dwóch regionach spektralnych w tych samych warunkach. Dla regionu od -11,5 do -15 ppm. uzyskano wynik 21 ± 3 protony.

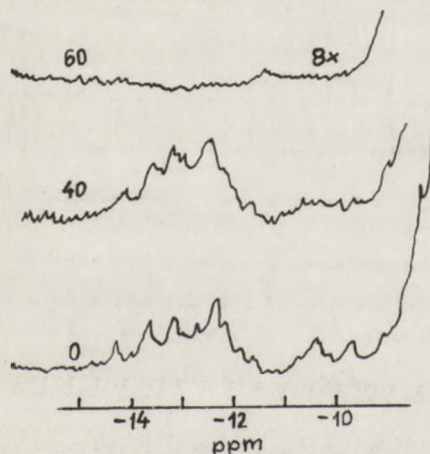
2. Wykonano widmo na aparacie częstotliwości podstawowej 300 MHz i w zakresie od -11 do -15 ppm porównywano intensywności pasm między sobą.

REGION III: OD -9,0 DO -11 PPM.

Pasma absorpcji występujące w tym regionie są najtrudniejsze do interpretacji. Opierając się na porównaniu z intensywnością występującą w regionie od -11 do -15 ppm, względna intensywność pasm występujących w regionie III odpowiada 4 lub 5 protonom w temperaturze 35°C i pH 5,0. Jak pokazano na rys. 3-5 pasma mają tendencję do znikania, jeżeli podnosimy pH lub temperaturę. Na rys. 3-5 pokazano, że pierwsze znika pasmo o środku ciężkości leżącym przy -9.8 ppm. Warto podkreślić, że w warunkach, w których pasma występujące w regionie III rozszerzają się i znikają, kształt pasm występujących w regionie II jest mało zmieniony (patrz rys. 3). Ponadto ten sam rysunek ilustruje wpływ różnych pH na kształt pasm występujących w tych regionach, szczególnie pomiędzy pH 5.0 a 7.5.

Poprzednio doniesiono, że tRNA^{Phe} z E.coli [9] poszerzeniu się pasm w regionie III wraz ze zwiększeniem temperatury towarzyszy poszerzenie się pasm występujących w pobliżu -13.5 ppm.

Fakt, że poszerzenie się pasm występujących pomiędzy -9.0 a 11 ppm. związane jest ze stosunkowo małą zmianą temperatury, sugeruje możliwość, że zjawisko to związane jest z III rzędową strukturą tRNA. Podstawą do wysunięcia tego przypuszczenia było osłabienie III rzędowej struktury tRNA w niższych temperaturach przez dodanie wzrastających ilości DMSO [12]. Wyniki tego doświadczenia przedstawiono na rys. 6.



Rys. 6. Widmo NMR 220 MHz tRNA^{Phe} z drożdży w wodzie i w roztworach zawierających 40 i 60% DMSO. Temperatura = 35°C

Denaturację mierzono przez pomiar pasm leżących w niskich polach pochodzących od protonów aromatycznych [12], które są rezultatem nie nakładania się (unstacking) zasad purynowych i pirymidynowych. W 40% DMSO niektóre małe zmiany obserwuje się w regionie "aromatycznym" widma, lecz drastyczne zmiany występują w regionie III. Integracja wykazująca 4 do 5 protonów spada do 2.

Gdy stężenie DMSO zwiększyć do 60%, to kształt pasm pochodzących od protonów aromatycznych jest zaostrzony, a same pasma przesunięte są w stronę niskich pól, wskazując raczej kompletny brak nakładania się zasad. W tych wa-

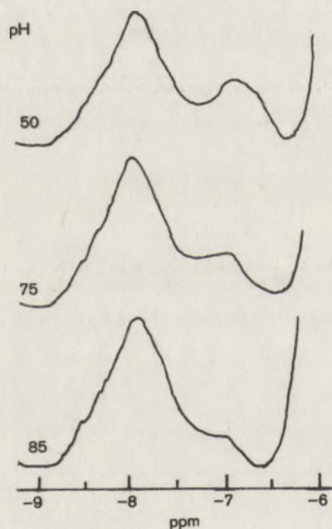
runkach całe widmo wymienialnych protonów było kompletnie zniszczone. Układ tych eksperymentów podtrzymuje stwierdzenie, że region III jest związany z III rzędową strukturą tRNA. Jednakże obecnie nie można jednoznacznie tych pasm przypisać i podaje się także inne możliwości: za pasma te odpowiadają grupy NH_2 , związane za pomocą niezwykle silnych wiązań wodorowych. Ponieważ część protonów azotu pierścienia z par, A-U może absorbować daleko w niskich polach, można wyobrazić sobie, że protony grup NH_2 z tych samych par zasad mogą uwidaczniać się w pasmach niskich pól przy wartości -10 ppm zamiast -6.6 ppm (przyjmując obserwacje dla AMP). Jakościowe obserwacje większych intensywności w regionie III dla tRNA z dużą ilością par A-U wydają się podtrzymywać tę propozycję [9]. Alternatywnie, pasma te można przypisać protonom z azotu pierścienia, które są związane z nietypowymi parami zasad.

Istnieje także możliwość, że sygnały rezonansowe związane są z protonami grup NH pierścienia reszt U i G, które chociaż nie sparowane, mogą występować w pewnym specjalnym ctoczeniu, gdzie szybkość wymiany protonów obniża się na tyle, że sygnał może być wykrywalny. W dodatku na czułość tych

pasem wpływa pH i temperatura, co zgadzałoby się z układem modelowym, gdzie wykazano, że sygnały z U_3H przesuwają się z -8 ppm w $CHCl_3$ do -11.5 w DMSO i wreszcie do -13.5 w roztworach wodnych.

NIEFRAKCJONOWANY tRNA DROŹDZOWY

Dla wykazania zależności kształtu widma od pH przeprowadzono pomiary używając niefrakcjonowanego tRNA z drożdży [1] (patrz rys. 7). Jak widać, pasma nie są dobrze wykształcone w porównaniu z $tRNA^{Phe}$ z drożdży, z powodu nakładania się pasm pochodzących z różnych tRNA. Zależność od pH dla całego regionu jest bardzo podobna jak dla czystego $tRNA^{Phe}$ z drożdży, co sugeruje, że właściwość ta jest podobna dla wielu tRNA.



Rys. 7. Widmo NMR 220 MHz niefrakcjonowanego tRNA drożdżowego. $t = 35^{\circ}C$ (inne warunki patrz rys. 3)

CECHY II i III RZĘDOWEJ STRUKTURY tRNA W ROZTWORZE

Z badań różnych układów modelowych oraz cząsteczek tRNA i ich fragmentów [1,7,20,21] wynika, że standardowa pozycja dla pary:

$$(AU)^{\circ} = -14.8 \text{ ppm.}$$

$$(GC)^{\circ} = -13.7 \text{ ppm.}$$

$$(AI)^{\circ} = -13.5 \text{ ppm.}$$

Głównym faktem, odpowiedzialnym za przesunięcia pozycji pasm występujących w niskich polach dla par AU i GC od ich standardowej pozycji, jest stałe pole pierścieniowe [20], pochodzące od przyległych zasad. Ponieważ przesunięcie to zależy od najbliższych sąsiadów, to można przewidzieć wid-

mo znając II rzędowną strukturę polinukleotydów i przestrzenną zależność przesunięcia wartości prądu pierścieniowego dla czterech zasad.

Dla uzyskania tej zależności przesunięcia prądu pierścieniowego skorzystano częściowo z obliczeń Giessnera-Prettre'a i Pullmana [22] i częściowo na najlepiej nadających się do tego celu widmach NMR tRNA przy założeniu istnienia w cząsteczce tRNA regularnych regionów spiralnych [23]. W konsekwencji otrzymano układ określonych pozycji i przesunięć natężenia prądu pierścieniowego, potrzebnych do przewidzenia widma protonów ugrupowania NH, tworzących wiązania wodorowe z drugim pierścieniem w parach zasad.

Z analizy widm NMR tRNA^{Phe} z drożdży, tRNA^{Glu} z E.coli, tRNA^{Arg} z E.coli tRNA^{Met} z E.coli, tRNA^{Trp} z drożdży, tRNA^{Tyr} z drożdży można wysunąć następujące wnioski odnośnie struktury tych cząsteczek w roztworze [20, 21].

II rzędowe struktury tych cząsteczek są dobrze opisane przez model liścia koniczyny. Dla cząsteczek tych ogólna liczba par zasad i stosunek AU/GC przyjęty z założonej struktury liścia koniczyny zgadza się z obserwacjami NMR.

Pokazano również, że można wyznaczyć za pomocą obliczeń pasma absorpcji konkretnych par zasad. Pozycje pasm absorpcji, pochodzące od par zasad, są bardzo czułe na wpływ wywierany przez najbliższe zasady i na oddziaływania z prawoskrętnie ułożonymi regionami spiralnymi [22].

Nie stwierdzono istnienia 4 lub 5 dodatkowych par zasad, jak to proponowano w niektórych modelach III rzędowej struktury tRNA [24]. Ramię akceptorowe i TYC w tRNA^{Glu} pojawia się w formie ciągłej spirali, w której AU-7 z ramienia akceptorowego nakłada się na parę zasad AU-7 z końca ramienia TYC.

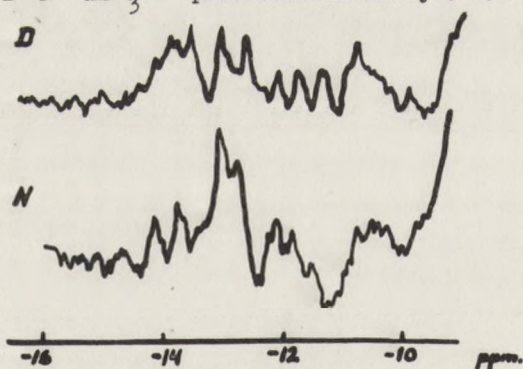
W tRNA^{Met} G-27 (umieszczone między ramieniem DiHU i ramieniem antykodonu) nakłada się na parę zasad GC-10, a A-45 w węźle dodatkowym podczas różnych konformacji cząsteczki, w zróżnicowany sposób nakłada się na AU-29, która jest końcową parą zasad w antykodonie. W drożdżowym tRNA^{Phe}, A-14 z pętli DiHU nakłada się na najmniej dwóch różnych drogach, z końcową parą GC-13 z ramienia DiHU. Widma NMR tych cząsteczek dostarczają ostatecznych dowodów na temat II rzędowej struktury tRNA i informacji dotyczących pewnych cech III rzędowej struktury tRNA w roztworze.

Niedawno Kim i inni [25] donieśli o istotnym postępie w określaniu krystalicznej struktury drożdżowego tRNA^{Phe} za pomocą analizy rentgenostrukturalnej. Chociaż pozostały nie rozwiązane ważne zagadnienia odnośnie relacji między strukturą tych cząsteczek w roztworze i strukturą występującą w stanie krystalicznym, to warto odnotować następujące fakty:

obraz analizy rentgenostrukturalnej o 4\AA rozdzielczości wskazuje, że ramiona akceptorowe i TYC tworzą formę ciągłej podwójnej spirali. Choć informacje uzyskane z widma NMR drożdżowego tRNA^{Phe} nie pozwoliły określić swoistych cech struktury, to jednak dane uzyskane na tej drodze są wystarczające dla uznania, że te dwa ramiona w tRNA^{Phe} z drożdży w roztworze występują w formie ciągłych spiral. Rezultaty uzyskane za pomocą analizy NMR dla innych cząsteczek tRNA w roztworze [20] sugerują, że nakładanie się w/wym. ramion w strukturze krystalicznej drożdżowego tRNA^{Phe} może być wspólną cechą różnych tRNA.

KONFORMACJA tRNA^{Leu} W STANIE NATYWNYM I ZDENATUROWANYM

Badano [13] natywny "N" i zdenaturowany "D" konformer tRNA₃^{Leu} z drożdży piekarniczych. Po uzyskaniu widma NMR zdenaturowanej próbki, tRNA denaturowano w tej samej próbce i wykonywano widmo. Ilościowo denaturacja była badana przez określenie aktywności akceptorowej dla leucyny. Widma NMR konformera "D" i "N" tRNA₃^{Leu} przedstawiono na rys. 8.



Rys. 8. Widma NMR konformera "D" i "N" tRNA₃^{Leu} z drożdży. Obj. próbki ok. 0.12 ml.
t = 33°C, stężenie ok. 60 mg/ml

Częściowe zmiany intensywności pasm porównywane w dwóch próbkach w zakresie od -11 do -15 ppm, odpowiadają 18 protonom dla konformera "D" i 22 protonom dla konformera "N".

Oznaczenie tej różnicy między parami AU i GC jest następujące:

- ogólna intensywność pasm między -11 a -12.8 ppm, wskazuje na wzrost od 3 do 4 par GC,
- w zakresie od -13.3 do -15 ppm, spada zawartość par AU od jednej do dwóch,
- w regionie między -12.8 a -13.3 ppm, występuje wzrost intensywności pasma dla par GC lub AU o jeden.

Zatem rezultaty denaturacji wskazują na wzrost od 3 do 5 par GC i zmniejszenie od 0-2 par AU, co zgadza się ze wzrostem od 2 do 4 par zasad (przy przejściu z konformeru "D" do "N"), zgodnie z ogólną intensywnością zmiany. Tak więc, szerokie zmiany obserwowane w regionie od -11 do -15 ppm. odpowiadają zmianom w II strukturze zachodzącym podczas denaturacji tRNA₃^{Leu}. Nasuwa się pytanie, czy konformer "D" odpowiada niekompletnej strukturze liścia koniczyny czy jakiejś innej alternatywnej konformacji.

I rzędowa struktura tRNA₃^{Leu}, nasuwa możliwość tworzenia struktury liścia koniczyny z 10 par AU lub AI, 12 par GC i 2 par GU [14, 15]. Pętla DiHU zawiera tylko 3 pary GC, gdzie w pozycji 10 jest 2-N- metyloguanozyna i w pozycji 12 4-N- acetylo cytydyna. W pętli tej denaturacja nie pociągałaby straty par AU. Obydwa krótko zmodyfikowane nukleotydy mogłyby tym bardziej podlegać denaturacji. Uhlenbeck [16] badając wiązanie komplementarnych oligonukleotydów do konformerów tRNA₃^{Leu} z drożdży piekarniczych zwraca uwagę na znaczne zwiększenie zdolności wiązania oligomeru do pętli DiHU w konformerze "D". Ten rezultat, pogłębiony przez dane spektroskopowe, wskazuje różnicę strukturalną w konformerze "D" w pętli DiHU.

Badania wiązania komplementarnych oligonukleotydów sugerują możliwość wytłumaczenia zwiększenia ilości par AU w konformerze "D", ponieważ pętla antykodonu nie była dostępna dla wiązania komplementarnych oligonukleotydów.

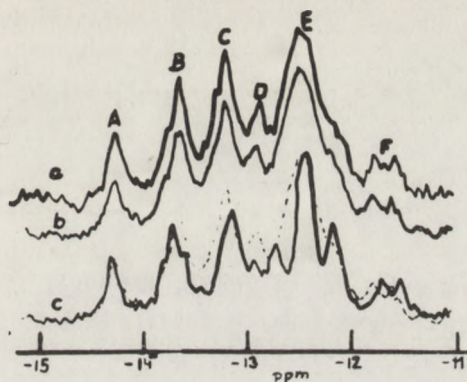
Ostatnie badania kinetyki wymiany trytu wykazały wzrost [17, 18] o 3 do 4 par zasad dla konformeru "N" (w porównaniu z konformerem D), co zgadza się z danymi NMR.

KONFORMACJA NAŁADOWANEGO I NIENAŁADOWANEGO tRNA^{Phe} Z DROŻDŻY PIEKARNICZYCH

Widma NMR 300 MHz naładowanego i nienaładowanego tRNA^{Phe} z drożdży piekarniczych przedstawiono na rys. 9 [19].

Interpretację niektórych pasm występujących w tym widmie przedstawiono w tabeli 4.

Porównanie widm NMR: naładowanego i nienaładowanego tRNA^{Phe}, nienaładowanego tRNA^{Phe} w obecności lub nieobecności wolnej fenyloalaniny nie wykazało istnienia wykrywalnych różnic w kształcie pasm i ich intensywności.



Rys. 9. Widmo NMR 300 MHz wodnego roztworu tRNA^{Phe} z drożdży: a) fenyloalanylo tRNA^{Phe} w pH 5, b) tRNA^{Phe} w pH 5, c) tRNA^{Phe} w pH 5 (linia przerywana) i w pH 7 (linia ciągła)

T a b e l a 4

Para zasad Nr	Pozycja	Miejsce w widmie NMR	Komentarz cech III struktury wpływających na orientację
AU 7	Wewn. koniec ramienia CCA	B	mało wrażliwa na orientację CCA wobec TYC
A I 3I	koniec antykodonu	C	mało wrażliwa na konformację antykodonu
GC 10	wewn. koniec DiHU	D	bardzo czuła na wzajemną orientację DiHu i antykodonu
GC 13	koniec DiHU	F	bardzo czuła na konformację DiHU
GC 27	wewn. koniec anty-kodonu	D lub E	bardzo czuła na konformację wężła dodatkowego
GC 49	wewn. koniec TYC	E	bardzo czuła na wzajemną orientację CCA i TYC

LITERATURA

- [1] Wong Y.; et al. - J. Mol. Biol., 72 (1972), 725-740.
 [2] Jardetzky C., Jardetzky O.; - JACS 82 (1960), 222.
 [3] Schweier M., Chan S., et al. - JACS 86 (1964), 6969.
 [4] Smith G.P., et al - Canad. J. Biochem. 47 (1969), 480.
 [5] Katz L., Penman S.; - J. Mol. Biol. 15 (1966), 220.
 [6] Shoup R.R., et al. - Biochem. Biophys. Res. Comm. 23 (1966), 194.

- [7] Kearns et al. - Nature 229 (1971), 338.
- [8] Wong Y., Nillson, Kearns D., - praca w przygotowaniu.
- [9] Kearns D., et al. - J.Mol.Biol. 61 (1971), 265.
- [10] Peisach - Proc.Nat.Acad.Sci.Wash. 60 (1968), 373.
- [11] Berzofsky J.A., - (1971) Thesis Ph.D., Einstein A., College of Medicine New York.
- [12] Crawford J.E., Chan S.I., Schweizer M.P., - Biochem.Biophys.Res.Comm. 44 (1971), 1.
- [13] Wong Y. et al. - J.Mol.Biol. 74 (1973), 403-406.
- [14] Chang S.I. et al. - FEBS Letters 17 (1971), 265.
- [15] Kowalsky et al. - Science 172 (1971), 385.
- [16] Uhlenbeck et al. - Fed.Proc. 31 (1972), 422.
- [17] Webb, Fresco - J.Mol.Biol. 74 (1973), 387.
- [18] Englander et al. - J. Mol.Biol. 63 (1972), 153.
- [19] Wong Y., et al. - Proc.Nat.Acad.Sci. USA 70 (1973), 2193-2195.
- [20] Shulman R.G., et al. - J.Mol.Biol. 78 (1973), 57-69.
- [21] Lightfoot D.R.- et al. - J.Mol.Biol. 78 (1973), 71-89.
- [22] Giessner-Prettre C., Pullman B., - J.Theor.Biol. 27 (1970), 87-95.
- [23] Arnott S., - Progr.Biophys.Mol.Biol. 22 (1971), 181-213.
- [24] Leviet M., - Nature 224 (1969), 759-763.
- [25] Kim S.H., et al. - Science 179 (1973), 285-288.

DYSKUSJA

W dyskusji mgr T. Haertle poruszył zagadnienie prawoskrętnych regionów spiralnych występujących w tRNA. Mgr A. Pohorille polemizował na temat badań kinetyki wymiany trytu i zastosowania tej metody do badania ilości par zasad w tRNA w stanie natywnym i zdenaturowanym. Dyskutowano także nad powtarzalnością widm NMR tRNA w stanie natywnym i zdenaturowanym.

Mirosława Z. Barciszewska

ZASTOSOWANIE ^{13}C -NMR DO BADANIA KOMPONENTÓW KWASÓW NUKLEINOWYCH

STRESZCZENIE

W artykule podane są podstawy teoretyczne i aparatura spektroskopii ^{13}C -NMR. Przedstawiono korelację między przesunięciem chemicznym ^{13}C a strukturą nukleozydów i nukleotydów oraz zależność wicynalnej stałej sprzężenia od kąta skręcenia.

Jedną z najbardziej użytecznych metod badawczych w chemii organicznej jest spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego. Dzięki tej technice osiąga się niewspółmierne rezultaty w porównaniu z innymi metodami. Dziedzina ta począwszy od roku 1946 rozwija się bardzo szybko, a od kilku lat wręcz rewelacyjnie.

Widma magnetycznego rezonansu jądrowego można uzyskać na skutek napromieniowania substancji badanej umieszczonej w stałym polu magnetycznym H_0 dodatkowym polem magnetycznym H_1 . Przy odpowiedniej częstotliwości pola H_1 dla jąder, które mają spin jądrowy $I > 0$ obserwujemy rezonans. W celu porównania możliwości wykorzystania różnych jąder do badań w tabeli I przedstawiono magnetyczne własności jąder. Z pobieżnej analizy wartości zawartych w tabeli wynika, że najlepsze efekty można uzyskać w przypadku stosowania jąder ^1H lub ^{19}F .

Ze względu na fakt, że izotop ^1H występuje zasadniczo we wszystkich związkach organicznych, spektroskopia protonowego rezonansu rozwinęła się najszybciej. Mimo szerokiego zastosowania tej techniki, nie jest ona najlepsza z punktu widzenia chemii organicznej. Ograniczoność tej metody spowodowana jest następującymi faktami:

a) Centrum zainteresowania w chemii organicznej nie są protony, lecz szkielet węglowy. Własności i reaktywność związków organicznych wyjaśnia

się przez stany wiążące atomów węgla, które można w przybliżeniu obliczyć metodami mechaniki kwantowej.

b) Cząsteczki organiczne zawierają zbyt mało magnetycznie nierównocennych protonów, tak że spektroskopia protonowego rezonansu daje mało informacji o szkielecie węglowym tych związków.

T a b e l a I

Magnetyczne własności jąder

izotop	naturalna zaw. izotopu %	liczba spinowa I, $h/2\pi$	częstotliwość nmr, Mc (przy H_0 14092 gausów)	względna czułość sygnałów nmr [3]
^1H	99.9844	1/2	60.000	1.000
^{13}C	1.108	1/2	15.085	0.016
^{15}N	0.365	1/2	6.081	0.001
^{19}F	100.0	1/2	56.446	0.834
^{31}P	100.0	1/2	24.288	0.066

Narzuca się możliwość wykorzystania jąder atomów węgla do badań związków organicznych metodą NMR.

1. SPEKTROSKOPIA ^{13}C -NMR

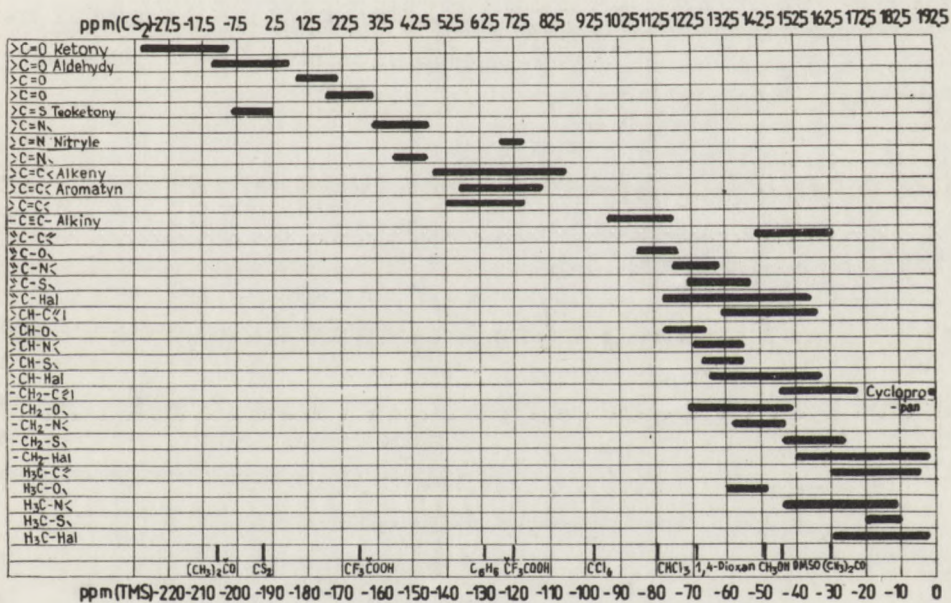
Spośród izotopów węgla tylko izotop ^{13}C posiada spin jądrowy $I = 1/2$ i dlatego można wykorzystać go w spektroskopii węglowego rezonansu jądrowego.

Spektroskopia jąder ^{13}C (cmr lub ^{13}C -nmr) charakteryzuje się następującymi czynnikami:

- przesunięcia chemiczne i stałe sprzężenia są bardzo duże,
- przesunięcia chemiczne jąder węgla ^{13}C w różnych otoczeniach rozciągają się w zakresie 0-200 ppm, co można porównać z przesunięciami obserwowanymi dla fluoru i fosforu. Dla zilustrowania tych wielkości w tabeli II przedstawiono częstotliwości absorpcji jąder ^{13}C znajdujących się w różnych otoczeniach strukturalnych,
- naturalna zawartość izotopu ^{13}C w związkach wynosi zaledwie 1,1% co wskazuje na konieczność stosowania znacznie większych próbek do badań niż w rezonansie protonowym,
- rezonans węgla ^{13}C jest dużo mniej czuły (1,56%) w stosunku do rezonansu protonowego przy takim samym natężeniu pola magnetycznego z powodu małego stosunku giroskopowego [4],

- przesunięcia chemiczne mierzy się w stosunku do wzorców, którymi są TMS, i CS_2 (którego sygnał występuje przy -192 ppm od TMS).

Tabela II
Przesunięcia chemiczne dla jąder ^{13}C



Z porównania tych cech wynika, że o rozwoju tej techniki, ze względu na małą zawartość ^{13}C w związkach oraz mniejszą czułość, będzie decydował rozwój techniki eksperymentalnej. Duży postęp w budowie magnesów wytwarzających pole magnetyczne o dużej jednorodności oraz wykorzystanie maszyn cyfrowych doprowadziło w ostatnich latach do szybkiego rozwoju spektroskopii ^{13}C NMR.

Ażeby uzyskać maksimum informacji z widm ^{13}C , opracowano szereg metod eksperymentalnych, które poprawiają jakość widm ^{13}C .

Do najważniejszych należą:

1.1. Zwiększenie stosunku sygnału do szumu

Stosunek S/N jest miarą czułości danej metody, a w spektroskopii ^{13}C jest on mały. Można go poprawić przez:

1.1.1. wielokrotne przemiatanie - widma powtarza się określoną ilość razy

i gromadzi się je w akumulatorze widm (CAT). Widma zostają dodane, natomiast szумы uśredniają się. W tym przypadku $S/N = \sqrt{n}$ (gdzie n jest liczbą zakumulowanych widm),

1.1.2. zapisanie widma w bardzo długim czasie (t_1). S/N jest pierwiastkiem kwadratowym ze stosunku czasu zapisu t_1 do normalnego czasu zapisu $S/N = \sqrt{t_1/t_0}$.

1.1.3. metoda SUPER SNAIL (Simple uncomputerized procedure for experimentally recording signals above noise by accumulation of integral lines) polega na numerycznym poprawieniu kilkakrotnie zapisanego widma [12].

1.2. Rozsprzężenie pasm $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ [4]

Ponieważ geminalne stałe sprzężenia $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ są bardzo duże (100 - 250 Hz) interpretacja widm ^{13}C jest często trudna z powodu nakładania multipletów $^{13}\text{C}-\text{H}$.

Dla uproszczenia widm i dla wzrostu intensywności, technika rozsprzężenia poszerzonych pasm ^1H jest często używana w spektroskopii omr. Próbka jest dodatkowo napromieniowywana polem o częstotliwości radiowej H_2 . Jeżeli pasmo częstotliwości H_2 pokryje cały zakres częstotliwości Larmora protonów, wszystkie multiplety $^{13}\text{C}-\text{H}$ zostaną wygaszone. W widmie zjawi się singlet dla każdego nierównoważnego atomu węgla. Stosunek S/N po rozsprzężeniu ulega zwiększeniu.

1.3. Częściowe rozsprzężenie - "off rezonans" [4]

Protonowe rozsprzężenie upraszcza widmo ^{13}C i zwiększa czułość. Ta technika niszczy jednak możliwość interpretacji sygnałów na bazie stałych sprzężenia $^{13}\text{C}-\text{H}$. W metodzie "off rezonans" częstotliwość przyłożonego pola H_2 jest kilkaset Hz poza zakresem częstotliwości Larmora protonów zamiast wewnątrz tego zakresu. W tych warunkach sprzężenia wicynalne i dalekiego zasięgu znikają. W zależności od zakresu częstotliwości pola H_2 geminalna stała $^{13}\text{C}-\text{H}$ zmniejsza się do 10-50 Hz z jednoczesnym pojawieniem się: kwartetu dla metylu, trypletu dla metylenu, dubletu dla metinu, singletu dla IV atomu węgla (rys. 1).

1.4. Wykorzystanie transformacji Fouriera do analizy widm ^{13}C

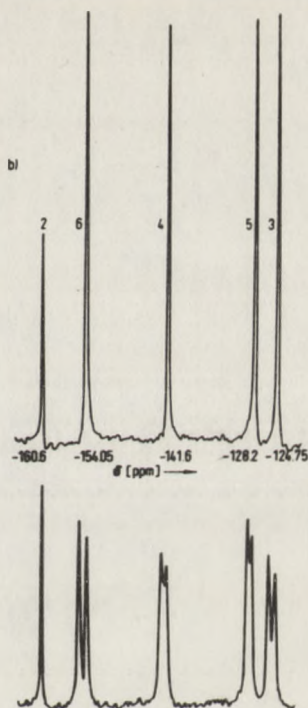
1.4.1. Swobodny zanik indukcji (Free Induction Decay)

Po akcie rezonansu poprzeczna magnetyzacja M_{xy} zanika wykładniczo z poprzecznym czasem relaksacji T_2 , tracąc fazę zgodną z H_1 . Ten proces nazywa się swobodnym zanikiem indukcji (FID). FID jest ob-

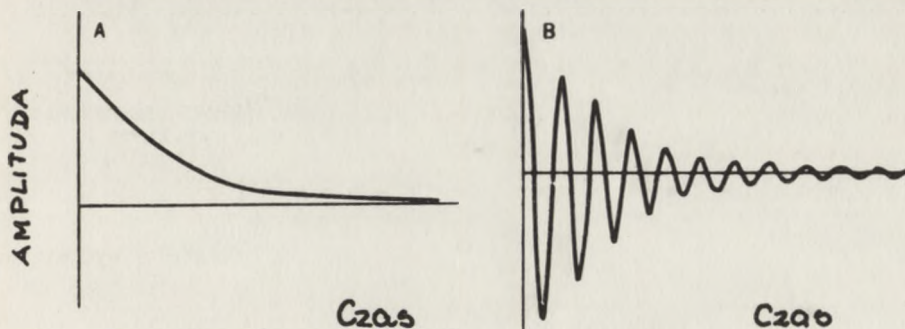
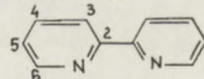
serwowany jako "brzęczenie" przy wysokiej rozdzielczości i szybkim przejściu licznych rezonansów, chociaż ten efekt może być także spowodowany przez niejednorodność pola. Zniekształcenie to, jak wiemy, zanika wykładniczo w czasie. Źródło tego efektu można wyjaśnić w następujący sposób. Boltzmanowski nadmiar jąder w stanie podstawowym odpowiada namagnesowaniu próbki w kierunku równoległym do kierunku przyłożonego pola. W stanie rezonansu część tego namagnesowania pojawia się jako wirująca składowa, leżąca w płaszczyźnie H_1 , która indukuje sygnały absorpcyjne i dyspersyjne w cewce odbiorczej. Jeżeli w stanie rezonansu pole częstotliwości radiowej H_1 zostanie nagle usunięte, wirująca składowa namagnesowania nie zniknie natychmiast, lecz będzie wygasać wykładniczo z szybkością wyznaczoną przez czasy relaksacji jąder powodujących powstanie sygnału.

1.4.2. Interferogram pulsowy [4]

Sygnały interferencyjne FID mogą być także zainicjowane przez krótkie (kilka mikrosekundowe) pulsy częstotliwości radiowej H_1 stosowane przy kącie prostym do H_0 . W spektroskopii plusowej NMR taki plus napotyka cząstkę z n magnetycznie nierównoważnymi jądrami, tj. n częstotliwościami Larmora. Zamiast jednego sygnału FID spektrometr zapisuje wtedy wszystkie sygnały



Rys. 1. Częściowe rozprężenie dla



Rys. 2. Swobodny zanik indukcji

interferencyjne wszystkich pobudzonych częstotliwości Larmora. Jeżeli częstotliwość używanego pulsu jest wystarczająco duża, wszystkie n częstotliwości Larmora cząsteczki są pobudzone. Otrzymujemy pulsowy interferogram, który przedstawia zanik poprzecznej magnetyzacji M_{xy} jako funkcji czasu. Interferogram zawiera wszystkie informacje widma NMR otrzymanego przez zamiatanie polem lub częstotliwością. Czas wymagany do zarejestrowania interferogramu jest rzędu podłużnego czasu relaksacji T_1 .

1.4.3. Transformacja Feuriera [10]

Pulsowy interferogram jest złożoną funkcją falową wynikającą z nałożenia wszystkich częstości Larmora pobudzonych przez pulsy. Podobnie, jak złożone funkcje falowe, interferogram może być zmieniany przy pewnych matematycznych warunkach do widm częstotliwości Larmora, tj. do zwykłego widma NMR, przez przekształcenie Fouriera.

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \exp(-i\omega t) dt$$

$f(t)$ - funkcja, która uległa transformacji

$$i = \sqrt{-1}$$

ω = częstość kątowna = $2\pi\nu$

t - czas

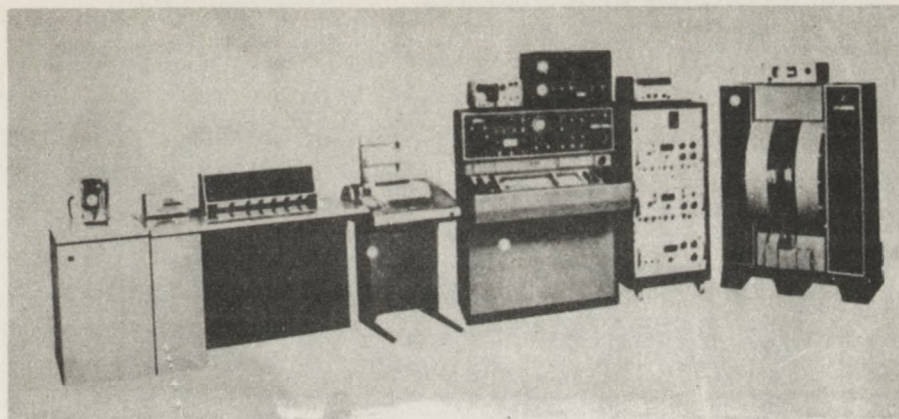
Transformacja wykonywana jest przez maszynę cyfrową za pomocą odpowiedniego algorytmu. Systemów FT mimo znajomości podstaw teoretycznych nie tworzy się samemu i z reguły kupuje się od firmy np. Varian, Nicollet, Digilab. W konsekwencji takiego przekształcenia otrzymuje się widmo NMR, którego stosunek S/N jest wyraźnie większy od umownego widma nmr tej samej próbki. Widmo ^{13}C NMR może być zapisane w ciągu kilku sekund.

1.5. Aparatura [5]

Zasadniczo aparatura do PFT C-13 NMR składa się z dwóch części:

- a) NMR - najczęściej 100 MHz
- b) urządzenia do transformacji Fouriera łącznie z komputerem.

Jednym z typowych zestawów jest system PFT C-13 NMR firmy JOEL.

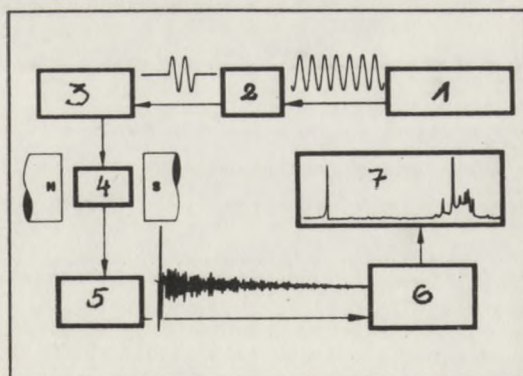


Rys. 3. Aparatura do ^{13}C - PFT NMR

Zestaw do PFT - ^{13}C NMR składa się z: 1 - cyfrowe urządzenie do programowania impulsów, 2 - jednostka transformująca, 3 - oscyloskop do kontrolowania sygnałów i pulsów 4 - dostosowuje częstotliwość radiową do naświetlania próbek, 5 - wzmacniacz do rozsprzęgania innych spinów, 6 - wzmacniacz, 7 - wzmacniacz dla C-^{13} FT max 80 gaussów można otrzymać przy próbie, 8 - licznik częstotliwości radiowej, 9 - czołowa podstawowego przyrządu, 10 - magnes, 11 - przystawka temperaturowa, 12 - komputer z pamięcią 8 kilobitów, 13 - 8 kilo dodatkowej pamięci, 14 - dalekopis, 15 - dziurarka taśmy, 16 - czytnik taśmy

Zasada działania tego systemu przedstawiona jest na rysunku 4.

Jako wynik otrzymujemy widmo, które można zarejestrować w sposób podobny jak dla wodoru, albo też otrzymujemy dane cyfrowe o położeniu danego sygnału, jego intensywności po odjęciu wzorca.



Rys. 4. Blokowy schemat urządzenia do TF. 1 - Nadajnik, 2 - bramka, 3 - wzmacniacz, 4 - próbka, 5 - odbiornik, 6 - urządzenie do TF, 7 - przyrząd rejestrujący

2. Zastosowanie spektroskopii ^{13}C -NMR do badania nukleotydów. Badano widma C-^{13} wielu związków organicznych. Nie udało się jednak znaleźć ogólnych reguł interpretacji widm. Można jedynie na podstawie

badania danej klasy związków dojść do pewnych uogólnień, co nie znaczy, że stosują się one do wszystkich związków.

Jak wiemy, przesunięcia chemiczne i stałe sprzężenia dostarczają informacji o strukturze badanego związku. Na przykładzie zasad pirymidynowych i purynowych oraz nukleozydów i nukleotydów zobaczymy od czego zależą te dwie wielkości.

2.1. Korelacja między przesunięciem chemicznym a strukturą w nukleozydach [6]

Przesunięcia chemiczne dla nukleozydów pirymidynowych i purynowych występują w dwóch rejonach widma:

- 60-100 ppm dla węgli pierścienia rybozy,
- 130-190 ppm dla węgli zasad heterocyklicznych

2.1.1. Przesunięcia chemiczne dla węgli pierścienia rybozy

T a b e l a III

Przesunięcia chemiczne dla węgli pierścienia rybozowego w nukleozydach
Przesunięcia podano w stosunku do TMS (znak + sygnał przy wyższym polu)

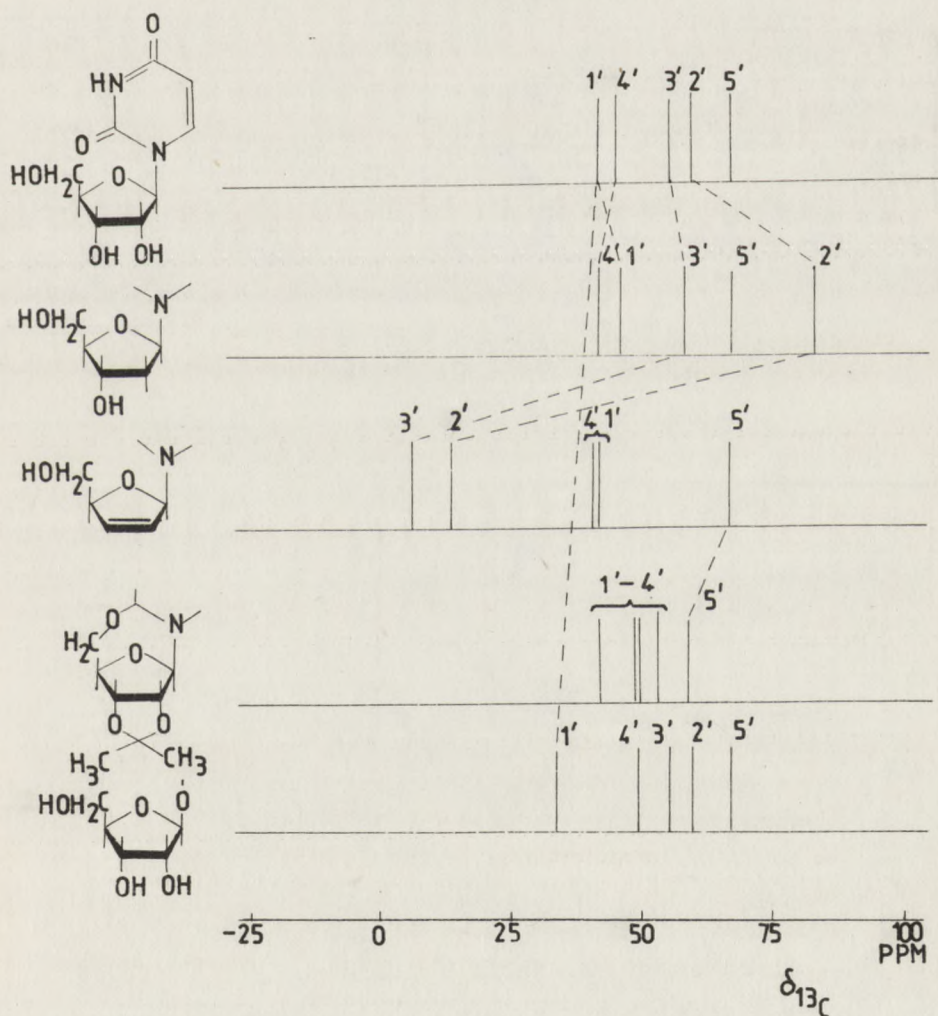
Związek	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'
urydyna (2.7M)	39.42	57.42	53.66	42.58	66.30
cytydyna(2.6M)	38.41	57.96	53.40	43.16	66.65
adenozyna	39.38	56.78	53.88	41.56	65.89
guanozyna	41.27	56.98	53.66	42.13	66.34

Z wyników zawartych w tabeli III wynika, że rezonans atomów węgla pierścienia rybozy nie jest zależny od zasad. Największym zmianom ulega zasadniczo tylko sygnał węgla C-1. Mając serię różnych pochodnych można łatwo interpretować występujące sygnały w zależności od struktury danego związku. Na rys. 5 przedstawiono taką zależność.

Z zależności przedstawionych na wykresie można zaobserwować, że:

- pochodne rybozy przy wymianie grupy 2' - hydroksylowej na wodór doznają przesunięcia w górę pola.
- w związkach nienasyconych 2'3' można rozróżnić sygnały C-2' i C-3' od C-1', C-4' i C-5', sygnały dla C-2' i C-3' ulegają przesunięciu w dół pola,
- w przypadku cyklizacji przy C-5' sygnał należący do tego węgla ulega przesunięciu w dół pola o 13 ppm,

- dla O-glikozydów linia przy najmniejszym polu dla węgla C-1 jest przesunięta w dół pola o 18 ppm. Pozostałe sygnały są bez zmian.
- Dorman i Roberts [13] badając odpowiednie nukleotydy stwierdzili, że sygnały dla węgla C-4' i C-5' są rozszczepione przez fosfor i dlatego można je łatwo wyznaczyć.



Rys. 5. Zależność chemicznego przesunięcia od struktury dla węgla pierścienia rybozowego w nukleozydach

Z przedstawionych danych wynika, że kolejność sygnałów w kierunku wzrastającego pola w rybozie jest następująca: C-1, C-4, C-3, C-2, C-5.

2.1.2. Przesunięcia chemiczne dla zasad pirymidynowych

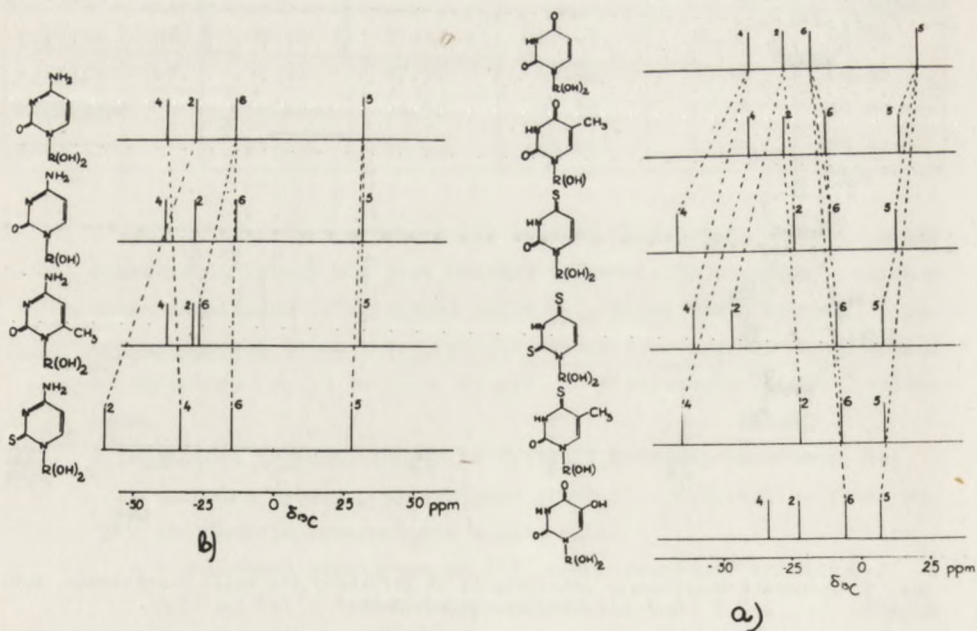
Sygnały dla zasad heterocyklicznych leżą w rejonie od -130 do -190 ppm.

Tabela IV

Przesunięcia chemiczne dla węgla zasad

związek	C-2	C-4	C-5	C-6
cytydyna (2.6 M)	-28.42	-38.17	+32.85	-14.29
dezoksytydyna (2.6 M)	-28.49	-38.44	+32.67	-13.93
urydyna (2.7 M)	-23.88	-36.20	+25.46	-13.68
tymidyna (2.7 M)	-23.06	-36.37	+18.02	- 8.80

Z danych wynika, że chemiczne przesunięcia dla węgla w cytydynie i dezoksytydynie są niezależne od fragmentu cukru, dlatego różnice w rezonansach węgla w urydynie i tymidynie muszą być spowodowane



Rys. 6. Zależność przesunięcia chemicznego od struktury dla węgla w a) urydynach, b) cytydynach

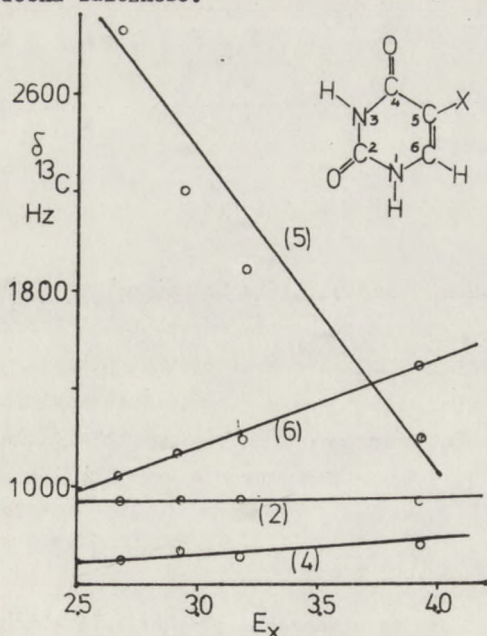
obecnością grupy metylowej przy C-5 w tymidynie. Jeżeli będziemy rozważać urydynę i cytydynę oraz ich pochodne to zauważymy, że (rys.6) podstawienie siarki zamiast tlenu w grupie karbonylowej przy C-4 lub C-2 powoduje przesunięcie sygnałów węgla, przy których nastąpiło podstawienie w dół pola o ok. 30 ppm. Sygnały węgla sąsiednich ulegają przesunięciu, ale w mniejszym stopniu.

Podobną sytuację mamy dla pochodnych adenozy i guanozy. Podsumowując te rozważania możemy powiedzieć, że przesunięcia chemiczne dla węgla w nukleozydach możemy rozpatrywać oddzielnie dla fragmentu cukru i zasady. W poszczególnych fragmentach dużą rolę odgrywiają podstawniki. Sygnały dla węgla, przy których zachodzi największa modyfikacja w gęstości elektronicznej, ulegają największemu przesunięciu w górę lub w dół pola.

II. WPLYW ELEKTROUJEMNOŚCI PODSTAWNIKA NA PRZESUNIĘCIA CHEMICZNE

H. Spiess i W.G. Schneider [15] wykazali, że dla halogenoalkanów istnieje liniowa zależność między chemicznym przesunięciem ^{13}C a elektroujemnością grupy X. Przesłanianie zmniejsza się z podwyższeniem elektroujemności grupy. Należało się spodziewać podobnej zależności w grupie nukleozydów.

Tarpley i Goldstein [1] stwierdzili, że dla 5-halogeno pochodnych uracylu istnieje podobna zależność.



Rys. 7. Przesunięcia chemiczne jako funkcja elektroujemności dla 5-halogenouracyli

Z wykresu wynika, że:

- rezonans dla węgla C-5, który jest bezpośrednio związany z podstawnikiem ulega największemu przesunięciu pod wpływem podstawnika,

$\delta^{13}\text{C}$ zmniejsza się ze wzrostem elektroujemności podstawnika,

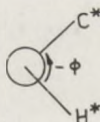
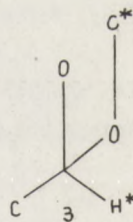
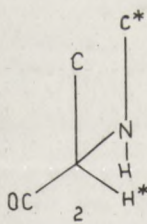
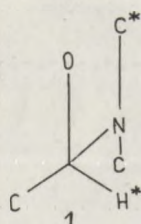
- węgiel C-6 doznaje wpływu podstawnika poprzez dwa wiązania - wpływ jest mniejszy niż dla C-5, Przesunięcie chemiczne wzrasta ze wzrostem E,

- C-4 doznaje także wpływu podstawnika poprzez dwa wiązania, lecz wpływ podstawnika jest dużo mniejszy niż dla C-6. Sugeruje to ważną rolę podwójnego wiązania między C-5 i C-6 w przenoszeniu wpływu podstawnika, przesunięcie wzrasta ze wzrostem E_x ;

- węgiel C-2 doznaje wpływu poprzez 4 wiązania. Wpływ podstawnika jest najmniejszy.

III. ZALEŻNOŚĆ WICYNALNEJ STAŁEJ SPRĘŻENIA $^{13}\text{C-H}$ OD KĄTA SKRĘCENIA

Pomiar wicynalnej stałej sprężenia dostarcza informacji o kącie skręcenia dla wicynalnych atomów C^* i H^* , a tym samym określa wzajemną orientację zasady azotowej i cukru.



Wicynalna $J^{13}\text{C-H}$ w przeciwieństwie do wicynalnej stałej sprężenia $^1\text{H}-^1\text{H}$ jest bardziej czuła na parametry strukturalne (elektroujemność, heteroatom, hybrydyzacja węgla) niż na steryczne. Stwierdzono [16], że wicynalna stała sprężenia $^{13}\text{C-H}$ jest większa dla atomów trans niż dla cis. Można ją wyznaczyć albo z widma rezonansu protonowego dla substancji wzbogaconej w izotop ^{13}C , albo z widma cmr dla substancji z naturalną zawartością tego izotopu. Schweizer [14] badał wicynalne stałe sprężenia dla cytydyny i 6-metylocytydyny, natomiast Lemieux [8] dla urydyny i jej cyklicznych pochodnych.

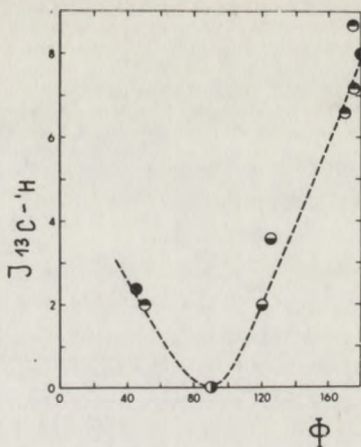
Zależność wicynalnej stałej sprężenia od kąta skręcenia podana jest na wykresie 8.

Z zależności tej wynika, że największe wartości J otrzymuje się w przypadku kąta 0° lub 180° , a niewielkie dla kątów bliskich 90° . Główną korzyścią z wyznaczenia wicynalnej J jest możliwość uzyskania przybliżonych wartości kątów skręcenia. Badając J w cytydynie i opierając się na wykresie podanym przez Lemieux, Schweizer stwierdził, że w cytydynie kąt skręcenia $\chi = 25^\circ$ odpowiednio do $J = 3$ Hz, a odpowiadający mu kąt dwuścienny między C-2 i H1 jest $\phi = 30-35^\circ$ (dla $\phi = -95^\circ$, $\chi = -35^\circ$). Obie te wartości kątów znaleziono dla anti glikozydów. Dla 6-metylocytydyny stała $J = 6$ Hz - zgodnie z wykresem podanym przez Lemieux kąty:

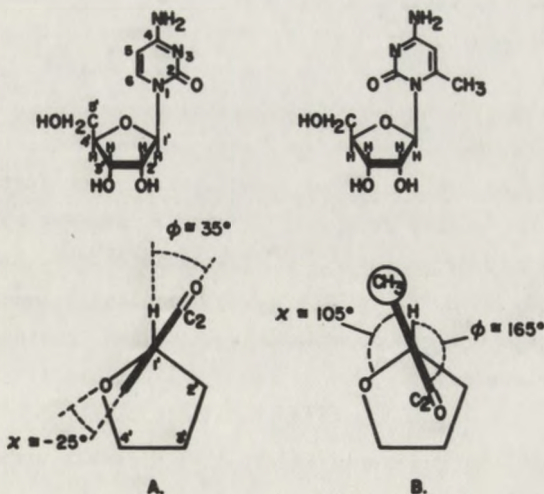
$$\chi = 165^\circ$$

$$\phi = 105^\circ$$

te wartości są charakterystyczne dla konformacji syn. Duży podstawnik - grupa metylowa przesuwa kąt konformacyjny do zakresu syn. Obie konformacje przedstawione są na rys. 9.



Rys. 8. Zależność wicynalnej stałej sprzężenia od kąta skręcenia



Rys. 9. Przedstawia konformację anti (A) i syn (B)

IV. STAŁA SPRĘŻENIA $^{13}\text{C} - ^{31}\text{P}$ A KONFORMACJA NUKLEOTYDÓW

Dane otrzymane z przesunięć chemicznych i stałych sprzężenia dla cyklicznych nukleotydów są mniej pewne, niż dane protonowego rezonansu, jednak są one wystarczające dla potwierdzenia konformacji uzyskanej innymi metodami. W tablicy podane są stałe sprzężenia dla serii 3', 5' cyklicznych nukleotydów [17 a].

T a b l i c a IV

Stałe sprzężenia dla 3', 5' cyklicznych nukleotydów

	U	C	A	G	T
C 1'P	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
C 2'P	8,0	7,8	7,8	7,8	8,3
C 3'P	4,5	4,3	4,3	3,8	4,8
C 4'P	4,5	4,5	4,5	4,8	4,5
C 5'P	7,0	7,0	7,0	7,3	7,0

Stałe sprzężenia zawarte w tabeli są w przybliżeniu takie same dla wszystkich związków badanej serii. Z tego wynika, że konformacja rybozy i cyklicznego pierścienia fosforanowego jest podobna w tych związkach.

Wicynalna $J^{13}\text{C}^{31}\text{P}$ w nukleotydach jest zależna od kąta dwuściennego. Ponieważ zakres sprzężeń $^{13}\text{C} - ^{31}\text{P}$ jest mniejszy (0-10 Mz) niż dla $\text{H} - ^{31}\text{P}$ (0-22 Hz), więc zmiany stałych sprzężenia $^{13}\text{C} - ^{31}\text{P}$ są mniej podatne na zmiany kąta dwuściennego niż $\text{H} - ^{31}\text{P}$. Przez analogię dla J H-H i $\text{H} - ^{31}\text{P}$ można przypuszczać, że stała sprzężenia CP trans będzie duża (ok. 10 Hz), a gauche będzie mała (1-2 Hz). Takie wicynalne stałe podano w tabeli. Badania pmr w roztworze wykazały, że cykliczny pierścień fosforanowy posiada konformację krzesłową. W konformacji tej atom fosforu jest trans do C2', a z danych C-13 mr wynika, że $J_{13\text{C}2'\text{-P}}$ jest 8,0 Hz - co wskazuje na sprzężenie trans. Stała P-C4' wskazuje na sprzężenie gauche. Geminalne stałe sprzężenia dla 3', 5' są różne, ale stałe dla całej serii (4.3 i 7 Hz); spowodowane to jest wpływem podstawników i różną gęstością elektronową wzdłuż drogi sprzężenia.

LITERATURA

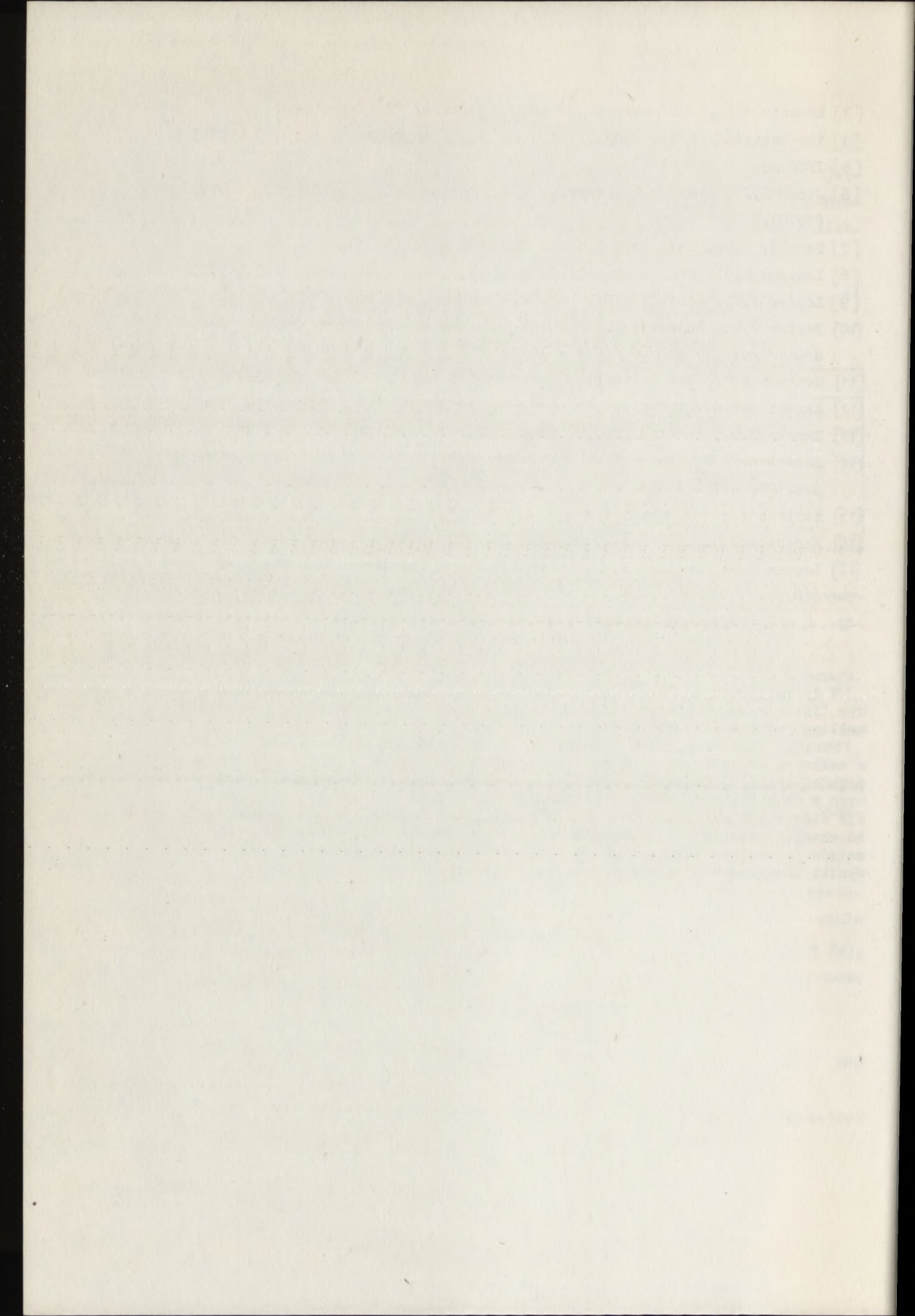
- [1] Dyer J.R., Spektroskopia absorpcyjna w chemii organicznej - PWN Warszawa 1967.
- [2] Emsley J.W., Eooney J., Sutcliffe L.H. High resolution NMR spectroscopy - Pergamon Press 1966.

- [3] Roberts J.D., Magnetyczny rezonans jądrowy, WNT Warszawa.
- [4] Von Breitanaiier E., Jung G., Voolter W., Angew.Chem. 83, 659 (1971).
- [5] JEOL news - 9a (2) 1971.
- [6] Jones A.J., Grant D.M., Winkley M.W., Robins R.K., JACS 92, 4079, (1970).
- [7] Tarpley A.R., Goldstein J.H., JACS 93, 3573 (1971).
- [8] Lemieux R.U., Nagabhusan T.L., Paul B., Can.J.Chem. 50, 773 (1972).
- [9] Lapper R.D., Smith I.C.P., J.Am.Chem.Soc., 95, 2880 (1973).
- [10] Farrar T.C., Becker E.D., Pulse and Feurier transform NMR - Academic Press 1971.
- [11] Mantsch H.H., Smith I.C.P., Biochem. Biophys.Res.Comn. 96,808(1972).
- [12] Annual Review of NMR spectroscopy Ed. by Mocney E.F. Academic Press.
- [13] Dersan D.E., Roberts J.D., Prec.Natl.Acad.Sci.U.S. 65, 19 (1970).
- [14] Schweicer M.P., Banta E.B., Witkowski J.T., Robins R.K., J.Am.Chem. Soc. 95, 3770 (1973).
- [15] Karplus M., J. Chem. Phys. 30, 11 (1959).
- [16] Karabatses C.J., J.Am.Chem.Soc. 83, 1230 (1961).
- [17] Lapper R.D., Mantsch H.M., Smith I.C.P., J.Am.Chem.Soc. 95, 2878, (1973).

DYSKUSJA

W dyskusji mgr M. Kręglewski poruszył problem przypisywania poszczególnym liniom ramanowskim określonych drgań w cząsteczce, ponieważ nie jest możliwe jednoznaczne stwierdzenie co to jest za typ drgania.

Ponadto zauważono, że w wypadku badań prowadzonych w roztworze wodnym w zakresie od 1500 do 1100 cm^{-1} następuje nałożenie się linii pochodzących od drgań zginających wody z drganiami rozciągającymi wiązań podwójnych w cząsteczkach zasad i ich pochodnych. Z tego też powodu interpretacja widm w tym zakresie jest bardzo trudna. Mgr A. Rafalski stwierdził, że chociaż przypisywanie drgań poszczególnym grupom jest nieścisłe, jednak metoda ta została wykorzystana w spektroskopii w podczerwieni i przynosi wyniki pomagające w ustaleniach strukturalnych.



Maciej Stobiecki

SPEKTROSKOPIA RAMANOWSKA ZASAD PIRYMIDYNOWYCH NUKLEOZYDÓW I NUKLEOTYDÓW

STRESZCZENIE

W referacie przedstawiono możliwości zastosowania spektroskopii ramanowskiej do badań podstawowych składników kwasów nukleinowych. Zostały poruszone problemy związane z przygotowaniem próbek i wpływ ich czystości na jakość widm. Podano przykłady widm ramanowskich zasad pirymidynowych i purynowych oraz ich nukleozydów i nukleotydów w roztworach i w ciele stałym.

Przedstawiono także wyniki badań nad wpływem temperatury na intensywność linii ramanowskiej.

W 1923 roku Smekal zwrócił uwagę na fakt, że w promieniowaniu rozproszonym oprócz fotonów o częstościach ν_0 powinny się pojawić fotony o częstościach różnych od częstości promieniowania wzbudzającego. Z kolei w 1925 roku Kramers i Heisenberg obliczyli na podstawie teorii kwantowo-mechanicznej, że fotony te powinny mieć częstość $\nu_0 \pm \nu_{osc.rot.}$ W 1927 r. Dirac opracował kwantowo-mechaniczną teorię rozpraszania. Uwieńczeniem przewidywań teoretycznych było zaobserwowanie w 1928 r. przez Ramana tego zjawiska w cieczech (benzen) oraz przez Landsberga i Mandelsztama w kryształach kwarcu.

Składowa elektryczna promieniowania elektromagnetycznego oddziałuje z cząsteczkami materii. Indukuje ona w molekułe moment dipolowy μ_{ind} , który jest proporcjonalny do natężenia E składowej elektrycznej zmiennego pola magnetycznego, elektromagnetycznego, przy czym współczynnik proporcjonalności zdefiniowano jako polaryzowalność molekuł :

$$\mu_{ind} = \alpha E \quad (1)$$

Placzek opracował teorię polaryzowalności, która pozwala na wygodny opis zjawiska Ramana, według niej polaryzowalność jest to potencjalna zdol-

ność przemieszczania się elektronu względem jąder atomowych w polu elektrycznym.

Indukowany w cząsteczce moment dipolowy musi drgać z częstotścią padającego promieniowania:

$$\mu_{ind} = \alpha E_0 \cos 2\pi \nu_0 t \quad (2)$$

Jeżeli uwzględnimy zależność natężenia pola elektrycznego od częstotści ν (ν_0) i że polaryzowalność jest funkcją współrzędnej normalnej drgania $\alpha(q)$ (przy założeniu, że wychylenie q jest bliskie zeru), pamiętając, że wychylenie q zmienia się periodycznie wg wzoru

$$q = Q \cos 2\pi \nu t \quad (3)$$

to

$$\begin{aligned} \mu_{ind} = & \alpha_0 E_0 \cos 2\pi \nu_0 t + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 Q E_0 \cos 2\pi (\nu_0 - \nu) t + \\ & + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 Q E_0 \cos 2\pi (\nu_0 + \nu) t \end{aligned} \quad (4)$$

W tym wzorze tkwi wytłumaczenie zjawiska Ramana. Czyli drgający indukowany moment dipolowy ma trzy podstawowe składowe ν_0 , $\nu_0 - \nu$, $\nu_0 + \nu$. Z praw elektrodynamiki wynika, że każdy drgający dipol jest źródłem promieniowania o natężeniu I proporcjonalnym do kwadratu amplitudy jego drgań i do czwartej potęgi częstotści drgań

$$I \sim M_{ind}^2 \nu^4 \quad (5)$$

Dla pierwszej składowej otrzymujemy następującą postać:

$I_{Ray} \sim \alpha_0^2 E_0^2 \nu_0^4$ - cząsteczka w wyniku oddziaływania z promieniowaniem elektromagnetycznym pozostaje na tym samym poziomie energetycznym, jest to rozproszenie Rayleighowskie, dla drugiej składowej:

$I_{st} \sim \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0^2 E_0^2 Q^2 (\nu_0 - \nu)^4$ - cząsteczka przechodzi na wyższy poziom oscylacyjny - rozproszenie stockesowskie, dla trzeciej składowej:

$I_{ast} \sim \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0^2 E_0^2 Q^2 (\nu_0 + \nu)^4$ - cząsteczka przechodzi na niższy poziom oscylacyjny - rozproszenie antystokesowskie.

Intensywność pasm stockesowskich jest około 1000 razy mniejsza od intensywności pasm rayleighowskich, natomiast o stosunku intensywności pasm antystokesowskich do pasm stockesowskich decyduje stosunek obsadzeń oscylacyjnych poziomów energetycznych.

Z rozważań kwantowo-mechanicznych wynika, że integralna intensywność I_{∞} pasma ramanowskiego związanego ze zmianą wibracyjnej liczby kwantowej $0 \rightarrow 1$ i-tego drgania normalnego jest proporcjonalna do kwadratu pochodnej polaryzowalności względem współrzędnej normalnej

$$I_{\infty} \sim \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0^2 \quad (6)$$

Jest to reguła wyboru w widmie Ramana. Wynika z niej, że w widmie Ramana pojawiają się pasma tylko tych drgań normalnych, w czasie których następuje zmiana polaryzowalności. Przejście ramanowskie jest zabronione, gdy pochodna polaryzowalności jest równa zero, $\left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 = 0$. Sytuacja taka ma miejsce w dwóch przypadkach:

1. polaryzowalność nie jest funkcją współrzędnej normalnej $\alpha \neq f(q_i)$ przypadek ten zachodzi, gdy wiązanie chemiczne jest całkowicie spolaryzowane, tzn. mamy do czynienia z wiązaniem jonowym, gdzie elektrony poruszają się wraz z jądrem atomowym. Np. dla NaCl nie obserwuje się widma ramanowskiego,

2. funkcja polaryzowalności w punkcie $q = 0$ ma ekstremum, wówczas $\left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_{q=0} = 0$. Sytuacja taka występuje zawsze wtedy, gdy cząsteczki mają środek symetrii, dla nich pewne drgania są aktywne w podczerwieni, a nieaktywne w efekcie Ramana i odwrotnie.

Ważną rolę w widmach Ramana odgrywa polaryzacja promieniowania rozproszonego. Depolaryzacją promieniowania rozproszonego nazywa się zjawisko wynikające z anizotropii polaryzowalności cząsteczek lub grup atomów. Stopień depolaryzacji ρ jest określony jako stosunek intensywności promieniowania rozproszonego, którego wektor elektryczny drga w płaszczyźnie prostopadłej do wektora elektrycznego wiązki padającej, do intensywności promieniowania, którego wektor elektryczny drga w płaszczyźnie równoległej do wektora elektrycznego wiązki padającej:

$$\rho = \frac{J_{\perp}}{J_{\parallel}} \quad (7)$$

Dla niespolaryzowanego promieniowania wzbudzającego stopień depolaryzacji ρ - drgania może zmieniać się w granicach:

$$0 \leq \rho \leq \frac{6}{7}$$

W praktyce oznacza to, że jeśli pasmo ramanowskie jest zdepolaryzowane

$\rho = 6/7$, to odpowiada ono drganiu asymetrycznemu lub zdegenerowanemu i ma małe natężenie, natomiast jeżeli pasmo ramanowskie jest spolaryzowane $0 \leq \rho \leq \frac{6}{7}$, to odpowiada ono drganiu w pełni symetrycznemu. Przy tym im bardziej wartość ρ jest zbliżona do zera, tym wyższa jest symetria molekuly.

Od momentu, gdy źródłem promieniowania wzbudzającego są lasery, trudności związane z rejestracją widm Ramana zostały prawie całkowicie usunięte. Spektroskopia ramanowska jest szeroko wykorzystana w przypadku badań kwasów nukleinowych oraz ich komponentów. Widma próbek podstawowych składników można rejestrować w postaci proszków, kryształów lub roztworów.

Musi być zapewniona wysoka czystość próbek przygotowywanych do badań metodą spektroskopii ramanowskiej z tego względu, że zanieczyszczenia znajdujące się w próbce mogą powodować fluorescencję, która będzie nakładać się na linie ramanowskie substancji badanej uniemożliwiając ich odczytanie.

Szczególnie przydatnym rozpuszczalnikiem do badań spektroskopowych tą metodą jest woda, która posiada tylko jedną bardzo silną linię w zakresie od 3200 do 3600 cm^{-1} , natomiast pozostałe linie około 1640, 800, 400 i 175 cm^{-1} mają bardzo małą intensywność tak, że interferencją ramanowska aktywnych drgań wody w przedziale poniżej 3200 cm^{-1} jest do zaniebdania. Aby otrzymać widmo odpowiedniej jakości, stężenie badanej substancji w roztworze powinno wynosić około 0,2 m/l, jednak ze względu na słabą rozpuszczalność, szczególnie zasad, otrzymanie takich stężeń jest nie zawsze możliwe. Na jakość widm roztworów ma również wpływ obecność stałych zanieczyszczeń, dlatego też dla wyeliminowania efektu rozpraszania promieniowania wzbudzającego należy roztwory filtrować.

Spektroskopia ramanowska jest bardzo przydatną metodą instrumentalną do określania w jakich formach tautomerycznych występują zasady purynowe i pirymidynowe oraz ich nukleozydowe i nukleotydydowe pochodne w roztworach wodnych.

W widmach poszczególnych zasad oraz pochodnych stwierdzono obecność specyficznych linii, które zostały przypisane charakterystycznym drganiom pierścieni zasad. Dane te mogą być wykorzystane do identyfikacji specyficznych zasad w biomolekułach o nieznanym składzie. Obserwuje się systematyczne zmiany częstotliwości linii ramanowskich ze zmianą pH roztworów dla wszystkich pochodnych danej puryny lub pirymidyny. Tworzeniu się kationu towarzyszy zawsze przesunięcie linii w kierunku wyższych częstotliwości drgań rozciągających podwójnego wiązania, podczas gdy tworzeniu się anionu towarzyszy odpowiednie zmniejszenie się częstotliwości. Występowanie tego zjawiska może być jedynie wytłumaczone przyłączeniem lub odłącze-

niem protonów (deuteronów) raczej w miejscach azotów pierścieniowych, a nie zewnętrznych grup aminowych. Przyłączenie protonów do pierścienia zasad faworyzuje rozkład elektronów π w wiązaniach podwójnych, podczas gdy usunięcie protonów powoduje delokalizację π elektronów. Z kolei linie w zakresie od 1200 do 1300 cm^{-1} odpowiadają drganiom rozciągającym wiązań pojedynczych pierścienia C-C i C-N. Podczas protonacji cząsteczki wzrasta charakter pojedynczego wiązania, stąd częstotliwość tych drgań maleje.

Badanie widm ramanowskich roztworów wodnych i w ciężkiej wodzie pozwala na uzyskanie większej ilości informacji strukturalnych wynikających z efektu podstawienia izotopowego, niż to miało miejsce w widmach uzyskanych metodą spektroskopii w podczerwieni.

Dotychczas przebadano zasady oraz 1-N podstawione pochodne w wypadku pirymidyn i 9-N podstawione pochodne puryn, gdzie podstawnikami mogą być atomy wodoru, grupa metylowa, pierścień rybozy lub 5'-fosforanu rybozy.

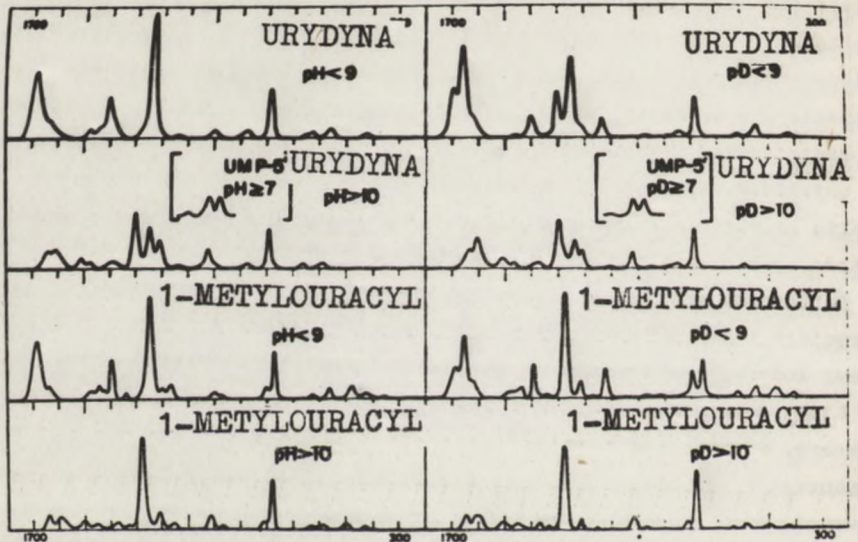
Widma ramanowskie tego typu związków można podzielić na dwa zasadnicze zakresy. Pierwszy od 1800 cm^{-1} do 1500 cm^{-1} , w którym pojawiają się linie ramanowskie pochodzące od drgań rozciągających wiązań podwójnych między atomami. W różnych warunkach rejestracji próbek, tzn. w stanie stałym, w roztworach wodnych i w ciężkiej wodzie oraz w roztworach alkalicznych zawierających NaOH, pochodne określonej zasady posiadają bardzo podobny układ linii, który zmienia się jednak wyraźnie ze zmianą środowiska.

Dla pochodnych uracyli stwierdzono, że w tym zakresie powinny się również pojawić linie związane z drganiami zginającymi w płaszczyźnie wiązań N-H, jednak intensywność tych linii jest minimalna albo nie są one w ogóle rejestrowane.

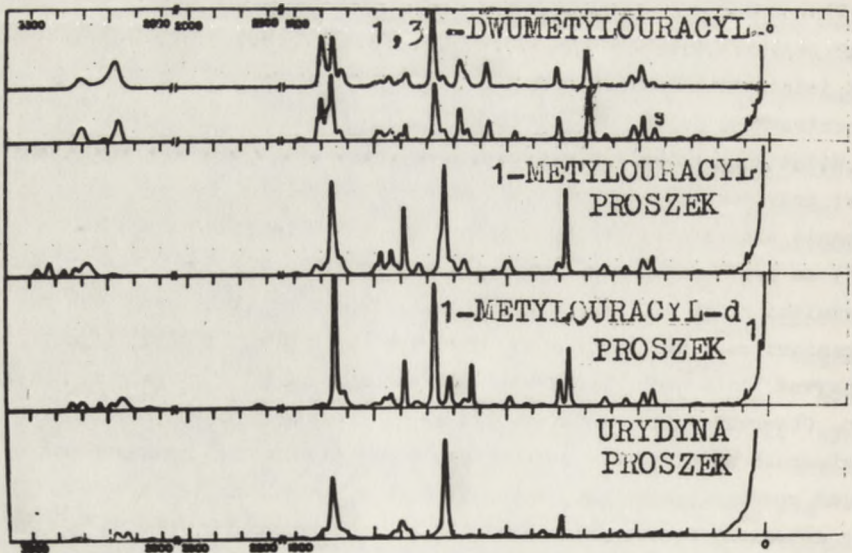
Widma wszystkich 1-N podstawionych pochodnych uracylu w roztworach ciężkiej wody posiadają trzy linie, które są odpowiedzialne za rozciągające drgania wiązań podwójnych, ponieważ drgania zginające wiązań N-D w pozycji N(3) są przesunięte poza ten rejon. Linia około 1690 cm^{-1} jest związana z drganiami grupy C=O przy węglu 2, a bardzo silna linia przy 1655 cm^{-1} z drganiami rozciągającymi grupy karbonylowej w pozycji C(4), najmniej intensywna linia jest przypisywana drganiom rozciągającym C=C w pierścieniu. Obserwuje się zasadnicze zmiany w widmie w wypadku analizy próbek w roztworach wodnych. Nie stwierdzono rozdzielenia się linii pochodzących od drgań rozciągających grup karbonylowych w pozycjach C(2) i C(4). Pojawia się natomiast bardzo intensywna linia z maksimum przy 1680 cm^{-1} . Zmiany te sugerują, że drgania grup karbonylowych są sprzężone z drganiami zginającymi N-H w pozycji N(3).

W roztworach zasadowych następuje przesunięcie linii widmowych w kie-

runku niższych częstotliwości na skutek deprotonacji cząsteczki w pozycji N(3), co powoduje delokalizację elektronów π między atomami pierścienia a grupami karbonylowymi O - C - N - C = O.



Rys. 1. Widma ramanowskie pochodnych uracylu w roztworach wodnych i w ciężkiej wodzie



Rys. 2. Widma ramanowskie pochodnych uracylu w stanie stałym

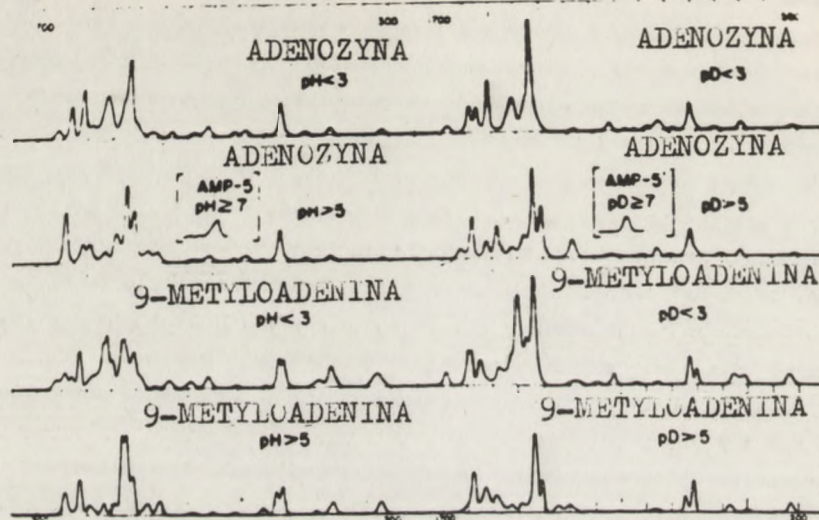
Obszar widma od 1800 do 1500 cm^{-1} jest identyczny dla wszystkich 1-N podstawionych pochodnych uracylu zarówno w roztworach NaOH i NaOD. Odmienne widmo obserwuje się dla zasadowych roztworów uracylu. W tym przypadku na zmianę widma ma wpływ efekt podstawienia izotopowego. Natomiast w alkalicznych roztworach 1,3-dwumetylouracylu nie obserwuje się żadnych zmian w porównaniu z widmami w roztworach obojętnych. W wielu pochodnych krystalicznych uracylu istnieją silne wiązania wodorowe i dane uzyskane metodą spektroskopii ramanowskiej potwierdzają ten fakt. Wnioski te zostały poparte tym, że między widmem ramanowskim krystalicznego 1-metylouracylu, a widmem roztworu występują poważne rozbieżności, a natomiast nie zaobserwowano podobnych różnic między widmem krystalicznego 1,3-dwumetylouracylu, w którym tego typu oddziaływania nie mogą mieć miejsca, a widmami jego roztworów w H_2O i D_2O .

Porównując widma ramanowskie 9-metyloadeniny i 9-metyloadeniny- d_2 w cieple stałym stwierdzono podobne własności spektralne obydwóch związków w zakresie od 1500 do 1600 cm^{-1} . Na tej podstawie wysnuto wniosek, że żadne z drgań w tym zakresie nie należy głównie do drgań nożycowych grupy NH_2 . Z kolei w widmie IR 9-metyloadeniny występuje silne pasmo przy 1671 cm^{-1} , które zanika zupełnie w widmie 9-metyloadeniny d_2 również w widmach IR innych niedeuterowanych pochodnych adeniny występuje silne pasmo przy 1672 cm^{-1} , które zanika po deuterowaniu. Stąd można wnioskować, że pasmo około 1670 cm^{-1} w widmie IR ciała stałego odpowiada prawie czystemu drganiu nożycowym grupy NH_2 , które nie są obserwowane w efekcie Ramana.

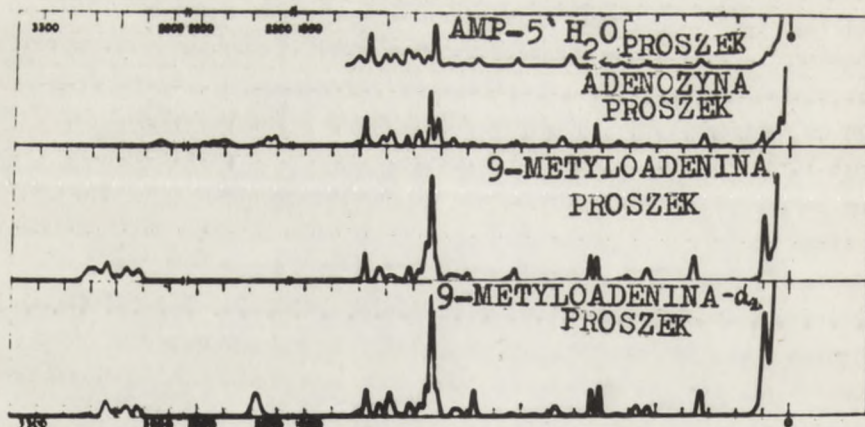
Widma pochodnych adeniny zarówno w roztworach wodnych jak i w ciężkiej wodzie, gdy następuje wymiana protonów w grupie aminowej na deuter, charakteryzują się dużym podobieństwem, linie pochodzące od drgań wiązań podwójnych w cząsteczce występują przy tych samych częstościach. Fakt ten tłumaczy się brakiem sprzężenia drgań nożycowych grupy NH_2 z drganiami rozciągającymi wiązań podwójnych.

Obniżenie pH lub pD badanych roztworów powoduje systematyczne podwyższenie częstotliwości linii należących do drgań rozciągających $\text{C}=\text{N}$ i $\text{C}=\text{C}$. Sugeruje to wnikanie protonów lub deuteronów wprost w strukturę pierścienia prawdopodobnie w pozycji N(1).

Efekt podstawienia izotopowego został również wykorzystany do określenia rodzaju drgań dla linii przy 1665 cm^{-1} w widmie stałej cytozyny lub jej pochodnych. Z danych spektroskopii IR wynikało, że pasmo przy 1665 cm^{-1} związane jest z drganiami nożycowymi NH_2 z powodu jego nieobecności w widmie pochodnych deuterowanych i przez analogię do pochodnych adeniny (pasmo przy 1671 cm^{-1}) zostało podane takie rozwiązanie. Natomiast w widmach ra-



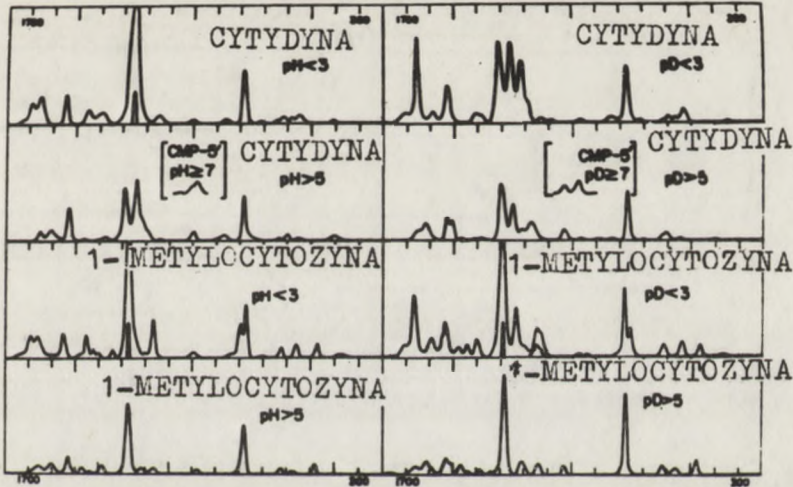
Rys. 3. Widma ramanowskie pochodnych adeniny w roztworach wodnych i w ciężkiej wodzie



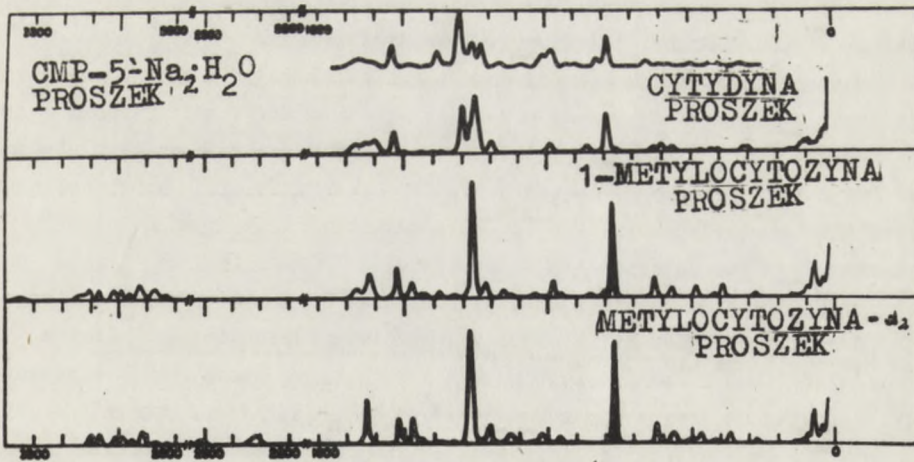
Rys. 4. Widma ramanowskie pochodnych adeniny w stanie stałym

manowskich adeniny nie ma odpowiednika tego pasma, a występuje ono w widmach pochodnych cytozyny zarówno w ciele stałym, jak i w roztworach wodnych i w ciężkiej wodzie. Znaczne natężenie tej linii ramanowskiej w pochodnych cytozyny sugeruje, że podstawowy udział ma nieco inne drganie niż drgania nożycowe grupy NH_2 . Widma deuterowanych pochodnych cytozyny wykazują silne pasma IR przy około 1650 cm^{-1} , co odpowiada pasmu 1665 cm^{-1} niedeuterowanych pochodnych, a małe przesunięcie częstotliwości sugeruje tylko niewielki wkład drgań grupy NH_2 . Z kolei grupa karbonylowa przy węglu w po-

zycji C(4) w pochodnych uracylu daje początek silnemu pasmu IR i linii ramanowskiej około 1660 cm^{-1} . Dlatego bardziej odpowiednie jest przypisanie tej linii w pochodnych cytozyny drganiom rozciągającym wiązań podwójnych.

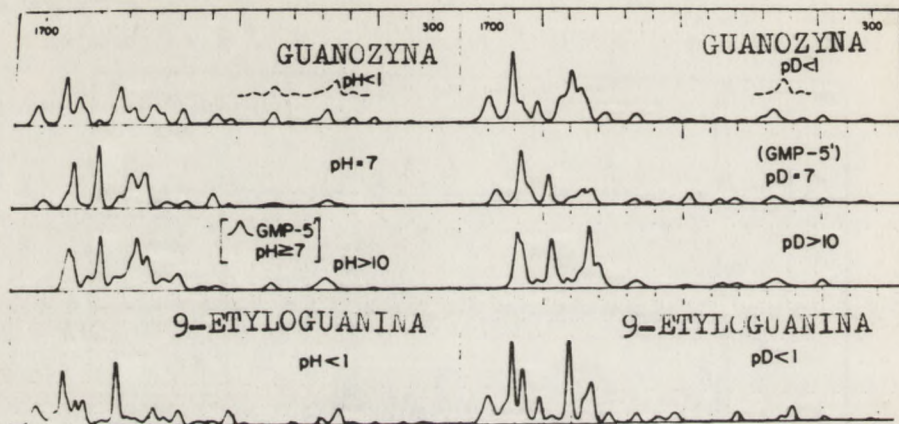


Rys. 5. Widma ramanowskie pochodnych cytozyny w roztworach wodnych i w ciężkiej wodzie



Rys. 6. Widma ramanowskie pochodnych cytozyny w stanie stałym

Badając widma pochodnych guanozyny w obojętnych roztworach wodnych i w ciężkiej wodzie stwierdzono, że występuje ona w formie 6-keto-2-amino. Silnie spolaryzowana linia leżąca przy 1670 cm^{-1} dla roztworu D₂O i 1680 cm^{-1} dla roztworów H₂O została przypisana przez analogię do widm uracylu drganiom rozciągającym grupy karbonylowej.



Rys. 7. Widma ramanowskie pochodnych guaniny w roztworach wodnych i w ciężkiej wodzie

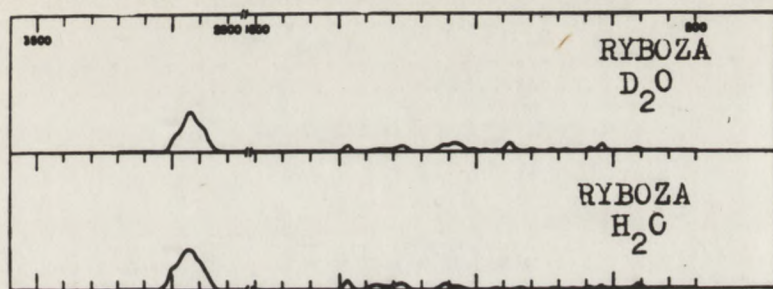
Jeżeli w roztworze dominowałby tautomer w formie enolowej nie można by się spodziewać linii o częstotliwości odpowiadającej drganiom grupy karbonylowej. Gdyby natomiast dominowała iminowa forma tautomeryczna drgania grupy C=N-H nie występowałyby przy tak dużej częstotliwości, a ponadto efekt izotopowy spowodowałby większą zmianę częstotliwości.

W widmach zasad i ich pochodnych w zakresie poniżej 1500 cm^{-1} pojawiają się linie związane z drganiami rozciągającymi i zginającymi wiązań w cząsteczce. Pewne linie występujące w tym zakresie są charakterystyczne dla omawianych związków i mogą służyć do identyfikacji poszczególnych składników kwasów nukleinowych lub oligonukleotydów. W wypadku uracylu i cytozyny linie te pojawiają się w zakresie od 1200 do 1300 cm^{-1} , są one przypisane drganiom rozciągającym pierścienia. Natomiast specyficzne drgania pierścieniowe pochodnych adeniny i guaniny przypisane są liniom w okolicy 1300 cm^{-1} . Ponadto występują dla wszystkich zasad charakterystyczne linie poniżej 800 cm^{-1} : linia około 790 cm^{-1} - uracyl, linia 780 cm^{-1} - cytozyna, 720 cm^{-1} - adenina i linia poniżej 700 cm^{-1} - guanina. Linie te są przypisane drganiom pulsacyjnym pierścienia i nie zmieniają swych częstotliwości podczas zmian pH lub pD.

Poza drganiami pierścieniowymi dla wszystkich widm zasad i ich pochodnych we wszystkich stanach skupienia i zakresach pH i pD w roztworach pojawiają się linie charakterystyczne dla różnych środowisk.

Porównanie widm wodnych zasad i ich pochodnych z widmami nukleozydów i nukleotydów wykazuje ich duże podobieństwo. Wynika to z faktu, że linie

ramanowskie pierścienia cukrowego mają bardzo małą intensywność w stosunku do linii pochodzących od drgań atomów pierścienia zasady.



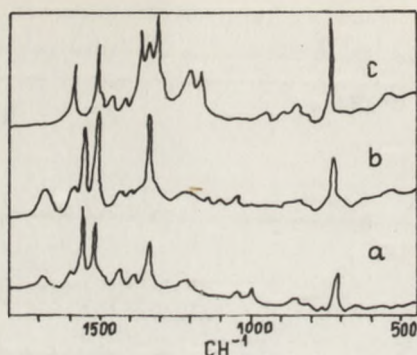
Rys. 8. Widma ramanowskie rybozy w roztworze wodnym i w ciężkiej wodzie

Jak można stwierdzić na podstawie rysunku widmo cząsteczki D(-) -rybozy ma tylko bardzo słabe linie ramanowskie przy 880, 1080 i 1125 cm⁻¹. Są one obecne również w widmach nukleotydów i nukleozydów. Słabe linie rybozy pojawiają się z kolei jako silne pasma w widmie IR i są przypisywane drganiom rozciągającym C-C i C-O w pierścieniu. W widmach nukleotydów pojawia się dosyć intensywna linia przy 980 cm⁻¹ i bardzo słaba linia w pobliżu 1100 cm⁻¹, są one przypisywane drganiom rozciągającym grupy fosforanowej. W widmach krystalicznych pochodnych zasad pojawiają się linie ramanowskie w zakresie poniżej 400 cm⁻¹, są one związane z szkieletowymi drganiami rozciągającymi i zginającymi. Między innymi stwierdzono, że w rejonie między 120 a 70 cm⁻¹ pojawiają się linie o bardzo małej intensywności, przypisywane czystym drganiom rozciągającym wiązań wodorowych.

Metoda spektroskopii ramanowskiej dzięki możliwości wykonywania widm w roztworach wodnych pozwala na stwierdzenie, w jakiej formie tautomerycznej występują poszczególne zasady. Dla określenia równowagi tautomerycznej inozyny w roztworach wodnych wykonane zostały widma ramanowskie obojętnych roztworów inozyny, 1-metyloinozyny i 6-O-metyloinozyny. Dwa ostatnie związki posiadają podstawniki w pozycjach uniemożliwiających przemianę w drugą formę tautomeryczną i mają struktury odpowiadające formie ketonowej lub enolowej. W zakresie powyżej 1500 cm⁻¹ dwa pierwsze związki posiadają cztery intensywne linie przy 1684, 1585, 1555 i 1512 cm⁻¹.

Szeroka linia w pobliżu 1680 cm⁻¹ jest przypisywana drganiom rozciągającym grupy karbonylowej, która określa formę ketonową. Natomiast widmo 6-O-metyloinozyny ma tylko dwie linie przy 1586 i 1508 cm⁻¹.

W zakresie poniżej 1500 cm⁻¹ w widmach inozyny i 1-metyloinozyny pojawiają się linie ramanowskie przy 1390 i 1335 cm⁻¹, a w widmie 6-O-metyloinozyny linie przy 1359 i 1307 cm⁻¹. Powyższe dane widmowe wskazują na po-



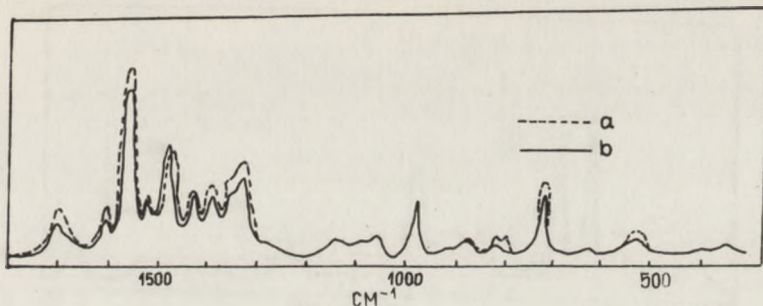
Rys. 9. Widma ramanowskie w roztworze $^2\text{H}_2\text{O}$, stężenie 0,25 M/l, p^2H 7,5, a) 1-metyloinozyna, b) inozyna, c) 6-0-metyloinozyna

dobną strukturę w cząsteczkach inozyny i jej 1-metylopo pochodnej. Ponadto w widmach dwóch pierwszych związków występuje linia przy 721 cm^{-1} , charakterystyczna dla formy ketonowej, przypisywana drganiom pulsującym pierścienia, a linia ramanowska charakterystyczna dla formy enalowej pojawia się w 6-0-metyloinozynie przy 736 cm^{-1} . Brak w widmie inozyny linii przy 736 cm^{-1} świadczy o tym, że w roztworze znajdują się one w ponad 99% w formie ketonowej.

Na kształt i intensywność linii ramanowskich w widmach roztworów wodnych nukleozydów i nukleotydów mają wpływ zmiany temperatury. Obniżenie temperatury może spowodować następujące zmiany: 1) zmniejszenie intensywności linii, jest to tzw. hypochromowy efekt Ramana, 2) wzrost ich intensywności, 3) przesunięcie częstotliwości lub 4) zmianę kształtu linii.

Na przykład dla pochodnych inozyny wszystkie tego typu zmiany w widmie są odwracalne w zakresie od 0 do 85°C . Dotąd uzyskane informacje wskazują na to, że fakt wystąpienia różnic w widmie ramanowskim pod wpływem temperatury nie jest spowodowany ani reakcjami protonacji lub deprotonacji, ani też przesunięciem punktu równowagi tautomerycznej, a odwracalność tych zmian ze zmianą temperatury wyklucza możliwość wystąpienia oddziaływań chemicznych. Dlatego też przyjęto, że zmiany widma ramanowskiego zachodzą pod wpływem asocjacji cząsteczek. Wystąpienie efektu hypochromowego w widmie Ramana wskazuje na to, że efekt asocjacji cząsteczek 5'-fosforanu inozyny przebiega poprzez stakingowanie zasad. Natomiast różnice we względnych wartościach intensywności poszczególnych linii świadczą o różnym stopniu sprzężenia pomiędzy stanami wibracyjnymi i elektronowymi.

Obserwuje się również duży względny wzrost intensywności linii ramanowskiej przy 820 cm^{-1} przy obniżeniu temperatury. We wszystkich badanych



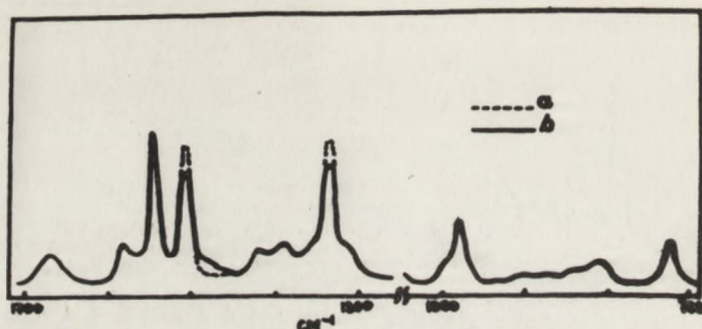
Rys. 10. Widma ramanowskie Ino-5'-P w roztworze H_2O , stężenie 0,6 M/l, pH 7,5, a) w temperaturze 10°C, b) w temperaturze 85°C

dotychczas polirybonukleotydach i kwasach nukleinowych intensywność linii o tej częstotliwości w widmach ramanowskich zależała od stopnia uporządkowania badanego układu. Linia ta miała maksymalną intensywność w widmach układów uporządkowanych i malała ona ze wzrostem stopnia nieuporządkowania. Stwierdzono, że linie przy 820 cm^{-1} należy przypisać prawdopodobnie drganiom grupy fosforanowej w każdym mono- lub polirybonukleotydzie.

Wzrost asocjacji cząsteczek 5'- fosforanu inozyny w niższych temperaturach powoduje przesunięcie linii przy 1472 cm^{-1} o 10 cm^{-1} w kierunku wyższych częstotliwości. Linia ta przypisywana jest sprzężonym drganiom pierścienia hipoksantynowego i zmiana jej położenia w kierunku wyższych częstotliwości wskazuje na usztywnienie wiązań w pierścieniu.

Brak jakichkolwiek oddziaływań na linię przy 980 cm^{-1} przypisywaną drganiom grupy fosforanowej podczas zmian temperatury świadczy o tym, że grupa PO_3 nie jest bezpośrednio związana z asocjacją cząsteczek nukleotydu i ma taką samą strukturę w wypadku stakingu zasad lub jego braku.

W roztworach w ciężkiej wodzie 5'- fosforanu inozyny w wyższych temperaturach następuje podstawienie atomu wodoru w pozycji C(8) pierścienia przez atom deuteru. Spektroskopia ramanowska jest prostą metodą pozwalającą na badanie przebiegu tej reakcji (rys. 11). Na rysunku są przedstawione widma roztworów 5'- fosforanu inozyny w ciężkiej wodzie. W pierwszym przypadku miało miejsce tylko nietrwałe podstawienie protonów w grupach NH i OH, natomiast w drugim nastąpiło podstawienie atomu wodoru deuterem w pozycji C(8). Różnice w intensywności linii przy 1508 i 1330 cm^{-1} są spowodowane podstawieniem atomu wodoru przez deuter. Obydwie linie należą do drgań rozciągających pierścień sprzężonych z drganiami zginającymi wiązania C-H w pozycji C(8). Wymianie towarzyszy również pojawienie się linii przy 1483 cm^{-1} spowodowane sprzężeniem drgań rozciągających pierście-



Rys. 11. Widma ramanowskie Ino-5'-P w roztworze $^2\text{H}_2\text{O}$, stężenie 0,6 M/l, p^2H 7,5, pomiary w temperaturze 0°C ; a) świeżo przygotowany roztwór, b) roztwór po ogrzaniu do temperatury 85°C

nia z drganiami zginającymi wiązania C-D. Na podstawie dotychczas zebranych informacji można dokonać pewnych uogólnień dotyczących widm ramanowskich zasad i ich pochodnych. W większości wypadków drgania deformacyjne wiązań N-H, N-D, NH_2 i ND_2 są bardzo słabe lub niewykrywalne w efekcie Ramana, nie odkryto żadnych wyraźnych wyjątków.

W widmach roztworów tej grupy związków linie pochodzące od drgań rozciągających grup karbonylowych są odpowiednio szersze niż inne drgania rozciągające wiązań podwójnych. Ponadto linie te są silnie spolaryzowane we wszystkich przypadkach, podczas gdy linie innych drgań rozciągających w pierścieniu są na ogół mniej spolaryzowane.

LITERATURA

- [1] Kęcki Z., Podstawy spektroskopii molekularnej, Warszawa PWN, 1972.
- [2] Lord R.C., Thomas G.J., Jr. Spectrochim. Acta. 23A 2551-2591 (1967).
- [3] Angrill C.L., J. Chem. Soc. 504 (1961).
- [4] Shimanouchi T., Tsuboi H., Kyogoku Y., Advances in Chemical Physics, Tom VII, Rozdz. 12 (1965).
- [5] Harada J., Lord R.C., Spectrochim. Acta. 26A 2305-2318 (1970).
- [6] Mederios C.C., Thomas G.J., Jr BBA 238 1 (1971).
- [7] Thomas G.J., Jr ibid. 213 417 (1970).
- [8] Mederios C.C., Thomas G.J., J.R. ibid. 247 449 (1973).

Marek Kręglewski

PROBLEMY TEORII WIDM IR SKŁADNIKÓW KWASÓW NUKLEINOWYCH

STRESZCZENIE

W rozdziale tym przedstawiono ogólne problemy teorii widm w podczerwieni. W oparciu o teorię przedyskutowano ograniczenia metody IR w badaniach struktury kwasów nukleinowych.

WSTĘP

Widma w podczerwieni cząsteczek mogą być analizowane różnymi metodami i z różnymi stopniami precyzji. W korzystnych przypadkach niewielkich cząsteczek, szczególnie dwuatomowych, możliwe jest przeprowadzenie dokładnych obliczeń wiążących obserwowane widmo ze strukturą cząsteczki. W innym skrajnym przypadku stosuje się tylko badanie jakościowe, empirycznie pozwalające stwierdzić obecność lub brak pewnych grup funkcyjnych. Między tymi podejściami istnieje wiele przypadków pośrednich, w których możemy posługiwać się metodami przybliżonymi. Stosowanie tych metod wymaga jednak dużej ostrożności ze względu na dużą ilość wprowadzanych przybliżeń.

Celem pracy jest przeanalizowanie problemów wyłaniających się przy stosowaniu do dużych cząsteczek obecnie dostępnej teorii widm w podczerwieni pod kątem poprawności opisu poszczególnych pasm IR oraz możliwości przewidywania zmian, jakie nastąpią w widmie w przypadku podstawienia lub zmiany konformacji cząsteczki. Objętość pracy pozwala tylko na zasygnalizowanie tych problemów i wypunktowanie rysujących się nowych sposobów podejścia przy interpretacji widm w podczerwieni. Nie zostaną przy tym przedyskutowane zagadnienia intensywności pasm czy reguły wyboru, ponieważ wymagają one stosowania odrębnego aparatu matematycznego; wynikają mianowicie z rozwiązywania równania Schrödingera czasowo zależnego.

TEORIA WIDM W PODCZERWIENI

Cząsteczki chemiczne są zbudowane z jąder i z elektronów, między którymi występują oddziaływania elektrostatyczne dające w wyniku trwałe układy. Jak już założono, nie zostaną uwzględnione problemy reguł wyboru czy intensywności i wobec tego można ograniczyć się do rozpatrywania stanów stacjonarnych cząsteczek, tj. stanów o określonej energii. Pozwala to utworzyć dla cząsteczki następujący hamiltonian (bez uwzględnienia spinu):

$$\hat{H} = \hat{T}_j + \hat{T}_e + \hat{V}(q, Q) \quad (1)$$

gdzie: $\hat{T}_j = \sum_{\nu} \frac{\hbar^2}{2M_{\nu}} \nabla_{\nu}^2$ jest operatorem energii kinetycznej jąder

$\hat{T}_e = \sum_{\xi} \frac{\hbar^2}{2m_{\xi}} \nabla_{\xi}^2$ jest operatorem energii kinetycznej elektronów

\hat{V} - operatorem elektrostatycznego oddziaływania jąder i elektronów

M_{ν} - masą ν -tego jądra, m_{ξ} - masą ξ -tego elektronu

Q, q - współrzędnymi odpowiednio jąder i elektronów

Dla tak postawionego problemu nie można w żadnym wypadku mówić o oddzielnej energii elektronowej, wibracyjnej czy rotacyjnej. Sens fizyczny ma tylko dyskusja energii całkowitej cząsteczki. Jednak rozwiązanie równania Schrödingera dla pełnego hamiltonianu znaleziono na razie tylko dla cząsteczki H_2^+ [1].

W wypadku dużych cząsteczek wprowadzić należy określone przybliżenia, z których najważniejsze jest przybliżenie adiabatyczne [2]. Zostanie ono omówione bardziej szczegółowo.

Każdą funkcję falową $\Psi(q, Q)$ będącą rozwiązaniem pełnego równania Schrödingera

$$H \Psi(q, Q) = E \Psi(q, Q) \quad (2)$$

można rozwinąć w szereg

$$\Psi(q, Q) = \sum_I \psi_I(q, Q) \chi_I(Q) \quad (3)$$

gdzie $\psi_I(q, Q)$ są funkcjami własnymi "hamiltonianu elektronowego"

$$\hat{H}(Q) = \hat{T}_e + \hat{V}(q, Q) \quad (4)$$

spełniającymi równanie

$$H(Q) \psi_1(q, Q) = W_1(Q) \psi_1(q, Q) \quad (5)$$

$W_1(Q)$ przedstawia wielkość, która byłaby równa pełnej energii cząsteczki, jeżeli jądra występujące w konfiguracji Q nie poruszałyby się.

Ponieważ masą najbliższego jądra - protonu jest 1836 razy większa od masy elektronu, w przybliżeniu adiabatycznym zakłada się, że ruch elektronu odbywa się w uśrednionym polu jąder, tzn. jądra poruszają się tak wolno, że elektrony "czują" tylko ich położenie, a nie prędkości. Jeżeli stany elektronowe cząsteczki nie są zdegenerowane, założenie to odpowiada ograniczeniu się rozwinięcia (3) tylko do jednego członu, który zapiszemy w postaci:

$$\psi(q, Q) = \psi_e(q, Q) \chi_j(Q) \quad (6)$$

Po podstawieniu funkcji (6) do równania (2) i po skorzystaniu z zasady wariacyjnej można znaleźć równanie na $\chi_j(Q)$ w postaci:

$$(\hat{T}_j + U_e(Q)) \chi_j(Q) = E \chi_j(Q) \quad (7)$$

$$\text{gdzie: } U_e(Q) = W_e(Q) + \int \psi_e(q, Q) \hat{T}_j \psi_e(q, Q) dq \quad (8)$$

jest efektywnym potencjałem, w którym odbywa się ruch jąder.

Drugi człon prawej części wzoru (8) jest bardzo mały - rzędu m_e/M_j i zazwyczaj jest zaniedbywany. Wtedy wewnątrzcząsteczkowy efektywny potencjał jest niezależny od masy jąder, co oznacza np. że $U_e(Q)$ nie zmienia się przy podstawieniu izotopowym.

Warto podkreślić, że w przybliżeniu adiabatycznym można całkowitą energię cząsteczki podzielić na energię elektronową W_e oraz wibracyjno-rotacyjną. Oznacza to, że taki podział energii jest konsekwencją określonego przybliżenia wynikającego z pozostawienia w rozwinięciu całkowitej funkcji falowej $\psi(q, Q)$ tylko jednego członu.

W stosowanych dotychczas metodach teoretycznych dla dużych cząsteczek zakłada się, że drgania odbywają się wokół położenia równowagi. W tym wypadku można efektywny potencjał zapisać w przybliżeniu harmonicznym:

$$U_e(Q) \approx W_e(Q) \approx W_e^0(0) + \frac{1}{2} \sum_{\nu} f_{\nu} Q_{\nu}^2 \quad (9)$$

gdzie współrzędne Q_ν są wybrane tak, aby nie występowały człony mieszane $Q_\nu Q_\mu$. Oznacza to, że każda z tych współrzędnych opisuje jedno drganie cząsteczki. Współrzędne takie nazywamy współrzędnymi normalnymi, drgania im odpowiadające drganiami normalnymi cząsteczki, a wyrażenie:

$$f_\nu = \left(\frac{\partial^2 W_e(Q)}{\partial Q_\nu^2} \right)_{Q_\nu=0} \quad (10)$$

stałą siłową ν -tego drgania normalnego.

Pomijając ruchy translacyjne i rotacyjne cząsteczki, dla tak wybranego układu współrzędnych Q_ν , funkcja falowa drgań rozkłada się na iloczyn funkcji oscylatorów harmoniczych poszczególnych drgań normalnych:

$$\chi_j(Q) = \prod_{\nu=1}^{3N-6} \eta_\nu(Q_\nu) \quad (11)$$

gdzie $3N-6$ jest liczbą drgań normalnych nieliniowej cząsteczki zbudowanej z N atomów.

Można teraz równanie (7) rozseparować na $3N-6$ równań opisujących pojedyncze drgania normalne. Całkowita energia układu wynosi:

$$E = W_e^0 + \sum \epsilon_\nu \quad (12)$$

$$\epsilon_\nu = \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \hbar \omega_\nu, \quad \omega_\nu = \sqrt{\frac{f_\nu}{\mu}} \quad (13)$$

gdzie μ jest efektywną masą drgających jąder, a ω_ν częstością drgań. Ponieważ w eksperymencie obserwuje się też $3N-6$ częstości, można określić łatwo stałe siłowe f_ν .

Wydawałoby się, że nakreślona droga jest prostym sposobem rozwiązania problemu wibracji drobiny. Niestety w praktyce nie są znane współrzędne normalne cząsteczki z wyjątkiem kilku najprostszych przypadków. Dlatego też rozwinięcie potencjału efektywnego w szereg będzie bardziej skomplikowane:

$$U_e(R) = W_e^0 + \frac{1}{2} \sum_{\nu} \sum_{\mu} K_{\nu\mu} (R_\nu - R_{\nu 0})(R_\mu - R_{\mu 0}) \quad (14)$$

gdzie:

$$K_{\nu\mu} = \left(\frac{\partial^2 W_e(R)}{\partial R_\nu \partial R_\mu} \right)_{\substack{R_\nu = R_{\nu 0} \\ R_\mu = R_{\mu 0}}} \quad (15)$$

R mogą być teraz współrzędnymi kartezjańskimi, współrzędnymi symetrii lub innymi. W takim przypadku stałych $K_{\nu\mu}$ (nawet gdy $K_{\nu\mu} = K_{\mu\nu}$) jest:

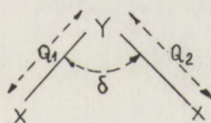
$$\frac{(3N - 6)^2 - (3N - 6)}{2} + 3N - 6 = \frac{3N - 6}{2} (3N - 5)$$

tzn. nie może być mowy o wyliczeniu ich z porównania z doświadczalnymi $3N - 6$ częstościami. Z tego też względu nie wolno przypisywać im żadnego sensu fizycznego.

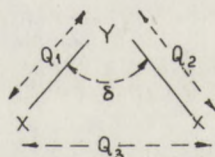
Aby uniknąć tej trudności stosuje się przybliżone potencjały dla ruchów jąder w cząsteczce. Potencjały te uwzględniają tylko niektóre oddziaływania atomów, a inne zostają pominięte. Do najczęściej stosowanych należą potencjały sił walencyjnych (VFF) i Ureya-Bradleya (UBFF). Oba stosuje się w obszarze przybliżenia harmonicznego.

Przybliżenia te zostaną omówione na przykładzie prostej trójatomowej cząsteczki.

VFF



UBFF



Rys. 1. Modele potencjałów VFF i UBFF dla cząsteczki trójatomowej

Potencjał VFF uwzględnia tylko oddziaływania ze zmianą długości wiązania i zmianą kąta między dwoma wiązaniami:

$$U_{\text{VFF}} = a_{11} (Q_1^2 + Q_2^2) + k \delta^2$$

Potencjał UBFF uwzględnia jeszcze oddziaływania między niektórymi niezwiązanymi bezpośrednio atomami:

$$U_{\text{UBFF}} = a_{11} (Q_1^2 + Q_2^2) + k \delta^2 + a_{12} Q_3^2$$

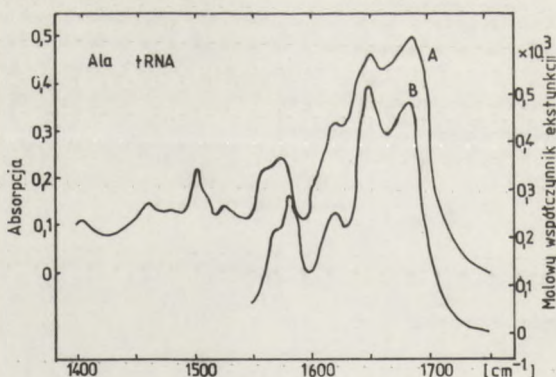
Stałe a_{11} , a_{12} , k wylicza się przez porównanie z eksperymentem. Trzeba jednak wyraźnie podkreślić, że nie wolno przypisywać im ściśle określonego sensu fizycznego, ponieważ współrzędne Q_1 , Q_2 , Q_3 nie są współrzędnymi normalnymi, czyli a_{11} , a_{12} , k nie są drugimi pochodnymi energii elektronowej W_e po odpowiednich współrzędnych. W praktyce oznacza to, że określenie stałych współczynników w potencjałach VFF lub UBFF dla jednej cząsteczki może spowodować duże błędy przy przeniesieniu tak wybranego zbioru stałych do innej, nawet podobnej, cząsteczki.

Z tego też względu stosuje się raz jeden, raz drugi model potencjału i niezwykle trudno jest przewidzieć czy otrzymana się poprawne energie przejść wibracyjnych zwłaszcza dla związków zawierających tlen, azot, siarkę itp [4].

PRZEGLĄD WYNIKÓW

Ze względu na wielkość cząsteczek kwasów nukleinowych ich badania teoretyczne natrafiają na wiele trudności. Stąd też nie ma na razie prac teoretycznych zajmujących się całością widma podczerwonego kwasów nukleinowych [5].

W 1969 r. M. Tsuboi i in. [6] próbowali poprzez analizę widm w podczerwieni niektórych t-RNA określić drugorzędową strukturę tego kwasu. Wykonano widma wzorcowe dla par zasad nukleinowych AU, GC oraz dla podstawowych nukleotydów UMP, GMP, AMP, CMP. Tworząc teraz superpozycję tych widm w zakresie 1400 do 1750 cm^{-1} starano się odtworzyć widmo t-RNA alaniny, waliny, metioniny i tyrozyny. Wyniki tej próby przedstawione są na rysunku 2 przykładowo dla t-RNA alaniny.



Rys. 2. A: obserwowana krzywa absorpcji IR filmu t-RNA alaniny, B: obliczona krzywa dla 0,060 AU + 0,508 GC + 0,090 AMP + 0,134 UMP + 0,119 GMP + 0,089 CMP (co odpowiada 2 AU + 17 GC + 6A + 9U + 8G + 6C)

Praca ta nie zostanie jednak omówiona szerzej, gdyż nie daje odpowiedzi na żadne z podstawowych pytań postawionych we wstępie, a poza tym trudno jest uzasadnić teoretycznie tę metodę. Sami autorzy przyznają, że nie uwzględnili obecności w t-RNA rzadkich zasad, których np. w t-RNA waliny jest aż 12 na ogólną liczbę 75 zasad. Co jednak wydaje się najistotniejsze, nie da się uzasadnić teoretycznie, że intensywności odpowiednich pasm

w nukleotydach czy parach zasad pozostają niezmiennione w makrocząsteczce t-RNA, gdzie liczba oddziaływań oraz geometria są zupełnie inne. Widoczne to jest już zresztą na rysunku 2, gdzie przy 1650 cm^{-1} i 1690 cm^{-1} nastąpiło odwrócenie względnej intensywności pasm.

Inne prace koncentrują się wokół analizy widm zasad nukleinowych. Wstępem do nich była obszerna eksperymentalna praca R.C. Lorda i G.J. Thomasa z 1967 r. [7], w której przedstawiono widma ramanowskie i niektóre podczerwone uracylu, adeniny, cytozyny, guaniny, ich nukleozydów, nukleotydów oraz pochodnych alkilowych wykonane w roztworach wodnych przy różnym pH i pD, a także w stanie stałym. Istotne jest zwrócenie przez autorów uwagi na obecność w widmie pewnych pasm charakterystycznych oraz na polaryzację niektórych linii Ramana, co ułatwi określenie typów drgań odpowiadających tym liniom.

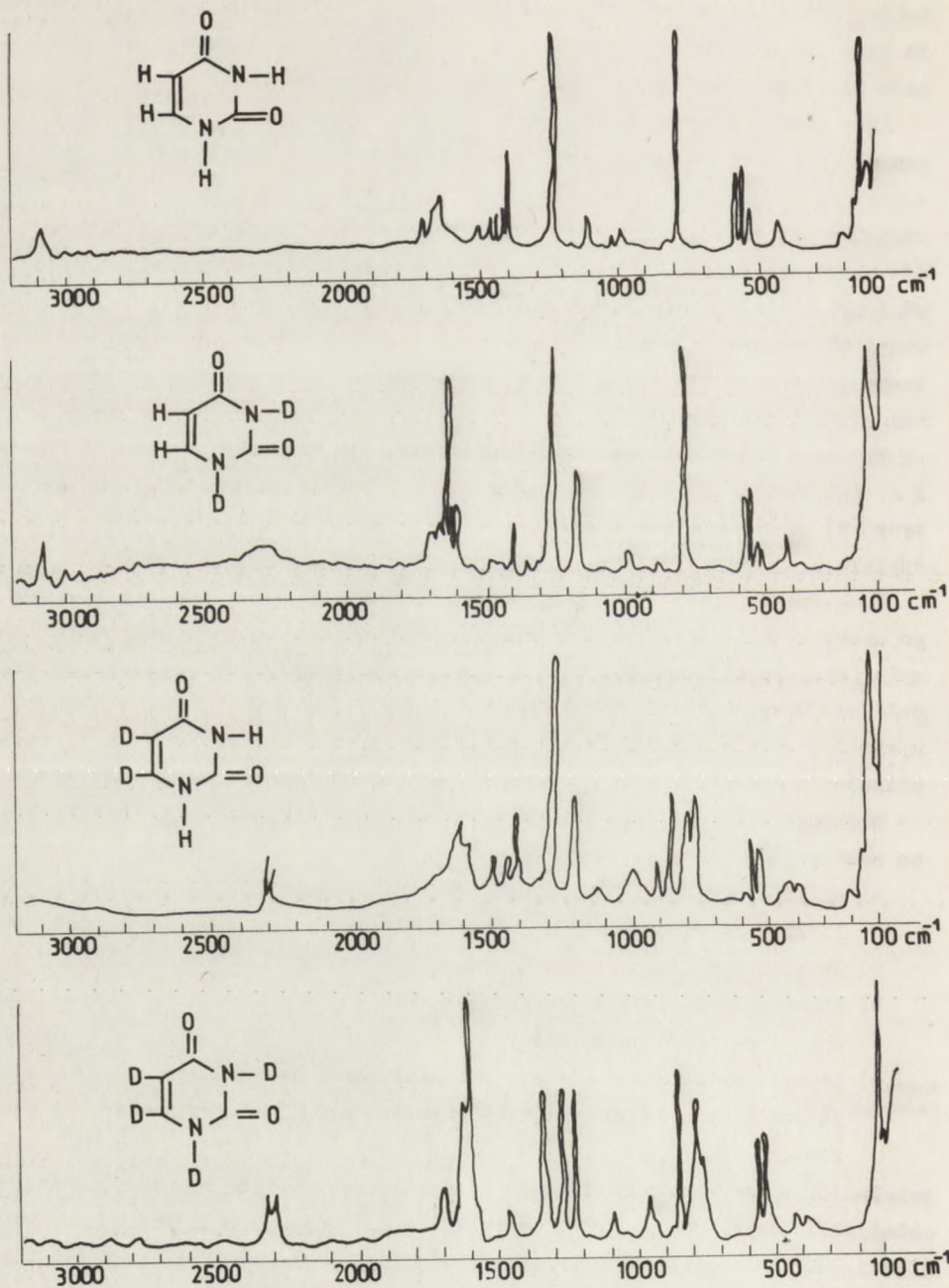
Pierwsze próby obliczenia częstości wibracji dla uracylu podjęli H.Susi i J. Ard w 1971 r. [8], a następnie w roku 1973 ci sami autorzy dla cytozyny [9]. W obu pracach ograniczono się tylko do analizy drgań w płaszczyźnie pierścienia. Szerzej omówiona zostanie pierwsza z tych prac.

Punktem wyjścia były wykonane widma ramanowskie i IR polikrystalicznego uracylu, N,N-dwudeuterouracylu, C,C-dwudeuterouracylu i perdeuterouracylu (rys. 3, 4). Początkowo próbowano dobrać zbiór stałych siłowych dla pola sił Ureya - Bradleya metodą itaracyjną [10]. Żadne jednak z obliczonych częstości nie zgadzały się z występującymi w eksperymencie, a w szczególności z drganiami CH i NH wyraźnie określonymi przez deuterowanie.

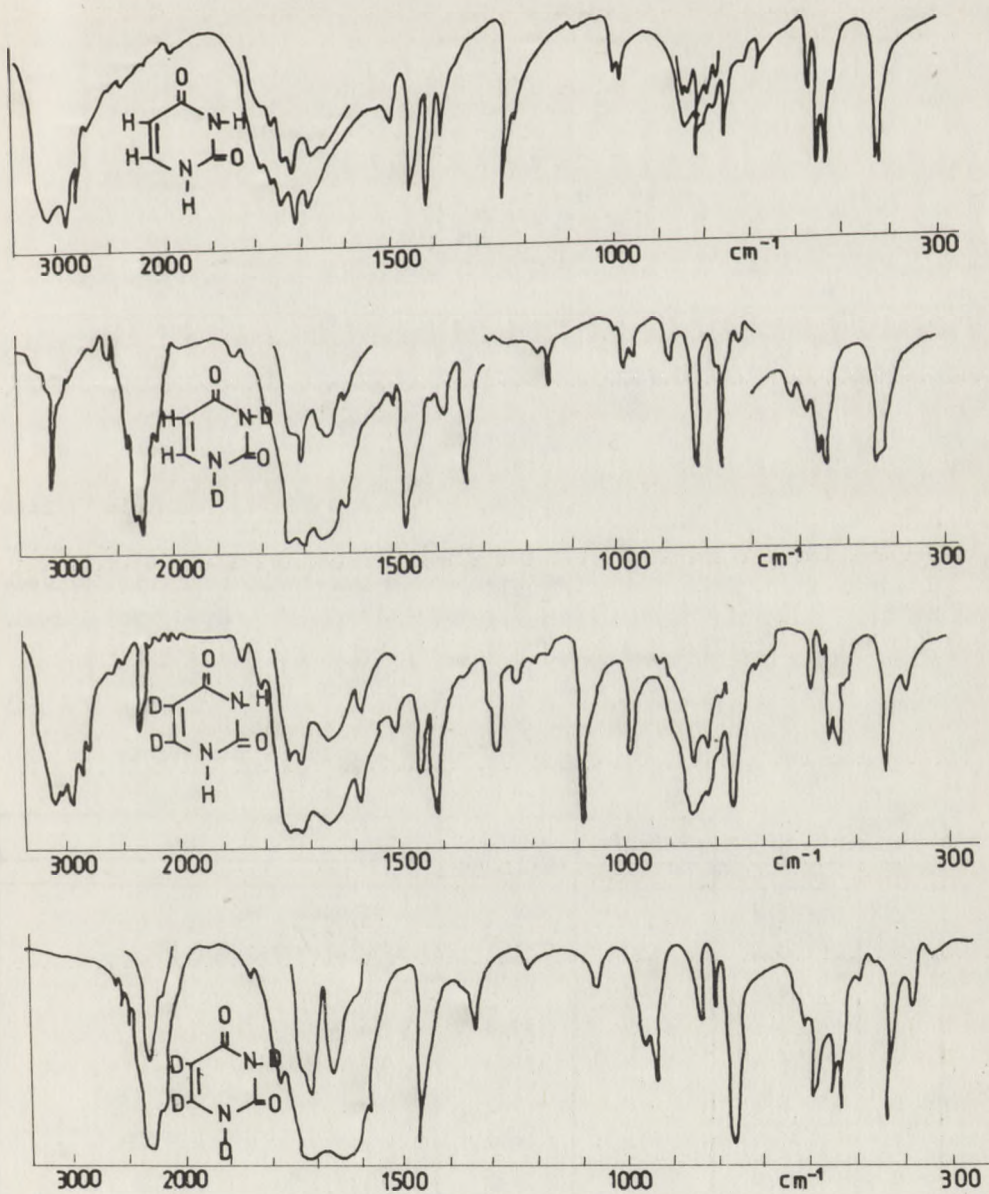
Rachunki wykonano więc dla pola sił walencyjnych, w którym uwzględniono następujące stałe siłowe:

- a) szkieletowych drgań rozciągających dla wiązań CO, CC, CN, które obliczono ze wzorów LADD'a i innych [11] i Deciusa [12] wiążących stałe siłowe z długościami wiązań,
- b) drgań zginających, które przyjęto takie jak w acetonie, cis-olefinach i n-metyloacetamidzie,
- c) pewnych oddziaływań między drganiami rozciągającymi oraz rozciągającymi i zginającymi, których wartości wyjściowe przeniesiono z benzenu.

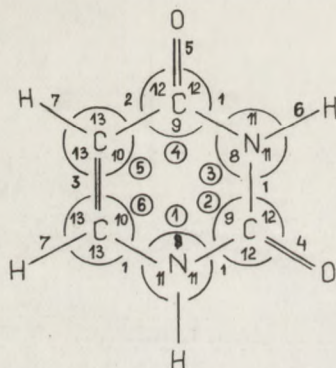
Sposób wyboru stałych siłowych przedstawiony jest na rysunku 5. Średni błąd obliczonych 83 częstości wyniósł $7,6\text{ cm}^{-1}$ (ok. 0,8%). Obliczone wartości PED czyli podziału energii potencjalnej poszczególnych drgań są też zgodne z oczekiwany (por. tabela I), co można było stwierdzić dla drgań charakterystycznych drobin, np. dla drgań rozciągających NH lub CH. Cie-



Rys. 3. Widma ramanowskie uracylu, N, N-dwudeuterouracylu, C, C-deuterouracylu, per-deuterouracylu



Rys. 4. Widma podczerwone uracylu, N, N-dwudeuterouracylu, C, C-dwudeuterouracylu, perdeuterouracylu



Rys. 5. Sposób wyboru stałych siłowych VFF w uracylu

kawą informacją są przedstawione przemieszczenia kartezjańskie dla niektórych drgań w płaszczyźnie uracylu wyraźnie wskazujące na to, jak skomplikowane jest drganie odpowiadające jednemu pasmu absorpcji (rys.5). Jednak wielkości PED i przesunięć kartezjańskich obliczone są w przybliżeniu harmonicznym [13, 14].

T a b e l a I

Obserwowane i obliczone drgania normalne uracylu w płaszczyźnie (cm^{-1})

	IR	Raman	Obl.	Opis
1	2	3	4	5
1	3160 m	3130	3134	ν NH sym. (99)
2	3160 m	3130	3131	ν NH niesym. (99)
3	3100 s	3100	3100	ν CH sym. (98)
4	3080 s	3085	3092	ν CH niesym. (99)
5	1716 s	1662	1684	ν C(2=)O (74)
6	1675 s	1648	1653	ν C(4=)O, ν C=C sym. (68)
7	-	1611	1605	ν C(4=)O, ν C=C niesym. (75)
8	1508 m	1507	1504	δ NH(1) (68)
9	1453 s	1462	1465	ν - pierścienia (61)
10	1417 s	1422	1424	δ NH(3) (66)
11	1390 m	1398	1397	δ CH sym. (62)

ciąg dalszy tabeli I

1	2	3	4	5
12	1238 s	1236	1248	ν - pierścienia (86)
13	1217 w	-	1211	δ CH niesym. (77)
14	1099 w	1104	1125	ν - pierścienia (83)
15	1003 m	1010	1028	ν - pierścienia (57)
16	993 m	988	980	ν, δ - pierścienia (77)
17	781 w	792	801	ν, δ - pierścienia (58)
18	585 m	579	576	δ - pierścienia (63)
19	565 m	558	564	δ C=O sym. (77)
20	550 s	540	536	δ - pierścienia
21	-	398	384	δ C=O niesym. (72)

ν - drganie rozciągające; δ - drganie deformacyjne; liczby w nawiasach podają podział energii potencjalnej (PED); s,m,w - silne, średnie, słabe pasmo absorpcji.

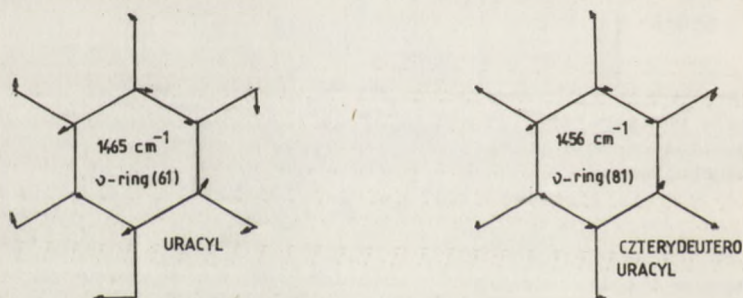
T a b e l a II

Obserwowane i obliczone drgania normalne cytozyny w płaszczyźnie (cm^{-1})

1	IR	Raman	Obl.	Opis
1	2	3	4	5
1	3380 s	3354	3356	ν NH_2 niesym. (100)
2	-	3230	3240	ν NH_2 sym. (99)
3	3169 s	3176	3190	ν NH (99)
4	-	3117	3121	ν CH sym. (99)
5	-	3117	3114	ν CH niesym. (99)
6	1703 w	1694	1689	δ NH_2 (90)
7	1662 vs	1653	1650	ν C=O (68)
8	1615 s	1612	1616	ν C=C (61)
9	1538 m	1533	1530	δ NH (50), ν - pierścienia (28)
10	1505 m	1498	1496	ν - pierścienia (56), δ NH (14)
11	1465 s	1462	1450	δ CH (40), ν C-N (20)
12	1364 m	1361	1344	ν C-N (38), δ CH (43)
13	1277 m	1276	1295	δ CH niesym. (72)
14	1236 m	1247	1222	ν - pierścienia (98)
15	1100 w	1108	1126	ν - pierścienia (52), ρ NH_2 (28)
16	1010 w	1011	1036	ν - pierścienia (72)
17	994 w	990	1007	ν, δ - pierścienia (81)
18	966 w	971	955	ν - pierścienia (57) ρ NH_2 (46)
19	793 m	792	790	ν, δ - pierścienia (52)

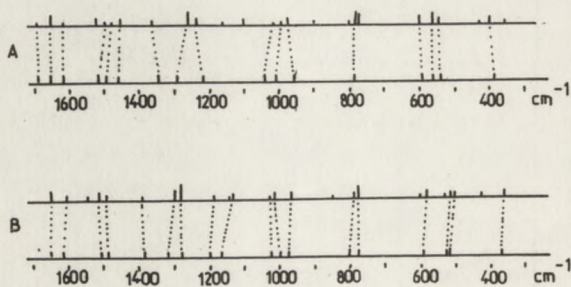
1	2	3	4	5
20	600 m	597	592	δ - pierścienia (58)
21	549 m	546	560	δ C=O, δ C-N sym. (67)
22	533 m	533	533	δ - pierścienia (54)
23	-	400	386	δ C=O, δ C=N niesym. (70)

ν - drganie rozciągające; δ - drganie deformacyjne; ρ - drganie skręcające; liczby w nawiasach podają podział energii potencjalnej (PED); vs, s, m, w - bardzo silne, silne, średnie, słabe pasmo absorpcji.



Rys. 6. Przesunięcia kartezjańskie (strzałki podają amplitudy ruchu poszczególnych atomów w skali rozmiarów geometrycznych cząsteczki)

Podobne obliczenia wykonano także dla cytozyny [9], z tym że większość stałych siłowych starano się przenieść wprost z VFF dla uracylu. Jednak w tym przypadku wyniki wykazywały dużo gorszą zgodność z eksperymentem, szczególnie w zakresie $1400 - 900 \text{ cm}^{-1}$ (rys. 7, tab. II). Jest to zakres szczególnie złożonych drgań szkieletowych i deformacyjnych. O ich złożoności świadczy fakt, że deuterowanie zmienia wszystkie obserwowane częs-



Rys. 7. Obserwowane częstości Ramana i obliczone częstości cytozyny - A i cytozyny d_2 - B

tości. Poza tym na uwagę zasługują informacje dotyczące badań krystalograficznych cytozyny [15]. Okazuje się mianowicie, że wiązanie C-NH₂ ma długość 1,330 Å i jest krótsze od wiązania C-N w pierścieniu cytozyny (1,337 Å) oraz dużo krótsze niż podobne wiązanie w aminach aromatycznych (1,42 Å). Trudno jest na razie wyjaśnić tak duże zmiany długości wiązań.

Osobnym zagadnieniem są badania spektroskopowe kryształów w dalekiej podczerwieni, tzn. w zakresie poniżej 250 cm⁻¹ [16]. W 1970 r. I. Harada i R.C. Lord zbadali widma kryształów pochodnych metylowych adeniny, tyminy, uracylu oraz kompleksu 1:1 1-metylotyminy i 9-metyloadeniny w zakresie 30 - 230 cm⁻¹. Widma te interpretowano przy zastosowaniu dwóch modeli potencjału Ureya-Bradleya. W pierwszym modelu uwzględniono oddziaływania międzycząsteczkowe tylko poprzez wiązania wodorowe, w drugim także poprzez daleko zasięgowe (do 3 Å) oddziaływania van der Waalsa między atomami wodoru. Fakt, że dla drugiego modelu uzyskano lepsze wyniki może wskazywać, że siły van der Waalsa dają istotny wkład do oddziaływań między zasadami nukleinowymi, chociaż z drugiej strony poprawa wyników może być tylko rezultatem wprowadzenia dodatkowego parametru.

PODSUMOWANIE

Z przytoczonych przykładów wynika, że najczęściej stosowana obecnie metoda analizy widm podczerwonych składników kwasów nukleinowych polega na przenoszeniu zbiorów stałych siłowych od jednej cząsteczki do drugiej. Dla małych cząsteczek stosunkowo łatwo można określić odpowiednie rodzaje drgań i te informacje wykorzystuje się wprost w dużych cząsteczkach. Czy takie postępowanie jest jednak uzasadnione? W wypadku niewielkich cząsteczek metoda ta daje wyniki zadawalające. Jednak już dla zasad nukleinowych pojawiają się trudności. Jak już wspomniano, przeniesienie zbioru stałych siłowych dla pola sił walencyjnych powoduje poważne błędy, a gdy zastosuje się pole sił Ureya - Bradleya wyniki są nawet rozbieżne. Podkreślić przy tym należy, że drgania poza płaszczyznę pierścienia w ogóle w tym schemacie nie zostały zinterpretowane ani dla uracylu, ani dla cytozyny [8, 9]. Przyczyną tych kłopotów jest przede wszystkim zły model drgań cząsteczki, opisywanej jako układ "kulek i sprężynek", oraz nieuzasadnione z punktu widzenia teorii przenoszenie stałych, które przecież w potencjałach UBFF i VFF są tylko zbiorami liczb pozbawionych głębszego sensu fizycznego, co było dyskutowane w części poświęconej teorii. Z praktycznego punktu widzenia najpoważniejszym minusem powyższej teorii jest brak możliwości przewidywania zmian w widmie przy zmianie konformacji cząsteczki.

Dyskusyjne jest także stosowanie przybliżenia harmonicznego, w którym zakłada się, że drgania odbywają się w pobliżu położenia równowagi. Dotyczy to przede wszystkim drgań o szczególnej wartości dla interpretacji widma IR - mianowicie drgań rozciągających CH i NH. Badając m.in. widma nadtonowe benzenu [17], amidów [18], piperydyny [19], stwierdzono, że drgania te są wyraźnie anharmoniczne.

Przyczyny niepowodzeń teorii widm w podczerwieni dla dużych cząsteczek mogą tkwić również głębiej, już w samym założeniu przybliżenia adiabatycznego. Założenie prowadzące w konsekwencji do podziału całkowitej energii cząsteczki na energie elektronową i wibracyjno-rotacyjną nie jest w pełni uzasadnione w układach zawierających atomy tlenu, azotu lub inne posiadające wolne pary elektronowe, które w istotny sposób zmieniają drgania drobiny. Przypuszczenie takie potwierdzone jest np. przez obserwowane w wielu związkach pasmo Bohlmanna [20-24] lub przez fakt anomalnych długości wiązań CN w cytozynie [15], co wskazuje na istnienie silnych sprzężeń elektronowo - wibracyjnych.

Nie są także wyjaśnione dostatecznie różnice występujące między widmami IR i Ramana. Niektóre pasma absorpcji w podczerwieni i linie ramanowskie przypisywane temu samemu drganiu są przesunięte nawet do 40 cm^{-1} względem siebie (por. tabl. I i II). Próbowano ten fakt tłumaczyć dla polipeptydów [25] różnymi warunkami wykonania widma IR i Ramana a stąd różnymi typami oddziaływań międzycząsteczkowych, lecz mogą to być efekty rzędu kilku cm^{-1} .

Jakie zatem widać możliwości rozwiązania powyższych problemów?

Dopóki nie zostanie stworzona nowa teoria widm podczerwonych dużych cząsteczek, należy przede wszystkim skoncentrować się na badaniach drgań charakterystycznych tzn. drgań słabo sprzężonych z resztą układu molekularnego. Do ich opisu będzie można zastosować teorię drgań lokalnych zaproponowaną przez Siebranda i Henry'ego [17]. Dotychczasowe prace dotyczące szczególnie drgań rozciągających CH [17, 26] wykazały jej dużą przydatność w wypadku badania drgań silnie anharmonicznych. Jednak do dalszych prac w tej dziedzinie potrzebne są dokładne widma nadtonowe (bliska podczerwień) badanych związków.

Pewne możliwości stwarzają też prace wiążące drgania normalne cząsteczki z jej strukturą elektronową, co pozwala na obliczenie stałych siłowych niektórych drgań [27], a także bezpośrednie wykorzystanie równania adiabatycznego [7]. Druga z tych metod jest wykorzystywana szczególnie szeroko przy badaniu wiązań wodorowych między parami zasad. Obliczenie energii elektronowej pary zasad dla różnych pozycji protonu w wiązaniu wodorowym

pozwoiliło na uzyskanie krzywej energii potencjalnej dla drgania protonu w tym wiązaniu [28-30]. Znajomość potencjału umożliwiła obliczenie częstości drgań rozciągających N-H [30, 31]. Wyniki są na razie jeszcze mało zadawalające, lecz wydaje się, że zastosowanie poprawniejszych metod, niż dotychczas stosowana prosta metoda WKB [32], pozwoli na uzyskanie dokładniejszych rezultatów.

LITERATURA

- [1] Hunter G., Pritchard H.O.; *J.Chem.Phys.* 46, 2153 (1967).
- [2] Longuet Higgins H.O.; *Adv. in Spectry*, vol. 2, Intersciences Publ. New York, 1961, s. 429.
- [3] Herzberg G.; *Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules*, Van Nostrand Company, London 1945.
- [4] Schachtschneider J.H., Snyder R.G.; *Spectrochim. Acta* 19, 117 (1963).
- [5] Susi H.; *Biol.Macromol.Series*, vol. 2, Timashoff S.N.; New York 1969.
- [6] Tsuboi M., Shuto K., Takemura S., Nishimura S.; *Bull.Chem.Soc. Jap.* 42, 102 (1969).
- [7] Lord R.C., Thomas G.J.; *Spectrochim. Acta* 23A, 2551 (1967).
- [8] Susi H., Ard J.S.; *Spectrochim.Acta* 27A, 1549 (1971).
- [9] Susi H., Ard J.S., Purcell J.M.; *Spectrochim.Acta*, 29A, 725 (1973).
- [10] Overand J., Scherer J.R.; *J.Chem.Phys.* 32, 1289 (1960).
- [11] Ladd J.A., Orville Thomas W.J.; Cox B.C., *Spectrochim. Acta*, 20, 1771 (1964).
- [12] Decius J.C.; *J.Chem.Phys.* 45, 1069 (1966).
- [13] Morino Y., Kuchitsu K.; *J.Chem.Phys.* 20, 1809 (1952).
- [14] Cyvin S.J.; *Acta Chem.Scand.* 13, 2135 (1959).
- [15] Barker D.L., Marsh R.E.; *Acta Cryst.* 17, 1581 (1964).
- [16] Harada I., Lord R.C., *Spectrochim. Acta* 26A, 2305 (1970).
- [17] Henry B.R., Siebrand W.; *J.Chem.Phys.* 49, 5369 (1968).
- [18] Krikorian S.B., Mahpour M.; *Spectrochim.Acta* 29A, 1233 (1973).
- [19] Baldock R.W., Katrizky A.R.; *J.Chem.Soc. (B)*, 1470 (1968).
- [20] Krueger P.J., Jan J.; *Canad.J.Chem.* 48, 3229, 3236 (1970).
- [21] Krueger P.J., Jan J., Wieser H.; *J.Mol.Struct.* 5, 375 (1970).
- [22] Skolik J., Krueger P.J., Wiewiórowski M.; *Tetrahedron* 24, 5439 (1968).
- [23] Masamune T., Takasugi M., Matsuki M.; *Bull.Chem.Soc.Jap.* 41, 2466 (1968).
- [24] Masamune T., Ohno M., Takemura K., Ohuchi S.; *Bull.Chem.Soc.Jap.* 41, 2458 (1968).

- [25] Kuroda Y., Saito Y., Machida K., Uno T.; Bull.Chem.Soc.Jap. 45, 2371 (1972).
- [26] Mc Kean D.C.; Spectrochim. Acta 29A, 1559 (1973).
- [27] Colthup N.B., Orloff M.K.; Spectrochim.Acta 27A, 1299 (1971).
- [28] Rein R., Harris F.E.; J.Chem.Phys. 41, 3393 (1964), 42, 2177 (1965), 43, 4415 (1965).
- [29] Clementi E., Mehl J.; Von Niesson W.; J.Chem.Phys. 54, 508 (1971).
- [30] Parker B.R.; Van Every J.; Chem.Phys.Lett. 9, 94 (1971).
- [31] Parker B.R., Khare G.P., J.Mol.Spectry 41, 195 (1972).
- [32] Dawydow A.S.; Mechanika Kwantowa, PWN, Warszawa 1967.

DYSKUSJA

W dyskusji zwrócono uwagę na możliwość zastosowania do badań w IR dużych cząsteczek programów dostępnych w Quantum Chemistry Program Exchange, pozwalających znaleźć współrzędne normalne dowolnej drobiny. Następnie omówiono wyniki zastosowania równania adiabatycznego do badań oddziaływań między składnikami dimerów, np. pary guanina-cytosyna. Przedyskutowano także trudności w przenoszeniu stałych siłowych między związkami zawierającymi heteroatomy, przy czym powołano się na wynik obliczeń badań dla kryształu tiomocznika, dla którego najlepsza zgodność częstości obliczonych z obserwowanymi wynosiła średnio tylko 7 cm^{-1} . Zaproponowano, aby dalsze badania rozpocząć od ustalenia geometrii analizowanych drobin, poprzez obliczenie minimum energii elektronowej dla różnych położeń jąder. Taki proces optymalizacji pozwoli na lepsze poznanie zależności między strukturą elektronową a wibracjami cząsteczek. Np: wykonany proces optymalizacji wykazał, że minimum energii cytosyna osiąga dla silnie skróconego wiązania C-NH₂, co jest zgodne z badaniami krystalograficznymi.

Kazimierz Jędrzejczak, Krzysztof Szyfter

ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII W PODCZERWIENI DO BADANIA STRUKTURY KWASÓW NUKLEINOWYCH

STRESZCZENIE

W referacie omówiono stan badań nad spektroskopią absorpcyjną w podczerwieni mono- i polinukleotydów, tRNA, RNA i DNA. Technika ta znalazła zastosowanie do określania struktury II- i III-rzędowej kwasów nukleinowych na podstawie oznaczenia stopnia sparowania nukleozydów i asocjacji warstwowej zasad azotowych. Ustalenia podano w rozbiciu na dane dotyczące widm ciała stałego i roztworu. Szeroko potraktowano metodykę wykonywania widm w podczerwieni kwasów nukleinowych.

1. WSTĘP

Zastosowanie spektroskopii w podczerwieni do badania kwasów nukleinowych pozwala uzyskać stosunkowo dużą liczbę informacji o ich strukturze molekularnej [1].

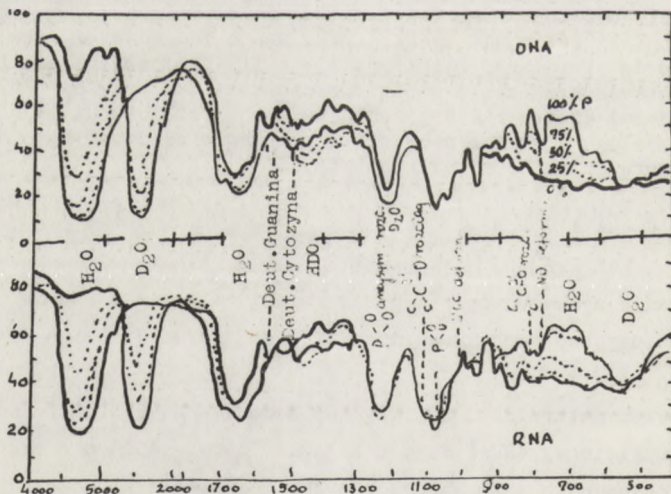
Każdy bowiem naturalny i syntetyczny kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA) i kwas rybonukleinowy (RNA) daje w rejonie $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ok. 40 do 50 dobrze zdefiniowanych pasm absorpcyjnych. Oczywiście w badaniach strukturalnych kwasów nukleinowych w postaci stałej nadal zasadniczą rolę odgrywa dyfrakcja promieni rentgenowskich, która pozwala wnioskować jednocześnie o strukturze przestrzennej cząsteczki. W przypadku badania kwasów nukleinowych w roztworach wodnych używano dotychczas spektrofotometrii w nadfiolecie, ponieważ woda posiada dużą absorpcję w zakresie podczerwieni. Zastosowanie spektrofotometrów do podczerwieni wysokiej klasy (typ Beckman IR 7) pozwala jednak na uzyskanie dobrych widm kwasów nukleinowych również w roztworach wodnych. Należy sądzić, że pokonanie trudności aparaturowych uczyni metodę spektroskopii w podczerwieni bardziej popularną wśród biochemików.

2. WPLYW NIEKTÓRYCH CZYNNIKÓW NA WIDMA W PODCZERWIENI KWA-SÓW NUKLEINOWYCH

a) Efekt deuterowania

Kwasy nukleinowe w postaci widm można niemal całkowicie deuterować poprzez wymianę z D_2O w fazie gazowej. Mianowicie roztwór kwasu nukleinowego nanosi się na płytkę z $AgCl$ lub CaF_2 , a następnie umieszcza się w eksykatorku nad stężonym kwasem siarkowym w celu wysuszenia próbki. W ten sposób przygotowaną próbkę przetrzymuje się w komorze nad roztworem D_2O , który nasycono stałym chlorkiem sodowym. Taka procedura pozwala na łatwą wymianę atomów wodoru na deuter w fazie gazowej (za wyjątkiem wiązań C-H), przy czym wilgotność powietrza w komorze utrzymuje się wtedy w granicach około 75%.

Dzięki tej metodyce można porównywać deuterowane i niedeuterowane filmy o jednakowej grubości (rys. 1).



Rys. 1. Widma absorpcyjne w podczerwieni filmów DNA i RNA w 92% wilgotności w postaci niedeuterowanej i całkowicie deuterowanej

b) Wpływ wilgotności powietrza

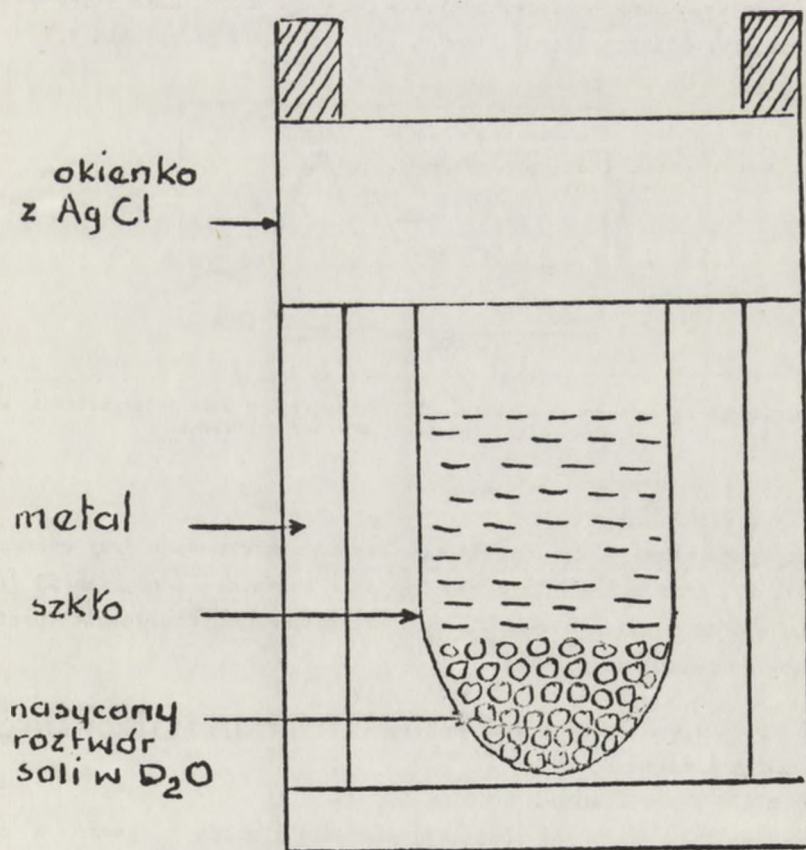
Prace Sutherlanda i Tsuboi [3, 4] wykazały, że widma w podczerwieni kwasów nukleinowych, zwłaszcza NaDNA, zmieniają się zastanawiająco ze zmianą wilgotności powietrza. Przy wzroście wilgotności od 0% pojawiają się szerokie pasma pochodzące od H_2O w rejonie $3400, 1640$ i 700 cm^{-1} . Na uwagę zasługuje fakt, że w wilgotnym powietrzu film wykazuje bardziej silny dichroizm w całym zakresie widma niż w suchym powietrzu, przy czym wiele szerokich pasm staje się wyraźnymi z zaznaczoną subtelną strukturą.

Powyższe fakty wskazują, że filmy NaDNA adsorbują parę wodną z wilgotnego powietrza, co wiąże się z uzyskaniem bardziej uporządkowanej struktury.

Ilość wody zaadsorbowanej przez film można oznaczyć na podstawie intensywności pasma przy 3400 cm^{-1} . Oznaczenie takie wskazuje, że zawartość wody wzbogaca o ok. 40% suchy ciężar NaDNA (7 cząsteczek H_2O na pojedynczy nukleotydy) w 75% wilgotności względnej [5].

W celu utrzymania żądanej wilgotności, podczas wykonywania widm w podczerwieni, próbkę z filmem kwasu nukleinowego umieszcza się w specjalnie zbudowanej kuwecie (komorze) nad nasyconym solą roztworem D_2O , kwasów nukleinowych o określonej wilgotności. Określoną wilgotność względną uzyskuje się przez zastosowanie odpowiedniego roztworu soli, co podają stosowne tabele [6].

Rys. 2 wskazuje przekrój komory.



Rys. 2. Przekrój kuwety do pomiarów w podczerwieni filmów

c) Wpływ podstawienia N^{15}

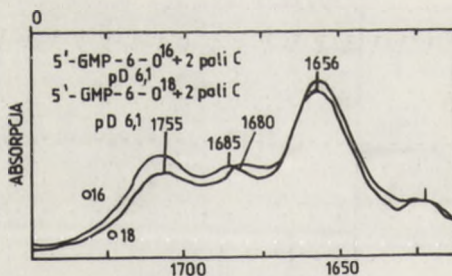
Próbkę DNA, w której praktycznie wszystkie atomy azotu zastąpione są N^{15} , można otrzymać hodując bakterie na pożywce z dodatkiem $^{15}NH_4Cl$ jako źródło azotu [7].

Zasadniczo tak podstawiony DNA wykazuje widmo absorpcyjne podobne do DNA otrzymanego ze zwykłych bakterii. Pewne jednak maksima absorpcji DNA z N^{15} są przesunięte nieco w stronę niższych częstotliwości,

d) Wpływ podstawienia O^{18}

Howard i Miles [8] otrzymali inozynę $-6-O^{18}$, kwas inozynowy $-6-O^{18}$ i guanozynę $-6-O^{18}$ poprzez enzymatyczną deaminację w D_2O^{18} . Podstawione w ten sposób nukleozydy i nukleotydy posłużyły do znalezienia pasm absorpcyjnych, w których zawarte są drgania rozciągające grup karbonylowych [8, 9].

W ten sposób znaczone nukleotydy zastosowano przy interpretacji widm kompleksów utworzonych między poli C i 5' - GMP lub 5' dGMP [10]. Uzyskane przesunięcia częstotliwości przedstawiono na rysunku 3.



Rys. 3. Użycie specyficznego podstawienia izotopowego w celu interpretacji widma w podczernieni kompleksu monomer - polimer

e) Wpływ pH (pD)

Porównano widma wodnych roztworów kwasów nukleinowych przy różnych pH [8, 11, 12] oraz widma filmów uzyskanych z roztworów o różnych pH [13, 14].

Znalezione różnice w widmach są spowodowane prawdopodobnie protonizacją lub deprotonizacją zasad.

3. PRZEGLĄD WIDM IR DEUTEROWANYCH I NIEDEUTEROWANYCH DNA I RNA

a) Obszar $4000 - 2000 \text{ cm}^{-1}$

Zarówno DNA, jak i RNA posiadają szerokie i silne pasmo w rejonie 3400 cm^{-1} (lub 2500 cm^{-1}) dla pochodnych deuterowanych. Odpowiada to drga-

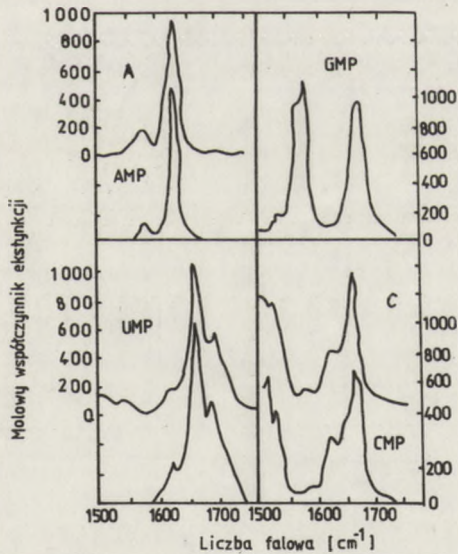
niom rozciągającym grup OH (lub OD) zaadsorbowanych cząsteczek wody.

W rejonie tym występują również drgania symetryczne i asymetryczne grup NH_2 , pochodzących z adeniny, guaniny lub cytozyny - maksimum absorpcji przy 3300 cm^{-1} i 3100 cm^{-1} (po deuterowaniu: 2500 i 2360 cm^{-1}) [15].

Słabe pasmo przy 2920 cm^{-1} przypisuje się drganiom rozciągającym C-H w rybozie.

b) O b s z a r $1800 - 1500\text{ cm}^{-1}$

Grupę silnych pasm w rejonie $1800 - 1500\text{ cm}^{-1}$ należy przypisać drganiom rozciągającym karbonylu C = O oraz drganiom szkieletowym i zginającym zasad (rys. 4).



Rys. 4. Widma absorpcyjne w podczerwieni trzech nukleozydów i czterech nukleotydów w D_2O w rejonie $1750 - 1500\text{ cm}^{-1}$

Silne i szerokie pasmo przy 1640 cm^{-1} pochodzi od drgań nożycowych zaadsorbowanej H_2O .

Bliższą charakterystykę tych pasm i pochodzenie przedstawia tabela 1.

Charakterystyka pasm absorpcyjnych w podczerwieni
w rejonie $1750 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ kwasów nukleinowych

Zasada	Położenie pasm (cm^{-1})	Intensywność	Charakterystyka
Adenina	1665	silne	drgania zginające NH_2 i rozciągające $\text{C}=\text{N}$
	1605	silne	
	1573	słabe	
Uracyl	1700	silne	drgania rozciągające $\text{C}=\text{O}$ drgania deformacyjne NH drgania rozciągające grup $\text{C}=\text{O}$ i $\text{C}=\text{C}$
	1680	silne	
	1650	silne	
	1620	słabe	
Tymina	1720	silne	drgania rozciągające $\text{C}_2=\text{O}$ drgania rozciągające $\text{C}_4=\text{O}$ drgania pierścienia
	1660	silne	
	1575	słabe	
Guanina	1690	silne	drgania rozciągające $\text{C}=\text{O}$ drgania nożycowe grup NH_2
	1630	słabe	
Cytoszyna	1700	słabe	drgania nożycowe grup NH_2 drgania pierścienia drgania pierścienia drgania pierścienia
	1647	silne	
	1603	silne	
	1585	słabe	

c) O b s z a r $1500 - 1000 \text{ cm}^{-1}$

Na uwagę zasługuje silne pasmo przy 1220 cm^{-1} przypisywane drganiom rozciągającym grup PO_2 [3, 4], natomiast kilka słabych pasm w rejonie $1100 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ odpowiada drganiom symetrycznym grupy fosforanowej oraz drganiom rozciągającym dezoksyrybozy lub rybozy.

d) O b s z a r $1000 - 700 \text{ cm}^{-1}$

W tym rejonie znajduje się kilka pasm pochodzących od drgań zasad typu out-of-plane, zwłaszcza w rejonie $800 - 760 \text{ cm}^{-1}$ widma niedeuterowanych DNA i RNA.

Silne pasmo przy 967 cm^{-1} , średnie przy 890 cm^{-1} i słabe przy 830 cm^{-1} obserwuje się dla każdego DNA, zarówno niedeuterowanego, jak i deuterowanego.

4. ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII W PODCZERWIENI DO BADANIA STRUKTURY KWASÓW NUKLEINOWYCH W STAŁYM FILMIE

a) Widma w podczerwieni dla DNA

Widma w podczerwieni soli sodowej kwasu dezoksyrybonukleinowego zostały wykonane po raz pierwszy w 1949 roku przez Blout'a i Fields'a [16].

Sutherland i Tsuboi [3] wykonali serię pomiarów używając promieniowania spolaryzowanego dla badania zorientowanych filmów NaDNA przy dwunastu różnych wilgotnościach. Skorelowali oni swoje wyniki ze strukturą zaproponowaną przez Watsona i Cricka.

Falk [18] znalazł interesujący fakt: przy wzroście względnej wilgotności od 0 do 65% następuje przesunięcie pasma PO_2^- z 1240 do 1220 cm^{-1} , przy czym nie obserwuje się dalszych zmian poniżej 65% wilgotności względnej. Jednocześnie przy wzroście wilgotności pomiędzy 0 i 60% dwa pasma przy 1066 i 962 cm^{-1} są przesunięte odpowiednio do 1052 i 970 cm^{-1} . Również w rejonie 1720 - 1550 cm^{-1} występują zmiany spektralne przy 65% wilgotności względnej.

Według autora powyższe fakty zdają się świadczyć, że przy wilgotności powietrza od 0 do 65% woda adsorbuje na punktach obsadzonych przez grupy PO_2^- Na^+ i tleny w grupach POC i COC. Przy dalszym wzroście wilgotności powietrza następuje uzupełnienie hydratacji łańcucha przez ok. 6 cząsteczek wody, po czym zaczyna się hydratacja zasad. Wykazano, że hydratacja jest niezbędna do parowania zasad przy tworzeniu helisy.

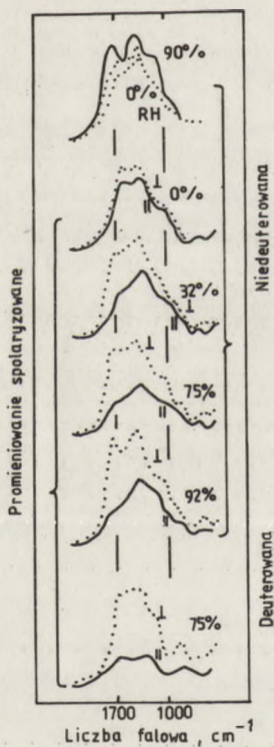
Świadczy o tym silne pasmo przy 1705 cm^{-1} pojawiające się przy 75% wilgotności i wyższej (rys. 5).

Pasmo powyższe jest nieobecne w widmie DNA z faga f_1 (o pojedynczej nici) oraz znika w widmach filmu otrzymanego z wodnych roztworów DNA o podwójnej nici po działaniu dezoksyrybonukleazą, po denaturacji cieplnej lub działaniu formamidem [19].

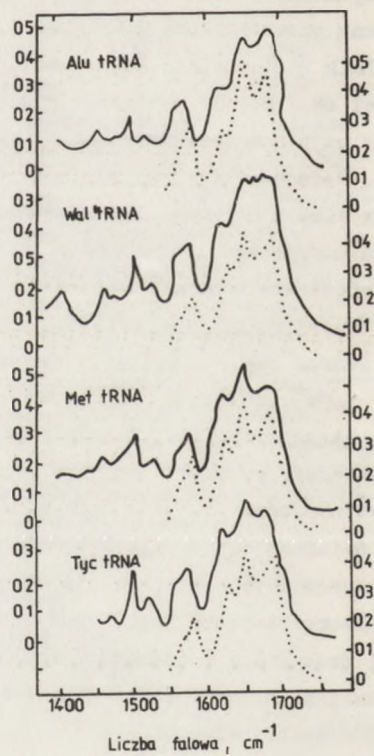
b) Widma w podczerwieni transferowych kwasów nukleinowych

Wykonano pomiary absorpcji w podczerwieni [20] deuterowanych filmów czterech specyficznych tRNA:

- 1) alaninowego tRNA z *T.utilis* [21],
- 2) walinowego tRNA z *T.utilis* [21],
- 3) metioninowego tRNA z *E.coli* [22],
- 4) tyrozynowego tRNA z *E.coli* [22].



Rys. 5. Widma absorpcyjne w podczerwieni filmu NaDNA z grasicy cielęcej w zależności od wilgotności względnej



Rys. 6. Widma absorpcyjne w podczerwieni filmów tRNA przy 92% wilgotności względnej. Linie przerywane odpowiadają widmom obliczonym przy założeniu: ala tRNA = 2 AU + 17 GC + 6A + 9U + 8G + 6C; wal tRNA = 7AU + 13 GC + 8A + 4U + 4G + 8C; met tRNA = 2AU + 17 GC + 13 A + 5U + 6G + 8C; tyr tRNA = 7 AU + 17GC + 11A + 6U + 4G + 10C

Pod wieloma względami dane spektralne wymienionych czterech tRNA są bardzo podobne, występują jednak pewne różnice w rejonach 1750 - 1400 cm^{-1} i 840 - 760 cm^{-1} .

Analizowane tutaj dane spektralne odzwierciedlają ilość par AU i GC oraz

ilość niesparowanych zasad A, U, G i C w każdym tRNA. Maksimum absorpcji np. przy 1690 cm^{-1} przypisuje się głównie parom zasad AU i GC, podczas gdy absorpcje przy 1655 i 1625 cm^{-1} pochodzą głównie od niesparowanych zasad. Widma teoretyczne wymienionych kwasów tRNA obliczono wg metody opisanej przez Thomasa [23].

Metoda ta służy do obliczenia ilości zasad sparowanych i niesparowanych, które uczestniczą w strukturze drugorzędowej kwasu nukleinowego, na podstawie widma IR danego RNA w obszarze $1750 - 1550\text{ cm}^{-1}$. W tym celu zestawiono katalog widm standartowych w podczerwieni dla AMP, UMP, GMP, CMP oraz poli (A + U) i poli (G + C). Na podstawie powyższych krzywych wzorcowych obliczono widma teoretyczne dla każdego z badanych tRNA, które były w zgodności z widmami obserwowanymi (rys. 6).

Porównanie ilości zasad sparowanych i niesparowanych, obliczonych na podstawie analizy obserwowanego widma IR z ilością zasad pochodzących z modelu liścia koniczyny dla tych czterech rodzajów tRNA o znanej strukturze, potwierdziło słuszność przyjęcia powyższego modelu struktury drugorzędowej.

5. ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII W PODCZERWIENI DO BADAŃ STRUKTURALNYCH KWASÓW NUKLEINOWYCH W ROZTWORACH WODNYCH

W spektroskopii w podczerwieni do badania roztworów nukleotydów, polinukleotydów i kwasów nukleinowych jako standardowego rozpuszczalnika używa się D_2O z następujących przyczyn:

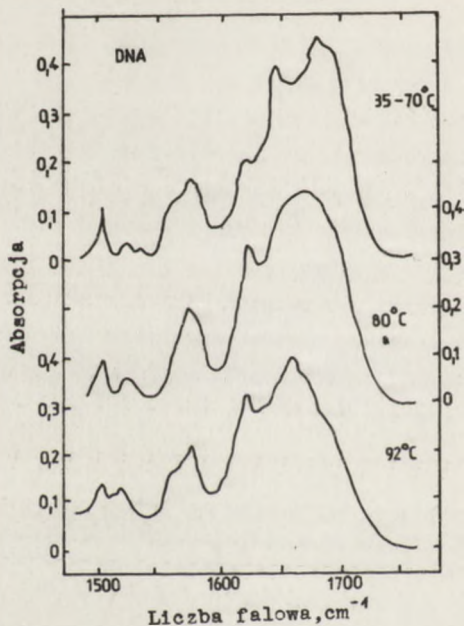
- 1) ciężka woda w przeciwieństwie do H_2O jest przepuszczalna w IR w rejonie wiązań podwójnych,
- 2) pozwala bezpośrednio zastosować otrzymane wyniki do wodnego środowiska, w którym zachodzą reakcje biologiczne,
- 3) pozwala obserwować cząsteczki nierozpuszczalne w organicznych rozpuszczalnikach, a które reagują tylko w wodnych roztworach.

Grubość warstwy roztworu dobiera się jako $0,05\text{ mm}$, przy czym stężenia kwasów nukleinowych muszą być dość wysokie, rzędu przynajmniej $0,05\text{ M}$ ($1,5\%$), a więc ok. 25 mg/ml .

a) Widma wodnych roztworów DNA

Krzywe absorpcji w podczerwieni roztworów DNA w D_2O w zależności od temperatury przedstawiono na rysunku 7.

Porównanie powyższych widm potwierdza fakt, że przy cieplnej denaturacji następują liczne zmiany spektralne [24, 25]. Polegają one m.in. na zniknięciu pasma absorpcji przy 1690 cm^{-1} i pojawieniu się nowego przy 1660 cm^{-1} .



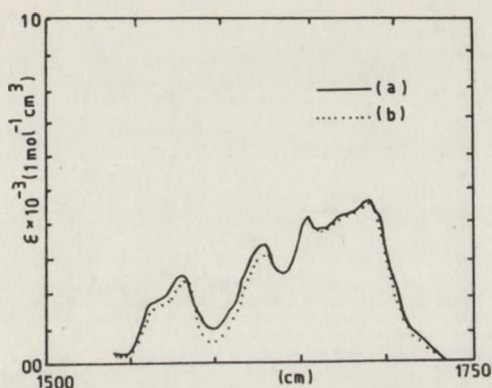
Rys. 7. Widma absorpcyjne w podczerwieni roztworów DNA z grasicy cielęcej w zależności od temperatury

Obserwacja intensywności tych pasm pozwala wyznaczyć termiczne przejścia cząsteczek DNA z formy helisowej do kłębkowej [26, 27]. Podobne zmiany spektralne znaleziono we widmach kwasów nukleinowych po denaturacji spowodowanej działaniem dezoksyrybonukleazy, alkaliami [25] lub formamidem [26]. Korzystając z metod IR oznaczono temperaturę przejścia formy helisowej do kłębkowej jako $89,6 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ dla 10% roztworu DNA z grasicy cielęcej w 0,15 M KCl w D_2O .

b) Widma w podczerwieni roztworów rybosomalnego RNA.

Thomas [23] przeprowadził dokładne badania w podczerwieni rybosomalnego RNA z drożdży oraz widma fragmentów wytworzonych przez kontrolowaną degradację tego kwasu (rys. 8).

Wspomniany autor opracował metodę analizowania widma eksperymentalnego w obszarze $1750 - 1550 \text{ cm}^{-1}$ w D_2O korzystając z 6 widm katalogowych: par AU i GC oraz niesparowanych zasad A, U, G i C.



Rys. 8. Widma w podczerwieni: a) rRNA w roztworze D_2O , $30^\circ C$, $pD = 7$; b) widmo teoretyczne odpowiadające: $0,35 GC + 0,29 AU + 0,125 AMP + 0,115 UMP + 0,095 GMP + 0,025 CMP$

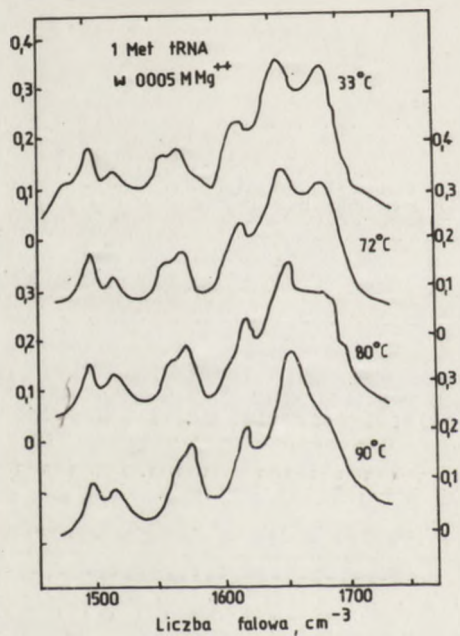
Przy użyciu tej metody wykazano, że 25% ogólnej ilości zasad w rybosomalnym RNA wiąże się w pary AU i 35% w pary GC, pozostają zaś pewne obszary niesparowane, co jest w zgodności z wcześniejszą analizą rentgenograficzną [28].

c) Widma w podczerwieni roztworów tRNA
Badano w podczerwieni roztwory formylometionylo tRNA z *E.coli* i izoleucylo tRNA z *T.utilis* w ciężkiej wodzie [29]. Otrzymane widma przedstawiono na rysunku 9.

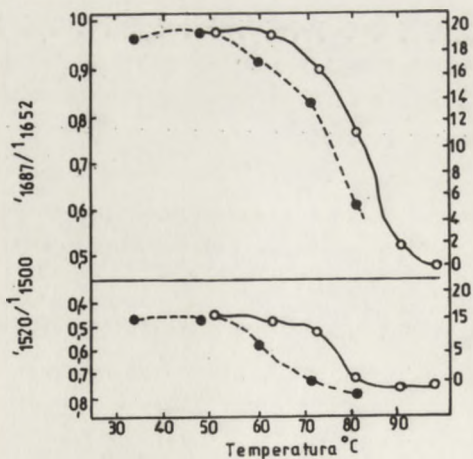
Widmo obserwowane w $33^\circ C$ jest w zgodności z widmem teoretycznym, przy założeniu struktury liścia koniczyny. Badano również "krzywe topnienia" dla metioninowego tRNA z *E.coli* obliczone na podstawie intensywności charakterystycznych pasm absorpcji (rys. 10).

"Krzywe topnienia" otrzymane na podstawie stosunku intensywności pasm $1687/1652\text{ cm}^{-1}$ nie pokrywają się z krzywymi opartymi na pomiarze intensywności pasm: $1520/1500\text{ cm}^{-1}$, tzn. "topnienie" w ostatnim przypadku następuje w nieco niższej temperaturze.

Autorzy nie podają jednak wytłumaczenia zaobserwowanych faktów.



Rys. 9. Widma absorpcyjne w podczerwieni roztworów metioninowego tRNA z *E. coli* z dodatkiem 0,005 M Mg^{+2}



Rys. 10. Krzywe topnienia met tRNA z *E. coli*
 linia ciągła: roztwór 0,2 M NaCl + 0,005 M $MgCl_2$ + 0,001 M kakodylan sodowy (pD=7,6)
 linia przerywana: roztwór 0,2 M NaCl + 0,001 M kakodylan sodowy (pD=7,5)

LITERATURA

- [1] Tsuboi M. - Application of Infrared Spectroscopy to Structure Studies of Nucleic Acids.
- [2] Todd Miles H. - Use of Infrared Spectroscopy for the Measurement of Nucleoside Binding to Polynucleotides, w "Methods in Enzymology", Vol. XII, B, str. 256.
- [3] Sutherland G.B., Tsuboi M. - Proc.Roy.Soc. (London) A 239,446 (1957).
- [4] Tsuboi M., - J.Am.Chem.Soc., 79 (1957) 1351.
- [5] Falk M., Hartman K.A., Lord Jr., R.C. - J.Am.Chem.Soc., 85 (1963)387.
- [6] International Critical Tables - Vol. 1, str. 67.
- [7] Tsuboi M., Shuto K., Higuchi S. - Bull.Chem.Soc.Japan, 41 (1968)1821.
- [8] Howard F.B., Miles H.T. - J.Biol.Chem. - 240 (1965) 801.
- [9] Miles H.T. - Proc.Natl. Acad.Sci. U.S., 51 (1964) 1104.
- [10] Howard F.B., Frazier J., Lipsett M.N., Miles H.T. - Bioch. Biophys. Res. Commun., 17 (1964) 93.
- [11] Miles H.T. - Proc. Natl.Acad.Sci.U.S., 47 (1961) 791.
- [12] Miles H.T., Howard F.B., Frazier J., - Science, 142 (1973) 1458.
- [13] Tsuboi M. - Polymer J. Sci.,Pt.C., Nr 7 (1964) 125.
- [14] Morgan R.S., Blout E.R., - J.Am.Chem.Soc. 81 (1959) 4625.
- [15] Kyogoku Y., Higuchi S., Tsuboi M. - Spectrochim.Acta, 23A (1967)969.
- [16] Blout E.R., Fields M. - J.Biol.Chem.,178 (1949) 335.
- [17] Fraser M.J., Fraser R.D.B. - Nature, 167 (1951) 759.
- [18] Falk M., Hartman K.A., Jr.Lord R.C.,- J.Am.Chem.Soc., 85 (1963) 387.
- [19] Shimanouchi T., Tsuboi M., Kyogoku Y. - Advances in Chemical Physics, Vol. VII.
- [20] Tsuboi M., Shuto K., Takemura S., Nishimura S., - Bull.Chem.Soc. Japan, 42 (1969) 102.
- [21] Kawada M., Myiazaki M., Takemura S. - J.Biochem. Tokyo,62 (1967) 287.
- [22] Nishimura S., Harada F., Narushima U., Seno T. - Biochim.Biophys.Acta, 142 (1967) 133.
- [23] Thomas V.J., Jr. - Biopolymers, 7 (1969) 325.
- [24] Kyogoku Y., Tsuboi M., Shimanouchi T., Watanabe I. - J.Mol.Biol., 3 (1961) 741.
- [25] Blout R.E., Lenormant H. - Biochim.Biophys.Acta, 17 (1955) 325.
- [26] Kyogoku Y., Tsuboi M., Shimanouchi T., Watanabe I., - Nature, 189 (1961) 120.
- [27] Fritzsche H. - Biochim.Biophys.Acta, 119 (1966) 645.

- [28] Fuller W., Hutchinson M., Spencer M., Wilkins M.H.F. - J.Mol. Biol. 27 (1967) 507.
- [29] Higuchi S., Morikawa K., Tsuboi M., Kyogoku Y., Nishimura S. - Nature.
- [30] Dube S.K., Marcker K.A., Clark B.F.C., Cory S. - Nature, 218 (1968) 1019.

Andrzej Dobek, Adam Patkowski

BADANIE STRUKTURY KWASÓW NUKLEINOWYCH PRZY POMOCY SPEKTROSKOPII RAMANA

STRESZCZENIE

Przedstawiono ogólne zasady badania II-go rzędowej struktury kwasów nukleinowych przy pomocy spektroskopii ramanowskiej. Omówiono krótko historyczny rozwój tych badań. Zebrano w tabeli charakterystyczne częstotliwości pasm ramanowskich dla roztworów tRNA w H_2O i D_2O , na podstawie widm mieszaniny tRNA z drożdży, w zależności od temperatury. Podano zmiany natężenia pewnych pasm związane ze zmianą temperatury, pH (pD) i stężenia jonów Na^+ i Mg^{2+} . Wykazano, że na podstawie tych danych można wyciągnąć wiele wniosków dotyczących II-go rzędowej struktury kwasów nukleinowych.

I. WSTĘP

Drgania molekularne, poza spektroskopią absorpcyjną w podczerwieni, można także badać przy pomocy widm Ramana. W widmach tych, oprócz pewnych pasm obserwowanych w IR pojawiają się nowe, odpowiadające przejściom wzbronionym w podczerwieni. Zastosowanie laserów, techniki filtrów jodowych [1] i monochromatorów o dwóch lub trzech siatkach pozwala badać przesunięcia częstotliwości dla światła rozproszonego od 0.003 do 3000 cm^{-1} ($10^8 - 10^{14}$ Hz), a dla roztworów wodnych w zakresie $200 - 3200\text{ cm}^{-1}$. W przedziale tym widmo ramanowskie kwasów nukleinowych składa się z około 30 pasm, które mają małą szerokość połówkową ($10 - 40\text{ cm}^{-1}$) i są stosunkowo łatwe do rozseparowania. Użycie roztworów D_2O pozwala badać pasma Ramana w obrębie pasm H_2O , a także efekt izotopowego podstawienia w całym zakresie widma.

Badanie słabych pasm Ramana możliwe jest dzięki rezonansowemu efektowi Ramana [2], który przejawia się we wzroście natężenia światła rozproszonego, gdy częstotliwość światła wzbudzającego zbliża się do częstotliwości pierwszego pasma absorpcyjnego.

Rozpatrywanie struktury kwasów nukleinowych ułatwione jest z powodu

występowania hypochromizmu ramanowskiego, analogicznego do występującego w UV dla tych związków. W oparciu o reguły wyboru, sformułowane na gruncie teorii grup, podana jest polaryzacja drgań wiązań cząsteczek o danej symetrii. Ułatwia to przypisywanie pasm Ramana poszczególnym składnikom kwasów nukleinowych. Teoretycznie obliczony stosunek depolaryzacji powinien zawierać się w granicach 0 - 6/7, a stwierdzony doświadczalnie dla kwasów nukleinowych nie przekracza 3/4.

Głównymi niedogodnościami eksperymentalnymi spektroskopii Ramana są wymagane stosunkowo duże stężenia próbek (np. dla tRNA powyżej 1.5%) i ich wysoka jednorodność optyczna. Dodatkowym warunkiem uzyskania dobrego widma jest jak najmniejsza fluorescencja próbki.

II. BADANIA RAMANOWSKIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

Badania ramanowskie kwasów nukleinowych zapoczątkowane zostały przez R.A. Malta [3], który posługiwał się klasycznym źródłem światła. Badania te nie mogły dać wówczas żadnych dokładniejszych informacji o strukturze cząsteczek, ponieważ nie ma teorii, która pozwoliłaby interpretować dane eksperymentalne dla tak złożonych układów. Dlatego w następnych latach duży nacisk położono na badania składników kwasów nukleinowych i związków modelowych [4-8], na których obecnie oparta jest interpretacja widm naturalnych kwasów nukleinowych. Prace dotyczące biologicznie czynnych cząsteczek zapoczątkował G.J. Thomas, Jr. badając widma roztworów wodnych rRNA z *E.coli* [9, 10]. Wkrótce potem grupa M. Tsuboi [11] otrzymała widmo tRNA^{fMet} z *E.coli*. Poprzez porównanie tego widma z widmami polirybonukleotydów można było przypisać poszczególnym składnikom tRNA odpowiednie pasma ramanowskie. Nie wszystkie pasma udało się w ten sposób oznaczyć z powodu niejednoznaczności wynikłych z przesunięcia częstości i zmian natężenia. Inna grupa (E.W. Small i in. [12]) doniosła w tym samym czasie o badaniach konformacji cząsteczek mieszaniny tRNA z drożdży w zależności od temperatury. Analogiczne badania wykonano dla molekuł tRNA^{fMet}, tRNA^{Val} i tRNA^{Phe} z *E.coli* [13]. Wyniki tych eksperymentów potwierdziły dane dotyczące ilości sparowanych i stakingujących zasad otrzymane innymi metodami. Wykazały też istnienie pasm ramanowskich, których natężenie zależne jest od zmian konformacji cząsteczki wywołanych zmianami temperatury. Ostatnio zbadano kilka dalszych specyficznych tRNA z *E.coli* [14]. Stwierdzono, że tRNA^{Glu}, tRNA^{Arg}, tRNA^{Phe}, tRNA^{fMet} i tRNA^{Val} mają ogólną strukturę drugorzędową taką samą i zawierają średnio 84±4% nukleotydów w rejonach uporządkowanych. Równocześnie doniesiono o badaniu naładowanego i

nienaładowanego tRNA^{Phe} z drożdży [15]. Zauważono, że w obu wypadkach ujawniają się duże różnice w asocjacji warstwowej zasad, zwłaszcza adeniny.

Obecnie prowadzone są dalsze intensywne badania związków modelowych, które są niezbędne dla dokładniejszej interpretacji otrzymywanych równocześnie widm naturalnych kwasów nukleinowych.

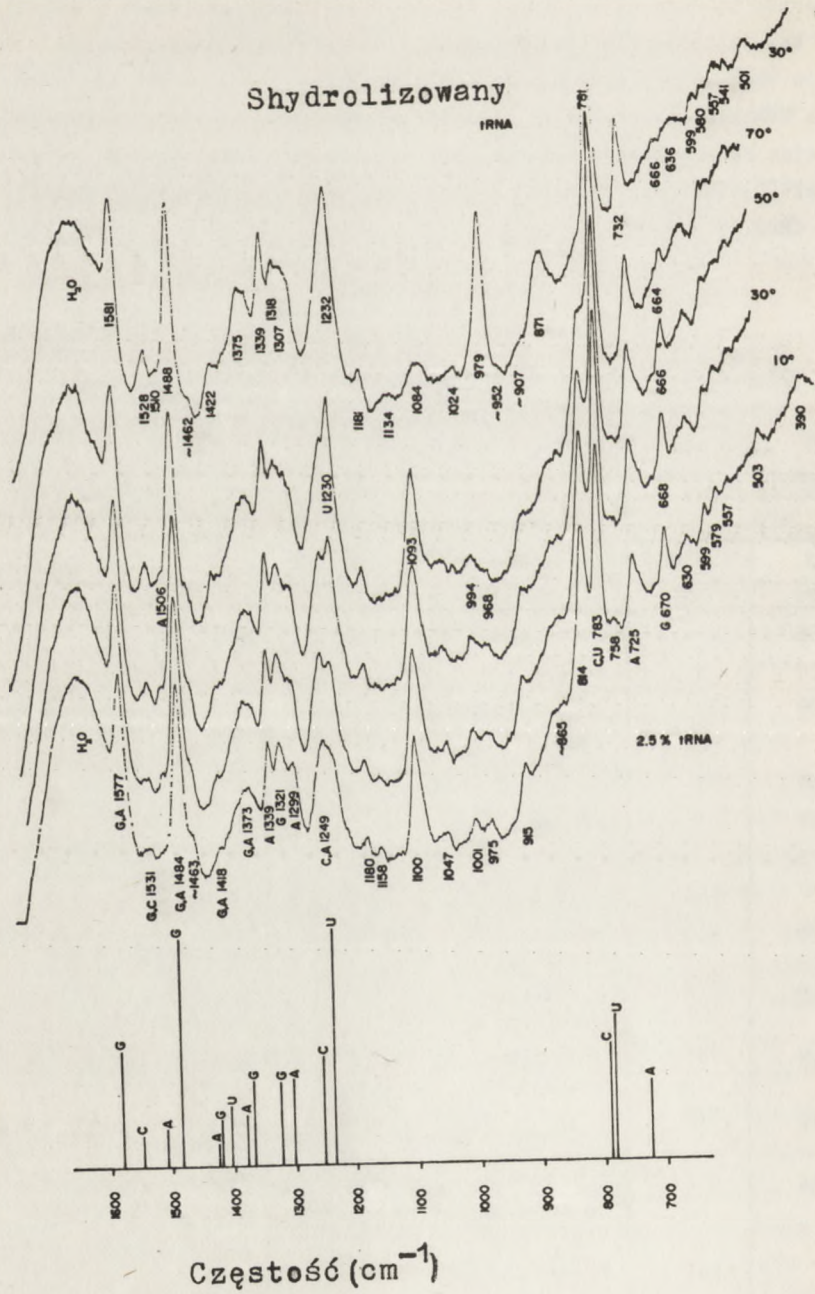
Dla dokładniejszego zilustrowania sposobu interpretacji eksperymentalnych widm Ramana kwasów nukleinowych oraz metod pozwalających wyciągać wnioski o strukturze badanych cząsteczek, omówimy szczegółowo widmo roztworu tRNA.

1. BADANIA tRNA

T a b e l a I

Częstości ramanowskie, ich oznaczenia i charakterystyka dla roztworów mieszaniny tRNA z drożdży w H₂O i D₂O

Częstość pasma (cm ⁻¹)		Przynależność	Zmiany pod wpływem temperatury
H ₂ O	D ₂ O		
1	2	3	4
368			
427		ryboza	
507	495	ryboza-fosforan	
	548	ryboza	
581	571		
601		ryboza	
633			
	664		
670	666	zmiana oddziaływania G-szkielet	silny spadek natężenia
727	718	nie zasocjowane warstwowo A	umiarkowany wzrost natężenia
759	753	oddziaływanie G-szkielet	zanika
786	777	C, U	umiarkowany wzrost natężenia
814	812	O-P-O dwuścienne symetrycz- ne rozciągające - zmiana uporządkowania szkieletu	przesunięcie częstości
	841	ryboza-fosforan	
ok. 869		ryboza-fosforan	
917	913	ryboza-fosforan	



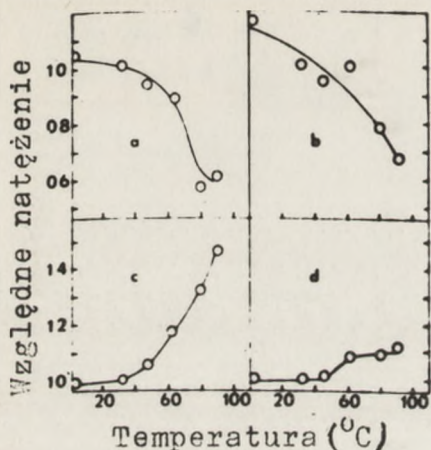
Rys. 1. Widma ramanowskie mieszaniny tRNA w H_2O przy pH 7,2 dla różnych temperatur

1	2	3	4
977	981	ryboza-fosforan	duży spadek natężenia
1000	994		
1049	1042	C-O rozciągnięcie ryboza-fosforan	umiarkowany spadek natężenia
1101	1101	O=P-O symetryczne rozciągające	
1132	1140	rozciągające przy węglu 2' rybozy	
1160		ryboza-fosforan	zanika
1180		rozciągające zewnątrz zasady - C-N	umiarkowany wzrost natężenia
1240		nie zasocjowane warstwowo U	duży wzrost natężenia
1253	1254	G, A	mały wzrost natężenia
1299	1303	nie zasocjowane warstwowo A	mały wzrost natężenia
1323	1313	nie zasocjowane warstwowo G	mały wzrost natężenia
1340	1344	nie zasocjowane warstwowo A	umiarkowany wzrost natężenia
1374	1370	nie zasocjowane warstwowo G, A	umiarkowany wzrost natężenia
1419		G, A	
1466		ryboza	
1485	1478	G, A; nie zasocjowane warstwowo G	mały wzrost natężenia
	1503		
1512	1524	A	
1534		nie zasocjowane warstwowo G, C	umiarkowany wzrost natężenia
1576	1578	G, A	
	1620		
	1655	C = O rozciągające	
	1684		

W oparciu o widma pokazane na rys. 1 i opisane w tabeli I można wykreślić krzywe topnienia dla wybranych pasm ramanowskich i opisać zmiany konformacji na podstawie wyników uzyskanych dla polirybonukleotydów.

a) K r z y w e t o p n i e n i a

Na podstawie widm Ramana otrzymanych dla specyficznych tRNA z E.coli wykreślone są krzywe topnienia na rys. 2.



Rys. 2. Krzywe topnienia $tRNA^{fMet}$ w D_2O dla pasm: a) 670 cm^{-1} ; b) 812 cm^{-1} ; c) 1578 cm^{-1} ; d) 780 cm^{-1}

sunku 2. Krzywa topnienia pasma 1578 cm^{-1} nie posiada jednak plateau nawet przy 90°C , kiedy natężenie w porównaniu z widmem przy 2°C wzrosło o 46%. Ten duży hypochromizm zgodny jest ze strukturą liścia koniczyny $tRNA^{fMet}$, w której miejsca G mogą być w dużym stopniu w konfiguracji sparowanej i zasocjowanej warstwowo nawet w wyższych temperaturach. Anomalna zmiana pasma 670 cm^{-1} nie da się wytłumaczyć zwykłym efektem hypochromowym. Przebieg zależności natężenia pasma 812 cm^{-1} od temperatury świadczy o stałej zmianie konformacji szkieletu $tRNA^{fMet}$ w zakresie $2 - 90^\circ\text{C}$.

b) Drgania / grupy fosforanowej

W widmie Ramana kwasów nukleinowych pojawiają się dwa pasma o średnim natężeniu, odpowiadające symetrycznym drganiom rozciągającym $-O-P-O-$ (w przybliżeniu 814 cm^{-1}) i $O=P=O^-$ (w przybliżeniu 1100 cm^{-1}) [9, 16] grupy fosfodwuestrowej. Oba pasma pojawiają się zarówno w widmach roztworów H_2O jak i D_2O . Stwierdzono, że kiedy uporządkowanie uwodnionego RNA wzrasta przy dodaniu jonów przeciwnych lub przy obniżeniu temperatury, to zwiększa się również natężenie pasma 814 cm^{-1} i przesunęła się ono nieznacznie w częstotliwości. Efekty te przypisywane są zmianie średniej konfiguracji wiązania dwuestrowego w szkielecie RNA. Równocześnie linia 1100 cm^{-1} pozostaje w zasadzie niezmienną. Podobnie protonizacja kwasów nukleinowych powoduje przesunięcie linii 814 cm^{-1} do wyższych częstotliwości, a nie wpływa na zachowanie się linii 1100 cm^{-1} .

Porównując krzywe topnienia dla $tRNA^{Val}$ i $tRNA^{fMet}$ z *E. coli* dla pasm 1688 , 1658 , 1578 , 812 i 670 cm^{-1} stwierdzono, że są one podobne, co sugeruje, że podobne też są zmiany struktury drugo- i trzeciorzędowej dla tych dwóch tRNA w zależności od temperatury. I tak zmiany natężenia w przedziale $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ pojawiają się w wyniku zerwania wiązań wodorowych w sparowanych zasadach podwójnie skręconych odcinków [10]. Wzrost natężenia pasma 780 cm^{-1} o 10% jest wynikiem przejścia pirymidyn (w większości C) w konfiguracje niesparowane i niezasocjowane warstwowo. Proces ten jest w zasadzie skończony w 70°C , co widać na ry-

Badania uwodnionych roztworów polinukleotydów i naturalnych kwasów nukleinowych udowodniły, że pasmo 814 cm^{-1} pojawia się tylko w tych związkach, w których występują rejony o uporządkowanej strukturze pojedynczej spirali (np. poly (rA) i poly (rC)) lub /i rejony struktur sparowanych zasad Watsona - Cricka (np. poly (rA) .poly (rU), poly (rI) poly (rC), poly (rG) poly (rC), poly (rA-rU) .poly (rA-rU), rRNA, tRNA i R17 RNA). Eksperymenty przeprowadzone z krystalicznymi włóknami DNA i RNA wykazały, że pasmo 814 cm^{-1} może być charakterystyczne dla kwasów znajdujących się w formie A (podwójna struktura spiralna z parami zasad pochylonymi swoimi płaszczyznami pod kątem około 75° do osi łańcucha). Do grupy związków formy A należą uwodnione cząsteczki RNA, lecz nie należą uwodnione cząsteczki DNA. Przykładem tego jest efekt termicznej denaturacji poly (rA) .poly (rU). W 85°C oddzielne włókna dupleksu są silnie nieuporządkowane, a ich przypadkowe struktury łańcucha powodują bardzo słabe drgania przy 795 cm^{-1} . Przesunięcie częstości od 814 do 795 cm^{-1} jest charakterystyczną własnością zmiany w konformacji wiązania C-O-P-O-C przy przejściu formy uporządkowanej w nieuporządkowaną polirybonukleotydu.

Wielkość natężenia I_1 pasma 814 cm^{-1} jest wprost proporcjonalna do liczby wiązań dwuestrowych w uporządkowanych strukturach, a wielkość natężenia I_2 pasma 1100 cm^{-1} jest niezależna od tego czynnika strukturalnego. Identyczne wartości I_1/I_2 w badanych związkach oznaczają więc, że konformacja wiązań estrowych jest ilościowo i jakościowo ta sama w każdym z nich. Stosunek I_1/I_2 jest niezależny od sekwencji zasad w sparowanych rejonach, rodzaju par zasad Watsona - Cricka i jest dokładnie taki sam dla polikwasów z całkowicie sparowanymi zasadami jak i dla pojedynczo skręconych łańcuchów, takich jak poly (rA) czy poly (rC). Ponieważ I_1/I_2 nigdy nie przekracza wartości 1.64 ± 0.04 , która obserwowana jest dla struktur całkowicie podwójnie-spiralnych, jak i dla struktur pojedynczo-spiralnych, należy stąd wnioskować, że w obu przypadkach wszystkie wiązania dwuestrowe są w podobnie uporządkowanej konfiguracji.

Wyniki te sugerują, że zmierzona wartość tego stosunku w naturalnym RNA może być porównana z wartością 1.64 ± 0.04 w celu określenia ilości grup fosfodwuestrowych w uporządkowanych rejonach kwasu.

Wartości pomiarów I_1/I_2 dla pewnych rodzajów RNA przedstawione są w tabeli II. Podano w niej również dane odnośnie drugorzędowej struktury tych kwasów otrzymane na podstawie przytoczonych stosunków natężeń.

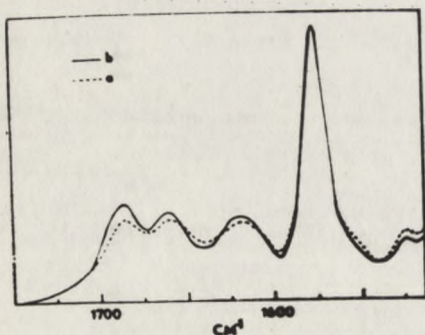
Stosunki natężeń dla drgań grupy fosforanowej i obliczona na ich podstawie drugorzędowa struktura kwasów nukleinowych [14, 17]

Rodzaj RNA	I_1/I_2	% zasad w rej. uporz.	% zasad w rej. nieuporz.	% zasad sparowanych	% zasad w rej. uporz. poj. skręcon.
16-S rRNA (E.coli Q13)	1.53 ± 0.08	95 ± 5	5 ± 5	60 ± 6	35 ± 11
23-S rRNA (E.coli Q13)	1.4	85 ± 5	15 ± 5	58 ± 6	27 ± 11
tRNA ^{fMet} (E.coli K12-M07)	1.38 ± 0.02	84 ± 3	16 ± 3	50 ± 5	34 ± 8
tRNA ^{Phe2} (E.coli K12-M07)	1.40 ± 0.05	85 ± 3	15 ± 3	53 ± 5	32 ± 8
tRNA ^{Arg} (E.coli K12-M07)	1.38 ± 0.04	84 ± 4	16 ± 4	53 ± 5	31 ± 9
tRNA ^{Glu} (E.coli K12 M07)	1.38 ± 0.02	84 ± 3	16 ± 3	50 ± 5	34 ± 8
tRNA ^{Val} (E.coli B)	1.36 ± 0.04	83 ± 4	16 ± 3	53 ± 5	30 ± 9
R17 RNA	1.44	87 ± 3	23 ± 3	-	-

Znając z innych badań całkowitą liczbę zasad wchodzących w skład rozpa-trywanego kwasu nukleinowego (jest ona znana np. dla wielu specyficznych tRNA), można dość dokładnie na podstawie badań ramanowskich określić ilość zasad znajdujących się w konfiguracjach nieuporządkowanych.

c) O b s z a r p o d w ó j n e g o w i ą z a n i a $1550-1750 \text{ cm}^{-1}$

Podobieństwo widm Ramana w przedziale podwójnego wiązania oznacza, że badane kwasy mają w przybliżeniu równy procent wszystkich zasad w sparowanych konfiguracjach [18, 19]. Silne pasmo widma ramanowskiego należy do H_2O . Dlatego też obszar ten należy badać dla roztworów D_2O , aby wyraźnie odseparować drgania rozciągające grup karbonylowych U, C, G i ich pochodnych pojawiające się w zakresie $1655-1688 \text{ cm}^{-1}$, a uczestniczące w wiązaniu wodorowym.



Rys. 3. Widmo Ramana w rejonie $1550-1750 \text{ cm}^{-1}$ roztworów w D_2O ; a) tRNA^{fMet} i b) tRNA^{Val}

Czułym testem na ilość sparowanych U jest stosunek natężeń pasm $1688/1658 \text{ cm}^{-1}$. Wartość tego stosunku jest np. większa dla tRNA^{Val} niż dla tRNA^{fMet} i oznacza więcej sparowanych

zasad U w tym pierwszym niż w drugim (co jest zgodne z modelem liścia koniczyny dla wymienionych kwasów).

d) O b s z a r 1150-1550 cm^{-1}

W przedziale tym występują drgania rozciągające pierścień puryn i pirymidyn. Pod wpływem asocjacji warstwowej zasad wiązania C-C i C-N zwiększają swój charakter wiązania pojedynczego i dlatego częstotliwość i natężenie tych drgań powinny maleć. Efekt taki obserwuje się dla pasma 1230 cm^{-1} , którego częstość przesuwa się do 1243 cm^{-1} , a natężenie rośnie przy przejściu U w formę nie zasocjowaną warstwowo. Podobnie silny hypochromizm ramanowski obserwuje się dla pasma 1375 cm^{-1} spowodowany asocjacją warstwową A, a wzrost pasma 1484 cm^{-1} spowodowany jest zmniejszeniem asocjacji warstwowej G. Pasma 1250 i 1300 cm^{-1} wywołane są drganiami pierścienia C i z ich natężeń można wnioskować wprost o ilości C w łańcuchu. Na przykład z porównania kilku specyficznych tRNA otrzymuje się z badań ramanowskich, że tRNA^{Glu} zawiera więcej C niż tRNA^{Val} lub tRNA^{Met}.

e) O b s z a r 650-800 cm^{-1}

Ze zmian w tym przedziale częstotliwości wnioskuje się również o oddziaływaniach asocjacji warstwowej zasad w łańcuchu polirybonukleinowym. Przejście C w konformację bez asocjacji warstwowej powoduje wzrost pasma 780 cm^{-1} . Silny spadek natężenia pasma 725 cm^{-1} wywołany jest zanikaniem asocjacji warstwowej A. Zmniejszenie oddziaływania G-szkielet i C-szkielet powoduje odpowiednio zmniejszenie pasm 670 i 758 cm^{-1} .

Zauważono również, że natężenie pasma 725 cm^{-1} pochodzącego głównie od drgań A, silnie się zmienia w zależności od ilości hU (dwuhydrourydy) w łańcuchu polinukleotydu. Przez porównanie widm różnych tRNA można wnioskować o ilości tych rzadkich nukleozydów w każdym z nich.

2. WPLYW STĘŻENIA JONÓW SODU I MAGNEZU NA WIDMA RAMANA KWASÓW RYBONUKLEINOWYCH

a) J o n y Na^+

Badano strukturę poly (rG) w zależności od stężenia Na^+ [20] i stwierdzono, że widma ramanowskie otrzymane dla obojętnych roztworów wodnych zawierających nadmiar jonów sodu są jakościowo różne od widm otrzymanych dla roztworów nie zawierających soli. Otrzymane wyniki świadczą o tworzeniu się stabilnych struktur drugorzędowych w poly (rG) w wymienionych wyżej dwóch typach roztworów. W roztworach o wysokim stężeniu jonów Na^+ , poly (rG) przypomina bardzo żel Guo-5'-P w strukturze pierścienia guaniny, tworzeniu wiązania wodorowego między zasadami i w konformacjach reszt rybozowych i fosforanowych. Natomiast w roztworach pozbawionych jonów sodu, poly

(rG) posiada nietypową strukturę pierścieni G i nietypową konformację reszt szkieletu. Zauważono, że częstości pasm ramanowskich formy poly (rG), występującej w roztworze bez jonów Na^+ w przedziale $1500\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$, są zgodne z częstościami IR podanymi poprzednio [21], chociaż względne natężenia znacznie się różnią. Z danych ramanowskich widać jednak jasno, że struktura poly (rG) w tych warunkach różni się od struktury występującej w żelu Guo-5'-P. Wnioski te nie mogą być wyciągnięte z samych widm IR.

Stwierdzona na podstawie badań Ramana poly (rG) stabilizacja struktury pierścienia G (struktury różnej od struktury tautomeru keto-aminowego) może odgrywać istotną rolę w oddziaływaniach G w RNA. Na przykład parowanie G z U, które jest sugerowane dla oddziaływania kodon - antykodon i dla spiralnych rejonów tRNA, może być faworyzowane przez taką modyfikację pierścienia G.

Prowadzone obecnie w Instytucie Fizyki UAM we współpracy z Międzyuczelnianym Instytutem Biochemii w Poznaniu badania ramanowskie zależności struktury cząsteczek mieszaniny tRNA z drożdży od stężenia jonów sodu wykazują znaczne zmiany natężenia i częstości poszczególnych pasm Ramana. Uzyskane widma nie zostały jeszcze szczegółowo opracowane i autorzy mają nadzieję, że wkrótce będą mogli podać ich dokładniejszą interpretację.

b) Jony Mg^{2+}

Wiązanie Mg^{2+} do specyficznych miejsc tRNA zmienia aktywność aminoakceptorową i podnosi średnią temperaturę topnienia, co stwierdzono w wyniku badań spektroskopowych UV [22]. Badania ramanowskie wodnych roztworów specyficznych tRNA przy 32°C w obecności 3M nadmiaru Mg^{2+} na grupę fosforanową ujawniły następujące zmiany [14, 18]: mały wzrost (około 10%) natężenia pasma 1688 cm^{-1} , równoczesny spadek natężenia pasma 1658 cm^{-1} i 15% wzrost natężenia pasma 814 cm^{-1} . Brak zmian częstości świadczy, że wiązanie jonów Mg^{2+} nie zachodzi w tych warunkach w ściśle określonym miejscu lub nie jest uwidocznione w widmach Ramana. Zmiany natężenia pasm 1688 i 1658 cm^{-1} sugerują mały wzrost liczby sparowanych zasad na molekułę [18, 19]. Wzrost natężenia pasma 812 cm^{-1} oznacza dalsze uporządkowanie szkieletu tRNA z powodu formowania się dodatkowych par zasad. Ponieważ model liścia koniczyny ogranicza liczbę zasad mogących się dodatkowo parować prawdopodobnym jest, że tworzy się kilka wewnątrzmolekularnych par.

Z krzywych topnienia dla roztworów D_2O tRNA^{Val}, tRNA^{Met} i innych specyficznych tRNA wynika, że nie występuje wyraźne topnienie sparowanych i zasocjowanych warstwowo rejonów i wyraźne zmniejszenie uporządkowania szkieletu poniżej 60°C .

3. BADANIA RAMANOWSKIE ROZTWORÓW rRNA I DNA

a) r R N A

Jak widać z tabeli II, cząsteczki 16-S i 23-S rRNA posiadają wysoko uporządkowaną strukturę drugorzędową. Choć 40% zasad nie jest sparowanych w tych cząsteczkach, dane ramanowskie wskazują, że większość niesparowanych zasad znajduje się w uporządkowanych pojedynczo-spiralnych konfiguracjach. Spirale typu "hairpin", które stanowią sparowane rejony rRNA, są połączone przez odcinki, w których występują głównie niesparowane zasocjowane warstwowo zasady. Zatem całkowita struktura rRNA jest bardziej uporządkowana, niż wynikałoby to jedynie z uwzględnienia modelu typu "hairpin". Dane otrzymane z widm Ramana sugerują również, że cząsteczki 16-S rRNA są średnio bardziej uporządkowane niż 23-S rRNA.

b) D N A

Porównanie widm Ramana dla wodnych roztworów DNA i RNA [23] wskazuje, że pasma G w RNA są znacznie silniejsze niż w DNA, mimo że w obu rodzajach występuje ten sam (około 40%) procent par GC, należy stąd wnioskować, że prawdopodobnie asocjacja warstwowa w DNA jest silniejsza niż w RNA.

PODSUMOWANIE

Określenie drugorzędowej struktury cząsteczek RNA konieczne jest do wyjaśnienia funkcji RNA z punktu widzenia jej molekularnych oddziaływań. Drugorzędową strukturą, zdefiniowaną jako ilość i rodzaj sfałdowań łańcucha w pewnych rejonach RNA, można mierzyć ilościowo jako:

- 1) procent (lub część) wszystkich zasad (A, U, G i C) w pojedynczo i podwójnie skręconych rejonach,
- 2) procent każdej z zasad komplementu Watsona-Cricka w podwójnie skręconych rejonach,
- 3) procent każdej z zasad w pojedynczo skręconych rejonach,
- 4) procent wszystkich zasad w uporządkowanych pojedynczo skręconych rejonach,
- 5) procent grup rybozo-fosforanowych w uporządkowanych rejonach.

Spektroskopia IR uwodnionych roztworów RNA udzieliła odpowiedzi na pytania związane z punktami 1), 2) i 3), podczas gdy spektroskopia ramanowska rozstrzyga dodatkowo problemy punktu 4) i 5). Analiza struktury RNA metodami spektroskopowymi oparta jest na porównaniu empirycznych danych dla naturalnych RNA z danymi otrzymanymi dla związków modelowych. Korelacje takie opisane zostały uprzednio dla widm UV [24], ORD i CD [25], IR [26] i ostatnio dla widm ramanowskich. W widmach IR i R związków modelowych da-

je się zauważyły znaczne różnice i dzięki temu porównanie tych dwóch metod pozwala na uzyskanie wielu szczegółowych informacji strukturalnych [27]. Przy badaniach widm IR należy pamiętać o błędzie spowodowanym trudnymi do określenia zakłóceniami przez oddziaływania prostopadłej asocjacji warstwowej. Oddziaływania te są wprawdzie słabe w porównaniu z oddziaływaniami parowania się zasad, jednak nie są do zaniedbania i ograniczają użyteczność metody IR przy badaniu drugorzędowej struktury RNA o nieznannej sekwencji zasad.

Przy badaniu widm Ramana bierze się pod uwagę dobrze rozdzielone pasma pochodzące zarówno od drgań wiązań zasad, jak i od drgań szkieletu RNA. Częstości 814 i 1100 cm^{-1} nie pojawiają się w widmie IR z powodu silnej interferencji z pasmami pochodzącymi od rozpuszczalnika, są one natomiast łatwo mierzone w widmie Ramana. Pasma te zależne są od konfiguracji rybonukleotydów, a nie od ich rodzaju lub sekwencji w łańcuchu RNA.

LITERATURA

- [1] Brown K.E., Erfurth S.C., Small E.W., Peticolas W.L.; Proc.Nat.Acad. Sci., USA 13, 4231 (1972).
- [2] Tsuboi M., Takahashi S., Muraichi S., Kajiura T.; Bull.Chem.Soc. Japan, 44, 2921 (1971).
- [3] Malt R.A.; Biochim, Biophys.Acta 120, 461 (1966).
- [4] Lord R.C., Thomas G.J., Jr; Spectr.Acta, 23A, 2551 (1967).
- [5] Lord R.C., Thomas G.J., Jr; BBA, 142, 1 (1967).
- [6] Peticolas W.L., Small E.W., Fanconi B.; Polymer Charakterization, Plenum Press, 1971.
- [7] Small E.W., Peticolas W.L.; Biopolymers, 10, 69 (1971).
- [8] Brown K.G., Kiser E.J., Peticolas W.L.; Biopolymers, 11, 1855 (1972).
- [9] Thomas G.J., Jr; BBA, 213, 417 (1970).
- [10] Thomas G.J., Jr, G.C. Medeiros, Hartman K.A.; BBRC, 44, 587 (1971).
- [11] Tsuboi M., Takahashi S., Muraishi S., Kajiura T., Nishimura S.; Science, 174, 1142 (1971).
- [12] Small E.W., Brown K.G., Peticolas W.L.; Biopolymers, 11, 1209 (1972).
- [13] Thomas G.J. Jr, Medeiros G.C., Hartman K.A.; BBA, 277, 71 (1972).
- [14] Thomas G.J. Jr, Chen M.C., Hartman K.A.; BBA, 324, 37 (1973).
- [15] Thomas G.J., Jr, Chen M.C., Lord R.C., Kotsiopoulos P.S., Tritton T.R., Mohr S.C.; BBRC, 54, 570 (1973).
- [16] Shimomouchi T., Tsuboi M., Kyogoku S.; Adv.Chem.Phys. 7, 435 (1964).
- [17] Thomas G.J., Jr, Hartman K.A.; BBA, 312, 311 (1973).

- [18] Thomas G.J., Jr, Medeiros G.C., Hartman K.A.; BBA, 277, 71 (1972).
- [19] Thomas G.J., Jr, Spencer M.; BBA, 179, 360 (1969).
- [20] Rice J., Lafleur L., Medeiros G.C., Thomas G.J. Jr; Raman J. Spectr., 1, 207 (1973).
- [21] Miles H.T., Frazier J.; BBA, 79, 216 (1964).
- [22] Lindhal T., Adams A., Fresco J.R.; Proc.Nat.Acad.Sci, USA, 55, 941, (1966).
- [23] Small E.W., Peticolas W.L.; Biopolymers, 10, 1377 (1971).
- [24] Cox P.A.; Biochem.J., 120, 539 (1970).
- [25] Gratzer W.B., Richards E.G.; Biopolymers, 10, 2607 (1971).
- [26] Thomas G.J., Jr; Biopolymers, 7, 325 (1969).
- [27] Lafleur L., Rice J., Thomas G.J., Jr; Biopolymers, 11, 2423 (1973).

DYSKUSJA

W dyskusji zabrali głos kolejno: mgr T. Dzięgielewski, mgr M. Kręglewski, doc.dr hab. J. Stankowski, prof.dr hab. M. Wiewiórowski i mgr A. Rafalski. Poruszono na wstępie zagadnienie obliczania i wyznaczania stopnia spiralizacji i ilości grup fosforanowych w odcinkach uporządkowanych i nieuporządkowanych łańcuchów kwasów nukleinowych przy pomocy widm Ramana i IR. Zainteresowanie wzbudziły badania ramanowskie tRNA prowadzone w Instytucie Fizyki UAM. Podkreślono, że badania widm Ramana i IR mogą stanowić alternatywę w stosunku do badań NMR i rentgenostrukturalnych. Dyskutowano następnie jednoznaczność przypisywania poszczególnych pasm Ramana i IR drganiom odpowiednich grup atomów w cząsteczce przy podstawieniu izotopowym bez uwzględnienia sprzężeń między drganiami. Poruszono kwestię aproksymacji widm tRNA przy pomocy widm polikwasów i wielkości błędu przy oznaczeniu natężeń poszczególnych pasm. Przedstawiono program badań przy wykorzystaniu spektrometru typu JEOL JRS-S1 znajdującego się w UAM i porównano możliwości tego typu spektrometru z możliwościami podobnych przyrządów stosowanych w innych pracowniach ramanowskich na świecie.

Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or introductory paragraph.

Main body of faint, illegible text, appearing to be several paragraphs of a document.

Bottom section of faint, illegible text, possibly a conclusion or signature block.

Jerzy Mścisz

DICHROIZM KOŁOWY W BADANIACH NUKLEOZYDÓW

STRESZCZENIE

W rozdziale tym przedstawiono możliwości metody dichroizmu kołowego (CD) w zastosowaniu do problemów strukturalnych w chemii składników kwasów nukleinowych. Uwzględniono wpływ rozpuszczalników na charakter widma.

Chcąc uzyskać z widm dichroizmu kołowego nukleozydów możliwie najwięcej informacji, należy rozpatrywać je łącznie z widmami absorpcyjnymi. Zmiany strukturalne w pochodnych uracylu, tyminy czy innych zasad kwasów nukleinowych mają stosunkowo nieznaczny wpływ na widma absorpcyjne, ale mogą powodować wyraźne różnice w wielkości i znaku efektu Cottona.

Analiza dostępnych krzywych CD pochodnych zasad kwasów nukleinowych wskazuje na obecność od dwóch do czterech efektów Cottona, wynikających z optycznie czynnych przejść elektronowych w rejonie 185 - 275 nm.

Przeprowadzone zestawienia (Manson [1], Krishna [2]) wskazały na możliwość korelacji widm zasad purynowych i pirymidynowych z pasmami absorpcyjnymi benzenu. Autorzy ci podzielili obserwowane w zasadach kwasów nukleinowych przejścia $\pi \rightarrow \pi^*$ na trzy grupy, które przez analogię z nomenklaturą przejść $\pi \rightarrow \pi^*$ benzenu, nazwali B_{2u} , B_{1u} , E_{1u} . Stan E_{1u} w przypadku benzenu i jego symetrycznych pochodnych jest podwójnie zdegenerowany, ale dla większości pochodnych asymetrycznych jest rozszczepiony.

Postulowana między widmami benzenu i zasad kwasów nukleinowych zależność nie sugeruje oczywiście podobieństw w rozkładzie gęstości elektronów, rozmieszczeniu węzłów czy rozkładzie ładunków w stanie wzbudzonym.

Ponieważ w zasadach purynowych i pirymidynowych występują na atomach azotu i tlenu niewiążące pary elektronowe, w zasadach tych występują przejścia $n \rightarrow \pi^*$, które są spolaryzowane prostopadle do płaszczyzny pierścienia zasady.

W związku z tym, że główny rejon absorpcyjny zasad purynowych i pirymidynowych może równocześnie zawierać przejścia $\pi \rightarrow \pi^*$ oraz $n \rightarrow \pi^*$, interpretacja widm wymaga starannej analizy krzywych CD i UV, odpowiednio podstawionych chromoforów zasadowych w różnych układach rozpuszczalników.

Dla odróżnienia przejścia $n \rightarrow \pi^*$ od przejścia $\pi \rightarrow \pi^*$ można między innymi stosować test przesunięć rozpuszczalnika Mc Connella [3]. Z drugiej strony przy analizie widm CD należy pamiętać, że wprowadzenie asymetrycznego podstawnika może całkowicie zmienić przebieg krzywej dichroizmu kołowego i czynność optyczna wyraźna w przypadku jednego rodzaju pochodnych może być dla innych praktycznie niezauważalna.

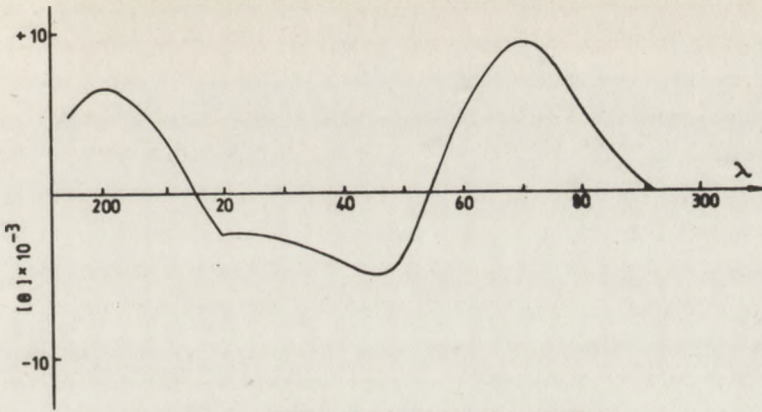
W pochodnych uracylu obserwuje się dwa wyraźne rejony absorpcyjne, pierwszy przy 260 nm i drugi w pobliżu 200 nm. W widmach CD tego typu związków przy 260 nm występują dwa efekty Cottona, zazwyczaj przeciwnego znaku. Podobnie dwa efekty Cottona pokazują się w okolicy 200 nm. Eliptyczność molowa długofalowego ekstremum CD, występującego zazwyczaj między 260 a 270 nm (pasmo B_{2u}) przybiera dla pochodnych urydyny wartości od 16500 dla 1/2,3-O-izopropylideno-5-deoksy (β -D-erytro-pent-4-eno) furanozylo/-uracylu w butanolu do -39000 dla 4'-tiourydyny w dioksanie. Położenie pasma B_{2u} może zmieniać się od 255 do 272 nm.

W krótkofalowym rejonie widma wszystkie pochodne urydyny posiadają dwa maksima CD, jedno w okolicy 210-220 nm i drugie poniżej 200 nm, które oznaczono odpowiednio jako E_{1ua} i E_{1ub} efekty Cottona. E_{1u} efekty Cottona są zazwyczaj przeciwnego znaku.

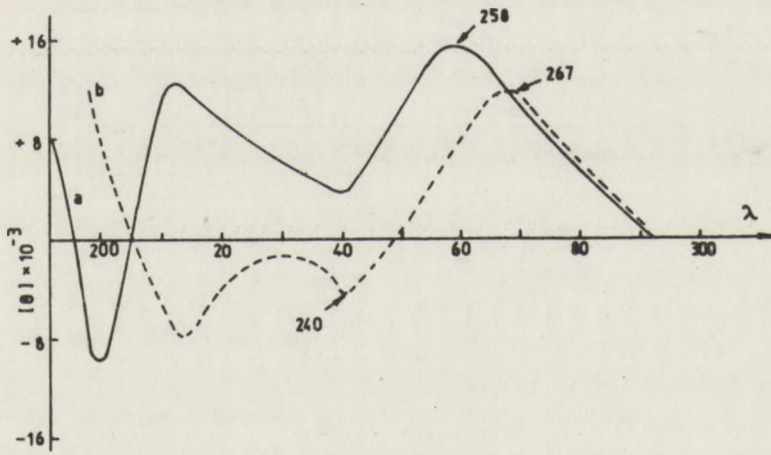
Pomiędzy rejonami spektralnymi E_{1u} i B_{2u} występuje rejon B_{1u} . Prawie dla wszystkich pochodnych urydyny znaleziono pasma CD występujące w zakresie 237 - 247 nm.

B_{1u} efekt Cottona jest zazwyczaj mniejszy i przeciwnego znaku niż B_{2u} efekt Cottona. Najwyraźniejszy B_{1u} efekt Cottona o eliptyczności molowej +6200 zaobserwowano dla 6-metylo-3 (β -D-ribofuranazylo) uracylu w wodzie. Urydyna daje stosunkowo intensywne pasmo CD przy 243 nm w acetonitrylu o eliptyczności molowej - 5000 (Miles [4] rys. 1).

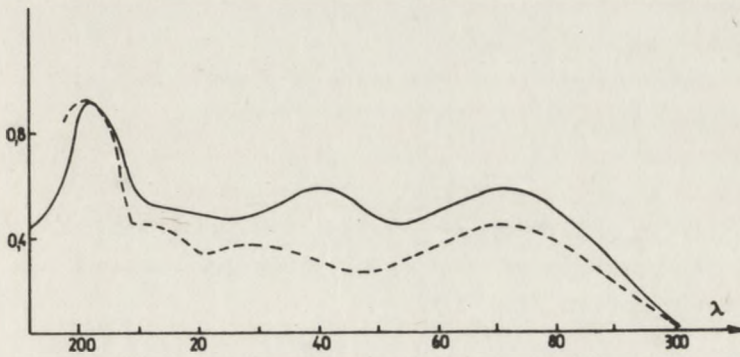
Zauważono, że gdy B_{1u} efekt Cottona jest przeciwnego znaku niż B_{2u} , ostatnie pasmo CD jest zawsze przesunięte w kierunku fal dłuższych (związek a), a gdy B_{1u} efekt Cottona jest nieobecny lub ma ten sam znak, pasmo B_{2u} w odniesieniu do widma absorpcyjnego jest przesunięte w kierunku fal krótszych (związek 6, rys. 2).



Rys. 1. Widmo CD urydyny w acetonitrylu



Rys. 2. Widma CD urydyny w wodzie przy pH = 7



Rys. 3. Widma CD cytydyny i 6-metylo-2'-deokscytydyny

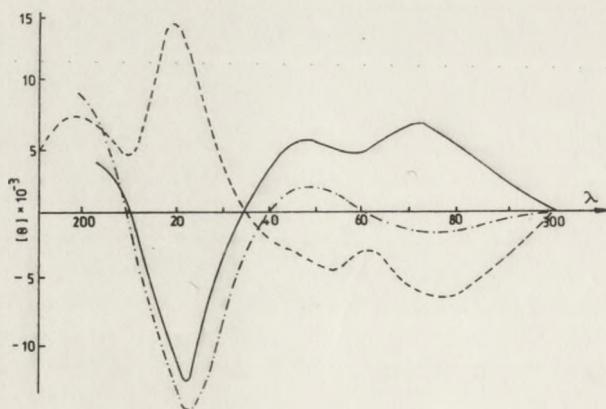
Widma absorpcyjne pochodnych nukleozydów cytozynowych prócz dwóch wyraźnie zaznaczonych maksimów przy 270 i 198 nm posiadają dodatkową absorpcję występującą między nimi (rys. 3). Słabo widoczne pasmo pojawia się przy 235 nm. W okolicy 215 nm występuje przegięcie zaznaczone na wyraźnym maksimum 198 nm mogące wskazywać na dodatkową absorpcję w tym rejonie. W widmach dichroizmu kołowego pochodnych cytozynowych stwierdzono występowanie od dwóch do czterech efektów Cottona. Dla nukleozydów cytozyny i 6-metylocytozyny B_{2u} efekt Cottona jest ściśle związany z długofalową absorpcją przy 270 nm. W przypadku 3-metylo i 5-halogenopochodnych, tak w przypadku widm absorpcyjnych i dichroizmu kołowego pasma te ulegają przesunięciu o 8-16 nm w kierunku fal dłuższych (tabela I).

T a b e l a I

	CD	UV
2'-deoksytydina	270 (8500)	270
5-J-2'-deoksytydina	280 (5000)	284
5-Br-2'-deoksytydina	286 (6200)	287

Pochodne cytydyny wykazują efekt Cottona w rejonie 215 - 225 nm, który można powiązać z przegięciem przy 215 nm na krzywej absorpcyjnej. Efekt ten jest wyraźny i zazwyczaj ujemny.

Występowanie czwartego efektu Cottona potwierdzają badania przeprowadzone dla α i β anomerów 6-metylodeoksytydyn oraz 6-metylocytozyny. (Rys. 4).

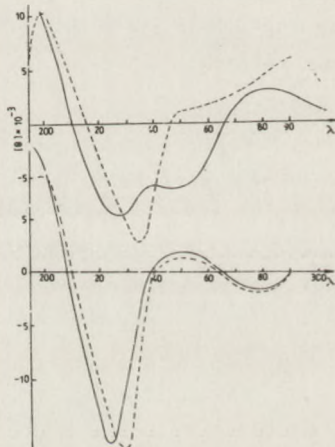
Rys. 4. Widma CD anomeru α i β 6-metylo-2'-deoksytydyny i 6-metylocytozyny

Miles [5] znalazł, że nukleozydy uracylowe i cytozynowe, posiadające jednakową część cukrową oraz jednakowe podstawniki w położeniach 5 i 6, dają tego samego znaku B_{2u} efekt Cottona. Zazwyczaj dużo mniejszy B_{1u} efekt Cottona nie wydaje się posiadać regularnych właściwości dla tego typu pochodnych. E_{1ua} efekt Cottona w przypadku pochodnych uracylowych i cytozynowych jest zazwyczaj ujemny, a E_{1ub} dodatni.

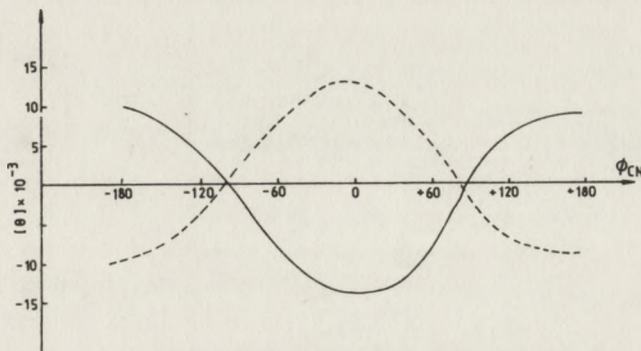
Porównanie krzywych CD 6-metylourydyny z 6-metylocytydyny oraz 5-bromo-2'-deoksyurydyny z 5-bromo-2'-deokscytydyny wskazuje, że dla pochodnych 6-metylowych wszystkie cztery efekty Cottona posiadają ten sam znak i są prawie tej samej wielkości. W przypadku pochodnych bromowych B_{2u} , E_{1ua} i E_{1ub} efekty Cottona są podobne, a B_{1u} przeciwne (rys. 5).

Krystaliczne dane strukturalne dla pochodnych urydyny i cytydyny (5-bromo-2'-deoksy-) wskazują, że oba związki występują w podobnych konformacjach (kąty torsyjne wynoszą odpowiednio -43° i -62°). Wydaje się możliwe, że podobne nukleozydy uracylowe i cytozynowe występują w podobnych konformacjach również w roztworach.

Zmiany w widmach CD powstałe w wyniku oddziaływań konformacyjnych indukowanych podstawnikami jak i zmianami rozpuszczalników sugerują, że eliptyczność molowa B_{2u} efektu Cottona jest funkcją kąta torsyjnego. Przedstawiono to na diagramie zależności eliptyczności molowej B_{2u} efektu Cottona od wartości kąta torsyjnego dla α i β anomerów pochodnych urydyny i cytydyny.



Rys. 5. Widma CD - u góry: 5-bromo-2'-deokscytydyny i 5-bromo-cytydyny, u dołu: 6-metylourydyny i 6-metylocytydyny

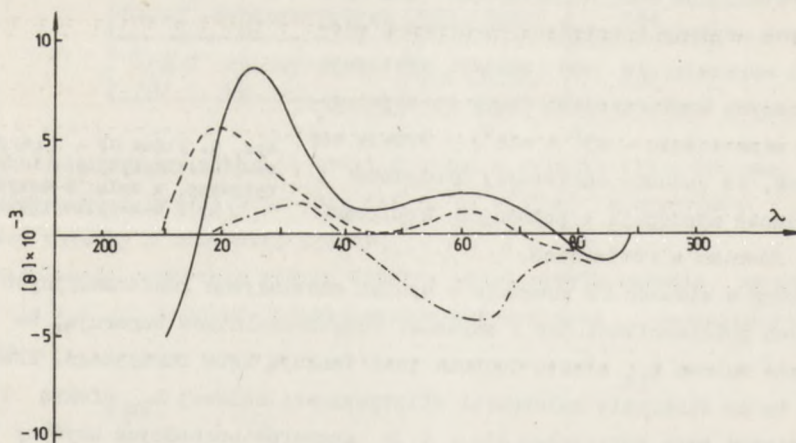


Rys. 6. Zmiany eliptyczności molowej w zależności od kąta torsyjnego

Przy zmianie kąta torsyjnego oczekuje się powolnych i regularnych zmian eliptyczności molowej (rys. 6).

Zastosowanie tego diagramu może być również pomocne przy ustalaniu konfiguracji na węglu anomerycznym dla nukleozydów uracylowych i cytozynowych.

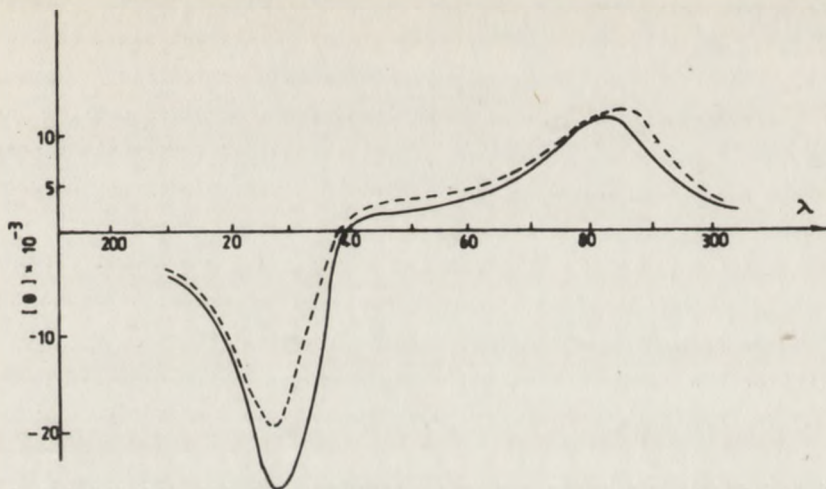
Przy zastosowaniu techniki CD badano w grupie nukleozydów purynowych wpływ podstawnika w chromoforze zasadowym na konformację wokół wiązania zasada - cukier oraz wpływ grupy fosforanowej na przebieg krzywych dichroizmu kołowego (Ikehara [6]). Stwierdzono, że nukleozydy purynowe posiadające objętościowe podstawniki w położeniu 8 występują w konformacji syn. 8-bromo i 8-fluoroadenozyna dają zupełnie podobne krzywe CD (rys. 7). Porównując przebieg krzywych CD tych związków z krzywą adenozyny stwierdzono, że efekt Cottona przy 260 nm jest odwrócony. Sugeruje to zmianę konformacji z anti dla adenozyny na syn dla pochodnych halogenowych. Podobnych danych dostarcza analiza krzywych CD dla 8-(2'-hydroksypropylo-2) adenozyny oraz innych 8 podstawionych pochodnych nukleozydów purynowych.



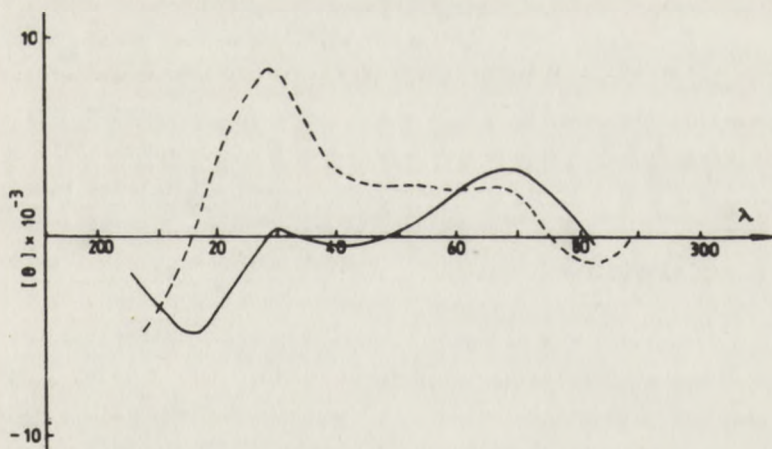
Rys. 7. Widma CD adenozyny, 8-bromoadenozyny i 8-fluoroadenozyny w wodzie przy pH=7

Po wprowadzeniu do nukleozydów purynowych w położeniu 5' funkcji fosforanowej, zauważono, że w przypadku nukleozydów występujących w konformacji anti, profil krzywej CD w głównym rejonie absorpcyjnym nie ulega zmianie (rys. 8).

W przypadku nukleozydów występujących w konformacji syn grupa fosforanowa wywiera duży wpływ na efekt Cottona w szerokim zakresie długości falowych, co sugeruje, że dla tego typu nukleozydów, wprowadzenie 5' funkcji fosforanowej, powoduje ważne zmiany w sile rotacji w tym zakresie (rys. 9).



Rys. 8. Widma CD 5'-monofosforanu-8,2'-S-cykloadenozyny i 8, 2'-S-cykloadenozyny w wodzie przy pH = 7



Rys. 9. Widma CD 8-bromoadenozyny i 5'-monofosforanu - 8-bromoadenozyny w wodzie przy pH = 7

Dla obu konformerów zaznacza się wyraźny wpływ funkcji fosforanowej na przebieg krzywych CD w rejonie 200 - 220 nm.

Badając wpływ rozpuszczalnika na charakter krzywych dichroizmu kołowego stwierdzono, że jedno lub więcej przejść elektronowych obserwowanych w widmach dichroizmu kołowego może być wynikiem przejścia $n \rightarrow \pi^*$. W urydynie i jej pochodnych obie grupy hydroksylowe w środowisku obojętnym i

jej pochodnych obie grupy hydroksylowe w środowisku obojętnym i zasadowym występują w formie ketonowej. Z drugiej strony znany jest fakt, że atomy tlenu funkcji ketonowych stosunkowo łatwo powodują wzbronione przejście $n \rightarrow \pi^*$, dopuszczając wzbudzenie elektronów niewiązących na orbital antywiązący "n". Wydaje się, że podobne przejście powinno występować w pochodnych zasad kwasów nukleinowych, posiadających potencjalne grupy ketonowe.

Rozpuszczalnik wpływa na widma elektronowe między innymi przez wytwarzanie wiązań wodorowych z elektronami niewiązącymi chromoforu. Powstające wiązanie wodorowe obniżając energię orbitalu "n" powoduje hipsochromowe przesunięcie pasma R powstającego w wyniku przejścia $n \rightarrow \pi^*$. Np. dla acetonu pasmo R w n-heksanie znajduje się przy 279 nm, a w wodzie przesuwa się do 264,5 nm (około 2100 cm^{-1}). Podobne przesunięcie dla chinonu wynosi 1600 cm^{-1} .

Tworzenie wiązania wodorowego może powodować przesunięcie pasma $\pi \rightarrow \pi^*$ w obu kierunkach. Jeżeli w wyniku przejścia elektronowego wzrastają protono-akceptorowe właściwości cząsteczki rozpuszczonej, co przy tworzeniu wiązania wodorowego obniża energię stanu wzbudzonego w większym stopniu niż stanu podstawowego, dla przejścia $\pi \rightarrow \pi^*$ obserwujemy efekt batochromowy. Natomiast, gdy gęstość elektronowa na protono-akceptorowej grupie funkcyjnej w wyniku przejścia do stanu wzbudzonego ulega zmniejszeniu, obserwujemy hipsochromowe przesunięcie pasma $\pi \rightarrow \pi^*$. W związku z tym, gdy oba przejścia $n \rightarrow \pi^*$ i $\pi \rightarrow \pi^*$ są przesunięte w tym samym kierunku, rozróżnienie typu przejść przez badanie efektu rozpuszczalników jest utrudnione.

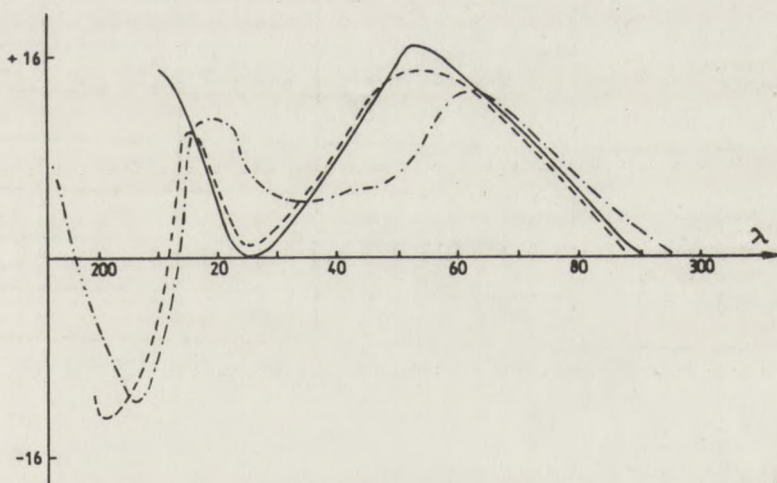
Wolne pary elektronowe pochodnych urydyny zdolne są do wytwarzania silnych wiązań wodorowych z takimi rozpuszczalnikami, jak woda czy inne kwasy typu Brønsteda. Zastosowanie takich rozpuszczalników powoduje znaczne zmiany w widmach. Natomiast niepolarny dioksan czy polarny acetonitryl, które nie posiadają atomów wodoru zdolnych do wytwarzania wiązań wodorowych, posiadają nieznaczny wpływ tak na widma UV jak i CD.

Potwierdzenie występowania przejścia $n \rightarrow \pi^*$ w zasadach kwasów nukleinowych znaleziono między innymi dla 1[2, 3-O-izopropylideno-5-deoksy-(β -D-erythro-pent-4-eno) furanozylo]uracylu (tabela II, rys. 10).

Z analizy krzywych CD wynika, że wszystkie pasma w obecności rozpuszczalników tworzących wiązania wodorowe (metanol, woda) posiadają przesunięcie batochromowe. W rejonie minimum (pomiędzy pasmami B_{2u} i E_{1ua}) 220-235 nm w krzywych CD występuje różnica pomiędzy widmami rodzimymi (w rozpuszczalnikach nie posiadających możliwości tworzenia wiązania wodorowego) a indukowanymi przez rozpuszczalniki. Zaznacza się ona w wartości eliptryczności molowej, która dla wody wynosi +5000 a dla cykloheksanu 0. Fakt

1- [2,3-0-Izopropylideno-5-deoksy (β -D-erytro-pent-4-eno) furanozyl] uracyl

rozpuszczalnik	B _{2u}	B _{1u}	E _{1ua}	E _{1ub}
woda	258 (13.000)	—	214 (10.000)	201 - 9500
acetonitryl	254 13.000	—	211 11.000	196 -10.000
dioksan	255 16.000	—		
DCE	254 15.800	—		
cykloheksan	255 16.000	—	209 15.000	



Rys. 10 Widma CD 1 [2, 3-0-izopropylideno-5-deoksy-(β -D-erytro-pent-4-eno) furanozyl] uracylu w cykloheksanie, acetonitrylu i wodzie

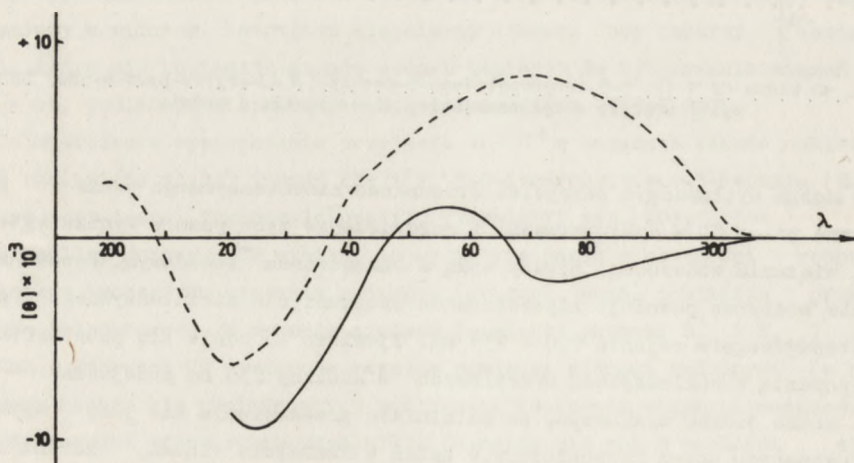
ten można wytłumaczyć pokryciem stosunkowo nieintensywnego pasma przez główne pasmo CD w cykloheksanie i rozdzielenie tych pasm w wyniku wytworzenia wiązania wodorowego między wodą a chromoforem zasadowym. Powstałe wiązanie wodorowe powoduje hipsochromowe przesunięcie nieintensywnego pasma występującego w rejonie 220 - 235 nm. Zjawisko to zdaje się potwierdzać występowanie w nukleozydach uracylowych w okolicy 235 nm przejścia $n \rightarrow \pi^*$. Nie można jednak wykluczyć, że zaistniałe przesunięcie nie jest wynikiem indukowanych przez rozpuszczalnik zmian w kształcie wiązań, intensywnościach i energiach odpowiednich drgań wibracyjnych.

Podobnych danych dostarcza analiza krzywych CD urydyny, 6-metylo-3-(β -ribofuranozylo) uracylu i 1(5-deoksy-D-erytro-pent-4-eno-furanozylo) uracylu (tabela III).

Tabela III

	R*	B _{2u}	B _{1u}	E _{1ua}	E _{1ub}
Urydyna	4 M HCl	266	238	215	-
	W	267	240	215	196
	D	272	244	220	-
	AN	272	243	220	200
6-metylo-3(β -D-ribofuranozylo) uracyl	W	268	242	214	195
	AN	270	243	215	195
	DCE	272	246	-	-
	D	273	245	-	-
1-(5-deoksy- β -D-erytro-pent-4-eno-furanozylo) uracyl	W	266	240	213	193
	AN	269	242	212	192
	D	269	242	-	-
	DCE	269	243	-	-

* W - woda, D - dioksan, AN - acetonitryl, DCE - dwuchloroetylen.



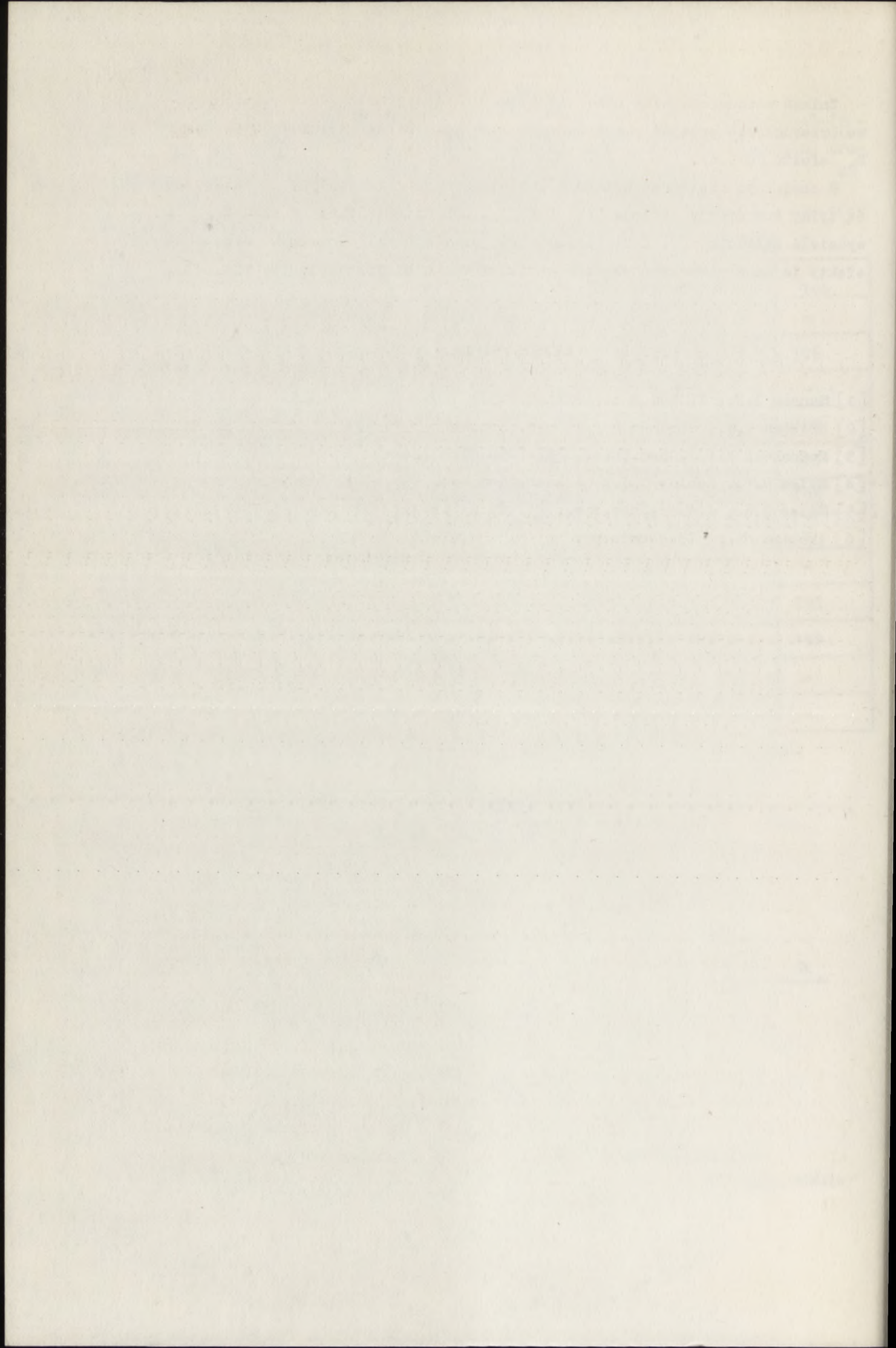
Rys. 11. Widma CD 2', 3'-O-izopropylidenocytydyny w dwuchloroetanie i wodzie

Zmiana rozpuszczalnika może nie tylko powodować bato - czy hipsochromowe przesunięcie przejść elektronowych, ale może także zmieniać znak pasma B_{2u} efektu Cottona.

W obojętnym roztworze wodnym 2', 3'-izopropylidenocytydyny widoczne są tylko dwa efekty Cottona (B_{2u} i E_{1ua}). DCE zmienia znak efektu B_{2u} i wydziela składnik B_{1u} , który pojawia się przy 253 nm. Oczekuje się, że efekty te są w pierwszym rzędzie wynikiem zmian konformacyjnych (rys. 11).

LITERATURA

- [1] Manson G.F.; J.Chem.Soc., 2071, (1954).
- [2] Krishna V.G., Goodman L.; J.Amer.Chem.Soc., (1961).
- [3] McConnell H.; J.Chem.Phys., 20, 700, (1952).
- [4] Miles D.W., Robins M.J.; J.Amer.Chem.Soc., 91, 824, (1969).
- [5] Miles D.W.; J.Amer.Chem.Soc., 91, 831, (1969).
- [6] Ikehara M.; Biochemistry, (1972).



Tomasz Haertlé

BADANIE KONFORMACJI POCHODNYCH GUANOZYNY I TWORZONYCH PRZEZ NIE ŻELÓW PRZY POMOCY DICHROIZMU KOŁOWEGO

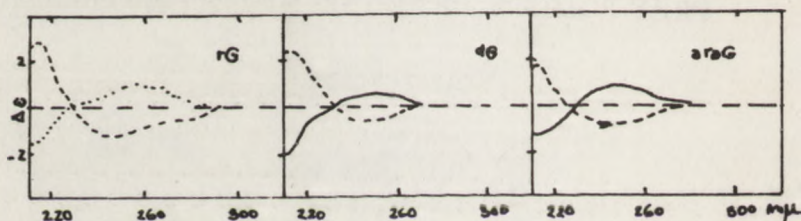
STRESZCZENIE

Dyskutuje się wyjątkowe właściwości guanozyny i jej pochodnych, takie jak: działanie destakujące, dużą swobodę rotacji dookoła wiązania glikozydowego, różną od innych nukleozydów orientację momentu dipolowego oraz uzależnioną od pH i podstawników przy N₇ inwersję efektu Cottona. Omawia się warunki powstawania żelów guanozyny. Postulowany jest następujący mechanizm agregacji: 1) powstawanie planarnych tetramerów, 2) tworzenie oktameru, 3) polimeryzację oktamerów. Mimo niestosowania się związków guanozyny do teorii ekscytonowej Tinoco, żele mogą służyć jako przykład niezdegenerowanego przypadku modelu ekscytonowego - zachodzi zatem proporcjonalność między kątem skręcenia względem siebie tetramerów a intensywnością siły rotacyjnej pasma ekscytonowego. Stwierdzenie to poparte jest analizą widm dichroicznych i odpowiadających im rentgenogramów 18 pochodnych guanozyny.

Guanozyna i jej pochodne w sposób zasadniczy różnią się od pozostałych nukleozydów kwasów nukleinowych. Większość metod syntetycznych działających dobrze w wypadku Ado, Cyt, Urd jest zupełnie bezskuteczna w wypadku Guo. Podobnie reakcje enzymatyczne nie zachodzą lub mają inny przebieg, gdy substratem jest Guo. Typowym przykładem jest polimeryzacja GDP przez polinukleotydylo fosforylaze, która nie zachodzi w warunkach typowych dla syntezy polinukleotydydów innych od poli.G. Nastąpi ona dopiero w temperaturze wyższej od 45°C [22]. Inne są też od całej reszty cząsteczki własności fizykochemiczne obszarów kwasów nukleinowych zawierających duże ilości Guo. Powoduje to preferencyjne przyłączanie sterydów [8a] oraz wbudowywanie w tych miejscach związków interkalujących [14a]. W oligonukleotydydach Guo wykazuje działanie destakujące [1, 3, 15] i często wyklucza przewidzenie własności optycznych cząsteczki [20, 23]. Posiada ona dużą swobodę

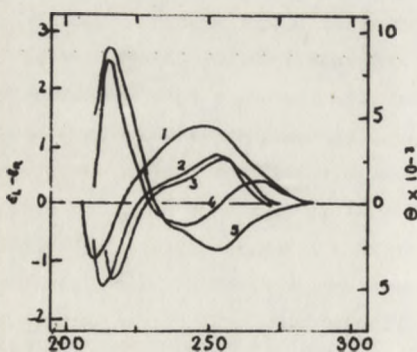
rotacji dookoła wiązania glikozydowego [14]. Badania teoretyczne potwierdzone danymi eksperymentalnymi wykazały zupełnie różną orientację momentu dipolowego [18], powodowaną przez zasadnicze różnice w strukturze elektro nowej guaniny w porównaniu z innymi zasadami. Dość wcześnie zaobserwowano, że Guo, której pierwszy efekt Cottona jest ujemny w pH obojętnym, w pH kwaśnym zmienia się na dodatni. Taka inwersja efektu Cottona była obserwowana tylko w Guo i jej pochodnych.

Widma CD pochodnych Guo w pH 7 i pH 1,5 oraz 0,5 przedstawiają się prawie jak obrazy lustrzane (rys. 1, 2).



Rys. 1. Widma CD rG-guanozyna, dG-dezoksyguanozyna, araG-arabinozyd guaniny. — pH 7, / --- pH 1,5, pH 0,5

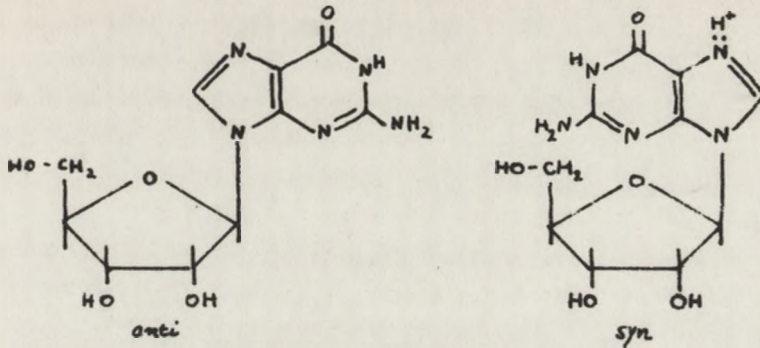
Przez analogię z licznymi pochodnymi Guo z podstawnikami w pozycji 8, które znajdują się, ze względów przestrzennych, w konformacji syn [21], a u których nie obserwuje się zależnej od pH inwersji efektu Cottona [11], wywnioskowano, że Guo zmienia konformację zasada-cukier z preferencyjnej anti w pH obojętnym o kącie $\phi = -30^\circ$ na konformację syn w niższych pH o kącie $\phi_{CN} = 150^\circ$ (rys. 2, 3).



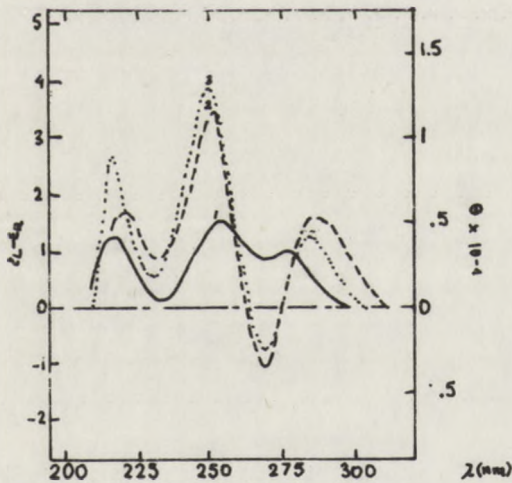
Rys. 2. Widma CD nukleozydów: 1-formicyna B, 2-guanozyna pH1, 3-7-metylguanozyna, 4-8-bromoguanozyna, 5-guanozyna pH 7

Odwroćenie konformacji może być powodowane przez protonizację N_7 (rys. 3). Fakt posiadania przez 7 metyló Guo dodatniego efektu Cottona w pH 5, a ujemnego w pH 9 wskazywałby, że protonizacja N_7 nie jest wyłączną przyczyną zmiany konformacji, która zależy w tym wypadku od zmiany rozmieszczenia ładunków.

Ekscytonowa teoria Tinoco [19] przepowiadająca dobrze własności optyczne oligonukleotydów, zawierających Ado, Urd, Cyt, nie



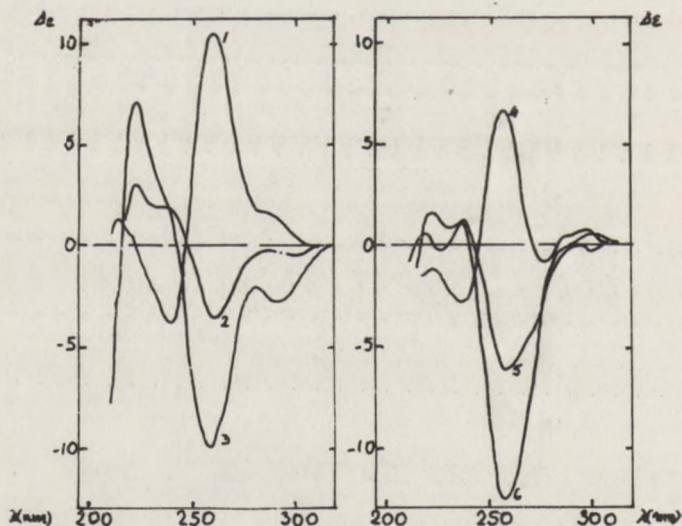
Rys. 3. Guanozyna w konformacji anti i syn



Rys. 4. Widma CD GpU w różnych rozpuszczalnikach. 1-woda, pH 7, +20°C, 2-woda pH 2, +20°C, 3 -5,5M LiCl, -20°C

daje rezultatów zgodnych z rzeczywistością w wypadku stosowania jej dla oligonukleotydów zawierających Guo. Na rysunku 4 pokazano widma CD dwunukleotydu GpU, które w pH obojętnym i temperaturze 20° wykazuje trzy dodatnie pasma odpowiadające Urd i protonizowanej Guo. Obserwuje się znaczny wzrost pasma Guo i malenie oraz przesunięcie pasma Urd. Ponieważ nie ma żadnych przesłanek świadczących o oddziaływaniach ekscytonowych - można tu dla interpretacji widma użyć zasadę stosowaną dla monomerów, że znak i wielkość efektu Cottona zależy od kąta CN [9, 16]. Taka interpretacja mówiłaby, że Guo jest niemal w konformacji syn, a Urd w pozycji o kącie $\phi_{CN}=+90^\circ$.

Świadczyłyby to o istnieniu w tych warunkach niestakingowej struktury zasadami umocowanymi prawie prostopadle do siebie i posiadającymi tendencje do tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy grupą aminową Guo a $O_{4'}Urd$. 4' 4' jonizacji ta niestakingowa forma przechodzi w strukturę stakingową z G w konformacji prawdopodobnie syn. Widma w pH kwaśnym i niskiej temperaturze przypominają się znacznie. Jest zaskakujące, że podobne są do siebie widma mierzone w tak różnych warunkach pH 7 + 20°C i pH 1 - 20°C. Silnie zależna od temperatury protonizacja GpU nie wystarcza do wytłumaczenia tego zjawiska. Jeżeli niemniej struktura stakingowa jest stabilna wywołana w niskim pH lub niskiej temperaturze, to mogłoby wskazywać, że forma może być konieczna dla jej stabilizacji z lub bez protonizacji N_7 ..



Rys. 5. Widma CD żelów i polinukleotydów. 1-poli G, 2-żel Guo, 3-żel Guo-3'-3'-P, 4-poli dG, 5-żel dGuo-5'-P, 6-żel dGuo

Tworzenie żelów Guo było po raz pierwszy opisane w 1905 roku, a niemniej zjawisko to do tego czasu nie jest dobrze poznane. Przez badania wielu pochodnych Guo stwierdzono, że do utworzenia żelu konieczne są: N_1 , O_6 , N_7 [4, 6, 13, 13a]. $5'OH$ wchodzi w wiązanie wodorowe z z grup NH_2 mogąc być donorem jak i akceptorem. W wypadku Guo-X'-P musi być zorientowany jeden z ujemnych ładunków fosforanu [12]. Rysunek 5 porównuje widma CD: poliG, poli dG oraz żelów: Guo, Guo 3P, dGuo, dGuo 5P. W widma

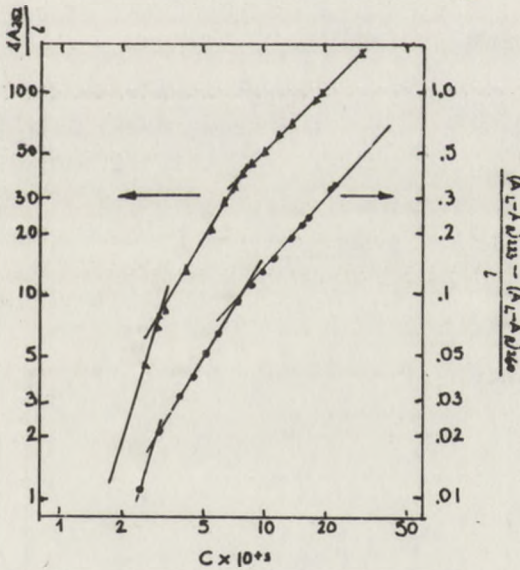
limerów i żelów wykazują godne uwagi podobieństwa. Wierzchołki i punkty przecięcia są przy tej samej długości fali mając różne efekty Cottona, co niekoniecznie jest powodowane zmianą konformacji, lecz może być związane ze zmianą znaku kąta CN.

Badane żele tworzą układy tetrameryczne [13, 4, 5], co można dowieść badając zależność hipochromizmu CD od stężenia nukleozydu i następującej agregacji, określoną wzorem: $\lg E_t = p \lg C_t + \text{const}$ [24],

gdzie - E_t - sygnał mierzony przy stężeniu C_t

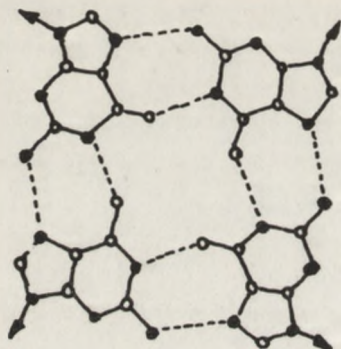
C_t - stężenie monomeru

p - stopień polimeryzacji = nachylenie odcinków na wykresie.



Rys. 6. Zależność hipochromii od stężenia monomeru ▲▲ A_{252} , .. CD - Guo - 3' - P

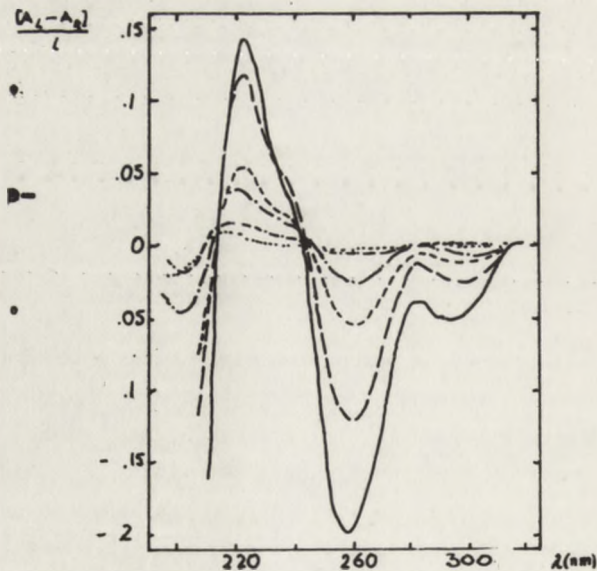
Rys. 6 pokazuje zależność hipochromizmu względem całkowitego stężenia Guo $\overline{3P}$ wykazując istnienie 3 różnych stopni agregacji o nachyleniach = 4,2,1. Nachylenie = 4 sugeruje tworzenie się tetramerów. Fakt obserwacji niskiego hipochromizmu sugeruje planarne ułożenie tetramerów [5]. Hipochromizm ułożenia planarnego i jego niska wartość była przewidziana przez Nesbeta [17] dla parowania zasad komplementarnych. Nachylenie = 2 wskazuje na dimeryzację istniejących tetramerów i formowanie tym samym oktamerów. Zmiana nachylenia i jego wartość = 1 wskazuje na nakładanie się oktamerów i tworzenie struktur fibrylarnych o interakcjach stackingowych. Etap ten charakteryzuje



Rys. 7. Tetrameryczne ułożenie guaniny w żelu Guo - 3' - P wg [13a]

się zmianami hipochromizmu zgodnymi z prawem Lamberta i Beera. Widmo CD Guo3P wskazuje na wysoce asymetryczną strukturę żelu objawiającą się dużym wzrostem sygnału ze stężeniem. Pojawiają się dwa ujemne wierzchołki przy 300 i 260 nm oraz jeden dodatni przy 223 nm. Punkty przecięcia nie są dobrze zdefiniowane przy dużych stężeniach. Ich przesunięcie może być powodowane przez orientację żelu w stężonych roztworach. Mechanizm tworzenia żelów pochodnych Guo - Guo3P, 8BrGuo i innych może być przedstawiony wg schematu: monomer \rightleftharpoons tetramer \rightleftharpoons \rightleftharpoons oktamer \rightleftharpoons polimer.

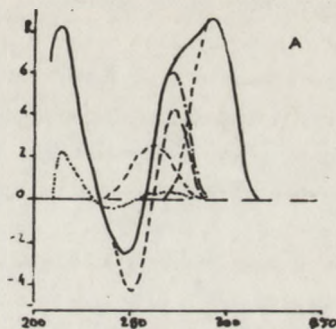
8BrGuo, która ze względów sterycznych posiada konfigurację syn, a co się z tym wiąże dodatni efekt Cottona, tworzy również żel o strukturze tetramerycznej. Analiza widma dichroizmu kołowego (rysunek 9) wskazuje, że aktywność optyczna głównego pasma absorpcji może być rozłożona na ostre pasma



Rys. 8. Widma CD Guo-3'-P- różne stężenia: — 0,0198 M, - - 0,015 M -- 0,0082 M, — . — 0,0056 M, -.- 0,0029 M, 0,0025 M

ekscytonowe charakterystyczne dla oddziaływań stakingowych i może być powiązana z ujemnym pasmem absorpcji widma roztworu [18a], dalsze pasmo przy 295 nm może być powodowane przez przejście $n \rightarrow \pi^*$ lub też zwiększone i przesunięte dodatnie pasmo dichroiczne widma roztworu. Jak wspomniano poprzednio*, żadne polimery czy oligomery Guo nie stosują się do teorii ekscytonowej Tinoco. Niemniej żele Guo mogą służyć jako dobry przykład nie zdegenerowanego przypadku modelu ekscytonowego i tą drogą będą się zachowywały podobnie do homodinuukleotydów [7].

Przesunięcia kątowe między tetramerami ułożonymi planarnie nad sobą były bardzo różne zależnie od żelu. Wydaje się, że siły stakingu są prawdopodobnie słabsze od wiązań wodorowych między poziomami tetramerów. Różnice w zachodzeniu na siebie zasad powinny powodować różnice w aktywności optycznej żelów wykazujących silne pasma dichroizmu, zakładając oczywiście, że struktura włóknista utrzyma się w roztworze. Ponieważ w wypadku niezdegenerowanym siła rotacyjna jest proporcjonalna do sinusa kąta pomiędzy odpowiadającymi momentami przejścia - można by znaleźć zależność między intensywnością pasm CD a kątem skręcenia poziomów tetramerów względem siebie, która powinna spełniać powyższą proporcjonalność. Ewentualne interakcje zdegenerowane między pasmami B1U i B2U będą znaczące tylko dla pewnych kątów obrotu pomiędzy poziomami tetramerów. Widma 18 pochodnych badanych są pokazane na rys. 10. Wszystkie były badane w warunkach "polimeryzacji". Dwa z najprostszych związków Guo i Guo3P dają bardzo podobne widma CD. Badania struktury włóknistej Guo dyfrakcją promieniowania X wykazały, że tworzy ona helikalny stos tetramerów o przesunięciu jednostkowym 45° . Podobne badania Guo3P również wykazały istnienie takiego samego przesunięcia jednostkowego. W takim układzie wiązania glikozydowe jednego z tetramerów byłyby ok. $CN=+30^\circ$, drugiego $\phi CN=-45^\circ$, obydwa w konfiguracji anti. Ponieważ widma CD tych układów tetramerycznych są zależne głównie od nakładania się chromoforów - zasad, można użyć wyniki CD w powiązaniu z wynikami dyfrakcji promieni X, w celu uzyskania większej ilości informacji strukturalnych. W konsekwencji można

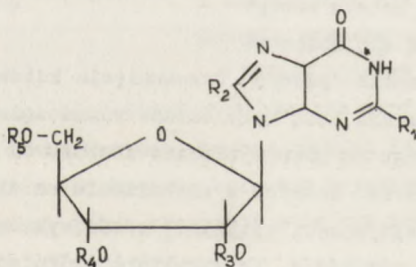


Rys. 9. Widmo CD 8BrGuo -- pasmo ekscytonowe, -.- n=0 pasmo, — n=0-żel. ... 60°

* Poniższy fragment stanowi część pracy J.F. Chantot, T. Haertlé, W. Guschlbauer, wykonanej w 1972 r. w C.E.A. de Saclay w grupie Dr Wilhelma Guschlbauera.

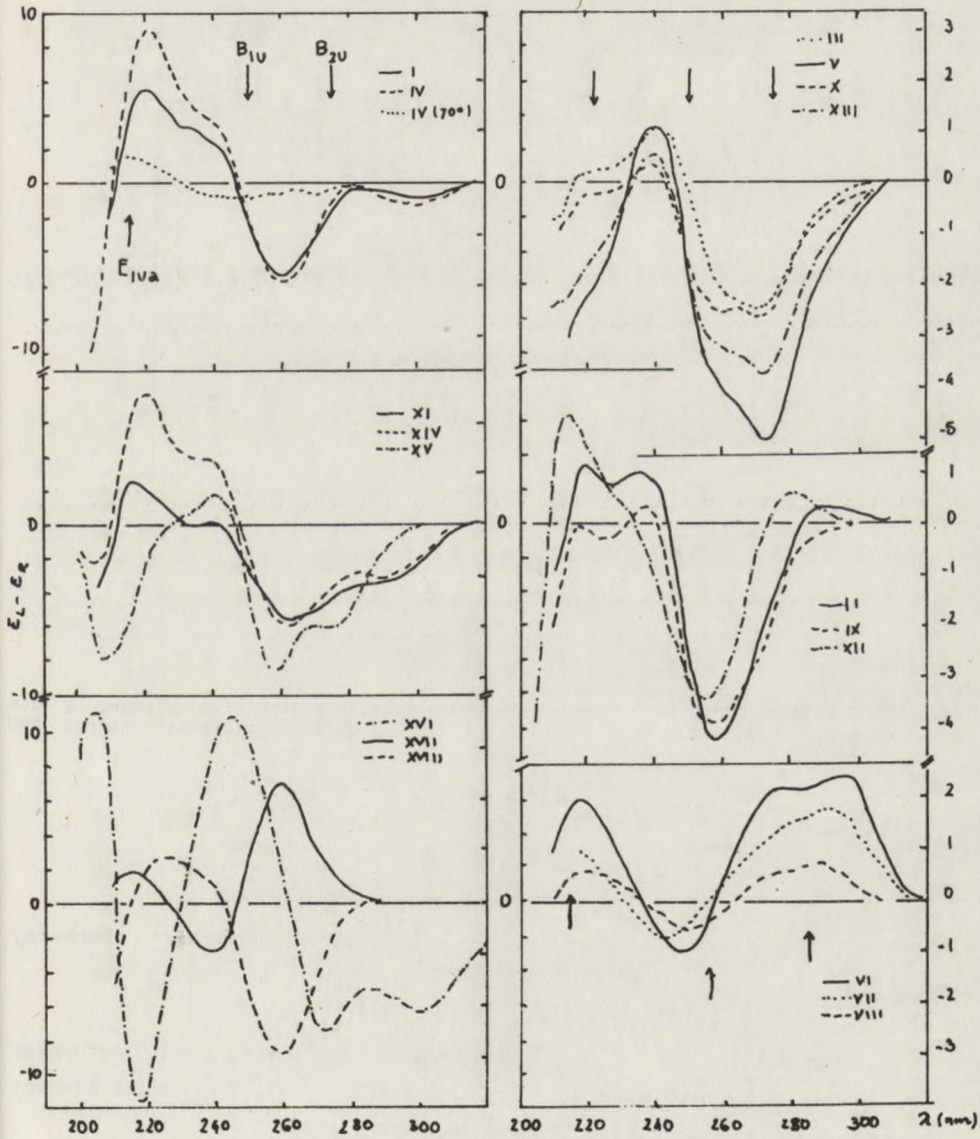
by z widma CD bezpośrednio odczytać kąt przesunięcia między tetramerami. Oglądając rys.10 zauważa się, że pasma ekscytonowe są umieszczone głównie w paśmie B1U. Pasma B2U, często niewidoczne w monomerze, wykazuje olbrzymi wzrost intensywności, np. V, X, XIII, nie wykazując jednak właściwości pasma ekscytonowego. Wykreślając zależność amplitudy pasma ekscytonowego wobec sin kąta otrzymanego z badań prom. X otrzymuje się dość dobrą korelację - rys. 11 (otwarte symbole). Dalsza lokalizacja otrzymanych widm CD pochodnych Guo na wykresie (pełne symbole) jest w większości wypadków pomyślna.

Dużym dylematem jest absolutna nieobecność aktywności optycznej w paśmie B2U w niektórych wypadkach (I, IV, IX, XII, XVII, XVIII), gdy jest ona bardzo duża w innych związkach.

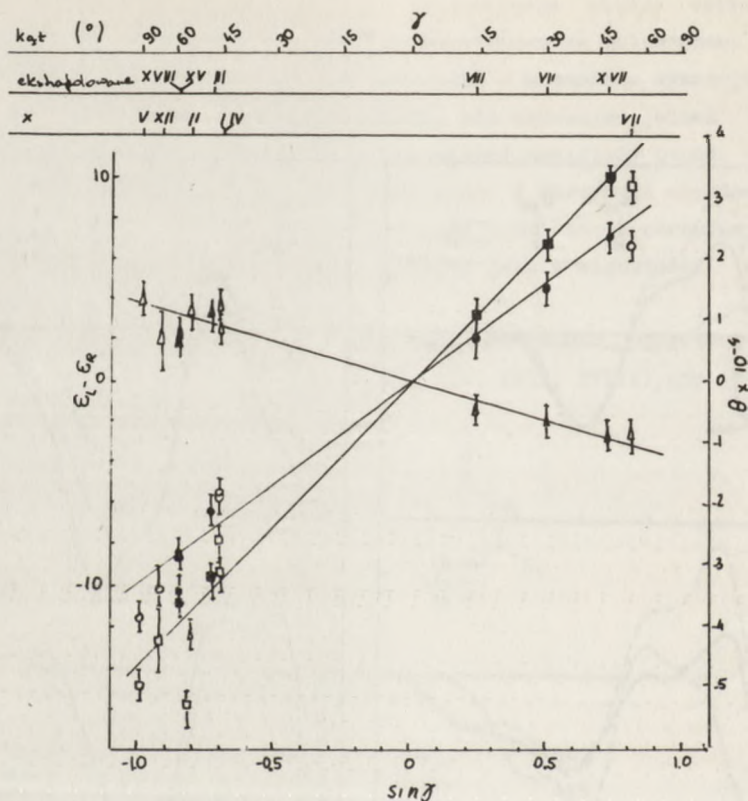


Badane związki

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	kąt
I	NH ₂	H	OH	OH	OH	-45
II	NH ₂	H	OH	OH	OH	-54
III	NH ₂	H	PO ₄	OH	OH	-48
IV	NH ₂	H	OH	PO ₄	OH	-45
V	NH ₂	H	OH	OH	PO ₄	-96
VI	NH ₂	Br	OH	OH	OH	+54
VII	NH ₂	Br	H	OH	OH	+30
VIII	NH ₂	H	OH	-fosforan-		+20
IX	NH ₂	H	H	OH	PO ₄	
X	NH ₂	H	OH	OH	SO ₄	
XI	NH ₂	H	-izopropyl-		OH	
XII	NH ₂	H	acetyl	acetyl	OH	-67
XIII	NH ₂	H	-etoksymetyl-		OPO ₃	
XIV	NH ₂	H	-fosfit-		OH	
XV	HNCH ₃	H	OH	OH	OH	-60
XVI	NH ₂	H	OH	OH	Cl	
XVII	NH ₂	H	OH	OPO ₃ -5'-Guo	OH	+47
XVIII	NH ₂	H	OH	OH	OPO ₃ -5'-Guo	-60



Rys. 10. Widma CD 18 pochodnych Guo

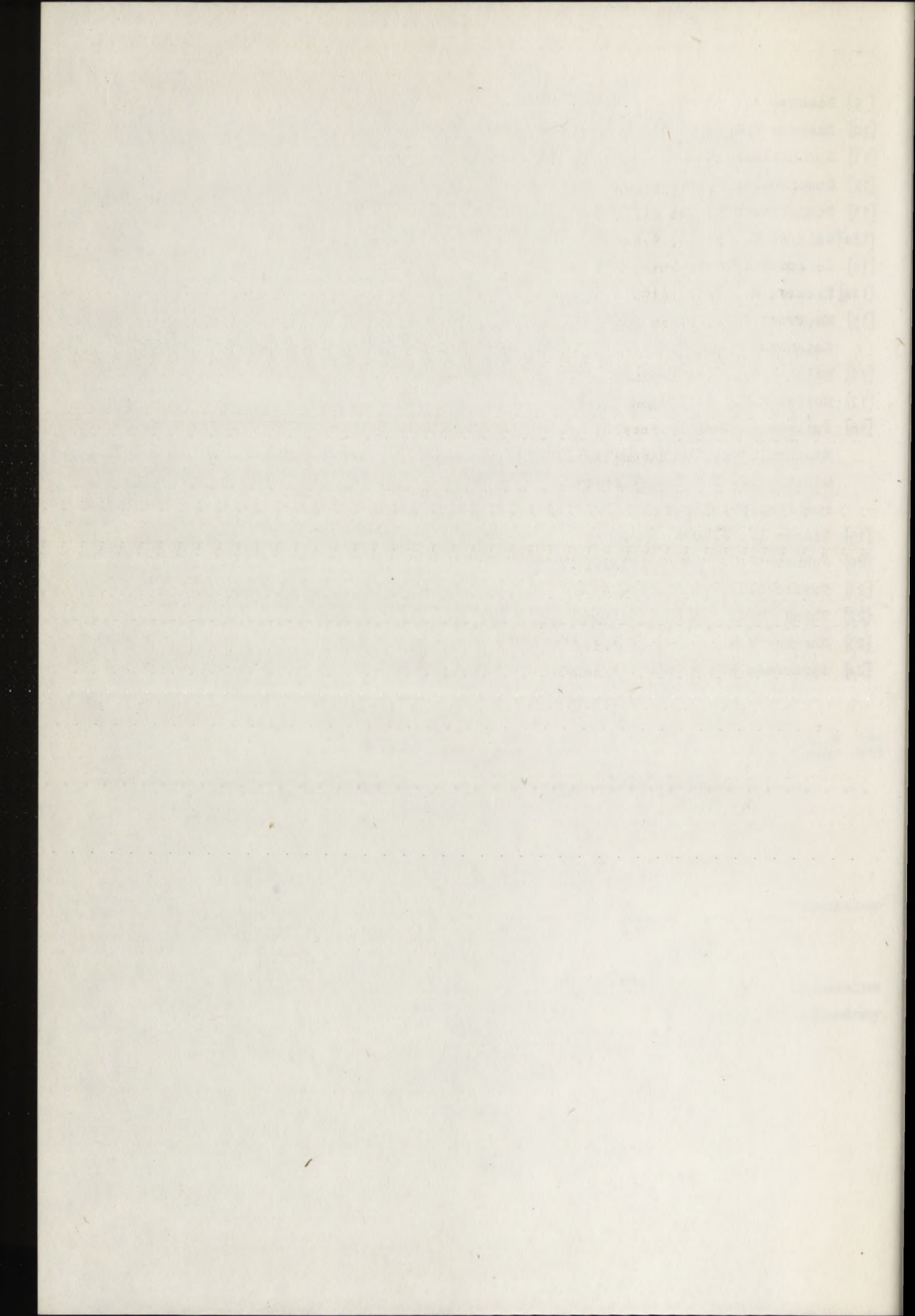


Rys. 11. Zależność CD żelów pochodnych Guo od sinusa kąta obrotu: O -ujemna, Δ dodatnia część, \square -amplituda (suma dodatniej i ujemnej części) pasma ekscytonowego B1U

LITERATURA

- [1] Brahms J. et al. J.M.B. 15 (1966) 467.
- [2] Brahms J. et al. J.M.B. 25 (1967) 481.
- [3] Busch A., Praca doktorska, Lawrence Radiation Laboratory Berkeley (Cal) 1965 Contract N^o W-7405-eng 48.
- [4] Chantot J.F. et al. Biochimie 53 (1971) 347.
- [5] Chantot J.F., "The Purines" - Theory and Experiment, The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry, IV, The Israel Academy of Science and Humanities, Jerusalem 11972, p205.
- [6] Chantot J.F. et al. FEBS lett. 4 (1969) 1173.
- [7] Chantot J.F. et al. Wyniki niepublik.
- [8] Chantot J.F. et al. A.B.B. 153 (1972) 347.
- [8a] Cohen P. et al. Biochem. 8 (1969) 3603.

- [9] Donohue J. et al. J.M.B. 2 (1960) 363.
- [10] Emerson T.R. et al. B.B.R.C. 6 (1967) 843.
- [11] Guschlbauer W. et al. FEBS lett. 1 (1968) 183.
- [12] Guschlbauer W., "Purines" - patrz p. 5 (1972) p. 297.
- [13] Guschlbauer W. et al. Studia Bioph. 24/25, (1970) 29.
- [13a] Gellert M. et al. P.N.A.Sci.US. 48 (1962) 2013.
- [14] Jordan F., Theor.Chim.Acta 9(1968) 242.
- [14a] Kersten W., BBA47 (1961) 610.
- [15] Maurizot J.C., praca dokt. Université d'Orleans-Tours 1970 Fac. des Sciences.
- [16] Miles D.W., "The Purines" 1972 Jerusalem patrz p. 5.
- [17] Nesbet R.K., Biopolimer Symp. 1 (1964) 129.
- [18] Pullman A. Quantum Aspects of Heterocyclic Compounds in Chemistry and Biochemistry, The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry, II, The Israel Academy of Sciences and Humanities 1970 Jerusalem, p9.
- [19] Tinoco I., J.Chem. Phys. 65 (1968) 91.
- [20] Johnson W.C. et al. Biopolimers 7 (1969) 727.
- [21] Tavale S.S. et al. J.M.B. 48 (1970)109.
- [22] Thang M.M. et al. BBA 108 (1965) 105.
- [23] Warshaw M.M. et al. J.M.B. 20 (1966) 29.
- [24] Zimmerman H. et al. Z.Electrochemie 60 (1966)56.



Bohdan Skalski, Adam Kraszewski

SPEKTROMETRIA MASOWA SKŁADNIKÓW KWASÓW NUKLEINOWYCH

STRESZCZENIE

Opracowanie zawiera omówienie stosowalności spektroskopii masowej do badań komponentów kwasów nukleinowych. Na przykładzie konkretnych związków podano ogólne schematy fragmentacji zasad nukleozydów i nukleotydów. Wskazano również plusy i minusy oraz zakres stosowalności tej metody jako metody badawczej dla ustalenia struktury komponentów kwasów nukleinowych.

WPROWADZENIE

Technika wykonania widma masowego wymaga, aby badany związek był odpowiednio lotny oraz trwały termicznie w warunkach pomiaru.

Spośród komponentów kwasów nukleinowych tylko wolne zasady oraz urydyna i adenozyne spełniają te warunki. Wolne zasady (puryny i pirymidyny) wykazują dostateczną prężność par [1, 2] w zakresie temperatur 130-200 °C. Nukleozydy wymagają wyższych temperatur [3], jednakże zbyt ostre warunki mogą powodować niepożądaną ich pirolizę w układzie wlotowym spektrometru.

Cytydyna, guanozyne oraz fosforany nukleozydów [3] są bardziej polarne i przez to niedostatecznie lotne dla spektrometrii masowej. Powstała więc konieczność chemicznej modyfikacji tych związków przez zastosowanie blokujących grup trójmetylosililowych, co powoduje radykalny wzrost ich lotności [3].

Należy podkreślić, że otrzymane widma masowe trójmetylosililowych (TMS) pochodnych zasad, nukleozydów i nukleotydów można dokładnie i z dużą dozą pewności zinterpretować. Pochodne te są trwałe w warunkach pomiaru, co jest dalszym pozytywnym czynnikiem przemawiającym za ich stosowaniem.

W przypadku analiz standardowych używa się mikrogramowych ilości próbek,

a niekiedy, jeżeli zachodzi konieczność, można uzyskać widmo ze znacznie mniejszych (np. rzędu 10^{-9} g) ilości substancji.

Większość widm masowych otrzymuje się przy zastosowaniu energii jonizacji 70 eV. Jednakże stosując niższe wartości energii (12–20 eV) uzyskuje się znaczne uproszczenie widm [1, 2] wskutek eliminacji wysokoenergetycznych procesów fragmentacji i przegrupowań, które są trudne do interpretacji i z reguły nie wnoszą istotnych informacji o strukturze badanego związku.

Sposoby fragmentacji jonów obserwowanych w widmach bada się za pomocą dokładnego pomiaru mas, pasm metastabilnych i specyficznego znakowania deuterem.

Dokładny pomiar mas (z dokładnością do czwartego miejsca dziesiętnego) na wysokorozdzielczych spektrometrach masowych [5, 6] umożliwia jednoznaczne zdefiniowanie składu elementarnego wybranych lub wszystkich fragmentów jonowych w widmie i jest zarówno pomocny w interpretacji widm, jak i badaniu zanieczyszczeń substancji.

Pomocną w interpretacji widm jest także obserwacja pasm spowodowanych jonowymi przejściami metastabilnymi. Przejścia te pociągają za sobą dekompozycję jonu o masie m_1 do innej formy jonowej o masie m_2 plus fragment neutralny w wolnym od pola rejonie spektrometru [6, 7] i rejestrowane są jako szerokie piki o niskiej intensywności przy m/e oznaczonym m^* , danym ze stosunku $m^* = (m_2)^2/m_1$.

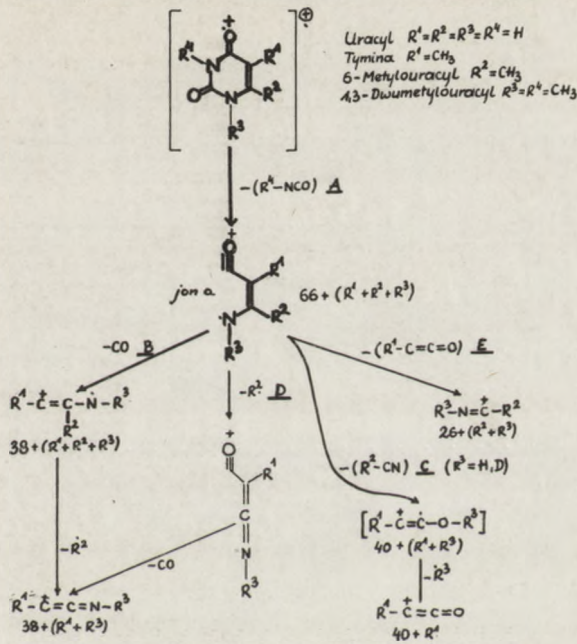
Obecność pasma metastabilnego (m^*) dla przejścia $m_1 \rightarrow m_2 + m$ (m - fragment neutralny) dowodzi jednoznacznie, że m_2 powstaje z m_1 , natomiast brak takiego pasma nie wyklucza danego przejścia, gdyż nie każdy proces fragmentacji jest metastabilny.

WIDMA MASOWE PIRYMIDYN

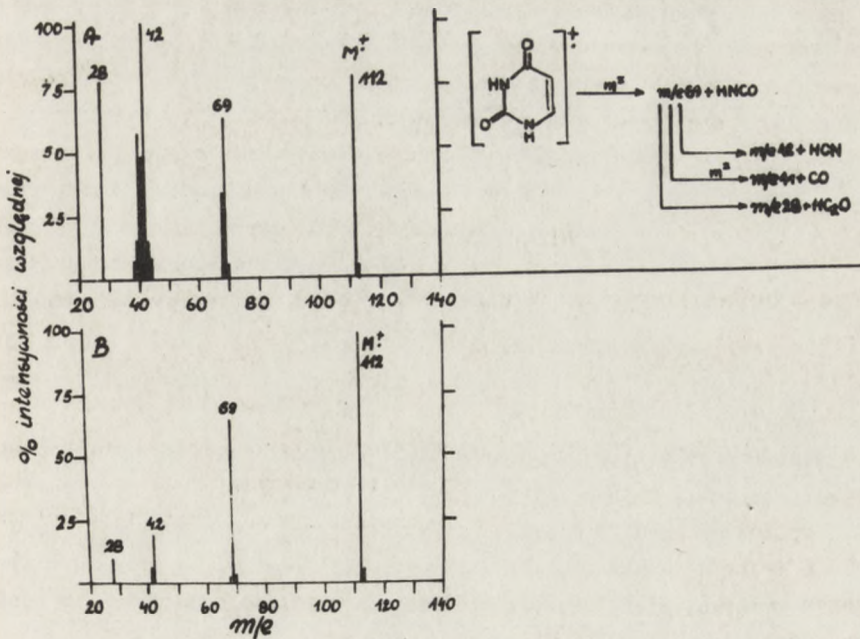
2,4 - Dwuketopirymidyny ulegają fragmentacji w sposób przedstawiony na rys. 1, pod warunkiem, że podstawniki alkilowe nie zawierają heteroatomów [2].

W widmie masowym uracylu [2] (rys. 2, A) obserwuje się wybitne pasmo jonu molekularnego przy m/e 112. Intensywny pik przy m/e 69 odpowiada eliminacji HNC(43 jednostki masy) z jonu molekularnego w sposób A. Ukazuje się on przy m/e 70 w widmie zdeuterowanego związku i jest także intensywny przy 20 eV (rys. 2, B).

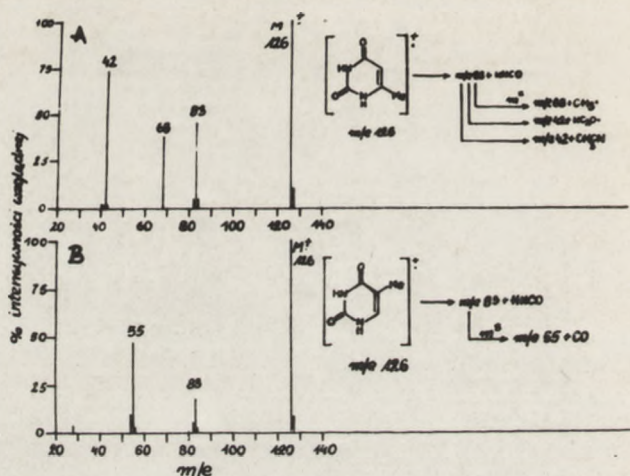
Dekarbonylacja jonu a w sposób B generuje jon o m/e 41, który tracąc dalej atom wodoru tworzy jon o m/e 40.



Rys. 1. Ogólny schemat fragmentacji 2,4--dwuketopirymidyn



Rys. 2. Widma masowe uracylu przy 70 eV (A) i 20 eV (B)



Rys. 3. Widma masowe 6-metyloruracylu (A) i tyminy (B) przy 20 eV

Eliminacja CO z jonu a może być poprzedzona utratą rodnika H^{*} (sposób D), co stanowi w zasadzie odwrócenie procesu B. Pasma główne przy m/e 42 powstaje na skutek eliminacji HCN (27 jednostek masy) z jonu a (sposób C), której towarzyszy przegrupowanie atomu wodoru z atomu azotu do pozostającego fragmentu ketenowego. Rozpad jonu a w sposób E, polegający na eliminacji fragmentu H-C=O (41 jednostek masy) generuje jon ukazujący się w widmie jako intensywne pasmo przy m/e 28.

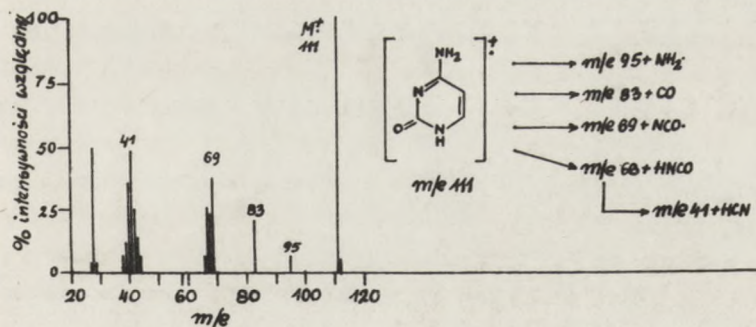
6-metyloruracyl [2] (rys. 2, A) również eliminuje HNC=O z jonu molekularnego w początkowym etapie fragmentacji, tworząc jon a przy m/e 83, który rozpada się dalej w sposób D, eliminując rodnik ^{*}CH₃ ($83 \xrightarrow{m^*} 68$), oraz w sposób C, eliminując CH₃CN ($83 \xrightarrow{m^*} 42$). Jon o m/e 42 powstaje również na skutek rozpadu jonu a w sposób E analogicznie, jak w przypadku uracylu. Stosunek intensywności jonów m/e 42 utworzonych na drodze C do intensywności jonów m/e 42 utworzonych w sposób E, wyznaczony za pomocą dokładnego pomiaru mas, wynosi 3:1.

Tymina (rys. 3, B) ulega fragmentacji [2] analogicznie jak uracyl z dominacją sposobu A i B. Nie obserwuje się tu eliminacji grupy metylowej z jonu a, której obecność w pozycji 5 faworyzuje dekarbonylację jonu a ($83 \rightarrow 55$) nad eliminacją HCN w sposób C ($83 \rightarrow 56$), w przeciwieństwie do 6-metyloruracylu, gdzie zachodzi intensywna eliminacja CH₃CN z jonu a ($83 \rightarrow 42$).

Widmo końcowego członu tej serii, 1,3-dwumetylouracylu [2], jest scharakteryzowane przez pik jonu molekularnego przy m/e 140 i intensywne pasma fragmentów jonowych przy m/e 83, 55 i 42, odpowiadające utracie CH_3NCO w sposób A i w dalszej kolejności eliminacji CO w sposób B i rodnika ketenowego (HC_2O) w sposób E.

Przedstawiony powyżej ogólny schemat fragmentacji 2,4-dwuketopirymidyn, wobec braku dowodu, że pierścień jonu molekularnego otwiera się przed eliminacją HNCO, jest zgodny z mechanizmem reakcji retro Dielsa - Aldera. Otwarcie pierścienia jonu molekularnego przed eliminacją HNCO faworyzowało by przede wszystkim eliminację CO z otwartego łańcucha, lecz pik przy (M-28) jest słabo wykrywalny w widmie 6-metylouracylu i 1,3-dwumetylouracylu i nie istnieje w uracylu i tyminie, gdzie obecność grupy metylowej przy C[5], jak można by się spodziewać, powinna ułatwiać eliminację przyległej grupy karbonylowej.

Widmo masowe cytozyny [2] wykonane przy 12 eV zawiera pasmo jonu molekularnego przy m/e 111 i trzy intensywne pasma fragmentów przy m/e 83, 69 i 68, odpowiadające odpowiednio eliminacji CO, NCO^* i HNCO z jonu molekularnego. W widmie wykonanym przy 70 eV (rys. 4), które jest bardziej skomplikowane, obserwuje się eliminację $^*\text{NH}_2$ z jonu molekularnego, nie występująca przy 12 eV.



Rys. 4. Widmo masowe cytozyny przy 70 eV

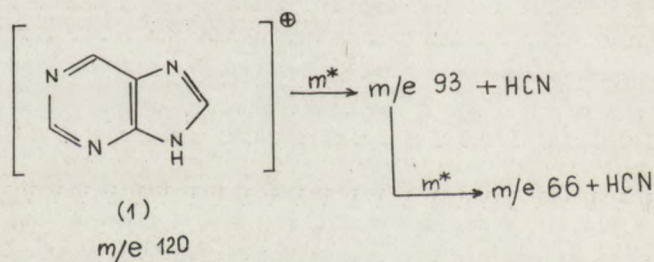
Jon molekularny 5-metylocytozyny [2] również eliminuje $^*\text{NH}_2$, CO, NCO^* i HNCO. Obserwuje się tu również eliminację H_2NCO^* z jonu molekularnego, co potwierdza obecne w widmie pasmo metastabilne przy m/e 52,5, odpowiadające eliminacji 44 jednostek masy ($125 \rightarrow 81$).

Widma około 50 dodatkowych pochodnych pirymidyny przedstawili w swych pracach T. Nishiwaki [8, 9] oraz K. Undheim i G. Hvistendahl [10]. Opu-

blikowano również widma masowe fotodimerów cyklobutanowych uracylu, tyminy i 5-bromouracylu [11] oraz fotodimerów cyklobutanowych 1, 1'-polimetylenobis-(5-alkilouracyli) [12, 13] (analogów dwunukleotydów). Najbardziej charakterystycznym sposobem fragmentacji tych fotodimerów jest rozerwanie pierścienia cyklobutanowego, co generuje jony o składzie identycznym z odpowiednim monomerem.

WIDMA MASOWE PURYN

W widmie masowym puryny [14] (1) dominuje pasmo jonu molekularnego (M^+) przy m/e 120.

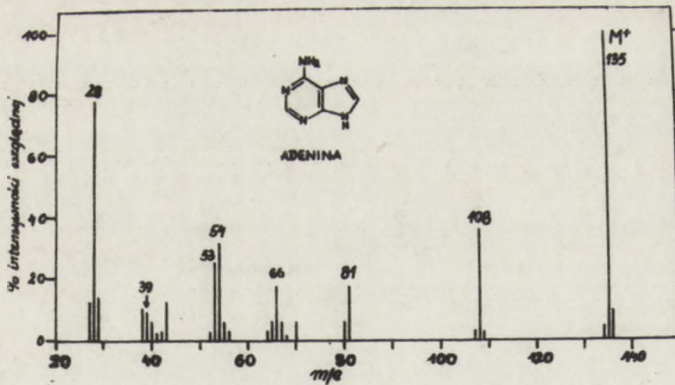
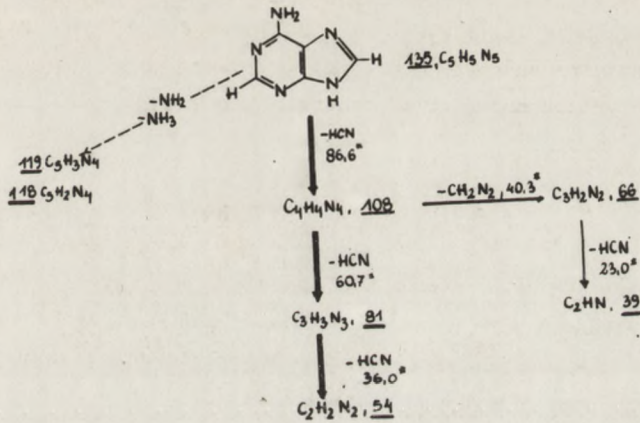


Obecne w widmie pasma metastabilne potwierdzają eliminację dwóch cząsteczek HCN z jonu molekularnego. Przy pomocy specyficznego znakowania deuterem znaleziono, że prawie 80% eliminowanych cząsteczek HCN obejmuje atomy C^2-N^3 i C^6-N^1 puryny.

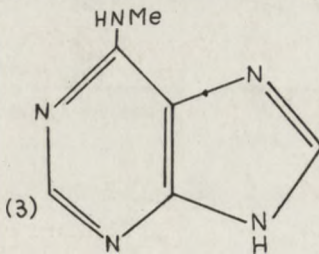
W widmie masowym adeniny [2] (rys. 5) również dominuje pasmo jonu molekularnego przy m/e 135.

Pasma przy m/e 108, 81 i 54 powstają dzięki kolejnej eliminacji trzech cząsteczek HCN z jonu molekularnego, co potwierdzają obecne w widmie odpowiednie piki metastabilne.

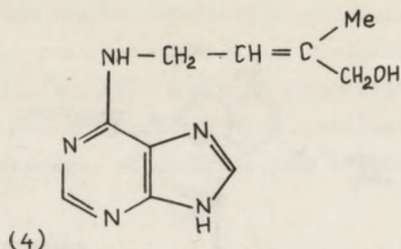
N-metyloadenina [3] w pierwszym etapie fragmentacji eliminuje CH_2N lub CH_3N^+ z grupy metyloaminowej jonu molekularnego [1]. Po tej fragmentacji następuje kolejna eliminacja trzech cząsteczek HCN. Jon molekularny N,N-dwumetyloadeniny również eliminuje CH_3CN^+ . Eliminacja ta związana jest z migracją jednej z grup metylowych z N^6 do atomu azotu pierścienia [15].



Rys. 5. Widmo masowe adeniny przy 70 eV



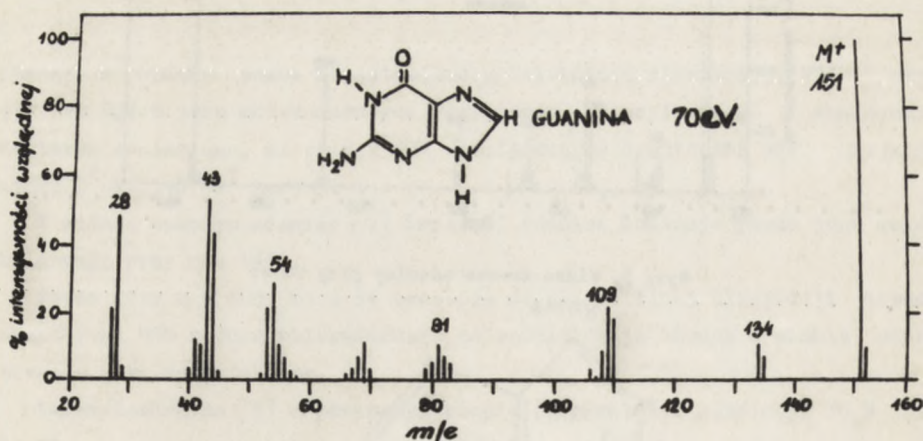
Struktura zeatyny [4], czynnika powodującego podział komórek, została oznaczona przy pomocy spektrometrii masowej [16].



Zeatyna

Przez porównanie widm masowych związku przed i po wymianie w D_2O wykryto obecność w cząsteczce trzech łatwo wymienialnych protonów (pasmo jonu molekularnego przy m/e 219 przesunięte zostało do m/e 222 po wymianie w D_2O).

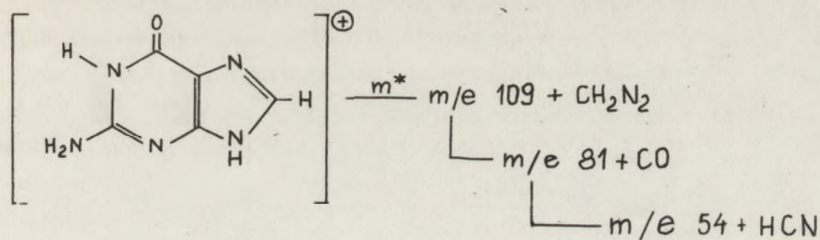
Ponadto w widmie znaleziono pasma odpowiadające eliminacji HO^{\bullet} i $HOCH_2^{\bullet}$ z M^+ oraz pasma przy m/e 135 i m/e 136, charakterystyczne dla jonu molekularnego adeniny i jego protonowej postaci, powstającej wskutek eliminacji podstawnika przy N^6 z przegrupowaniem atomu wodoru od eliminowego fragmentu do grupy aminowej lub jednego z atomów azotu pierścienia.



Rys. 6. Widmo masowe guaniny przy 70 eV

W widmie masowym guaniny [1] (rys. 6) pasmo jonu molekularnego jest pasmem głównym (100% intensywności względnej).

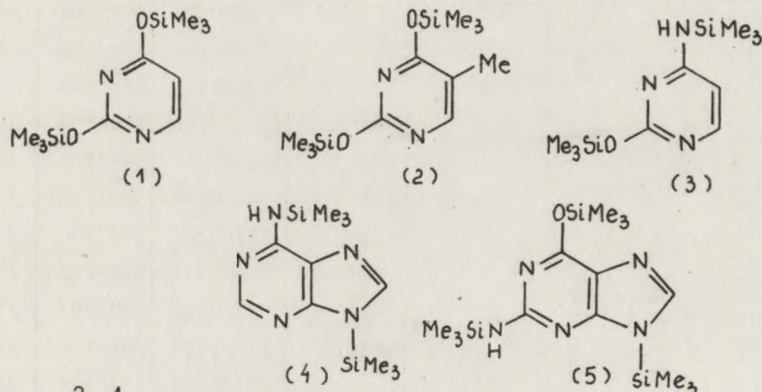
Pasmo przy m/e 109 powstaje dzięki eliminacji z jonu molekularnego fragmentu CH_2N_2 obejmującego atomy N^1 , C^2 i atom azotu grupy aminowej. Utworzony jon rozpada się dalej, eliminując kolejno CO i HCN. Fragment przy m/e 110



tworzy się w wyniku eliminacji CHN_2^+ z M^+ . Obserwuje się również pasma przy m/e 135 ($\text{M}^+ - \text{NH}_2$), m/e 134 ($\text{M}^+ - \text{NH}_3$) i m/e 108 ($\text{M}^+ - \text{HNCO}$). Przejścia te potwierdzono przez pomiar składu elementarnego jonów i przesunięcia pasm w widmie związku po wymianie labilnych protonów w D_2O .

WIDMA MASOWE TRÓJMETYLOSILILOWYCH POCHODNYCH ZASAD PURYNOWYCH I PIRYMIDYNOWYCH

Izolacja niewielkich ilości modyfikowanych biologicznie lub chemicznie zasad z hydrolizatów RNA lub DNA, potrzebnych dla uzyskania ich widm masowych, jest bardzo trudna, a często nawet niemożliwa do wykonania. W takich przypadkach mieszaninę zasad poddaje się silylowaniu w celu przeprowadze-



- (1) - O^2, O^4 - bis (trójmetylosililo) uracyl
 (2) - O^2, O^4 - bis (trójmetylosililo) tymina
 (3) - O^2, N^4 - bis (trójmetylosililo) cytozyna
 (4) - $\text{N}^6, 9$ - bis (trójmetylosililo) adenina
 (5) - $\text{N}^2, \text{O}^6, 9$ - trój (trójmetylosililo) guanina

nia ich w łatwo lotne pochodne trójmetylosililowe [17] dające się rozdzielić metodą chromatografii gazowej [18]. Jeżeli system wlotowy spektrometru masowego sprzężony jest z chromatografem gazowym, otrzymuje się jednocześnie widma masowe rozdzielanych sililowanych zasad.

Widma masowe trójmetylosililowych (TMS) - pochodnych pięciu głównych zasad [19] z RNA i DNA przedstawiono na rys. 7.

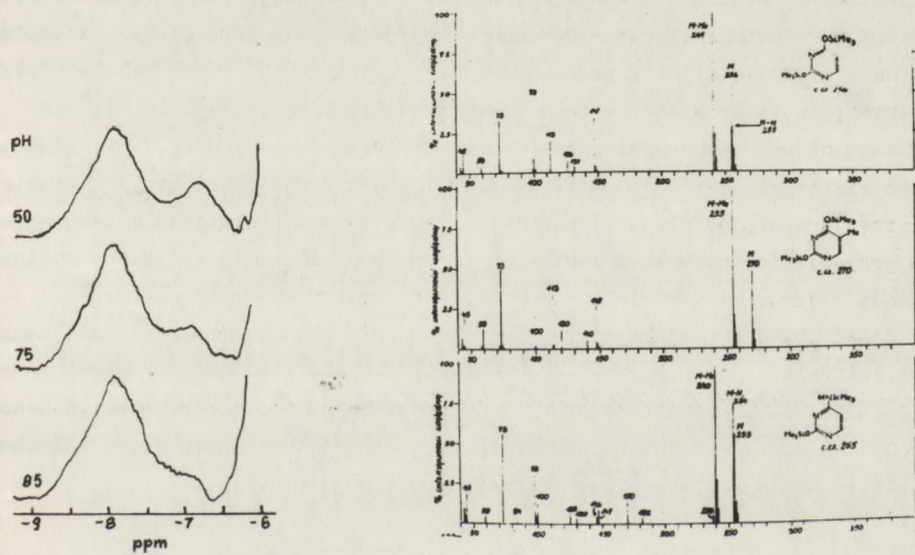
Ponadto w tabeli I podano intensywności najbardziej charakterystycznych jonów w widmach masowych TMS-pochodnych dwudziestu dodatkowych zasad.

T a b e l a I

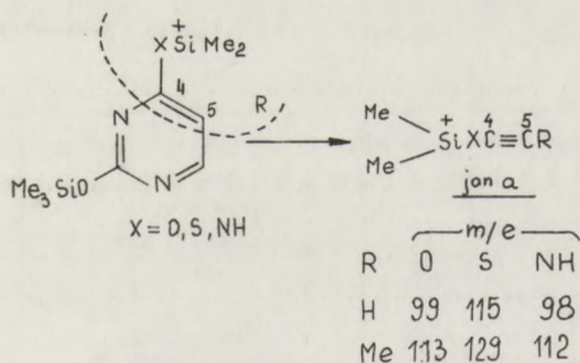
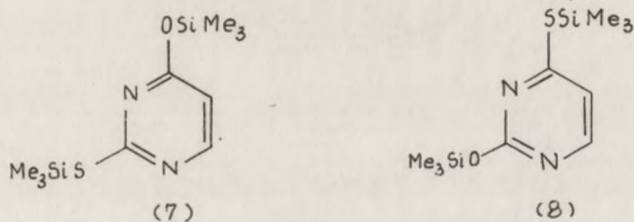
Wybrane jony z widm masowych trójmetylosililowych
pochodnych zasad pirymidynowych i purynowych

Zasada	Ilość grup Me ₃ Si-	m/e (int.)			
		M	M-H	M-Me	m/e 73
Puryna	1	192/67/	191/3,6/	177/100/	/21/
6-Metylopuryna	1	206/73/	205/3,5/	191/100/	/23/
3-Metyloadenina	1	221/52/	220/4,1/	206/100/	/21/
N-Metyloadenina	1	221/100/	220/19/	206/53/	/53/
6-Chloropuryna	1	226/96/	225/1,1/	211/100/	/45/
6-Metylopuryna	1	238/100/	237/9,0/	223/57/	/83/
5-Metylocytozyna	2	269/37/	268/2,8/	254/100/	/39/
Hipoksantyna	2	280/48/	279/2,5/	265/100/	/47/
1-Metyloadenina	2	293/8,1/	292/0,7/	278/100/	/48/
2-Metyloadenina	2	293/32/	292/2,4/	278/100/	/40/
7-Metyloadenina	2	293/37/	292/24	278/100/	/57/
7-Metyloguanina	2	309/22/	308/2,9/	294/100/	/51/
7-Metyloksantyna	2	310/50/	309/11/	295/100/	/42/
5-Hydroxyuracyl	3	344/41/	343/20/	329/100/	/84/
6-Hydroxyuracyl	3	344/75/	343/52/	329/100/	/62/
5-Hydroxymetylocytozyna	3	357/100/	356/5,1/	342/42/	/92/
5-Hydroxymetylouracyl	3	358/60/	357/5,0/	343/29/	/100/
Ksantyna	3	268/72/	367/3,7/	353/100/	/80/
Kwas orotowy	3	372/7,0/	371/3,6/	257/52/	/94/
Kwas moczowy	4	456/78/	455/4,0/	441/57/	/100/

Intensywności jonów molekularnych TMS-pochodnych zasad są ogólnie wysokie, co jest zgodne z aromatycznym charakterem cząsteczek.

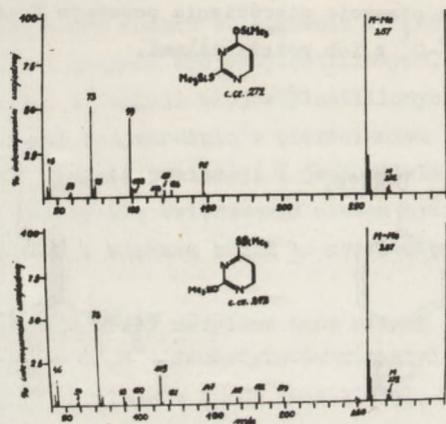


Najwięcej danych strukturalnych w widmach TMS-pochodnych pirymidynowych dostarczają jony powstające z fragmentu M-Me na skutek otwarcia pierścienia pirymidynowego. Widma izomerycznych tiouracyli [19] (7), (8) (rys. 8) wykazały, że w wyniku otwarcia pierścienia powstaje fragment jonowy obejmujący atomy węgla C⁴-C⁵ z ich podstawnikami.

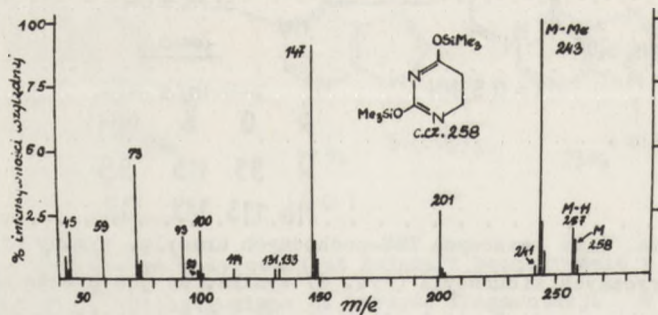


Z porównania widm masowych TMS-pochodnych uracylu, tyminy (rys. 7) i dwóch izomerycznych tiouracyli (rys. 8) wynika, że jon a może służyć jako dobry wskaźnik pozycji C-metylacji (przy C⁵ lub C⁶) i tiolowania w pirymidynach.

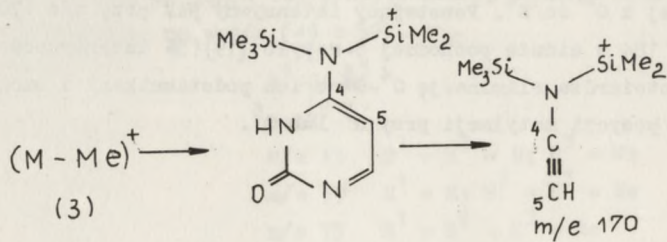
W widmie pochodnej cytozyny [19] (3) (rys. 7) rozerwanie pierścienia aromatycznego we fragmencie M-15 jest poprzedzone migracją funkcji trójmetylosililowej z O² do N⁴. Powstający intensywny pik przy m/e 170, przesunięty do m/e 184 w widmie pochodnej 5-metylo [19] (5% intensywności względnej), również potwierdza eliminację C⁴-C⁵ z ich podstawnikami i umożliwia rozróżnienie pozycji metylacji przy C⁵ lub C⁶.



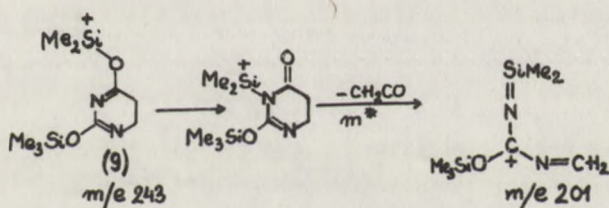
Rys. 8. Widma masowe TMS-pochodnych 2-tiouracylu i 4-tiouracylu



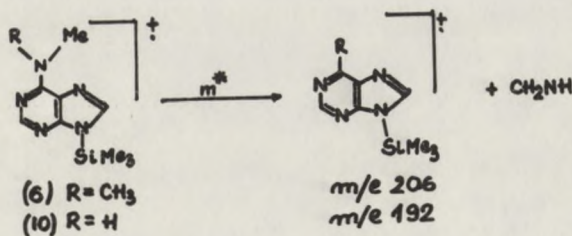
Rys. 9. Widmo masowe TMS-pochodnej 5,6-dwuhydrouracylu



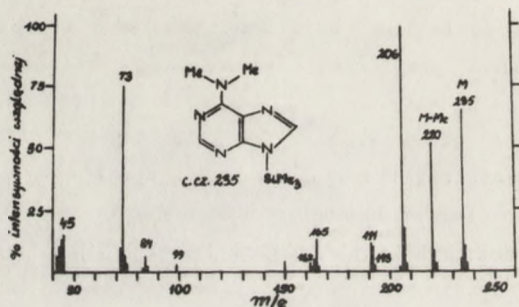
Wysycenie wiązania C⁵-C⁶ w pirymidynach prowadzi do kilku ważnych różnic w sposobie fragmentacji. Tworzenie jonu a (m/e 99), jak widać na rys. 9, jest stłumione, ale tworzy się jon dający intensywne pasmo przy m/e 201, które nie ma odpowiednika w widmie uracylu (rys. 7). Dokładny pomiar masy fragmentu przy m/e 201 pozwolił na ustalenie mechanizmu, który polega na eliminacji z jonu molekularnego cząsteczki ketenu (H₂C=O), obejmującej atomy węgla C⁴-C⁵. Eliminacja ta poprzedzona jest migracją grupy trójmetylosililowej z O⁴ do N³. Przejście to potwierdza również obecne w widmie pasmo metastabilne dla eliminacji 42 jednostek masy z fragmentu M-Me.



W przypadku N-metylowych pochodnych adeniny, takich jak (6) i (10), wysokodiagnostycznym procesem charakteryzującym metylację grupy aminowej jest eliminacja metylenoiminy z jonu molekularnego, której towarzyszy migracja grupy metylowej lub atomu wodoru do N¹ względnie C⁶.



W widmie masowym N-metyloadeniny (rys. 10) pasmo jonu m/e 206 jest pasmem głównym.



Rys. 10. Widmo masowe TMS-pochodnej N,N-dwumetyloadeny

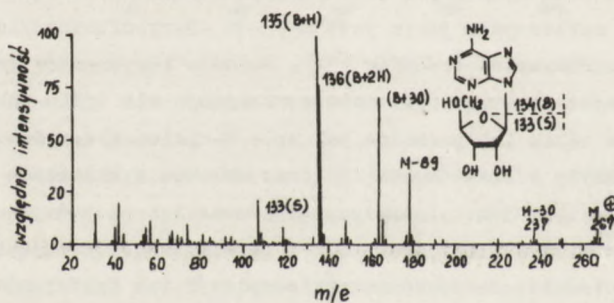
Wymagana niewielka ilość substancji, łatwość z jaką otrzymywane są widma oraz obserwowana specyficzność fragmentacji, sugerują, że widma masowe zasad purynowych i pirymidynowych, jak również ich TMS-pochodnych, mogą służyć jako użyteczne modele w określaniu struktury chemicznie lub biologicznie modyfikowanych komponentów kwasów nukleinowych. Technika ta jest również użyteczna w określaniu pozycji i ilości przyłączanych biologicznie lub chemicznie izotopów D (^2H), ^{18}O i ^{13}C .

SPEKTROSKOPIA MASOWA NUKLEOZYDÓW I ICH FOSFORANÓW

Dotychczas otrzymano widma masowe wszystkich majorowych nukleozydów i ich fosforanów oraz niektórych tzw. rzadkich nukleozydów łącznie z hipermodyfikowanym nukleozydem jakim jest N-(9- β -D-rybofuranazylopurynylo-6-yl(-N-metylokarbamoylo) treonina [21]. Badania komponentów kwasów nukleinowych za pomocą spektroskopii masowej obejmują nie tylko nukleozydy i ich fosforany, ale także ich pochodne, jak np.: 8-cyklonukleozydoadenozyny [22], inozyny, guanozyny i ksantozyny [23] oraz układów cyklicznych urydyny [24], 4-tiourydyny [25] i 5-metylourydyny [25] oraz ich pochodnych blokowanych [26] grupami trytylową, acetylową i piwaloilową. Okazuje się, że nie tylko trójmetylosililowe pochodne nukleozydów i ich fosforanów znajdują zastosowanie w spektroskopii masowej. Inną odpowiednią grupą blokującą jest grupa trójfluoroacetylowa [27], która znajduje coraz częstsze zastosowanie. Jedną z ujemnych stron preparowania trójmetylosililowych pochodnych badanych związków jest konieczność rozdzielenia związku pertrójmetylosililowego od niecałkowicie zablokowanych. Ze względu na niewielkie ilości substancji koniecznej do otrzymania widma masowego, bardzo pomocna okazała się chromatografia gazowa. Wskutek sprzężenia chromatografu gazowego z spektroskopem masowym można rozdzielić powstałe produkty silylowania, a następnie uzyskać widmo czystego pertrójmetylosililowego związku. Technikę tę stosuje się obecnie bardzo powszechnie. Podczas reakcji silylowania mogą zachodzić inne reakcje chemiczne, które dają w efekcie mieszaninę nie tylko w różnym stopniu zablokowanego substratu, ale także produkt niepożądaną reakcji. Taką sytuację napotkano przy trójmetylosilylowaniu [28] 7-metyloguanozyny przy dostępie tlenu, otrzymując w reakcji tlenu z zasadą 7-metylo-8-ketoguanozynę. W przypadku innych nukleozydów i ich fosforanów takich reakcji nie zaobserwowano. Nie znaczy to, że procesy uboczne nie zachodzą, jednak nie mają one absolutnie żadnego wpływu na widmo masowe w dotychczas badanych związkach.

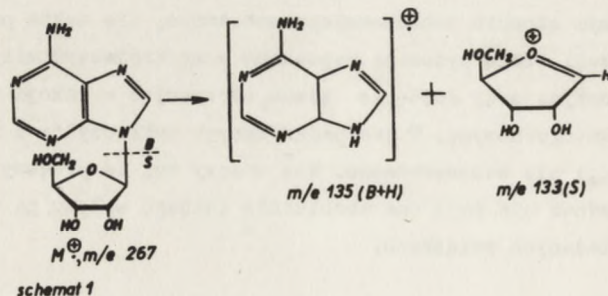
OMÓWIENIE WIDM MASOWYCH NUKLEOZYDÓW I ICH FOSFORANÓW

Widmo masowe nukleozydów jest oczywiście zależne od sposobu fragmentacji jonu molekularnego. Jest rzeczą zmienną, że wszystkie nukleozydy ze względu na swoją budowę ulegają fragmentacji w sposób charakterystyczny i nadający się do względnie łatwej interpretacji. Dlatego w tym opracowaniu przedstawiono widmo masowe oraz sposób fragmentacji adenozyiny [29] (rys. 1) jako przykład obejmujący również inne nukleozydy, których widma masowe można wykonać bez modyfikacji badanego związku.

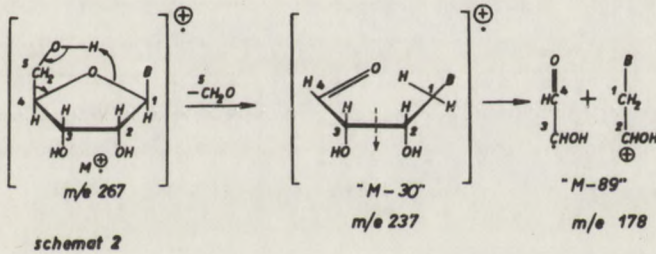


Rys. 1. Widmo masowe adenozyiny przy 70 eV

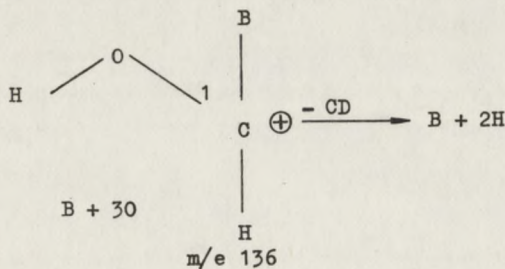
Widmo wykonano przy 70 eV. Można w nim wyróżnić pik przy m/e 267, odpowiadający jonowi molekularnemu oznaczonego przez M^+ . M^+ ulega następnie rozpadowi na trzy rodniokjony, odpowiadające odpowiednio adeninie plus jeden proton ($B+H$) przy m/e 135, adeninie plus dwa protony ($B+2H$) przy m/e 136 oraz fragmentowi powstałemu z reszty cukrowej przy m/e 133 oznaczonej jako S . Tę drogę fragmentacji przedstawiono na schemacie pierwszym.



Jak widać, rozpad jonu molekularnego w tym przypadku przebiega z rozerwaniem wiązania N-glikozydowego. Inny sposób fragmentacji jonu molekularnego, w którym z części cukrowej ulega wydzieleniu cząsteczka formaldehydu (CH_2O) oraz jon oznaczony $(M-30)^+$ przy m/e 237, którego prawdopodobna struktura przedstawiona jest na schemacie 2. Jon $(M-30)^+$ ulega rozpadowi na dwa fragmenty, z których jeden przy m/e 178 jest położony o 89 m/e jednostek poniżej jonu molekularnego $(M-89)^+$ i zawiera adeninę połączoną z atomami węgla C-1 i C-2 pochodzącymi z reszty cukrowej.

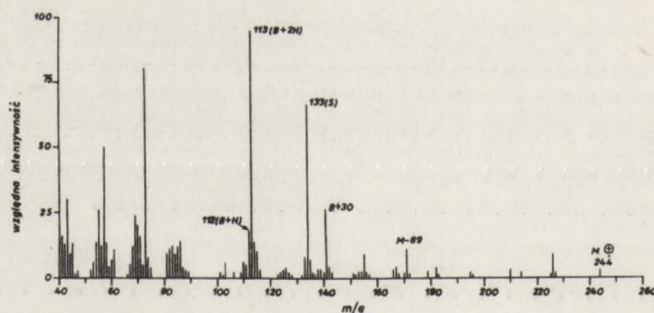


Wyżej przedstawiona fragmentacja przebiega bez rozerwania wiązania N-glikozydowego, co pociąga za sobą powstawanie zupełnie innych jonów, niż w przypadku rozerwania tego wiązania. W widmie masowym adenozyne występuje pik przy m/e 164 odpowiadający jonowi, którego strukturę uwidoczniono na schemacie 3. Zawiera on adeninę (lub inną odpowiednią zasadę) połączoną wiązaniem N-glikozydowym z fragmentem cukru o składzie CH_2O . Badania przeprowadzone za pomocą podstawienia protonów deuterem [30] sugerują, że fragment cukru w tym jonie stanowi węgiel C₁-1 i związany z nim atom wodoru oraz atom tlenu z pierścienia furanozowego z atomem wodoru pochodzącym z grupy OH-2'. Wyjaśnienie tworzenia się tego jonu pozwala wytłumaczyć bardzo małą intensywność pików $(B+30)^+$ w przypadku 2'-dezynukleozydów.



Występowanie bardzo mało intensywnego pików B+30 w widmach masowych 2'-dezoksynukleozydów nasuwa przypuszczenie, że atom wodoru może przegrupowywać się do pierścieniowego atomu tlenu z grup OH w pozycji 3'- lub 5'. W tym kontekście wydaje się, że przegrupowanie atomu wodoru z pozycji 2'-OH i powstanie jonu B+30 jest uprzywilejowane. Ten pogląd poparty na wspomnianych już badaniach związków podstawionych deuterem i porównaniem z widmami masowymi 2'-dezoksynukleotydydów zostaje podważony na podstawie widm masowych 2'-O-metyloadenozyny, gdzie przy m/e 164 występuje pik B+30 o dużej intensywności. Jak dotychczas jest to problem niewyjaśniony.

Przedstawione powyżej widmo masowe adenozyny i jego interpretacja są charakterystyczne dla widm pochodnych adenozyny oraz urydyny. Nie rozpatrując szczegółowo poszczególnych etapów fragmentacji przedstawiono (rys. 2) widmo masowe urydyny, w którym można zinterpretować poszczególne pikki. Porównując jednak ich intensywności widać, że intensywności odpowiadające jonowi o tej samej budowie są różne. Wzajemne intensywności poszczególnych pików przedstawiono na schemacie 4.



Rys. 2. Widmo masowe urydyny przy 70 eV

Zestawienie intensywności odpowiednich pików

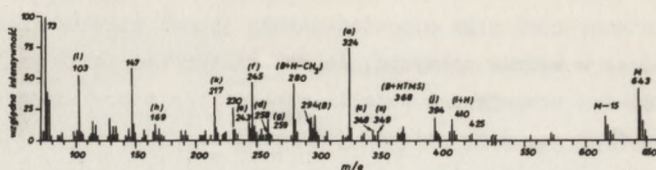
adenozyna		urydyna
M-30 m/e 237	>	M-30 m/e 214
M-89 m/e 178	>	M-89 m/e 155
B+30 m/e 164	>	B+30 m/e 141
B+2H m/e 136	<	B+2H m/e 113 p.g.
B+H m/e 135 p.g.	>>	B+H m/e 112
S m/e 133	<<	S m/e 133

Schemat 4

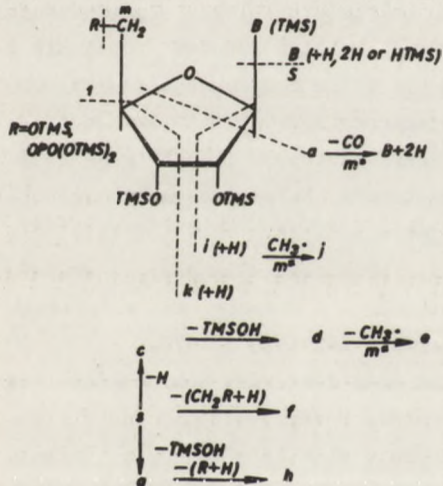
Porównanie względnych intensywności tych pików w widmie masowym badanego nukleozydu może rozstrzygnąć czy jest on pochodną adenozyliny czy urydyny. Często intensywność pików odpowiadającego jonowi molekularnemu nie jest duża i trudno go w widmie uchwycić. Jednak zinterpretowanie pików M-89 i B+30 oraz B+2H i S pozwala nam ustalić wartość m/e odpowiadającą jonowi molekularnemu oraz czy dany związek jest z serii rybo- czy dezoksyrybo. Nie zawsze można na podstawie widma masowego oraz ogólnych przyjętych zależności ustalić prawdopodobną budowę związków. Taka sytuacja może być spowodowana odmienną od typowej budową nukleozydu np. pseudourydyna. Obecność C-glikozydowego wiązania powoduje, iż jon molekularny ulega fragmentacji głównie przez przegrupowanie reszty cukrowej. Dalszym powodem innej niż w większości nukleozydów fragmentacji może być silna modyfikacja zasady. Obserwujemy to w przypadku N-//9-β-D-rybofuranozylopurynylo-6-yl/-N-metylokarbonylo) treoniny, gdzie w pierwszym rzędzie następuje fragmentacja części treoninowej a następnie pozostałej cząsteczki. Należy nadmienić, że obraz widma masowego nukleozydów, podobnie jak w przypadku zasad, zmienia się zasadniczo przy zmianie energii jonizacji. Porównania widm przy woltażu 70 eV i 20 eV komponentów kwasów nukleinowych zawarte są w pracach S.M. Mechta [32], S.A. Gupty i N.J. Leonarda z lat 1969 i 1970.

Jak już wspomniano, cytrydyna i guanozyna oraz fosforany nukleozydów są zbyt mało lotne, aby wykonać ich widma masowe. Przeprowadzenie ich w pochodne trójmetrylosililowe pozwala na wykonanie widm, lecz znacznie zmienia sposób fragmentacji względem ogólnie przyjętych schematów. Dyskusję widma masowego trójmetrylosililopochodnych nukleozydów przedstawiono na podstawie pięciu trójmetrylosililopochodnej guanozyliny. I w tym przypadku spotykamy różne sposoby fragmentacji jonu molekularnego uwidocznione na schemacie 5. We wszystkich trójmetrylosililowych pochodnych nukleozydów, a w przypadku (TMS)₅ pochodnej guanozyliny (rys. 3), obserwuje się pik przy m/e 628 (M-15), co odpowiada wydzieleniu się z jonu molekularnego grupy CH₃. Rozerwanie wiązania N-glikozydowego pociąga za sobą powstanie pików pochodzących od jonów zasady przy m/e 294 (B) oraz B+H przy m/e 280 po odczepieniu grupy CH₃. Wskutek przegrupowania grupy HTMS z części cukrowej od zasady otrzymujemy pik przy m/e 268 odpowiadający jonowi B+HMTS. Dalszą konsekwencją rozerwania wiązania N-glikozydowego są jony pochodzące od części cukrowej związku. Przy m/e 349 występuje pik S, pochodzący od cukru, wraz z trzema grupami TMS.

Wskutek odczepienia z S cząsteczki trójmetrylosililanolu otrzymujemy pik przy m/e 259 (g). Z fragmentu oznaczonego "g" odczepia się następna cząsteczka trójmetrylosililanolu, dając w efekcie jon "h", od którego sygnał ob-



Rys. 3. Widmo masowe $(TMS)_5$ pochodnej guanozyny przy 70 eV



schemat 5

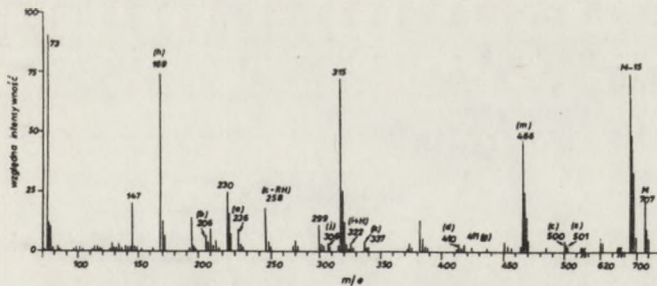
Widmo masowe siliłowanej guanozyny zawiera szereg innych pików, które świadczą o tym, że fragmentacja może przebiegać podobnie, jak w nukleozydach nie podstawionych, tj. bez rozerwania tego wiązania.

W przypadku, gdy następuje rozerwanie wiązania $C1' - C2'$ tworzy się fragment "a", dający pik przy m/e 324 złożony z zasady oraz atomu węgla $C1'$ z dwoma atomami wodoru i jednym atomem tlenu z pierścienia furanowego. Fragment ten tracąc cząsteczkę CO daje jon o sygnale przy m/e 296. Jeżeli w jonie molekularnym ulega rozerwaniu wiązanie $C2' - C3'$, to powstaje jon (i+H) zbudowany z zasady połączonej z $C1'$ i $C2'$ pochodzącymi od cukru wraz z grupą OTMS przy atomie węgla $C2'$. Sygnał pochodzący od tego jonu położony jest przy m/e 410. Inne fragmenty, którym można przypisać odpowiedni pik na widmie, to odpowiednio fragment złożony z atomu węgla $C5'$ z dwoma atomami wodoru i resztą trójmetylosililoksy, któremu odpowiada pik przy m/e 103.

serwujemy przy m/e 169. Jon powstały z części cukrowej ulega fragmentacji również na innej drodze, w której najpierw S traci atom wodoru, dając jon oznaczony "c", którego pik położony jest przy m/e 348. Otrzymany jon "c" traci cząsteczkę trójmetylosililanolu i tworzy jon, któremu odpowiada pik przy m/e 258 ("d"). Jon "d", w wyniku przejścia metastabilnego, w którym odłącza się rodnik CH_3 , tworzy fragment "e" o m/e 243. Trzeci nadający się do interpretacji sposób fragmentacji jonu S polega na oderwaniu od S ugrupowania $(CH_2OTMS + H)$, w wyniku czego otrzy-

Bardzo intensywny pik przy m/e 73 odpowiada jonowi trójmetylosililowemu. Pik przy 147 m/e pochodzi od ugrupowania $(/CH_3/3 Si OSi/CH_3/2)$ i wreszcie sygnał położony przy m/e 217 należy przypisać jonowi "k" (schemat 5) złożonemu z dwóch grup trójmetylosililoksy połączonych z atomami węgla C3', C4' i C5'.

Na podstawie przedstawionego widma $(TMS)_5$ pochodnej guanozyny, które jest typowe dla wielu TMS pochodnych nukleozydów, można uzyskać szereg informacji o badanym związku. Podobnie, jak w przypadku nukleozydów niezablokowanych, można ustalić ciężar cząsteczkowy, skład atomowy oraz uzyskać potwierdzenie czy reszta cukrowa jest pochodną rybozy, czy 2' lub 3' dezoksyrybozy. Można również z dużą pewnością ustalić, jaka zasada wchodzi w skład badanego nukleozydu. Sumując powyższe uzyskane informacje można powiedzieć, że pozwalają one na pełną identyfikację nukleozydu mimo skomplikowania widma przez grupy blokujące. Twierdzenie to dotyczy również sililowych pochodnych 5' lub 3' fosforanów nukleozydów. Widmo (TMS) pochodnej 5'-fosforanu adenozyne przedstawione jest na rys. 4. Powracając do schematu 5 można przypisać większość pików odpowiednim fragmentom. Sposób fragmentacji jest niemalże identyczny, jak w przypadku zablokowanego nukleozydu, tak że reszta fosforanowa nie wnosi istotnych zmian do ogólnego schematu rozpadu jonu molekularnego zsililowanych nukleozydów. Oderwanie zsililowanej



Rys. 4. Widmo masowe $(TMS)_5$ pochodnej 5'-fosforanu adenozyne przy 70 eV

reszty fosforanowej z pozycji 5' daje fragment nukleozydu, którego pik ("m") położony jest przy 466 m/e . Wskutek wewnątrzcząsteczkowego przegrupowania grupy TMS otrzymujemy fragment $HO-P-(OTMS)_3$ o sygnale przy m/e 315. Ten jon tracąc cząsteczkę metanu rozpada się na fragment, któremu odpowiada pik przy 299 m/e . Jon reszty cukrowej S traci cząsteczkę trójmetylosililanolu, dając fragment "g", który następnie odszczepia ugrupowanie dwu-trójmetylosililofosforanowe plus atom wodoru, co prowadzi do jonu "h". Położenie sygnałów odpowiadających jonom "g" i "h" jest odpowiednio przy 411 m/e i 169 m/e .

Wydaje się niecelowa dalsza szczegółowa analiza drogi fragmentacji oraz przedstawionego widma $(TMS)_5$ pochodnej 5' fosforanu adenozy, ponieważ, uwzględniając różnice mas, można stwierdzić daleko posunięte podobieństwo do sposobu fragmentacji trójmetylosililopochodnych nukleozydów przedstawionego poprzednio.

Również w przypadku fosforanów nukleozydów na podstawie analizy widma masowego można ustalić [33] czy dany fosforan jest pochodnym 3' czy 5', czy też może jest on 3' - 5' lub 2' - 3' cykliczną pochodną.

PODSUMOWANIE

Na podstawie przedstawionych analiz za pomocą spektroskopii masowej komponentów kwasów nukleinowych począwszy od zasad aż do fosforanów nukleozydów, można stwierdzić, że ta metoda analizy okazuje się bardzo przydatną. Charakterystyczny i powtarzalny sposób fragmentacji czyni z każdego widma masowego badanego związku jego "odcisk palca", co można traktować jako wzorzec. Literatura przytacza również wiele przykładów, w których spektroskopia masowa użyta została jako pierwszoplanowa analiza ustalająca strukturę. Obecnie przeprowadza się próby stosowania tej analizy do większych fragmentów kwasów nukleinowych, jak fosforany dwunukleozydów, w związku z czym wydaje się iż jest to metoda badawcza przyszłości. Jeżeli uszerogować poszczególne metody ustalania struktury pochodnych kwasów nukleinowych, to spektroskopię masową już obecnie zaliczać można do metod wiodących obok analiz UV, IR, NMR.

LITERATURA

- [1] Rice J.M., Dudek G.O.; J. Amer.Chem.Soc., 89, 2719 (1967).
- [2] Rice J.M., Dudek G.O., Barber M.; J.Amer.Chem.Soc., 87, 4569 (1965).
- [3] McCloskey J.A., Lawson A.M., Tsuboyama K., Krueger P.M., Stilwell R.N.; J.Amer.Chem.Soc., 90, 4182 (1968).
- [4] Tropp B.E., Law J.H., Hayes J.M.; Biochemistry, 3, 1837 (1964).
- [5] Biemann K., Fennessey P.V.; Chimia, 21, 226 (1967).
- [6] Silverstein R.M., Bassler G.C.; Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych, PWN (1970).
- [7] Jennings K.R.; J.Chem.Phys., 43, 41176 (1965).
- [8] Nishiwaki T.; Tetrahedron, 22, 3117 (1966).
- [9] Nishiwaki T.; Tetrahedron, 23, 1153 (1967).
- [10] Undheim K., Hvistendahl G.; Acta Chem.Scand., 25, 3227 (1971).

- [11] Fenselau C., Wang S.Y.; *Tetrahedron*, 25, 2853 (1969).
- [12] Leonard N.J., Golankiewicz K., McCredie R.S., Johnson S.M., Paul I.C.; *J.Amer.Chem.Soc.*, 91, 5855 (1969).
- [13] Golankiewicz K., Strękowski L.; *Bull.Acad.Polon.Sci., Sér.Sci.Chim.*, 20, 945 (1972).
- [14] Goto T., Tatematsu A., Matsura S.; *J.Org.Chem.*, 30, 1844 (1965).
- [15] Rahamim Y., Sharvit J., Mandelbaum A., Sprecher M.; *J.Org.Chem.*, 32, 3856 (1967).
- [16] Shannon J.S., Letham D.S.; *N.Z.J.Sci.*, 9, 833 (1966).
- [17] Shimizu B., Asai M., Nishimura T.; *Chem.Pharm.Bull.*, 15, 1847 (1967).
- [18] Gehrke C.W., Lakings D.B.; *J.Chromatogr.*, 61, 45 (1971).
- [19] White E., Krueger V.P.M., McCloskey J.A.; *J.Org.Chem.*, 37, 430 (1972).
- [20] Show S.J., Desiderio D.M., Tsuboyama K., McCloskey J.A.; *J.Amer.Chem.Soc.*, 92, 2510 (1970).
- [21] Kimura-Harada F., von Minden D.L., McCloskey J.A., Nishimura S.; *Biochemistry* 11, 3910 (1972).
- [22] Ikeda M., Tamura Y., Ikehara M.; *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 7, 1377 (1970).
- [23] Lin D.C.K., Slotin L., Oglivie K.K., Westmore J.B.; *Journal of Organic Chemistry* 38, 1118 (1973).
- [24] Tsuboyama S., McCloskey J.A.; *Journal of Organic Chemistry* 37, 166 (1972).
- [25] Westmore J.B., Lin D.C.K., Oglivie K.K., Waybon H.; *Organic Mass Spectrometry* - 6, 1243 (1972).
- [26] Westmore J.B., Lin D.C.K., Oglivie K.K.; *Organic Mass Spectrometry* 7, 317 (1973).
- [27] Koenig W.A., Smith L.C., Grain P.F., McCloskey J.A.; *Biochemistry* 10, 3968 (1971).
- [28] von Minden D.L., Stillwell R.N., Koenig W.A., Lyman K.J., McCloskey J.A.; *Analytical Biochemistry* 1, 1 (1972).
- [29] Don Dejongh C.; "Synthesis of Nucleic Acid" cz. II, New York (1970 r).
- [30] Hecht S.M., Gupta A.S., Leonard N.J.; *Analytical Biochemistry* 30, 2, (1969).
- [31] Bieman K., McCloskey J.A.; *J.Am.Chem.Soc.* 84, 2005 (1962).
- [32] Hecht S.M., Gupta A.S., Leonard N.J.; *Analytical Biochemistry* 38, 1 (1970).
- [33] Lawson A.M., Stillwell R.N., Tacher M.M., Tsuboyama K., McCloskey J.A.; *J.Am.Chem.Soc.* 93, 1014 (1971).

DYSKUSJA

W dyskusji zabrali głos prof.dr M. Wiewiórowski, doc.dr hab. M. Kiełczewski oraz dr M. Dramiński.

Poruszyli oni zagadnienia związane z widmami masowymi alkilowych pochodnych nukleozydów, powołując się także na własne badania w tym zakresie. Następnie poruszono problemy związane z ograniczeniami i możliwościami zastosowania spektroskopii masowej w badaniach strukturalnych komponentów kwasów nukleinowych.

Dyskusję zakończył prof.dr M. Wiewiórowski, który omówił problemy związane z aparaturą stosowaną w spektroskopii masowej oraz z rozwojem tej metody w Polsce.

Jan Barciszewski, Antoni J. Rafalski

IZOLACJA, WŁASNOŚCI I STRUKTURA tRNA SPECYFICZNYCH DLA FENYLOALANINY

STRESZCZENIE

W referacie przedstawiono informacje dotyczące izolacji i własności oraz najnowsze poglądy na strukturę trzeciorzędową tRNA^{Pen}. Przedstawiliśmy wiele przykładów wykorzystania chemicznej modyfikacji w badaniach struktury tRNA. Przedstawiono ostatnie osiągnięcia w badaniach struktury krystalicznej tRNA^{Pen}. Starano się pokazać użyteczność metod termodynamicznych i spektroskopowych do tego typu badań strukturalnych.

Spośród wszystkich tRNA o znanej sekwencji nukleotydowej najwięcej badań koncentrowało się na tRNA specyficznych dla fenyloalaniny. Między innymi na przykładzie tych tRNA próbuje się wyjaśnić szereg nie rozwiązanych dotąd zagadnień biologii molekularnej. O wyborze tRNA^{Pen} jako modelu do badań decyduje zasadniczo łatwa i szybka metoda otrzymywania oraz, w niektórych przypadkach, obecność silnie fluoryzującego nukleozydu. Ponieważ tRNA^{Pen} z drożdży można otrzymać najłatwiej, jak pokazaliśmy poniżej omawiając zastosowanie BD-celulozy, stąd też najwięcej badań strukturalnych opierało się właśnie na tym materiale.

W niniejszym referacie pragniemy przedstawić dotychczasowe osiągnięcia w badaniach nad fenyloalaninowymi tRNA. Zastawienie tych rezultatów jest dla nas bardzo interesujące, ze względu na nasze zainteresowania tRNA^{Pen} z nasion łąbinu żółtego.

1. METODY IZOLACJI RNA^{Pen} Z RÓŻNYCH ORGANIZMÓW

tRNA^{Pen} z drożdży

Mieszanie tRNA z drożdży otrzymuje się w prosty sposób (Holley 1963). Z wielu metod opracowanych dla rozdziału specyficznych tRNA najcenniejszą w

tym przypadku okazała się chromatografia na DB-celulozie. Stosunkowo proste otrzymywanie tego wymiennicza oraz specyficzne własności tRNA^{Fen} z drożdży spowodowały powszechne stosowanie tej techniki (Tener 1967; Gillam 1967). Silne niewiązaniowe oddziaływanie z nośnikiem powoduje zatrzymanie tRNA^{Fen} na kolumnie, a w ten sposób oddzielenie od pozostałych. Kwas opuszczający kolumnę pod wpływem rozpuszczalników organicznych (2-metoksy- etanol, etanol; Gillam 1967) jest oczyszczony 17-krotnie w stosunku do materiału wyjściowego. Niezbyt wysoki stopień oczyszczenia spowodowany był silnym wiązaniem zanieczyszczeń absorbujących w ultrafiolecie do BD-celulozy. Zastosowanie BD-celulozy pokrytej kwasem krzemowym (Wimmer 1968) powoduje zmniejszenie oddziaływania tRNA^{Fen} z nośnikiem. Stosując to postępowanie można przy niższym stężeniu chlorku sodowego wymywać tRNA^{Fen} z kolumny, natomiast inne zanieczyszczenia, głównie rRNA i mRNA, pozostają w tych warunkach na kolumnie. Wydaje się celowe stosowanie dwóch etapów oczyszczania preparatu tRNA^{Fen} na BD-celulozie. Pierwszy będzie polegał na stosowaniu normalnego wymiennicza jonowego, drugi natomiast będzie wykorzystywał obecność kwasu krzemowego na BD-celulozie. W literaturze przyjęto dla oznaczenia tego nośnika skrót BDCS, co oznacza benzoylated DEAE cellulose - coated silicic acid. Przy zastosowaniu tych technik otrzymano preparat o czystości 97%. Zamiast stosowania BDCS, która ma małą pojemność jonowymienną, z dużym powodzeniem do otrzymywania preparatywnych ilości tRNA^{Fen} zastosowano chromatografię na DEAE Sephadex A-25 (Schneider 1972).

tRNA^{Fen} z bakterii *Escherichia coli*

Mieszanie tRNA otrzymano techniką ekstrakcji fenolem, wstępnego oczyszczania izopropanolem i strącenia etanolem. Surowy preparat tRNA rozdzielono na DEAE-celulozie (Hander 1969) w gradiencie stężenia chlorku sodowego od 0,25 M - 0,65 M. Frakcję zawierającą między innymi tRNA^{Fen} oraz tRNA^{Leu} i tRNA^{Tyr} rozdzielano na kolumnie z odwróconą fazą RPC 4. Uzyskano wyraźny rozdział dwóch tRNA^{Fen} od innych. Frakcje zawierające tRNA^{Fen} zagęszczano dalej na kolumnach z DEAE-celulozą (Weeren 1970). Tak oczyszczony preparat wykazywał aktywność 995 pM/A₂₆₀. Ze względu na obecność dwóch tRNA specyficznych dla fenyloalaniny zaszła potrzeba opracowania prostej metody otrzymywania tych tRNA. Zastosowano więc w pierwszym etapie chromatografię w systemie RPC - 3, a następnie kolumnę z RPC - 4. Można w ten sposób otrzymać dwa tRNA^{Fen} o aktywności wynoszącej 1300 dla tRNA^{Fen}₁ i 1650 dla tRNA^{Fen}₂. Metoda izolacji specyficznego tRNA^{Fen} z *E.coli* jest dużo bardziej skomplikowana w porównaniu do tRNA z drożdży (Weeren 1972).

tRNA^{Fen} z kiełków pszenicy

Mieszaninę tRNA z kiełków pszenicy otrzymano metodą ekstrakcji fenolem (Dudock 1969), po czym rozdzielano na kolumnie z BD-celulozą, stosując liniowy gradient stężenia NaCl od 0,3 M - 1,3 M. Obecność frakcji tRNA^{Fen} stwierdzono przy pomocy spektrofluorymetru oraz na podstawie aktywności akceptorowej. Przy stężeniu 0,85 - 0,95 M NaCl stwierdzono wpływ z kolumny tRNA specyficznego dla fenyloalaniny w postaci dwóch pików absorpcji przy długości fali 260 nm (Yoshikami 1968, 1971). Dla końcowego oczyszczenia preparatu zastosowano powtórnie BD-celulozę. Otrzymany w wyniku tej operacji tRNA charakteryzował się czystością 90% (Yoshikami 1968).

tRNA^{Fen} z wątroby królika

Mieszaninę tRNA z wątroby królika wyizolowano znanymi metodami (Petrisant 1971). Fenyloalaninowy tRNA otrzymano stosując trzy etapy oczyszczania: dwa na benzoilowanej DEAE-celulozie oraz jednej na DEAE-Sephadex A-50. Deaminoacylowany tRNA z wątroby królika chromatografowano na pierwszej kolumnie z HD celulozą, stosując liniowy gradient stężenia NaCl od 0,4 - 1,0 M. w buforze octanowym o pH 4,5. Po zakończeniu gradientu tRNA^{Fen} wymywano buforem z 1 M NaCl, zawierającym 20% etanolu. Po odzyskaniu tRNA^{Fen} z HD celulozy, preparat poddano dalszemu oczyszczaniu na DEAE-Sephadex A-50. Po tym etapie aktywność preparatu wynosiła 750 pM/A₂₆₀. Frakcję tą poddano reakcji aminoacylacji fenyloalaniną i ponownie oczyszczano na HD-celulozie. Fenyloalaninowy tRNA wymywano gradientem stężenia NaCl w zakresie 0,8 - 1,0 M z dodatkiem etanolu w gradiencie od 0-15%. Otrzymany preparat miał aktywność akceptorową 1600 - 1700 pM/A₂₆₀ (Keith 1973).

tRNA^{Fen} z wątroby szczura

Fenyloalaninowy tRNA z wątroby szczura izolowano metodą chromatografii na benzoilowanej DEAE-celulozie z mieszaniny tRNA otrzymanej standardowymi metodami (Rogg 1969). Do wycięcia tRNA^{Fen} z kolumny używano buforu zawierającego 1,5 M NaCl z dziesięcioprocentowym dodatkiem etanolu. Ostatecznie oczyszczono preparat na kolumnie z odwróconą fazą w systemie RPC - 2 (Fin 1968).

tRNA^{Fen} z wątroby wołu i cielęcia

Frakcję zawierającą tRNA^{Fen} otrzymano rozdzielając mieszaninę transferowych RNA na kolumnie z benzoilowaną DEAE-celulozą w gradiencie stężenia NaCl w zakresie 0,4 - 1,5 M. Zasadnicza część tRNA^{Fen} wypłynęła z kolumny przy stężeniu NaCl wynoszącym 0,9 M. Reszta tRNA^{Fen} wypływała pod wpływem dodatku 10% etanolu. Główną frakcję zawierającą fenyloalaninowy

tRNA poddano dalszemu oczyszczaniu na kolumnie z hydroksyapatytem. Otrzymano preparat o aktywności 1520 pM/A₂₆₀ (Blobstein 1973).

tRNA^{Fen} z *Halobacterium cutirubrum*

Preparat ten otrzymywano na kolumnie z BD celulozy rozdzielając mieszaninę tRNA aminoacylowaną przy pomocy fenyloalaniny znaczonej izotopowo węglem 14-C. Otrzymano dwie frakcje. Pierwsza wpływała w gradiencie stężenia NaCl, druga natomiast po dodaniu 20% etanolu do buforu. Przyczyną takiego obrazu chromatograficznego może być obecność dwóch izoakceptorowych tRNA, które mają różną siłę wiązania do BD celulozy (Griffiths 1970).

tRNA^{Fen} z *Torulopsis utilis*

Kwas ten otrzymywano stosując chromatografię na DEAE-Sephadex A-25 w różnych układach chromatograficznych. Wstępny rozdział mieszaniny tRNA z *Torulopsis utilis* uzyskano, prowadząc rozdział w gradiencie stężenia 0,75 - 1,6 M siarczanu amonowego w buforze octanowym. Otrzymaną frakcję, zawierającą między innymi tRNA^{Fen}, rozdzielano dalej na DEAE-Sephadex A-25 w buforze fosforanowym w gradiencie stężenia chlorku potasowego 0,25-0,4 M. Zastosowanie 0,5 M buforu fosforanowego oraz gradientu stężenia chlorku potasowego w granicach 0,6-0,7 M pozwoliło na uzyskanie frakcji izoakceptorowych tRNA^{Fen} z *Torulopsis utilis* (Miyazaki 1968).

tRNA^{Fen} z *Drosophila melanogaster*

Mieszaninę tRNA izolowano metodą fenolową z zastosowaniem DEAE-celulozy w celu oczyszczenia preparatu. Mieszaninę tRNA z *Drosophila* chromatografowano następnie na benzoilowanej DEAE celulozie w standardowych warunkach. tRNA^{Fen} wpływał z kolumny przy stężeniu 0,65 M NaCl. Frakcję tę poddano aminoacylacji fenyloalaniną, a następnie reakcji z aktywnym estrem n-hydroksymidru kwasu bursztynowego i kwasu naftoksyoctowego. Tak modyfikowany tRNA rozdzielono na BD celulozie w gradiencie NaCl. tRNA^{Fen} wymywano buforem zawierającym 1M NaCl z dodatkiem 35% etanolu. Po inkubacji w buforze tris 1,8 M tRNA^{Fen} oczyszczano ponownie na BD celulozie. Otrzymany preparat miał aktywność 1731 pM/A₂₆₀ (White 1973, 1973 a).

tRNA^{Fen} z innych organizmów

W skali analitycznej wyizolowano specyficzne tRNA dla fenyloalaniny z następujących źródeł: Hepatomy Novikoff, retikulocytów królika, niskocząsteczkowej frakcji jądrowego RNA z wątroby szczura (Fink 1971) oraz z wątroby myszy (Hancock 1971). Zauważono również, że mitochondrialny Fen-tRNA^{Fen} zachowuje się podobnie do Fen-tRNA^{Fen} z cytoplazmy (Fink 1971).

Otrzymywanie i własności tRNA^{Pan} z różnych źródeł

Ip.	Źródła tRNA	Etapu otrzymania							Własności			Literatura		
		DEAE-celuloza (gradient NaCl)	ED-celuloza (gradient NaCl)	ED-celuloza (gradient etanolu)	BDCS	Hydroksyapatyt	Fenaksylowanie	Ami-noacylacja	DEAE-Sephadex	RPC	Fluorescencja		Obecność Y	Czystość %
1	Drożdże		+	+	+				+		+	+	97,5	Wimmer 1968 Schneider 1972
2	Kiełki pszenicy		+									+	90	Yoshikami 1968, 1971
3	Wątroba szczura			+								+	67	Fink 1968, 1971
4	Wątroba królika			+								+	98	Petrissant 1971
5	Wątroba cielęcina							+				+	90	Blobstein 1973
6	Wątroba szczura (płód)		+									+		Fink 1971
7	Retikulocyty królika			+								+		"
8	Wątroba szczura niskoczast. RNA			+								+		"
9	Wątroba szczura mitochondria			+								+		"
10	Hepatoma Novikoff			+								+		Weeren 1972
11	Escherichia coli	+		+								+		Griffiths 1970
12	Halobacterium cutitubrum		+											Miyazaki 1968 Kasai 1971
13	Torulopsis utilis			+								+		White 1973 1973a
14	Drosophila melanogaster	+	+										90	

Z materiałów tych tRNA^{Fen} wyodrębniono metodą chromatografii na DB-celulozie, po uprzedniej aminoacylacji.

Przedstawione powyżej metody otrzymywania tRNA specyficznych dla fenyloalaniny, mimo dużych podobieństw, w niektórych przypadkach wyraźnie się różnią. Prawie wszystkie tRNA^{Fen} zawierają fluoryzujący nukleozyd typu Y, jednak zachowanie tRNA na kolumnie z BD-celulozą jest różne, tRNA z wątroby szczura i królika zostają silniej zatrzymywane na BD-celulozie, niż np. tRNA^{Fen} z wątroby wołu. Różnice w powinowactwie do BD-celulozy mogą być wynikiem różnic w strukturze nukleozydu Y lub tRNA. Dla ukazania podobieństw i różnic w metodach otrzymywania, przedstawiliśmy w tabeli I porównanie etapów oczyszczania fenyloalaninowych tRNA z różnych źródeł.

Jeżeli, jak sądzą niektórzy badacze, metody izolacji fenyloalaninowych tRNA oparte są na różnicach w strukturze zasad Y, to należy wyjaśnić:

- dlaczego tRNA^{Fen} z wątroby szczura oraz wątroby cielęcica mimo zawartości zasady typu Y o tej samej strukturze zachowują się inaczej na kolumnie z BD-celulozą,

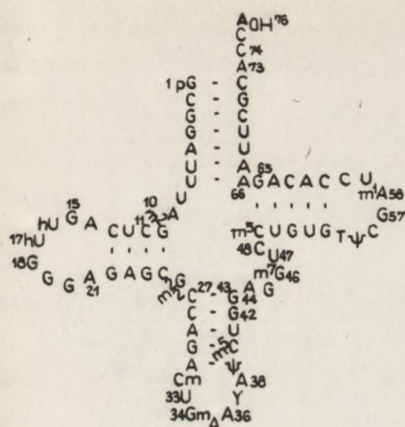
- jakie są przyczyny różnicowania się zachowania tRNA^{Fen} po aminoacylacji fenyloalaniną na izoakceptorowe o różnym stopniu powinowactwa do BD-celulozy,

- czy rzeczywiście tylko obecność zasad typu Y jest przyczyną zatrzymywania i ewentualnie rozdziału tRNA^{Fen} na BD-celulozie.

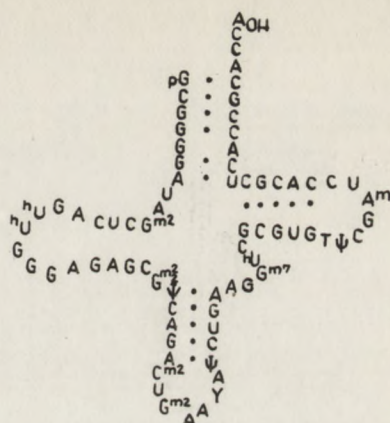
Wyjaśnienie tych kwestii zależeć będzie od znajomości większej ilości struktur zasad typu Y. Musimy mieć również przy tym na uwadze całą skomplikowaną stronę tego problemu. Wydawało się bowiem, że rozszyfrowanie struktury zasady Y z drożdży oraz wątroby ssaków wskaże przyczyny określonych własności tRNA^{Fen}. Niestety różnica w obecności grupy nadtlenkowej nie wyjaśniła różnic w zachowaniu chromatograficznym (Blobstein 1973).

2. STRUKTURA PIERWSZORZĘDOWA tRNA^{Fen}

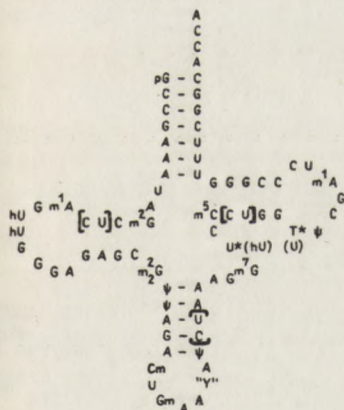
Mimo stosunkowo prostej metody otrzymywania fenyloalaninowych tRNA o dużej czystości, zdołano określić tylko sekwencje polinukleotydów w czterech tRNA^{Fen}, z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, kiełków pszenicy, *Escherichia coli* i wątroby królika, które przedstawiliśmy na rysunkach 1, 2, 3, 4.



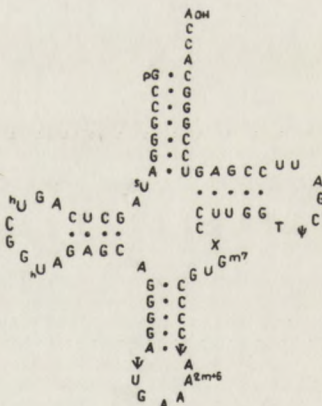
Rys. 1. Struktura tRNA^{Fen} z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (Rajbhandary 1967)



Rys. 2. Struktura tRNA^{Fen} z kiełków pszenicy (Dudock 1969)



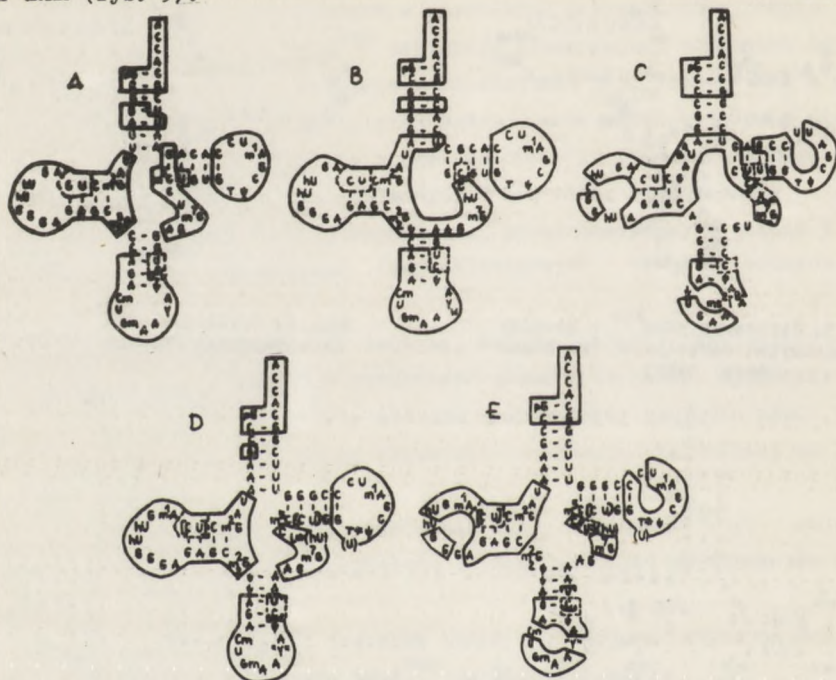
Rys. 3. Struktura tRNA^{Fen} z wątroby królika (Keith 1970)



Rys. 4. Struktura tRNA^{Fen} z *Escherichia coli* (Barrell 1969)

Struktury tRNA^{Fen} z drożdży i kiełków pszenicy są bardzo podobne i stwierdzono tylko 16 różnic w sekwencji nukleotydowej. Oba tRNA mają identyczne pętle dwuhydrourydyny i taki sam dziesięcionukleotyd w ramieniu i pętli antykodonu. Większe różnice można zauważyć w strukturze tRNA^{Fen} z *Escherichia coli*. Występują one zarówno w sparowanych jak i nie związanych wodorowo fragmentach cząsteczki. Fenylalaninowy tRNA z *E. coli* ma inną ilość modyfikowanych nukleozydów oraz różni się trzecią zasadą antykodonu (pozycja "wobble" objęta hipotezą tolerancji Cricka). W przeciwieństwie do pozostałych, tRNA^{Fen} z *E. coli* zawiera tionukleozydy oraz nie zawiera pochodnych metylowanych.

Obecność podobnych fluoryzujących nukleozydów w tej samej pozycji jest jedną z wielu podobieństw między tRNA^{Fen} o znanej strukturze. Porównanie sekwencji wskazuje na duże podobieństwa istniejące w grupie eukariotycznych tRNA (rys. 5).



Rys. 5. Podobieństwa między eukariotycznymi a prokariotycznymi tRNA^{Fen} (Keith 1973) A - podobieństwa między tRNA^{Fen} z drożdży i wątroby królika, B - podobieństwa między tRNA^{Fen} z kiełków pszenicy i wątroby królika, C - podobieństwa między tRNA^{Fen} z *Escherichia coli* i wątroby królika, D - podobieństwa między tRNA^{Fen} z wątroby królika a eukariotycznymi tRNA^{Fen} ; E - podobieństwa między tRNA^{Fen} z wątroby królika a tRNA^{Fen} z organizmu prokariotycznego

Można zauważyć identyczne fragmenty we wszystkich regionach, a różnice tylko w trzech regionach, tj. w ramionach GTWC, aminokwasowym i antykońcu. Podobieństwa w strukturze trzeciorzędowej mogą być dużo większe. Aminoacylacja w układzie heterologicznym eukariotycznych tRNA^{Fen} syntetazami z eukariotów zachodzi równie wydajnie, jak w układzie homologicznym. Stosunkowo więcej różnic istnieje między eukariotycznymi tRNA^{Fen} i jednym prokariotycznym tRNA^{Fen} o znanej strukturze z *E. coli*. Na istnienie tych różnic wskazuje również stosunkowo niska wydajność reakcji aminoacylacji tRNA^{Fen} z *E. coli* aminoacylo tRNA syntetazą z drożdży. Mimo tego nie powinny ująć uwadze wyraźne podobieństwa między eukariotycznymi i prokariotycznymi tRNA^{Fen} , szczególnie w ramieniu dwuhydrourydyny, w końcowym fragmencie ramienia aminokwasowego i części ramienia dodatkowego (Keith 1973).

3. WŁASNOŚCI tRNA^{Pen}

Zasadnicza część przedstawionego materiału dotyczyć będzie tRNA^{Pen} z drożdży, gdyż właśnie ten tRNA był głównym obiektem większości badań. Charakterystykę rozpoczniemy od informacji dotyczących modyfikacji fragmentów tRNA^{Pen}, a następnie omówimy zagadnienia rozpoznawania tRNA przez syntetazy. Opiszemy także ostatnie osiągnięcia w zakresie badania struktury krystalicznej tRNA oraz określanie struktury przestrzennej tych niezwykle interesujących cząsteczek.

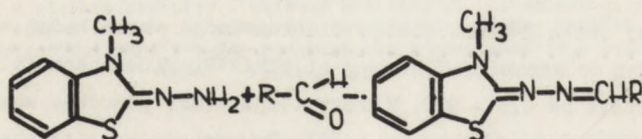
Antykodon z racji oddziaływania z kodonem podczas procesu biosyntezy białka wydaje się być miejscem struktury tRNA bardzo wrażliwym na wszelkie zmiany strukturalne w samym fragmencie, jak i w jego otoczeniu. Ze względu na swoją strukturę tRNA^{Pen} z drożdży jest dobrym obiektem dla tych badań. RajBhandary i Khorana w 1967 roku ustalając sekwencję nukleozydów w cząsteczce tRNA^{Pen} z drożdży znaleźli nukleotydy o silnych własnościach fluorescencyjnych (RajBhandary 1967).

Miejscem występowania tego związku jest pozycja przyległa do antykodonu od końca 3'. Jak się później okazało, obecność tego nukleozydu umożliwiła wiele interesujących badań strukturalnych. Podczas określania dalszych struktur pierwszorzędowych tRNA^{Pen}, stwierdzono również obecność innych związków silnie fluoryzujących. Dzięki tej własności można oceniać obecność lub brak tRNA^{Pen} w określonej frakcji tRNA. Widma fluorescencji wszystkich fenyloalaninowych tRNA wyglądają bardzo podobnie. Widmo emisji fluorescencji ma maksimum przy około 430 nm przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 310 nm, natomiast widmo wzbudzenia przy obserwacji 430 nm ma maksimum przy około 310 nm. Emisję fluorescencji można badać w roztworze zawierającym co najmniej 0,01 mg/ml tRNA^{Pen}. Fluorescencja nie zmienia się w zakresie pH 4,5 - 9,0. Wzrost temperatury powoduje spadek intensywności fluorescencji (Yoshikami 1968). Wykorzystując zjawisko fluorescencji udało się wykazać obecność związków o podobnych własnościach do nukleozydu Y w tRNA^{Pen} z mitochondriów i w niskocząsteczkowym jądrowym RNA z wątroby szczura, co może wskazywać na podobieństwa między mechanizmami syntezy białka w mitochondriach i w cytoplazmie (Fink 1971). Fenyloalaninowy tRNA z *Drosophila melanogaster*, jako jedyny znany tRNA^{Pen} z eukariota, nie zawiera zasady typu Y, czym przypomina tRNA^{Pen} z organizmów prokariotycznych. Rezultaty heterologicznego aminocelowania wskazują, że tRNA^{Pen} z *Drosophila* bardziej przypomina fenyloalaninowy tRNA z drożdży niż z *Escherichia coli* (White 1973, 1973 a).

W roku 1968 Thiebe i Zachau (Thiebe 1968) opracowali prostą metodę wydzielenia fluoryzującej zasady Y z tRNA^{Pen} z drożdży przez hydrolizę w pH 2,9. Zasadę Y można w tych warunkach ekstrahować rozpuszczalnikami organicznymi, natomiast otwarty pierścień rybozy pozostaje w łańcuchu polinukleotydowym. tRNA bez zasady Y (tRNA^{Pen}_{-Y}) w dalszym ciągu zachowuje aktywność akceptorową, natomiast jest słabiej wiązany do rybosomów. Reakcja aminoacylacji tak modyfikowanego tRNA zachodzi tylko w obecności homologicznej syntezy, natomiast nie zachodzi w obecności np. syntetazy z E.coli.

Na uwolnione miejsce po zasadzie Y można wprowadzać inne związki wykazujące fluorescencję. Postępowanie to ma na celu m.in. wykorzystanie zjawiska fluorescencji do badania struktury trzeciorzędowej, a w szczególności odległości antykodon - koniec 3'. Zachau (Wintermeyer 1971) wprowadzał do cząsteczki tRNA związki o silnym efekcie fluorescencyjnym, takie jak proflawina i bromek etidium. Wiązanie między określoną aminą i tRNA tworzy się na skutek powstania N-glikozydu lub zasady Schiffa. Otrzymane tą drogą zmodyfikowane cząsteczki tRNA^{Pen} wykazują pełną aktywność akceptorową, podobnie jak tRNA^{Pen}_{-Y}. Mniejsza aktywność akceptorowa w układzie heterologicznym wskazuje prawdopodobnie na możliwość zmiany konformacji tRNA^{Pen}.

Podobną techniką Cramer (Freist 1972) wprowadził na opuszczone miejsce zasady Y związek o podobnych własnościach fluorescencyjnych, a mianowicie 3-metylo-2-benzotiazolon. Reaguje on z grupą aldehydową w sposób przedstawiony na rys. 6.



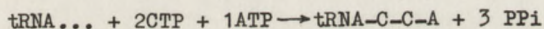
Rys. 6. Reakcja 3-metylo-2-benzotiazolonu ze związkami zawierającymi grupę aldehydową, np: tRNA^{Pen} bez zasady Y (Freist 1972)

Tak modyfikowany tRNA z nową grupą aromatyczną i fluorescencyjną ma podobne własności do natywnego tRNA. Można go między innymi łatwo wydzielać na kolumnach z BD-celulozą. Do cząsteczki tRNA można wprowadzać w określone pozycje także inne związki, zastępując nimi dwuhydrouacyl lub 7-metyloguaninę (Wintermeyer 1971).

Jak już poprzednio wspomnieliśmy, badania funkcji i struktury tRNA wymagają niekiedy wprowadzania w znaną pozycję cząsteczki związków o określonych własnościach spektralnych, reaktywnych grup, a niekiedy nawet cięż-

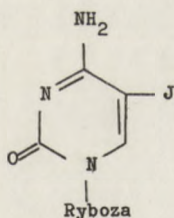
kich, w celu otrzymania pochodnych umożliwiających badania rentgenostrukturalne. Włączanie tych ostatnich można osiągnąć m.in. przez tworzenie kompleksów odpowiednich kationów z cząsteczkami tRNA. Ponieważ cząsteczka tRNA ma dużą ilość anionów fosforanowych, nie można oczekiwać wielkiej specyficzności tworzenia takiego kompleksu. Mimo wszystko wydaje się, że miejscem tego typu oddziaływań jest ramię aminokwasowe.

Cramer (Sprinzl 1972) wprowadził 5-jodocytydynę (rys. 7) w pozycję 75 przy pomocy enzymu nukleotydylotransferazy. Enzym ten w ogólności katalizuje reakcje typu

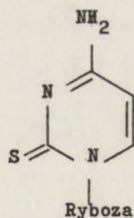


Tak modyfikowany tRNA^{Fen} -A₇₃-C₇₄-j₇₅-A₇₆ jest równie aktywny w procesie włączania aminokwasu jak natywny tRNA. Stałe Michaelisa są takie same dla natywnego i zmodyfikowanego tRNA^{Fen} . Na tej i podobnych obserwacjach oparto przypuszczenie, że obecność 5-jodocytydyny nie zmienia trójwymiarowej struktury fenyloalaninowego tRNA z drożdży. Wprowadzenie atomu ciężkiego do struktury może być bardzo pożyteczne w analizie rentgenostrukturalnej.

Na podobnej zasadzie w miejsce cytozyny 75 w tRNA^{Fen} wprowadzono 2-tiocyzynę, rys. 8. (Sprinzl 1973).

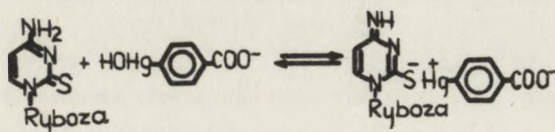


Rys. 7. 5-jodocytydyna



Rys. 8. 2-tiocyzyzna

Nukleotyd ten w cząsteczce tRNA może stanowić specyficzne miejsce oddziaływania ze związkami rtęciowymi. Schemat takiego oddziaływania przedstawia rys. 9.

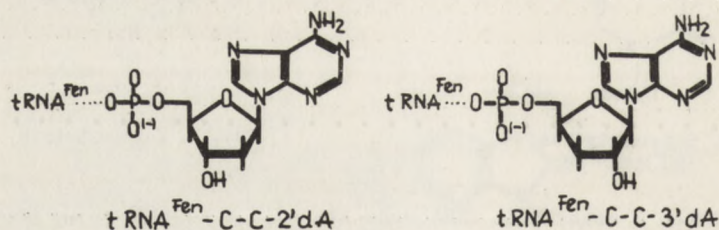


Rys. 9. Reakcja tworzenia kompleksu między 2-tiocyzyną i związkiem rtęciorganicznym (Sprinzl 1973)

Po wprowadzeniu końcowej adenozyiny do cząsteczki przy pomocy tego samego enzymu otrzymujemy tRNA o normalnej zdolności akceptorowej. Dla reakcji z aminoacylo tRNA syntetazą stałe Michaelisa są tego samego rzędu w przypadku modyfikowanego i normalnego tRNA^{Fen} z drożdży. Ponieważ istotne zmiany w strukturze tRNA nie mogłyby być zaakceptowane przez aminoacylo tRNA syntetazę, należy przypuszczać, że zastąpienie cytozyny przez 2-tiocytozynę nie zmienia konformacji końcówki CCA w tym tRNA. Parahydroksyrzędzio-benzoosan reaguje z 2-tiocytydyną tworząc kompleks, którego powstawanie można śledzić spektrofotometrycznie (Scheit 1973). Taki sam kompleks tworzy również 4-tiourydylna w zdenaturowanej formie tRNA^{Fen} z E.coli, natomiast w formie natywnej brak jest oddziaływania. Obserwacje te potwierdzają przypuszczenie, że końcówka C - s² C - A jest w takiej konformacji jak w niemodyfikowanym tRNA^{Fen} z drożdży.

Opisane metody pozwalają modyfikować nukleotyd znajdujący się w pozycji 75 w cząsteczce tRNA^{Fen}. Modyfikacja może zachodzić w pozycjach 2 i 5 pierścienia pirymidyny bez jakiegokolwiek wpływu na aktywność akceptorową preparatu.

Niemniej interesujące wydają się być rezultaty modyfikacji ostatniej pozycji w tRNA^{Fen} z drożdży, czyli końcowej adenozyiny. W pozycję tę wprowadzano związki o strukturze bardzo podobnej do adenozyiny, a mianowicie 2'-dezoksyadenozyinę i 3'-dezoksyadenozyinę (rys. 10).



Rys. 10. tRNA^{Fen} z drożdży zawierający zamiast końcowej adenozyiny 2'-dezoksyadenozyinę i 3'-dezoksyadenozyinę

Otrzymane tRNA z modyfikowanymi końcówkami wykorzystano do badania mechanizmów procesu biosyntezy białka (Sprinzl 1973a). Na rysunku 10 przedstawiono dwa modyfikowane tRNA różniące się w porównaniu do natywnego tRNA brakiem jednej grupy hydroksylowej. Te tRNA^{Fen} - C - C - 2'dA i tRNA^{Fen} - C - C - 3'dA są odporne na działanie utleniające nadjodanu potasu, któ-

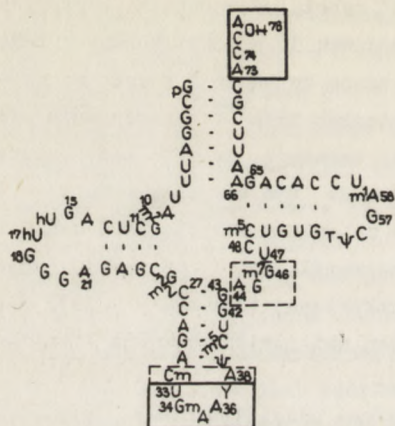
ry powoduje rozczepienie wiązania C2' - C3' rybozy. W warunkach, w których tRNA^{Pen} - CCA jest całkowicie utleniany, końcówka 3' w modyfikowanych tRNA pozostaje nienaruszona. Tę własność wykorzystano do badania różnic w procesie aminoacylacji obu modyfikowanych cząsteczek tRNA^{Pen} w porównaniu do macierzystej cząsteczki. Otrzymane rezultaty wskazują, że tRNA bez grupy 2'-hydroksylowej na końcowej adenozyne nie może być aminoacylowany. Z drugiej strony brak końcowej grupy 3'OH nie ma wpływu na wydajność reakcji aminoacylacji. Stąd wynika konkluzja, że aminoacylacja natywnej formy tRNA^{Pen} z drożdży zachodzi na grupie 2'-hydroksylowej (Sprinzl 1973 a). Utleniony tRNA^{Pen} CCA nie jest ani substratem, ani inhibitorem dla fenyloalanylo-tRNA-syntetazy (Von der Haar 1971).

Ponieważ sekwencja CCA jest głównym miejscem oddziaływania z syntetazą, modyfikacja tego fragmentu tRNA może stanowić metodę badania reakcji aminoacylacji. Znalaziono zależność między obecnością końcówki CCA a poziomem aminoacylacji w tRNA^{Pen} z *Escherichia coli* (Tal 1972). Stwierdzono, że tRNA-CC przyłącza przy pomocy nukleotydylo-tRNA transferazy AMP, ale nie CMP. tRNA-C przyłącza CMP i AMP w stosunku molowym 1 : 1. tRNA bez CCA przyłącza natomiast CMP i AMP w stosunku molowym 2 : 1. Zbadano również, że tRNA-CA nie jest aminoacylowany mieszaniną aminokwasów, co wskazuje jednoznacznie, że pełna sekwencja CCA jest absolutnym warunkiem procesu aminoacylacji.

Dla pełnego zrozumienia funkcji tRNA konieczna jest znajomość przestrzennej budowy cząsteczki tRNA, a szczególnie informacja, które segmenty lub części pętli w strukturze tRNA są dostępne dla oddziaływania z innymi cząsteczkami, a które zaangażowane są w tworzenie struktury wyższego rzędu. Do wyjaśnienia tego problemu stosuje się wiele technik eksperymentalnych, między innymi wiązanie komplementarnych oligonukleotydów (Pongs 1973). Stwierdzono, że następujące sekwencje oligonukleotydów w cząsteczce tRNA^{Pen} z drożdży są dostępne dla wiązania komplementarnych zasad (rys. 11):

- sekwencja nukleotydów 33 - 37 w pętli antykodonu,
- sekwencja nukleotydów 44 - 46 w ramieniu dodatkowym,
- trójnukleotyd CCA.

Dowody otrzymane z chemicznej modyfikacji wskazują, że dwuhydrourydyny w pozycjach 16 i 17, guanozyna w pozycji 20 w ramieniu dwuhydrourydyny, guanozyna w pozycji 34, adenozyne w pozycjach 35, 36 i 38, nukleotydy Y w pozycji 37 w pętli antykodonu oraz końcówka CCA występują we fragmentach jednociowych tRNA^{Pen} z drożdży. Ponieważ komplementarne oligonukleotydy nie wiążą się do pętli T_ψC ani też do innych regionów, należy przypuszczać, że te regiony tRNA^{Pen} z drożdży nie są dostępne (Pongs 1971). Istotne było



Rys. 11. Struktura tRNA^{Phe} z drożdży, z zaznaczonymi miejscami wiązania komplementarnych oligorybonukleotydów (linia ciągła) oraz sekwencjami częściowo dostępnymi dla wiązania (linia przerywana)

sprawdzenie zmian w wiązaniu oligomeru do antykodonu po usunięciu zasady Y z cząsteczki tRNA^{Phe}. Brak zasady Y powoduje zmniejszenie się stałych asocjacji. Przyczyną tego może być zniszczenie sztywnej konformacji po usunięciu zasady Y. Bardziej labilna pętla antykodonu nie jest zdolna do wiązania oligonukleotydów w takim stopniu jak poprzednio (Maelicke 1973; Cameron 1973; Pongs 1973a). Innymi słowy usunięcie zasady Y z tRNA^{Phe} powoduje osłabienie oddziaływań kodon-antykodon. Obecność modyfikacyjnej puryny przyległej do antykodonu jest więc ważnym czynnikiem dla stabilizacji tych oddziaływań, na co

wskazują również następujące informacje:

- stała równowagi wiązania tetranukleotydu UUCA, który jest komplementarny do trójnukleotydu antykodonu i pirymidynowego nukleozydu znajdującego się obok antykodonu od strony 5', wynosi około 80 000 l/mol, w przypadku, kiedy w cząsteczce znajduje się modyfikowana zasada, oraz 15 000 jeżeli brak jest modyfikowanego nukleozydu w pozycji obok antykodonu od strony 3',
- oddziaływanie wzrasta ze wzrostem stopnia modyfikacji zasady,
- oddziaływanie maleje po usunięciu sąsiadującej z antykodonom zasady.

Jak już poprzednio wspomnieliśmy tRNA^{Phe}_{-Y} nie tworzy kompleksu z mRNA na rybosomie (Thiebe 1968). Obecność zasady Y wpływa również prawdopodobnie na konformację innych fragmentów cząsteczki. Stwierdzono, że wiązanie oligonukleotydu UCCC do pętli dwuhydrourydyny jest 5 razy słabsze, gdy brak jest w cząsteczce zasady Y.

Dowód ten nie jest jednak przekonujący, ponieważ nie wiadomo, czy kwaśne środowisko (pH 2,9) nie wywołuje już innych zmian w cząsteczce. Działanie kwasem na tRNA^{Tyr} z E.coli powoduje również zmniejszenie stałej asocjacji i dlatego należy ustalić wpływ tego czynnika przed wyciągnięciem ostatecznych wniosków (Cameron 1973).

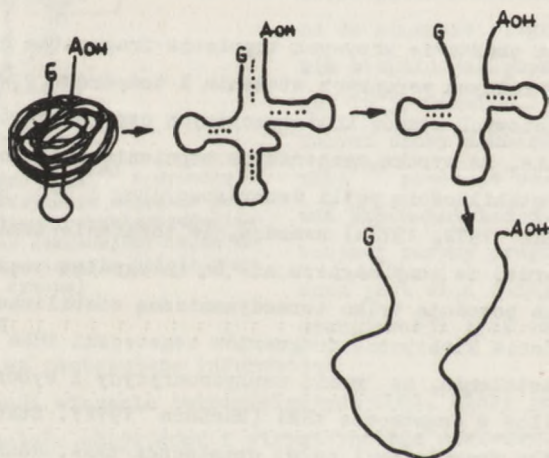
Metoda wiązania oligonukleotydów do tRNA jest pożytecznym sposobem badania zmian struktury tRNA. Zastosowanie tej metody do chemicznie lub biochemicznie modyfikowanych tRNA prowadzi do uzyskania istotnych struktural-

nych informacji. Wiązanie oligonukleotydów do ramienia dodatkowego i do końcówki CCA może zmieniać strukturę tych fragmentów cząsteczki i dlatego nukleozydy te mogą stać się dostępne, mimo że uprzednio nukleozydy w tych częściach tRNA były odporne np. na chemiczną modyfikację. Mimo uzyskania tą metodą szeregu informacji w dalszym ciągu niewiele można powiedzieć o konformacji cząsteczek tRNA^{Phe} w roztworze. Do tego typu badań stosuje się bardziej precyzyjne metody kinetyczne, termodynamiczne i spektralne. W literaturze istnieje wiele doniesień na ten temat, nie zawsze zgodnych co do interpretacji.

Römer (1970) na podstawie krzywych topnienia fragmentów oraz całej cząsteczki tRNA^{Phe} w różnych warunkach stężenia i temperatury wykazał istnienie pięciu przejściowych stanów konformacyjnych cząsteczki tego tRNA. Podał on jednocześnie, że wysoka temperatura topnienia cząsteczki tRNA jest spowodowana dużą stabilnością pętli dwuhydrourydyny i T ψ C. Biltonen i Levy (Levy 1972; Rialdi 1972, 1972a) uważają, że topnienie tRNA^{Phe} odbywa się w dwóch etapach oraz, że jony magnezu nie są integralną częścią aktywnej konformacji tRNA, a powodują tylko termodynamiczną stabilizację struktury (Levy 1972). Badania kinetyczne fragmentów cząsteczki tRNA^{Phe} potwierdziły wcześniejsze ustalenia, że ramię dwuhydrourydyny i rybozylotymidyny są najbardziej stabilne w cząsteczce tRNA (Harbers 1972). Stabilność antykodonu jest różna dla fragmentów i całej cząsteczki tRNA. Różnice w trwałości pochodzą z sił elektrostatycznego odpychania ujemnie naładowanych grup fosforanowych, co jest zgodne z różnicami w temperaturze topnienia przy wysokiej sile jonowej. Przypuszcza się, że na stabilność fragmentu antykodonowego wpływa akumulacja ujemnego ładunku przyległych ramion dwuhydrourydyny i T ψ C. Korelacja między temperaturą topnienia a etapami przejściowymi między spiralą a kłębkiem jest trudna do wyjaśnienia. Pary A - U mają duży udział w destabilizacji struktury. W ramieniu aminokwasowym trzy pary A - U występują na jednym końcu. Z powodu mniejszej stabilności termodynamicznej mogą one topnieć w niższych temperaturach niż pary G-C. Jednakże w natywnej cząsteczce tRNA pary A - U są stabilizowane przez wpływ reszty cząsteczki. Zauważono również, że podczas procesu rekombinacji połówek ramienia aminokwasowe i antykodonowe ulegają parowaniu, natomiast nie zauważono tego efektu w ramieniu dwuhydrourydyny i aminokwasowym. Stwierdzono również, że część ramienia aminokwasowego zajmuje miejsce poza cząsteczką i nie bierze udziału w tworzeniu struktury trzeciorzędowej (Riesner 1973). Na podstawie tych badań można było wysunąć wnioski co do przebiegu procesu termicznej denaturacji cząsteczki tRNA^{Phe}. Riesner (1973) zaproponował na-

stępującą sekwencję przejść konformacyjnych podczas procesu topnienia (rys. 12):

- pod wpływem temperatury struktura trzeciorzędowa przekształca się w strukturę przypominającą model liścia koniczyny,
- w następnym etapie topią się ramię antykodonowe i aminokwasowe,
- w ostatniej fazie ulegają denaturacji fragmenty dwuhydrourydyny i rybozylotymidyny.



Rys. 12. Etapy przemian strukturalnych tRNA^{Phe} z drożdży podczas ogrzewania

Te obserwacje zostały potwierdzone niezależnie przez Cole (1972, 1972 a), który zaproponował diagramy równowagi fazowej określające przejścia konformacyjne. Konformację występującą w niskiej temperaturze i przy dużym stężeniu soli nazywa się natywną. W wysokim stężeniu soli i średnich zakresach temperatury (40 - 50°C) struktura trzeciorzędowa przechodzi w konformację podobną do liścia koniczyny. W niskim stężeniu soli i przy niskiej temperaturze trzeciorzędowa struktura przechodzi w mniej upakowaną strukturę niepodobną do liścia koniczyny. Przy wysokiej temperaturze i wysokim stężeniu soli powstaje kłębek.

Nie mniej interesujących informacji o strukturze tRNA w roztworze dostarczyły widma wysokorozdzielczej spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego - NMR (Lightfoot 1973). Analiza 300 MHz widm NMR fragmentów tRNA w świetle teorii przesunięć diamagnetycznych pozwoliła wyznaczyć prawie wszystkie sygnały rezonansowe w cząsteczce tRNA^{Phe} z drożdży. Sygnały par zasad występujących na końcach fragmentów spiralnych cząsteczki mogą dostarczać cennych informacji o strukturze trzeciorzędowej, ponieważ są

one czułe na względną orientację bezpośrednio przyległych par zasad w pojedynczym łańcuchu cząsteczki. W przypadku tRNA^{P_{en}} parami zasad, o których można uzyskać takie informacje, są: A - U w pozycji 7 i 31, G - C w pozycjach 10, 13, 27, 49. Niestety sygnały rezonansowe pary A - U w pozycji 7 i A-U w pozycji 31 mają bardzo małe przesunięcia (0,1-0,2 ppm) w stosunku do sąsiedniej zasady, która znajduje się w pojedynczym łańcuchu. Pary zasad G-C dają sygnały rezonansowe występujące w rejonie widma NMR, w którym jednoznaczna interpretacja jest trudna. Bardzo dokładna analiza mimo wszystko może dostarczyć pewnych informacji strukturalnych. Wykorzystuje się do tego celu między innymi widma fragmentów cząsteczki tRNA^{P_{en}}. Analiza i integracja widm NMR przy 220 MHz wskazuje na obecność 18[±]1 protonów w rejonie - 11 do - 15 ppm (Wong 1972, 1973). Zastosowanie przyrządu o większej rozdzielczości (300 MHz) pozwoliło znaleźć w tym fragmencie widma sygnały 19 protonów. Z analizy modelu liścia koniczyny tRNA^{P_{en}} wynika natomiast 20 par zasad. Jest to spowodowane faktem, że para G-U w pozycji 4 nie ma udziału w sygnałach rezonansowych w rejonie niskiego pola, co może wskazywać na brak wiązania wodorowego tych zasad (Shulman 1973).

Ogólnie można powiedzieć, że obliczona z modelu liczba par zasad i miejsce ich występowania zgadza się z informacjami uzyskanymi z widm NMR. Lepsza zgodność między obserwowanymi i obliczonymi położeniami protonów związanych wodorowo we fragmentach struktury tRNA niż w całej cząsteczce, wskazuje na odchylenia w natywnej strukturze tRNA^{P_{en}} od regularnej spirali A'RNA przyjętej do obliczeń (Arnott 1971).

Bardzo dużo informacji uzyskano z badań niskokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego roztworów tRNA. Ustalono, że promień obrotu cząsteczki wynosi 24,4 Å. Ciężar cząsteczkowy oznaczony tą metodą wynosił 26 100 w porównaniu do 24 890 obliczonego z sekwencji nukleotydów. Objętość cząsteczki wynosi 4,1 x 10⁴ Å³. Objętość obliczona na podstawie wymiarów komórki elementarnej i liczby cząsteczek w niej zawartych wynosi 3,84 x 10⁴ Å³. (Piltz 1971). Dla rozwiązania trzeciorzędowej struktury tRNA potrzebne są obrazy wysokorozdzielczej dyfrakcji promieni rentgenowskich kryształów tRNA oraz pochodnych tRNA zawierających między innymi metale ciężkie. Opracowano w tym celu wiele metod krystalizacji specyficznych tRNA (Cramer 1970; Brown 1972; Ichikawa 1972). Fenyloalaninowy tRNA z drożdży krystalizuje w różnych układach krystalograficznych (tabela II). Stwierdzono, że w określonych warunkach stężenia spermidyny i jonów magazynu tRNA^{P_{en}} krystalizuje w układzie rombowym w prostej komórce elementarnej o wymiarach a = 33,2 Å, b = 56,1 Å, c = 161 Å. Dla tych kryształów otrzymano obraz dyfrakcyjny z rozdzielczością 2,3 Å (Kim 1971).

Tabela II

Polimorfizm kryształów tRNA^{Pen} z drożdży (Kim 1973a)

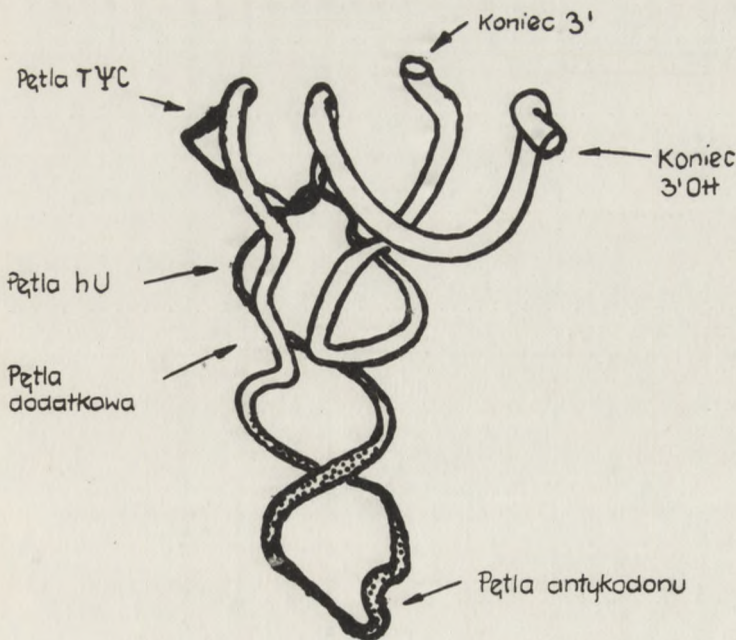
Układ kryształograficzny	Grupa przestrzenna	a (Å)	b (Å)	c (Å)	alfa (°)	Objętość komórki element. (Å ³)	Liczba cząsteczek w jednostce asymetrycznej	Rozdzielczość obrotowa frakcyjnego (Å)	Czynnik wytrącający
Jednostkowy Rombowy	P2 ₁	33	56	63	90	11,7x10 ⁴	1	4	a
	P2 ₁ 2 ₂ 1	30-33	53-56	110-161		19,5-29,8x10 ⁴	1	2,3	a,b
Heksagonalny	P2 ₁ 2 ₁ 2	29	48	104		14,5x10 ⁴	1	6,5	a
	O222 ₁	60,6	85,0	234		121x10 ⁴	2	15	b,c
	P6 ₂ 22	82		236		137x10 ⁴	1	8	a
	P6 ₁ 22	104		193		181x10 ⁴	1	7	a,b
Trygonalny Regularny	R32	126		302		415x10 ⁴	6	7	b,c
	I4 ₁ 32	154	154	154		365x10 ⁴	1	3	a

Czynniki wytrącające: a - izopropanol,

b - 2-metylo, 2,4 pentanodiol,

c - t-butanol

Z analizy upakowania w komórce elementarnej ustalono, że cząsteczka tRNA^{Fen} ma wymiary $80 \times 33 \times 28 \text{ \AA}$. Jedną z niezwykłych cech związanych z kryształami rombowymi tRNA^{Fen} ($P2_12_1$) jest zjawisko zmniejszania komórki elementarnej podczas suszenia preparatów. W trakcie tego procesu osie a i b zmieniają się niewiele, natomiast oś c zmniejsza się z 161 do 128 \AA , a nawet do 109 \AA (tab. III). Upakowanie cząsteczki wzdłuż osi a i b jest dużo większe niż wzdłuż osi c. Możliwe jest, że wolne miejsce jest okupowane przez cząsteczki sperminy, konieczne dla tworzenia się kryształów. Cząsteczki tRNA jako bardzo labilne mogą ulegać zmianom konformacyjnym podczas skracania osi c (Kim 1973 a,b). Kształt cząsteczki otrzymany z obrazów dyfrakcyjnych przy rozdzielczości $5,5 \text{ \AA}$ (Kim 1972) jest wyraźny z wyjątkiem jednego fragmentu, którego nie można było zidentyfikować. Przy rozdzielczości 4 \AA stwierdzono obecność regionu nadającego cząsteczce tRNA^{Fen} wygląd podobny do litery L, co jest widoczne na rys. 13 (Kim 1973). Odległość między antykodonem oraz pętlą rybozylotymidyny wynosi 77 \AA , a między antykodonem i końcówką CCA - 82 \AA . Na rysunku 13 można zauważyć, że główny szkielet cząsteczki składa się z dwóch fragmentów o strukturze spiralnej. Części te połączone są w dwóch miejscach. Nukleozydy w pozycjach 8 i 9 łączą końcówkę CCA z ramieniem dwuhydrourydy. Drugi mostek zawiera 5 nukleotydów ramienia dodatkowego i łączy ramię T Ψ C z antykodonem.



Rys. 13. Ułożenie łańcucha polinukleotydowego tRNA^{Fen} na podstawie wyników analizy rentgenostrukturalnej (Kim 1973)

Zmiany wymiarów komórki elementarnej kryształów tRNA^{Fen} z drożdży (Kim 1973 b)

Typ komórki	Grupa przestrzenna	a (Å)	b (Å)	c (Å)	Objętość komórki asymetrycznej (Å ³)	% H ₂ O ^x obliczony	Rozdzielczość obrazu dyfrakcyjnego (Å)
1	P2 ₁ 2 ₁ 1	33	56	161	7,5 x 10 ⁴	71	2,3
2	P2 ₁ 22 ₁	33	56	128	5,95 x 10 ⁴	63	3,7
3	P2 ₁ 22 ₁	33		117			7,0
4	P2 ₁ 22 ₁	30	53	109	4,35 x 10 ⁴	50	11,0
5	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	29	48	104	3,63 x 10 ⁴	40	6,5
6	P2 ₁	33	56	63	5,8 x 10 ⁴	63	3,5

^x W obliczeniach przyjęto, że średnia objętość cząsteczki wynosi 0,505 Å³

Jak pokazano w niniejszym rozdziale tRNA specyficzny dla fenyloalaniny stanowił podstawę badań na różnych płaszczyznach, począwszy od wiązania do rybosomów, poprzez bardzo subtelne metody kinetyczną, aż do ustalenia struktury kryształu. Struktura krystaliczna tRNA^{Phe} z drożdży jest pierwszą dla tego typu związków, co otwiera nowy etap badań strukturalnych w dziedzinie kwasów nukleinowych. Pozostaje jeszcze wiele ciekawych zagadnień dotyczących tRNA^{Phe}, które dla przejrzystości pracy umieszczono w innych rozdziałach. Należy stwierdzić, że ostateczne rozwiązanie problemu struktury fenyloalaninowych i innych tRNA będzie wynikiem stosowania różnych metod fizykochemicznych. Obecnie możemy już na pewno powiedzieć, że zaproponowany przez R.W. Holleya w roku 1965 model liścia koniczyny w rozwrotce został całkowicie potwierdzony wieloma metodami. W tworzeniu struktury wyższego rzędu prawdopodobnie nie biorą udziału siły wiązań wodorowych a tylko siły elektrostatyczne oddziaływań warstwowych. Oprócz wyraźnych dowodów z magnetycznego rezonansu jądrowego wskazują na to również rezultaty badań termodynamicznych oraz pewne cechy struktury kryształu.

LITERATURA

- Arnott S., (1971) w *Progress in Biophysics and Molecular Biology* (red. Boutley J.A.V., Noble D., Pergamon Press, Oxford, tom 22 str. 179.
- Blobstein S., Grunberger D., Weinstein I.B., Nakanishi K., (1973); *Biochemistry*, 12, 188.
- Brown R.S., Clark B.F.C., Coulson, R.R., Finch J.T., Klug A., Rhodes D., (1972) *Eur. J. Biochem.*, 31, 130.
- Cameron V., Uhlenbeck O.C., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 50, 635.
- Cole P.E., Yang S.K., Crothers D.M., (1972) *Biochemistry*, 11, 4358.
- Cole P.E., Crothers D.M., (1972a), *Biochemistry*, 11, 4368.
- Cramer F., Von der Haar F., Saenger W., Schlimme E., Schulz G.E., (1970); *J. Mol. Biol.*, 51, 523.
- Dudock B.S., Katz G., Taylor E.K., Holley R.W., (1969) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 62, 941.
- Fink L.M., Goto T., Frankel F., Weinstein I.B., (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32, 963.
- Fink L.M., Lenks K.W., Goto T., Weinstein I.B., (1971) *Biochemistry*, 10, 1873.
- Freist W., Maelicke A., Sprinzl M., Cramer F., (1972) *Eur. J. Biochem.*, 31, 215.

- Gillam I., Millward S., Blew D., Tigerstrom M., Wimmer E., Tener G.M., (1967) *Biochemistry*, 6, 3043.
- Griffiths E., (1970) *FEBS Letters*, 10, 225.
- Hancher C.W., Phares E.F., Novelli G.D., Kelmers A.D., (1969) *Bio-technol.Bioeng.*, 11, 1055.
- Hancock R.L., Ghertner L., Douggan D., (1971) *Physiol.Chem.Phys.*, 3, 559.
- Harbers K., Thiebe R., Zachau H.G., (1972) *Eur.J.Biochem.*, 26, 132.
- Holley R.W., (1963) *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 10, 186.
- Holley R.W., Everett G., Madison J.T., Marquisee M., Merrill S.H., Pen-
swick J.R., Zamir A., (1965) *Science*, 147, 3664.
- Ichikawa T., Sandaralingham M., (1972) *Nature New Biology*, 263, 174.
- Kasai H., Goto M., Takemura S., Goto T., Matsuura S., (1971) *Tetra-
hedron Letters*, 2275.
- Keith G., Picaud F., Wissenbach J., Ebel J.P., Petrissant G., Dir-
heimer G., (1973) *FEBS Letters*, 31, 345.
- Kim S.H., Quigley G., Suddath F.L., Rich A., (1971) *Proc.Nat.Acad.Sci.
USA*, 68, 841.
- Kim S.H., Quigley G., Suddath F.F., McPherson A., Sneden D., Kim J.J.,
Weinzierl J., Blatman P., Rich A., (1972) *Proc.Nat.Acad.Sci.*, USA,
69, 3746.
- Kim S.H., Quigley G., Suddath F.L., McPherson A., Sneden D., Kim J.J.,
Weinzierl J., Blatman P., Rich A., (1973) *Science* 179, 285.
- Kim S.H., Quigley G., Suddath F.L., McPherson A., Sneden D., Kim J.J.,
Weinzierl J., Rich A., (1973a) *J.Mol.Biol.*, 75, 421.
- Kim S.H., Quigley G., Suddath F.L., McPherson A., Sneden D., Kim J.J.,
Weinzierl J., Rich A., (1973b) *J.Mol.Biol.*, 75, 429.
- Levy J., Rialdi G., Biltonen R., (1972) *Biochemistry*, 11, 4138.
- Levy J., Biltonen R., (1972a) *Biochemistry*, 11, 4145.
- Ligwtfoot D.R., Wong, K.K., Kearns D.R., Reid B.R., Shulman R.G., (1973)
J.Mol.Biol., 78, 71.
- Maelicke A., Von der Haar F., Cramer F., (1973) *Biopolymers* 12, 27.
- Miyazaki M., Takemura S., (1968) *J.Biochem.*, 63, 637.
- Petrissant G., Boissnard M., Puissant C., (1971) *Biochimie*, 53, 1105.
- Pilz I., Kratky O., Von der Haar F., Cramer F., (1971) *Eur. J.Biochem.*
18, 438.
- Pongs O., Reinwald E., Stamp K., (1971) *FEBS Letters*, 16, 275.
- Pongs O., Bald R., Reinwald E., (1973) *Eur.J.Biochem.*, 32, 117.
- Pongs O., Reinwald E., (1973a) *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 50, 357.

- RajBhandary U.L., Chang S.H., Stuart A., Faulkner R.D., Hoskinson R.M., Khorana H.G., (1967) Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 57, 751.
- Rialdi G., Levy J., Biltonen R., (1972) Biochemistry, 11, 2472.
- Riesner D., Maass G., Thiebe R., Philipsen P., Zachau G.H., (1973) Eur.J.Biochem., 36, 76.
- Rogg H., Wehril W., Staehelin M., (1969) Biochim.Biophys. Acta,195, 13.
- Römer R., Riesner D., Maass G., (1970) FEBS Letters, 10, 352.
- Scheit K.H., Faerber P., (1973) Eur.J.Biochem., 33, 545.
- Schneider D., Solfert R., Von der Haar F., (1972) Hoppe-Seylers Zeitschrift Phys. Chem., 353, 1330.
- Shulman R.G., Hilbers C.W., Wong Y.P., Lightfoot D.R., Reid B.R., Kearns D.R., (1973) Proc.Nat.Acad.Sci. USA 70, 2042.
- Shulman R.G., Hilbers C.W., Kearns D.R., Reid B.R., Wong Y.P.,(1973a) J.Mol., 78, 57.
- Sprinzel M., Von der Haar F., Schlimme E., Sternbach H., Cramer F., (1972) Eur.J.Biochem., 25, 262.
- Sprinzel M., Scheit K.H., Cramer F., (1973) Eur.J.Biochem., 34, 306.
- Sprinzel M., Scheit K.H., Sternbach H., Von der Haar F., Cramer F., (1973a) Biochem.Biophys.Res.Comm., 51, 881.
- Tal J., Deutcher M.P., Littauer U.Z., (1972) Eur.J.Biochem., 28, 478.
- Tener G.M., Gillam I., Tigerstrom M., Wimmer E., Millward S., Blew D., Maxwell I., (1971) Materiały 7th International Congress Biochemistry, Tokyo.
- Thiebe R., Zachau H.G., (1968) Eur.J.Biochem., 5, 546.
- Von der Haar F., Schlimme E., Gomez-Guillen M., Cramer F., (1971); Eur.J.Biochem., 24, 296.
- Weeren H.O., Ryon D., Heartherly D.E., Kelmers A.D.,(1970);Biotechnol. Bioeng., 12, 889.
- Weeren H.O., Ryon A.D., Kelmers A.D., (1972) Biotechnol. Bioeng., 14, 617.
- White B.N., Tener G.M., (1973) Can.J.Biochem., 51, 896.
- White B.N., Tener G.M., (1973a) Biochim.Biophys.Acta, 312, 267.
- Wimmer E., Maxwell I.H., Tener G.M., (1968) Biochemistry, 7, 2623.
- Wintermeyer W., Zachau H.G., (1971) Letters, 18, 214.
- Wong Y.P., Kearns D.R., Reid B.R., Shulman R.G., (1972) J.Mol. Biol., 72, 741.
- Wong Y.P., Kearns D.R., Shulman R.G., Yamane T., Chang S., Chirikjani J.G., Fresco J.R., (1973); J.Mol.Biol., 74, 403.

Yoshikami D., Katz G., Keller E.B., Dudock B.S., (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 166, 714.

DYSKUSJA

W dyskusji interesowano się głównie problemami struktury trzeciorzędowej fenyloalaninowych tRNA, a szczególnie dowodami eksperymentalnymi na podstawie których opierano wnioski o subtelnych cechach struktury. Głównie interesowano się wnioskami dotyczącymi kolejności denaturacji termicznej poszczególnych fragmentów struktury tRNA oraz założeniami teoretycznymi analizy widm magnetycznego rezonansu jądrowego.

BADANIA SPEKTROSKOPOWE I STRUKTURALNE ZASAD „Y”

STRESZCZENIE

W pracy przedstawiono informacje literaturowe na temat zasad typu Y występujących w fenyloalaninowych tRNA. Przedyskutowano własności fluorescencyjne tych związków oraz widma CD, UV, NMR i masowe. Dotąd znane są trzy hydrofobowe zasady:

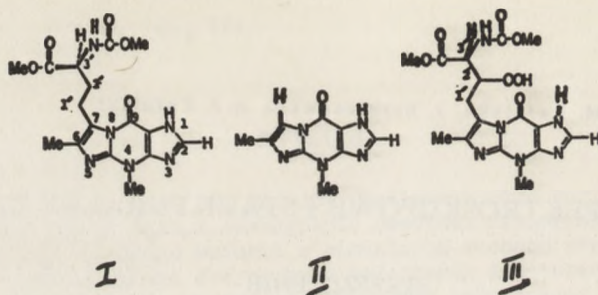
- zasada Y w tRNA^{P_{en}} drożdżowym,
- zasada Y_t z *Torulopsis utilis*,
- zasada peroksy - Y z wątroby, kiełków pszenicy i z łubinu.

Uwagi ogólne:

Zasady Y należą do najbardziej skomplikowanych jakie znaleziono w jakichkolwiek tRNA. Zajmują one położenie przyległe do końca 3' antykodonu oraz, jak wykazały ostatnie badania rentgenograficzne w kryształach tRNA^{P_{en}} z drożdży, są one wysunięte na zewnątrz cząsteczki tRNA^{P_{en}} [12]. Zasady te mają pewien, jeszcze bliżej nie wyjaśniony wpływ na oddziaływanie kodon - antykodon. Charakteryzują się one niezwykleymi własnościami fluorescencyjnymi i m.in. dzięki nim mają zastosowanie do badań trzeciorzędowej struktury tRNA^{P_{en}}. Jak dotąd oznaczono strukturę trzech hydrofobowych zasad występujących w fenyloalaninowych tRNA otrzymanych z różnych źródeł:

zasady Y (I) z drożdży piekarniczych [1,2,3,4] (rys. 1),
zasady Y_t (II) z drożdży *Torulopsis utilis* [5],
zasady peroksy - Y (III) z wątrób wołu, cielęcina, szczura i kurczęcia [6,7]
Tę ostatnią znaleziono również w tRNA^{P_{en}} wyodrębnionym z łubinu *Lupinus luteus* [8].

D. Yoshikami, G. Katz, E.B. Keller i B.S. Dudock [9] prowadzili badania nad zasadą Y_w w tRNA^{P_{en}} z kiełków pszenicy. Stwierdzili oni, że ten fluorescujący związek chromatograficznie i chemicznie jest podobny do zasady Y w tRNA^{P_{en}} z wątrób wołu. Może on być najprawdopodobniej określanym wzorem III.



Rys. 1. Struktury zasad: Y z drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae* (I), Y_m z drożdży *Torulopsis utilis* (II), peroxy-Y z wątroby ssaków i łubinu żółtego (III)

R.L. Hancock, L. Ghertner D. Dougan [10] badali własności zasady Y z wątroby myszy. Jednakże nie podali oni jej struktury ograniczając się tylko do badań własności fluorescencyjnych.

Izolacja zasad Y przebiega podobnie, niezależnie od tego z jakich źródeł pochodzi tRNA. Oczyszczony tRNA^{Fen} inkubuje się w temperaturze 37° C, przy pH 2,9 w ciągu 3-5 godz. W tych warunkach następuje odszczepienie zasady Y. Po wyekstrahowaniu z roztworu tRNA oczyszcza się ją metodą chromatografii cienkowarstwowej.

Jakkolwiek izolacja tych zasad z tRNA^{Fen} jest stosunkowo prosta, przez dłuższy czas nie znano ich struktury. Duże osiągnięcia w tym zakresie odnieśli Nakanishi i współpracownicy, podając budowę zasady Y i peroksy - Y, oraz Kasai i Goto, którzy przedstawili strukturę zasady Y_t . Badania strukturalne tych zasad opierały się na interpretacji widm absorpcyjnych, fluorescencyjnych, wibracyjnych, wysokorozdzielczych widm masowych, NMR i CD. W niniejszej pracy zostaną omówione trzy rodzaje zasad (I-III), ich własności spektralne i strukturalne.

Z a s a d a Y (I)

Związek ten występuje w fenyloalaninowym tRNA wyodrębnianym z drożdży piekarniczych. Koji Nakanishi i współpr. [1,2] zaproponowali dla zasady Y strukturę, która jest wyrażona wzorem I. Strukturę ustalono na podstawie danych spektralnych, prowadzonych na 300 μ g natywnej zasady oraz na syntetycznych modelach. Konfiguracja L była ustalona dla pojedynczego centrum asymetrycznego w bocznym łańcuchu (Funamizu i współpr. 1971). Surową zasadę (500 μ g) wyodrębnioną uprzednio z tRNA^{Fen} drożdżowego oczyszczano metodą chromatografii cienkowarstwowej, używając fazy rozwijającej: octan

etylu - n-propanol-woda. Silnie fluoryzujące pasmo charakteryzowało się R_F 0,71 [1]. Oprócz tego pasma pojawiały się inne o R_F 0,95, jednakże nie było ono dalej badane ze względu na bardzo słabą fluorescencję. Widma UV syntetycznej i naturalnej zasady Y (I) są prawie identyczne. Wartości zestawione w tabeli I dotyczą jedynie widm UV syntetycznej zasady (w H_2O). Autorzy (Koji Nakanishi i współpr. [2]) podali jedynie, że widmo związku naturalnego jest podobne.

T a b e l a I

Charakterystyka spektralna w ultrafiolecie syntetycznej zasady Y

Rozpuszczalnik	Położenie maksimum absorpcji i wartość molowego współczynnika ekstynkcji		
	Maksimum A	Maksimum B	Maksimum C
Woda	235 (32000)	263 (5800)	313 (5000)
Woda (pH = 2,0)	233 (35600)	286 (7600)	
Woda (pH = 10,0)	236 (32800)	265 (6800)	304 (7200)
Metanol	235 (48100)	263 (8200)	310-315 (7400)

Natomiast w swej poprzedniej pracy [1] przedstawili dane UV (10% MeOH) dla naturalnej zasady (tabela II).

T a b e l a II

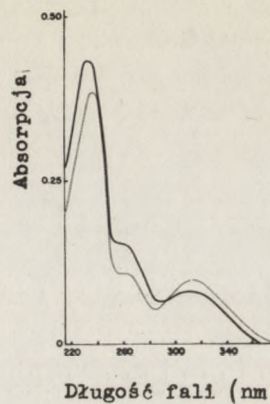
Charakterystyka spektralna w ultrafiolecie naturalnej zasady Y

Rozpuszczalnik	Położenie maksimum absorpcji i wartość molowego współczynnika ekstynkcji nm (ϵ)		
	Maksimum A	Maksimum B	Maksimum C
10% Metanol	235 (23500)	263 (4500)	313 (3500)
10% Metanol (pH=2,1)	235 (22800)	285 (4615)	-
10% Metanol (pH=9,4)	236 (23500)	264 (4400)	303 (43500)

Rys. 2. pozwala na porównanie widm UV zasad Y i peroksy -Y [6].

Obie zasady (syntetyczna i naturalna) wykazują silne własności fluorescencyjne. Wzbudzone światłem λ 320 nm, fluoryzują przy λ 445 nm.

Widma IR były wykonane w KBr. Zebrane z nich informacje zestawione są w tabeli III.



Rys. 2. Widma UV zasady Y^+ z drożdżowego tRNA^{Phe} (-----) i zasady peroksy- $Y^+Y^+Y^+$ z tRNA wątroby cielęcía. Widma wykonano w 0,01 M fosforanie

T a b e l a III

Charakterystyka spektralna w podczerwieni
zasady Y z drożdży

Położenie maksimum absorpcji [cm ⁻¹]	
Naturalna zasada Y	Syntetyczna zasada Y
1725	1726
1700	1698
1690	1583
1570	1568

R. Thiebe, H.G. Zachau i współprac. [4] prowadzili również szereg badań spektroskopowych zasady Y, którą w odróżnieniu od nukleozydu badali Y^+ .

Widmo CD (dichroizmu kołowego) (10% MeOH) dla fragmentu Y^+ wykazuje ujemny efekt Cottona przy λ 237 nm [4]. Natomiast dla natywnej zasady Y widma CD [1] wynika:

$$\Delta\epsilon_{235} - 2,2 \pm 0,3$$

$$\Delta\epsilon_{260} - 0,5 \pm 0,3$$

Obecność dwóch słabych efektów Cottona w widmie CD przy długościach fal odpowiadających maksimum absorpcji UV sugerowała, że boczny łańcuch gładki metinowy jest centrum chiralnym. Słabe ekstrema CD były spowodowane

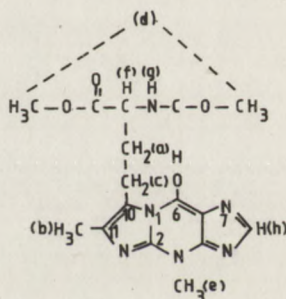
nieznacznymi zmianami układu aromatycznego wynikającymi z bliskości centrum chiralnego. Stwierdzono [1], że krzywe CD pozostawały niezmiennie po 24 godz. przechowywania roztworów w pH3 i pH4. Wyklucza to możliwość istnienia łatwo enolizującej grupy przyłączonej do centrum chiralnego.

W widmach masowych natywnej i syntetycznej zasady Y pojawiły się piki przesunięte o 14 jednostek masowych w górę, gdy próbka była rozpuszczona w roztworze metanolowym. Jest to wynikiem reakcji metanolu z zasadą Y.

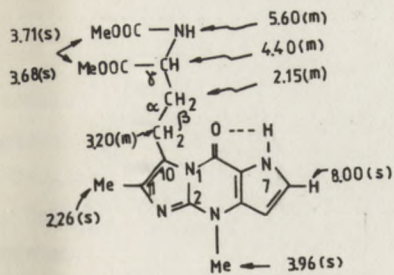
NMR naturalnej zasady Y wykazuje cztery singlety metylowe (2,26; 3,68; 3,71; 3,96 ppm), jeden dla wodoru aromatycznego (8,00 ppm) oraz sygnał wodoru wymienialnego na deuter (5,60 ppm).

Thiebe i współpr. [4] podali wartości NMR dla Y⁺ w różnych rozpuszczalnikach. Są one zestawione w tabeli IV.

Sygnały NMR (w CDCl₃) zgodne są z danymi Nakanishi i współpr. [1] (rys. 4). Obserwowane nieznaczne przesunięcie sygnałów jest wywołane efektem rozpuszczalnika. Wystąpienie sygnału "e" w dwóch różnych pozycjach (w CDCl₃) może odnosić się do przegrupowania grupy metylowej. Przy pomocy podwójnego rezonansu wykazano sprzężenie między protonami "a" i "f".



Rys. 3. Oznaczenia protonów zasady Y z drożdży, stosowane w Tabeli IV 4



Rys. 4. Wartości przesunięć chemicznych protonów Y z drożdży [1], s = singlet, m = multiplet

Przesunięcie protonu "h" (w roztworze pirydynowym) powinno być związane z prądem pierścieniowym. Sygnały 7,45 ppm (szerokie) i 7,7 ppm (s) mogą być przypisane protonowi "g" w łańcuchu bocznym i protonowi N - 7. Brak sygnału wymiennego protonu, który Nakanishi i współpr. [1] wiążą z N - 7, Zachau i współpr. [4] wiążą z tlenem przy C-6. Sposób fragmentacji zasady Y w spektrometrze masowym pokazuje rysunek 5 [1].

Widma NMR zasady Y⁺ w różnych rozpuszczalnikach [4]

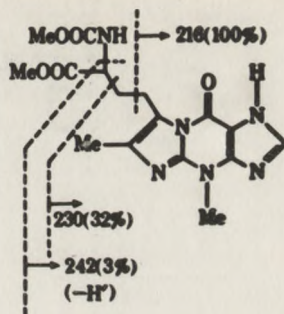
Proton (patrz rys. 3)	(² H) Chloroform)	(² H) Chloroform + + H ₂ O	(² H) Pirydyna	(² H) Pirydyna + + H ₂ O	(² H Acetonitryl)
a	2,18 (2) m	2,1	2,3 (2)	2,4	
b	2,26 (3) s	2,3	2,3 (3)	2,3 (3)	
c	3,20 (2) m				3,30 (2) m
d	3,68 (3) s	3,7	3,84 (6)	3,7 (3)	3,84 (6) s
e	3,70 (3) s!	4,08	4,14 (3)	3,6 (3)	
f	3,96 (3) s	4,4	4,4 (1)	3,9	4,00 (3) s
g	4,38 (1) m			4,4 (1)	4,34 (1) m
h	5,9 (1) broad	7,92	6,0 (1)	5,7 (1)	7,45 (1) broad
	8,00 (1) s		8,4 (1)	8,25 (1)	7,7 (1) s 8,00 (1) s

s - singlet

m - multiplet

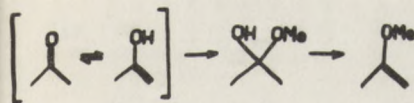
Trójmetylosilan - wzorzec

Masa cząsteczkowa obliczona dla $C_{16}H_{20}N_6O_5$ wynosi 376.1495; znaleziono M^+ 376.1497 (37%); $M-MeOH$ 344(5%). Podstawowy pik m/e 216 oraz wynioskowana obecność $-CH-CH_2-CH_2-$ przy pierścieniu aromatycznym sugerowały, że boczny łańcuch składa się z $C_7H_{12}NO_4$, a pozostałość stanowi $C_9H_8N_5O$. Kiedy badano widmo masowe metanowego rozтворu zasady Y (natywnej), w widmie pojawiały się wyraźne piki przy m/e 390, 358, 256, 244, 230, występujące o 14 jednostek masowych niżej. Może to być wytłumaczone konwersją grupy karbonylowej w enol eteru metylowego (rys. 6).



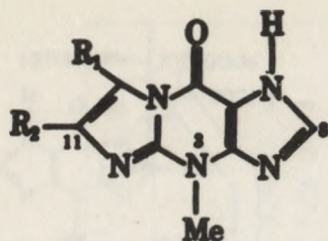
Rys. 5

Zachau [1] podaje, że w widmie masowym zasady Y pojawiają się piki należące do jonów, których masa odpowiada wzorom: $C_{16}H_{20}N_6O_5$, $C_{15}H_{16}N_6O_4$, $C_{14}H_{14}N_5O_3$, $C_{11}H_{12}N_5O$ i $C_{10}H_{10}N_5O$ - fragment występujący najintensywniej. Pojawiały się również jony o mniejszym natężeniu różniące się od każdego z powyższych o dodatkową grupę CH_2 . Z względnych intensywności tych dwóch grup jonów można było wynioskować, że wyższy homolog jest nieco bardziej lotnym składnikiem badanej próbki.



Rys. 6

Z głównej serii powyżej podanych jonów, pierwszy jest najprawdopodobniej jonem molekularnym. Z małej ilości atomów wodoru w $C_{10}H_{10}N_5O$ wynika, że powinien zawierać 8 pierścieni lub podwójnych wiązań i wolną wartościowość. Ten fragment musi zatem reprezentować aromatyczną część cząsteczki i tworzony jest najprawdopodobniej przez rozszczepienie wiązania C-C-Ar. Ze względu na odporność pierścieni aromatycznych na fragmentację, dane z tych widm masowych nie pozwalają wynioskować struktury części pierścieniowej. Obecność jonu $C_6H_5N_4O$ potwierdzałaby system guaniny [1], gdyż zezwala to na istnienie atomu tlenu przy pierścieniu B lub C, ale nie A. Obecność jonów $C_{14}H_{14}N_5O_3$ oraz $C_{11}H_{12}N_5O$ wskazuje na bogate w heteroatomy zakończenie łańcucha bocznego ($C_5H_8NO_4$), ponieważ jon $C_{14}H_{14}N_5O_3$ odpowiada utracie $C_2H_6NO_2$, tzn. karbaminianu metylu oraz jednego wodoru, które muszą być przyłączone do pozostałych trzech atomów łańcucha bocznego, przy których znajdują się dwa atomy tlenu. Prowadzi to do tej samej struktury jaką proponował Nakanishi i współpr. Nakanishi i współpr. [2] prowadzili badania spektralne i strukturalne na związkach modelowych



Rys. 7

UV (MeOH)
 $[\lambda]$ [nm] [ε]
 313 (5000)
 260 (5300)
 235 (33500)

b) $R_1 = -CH_3$
 $R_2 = -CH=CHCH_2CH_3$
 UV (MeOH)
 $[\lambda]$ [nm] [ε]
 323 (1050)
 261 (26300)
 242 (37300)
 227 (31000)

NMR (CDCl₃ + DMSO - d₆)

Boczny łańcuch Me	1,08 (t, J = 7 Mz)
allylowy CH ₂	2,25 (m)
10-Me	2,75 (s)
N ³ - Me	3,96 (s)
α - olefinowy CH	6,35 (d, J = 17 Hz)
β - olefinowy CH	6,60 (m)
8-H	7,80 ppm (s)

c) $R_1 = -CH_3$
 $R_2 = -nC_4H_9$

Związek ten powstaje przez uwodornienie związku (b) i jest izomeryczny ze związkiem (a)

UV (MeOH)
 $[\lambda]$ [nm] [ε]
 313 (5500)
 258 (6750)
 234 (34700)

NMR (CDCl₃)
 10 - Me 2,71 (s)
 N³ - Me 3,96 (s)
 8 - H 7,86 ppm (s)

Wynioskowanie o różnicach zw. (a) i (c) oparte jest na przesunięciach chemicznych dwóch grup olefinowych wskazujących, że proton związku (c), absorbujący przy 2,71 ppm, w przeciwieństwie do protonu zw. (a) (2,31 ppm), jest pod wpływem anizotropowym tlenu w pozycji peri.

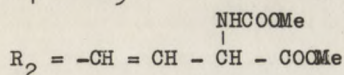
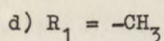
będących pochodnymi syntetycznej zasady Y (rys. 7). Niżej podano charakterystykę spektralną tych związków:

a) $R_1 = -nC_4H_9$

$R_2 = -CH_3$

Związek ten można otrzymać w reakcji 3-metyloguaniny z 3-bromoheptan-2-onem w DMSO-H₂O w temp. 60°

NMR (CDCl₃)
 11-Me 2,31 (s)
 N³ - Me 4,00 (s)
 8-H 7,89 ppm (s)

UV (H_2O) pH 6,8[λ][nm][ϵ]

325 (8120)

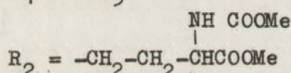
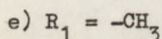
264 (23700)

243 (25500)

NMR ($CDCl_3$ -DMSO- d_6)

11 - Me 2,73 (s)

COOMe 3,86 (s)

 N^3 - Me i COOMe 3,96 (6Hz) α - olefinowy CH 6,41 (d, J = 14 Hz) β - olefinowy CH 6,74 (d od d J=14,4 Hz) δ -H 7,84 ppm (s)

(e) powstaje przez uwodornienie związku d

UV (H_2O) pH 6,6[λ][nm][ϵ]

312 (5100)

263 (7010)

233 (30500)

NMR ($CDCl_3$)

11-Me 2,66 (s)

COO Me 3,70 i 3,74 (s)

 N^3 -Me 3,91 (s) δ -H 7,76 ppm (s)

piki metylu olefinowego przy 2,26 ppm w zw. (a) i przy 2,66 w zw.(d) wyraźnie odróżniają te dwa izomery.

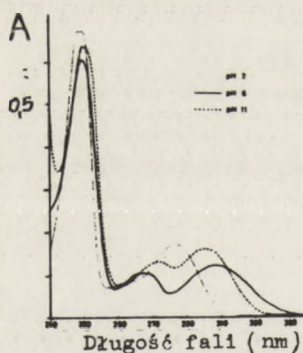
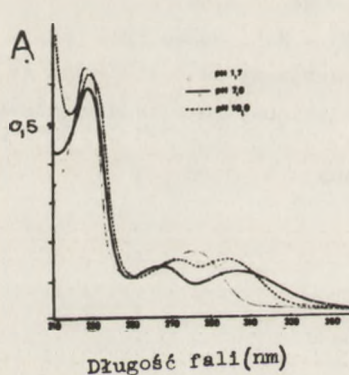
Z a s a d a Y_t (II)

W fenylealaninowym tRNA w *Torulopsis utilis* znaleziono nukleozyd Y, który zawiera fluoryzującą zasadę opisaną przez H. Kasai i współpr. [5] jako Y_t . Na podstawie widm UV w różnych pH oraz wartości R_F stwierdzono, że różni się ona od Y_w w tRNA^{Fen} z kiełków pszenicy. Profil widm UV w środowisku kwaśnym, obojętnym i zasadowym wyraźnie przypomina widma UV zasady Y:

 H_2O $\lambda_{max} (\epsilon)$ 230 (31000); 264 (5300); 307 (5900).

Widmo UV natywnej zasady Y_t jest identyczne z widmem zasady syntetycznej (II), którą otrzymano przez kondensację 3-metyloguaniny z bromoacetonem (rys. 8).

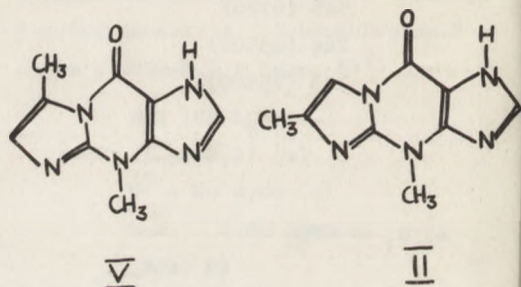
W czasie reakcji z aldehydem α - bromopropinowym powstaje zw. izomeryczny [V] (rys. 9).



Rys. 8

Widma NMR (D₂O) dla związku Y_t, który był krystalizowany z wody charakteryzuje się sygnałami przy δ 2,24 ppm (3H, d, J=1Hz) 3,82 ppm (3H, s), 7,32 ppm (1H, g J=1Hz) i 8,07 ppm (1H, s), które kolejno mogą oznaczać aromatyczny metyl, N-metyl i 2 protony aromatyczne. Małe sprzężenie około 1Hz pojawiające się między metylem przy 2,24 ppm i protonem 7,32 ppm jest przypisywane dalekosiędnemu oddziaływaniu spinowo - spinowemu między metylem i protonem ugrupowania CH₃-C=CH. Tak więc zasada Y_t posiada dwie grupy metylowe, jedną przy C-10 lub C-11 i drugą przy N-3, N-7 lub N-9.

Widma NMR zw. II i V były wykonane w 1N DCl-D₂O. Związek II wykazuje sygnał C-metylu przy 2,48 ppm w wyższym polu magnetycznym niż odpowiadający sygnał zw. V (2,72 ppm), podczas gdy sygnał protonu aromatycznego (7,68 ppm), który jest sprzężony spinowo z sygnałem grupy C - metylowej w poprzednim zw. II, pojawił się przy niższym polu niż odpowiadający mu sygnał (7,26 ppm zw. V), przy założeniu, że sygnał metylu i proton na C-10 pojawia się przy niższym polu magnetycznym niż sygnały tych grup przy C-11, izięki efektowi anizotropowemu grupy karbonylowej w pozycji 6. Związkom II i V mogą być przypisane takie właśnie struktury.



Rys. 9

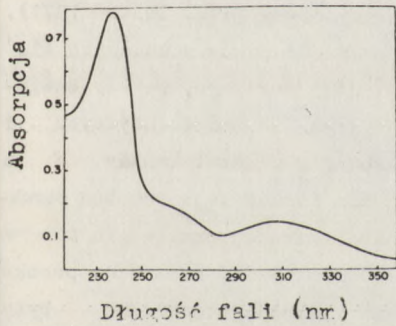
Widmo NMR (D₂O) dla związku Y_t, który był krystalizowany z wody charakteryzuje się sygnałami przy δ 2,24 ppm (3H, d, J=1Hz) 3,82 ppm (3H, s), 7,32 ppm (1H, g J=1Hz) i 8,07 ppm (1H, s), które kolejno mogą oznaczać aromatyczny metyl, N-metyl i 2 protony aromatyczne. Małe sprzężenie około 1Hz pojawiające się

Zasada peroksy - Y (III)

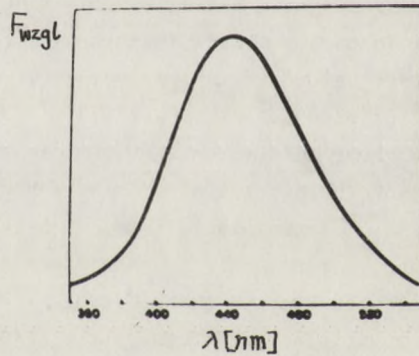
Nazwa systematyczna (IUPAC) tego związku brzmi: ester dwumetylowy kwasu α - (karboksyamino)- 4,9-dwuodorowodoronadtleno-4,6-dwumetylo-9- oxo - -1H-imidazo [1, 2 - α] puryno-7-masłowego.

Zasadę peroksy Y znaleziono w tRNA^{Phe} z wątrób szczura, cielęcia, wołu i kurczęcia; w tRNA^{Phe} z kielków pszenicy, a ostatnio również w tRNA^{Phe} z żubinu.

R_F fluoryzującej zasady peroksy-Y jest mniejsze niż zasady Y z tRNA^{Phe} drożdżowego.

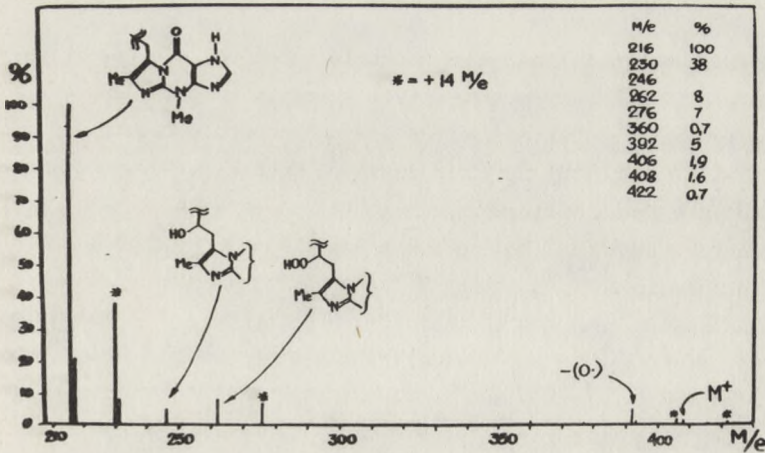


Rys. 10



Rys. 11

W widmie UV występuje maksimum absorpcji przy 308, 260, 236 nm (rys.10). Maksimum wzbudzenia dla III jest 247, 273 i 322 nm, a maksimum emisji 445 nm (rys. 11). Widmo masowe zasady peroksy - Y pokazuje rys. 12.



Rys. 12

Macierzysty jon związku peroksy jest 408, 1395 (obliczony dla $C_{16}H_{20}N_6O_7$, 408, 1393). Porównując jon molekularny zasady peroksy z jonem zasady Y, można stwierdzić obecność dwóch dodatkowych atomów tlenu w związku peroksy. Intensywność piku m/e 216 (rozszczerzenie C) wskazuje na obecność fragmentu aromatycznego i grup α - metylenowej. Rozszczerzenie b daje piki m/e 262 i 246, co wskazuje, że oba dodatkowe tleny w zakresie peroksy znajdują się przy węglu β - jako grupa nadtlenkowa lub jako gem-diol. Możliwość ugrupowania gem-diolowego jest raczej nieprawdopodobna ponieważ w tym przypadku obserwowano by utratę 17 lub 18 jednostek masy, co nie ma w rzeczywistości miejsca. Z drugiej jednak strony wiadomo, że wodoronadtlenki zdolne są do utraty atomów tlenu w spektrometrze masowym (van Lier, Smith 1971). Utrata atomów tlenu prowadząca do m/e 392 i obecność pików różniących się o 16 jednostek masy (m/e 376 i 360; m/e 262 i 242) wskazuje, że zw. zawiera grupę nadtlenną. Porównanie widm absorbcyjnych, fluorescencyjnych i wysoko rozdzielczych widm masowych zasady peroksy z widmami zasady Y z tRNA^{Fen} drożdżowego, pozwala stwierdzić, że obie zasady mają podobną strukturę, a różnią się jedynie obecnością grupy nadtlenną przy węglu β - w łańcuchu bocznym zasady peroksy. Aby wykluczyć możliwość, że zasada peroksy jest artefaktem tworzącym się w czasie procesu izolacji prowadzone były następujące badania:

- inkubacja syntetycznej d, l-Y zasady z tRNA^{Fen} drożdżowego z frakcją supernatantu porybosomalnego z wątroby,
- dodanie drożdżowego tRNA do homogenatu wątrobowego i późniejsze izolowanie tRNA^{Fen} i zasady Y,
- izolowanie tRNA^{Fen} i zasady Y z wątroby cielęcia w obecności azydru sodu.

Fluoryzujące zasady izolowane w czasie tych procesów pozostawały nie zmienione. Stąd wniosek, że grupa nadtlenną w bocznym łańcuchu zasady peroksy nie jest artefaktem izolacji. Prawdopodobnie reszta wodoronadtlenkowa w tRNA^{Fen} z wątroby istnieje in vivo. Mechanizm biosyntezy nie jest znany. Jedynie znaną analogiczną drogą biosyntetyczną jest proksydacja nienasyconych tłuszczów. Badano enzym z mikrosomów wątroby szczura działający w połączeniu z NADPH, który w obecności jonów nieorganicznych powoduje utlenienie nienasyconych lipidów. Możliwe, że analogiczne enzymy z różnymi specyficznymi substratami wywołują proksydację in vivo Y-im Gua. Oprócz zasady peroksy zaobserwowano obecność nieutlenionej zasady występującej jako składnik obecny w małej ilości w preparatach tRNA^{Fen} wątroby szczura i kurczęcia. Przymuszcza się, że jest on odbiciem niecałkowitej konwersji do zasady peroksy Y.

Na podstawie wartości R_F stwierdzono, że w trNA^{Fen} z łubinu występują dwa fluoryzujące komponenty. Jeden z nich o większym R_F określono [8] jako zasadę peroksy Y, drugi natomiast jest prawdopodobnie zasadą Y. Występująca tutaj zasada Y może być biosyntetycznym prekursorem dla zasady peroksy Y, jednak to ostatnie nie zostało jeszcze precyzyjnie potwierdzone.

Widmo masowe zasady peroksy Y jest:

$408(\text{M}^+, 408, 1390, \text{obliczone } 408, 1393); 392(\text{M}^+ - 16) 262(3'' 2') 246/(3'' 3') - 16/ \text{ i } 216(2'' 1')$.

Dodatkowo otrzymane piki 422, 406, 276 i 230 różnią się od wyżej podanych o 14 jednostek masowych. Geneza tych pików nie jest jeszcze bliżej znana.

Maksimum fluorescencji występuje przy 433 nm (wzbudzone 310 nm), maks. wzbudzenia przy 247, 276 i 322 nm (emisja 430 nm) (w H_2O). Krzywa CD [8] była różna od CD dla zasady Y (tab. V i rys. 13).

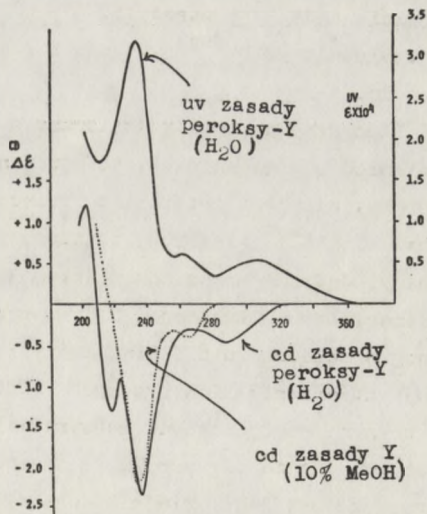
T a b e l a V

Dichroizm kołowy zasady peroksy - Y

	Położenie i intensywność efektu Cottona (nm) ($\Delta \epsilon$)
Peroksy Y (w H_2O)	204(+1,24); 222(-1,33); 239(-2,34); 287(-0,45)
Y (10% MeOH)	235(-2,2); 264(-0,36)

Minimum przy $\lambda = 286$ nm zasady peroksy Y jest prawdopodobnie wynikiem nakładania się dwóch minimów CD, odpowiadającym maksimum UV przy 263 nm i 310 nm. Ekstremum w widmie CD zasady Y przy 260 nm odpowiada UV 263 nm, podczas gdy pik CD odpowiadający w UV $\lambda = 313$ nm mógłby być za słaby, aby go zmierzyć. Konfiguracja na centrum chiralnym została ustalona jako s, natomiast obecne dane CD dla zasady peroksy Y nie są dostateczne, aby wyciągnąć z nich wniosek dotyczący konfiguracji.

W celu potwierdzenia obecności grupy nadtlencowej w zasadzie peroksy Y



Rys. 13

przeprowadzono test chemiczny, który polegał na reakcji zasady peroksy Y z tiocyjanianem żelazawym. Pojawienie się różowego zabarwienia świadczy o utlenieniu jonów $Fe^{++} \rightarrow Fe^{+++}$ przez obecną grupę wodoronadtlenkową.

Oprócz peroksy Y z łubinu żółtego nie znamy struktur żadnych innych zasad Y z materiału roślinnego. Badano również zasady typu Y występujące w $tRNA^{Fen}$ wyodrębnionym z wątroby myszy [10]. Stwierdzono, że zasada ta jest bardziej labilna od zasady Y z drożdżowego $tRNA^{Fen}$ oraz zaobserwowano różnicę ruchliwości elektroforetycznej. Jednakże struktura tego komponentu nie jest jeszcze bliżej określona.

P o d s u m o w a n i e

Znane są trzy zasady typu "Y":

- zasada Y w $tRNA^{Fen}$ drożdżowym,
- zasada Y_t z *Torulopsis utilis*,
- zasada peroksy Y z wątrób, kiełków pszenicy i łubinu.

Zasady te mają podobne widma UV i fluorescencyjne. Widmo masowe pomaga w rozszyfrowaniu struktury. Dotychczas mało jest jednak danych z NMR i IR, natomiast CD nie jest jeszcze ściśle wyjaśnione.

W n i o s k i

Fenylalaninowe $tRNA$ izolowane z licznych komórek eukariotycznych zawierają wysoce modyfikowane fluorescencyjne zasady typu Y. Stosowanie metod spektralnych, takich jak UV, fluorescencja, CD, widm masowych i NMR, pozwoliło określić strukturę tych związków. Zasady te stanowią możliwości badań spektralnych przemian struktury trzeciorzędowej $tRNA^{Fen}$. Dużo interesujących danych może dostarczyć chemiczna i enzymatyczna modyfikacja i interkonwersja zasady Y - peroksy Y - hydroksy Y.

Własności i funkcje tych niezwykle skomplikowanych komponentów w $tRNA$ są intrygującymi problemami, które wymagają dalszych badań syntetycznych i analitycznych.

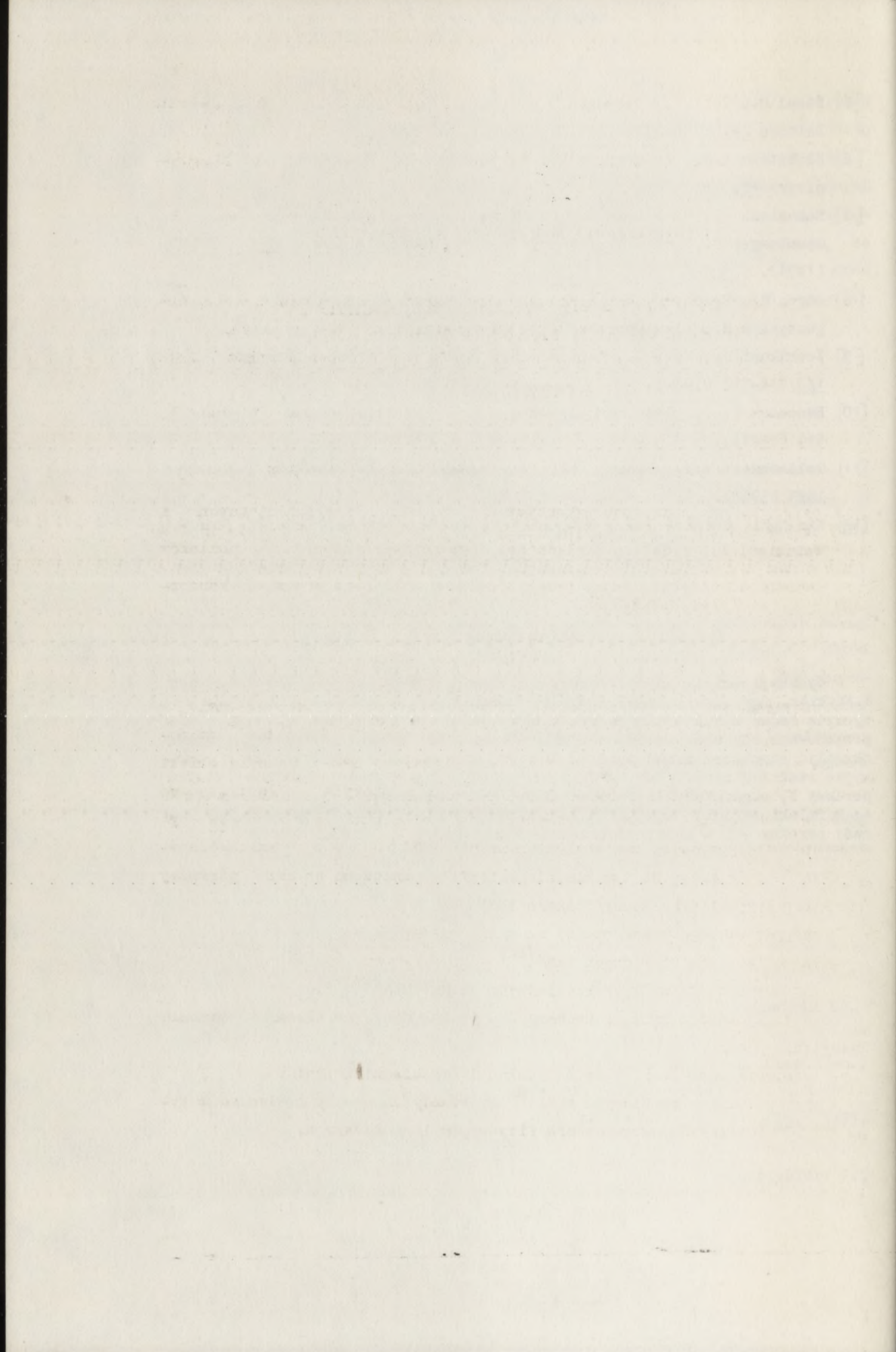
LITERATURA

- [1] Nakanishi K., Furutachi N., Funamizu M., Grunberger D., Weinstein I.B., *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 7617 (1970).
- [2] Funamizu M., Terahara A., Feinberg A., Nakanishi K.; *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 6706 (1971).
- [3] Fink L., Lanks K., Goto T., Weinstein I.B.; *Biochemistry* 10, 1873, (1971).
- [4] Thiebe R., Zachau G.H., Baczynskyj L., Biemann K., Sonnenbichler J.; *Biochem. Biophys. Acta* 240, 163-169 (1971).

- [5] Kasai H., Goto M., Takemura S., Goto T., Matsuura S.; Tetrahedron Letters 29, 2725-2728 (1971).
- [6] Blobstein S.H., Grunberger D., Weinstein I.B., Nakanishi K.; Biochemistry 12, 188 (1973).
- [7] Nakanishi K., Blobstein S., Funamizu M., Furutachi N., van Lear G., Grunberger D., Lanks K., Weinstein I.B.; Nature (London) 234 107, (1971).
- [8] Aaron M., Feinberg, Nakanishi K., Barciszewski J., Rafalski A.J., Augustyniak H., Wiewiórowski M.; J.Amer.Chem.Soc., 1974, w druku.
- [9] Yoshikami D., Katz G., Keller E.B., Dudock B.; Biochem.Biophys Acta 166 714-717 (1968).
- [10] Hancock R.L., Ghertner L., Dougan D.; Physiol.Chem and Physics 3, 559 (1971).
- [11] Goldschmidt B.M., Blazej T.P., van Duren B.L.; Tetrahedron Letters 1583 (1968).
- [12] Kim S.H., Quigley G.J., Suddath F.L., Mc Pherson A., Sneden D., Kim J.J., Weinzierl J., Rich A.; Science 179, 285 (1973).

DYSKUSJA

W dyskusji wzięli udział: prof. D. Shugar, doc. dr A. Chimiak, mgr R. Adamiak, mgr J. Barciszewski, mgr D. Labuda, mgr A. Rafalski. Dyskusja dotyczyła badań strukturalnych rzadkich zasad i ich roli biologicznej. Zaproponowano, aby obok metod spektralnych stosować również inne, pozwalające określić strukturę zasad typu Y. Przedyskutowano widma absorpcyjne i emisyjne rzadkich zasad. Doc A. Chimiak poddał w wątpliwość istnienie zasady peroksy Y, sugerując dla tego związku strukturę kwasu hydroksamowego. A. Rafalski zwrócił uwagę na niezgodność tej hipotezy z fragmentacją zasady peroksy - Y w spektrometrze masowym.



J. Barciszewski, M. Rafalska, A. J. Rafalski

WYKORZYSTANIE WŁASNOŚCI ZASAD „Y” W BADANIACH TRANSFEROWYCH RNA

STRESZCZENIE

W referacie przedstawiono wykorzystanie własności fizykochemicznych i chemicznych nukleozydów Y - najbardziej skomplikowanych komponentów tRNA - do badania struktury tRNA. Uwzględniono szczególnie zastosowania pomiarów fluorescencji w warunkach dynamicznych. Rezultaty tych prac przedyskutowano z punktu widzenia struktury trzeciorzędowej tRNA oraz przemian konformacyjnych tych makrocząsteczek.

WSTĘP

Transferowe kwasy rybonukleinowe, ze względu na ich zasadniczą rolę w procesie biosyntezy białka, polegającą na "ustawianiu" cząsteczek aminokwasów w kolejności odpowiadającej sekwencji matrycy mRNA, stanowią obiekt bardzo szeroko zakrojonych badań strukturalnych, w których wykorzystywane są wszelkie dostępne metody fizykochemiczne i chemiczne [1]. Prace te wykonywane są najczęściej na fenyloalaninowych tRNA [2], a w szczególności tRNA^{Phe} z drożdży. Na tym właśnie materiale oznaczono po raz pierwszy strukturę krystaliczną specyficznego tRNA [3].

Przyczyny takiego stanu rzeczy są m.in. następujące:

- łatwa izolacja niektórych tRNA^{Phe},
- znajomość struktur pierwszorzędnych kilku tRNA^{Phe} [2],
- oddziaływanie z prostym kodonem UUU (także CUU), co ułatwia badania biosyntezy [4],
- istnienie sprawdzonych metod izolacji odpowiednich syntez,
- występowanie w niektórych tRNA^{Phe} supermodyfikowanych nukleozydów typu "Y" o niezwykłych własnościach fizycznych i chemicznych.

Omówienie przykładów wykorzystania własności nukleozydów typu "Y" do badań strukturalnych fenyloalaninowych tRNA stanowić będzie treść niniejszego przeglądu.

Występowanie nukleozydów typu "Y" w strukturach pierwszorzędowych tRNA oraz strukturę i własności typu związków omówiono gdzie indziej (2, 5). Obecnie ograniczymy się do przypomnienia, że nukleozyd "Y" występuje w tRNA w pozycji przyległej do końca 3' antykodonu. Nukleozyd ten ulega bardzo łatwo rozszczepieniu w miejscu wiązania N-glikozydowego, podczas inkubacji w pH=2,9 w 37°C. Najbardziej charakterystyczną jego cechą jest stosunkowo intensywna fluorescencja w temperaturze pokojowej w roztworach wodnych. Długość fali emisji wynosi około 440 nm przy wzbudzeniu 310 nm.

Te unikalne własności, dzięki którym nukleozydy "Y" nie przypominają żadnych innych komponentów tRNA, są pomocne w badaniach tRNA^{Pen}, w szczególności umożliwiając poczynienie pewnych interesujących ustaleń związanych ze strukturą przestrzenną tych cząsteczek.

WYKORZYSTANIE FLUORESCENCJI NUKLEOZYDÓW „Y” W BADANIACH tRNA

Spektroskopia emisyjna w porównaniu z absorpcyjną jest znacznie mniej rozpowszechniona w badaniach biochemicznych, między innymi ze względu na większe trudności instrumentalne, mniejszą uniwersalność i ograniczenia w stosowaniu ilościowym. Mimo to, dzięki czułości widm emisyjnych na wpływ pH, stężenia, bezpośredniego otoczenia chromoforu, pozwalają one na uzyskanie cennych informacji strukturalnych [6] takich, jak:

- otoczenie chromoforu i dostępność dla rozpuszczalnika,
- odległość między donorem a akceptorem, w przypadku przeniesienia energii między dwoma chromoformami,
- relaksacja rotacyjna chromoforu,
- geometria i symetria cząsteczki w stanach wzbudzonych.

Metody te znalazły dotychczas znacznie większe zastosowanie w biochemii białek niż kwasów nukleinowych. Proste zasady kwasów nukleinowych, w odróżnieniu do aminokwasów aromatycznych, nie fluoryzują w temperaturze pokojowej w roztworach wodnych.

Chromofory kwasów nukleinowych (A,G,C,U,T) mają bardzo podobne widma absorpcyjne i emisyjne, podczas gdy w białkach aminokwasy aromatyczne (tryptofan, tyrozyna, fenyloalanina) rozmieszczone są w pewnych odstępach w łańcuchu polipeptydowym i różnią się bardzo widmami od pozostałych aminokwasów.

Jedynie w przypadku tRNA modyfikowane zasady mają odmienne własności op-

tyczne, co pozwala na selektywne wzbudzenie określonych elementów struktury tRNA (charakterystyki fluorescencyjne modyfikowanych zasad podano w tabeli I [6]). Dlatego większość zastosowań metod fluorescencyjnych w badaniach kwasów nukleinowych dotyczy tRNA.

T a b e l a I

Charakterystyka absorpcyjna i emisyjna niektórych zasad występujących w transferowych tRNA [6]

Nukleozyd	Absorpcja		Fluorescencja			Fosforescencja		
	λ_{\max} [nm]	$\epsilon [10^3]$	λ_{\max} [nm]	φ_F	λ_{PR} [nm]	λ_{\max} [nm]	φ_P	${}^3\tau$ [s]
A	261	14.9	313	0.01	373	397	0.015	2.4
iA	270	-	325	0.1	380	412	0.01	1.65
sA	247,284	25.0, 17.8	335	0.35	390	425	0.25	0.36
m ⁶ A	266	16.0	329	0.09	364	411	0.045	2.5
m ² A	262	-	351	0.11	365	405	0.03	3.2
tA	268,277	-	321	0.37	360	409	0.03	1.95
G	252	13.7	323	0.13	365	402	0.07	1.3
m ⁷ G	257,281	8.5, 7.4	337	0.35	357	448	0.005	1.8
m ² G	259	16.3	338	0.27	373	414	0.14	1.4
m ¹ G	248,272	10.0, 7.9	326	0.15	381	423	0.01	1.6
C	271	8.9	322	0.05	352	405	0.01	0.3
sC	281	-	-	0.005	362	407	0.1	0.04
m ⁵ C	277	8.9	328	0.20	370	428	0.05	0.8
T	267	9.7	322	0.24	382	438	0.005	0.3
U	262	10.0	314	0.01	350	405	0.0	0.55
(mam) ⁵ U	282	-	322	0.21	362	425	0.01	0.3
s ² (mam) ⁵ U	-	-	345	0.006	387	429	0.035	0.04
s ⁴ U	244,333	4.5, 21.0	-	0.005	437	461	0.08	1.9x10 ³
ϕ	262	8.1	319	0.44	361	425	0.02	0.5
Y	237,315	30.3	405	0.33	402	450	0.01	2.4
			452a	0.03	-	-	-	-

φ_F - wydajność kwantowa fluorescencji

φ_P - wydajność kwantowa fosforescencji

λ_{PR} - progowa długość fali fluorescencji (krótkofalowa)

${}^3\tau$ - czas życia stanu trypletowego

mam - matyloaminometylo

(a) - w temperaturze pokojowej

Nukleozydy typu "Y" dobrze nadają się do takich badań, gdyż:

- ich absorpcja UV rozciąga się do około 330 nm (długofalowe maksimum przy 315 nm), co pozwala na wzbudzenie promieniowaniem o długości fali, przy której pozostałe nukleozydy tRNA^{Fen} praktycznie nie absorbują. Najniższy wzbudzony poziom singletowy "Y" leży znacznie poniżej tego poziomu innych nukleozydów, dzięki czemu przeniesienie energii do otaczających zasad jest bardzo mało prawdopodobne;

- Y jest jedynym nukleozydem w tRNA^{Fen}, który w roztworach wodnych w temperaturze pokojowej wykazuje istotną fluorescencję. Wydajność kwantowa fluorescencji 7-metyloguanozyny w tRNA^{Fen} z drożdży jest o rząd wielkości mniejsza.

- fluorescencja "Y" jest bardzo podatna na wpływ otoczenia i polarność środowiska.

Wykorzystując powyższe własności oraz następujące metody:

- fluorescencja (statyczna),
- polarność fluorescencji (statyczna),
- przeniesienie energii fluorescencji do innych chromoforów,
- wygaszanie energii fluorescencji przez różne czynniki,
- pomiar czasów fluorescencji,
- nanosekundowa depolaryzacja fluorescencji,

przeprowadzono szereg badań strukturalnych, głównie na fenyalaninowym tRNA z drożdży.

Fakt zależności wydajności kwantowej fluorescencji zasady "Y" od otoczenia i polarności pozwolił na badanie konformacji antykodonu.

Beardsley [8] stwierdził, że intensywność fluorescencji "Y" w tRNA^{Fen} z drożdży i kiełków pszenicy wzrasta 2-3 krotnie ze wzrostem stężenia jonów Mg²⁺ w roztworze wodnym (rys. 1).

W obecności 0,1 M NaCl jony magnezu w stężeniach 10⁻¹ - 10⁻⁵ M mają mały wpływ na ogólną strukturę tRNA. Mimo to wnioskować można, że zmiany fluorescencji wywodzą się ze zmian konformacyjnych. Bezpośrednie wiązanie Mg²⁺ do "Y" nie może być przyczyną zjawiska, gdyż efekt ten nie występuje w sześci nukleotydzie zawierającym "Y". Autorzy sugerują, że zmiany konformacyjne objawiają się większą dostępnością "Y" dla rozpuszczalnika, w wyniku mniejszego chronienia przez przyległe elementy struktury drugiej i trzeciorzędowej, w nieobecności magnezu. Zwiększenie oddziaływania z rozpuszczalnikiem powoduje zmniejszenie względnej wydajności kwantowej fluorescencji oraz skrócenie czasu życia fluorescencji. Nawet w nieobecności magnezu nie było możliwe pełne przekształcenie tRNA w konformację z dostępną "Y".

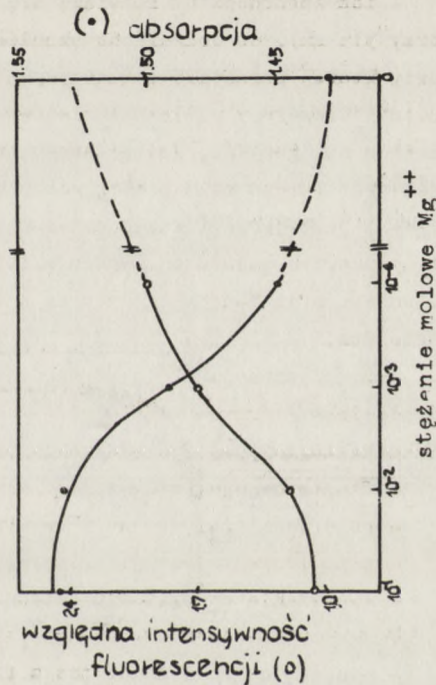
Inni autorzy [9] sądzą, że przyczyną tego mogły być pewne śladowe ilości jonów dwuwartościowych. Przypuszczalnie w miarę obniżania stężenia magnezu zachodzą powolne zmiany struktury trzeciorzędowej lub nawet rozerwanie parowania zasad w antykodonie.

Intensywność fluorescencji zasady "Y" wzrasta również w obecności D_2O , w przypadku, gdy próbki nie zawierają magnezu, co potwierdza tezę o dostępności "Y" dla rozpuszczalnika, w tych warunkach [8]. Zmiana intensywności wynika prawdopodobnie ze zwolnienia reakcji protonizacji-deprotonizacji. Inny możliwy mechanizm to zmniejszenie stopnia reorientacji rozpuszczalnika wokół stanu wzbudzonego, o ile ta reorientacja powoduje wygaszanie fluorescencji.

Podczas pomiaru czasów życia fluorescencji w nieobecności magnezu zauważono, że niemożliwe jest odwzorowanie krzywej zaniku emisji jedną funkcją eksponencjalną, co wskazuje na istnienie w tych warunkach więcej niż jednej konformacji tRNA. Czasy życia wynoszą 6-7 nanosekund [8].

Technika nanosekundowej depolaryzacji fluorescencji [8] pozwoliła ustalić stopień ruchliwości zasady "Y" względem całej cząsteczki tRNA. W przypadku sztywnego umiejscowienia chromoforu, z rozmiarów cząsteczki wyliczyć można teoretycznie czas równy 15 nanosekund. Ponieważ czasy zmierzone są zawsze krótsze od 10 nanosekund, zasada "Y" jest w pewnym stopniu swobodna względem cząsteczki tRNA, zarówno w obecności jak i nieobecności jonów magnezu. Swoboda ta jest jednak ograniczona, gdyż dla całkowicie ruchliwego chromoforu czasy relaksacji byłyby jeszcze krótsze. Taki wynik może być związany z :

- rotacją "Y" wokół wiązań pojedynczych,

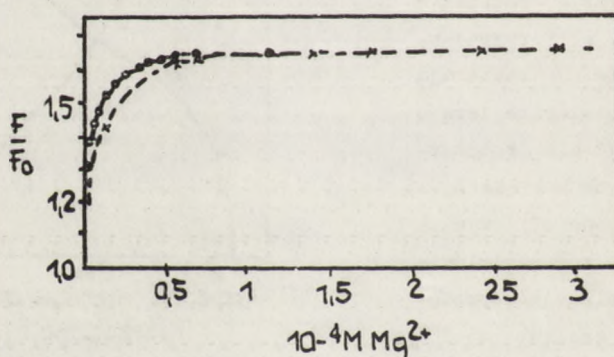


Rys. 1. Zależność fluorescencji "Y" przy 450 nm (wzbudzenie 320 nm) oraz absorpcji przy 257,5 nm tRNA^{Fen} w zależności od stężenia jonów magnezu [8]

- ruchami torsyjnymi zasady "Y",
- ruchami antykodonu względem całej cząsteczki tRNA.

Najprawdopodobniej rzeczywistą przyczyną są ruchy torsyjne zasady, choć nie udało się tego ustalić z pewnością [8].

Szczegółowo badano także wpływ magnezu na fluorescencję fragmentów tRNA^{Fen} z drożdży [10]. Badania te pozwoliły m.in. stwierdzić, że jedna cząsteczka dwunastonukleotydu lub sześciostonukleotydu, zawierających nukleocyd "Y", wiąże jeden jon Mg^{2+} (rys. 2) [10].



Rys. 2. Względna intensywność fluorescencji oligonukleotydów w funkcji stężenia magnezu [10]; o - sześciostonukleotyd, stężenie $6,3 \times 10^{-6} M$, x - dwunastonukleotyd, stężenie $6,4 \times 10^{-6} M$

Bardzo prawdopodobne jest istnienie również innych centrów, słabiej wiążących Mg^{2+} [10].

Maass [11, 12] przeprowadził szczegółowe badania termodynamiczne i kinetyczne tRNA^{Fen} z drożdży, z wykorzystaniem pomiarów UV i fluorescencji nukleozydu "Y" w funkcji temperatury, zarówno całego tRNA^{Fen}, jak i fragmentów otrzymanych w warunkach częściowego trawienia rybonukleazami. Część antykodonowa tRNA z drożdży (Fen 21-57) wykazywała w 1M NaCl dwa przejścia konformacyjne. Przejście niskotemperaturowe ($T_m = 48^\circ C$ w 1 M NaCl) charakteryzowało się czasem relaksacji 20 ms, a przejście wysokotemperaturowe ($T_m = 72^\circ C$ w 1 M NaCl) - czasem relaksacji 200 μs . Wyniki te uzyskano na podstawie eksperymentów "T-jump" monitorowanych fluorescencją i absorpcją UV. Przejście niskotemperaturowe wiązało się ze wzrostem intensywności fluorescencji, a wysokotemperaturowe - maleniem.

Takie zmiany konformacyjne wyjaśniono przejściami między stanami podanymi na rysunku 3 [12].

Model ten wyjaśnia obserwowane zmiany fluorescencji. Największą intensywność emisji obserwować się będzie bowiem w stanie odpowiadającym modelowi liścia koniczyny, gdyż pętla antykodonu jest tu najmniejsza. W pozostałych stanach rozpuszczalnik ma większy dostęp do "Y", powodując gaszenie fluorescencji.

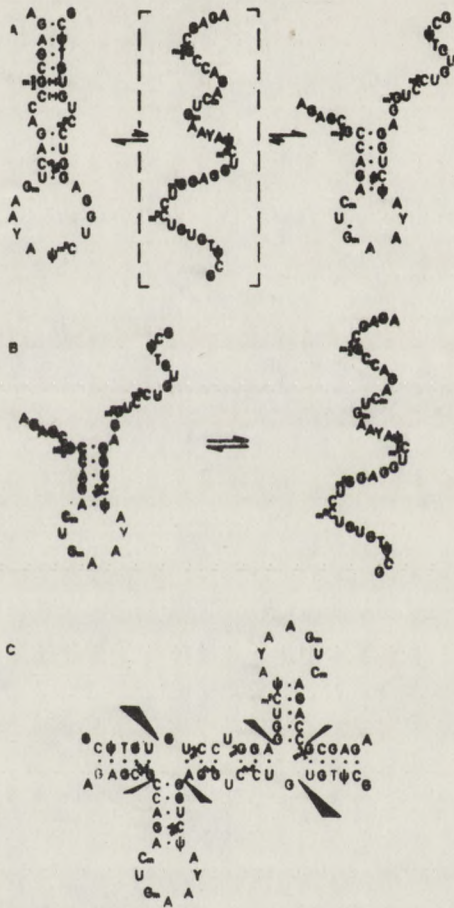
Z danych tych wynika, że pomiary fluorescencji zasady "Y" mogą być stosowane do szczegółowej interpretacji krzywych topnienia tRNA^{Fen}. W czasie topnienia pętli antykodonu obserwuje się zmniejszenie intensywności fluorescencji. Zmniejszenie intensywności fluorescencji tRNA^{Fen} w trakcie zmian temperatury stanowi więc indyktor topnienia antykodonu w badaniach całych cząsteczek tRNA [12].

Już uprzednio stwierdzono, że depolaryzacja i gaszenie fluorescencji zachodzi w niskotemperaturowych regionach krzywej topnienia, ale wtedy nie można było stwierdzić jednoznacznie pochodzenia tego zjawiska [11].

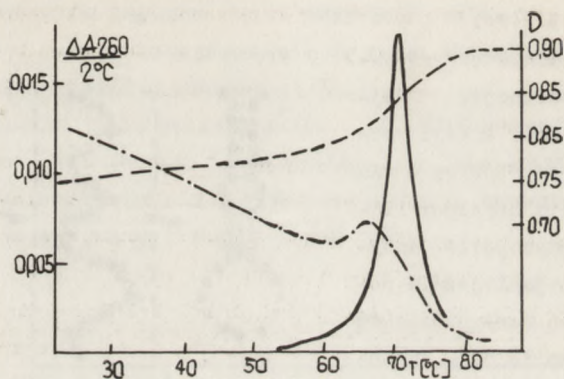
Całokształt zebranych danych pozwala sądzić, że topnienie tRNA^{Fen} z drożdży odbywa się w następujących etapach:

- przekształcenie struktury trzeciorzędowej w "liść koniczyny",
- topnienie ramienia akceptorowego i antykodonu,
- niezależne topnienie ramienia t^ψC i dwuhydrourydynowego.

Rysunek 4 pokazuje zależność fluorescencji i absorpcji UV tRNA^{Fen} od temperatury [11].



Rys. 3. Zmiany konformacyjne fragmentu antykodonowego tRNA^{Fen} z drożdży [12]; A. schemat przejścia niskotemperaturowego, B. schemat przejścia wysokotemperaturowego



Rys. 4. Krzywe topnienia tRNA^{Phe} z drożdży w obecności 2 mM MgCl₂ w buforze kakodylanu sodu 0,01 M, pH = 6,8 zawierającym 0,1 M NaCl [11]; — absorpcja różnicowa $\Delta A_{260}/2^{\circ}\text{C}$; -.- fluorescence różnicowa w jednostkach względnych, wzbudzenie 313 nm, emisja 340 nm; -.-.- depolaryzacja fluorescencji mierzona przy tych samych długościach fali

Badanie wygaszania fluorescencji nukleozydu "Y" w tRNA w obecności innych cząsteczek chromoforowych, przez singletowo-singletowe przeniesienie energii, dostarczyło szeregu interesujących informacji strukturalnych.

Teoria singletowo-singletowego przeniesienia energii jest dobrze opracowana [13, 14]. Względna efektywność przesunięcia energii jest odwrotnie proporcjonalna do szóstej potęgi odległości między donorem (np. "Y") a akceptorem. Ważnym parametrem charakteryzującym system jest tzw. odległość Förstera - R_0 . Jest to taka hipotetyczna odległość między donorem a akceptorem, przy której fluorescencja donora jest wygaszana w 50%.

Beardsley i Cantor [15] zastosowali pomiary przeniesienia energii z zasady "Y" do chromoforu związanego z końcem 3'CCA tRNA^{Phe}, do określenia odległości między ramieniem aminokwasowym a antykodonem w tym tRNA.

Jako akceptory związane z końcem 3' wykorzystano akryflawinę, hydrazyd kwasu proflawinylooctowego i 9-hydroazynoakrydynę. Akryflawina jest idealnym akceptorem energii stanu singletowego z zasady "Y", ponieważ jej widmo absorpcyjne pokrywa się z widmem emisyjnym "Y", oraz charakteryzuje się dużym molowym współczynnikiem ekstynkcji ($3,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Z wartości tej przy określonych założeniach obliczono odległość Förstera równą 30 Å. Dla 9-hydroazynoakrydyny $R_0 = 24 \text{ Å}$. Hydrazyd kwasu proflawinylooctowego charakteryzuje się absorpcją w regionie 315-325 nm, a więc w zakresie używanym do wzbudzenia "Y", co zmusza do wprowadzenia dodatkowych poprawek. Pewne trudności związane też są z niestabilnością wiązania barwników z

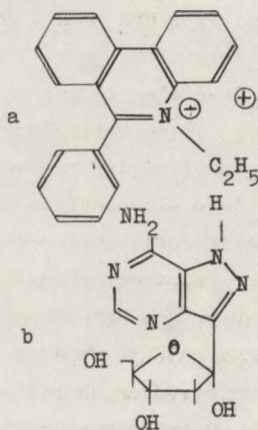
tRNA, w związku z czym trudno uzyskać pełne podstawienie końca 3'. Po wprowadzeniu koniecznych poprawek stwierdzono, że efektywność przeniesienia energii jest mniejsza od 0,5, a więc odległość barwnik - "Y", a tym samym ramię aminokwasowe - antykodon, jest większa niż 30 \AA , prawdopodobnie w granicach $40-60 \text{ \AA}$.

Wynik ten jest oczywiście przybliżony. Związanie akceptora może zmieniać konformację tRNA, a także stosowane barwniki mogą ulegać interkalacji w dwuspiralnych regionach tRNA. Mimo to można wykluczyć szereg hipotetycznych struktur, w szczególności wszystkie te, w których ramię aminokwasowe jest nałożone na ramię antykodonu. Błędy systematyczne tak wykonanych oznaczeń mogą dochodzić do 20%. Najbardziej niepokojącym źródłem nieścisłości jest milczące przyjęcie w obliczeniach założenia, że kąty między momentami dipolowymi przejść donora i akceptora są dowolne i przypadkowe. W celu udowodnienia tego założenia należałoby wykazać, że nie ma ograniczenia rotacji związanego barwnika ani zasady "Y". Przyniesione wyżej pomiary nanosekundowej depolaryzacji fluorescencji zasady "Y" w tRNA^{Fen} [8] wskazują, że w przypadku "Y" zachowana jest dość duża swoboda rotacji. Dalším faktem przemawiającym za rotacyjnym uśrednieniem orientacji donora i akceptora jest podobieństwo wyników tych trzech różnych barwników o różnych ukierunkowaniach dipola przejścia względem wiązania łączącego je z tRNA.

Podobne wyniki uzyskano niedawno stosując tRNA zawierającą formycynę (rys. 5) zamiast końcowej adenozyiny [19].

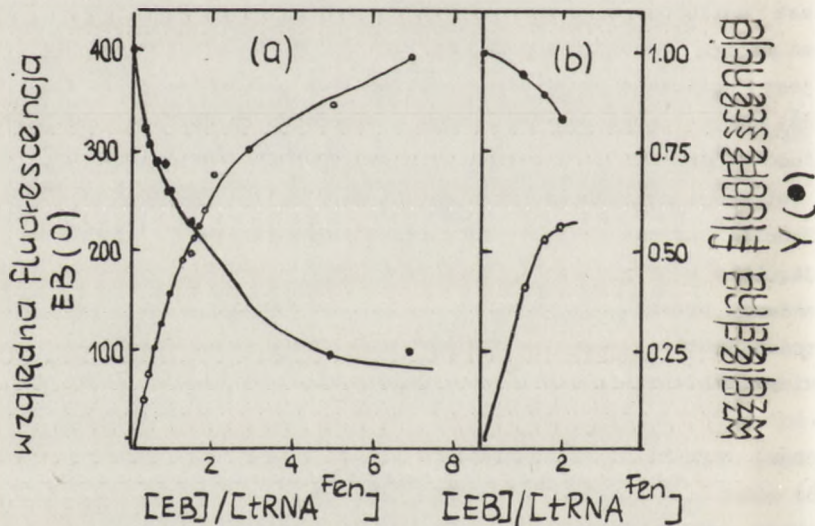
Tę samą metodę Tao, Nelson i Cantor [16] zastosowali do określenia odległości między "Y" w antykodonie a cząsteczką bromku etidium związaną z tRNA przez interkalację.

Bromek etidium (BE)-bromek 2,7-dwuamino-9-fenyl-10-etylofenantrydyniowy - jest popularnie używany do badania struktury kwasów nukleinowych. Wiązanie BE zachodzi przez interkalację między parami zasad [17], co pozwala stosować go do odróżnienia regionów spiralnych tRNA. BE jest związany sztywno z cząsteczką RNA i nie ma prawie żadnej swobody rotacyjnej. Widmo absorpcyjne BE w zakresie widzialnym nakłada się w dostatecznym stopniu z emisją "Y", a więc można go stosować jako akceptor energii.



Rys. 5. Niektóre znaczniki fluorescencyjne stosowane w badaniach tRNA; a - bromek etidium, b - formycyna

Stwierdzono, że zarówno w obecności jak i nieobecności jonów magnezy, tRNA^{Fen} z drożdży wiąże silnie jedną cząsteczkę bromku etydium. W obecności Mg²⁺ wiązanie BE powoduje silne wygaszenie fluorescencji nukleozydu "Y" (rys. 6 a). Wydajność kwantowa fluorescencji "Y" w obecności jonów magnezu bardzo niewiele zmienia się pod wpływem dodatku barwnika (rys. 6 b).



Rys. 6. Względna fluorescencja bromku etydium, (wzb. 520 nm, em. 581 nm) oraz nukleozydu "Y" (wzb. 320 nm, em. 430 nm), w funkcji względnego stężenia bromku etydium [16]: a - w nieobecności jonów magnezu; b - w obecności 0.002665 M magnezu

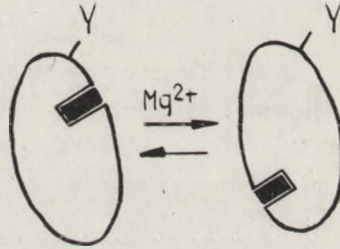
Pomiary czasu zaniku fluorescencji "Y" dały nieoczekiwany wynik. Zanik fluorescencji, niezależnie od stężenia magnezu, nie zmierza się pod wpływem oddziaływania z bromkiem etydium. Oznacza to, że wygaszenie fluorescencji "Y" przez BE jest w nieobecności magnezu całkowite, natomiast obserwowanej fluorescencji przyczyniają się jedynie cząsteczki tRNA zawierające związanego barwnika. Z tego wynika, że bromek etydium w obecności magnezu związany jest znacznie bliżej nukleozydu "Y", niż odległość Förstera ($R_0 = 24 \text{ \AA}$), przypuszczalnie w ramach dwuspiiralnego ramienia antykodonu. Niecałkowite wygaszenie fluorescencji

rzy dużych stężeniach BE (ośmiokrotny nadmiar molowy w stosunku do tRNA), tłumaczyć należy istnieniem niektórych cząsteczek tRNA w konformacji nieodpowiedniej do wiązania barwnika. W obecności magnezu przypuszczalnie istnieje kilka słabych centrów wiązania BE. Ponieważ nie obserwuje się wygaszania fluorescencji ("Y"), najbardziej istotne z tych centrów znajduje się aleko do "Y", na pewno nie w pętli antykodonu. Rezultaty te podsumowuje rys. 7 [16].

W późniejszych badaniach Maass [9] stwierdził, że w nieobecności magnezu tRNA^{Fen} zbrodzi wiąże trzy cząsteczki bromku etidium, dopiero przy stężeniu jonów magnezu 0,5 nM liczba centrów ograniczona jest do jednego. Wyniki Tao i współpracowników [16] odnieść ięc raczej należy do dwóch różnych stężeń magnezu. Próbki określone przez tych autorów jako "bez magnezu", zawierać musiały zanieczyszczenia jonowe.

Właściwości fluorescencyjne nukleozydu "Y" tRNA^{Fen} wykorzystano także do badania oddziaływań z innymi molekułami.

Jedną z funkcji cząsteczki tRNA jest oddziaływanie z kodonem na rybosomie. Nie zanika ono jednak w nieobecności rybosomu [20, 21]. Eisinger [20] badał te interakcje w fenyloalaninowym tRNA z drożdży, stosując metody fluorescencyjne. Podczas dodawania kodonu UUC lub oligomerów zawierających kodon "wobble" - UUU do roztworów tRNA^{Fen} zaobserwowano małe przesunięcie maksimum emisji fluorescencji "Y" w kierunku fal krótszych. Ponieważ zjawiska tego nie zaobserwowano przy dodawaniu poli (C) lub przy zmianie stężenia magnezu, przyjęto, że jest ono spowodowane nieco bardziej hydrofobowym otoczeniem chromoforu "Y" w warunkach udziału sąsiednich zasad (antykodonu) w oddziaływaniu wodorowym z UUC lub UUU. Wiązanie tych kodonów zachodziło tylko w obecności magnezu. Efekt przesunięcia maksimum emisji wykorzystano do oszacowania siły wiązania oligomerów z tRNA^{Fen}. Rejestrowano zmiany widmowe przy zwiększaniu stężenia UGC w roztworze. Znacząc kształt widma w nieobecności UUC i przy dużym nadmiarze UUC obliczono stężenie cząsteczek tRNA związanych z tym kodonem przy każdym jego pośrednim stężeniu. Z tych danych obliczono stałą asocjacji w różnych temperaturach.



Rys. 7. Schemat przedstawiający wpływ jonów magnezu na wiązanie bromku etidium do tRNA^{Fen}. Czarny prostokąt przedstawia bromek etidium [16]

Na podstawie znanego równania:

$$\Delta F = \Delta H - T \Delta S = -RT \ln K$$

oszacowano wartość parametrów termodynamicznych dla asocjacji antykodonu z UUC:

$$\Delta F = -4 \text{ kcal/M}$$

$$\Delta H = -15 \text{ kcal/M}$$

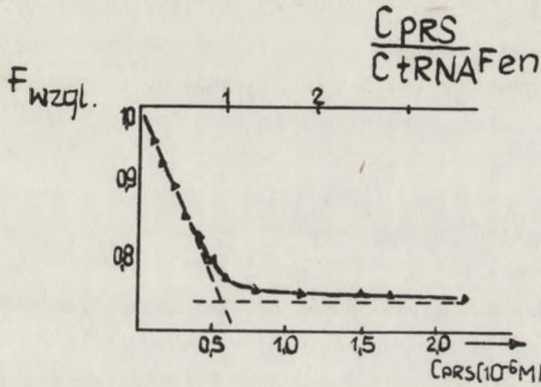
$$T \Delta S = -11 \text{ kcal/M/w } 10^{\circ}\text{C/}$$

Metody fluorescencyjne stosowano wielokrotnie do badania reakcji enzymatycznej aminoacylacji tRNA aminokwasem przy pomocy enzymu aminoacylo-tRNA-syntetazy. Wykorzystywano w tym celu naturalną fluorescencję reszt tryptofanowych syntezy lub grup fluorescencyjnych przyłączonych do enzymu lub tRNA [22-28].

Do niedawna sądzono, że region antykodonu ma minimalny wpływ na reakcję aminoacylacji. Maass doniósł jednak ostatnio o wpływie fenyloalanylo-tRNA-syntetazy na fluorescencję nukleozydu "Y" w tRNA^{Phe} z drożdży [29]. Badania fluorescencyjne pozwoliły na ustalenie szeregu parametrów kinetycznych asocjacji enzymu z tRNA. W nieobecności jonów Mg²⁺ syntetaza powoduje wzrost intensywności fluorescencji "Y" w tRNA. Podobny efekt wywiera dodatek jonów magnezu. Zjawisko to tłumaczą autorzy lokalnym wpływem syntetazy na region antykodonu, prowadzącym do osłaniania chromoforów przed gaszącym działaniem cząsteczek wody. W roztworach zawierających zarówno jony magnezu jak i syntetazę, enzym zmniejsza intensywność fluorescencji, a za tym redukuje efekt ochronny jonów magnezowych. Miareczkowanie tRNA syntetazą, kontrolowane fluorescencyjnie pozwoliło ustalić, że tworzy się kompleks o stechiometrii 1:1 (rys. 8).

Syntetaza serynowa nie ma wpływu na fluorescencję nukleozydu "Y".

Wykonano również pomiary kinetyczne oddziaływania syntetazy z tRNA^{Phe} techniką "stopped flow". W pierwszym etapie następuje asocjacja tRNA z enzymem, o stałej szybkości rzędu $k = 1,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Stała ta wskazuje, że szybkość asocjacji jest niemal kontrolowana dyfuzyjnie. W następnym, kontrolującym szybkość, etapie zachodzi powolne uwalnianie zaminoacylowanego tRNA, ze stałą szybkości około $2,5 \text{ s}^{-1}$ (o ile reakcję prowadzi się w obecności fenyloalaniny i adenozyotrójfosforanu). Ponieważ stwierdzono niezależnie, że same uwalnianie aminoacylo-tRNA zachodzi przynajmniej o rząd wielkości szybciej (stała rzędu 27 s^{-1}), etap ten nie decyduje o ogólnej szybkości reakcji aminoacylacji enzymatycznej.



PRS = Fenyloalanylo-tRNA-syntetaza

Rys. 8. Wygaszanie fluorescencji zasady "Y" w tRNA^{Fen} przez fenyloalanylo-tRNA-syntetazę, w obecności $10^{-2}M$ Mg²⁺ w 20°C. Wzbudzenie przy 313 nm, emisja przy 450 nm. Uwzględniono poprawkę na fluorescencję dodanego enzymu [29]

Jak starano się pokazać powyżej, fluorescencja nukleozydów "Y" może być wykorzystana do bardzo różnorodnych badań strukturalnych i biochemicznych tRNA, dostarczając wielu cennych informacji, często niedostępnych na innej drodze. Szczególnie interesujące dane uzyskać można z precyzyjnych pomiarów emisji w warunkach nierównowagowych.

WYKORZYSTANIE WŁASNOŚCI CHEMICZNYCH NUKLEOZYDÓW „Y” W BADANIACH tRNA

Własności chemiczne nukleozydów "Y" [30] są mało znane ze względu na dostępność jedynie mikrogramowych ilości tych związków oraz brak, jak dotychczas, odpowiednich modeli syntetycznych. Syntetyczne zasady "Y" i "Y_T" również prawie nie były badane pod kątem własności chemicznych.

Wiadomo jednak, że w pH = 2,9, wiązanie N-glikozydowe zasady "Y" z częścią rybozową nukleozydu ulega łatwo rezerwaniu, dając wolną zasadę i resztę rybozową w tRNA, zawierającą reaktywną grupę aldehydową [31,32,37]. Tę całkowicie unikalną w chemii tRNA własność wykorzystano niejednokrotnie do badania kwasów nukleinowych, m.in. do:

- specyficznego przecinania tRNA^{Fen} na dwie połowy,

- przyłączenia w miejscu zasady "Y" innych związków,
- badania udziału antykodonu w różnych oddziaływaniach.

W pracowni H.G. Zachaua stwierdzono, że traktowanie tRNA zawierającego grupę aldehydową, po wycięciu zasady "Y", aminami w dużym stężeniu prowadzi do powstania zasady Schiffa, a następnie do przecięcia łańcucha polinukleotydowego [33,34]. Tak otrzymane dwie "połowy" tRNA można rozdzielić i używać do dalszych badań strukturalnych.

Przy zastosowaniu jednak 100-krotnie mniejszego stężenia aminy zachodzi trwałe kowalentne przyłączenie tej aminy do tRNA, przez utworzenie N-glikozydu lub zasady Schiffa [35]. Wiązanie to jest trwałe w pH=7,0 lub 7,5. W pH=4,0 zachodzi łatwo hydroliza. Redukcja borowodorkiem sodu prowadzi do powstania aminy drugorzędowej, trwałej także w kwaśnym środowisku [35].

Metoda ta pozwoliła na przyłączenie do tRNA w pozycji przyległej do końca 3' antykodonu związków silnie fluoryzujących - proflawiny lub bromku etidium [35].

W połączeniu z dotychczas stosowanym:

- sprzęganiem związków fluoryzujących z rybozą końcowej adenozy 3',
- zastępowaniem końcowej adenozy formycyną,
- oddziaływaniem niekowalencyjnym.

Ta nowa metoda znaczenia fluorescencyjnych tRNA^{Fen} umożliwi dalsze badania strukturalne i studia oddziaływania z enzymami, przy pomocy technik opisanych powyżej.

"Wycinanie" zasady "Y", a więc dość poważna zmiana w natywnej strukturze antykodonu, może służyć do oszacowania udziału tej części cząsteczki tRNA w oddziaływaniu z innymi cząsteczkami biologicznymi.

Stwierdzono na przykład, że usunięcie "Y" nie zmniejsza stopnia aminoacylacji tRNA w układzie homologicznym, chociaż reakcja zachodzi odmiennie [31,32,36]. Podobnie, wyżej przedstawione zastąpienie "Y" fluoryzującymi barwnikami [35] wywiera tylko niewielki wpływ na aminoacylację homologiczną, ale dość poważnie zmniejsza wydajność aminoacylacji heterologicznej enzymem z E.coli. Zredukowany borowodorkiem tRNA - bromek etidium w ogóle nie jest aminoacylowany w tych warunkach [35].

Transferowy RNA^{Fen} pozbawiony zasady "Y" zupełnie inaczej zachowuje się również w oddziaływaniu z tetramerami komplementarnymi do pętli antykodonu (GCAG, UUCA, UCCC, GACC) - [38]. Zmniejszenie stałej wiązania tetramerów wyjaśnić można zmianami konformacyjnymi tRNA polegającymi na zmniejszeniu sztywności struktury pętli antykodonu [38]. Bardziej elastyczny pętla wiąże oligomery znacznie słabiej [38].

Na zakończenie warto wspomnieć, że specyficzne zachowanie się fenyloalaninowych tRNA na kolumnach wypełnionych benzoilowaną DEAE-celulozą, pozwalające wydzielić w sposób prosty np. tRNA^{Phe} z drożdży, bywa niekiedy przypisywane obecności w tym kwasie hydrofobowej zasady "Y" [39].

PODSUMOWANIE

Obecność niezwykłych zasad supermodyfikowanych, znanych jako "Y" w antykodonach szeregu fenyloalaninowych tRNA może być m.in. wykorzystana do badań:

- kształtu i wielkości cząsteczki tRNA w roztworze,
- udziału antykodonu w strukturze trzeciorzędowej tRNA,
- miejsca wiązania innych cząsteczek fluoryzujących,
- dostępności antykodonu dla wody i innych cząsteczek środowiska,
- przejść konformacyjnych antykodonu,
- wpływu różnych czynników na konformację tRNA,
- udziału antykodonu w oddziaływaniach z enzymami i oligonukleotydami,

a także do:

- specyficznego rozcinania cząsteczki tRNA,
- wprowadzanie związków syntetycznych w pozycję przyległą do antykodonu,
- szybkiej izolacji fenyloalaninowych tRNA.

Jesteśmy przekonani, że podane przykłady nie wyczerpują potencjalnych możliwości badawczych. Poznanie struktur i własności dalszych zasad "Y" przyczyni się do zmiany możliwości potencjalnych w konkretne fakty naukowe.

LITERATURA

- [1] Rafalski A.J., Barciszewski J.; "Najnowsze poglądy na strukturę tRNA, w "Synteza, struktura i własności tRNA, wydawnictwo UAM, Poznań 1972.
- [2] Barciszewski J., Rafalski A.J.; "Struktura i własności fenyloalaninowych tRNA" (artykuł w niniejszym tomie).
- [3] Kim S.H., Quigley G.J., Suddath F.L., McPherson A., Sneden D., Kim J.J., Wienzierl J., Rich A.; Science 179, 285 (1973).
- [4] Nirenberg M.W., Jones O.W., Leder P., Clark B.F.C., Pestka S.; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 549 (1963).
- [5] Rafalska M., Barciszewski J., Rafalski A.J.; "Badania spektralne i strukturalne zasad "Y" z drożdży wątrób ssaków i łubinu" (artykuł w niniejszym tomie).

- [6] Eisinger J., Lamola A.A.; w *Methods in Enzymology*, vol. XXI, pod red. Grossman L., Moldave K.; Academic Press, New York 1971.
- [7] Eisinger J., Feuer B., Yamane T.; *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.* 65, 638, (1970).
- [8] Beardsley K., Tao T., Cantor C.R.; *Biochemistry* 9, 3524 (1970).
- [9] Urbanke C., Römer R., Maass G.; *Eur.J.Biochem.* 33, 511 (1973).
- [10] Maelicke A., von der Haar F., Cramer F.; *Biopolymers* 12, 27 (1973).
- [11] Römer R., Reisner D., Maass G.; *FEBS Lett.* 10, 352 (1970).
- [12] Riesner D., Maass G., Thiebe R., Philippsen P., Zachau H.G.; *Eur.J. Biochem.* 36 76 (1973).
- [13] Förster T.; *Discuss.Paraday Soc.* 27 7 (1959).
- [14] Stryer L., Haugland R.P.; *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.* 58 719 (1967).
- [15] Beardsley K., Cantor C.R.; *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.* 65 39 (1970).
- [16] Tao T., Nelson J.H., Cantor C.R.; *Biochemistry* 9 3514 (1970).
- [17] Fuller W., Waring M.J.; *Ber.Bunsenges.Chem.* 68 805 (1964).
- [18] Brand L., Gohlke J.R.; *Ann.Rev.Biochem.* 41 843 (1972).
- [19] Maelicke A.; Referat na: IV Jenear Molekularbiophysikalisches Symposium 30 Mai - 2 Juni 1973, Jena NRD.
- [20] Eisinger J., Feuer B., Yamane T., *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.* 65, 638 (1970).
- [21] Uhlenbeck O.C., Baller J., Doty P.; *Nature (London)* 225 508 (1970).
- [22] Helene C., Burn F., Yaniv M.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 37 393 (1969).
- [23] Bruton J.C., Hartley B.S.; *J.Mol.Biol.* 52 165 (1971).
- [24] Rigler R., Cronvall E., Hirsch P., U.Pachmann, Zachau H.G.; *FEBS Lett.* 2, 320 (1970).
- [25] Blanguet G., Fayat G., Waller J.P., Iwatsubo M.; *Eur.J.Biochem.* 24, 461 (1972).
- [26] Holler E., Bennett E.L., Calvin M., *Biochem.Biophys.Comm.* 45, 409 (1971).
- [27] Engel G., Heider M., Maelicke A.; von der Haar F., Cramer F., *Eur J. Biochem.* 29 257 (1972).
- [28] Pingoud A., Reisner D., Boehme E., Maass G.; *FEBS Lett*, 30 1 (1973).
- [29] Krauss G., Römer R., Reisner D., Maass G., *FEBS Letters* 30, 6 (1973).
- [30] Thiebe R., Zachau H.G., Baczyński L., Biemann K., Sonnenbichler J., *Biochim.Biophys.Acta*, 240 163 (1971).
- [31] Thiebe R., Zachau H.G.; *Eur. J.Biochem.* 5 546 (1968).
- [32] Thiebe R., Zachau H.G.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 33 260 (1968).
- [33] Philippsen P., Thiebe R., Wintermeyer W., Zachau H.G.; *Biochem. Biophys. Res.Comm.*, 33 902 (1968).

- [34] Wintermeyer W.; Praca doktorska, cytowane w [35].
- [35] Wintermeyer W., Zachau H.G.; FEBS Lett, 18 214 (1971).
- [36] Thiebe R., Zachau H.G.; Biochim.Biophys.Acta 217, 294 (1970).
- [37] Thiebe R., Zachau H.G.; w Methods in Enzymology, vol. XX, pod red. Grossman L., Moldave K.; Academic Press, New York 1970.
- [38] Cameron V., Uhlenbeck O.C.; Biochem.Biophys.Res.Commun, 50, 635 (1973).
- [39] Wimmer E., Maxwell I.H., Tener G.M.; Biochemistry 7, 2623 (1968).

DYSKUSJA

Dyskusja dotyczyła zależności kwantowej fluorescencji nukleozydu Y od konformacji tRNA, a w szczególności mechanizmu gaszenia fluorescencji przez cząsteczki wody w rozplecionej konformacji pętli antykodonu. Wskazano na celowość przebadania zależności wydajności kwantowej fluorescencji zasad Y od rodzaju rozpuszczalnika. Zwrócono również uwagę, że nie zbadano dotychczas dokładnie stabilności nukleozydu Y w zakresie pH od 3 do 7. Pytano także o szczegóły eksperymentalne reakcji utlenionego tRNA z fluoryzującymi barwnikami.

Faint, illegible text covering the majority of the page, appearing to be bleed-through from the reverse side. The text is too light to transcribe accurately but seems to consist of several paragraphs of prose.

Franciszek Kaźmierczak, Jerzy Langer

ZWIĄZKI MODELOWE W BADANIACH ODDZIAŁYWAŃ NIEWIĄZANIOWYCH I PRZEMIAN FOTOCHEMICZNYCH KOMPONENTÓW KWASÓW NUKLEINOWYCH

STRESZCZENIE

Przedyskutowano możliwości zastosowań związków modelowych do badań asocjacji warstwowej i przemian fotochemicznych zasad-składników nukleotydów. Omówiono budowę kompleksów van der Waalsa oraz struktury produktów reakcji fotochemicznych (dimeryzacji) pirymidynowych analogów nukleotydów i wolnych zasad.

Przedstawiono mechanizmy reakcji fotoprzyłączenia i fotodimeryzacji zasad pirymidynowych.

Część I

ASOCJACJA WARSTWOWA (STACKING) - ODDZIAŁYWANIA NIEWIĄZANIOWE WOLNYCH ZASAD, NUKLEOZYDÓW I NUKLEOTYDÓW

Stabilność spirali kwasu nukleinowego jest w dużym stopniu uwarunkowana oddziaływaniami pomiędzy sąsiednimi zasadami nici tego kwasu. Poza tym udział w stabilności mają elektrostatyczne oddziaływania pomiędzy grupami fosforanowymi ujemnie naładowanymi. Specyficzny wpływ wywierają również reszty cukrowe (rybo- i dezoksyrybo-) [1].

Wolne zasady, nukleozydy i nukleotydy w środowisku niewodnym i w stanie krystalicznym ulegają asocjacji poprzez wiązania wodorowe. Natomiast w środowisku wodnym obserwuje się silną asocjację warstwową (wertykalną), przy czym zasady znajdują się względem siebie w płaszczyznach równoległych, oddalonych od siebie o około 3-4Å. W tych warunkach powstają nie tylko dime-

ry, ale również wysokopolimeryzowane układy. Za takim modelem asocjacji w środowisku wodnym przemawiają wyniki uzyskane z pomiarów fizycznych. Ts'ó [2] i in. [3,4,5] w wyniku badań zmian ciśnienia par roztworów ze zmianą stężenia puryny, urydyny i cytydyny określili stałe równowagi asocjacji (tabela I).

T a b e l a I

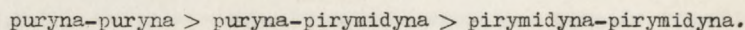
Związek	$K_{\text{asocj.}} [\text{mol}^{-1}]$
Inozyna	3,0 (1,8)*
1-Metyloinozyna	1,8-2,0
Puryna	2,1
Rybozylopuryna	1,9
6-Metylopuryna	6,7
Adenozyna	4,5
2'-O-Metyloadenozyna	5,1
2'-Dezoksyadenozyna	4,7-7,5
6-egzo-N-Metyloadenozyna	11,8-14,9
6-egzo-N-Metylo-2'- -Dezoksyadenozyna	15,9
6-egzo-N,N-Dwumetyloade- nozyna	22,2
Urydyna	0,61
Cytydyna	0,87
5-Bromourydyna	1,0

*z pomiarów sedymentacyjnych

Z tabeli wynika, że po podstawieniu protonów zdolnych do tworzenia wiązań wodorowych grupą alkilową wartość stałej asocjacji wzrasta. Podstawniki metylowe i halogenowe powodują również wzrost stałej asocjacji. Ze względu na brak wyraźnego wpływu reszty cukrowej mimo zwiększonych własności hydrofilowych na stałą asocjacji, przypuszcza się, że asocjacja zasad związana jest z ich specyficznymi własnościami.

Tworzenie asocjacji zachodzi również w roztworach zawierających mieszaninę zasad, nukleozydów i nukleotydydów. Dla takich układów stałe asocjacji zostały określone ze zmian rozpuszczalności jednej zasady w obecności drugiej (tabela II).

Z analizy tabeli I i II wynika następujący szereg oddziaływań zasada - zasada:



Ten szereg oddziaływań potwierdziły również badania termodynamiczne asocjacji szeregu puryn i pirymidyn [2,4,7,8,11,12,13]. Kalorymetryczne pomiary dostarczają danych o entalpii, entropii i swobodnej energii asocja-

cji. Dla szeregu pochodnych puryny otrzymane [8] termodynamiczne parametry asocjacji przedstawiają się następująco (tabela III).

T a b e l a II

Układ	$K_{\text{asocj.}} [\text{mol}^{-1}]$
Adenina - puryna	9,3
Adenina - cytozyna	4,6-5,0
Adenina - urydyna	4,3-4,9
Adenina - pirymidyna	1,8-2,3
Adenina - fenol	2,3-3,1
Tymina - puryna	1,6-2,3
Tymina - urydyna	1,1-1,2
Tymina - pirymidyna	0,8-0,9

T a b e l a III

Związek	H°	G°	S°	K
Puryna	- 4,2	- 0,44	- 13	2,1
6-Metylopuryna	- 6,0	- 1,12	- 16	6,7
Rybozylpuryna	- 2,0	0,5	- 5	2,7
Dezoksyadenozyna	- 3,7	- 1,5	- 7	12
Kofeina	- 3,4	- 1,5	- 6	13
6-Dwumetyloaminopuryna	- 9,1	- 2,4	- 22,5	

Z tych danych wynika, że modyfikacje pierścienia purynowego wywierają znaczny wpływ na entalpię asocjacji. Swobodna energia asocjacji nie koreluje dobrze ze zmianami entalpii. Skomplikowany wpływ entropii jest prawdopodobnie odbiciem zmian struktury cząsteczek wody i stereochemii oddziałujących związków. Wprowadzenie grupy metylowej w położenie 6 puryny ma stabilizujący wpływ o 2,0 do 2,5 kcal/mol. Kwantowo - mechaniczne obliczenia [9,10] energii oddziaływań puryny i 6-metylopuryny wykazały, że podstawienie grupą metylową wywołuje stabilizujące oddziaływanie rzędu 2-3 kcal/mol. Addycja rybozy do puryny i dezoksyrybozy do adeniny nie wywołuje dużych zmian entalpii. Prawdopodobnie spowodowane to jest wpływem na konformację asocjatów. Dla kofeiny należy oczekiwać silnych oddziaływań aso-

cyjnych (na podstawie stałej asocjacji). Umiarkowana wartość entalpii asocjacji ($-3,4$ kcal/mol) wskazuje na znaczenie i udział entropii w tworzeniu kompleksów asocjacyjnych.

W oparciu o znajomość entalpii molowej i współczynnika osmotycznego określono [11] entalpię asocjacji pirymidyn (tabela IV).

T a b e l a IV

Związek	H°	G°	S°	K
Rybozylo-puryna	-2,5	-0,38	- 7	1,9
Cytydyna	-2,8	0,08	-10	0,87
Urydyna	-2,7	0,29	-10	0,61
Tymidyna	-2,2			
5-Bromourydyna	-2,7			

Entalpia asocjacji dla nukleozydów pirymidynowych w wodzie wynosi około $-2,5$ kcal/mol, co stanowi około połowę odpowiedniej wartości dla 6-metylopuryny. Dla cytydyny, urydyny i tymidyny nie obserwowano zmian entalpii ze zmianą stężenia. Dla 5-bromourydyny obserwowano wzrost entalpii (w zakresie stężeń od $0,31$ do $0,05$ mola entalpia wzrasta od $-2,7$ do $-3,9$ kcal/mol). Te efekty tłumaczy przyjęcie hipotezy, że dla cytydyny i urydyny równowagę opisuje jednostopniowa stała natomiast więcej niż jedna stała jest konieczna w przypadku roztworu 5-bromourydyny.

Asocjację warstwową pirymidyn i puryn w wodnych roztworach potwierdzają również badania własności optycznych tych związków. Stężeniowe badania [5] absorpcji dezoksyadenozyny przy 260 nm wykazały zmniejszanie się wartości ϵ przy wzroście stężenia (odchylenie od liniowości prawa Beera, tabela V).

T a b e l a V

Stężenie M	$\epsilon \cdot 10^{-3}$
$2,75 \cdot 10^{-4}$	15,3
$2,36 \cdot 10^{-2}$	13,9
$4,50 \cdot 10^{-2}$	13,1

Te wyniki wskazują na asocjację cząsteczek dezoksyadenozyny w roztworze wodnym. Solie i Schellman [5] obliczyli, że $0,045$ molowy wodny roztwór

dezoksyadenozyny zawiera 56% cząsteczek monomeru, 28% cz. dimeru, 12% cz. trimeru, 4% tetrameru i 1% cz. pentameru.

Przedstawione dotychczas wyniki badań nad asocjacją warstwową pirymidyn i puryn dostarczają wiedzy o stopniu oddziaływania między nimi. Jednak na podstawie tych danych nie można nic powiedzieć o wzajemnym położeniu cząsteczek zasad w kompleksach asocjacyjnych. Takich informacji dostarczą badania magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).

Ze wzrostem stężenia purynowych pochodnych w wodzie obserwuje się wyraźne przesunięcia sygnałów NMR w kierunku silnych pól. Zaobserwowano, że przesunięcie to jest tym większe, im większa jest wartość stałej asocjacji K (tabela VI).

T a b e l a VI

Zależność przesunięć chemicznych protonów od stężenia w D_2O [3]
(zmiana stężenia od 0 do 0,2M, częstotliwość generatora 60 MHz)

Związek	Temp.	C ₂ -H	C ₈ -H	C ₆ -H	C ₁ -H	CH ₃	K _{asocj.}
Inozyna	32	6,4	5,3	-	7,1	-	-
1-Metyloinozyna	33	8,9	6,4	-	6,8	5,3	1,8-2
Puryna	25-27	12,6	9,6	14,2	-	-	2,1
6-Metylopuryna	25-27	19,4	13,3	-	-	17,0	6,7
Rybozylpuryna	30	10,7	6,4	13,1	8,8	-	1,9
Adenozyna	32	14,8	8,3	-	6,9	-	4,5
6-egzo-N-metylo-2'- -dezoksyadenozyna	32	26,0	15,8	-	14,0	15,2	15,9
6-egzo-NN-Dwumetylo- loadenozyna	28	27,2	14,5	-	14,4	25,5	22,2

Na widmach NMR puryny i 6-metylopuryny [14] ze wzrostem stężenia obserwuje się przesunięcia wszystkich sygnałów w kierunku wyższego pola. Przesunięcia takie w przypadku związków aromatycznych związane są z magnetyczną anizotropią wywołaną prądami pierścieniowymi. Efekt stężeniowy dla puryn wynosi:

0,60 - 0,70 ppm dla pierścienia pirymidynowego,

0,48 ppm dla pierścienia imidazolowego.

Odpowiednie przesunięcia dla 6-metylopuryny są większe:

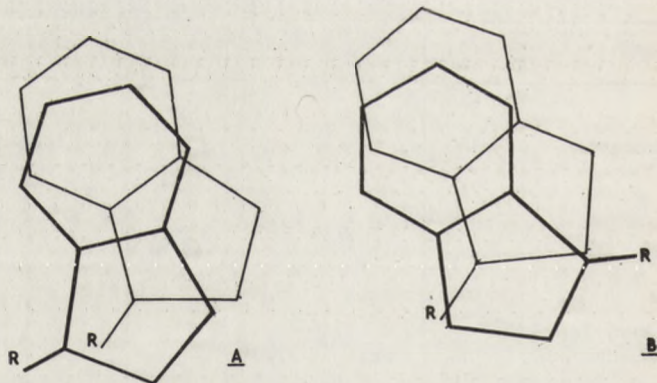
0,76 ppm dla pierścienia pirymidynowego,

0,53 ppm dla pierścienia imidazolowego.

Zależność temperaturowa stężeniowego efektu NMR sugeruje egzotermiczny charakter procesu asocjacji. Ze wzrostem temperatury obserwuje się obniżenie efektów. Te dane korelują z danymi kalorymetrycznymi. Efekt stężeniowy nie występuje w DMSO i DMF, tylko w wodzie. DMSO i DMF znane są jako czynniki denaturujące. Asocjaty ulegają rozerwaniu w rozpuszczalnikach organicznych, z podwyższeniem temperatury i ze zmianą pH środowiska.

W oparciu o dane NMR można stwierdzić, że asocjacja nukleozydów purynowych jest większa niż samych puryn. Badania metylowanych pochodnych wskazują, że asocjacja nie zachodzi poprzez tworzenie wiązań wodorowych, np. N-6-dwumetyloadenozyna asocjuje silniej niż adenozyna, mimo likwidacji centrów donorowych dla wiązań wodorowych.

Z badań NMR [3] wynika, że miejscem asocjacji nukleozydów są zasady. Modyfikacja pentozy, np. poprzez metylowanie, może działać inhibitująco na asocjację ze względów sterycznych. W oparciu o wyniki NMR proponuje się dwa modele:



Układ B faworyzowany jest przez zmniejszoną zawadę przestrzenną rybozy i zmniejszone odpychanie między momentami dipolowymi sąsiednich zasad. Te modele przedstawiają uśrednioną konformację zasad. Energia asocjacji jest rzędu wielkości kT, więc kompleksy posiadające różne konformacje szybko przechodzą jeden w drugi.

Asocjaty w roztworach są stabilizowane siłami wzajemnego oddziaływania między zasadami i efektami związanymi z oddziaływaniem rozpuszczalnika z zasadami wolnymi (niezasocjowanymi) i zasocjowanymi. Oddziaływania zasada - zasada są uwarunkowane siłami van der Waalsa - Londona.

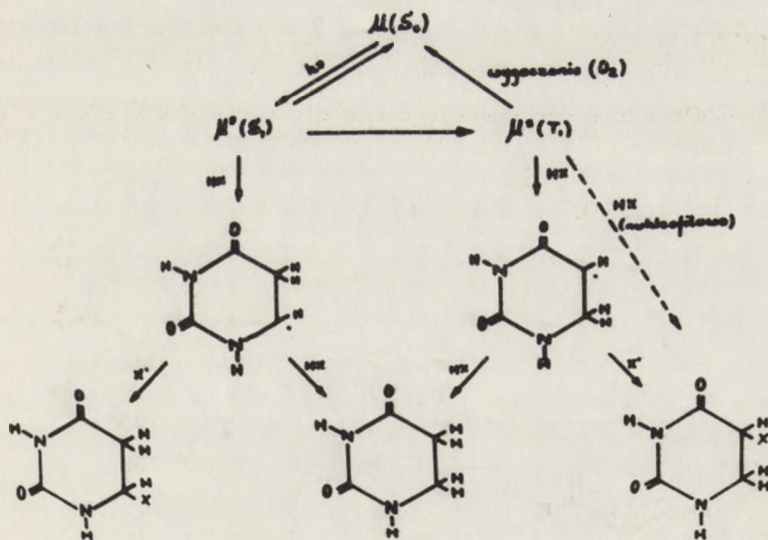
H i p o c h r o m i z m

Dobrze znaną cechą widm w UV kwasów nukleinowych jest tzw. efekt hipochromowy tzn. zmniejszenie integralnej powierzchni pasma absorpcji polimeru w odniesieniu do mononukleotydu. Stosowane jest również pojęcie "hipo-

Prawie wszystkie wspomniane wyżej reakcje przebiegają zgodnie ze schematem a na rys. 3. Schemat b obowiązuje w przypadku przyłączenia związków siarki, częściowo amin i ewentualnie H_2O_2 . Sposób przyłączenia zależy od mechanizmu procesu. Przyjmowany dotychczas mechanizm nukleofilowego przyłączenia [4,39], przynajmniej do reakcji biegnących ze wzbudzonego stanu singletowego (a do takich należą np. reakcje hydratacji), nie wydaje się być możliwym. Zarzuty są następujące:

1. w stanie wzbudzonym obserwujemy zwiększoną gęstość elektronów w pozycji C6 przy jednoczesnym jej zmniejszeniu na węglu C5,
2. krótki czas życia stanu singletowego oraz znaczne zmniejszenie rzędu wiązania $C5 = C6$ wykluczają łatwiejszą polaryzowalność tego wiązania w stanie wzbudzonym; wiązanie jest bardziej spolaryzowane, ale w kierunku przeciwnym niż wymagałby tego założony mechanizm [4, 39].

Alternatywna propozycja przebiegu omawianych reakcji przedstawiona została na rysunku 4 [17].



Rys. 4. Mechanizm reakcji fotoprzyłączenia

Cząsteczka uracylu w stanie singletowym S_1 reaguje z $H-X$ z wytworzeniem bardziej trwałego rodnika w pozycji C6. Rodnik ten natychmiast przyłącza rodnik X' lub, reagując ponownie z HX , przechodzi w dwuhydrouracyl.

Po zajęciu konwersji do stanu tripletowego T_1 możliwe są dwie sytuacje:

1. uracyl w stanie tripletowym (jako dwurodnik) atakuje cząsteczkę HX swoją bardziej aktywną pozycją C6 odrywając atom wodoru. Wytworzony rodnik

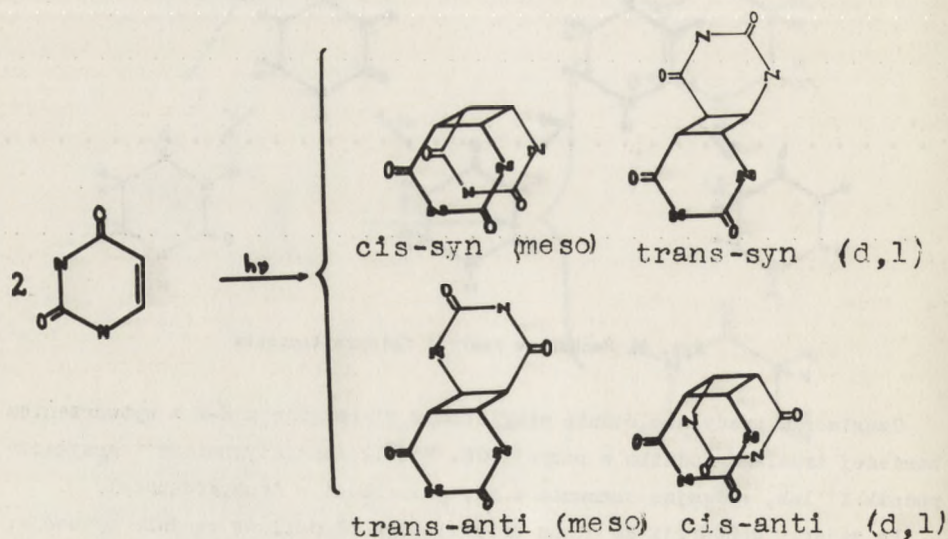
monohydrouracylowy może oderwać wodór od HX - powstaje wtedy dwuhydrouracyl (jak w przypadku opisanym w pracy [6,9]) lub połączyć się z rodnikiem X'. Obydwa ostatnie procesy dotyczą węgla C5 uracylu,

2. wzbudzona cząsteczka uracylu w stanie T1 ulega reakcji nukleofilowej przy zmienionym rozkładzie gęstości elektronów. W tej sytuacji atak nukleofilowy atomu X zachodzi w pozycji C5, a elektrofilowe przyłączenie wodoru - na węglu C6 (rys. 4).

Przedstawiony mechanizm zgodny jest z obserwacjami poczynionymi dla większości znanych procesów fotoprzyłączenia (w tym również przyłączenia związków siarki i amin), dopuszcza możliwość złożonego przebiegu reakcji i tłumaczy brak spodziewanej korelacji między nukleofilowością a reaktywnością danej grupy funkcyjnej w procesie przyłączenia.

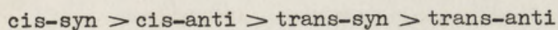
T w o r z e n i e d i m e r ó w c y k l o b u t a n o w y c h

Cyklobutanowa dimeryzacja (rys. 5) jest procesem charakterystycznym dla α, β - nienasyconych związków karbonylowych [18,19]. Reakcja ta w przypadku wolnych zasad pirymidynowych prowadzi do sześciu stereoisomerów [20] (rys. 5), których strukturę określono na drodze degradacji chemicznej [22-24], badań rentgenostrukturalnych [25-32], a także w oparciu o różnice polarności (momentów dipolowych) z wykorzystaniem chromatografii [33,34,35, 36,37,68,69].



Rys. 5. Możliwe izomery fotodimerów uracylu

Ustalono następujący szereg zmniejszającej się polarności:



Struktury syn są bardziej trwałe niż odpowiednie struktury anti, które z łatwością rozpadają się w gorących, zakwaszonych lub zalkalizowanych wodnych roztworach [34,38].

Ciekawą i charakterystyczną cechą fotodimerów cyklobutanowych jest uzależnienie ich struktury (długości wiązań i kątów między wiązaniami) wyłącznie od konfiguracji: formy cis-syn i cis-anti posiadają wygięty pierścień cyklobutanowy z kątem dwuściennym około 155° [26,24,29,31], natomiast formy trans-anti mają płaskie pierścienie cyklobutanowe [27, 32].

Dimeryzacja cyklobutanowa zachodzi zarówno w wodnych roztworach zasad [37], w roztworach zamrożonych - szklkach [40] oraz w fazie krystalicznej [69], jak i w cząsteczkach kwasów nukleinowych RNA [63, 71], DNA [70], przy czym wydajności poszczególnych izomerów (rys. 5) w każdym przypadku są różne (odpowiednie zestawienie znaleźć można w pracy [39]).

Obserwowano również procesy sensybilizowanej fotodimeryzacji, które zachodzą wtedy, gdy w środowisku reakcji cząsteczka absorbująca promieniowanie posiada wyższą energię stanu tripletowego (T_1) niż energia odpowiedniego stanu cząsteczki pirymidyny, np. uracylu ($E_{T_1} = 78,8$ kcal/mol), lecz zupełnie inaczej reaguje w obecności acetofenonu ($E_{T_1} = 76,2$ kcal/mol) czy propiofenonu ($E_{T_1} = 72,8$ i $74,7$ kcal/mol) - następuje wówczas przyłączenie ketonów [40,41, 42 a,b, 43] (rys. 6). Aceton sensybilizuje także dimeryzację cytozyny [37].

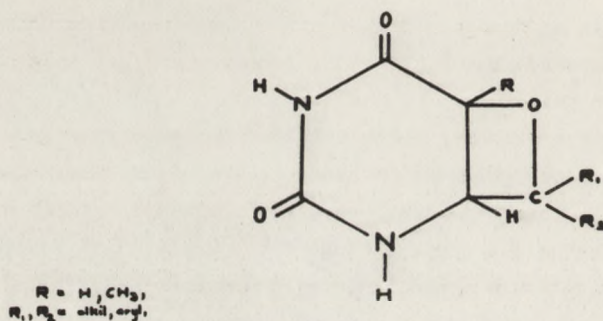
Jest rzeczą godną uwagi, że produkty zawierające pierścień cyklobutanowy mogą powstawać nie tylko na drodze fotodimeryzacji samych zasad. Prowadzą do nich wszystkie procesy przyłączania olefin, w tym nawet etylenu [44].

T w o r z e n i e s t r u k t u r o k s e t a n o w y c h

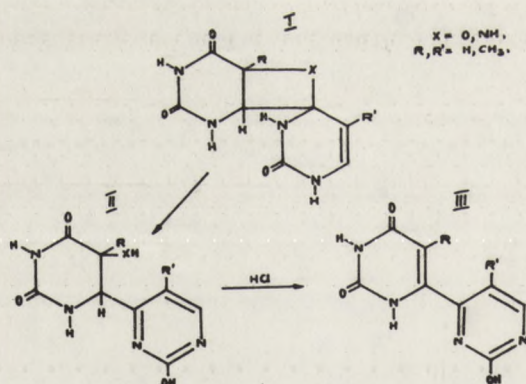
Naświetlanie roztworów zasad pirymidynowych w obecności ketonów może prowadzić do przyłączenia tych ostatnich z wytworzeniem połączeń przedstawionych na rys. 6 [37,40-43].

Analogiczne połączenia mogą powstać w wyniku reakcji dwóch cząsteczek zasad pirymidynowych (rys. 7).

Połączenia te są bardzo nietrwałe, a o ich istnieniu wnioskuje się zwykle pośrednio: reakcje fotochemiczne w zamrożonych wodnych roztworach uracylu [45] i tyminy [46-48] doprowadziły do otrzymania związków III (rys. 7), które mogły powstać z odpowiednich struktur oksetanowych I. Należy zaznaczyć, że trwałość struktur II jest również bardzo ograniczona. Powstawanie układów oksetanowych wykazano także w pracach [49-51].



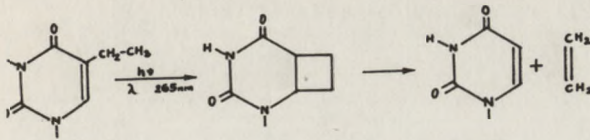
Rys. 6. Produkt przyłączenia ketonu do cząsteczki uracylu



Rys. 7. Analogiczny do przedstawionego na rys. 6 produkt reakcji dwóch cząsteczek zasad pirymidynowych i jego charakterystyczne reakcje

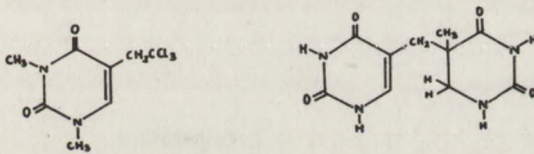
Interesujące są reakcje, jakim ulegają podstawniki alkilowe przy C5 pirymidyn. Naświetlanie roztworu 5-etylouracylu prowadzi do usunięcia grupy etylowej (rys. 8) [52,53].

Eliminacja ta będąca w końcowej swej fazie odwróceniem fotoprzyłączenia etylenu, dowodzi jednocześnie aktywności pozycji C6 w reakcjach rodnikowych. Procesami, które wskazują na analogię do odpowiednich przemian alkilowych podstawników w pierścieniu aromatycznym są reakcje tyminy z CCl_4 [55] oraz tworzenie nowego typu dimerów [54] (rys. 9).

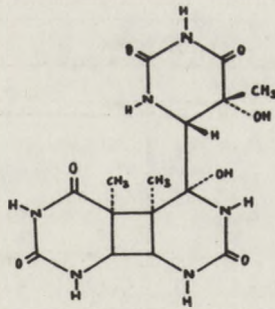


Rys. 8. Fotoindukowane odłączenie grupy etylowej od 5-etylouracylu

W zamrożonych roztworach wodnych zasad powstawać mogą także fototrimery (rys. 9a). W przypadku uracylu są to związki niezbyt trwałe [24, 45]; szczególnie przebadano fototrimer tyminy [46a, 47, 56, 57].



Rys. 9. Nietypowe produkty reakcji fotochemicznych tyminy

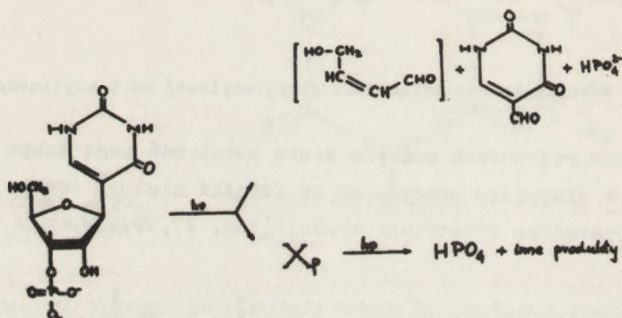


Rys. 9a. Fototrimer tyminy

Przemiany fotochemiczne nukleotydów

Obecność wielu grup funkcyjnych w cząsteczkach nukleotydów w znacznym stopniu komplikuje badania. Przykładowo naświetlanie Tpt w wodnym roztworze prowadzi do otrzymania dwóch fotodimerów wewnątrzcząsteczkowych cis-syn i trans-syn oraz dwóch produktów o nieznanych strukturach [58, 60]. Po-

dobnie 3'fosforan pseudourydyny, poddany działaniu światła o długości fali 254 nm, reaguje w dwojaki sposób (rys. 10), przy czym w jednym przypadku powstałego produktu nie udało się zidentyfikować [59].



Rys. 10. Fotoliza pseudourydyny

W tabeli XII (z pracy 59) przedstawiono wydajności kwantowe niektórych ważniejszych przemian nukleotydów.

Tabela XII

$\times 10^3$			
Związek	Hydrat	Dimer	Ogółem
Up	18		18
Cp	12		12
UpU	18	38	56
CPCP			7,5
CpUp	18		
3' - MP	Rozpad		Przegrupowanie
	10	6	16

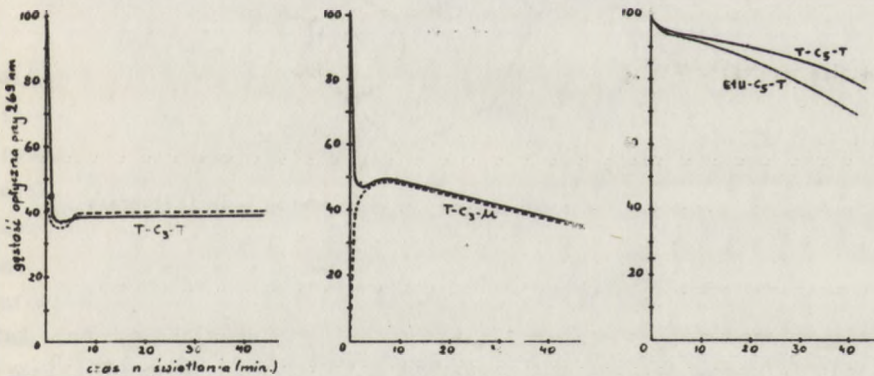
Fotochemia pirymidynowych analogów nukleotydów

Trudności występujące w badaniach nukleotydów mogą zostać wyeliminowane przez zastosowanie odpowiednich układów modelowych. Doskonałymi, choć nie jedynymi modelami (w pracowni N.J. Leonarda otrzymano i przebadano tzw.

skrócone nukleozydy [64] zbudowane na bazie dezoksyrybozy), okazały się znow polimetylenowe analogi nukleotydów. Efekty związane z asocjacją warstwową, wyraźnie występujące w serii tych związków, sugerują, że ich reakcje fotochemiczne w dużym stopniu będą zbieżne z procesami zachodzącymi w polinukleotydach. Biorąc pod uwagę, że w przypadku analogów mamy do czynienia z "czystym" oddziaływaniem zasad należy przypuszczać, że przemiany fotochemiczne tych związków oparte będą na jednej lub kilku reakcjach przedstawionych na rysunku 2.

K i n e t y k a p r z e m i a n f o t o c h e m i c z n y c h

Interesujące są wyniki badań kinetycznych fotolizy polimetyleno-bis-(5-alkilo)uracyli w roztworach wodnych naświetlanych promieniowaniem o długości fali 265 nm. Typowe przebiegi otrzymywanych w trakcie tych badań krzywych kinetycznych przedstawiono na rys. 11 [39,62 a,b].

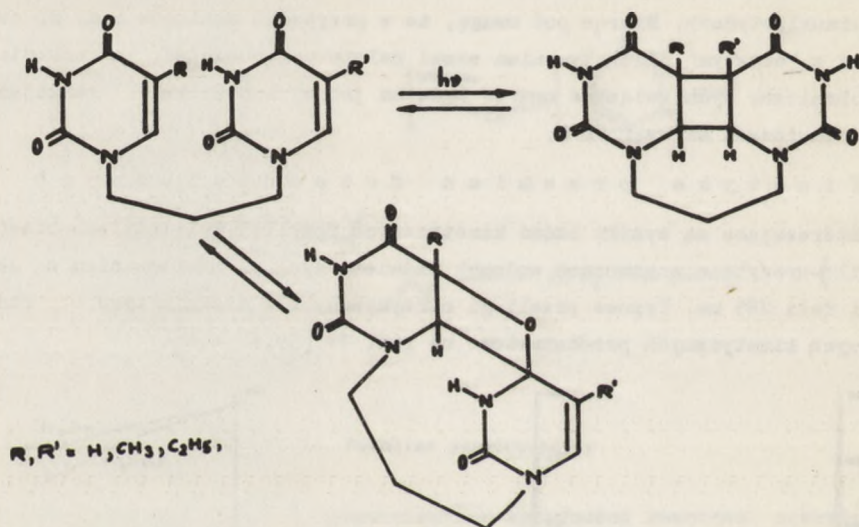


Rys. 11. Krzywe kinetyczne fotolizy polimetyleno-bis-(5-alkilo)uracyli

Analiza powyższych krzywych prowadzi do następujących wniosków:

- 1) przebieg fotolizy zależy przede wszystkim od długości łańcucha polimetylenowego; wpływ podstawnika w pozycji 5 jest znikomy,
- 2) w serii trójmetrylenowej naświetlanie tak substratów jak i fotodimerów prowadzi do stanu fotostacjonarnego, którego osiągnięcie umożliwia dopiero przebieg dalszych procesów o mniejszej wydajności kwantowej. Dokładne badania wykazały, że stan ten jest skutkiem występowania odwracalnej dimeryzacji cyklobutanowej (układy 5-cio metylenowe z trudem ulegają dimeryzacji, stąd przewaga procesów nieodwracalnych i odmienny kształt krzywej kinetycznej, rys. 11),
- 3) jednym z procesów jest tworzenie nietrwałych struktur oksetanowych. Powstawanie tych związków wiąże się z występowaniem minimum na krzywych kinetycznych (rys. 11 i 12).

4) reakcje konkurencyjne - fotohydratacja, deetylacja, fotoutlenianie - nie odgrywają większej roli (przynajmniej w serii trójmetrylenowej). Procesem głównym jest fotodimeryzacja cyklobutanowa [39].



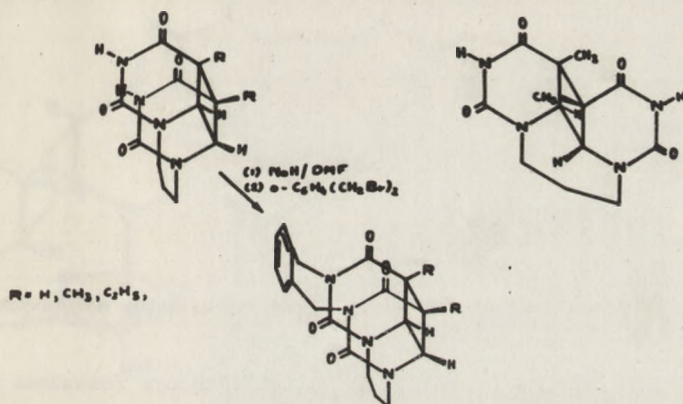
Rys. 12. Przemiany fotochemiczne trójmetryleno-bis-(5-alkilo)-uracyli

S t r u k t u r a f o t o d i m e r ó w

Naświetlanie wodnych roztworów analogów trójmetrylenowych prowadzi każdorazowo do otrzymania z dużą wydajnością jednego tylko produktu, którym jest izomer cis-syn dimeru cyklobutanowego. Nie stwierdzono dotychczas powstawania drugiego, dopuszczalnego z uwagi na ograniczoną długość łańcucha - $(CH_2)_3$ - izomeru syn-trans, rys. 13 [39, 62 a, b].

Strukturę cis-syn uzyskiwanych fotodimerów udowodniono przez syntezę odpowiednich o-ksylenowych pochodnych (rys. 13), przez porównanie danych spektralnych z odpowiednimi danymi dla fotodimerów o znanej strukturze oraz na drodze analizy widm NMR [39, 62 a, b].

Fotodimer T-C₃-T badano rentgenograficznie [25]. Badania te doprowadziły również do ustalenia konformacji pierścienia 1,4-dwuazacykloheptanowego w omawianym fotodimerze. W stanie krystalicznym jest to konformacja krzesłowa. Na podstawie rozważań modelowych oraz w oparciu o analizę stałych sprzężenia protonów łańcucha metylenowego i temperaturowe badania NMR ustalono [39], że konformacja ta jest również dominującą w roztworze.



Rys. 13. Możliwe izomery fotodimerów trójmetylenowych analogów nukleotydów

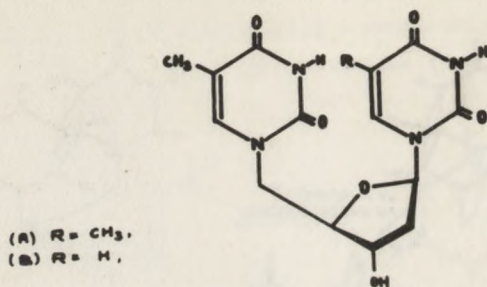
Analiza sygnałów protonów imidowych w różnych fotodimerach prowadzi do wniosku, że symetrycznie podstawione w pozycjach 5,5'-fotodimery występują w roztworze izoenergetycznych, szybko przechodzących jedna w drugą konformacjach, wynikających ze zmian konformacyjnych pierścieni dwuhidropirymidynowych - daje to jeden uśredniony sygnał NMR. W przypadku niesymetrycznego podstawienia 5,5' cząsteczki fotodimeru występują głównie w jednej konformacji - o niższej energii, co prowadzi do pojawienia się dwóch sygnałów NMR protonów imidowych [39].

Wymienione konformacje znaleziono wcześniej w krystalicznym stanie fotodimeru T-C₃-T [25].

Stałe sprzężenia protonów w położeniach 6 i 6' fotodimerów pozwalają na zbadanie geometrii pierścieni cyklobutanowych. Na podstawie porównań ze stałymi sprzężeń dla odpowiednich fotodimerów tyminy i uracylu, w których pierścien ten jest wygięty oraz wykorzystując dane rentgenostrukturalne dla T-C₃-T, ustalono, że we wszystkich fotodimerach trójmetyleno-bis-(5-alkilo)-uracyli występuje płaski pierścień cyklobutanowy.

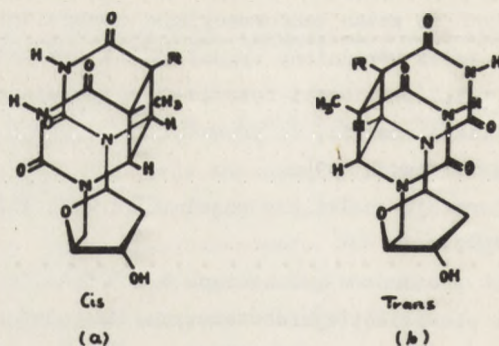
Przedstawione w niniejszej pracy wyniki dotyczą głównie trójmetylenowych analogów nukleotydów. Podyktowane to jest łatwością, z jaką ulegają one fotodimeryzacji. Ostatnio otrzymano (z wydajnością 20%) i zbadano cyklobutanowy fotodimer pięciometylenobistyminy. Jak się okazało dimer ten również posiada konfigurację cis-syn [73].

Interesująco przedstawia się stereochemia produktów przemian fotochemicznych tzw. "skróconych" dwunukleozydów [72], (rys. 14).



Rys. 14. "Skrócone" dwunukleozydy - nowy typ związków modelowych

Związek (A) naświetlany przy 300 nm w rozcieńczonym roztworze wodnym daje wyłącznie jeden fotodimer (wydajność 88%), którego strukturę ustalono jako cis-syn. Istnieją jednak dwie możliwości realizacji takiej struktury (rys. 15). Szczegółowe badania wykazały, że otrzymany produkt ma konfigurację przedstawioną na rys. 15 a - "cis" względem ułożenia tlenu furanowego i karbonyli.

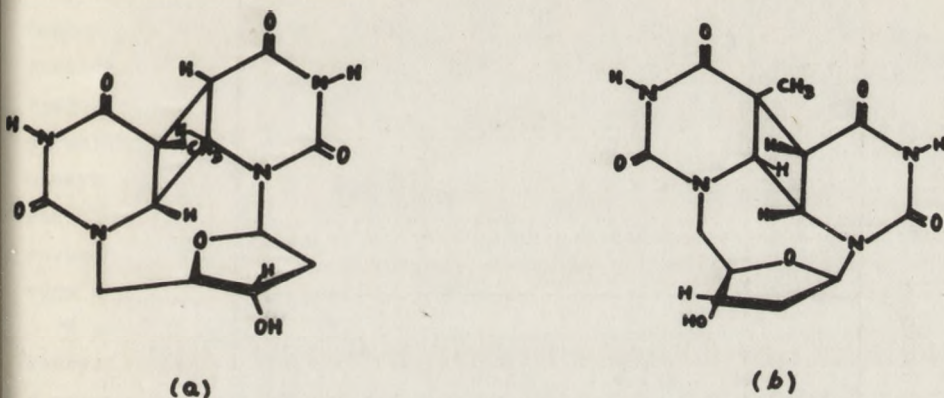


Rys. 15. Fotodimery "skrótanych" dwunukleotydów

Naświetlanie związku (B) przy 300 nm w obecności sensybilizatora (1% acetonu) prowadzi do otrzymania dwóch produktów w stosunku 1:1. Są nimi:

- fotodimer cis (cis-syn), o konfiguracji identycznej z określoną wyżej dla dimeru związku (A) (rys. 15 a); wydajność 42%,

- fotodimer trans-syn (wydajność 44%), konfigurację którego przedstawia rys. 16 b. Alternatywna struktura (rys. 16 a) odrzucona została w oparciu o badania NMR [72].



Rys. 16. Fotodimery "skróconych" dwunukleotydów

Mechanizm fotodimeryzacji

Wysoka stereoselektywność fotodimerazycji trójmetylenobis (pięć-alkilouracyli) - ponad 90% izomeru *cis-syn* - oraz zależność wydajności kwantowej fotodimeracji od długości łańcucha polimetylenowego świadczą o wpływie asocjacji warstwowej na przebieg reakcji dimeryzacji. Optymalną długość posiada łańcuch trójwęglowy umożliwiający równoległe ułożenie zasad. Łańcuchy $-(CH_2)_2$ - oraz $-(CH_2)_5$ - utrudniają przebieg reakcji (spadek wydajności kwantowej) na skutek zwiększonych naprężeń i wzrostu energii stanu przejściowego (łańcuch C_2) lub ułatwienia dezaktywacji wzbudzonej cząsteczki przed zajściem reakcji (łańcuch C_5). Dłuższe łańcuchy utrudniają również asocjację warstwową w stanie podstawowym.

Fotodimeryzacja analogów trójmetylenowych w roztworach wodnych zachodzi ze stanu singletowego (brak efektu tlenkowego i wygaszanie przez KBr). Struktura bardziej stabilnego kompleksu van der Waalsa w stanie podstawowym decyduje więc o przebiegu reakcji (ze względu na krótki czas życia stanu wzbudzonego).

Jeżeli tak jest, to ze wzrostem oddziaływań typu "stacking", mierzonym np. jako wzrost hipochromizmu, powinniśmy obserwować zwiększenie wydajności kwantowej fotodimeryzacji. Doświadczenie nie w pełni potwierdza tę zależność [39, 62a, b], (tabela XIII). Szereg związków o wzrastających oddziaływaniach nie jest zbieżny z szeregiem wzrostu wydajności kwantowej

Hypochromizm i wydajności kwantowe fotodimeryzacji analogów

Połączenie	Środowisko	Hypochromizm %	Wydajności kwantowe dimeryzacji 10^{-2} przy 270 nm
EtU-C ₃ -EtU	H ₂ O, N ₂	8,8	3,4
EtU-C ₃ -T	H ₂ O, N ₂	7,9	3,5
T-C ₃ -T	H ₂ O, N ₂	7,0	4,0
EtU-C ₃ -U	H ₂ O, N ₂	4,5	2,6
T-C ₃ -U	H ₂ O, N ₂	2,6	2,4
EtU-C ₅ -T	H ₂ O, N ₂	1,2	0,2
U-C ₃ -U	H ₂ O	1,2	-
T-C ₅ -T	H ₂ O, N ₂	1,0	0,2
EtU-C ₃ -EtU	C ₂ H ₅ OH, N ₂	-0,3	-
EtU-C ₃ -EtU	C ₂ H ₅ OH, O ₂	-	-
T-C ₃ -T	C ₂ H ₅ OH, N ₂	-1,3	-
T-C ₃ -T	C ₂ H ₅ OH, O ₂	-	-
T-C ₃ -T	0,1 N NaOH, O ₂	5,6	-

fotodimeryzacji. Wynikłe niezgodności tłumaczy się wpływem oddziaływań sterycznych podstawników przy C5 i C5' na energię stanu przejściowego. Istotnie, zgodnie z założeniami Jiro Higuchi i Takeshi Ito (obliczenie dla pochodnych benzochinonu w kryształach [19]), energia stabilizacji stanu przejściowego zależy od międzymolekularnych całek nakrywania. Równoległe i wzajemnie przesłaniające się ułożenie pierścieni zasad stabilizuje więc strukturę stanu przejściowego. Odchylenia od tego układu wywołane objętościowym oddziaływaniem podstawników prowadzą wtedy do zmniejszenia jego stabilności, a w konsekwencji do obniżenia wydajności kwantowej. Powyższe rozumowanie tłumaczy również znaczenie mniejszą trwałość stanu przejściowego o strukturze trans-syn.

W przypadku użycia innych rozpuszczalników niż woda, np. alkoholu, w których nie dochodzi do asocjacji warstwowej, a zasady kompleksują głównie z wytworzeniem wiązań wodorowych, obserwowano znaczne zmniejszenie wydajności kwantowej fotodimeryzacji. Przy naświetlaniu $\text{EtU-C}_3\text{-EtU}$ pojawił się nawet efekt tlenkowy - wskazuje to na udział stanu tripletowego w dimeryzacji [39].

Nie jest wykluczone, że wzbudzenie cząsteczek polimetylenowych analogów, zwłaszcza w układach o krótkim łańcuchu, zachodzi nie na drodze izolowanego wzbudzenia jednej z zasad tworzących cząsteczkę, lecz całego układu sprzężonego w wyniku oddziaływań wibronowych. Sprzężenia takie są powszechnym zjawiskiem w dimerach [64]. W omawianym przypadku nie zaobserwowano jednak żadnych wyraźnych efektów spektralnych (poza hipochromizem), przemawiających za istnieniem sprzężenia wibronowego. Hipochromizm może być jednakże z powodzeniem wytłumaczony również na innej drodze (patrz cz.I) [65-67].

U w a g i k o ń c o w e

Omawiane układy modelowe, charakteryzujące się niezbędną prostotą budowy i stosunkowo łatwo dostępne, odgrywają dużą rolę w poznaniu natury oddziaływań oraz mechanizmów reakcji występujących w organizmach żywych i przebiegających z udziałem niezwykle ważnych biologicznie substancji do jakich należą kwasy nukleinowe czy enzymy. Wyniki uzyskane z wykorzystaniem analogów nukleotydów są w dobrej zgodności z ustaleniami opartymi na badaniach nukleotydów czy wręcz kwasów nukleinowych (fotoliza DNA i RNA prowadzi również do fotodimerów cyklobutanowych o strukturze cis-syn [58, 60, 63]), przy czym układy te charakteryzuje duży hipochromizm. Badanie analogów typu "skróconych" dwunukleozydów pozwalają dodatkowo na wyciągnięcie ważnych wniosków dotyczących samych nukleozydów - ich konformacji.

LITERATURA

- [1] Sewilla M.D., Van Paemel C.; Photochem. Photobiol., 15, 407-409 (1972).
- [2] Moore A.M.; Can. J. Chem., 36, 281 (1958).
- [3] Sinsheimer R.L., Rastings R.; Science 110, 525 (1949).
- [4] McLaren A.D., Shugar D.; Photochemistry of proteins and nukleic acids s. 162
- [5] Ochiai Hideo; Agr. Biol. Chem. 35, 622-624 (1971).
- [6] Ochiai Hideo; Shibats Hitoski; Agr. Biol. Chem. 36, 1955-1960, (1972).
- [7] Smith K.C.; Biochem. Biophys. Res. Commun., 39, 1011 (1970).
- [8] Smith K.C., Aplin R.T.; Biochemistry, 5, 2125 (1966).
- [9] Gorelia Lester S., Lisagor Philip, Yang N.C.; Photochem. Photobiol., 16, 465-480 (1972).
- [10] Fikus M., Shugar D.; Acta Biochim. Polon. 13, 39 (1966).
- [11] Shugar D., Wierzchowski K.L.; Post. Biochem. Suppl. 4, 243 (1958).
- [12] Wang S.Y.; Nature 190, 690 (1961).
- [13] Moore A.M.; Can. J. Chem., 37, 1281 (1959).
- [14] Fikus M., Wierzchowski K.L., Shugar D.; Photochem. Photobiol. 1, 325 (1962).
- [15] Fahr E., Kleber R., Beobinger E.; Z. Naturforsch. 21b, 219 (1966).
- [16] Ewans N.A., Serige W.E., McLaren A.D.; Photochem. Photobiol. 9, 515 (1969).
- [17] Langer J.; wyniki niepublikowane.
- [18] Calvert J.G., Pitts J.N. jr; Photochemistry, New York-London-Sydney, John Wiley and Sonns.
- [19] Higuchi Jim, Ito Takeski; Theoret. Chim. Acta (Berl) 22, 61-69 (1971).
- [20] Fraenkel C., Wulf D.L.; Biochim. Biophys. Acta 51, 332 (1961).
- [21] Witkop B.; Photochem. Photobiol. 7, 813 (1968).
- [22] Kunieda T., Witkop B.; J. Am. Chem. Soc. 89, 4232 (1967).
- [23] Blackburn C.M., Dawies R.J.; J. Am. Chem. Soc. a) 89, 5941 (1967); b) Chem. Commun. 1965, 215; c) J. Chem. Soc. C, 23, 2239 (1966).
- [24] Konnert J., Gibson J., Karle J.L., Khattak M.N., Wang S.I.; Nature 227, 953 (1970).
- [25] Leonard N.J., Golankiewicz K., McCredie R.S., Johnson S.M., Paul J.C.; J. Am. Chem. Soc. 91, 5855 (1969).
- [26] Cammerman N., Cammerman A.; Science 160, 1451 (1968).
- [27] Cammerman N., Nyburg S.C., Weinblum D.; Tetrahedron Lett. 4127 (1969).
- [28] Cammerman N., Nyburg S.C.; Acta. Cryst. B25, 388 (1969).
- [29] Cammerman N., Weinblum D., Nyburg S.C.; J. Am. Chem. Soc. 91, 982 (1969).

- [30] Elad D., Kruger C., Schmidt G.M.J.; Photochem.Photobiol. 6, 495 (1967).
- [31] Adman E., Gordon M.P., Jensen L.H.; Chem.Comm. 1019 (1968).
- [32] Einstein J.R., Nosszu J.L., Longwarth J.W., Rahan R.O., Wei C.H.; Chem.Comm. 1063 (1967).
- [33] Sasson S., Rosenthal J., Elad D.; Tetrahedron Lett. 4513, (1970).
- [34] Weinblum D., Johns H.E.; Biochim.Biophys.Acta 114, 450 (1966).
- [35] Weinblum D., Ottensmeyer F.P., Wright G.F.; Biochim.Biophys.Acta 155, 24 (1968).
- [36] Jennings B.H., Pastra S.C., Wellington J.L.; Photochem.Photobiol. 11, 215 (1970).
- [37] Varghese A.J.; Photochem.Photobiol. 15, 113-118 (1972).
- [38] Herbert M.A., Le Blanc J.C., Weinblum D., Johns H.E.; Photochem.Photobiol. 2, 3369 (1969).
- [39] Strękowski L.; praca doktorska(1971).
- [40] Varghese A.J., Rupert C.S.; Photochem.Photobiol., 13, 365 (1971).
- [41] Jennings B.H., Pastra-Landis S., Lerman J.W.; Photochem. Photobiol. 15, 479-491 (1972).
- [42] Charlier M., Helane C., a) Photochem.Photobiol. 15, 71-87 (1972);
b) Photochem.Photobiol. 15, 527-536 (1972).
- [43] Chelier M., Helene C.; C.R.Acad.Sc.Paris, 272, 743 (1971).
- [44] Maleski R., Morrison H.; Mol.Photochem., 4, 55-59 (1972).
- [45] Khattak M.W., Wang S.J.; Science, 163, 1341 (1969).
- [46] Varghese A.J., Wang S.Y.; a) Biochem.Biophys.Res.Comm., 33, 102 (1968); b) Science 160, 186 (1968).
- [47] Rahn R.O., Hosszu J.L.; Photochem. Photobiol., 10, 131 (1968).
- [48] Karle I.L., Wang S.Y., Varghese A.J.; Science 164, 183 (1969).
- [49] Mori T., Yang K.H., Kimoto K., Nazaki H.; Tetrahedron Lett. 2419 (1970).
- [50] Rabinowich D., Schmidt G.M.J.; J.Chem.Soc. B2, 144 (1967).
- [51] Cream C.E., Mular M., Paice J.C.; Tetrahedron Lett. 3479 (1967).
- [52] Pietrzykowska I., Shugar D.; Acta.Biochim.Polon 17, 361 (1970).
- [53] Pietrzykowska I., Shugar D.; Science 161, 1284 (1968).
- [54] Varghese A.J.; Biochem.Biophys.Res.Comm. 38, 484 (1970).
- [55] Murica D., Kleopfer R., Maleski R., Morrison H.; Mol. Photochem. 4, 513-517 (1972).
- [56] Flippon J.L., Karle I.L., Wang S.Y.; Science 169, 1084 (1970).
- [57] Wang S.Y.; J.Am.Chem.Soc. 93, 2768 (1971).
- [58] Pearson M.L., Ottensmeyer F.P., Johns H.R.; Photochem.Photobiol. 4, 739 (1965).

- [59] Schulman D.H., Kucan I., Edelman B., Chambers R.W., *Biochemistry* 12, 201 (1973).
- [60] Johns H.E., Pearson M.L., Le Blanc J.C., Heikener C.W.; *J.Mol.Biol.* 9, 503 (1964).
- [61] Logue M.W., Leonard N.J.; *J.Am.Chem.Soc.*, 94, 2812 (1972).
- [62] Golankiewicz K., Strękowski L., a) *Bull.Acad.Polon.Sci.* XIX, 97(1971); b) *Bull.Acad.Polon.Sci.* XIX, 171 (1971).
- [63] Huang C.W., Gordon M.P.; *Int.J.Red.Biol.* 23, 527 (1973).
- [64] Konarski J.; *Zeszyty Naukowe Politechniki Poznańskiej* 1, 2 (47) (1967); *Acta Phys.Polon.* XXXII, 427 (1967).
- [65] Nesbet R.K.; *Mol.Phys.* 7, 211 (1964).
- [66] Bolton H.C., Weis J.J.; *Nature.Lond.*, 195, 666 (1962).
- [67] Tinoco I., Jr.; a) *J.Chem.Phys.* 33, 332 (1960); b) *J.Am.Chem.Soc.* 82, 4785 (1960); c) *J.Chem.Phys.* 34, 1067 (1961); d) *J.Am.Chem.Soc.* 83, 5047 (1961).
- [68] Benkers R., Berends W.; *Biochim.Biophys.Acta.* 41, 550 (1960).
- [69] Varghese A.J.; *Photochem.Photobiol.* 13, 357 (1971).
- [70] Tyrrell R.M.; *Photochem.Photobiol.* 17, 63 (1973).
- [71] Harriman P.D., Zachau H.G.; *J.Mol.Biol.* 16, 387 (1966).
- [72] Logue M.W., Leonard N.J.; *J.Am.Chem.Soc.* 94, 2842 (1972).
- [73] Golankiewicz K., Skalski B.; w druku.

DYSKUSJA

W dyskusji poruszono problem zastosowań reguł Woodwarda-Hoffmana i prostych rozważań geometrycznych (w oparciu o modele mechaniczne) przy interpretacji wyników reakcji fotochemicznej dimeryzacji zasad pirymidynowych.

Wątpliwości odnośnie przydatności badań modelowych wyraził mgr Z. Kaźmierczuk.

Mgr A. Sokalski wystąpił z propozycją stosowania dynamicznych indeksów reaktywności, opartych na kompleksach Wheland, jako parametrów lepiej opisujących względną reaktywność cząsteczki niż przedstawione przykładowo dla tyminy indeksy statyczne-frontalne gęstości elektronowe.

LISTA UCZESTNIKÓW KONFERENCJI BOSZKOWO GRUDZIEŃ 1973 ROK

1. Instytut Biochemii i Biofizyki PAN Warszawa
2. Uniwersytet Warszawski Katedra Biofizyki Warszawa
3. Instytut Chemii Organicznej PAN Warszawa Poznań
4. Politechnika Łódzka Instytut Chemii Organicznej Łódź
5. Wojskowa Akademia Medyczna Łódź
6. Instytut Onkologii Gliwice
7. Politechnika Śląska Instytut Chemii i Technologii Organicznej Gliwice
8. Politechnika Krakowska Instytut Chemii i Technologii Organicznej Kraków
9. Politechnika Wrocławska Instytut Chemii Organicznej i Fizycznej Wrocław
10. Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN Łódź
11. Uniwersytet Marii Skłodowskiej Curie Instytut Mikrobiologii i Biochemii Lublin
12. Politechnika Gdańska Instytut Chemii i Technologii Organicznej oraz Żywnościowej Gdańsk
13. Uniwersytet Gdański Instytut Chemii Gdańsk
14. Uniwersytet im. B.Bieruta Instytut Chemii Wrocław
15. Akademia Medyczna Łódź
16. Uniwersytet Adama Mickiewicza Instytut Chemii Poznań
17. Uniwersytet Adama Mickiewicza Instytut Fizyki Poznań
18. Akademia Rolnicza Międzyuczelniany Instytut Biochemii Poznań
19. Uniwersytet Adama Mickiewicza-Międzyuczelniany Instytut Biochemii Poznań
20. Akademia Medyczna Poznań
21. Zakład Genetyki Roślin PAN Poznań
22. Instytut Fizyki PAN Poznań

1. Adamiak R.	mgr	3
2. Antkowiak J.	mgr	16
3. Antkowiak R.	mgr	3

4. Antkowiak W.	doc.dr hab.	16
5. Arnold Z.	dr inż.	5
6. Augustyniak H.	dr	3
7. Augustyniak J.	doc.dr hab.	19
8. Barciszewska M.	mgr	16
9. Bareiszewski J.	mgr	3
10. Barczyński P.	mgr	16
11. Biała E.	mgr	16
12. Bierzyński A.	mgr	1
13. Bochwic B.	prof.dr hab.	4
14. Bolewska K.	mgr	1
15. Boryski J.		16
16. Bujarski J.	mgr	16
17. Chimiak A.	doc.dr hab.inż.	12
18. Daniluk W.		16
19. Danowska G.		16
20. Darżynkiewicz E.	mgr	2
21. Dembek P.	mgr	16
22. Dębska G.	mgr	17
23. Dobek A.	mgr	17
24. Domagalski P.		16
25. Drabowicz J.	mgr	10
26. Dramiński M.	dr inż.	5
27. Dramiński W.	mgr inż.	4
28. Duda T.	mgr	16
29. Dzięgielewski T.	mgr	18
30. Fechnerowa B.	dr	17
31. Fiałkiewicz Z.	dr	13
32. Flatau K.	mgr	17
33. Frankowski A.	dr inż.	4
34. Frass E.	mgr inż.	5
35. Frencel I.	doc.dr hab.	21
36. Gessner W.	mgr	16
37. Giziewicz J.	mgr	1
38. Golankiewicz B.	doc.dr hab.	3
39. Golankiewicz K.	prof.dr hab.	16
40. Górnicki P.		16
41. Grześkowiak K.	dr	16
42. Haertlé T.	mgr	19

43. Hełka K.		16
44. Jakubowski H.	dr	18
45. Jankowski A.	mgr	16
46. Joachimiak A.		16
47. Jurka J.	mgr	6
48. Karwowska U.	mgr	19
49. Kaźmierczak F.	mgr	16
50. Kaźmierczuk Z.	mgr	2
51. Kierzek R.		16
52. Kleczewska-Kędziora H.	mgr	16
53. Koll A.	dr	14
54. Konieczny A.		16
55. Konys M.	mgr	17
56. Koroniak H.	mgr	16
57. Kowalski P.	mgr inż.	8
58. Kraszewski A.	mgr	3
59. Kręglewski M.	mgr	16
60. Krzyżosiak W.	mgr	16
61. Kułakowska I.	mgr	1
62. Kuśmierek J.	mgr	1
63. Labuda D.	mgr	1
64. Langer J.	mgr	16
65. Lesiak K.	mgr	10
66. Łangowska K.	mgr inż.	16
67. Łuczak J.	mgr	10
68. Magiera T.	mgr	8
69. Małecki J.	prof.dr hab.	22
70. Małkiewicz A.	dr inż.	4
71. Markiewicz M.	mgr	16
72. Markiewicz W.	mgr	3
73. Michalska M.	doc.dr hab.	15
74. Milecki J.	mgr	16
75. Mossor T.	dr	19
76. Mścisz J.	mgr	16
77. Norris R.	dr	18
78. Nowak B.	mgr	16
79. Okupniak J.	mgr	3
80. Olszańska B.	dr	1
81. Oźminkowska J.		16

82. Ożgo Z.	dr	17
83. Paryzek Z.	dr	16
84. Paszczyński A.	mgr	11
85. Paszyc S.	prof.dr hab.	16
86. Patkowski A.	mgr	17
87. Plesiewicz E.	mgr	1
88. Pohorille A.	mgr	2
89. Proba Z.	mgr	1
90. Psoda A.	mgr	2
91. Rafalska M.	mgr	16
92. Rafalski A.	mgr	3
93. Rasała D.	mgr	16
94. Remin M.	mgr	2
95. Rempulska A.		16
96. Rudzińska M.	dr	19
97. Sepioł W.	mgr	1
98. Serafinowski P.	mgr inż.	16
99. Shugar D.	prof.dr hab.	1
100. Siepak E.	mgr	16
101. Skalski B.	mgr	16
102. Słomski R.	mgr	20
103. Smagowicz J.	mgr	1
104. Smiatacz Z.	dr	13
105. Sobótko W.	doc.dr hab.	3
106. Sokalski A.	mgr	14
107. Sokołowska T.	doc.dr hab.	12
108. Stankowski J.	doc.dr hab.	22
109. Stawiński J.	mgr	3
110. Stobiecki M.	mgr	16
111. Strękowski L.	dr inż.	16
112. Stuczyńska B.		16
113. Szafran Z.	dr	3
114. Walczyna R.	mgr	13
115. Wałaszek Z.	dr	7
116. Wenska G.	mgr	16
117. Wiewiórowska D.	dr	3
118. Wiewiórowski M.	prof.dr	3, 16
119. Wójcik J.	mgr	13
120. Wrede A.	mgr	1

121. Wyrzykiewicz E.	dr	16
122. Wysocka W.	dr	16
123. Zakrzewska K.	mgr	1
124. Żarnowski J.	dr	3
125. Kiełczewski M.	doc.dr hab.	16
126. Szyfter K.	dr	3

SPIS TREŚCI

Wstęp	3
Włodzimierz Krzyżosiak, Piotr Barczyński, Analiza konformacyjna nukleotydów	5
Henryk Koroniak, Barbara Nowak, Zależność wicynalnych stałych sprzężenia J_{HH} od kątów dwuściennych ϕ_{HH} w rybofuranozie. Równanie Karpulsa i jego modyfikacje	19
Piotr Barczyński, Włodzimierz Krzyżosiak, Badanie równowag konformacyjnych pierścienia rybofuranozy w nukleozydach i nukleotydach ...	31
Barbara Nowak, Henryk Koroniak, Określenie populacji struktur rotamerowych egzocyklicznej grupy CH_2OH	43
Józef Bujarski, Określenie konformacji rotamerowej syn-anti nukleozydów i nukleotydów metodą PMR	55
Teresa Duda, Zastosowanie NMR do określenia anomerycznej konfiguracji.	67
Jan Milecki, Zastosowanie jądrowego afektu Overhausera i reagentów przesunięcia w badaniach strukturalnych nukleotydów i nukleozydów.	81
Józef Bujarski, Wpływ subtelnej modyfikacji zasady na konformację nukleozydu	95
Danuta Rasała, Ewa Biała, Zastosowanie magnetycznego rezonansu jądrowego do badania konformacji 2',3' i 3',5' cyklicznych nukleotydów ..	103
Wiesław Gessner, Zastosowanie metody PMR do badań konformacyjnych oligonukleotydów. Asocjacja warstwowa zasad azotowych	123
Tytus Dzięgielewski, Zastosowanie NMR wysokiej częstotliwości do badania struktury tRNA	151
Mirosława Z. Barciszewska, Zastosowanie ^{13}C NMR do badania komponentów kwasów nukleinowych	163
Maciej Stobiecki, Spektroskopia ramanowska zasad, nukleozydów i nukleotydów	179
Marek Kręglewski, Problemy teorii widm IR składników kwasów nukleinowych	193

Kazimierz Jędrzejczak, Krzysztof Szyfter, Zastosowanie spektroskopii w podczerwieni do badania struktury kwasów nukleinowych	209
Andrzej Dobek, Adam Patkowski, Badanie struktury kwasów nukleinowych przy pomocy spektroskopii Ramana	223
Jerzy Mściśz, Dichroizm kołowy w badaniach nukleozydów	237
Tomasz Haertlé, Badanie konformacji pochodnej guanozyny i tworzonych przez nie żelów przy pomocy dichroizmu kołowego	249
Bohdan Skalski, Adam Kraszewski, Spektrometria masowa składników kwasów nukleinowych	261
Jan Barciszewski, Antoni J.Rafalski, Izolacja, własności i struktura tRNA specyficznych dla fenyloalaniny	287
Maria Rafalska, Jan Barciszewski, Antoni J.Rafalski, Badania spektroskopowe i strukturalne zasad "Y"	311
Jan Barciszewski, Maria Rafalska, Antoni J.Rafalski, Wykorzystanie własności zasad "Y" w badaniach transferowych RNA	327
Franciszek Kaźmierczak, Jerzy Langer, Związki modelowe w badaniach oddziaływań niewiązaniowych i przemian fotochemicznych komponentów kwasów nukleinowych	345
Lista uczestników konferencji - Boszkowo, grudzień 1973 rok	377