

## Взаємодія з карбоксилат-іоном у безводному ДМСО зсуває прототропну кето-енольну рівновагу в нуклеозидах урацилу і тиміну в бік енольної таутомерної форми: дані спектроскопії $^1\text{H}$ ЯМР

С. П. Самійленко, І. В. Кондратюк, Д. М. Говорун

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна  
E-mail: dhovorun@imb.org.ua

*У спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР кожного з чотирьох нуклеозидів урацилу і тиміну U, dU, T і rT у зневодненому ДМСО за присутності карбоксилат-іона спостережено зникнення сигналів протонів N3H азлікону та всіх гідроксильних протонів глікозидного фрагмента. Ці факти інтерпретовано як результат дикето-кето-енольного таутомерного переходу N3H  $\rightarrow$  O2H у залишках основ при утворенні комплексів нуклеозидів з двома молекулами ліганду: один карбоксилат-іон утворює два H-зв'язки з групами O2H і O5'H, другий — з гідроксильними групами O2'H та O3'H у випадку рибозиду або один H-зв'язок з групою O3'H дезоксирибозиду. Отримано ряди стабільності комплексів, з яких, зокрема, випливає, що канонічні нуклеозиди U і T порівняно з метаболітами dU і rT утворюють з карбоксилат-іоном стабільніші комплекси. Стисло йдеться про біологічну значущість отриманих результатів.*

**Вступ.** Важливість дослідження структурно-динамічних та фізико-хімічних властивостей нуклеозидів — мономерних ланок нуклеїнових кислот — для розуміння структури та «інтимних» механізмів функціонування цих макромолекул у наш час вже можна вважати трюїзмом. З ранніх робіт, присвячених нуклеозидам, вкажемо на вивчення методом ЯМР їхньої самоасоціації в неводних [1] та водних [2] розчинах, асоціації в ДМСО [3], а також на ґрунтовний огляд досліджень просторової структури нуклеозидів та їхніх похідних [4].

Аналіз впливу протонування на спектри  $^{15}\text{N}$  ЯМР нуклеозидів з природнім вмістом ізотопу  $^{15}\text{N}$  [5] дозволив безпосередньо встановити місця їхнього протонування в ДМСО та нейтральних водних розчинах. Окремо відзначимо одну з перших робіт з проблеми специфічності білково-нуклеїнових взаємодій [6], де методом  $^1\text{H}$  ЯМР вивчали утворення комплексів між нуклеозидами та сполу-

ками, що моделюють активні групи амінокислотних залишків. Роль глікозидного фрагмента гуанозину та аденозину у їхній взаємодії з депротонованою карбоксильною групою амінокислот досліджено в роботі [7].

Недавня робота [8], присвячена теоретичному розрахункові методом функціоналу густини в базисі 6-31G(d,p) молекулярної структури канонічних 2'-деоксирибонуклеозидів, містить також стилій, проте вичерпний огляд сучасної літератури щодо структури нуклеозидів. Методом функціоналу густини вивчали також роль конформації цукрового залишку та орієнтації основи у формуванні властивостей 2'-деоксирибо- та рибонуклеозидів в основному стані [9].

У нашій попередній публікації [10] методом  $^1\text{H}$  ЯМР та квантовохімічними розрахунками встановлено дикето  $\rightarrow$  кето-енольний таутомерний перехід в урацилі і тиміні, спровокований їхньою взаємодією у зневодненому ДМСО та вакуумі з депротонованою карбоксильною групою амінокислот. Ця ро-

бота має на меті відповісти на питання, чи здатний карбоксилат-іон викликати подібну зміну таутомерного статусу нуклеозидів урацилу і тиміну?

**Матеріали і методи.** Використано такі реактиви: урацил (Ura) і тимін (Thy) від фірми «Calbiochem» (США); 1-метилурацил ( $m^1$ Ura), 1-циклогексаурацил ( $chx^1$ Ura), уридин (U), дезоксиуридин (dU), 1-метилтимін ( $m^1$ Thy), тимідин (T) і риботимідин (rT) від фірми «Sigma» (США); ацетат натрію (NaAc) від фірми «Реахим» (Російська Федерація); ДМСО- $d_6$  від фірми «Fluka» (Швейцарія) висушували над ситами 4 і 5 Å фірми «Serva» (Німеччина). Спектри  $^1H$  ЯМР реєстрували на спектрометрі Gemini 200 («Varian», США) в ампулах діаметром 5 мм. Концентрація усіх сполук у розчинах складала 30 мМ.

**Результати і обговорення.** Результати дослідження методом  $^1H$  ЯМР взаємодії в ДМСО NaAc, який є прийнятною моделлю депротонованої карбоксильної групи бічних радикалів аспарагинової і глутамінової кислот у білках [11], з нуклеозидами та спорідненими сполуками наведено в табл. 1 і 2. Як видно з таблиць, при взаємодії U, dU, T і rT з карбоксилат-іоном у спектрах  $^1H$  ЯМР зникають сигнали імінопротонів N3H (як і у випадку основ Ura і Thy) та гідроксильних груп O2'H, O3'H, O5'H. У той же час у спектрах похідних основ  $m^1$ Ura,  $chx^1$ Ura і  $m^1$ Thy, в молекулах яких атом водню при глікозидному атомі азоту N1 замінено на метильну або циклогексильну групи, за присутності NaAc спостерігається лише невелике зміщення сигналів протонів N3H у бік слабких полів на 0,030; 0,044 і 0,019 м. ч. відповідно. Це свідчить про збереження таутомерного статусу цих молекул при їхній взаємодії з карбоксилат-іоном та участь імінопротонів N3H у формуванні слабких Н-зв'язків з ним.

Аналіз зсувів сигналів протонів Ura  $\delta$  при заміщенні глікозидного атома азоту N1 (табл. 1) вказує на їхню співмірність та незначну залежність від природи замісника. Для протонів N3H в ряду  $U > dUchx^1 > Ura > m^1Ura$  відповідні значення  $\delta$  складають 0,475; 0,453; 0,392 і 0,386; для протонів C5H — 0,118; 0,179; 0,098 і 0,063; для протонів C6H — 0,485; 0,451; 0,329 і 0,214 м. ч.

Ще більші зміни спостерігаються в ряду  $rT > T > m^1Thy$ : для протонів N3H значення  $\delta$  складають відповідно 0,689; 0,671 і 0,640 та для протонів C6H — 0,475; 0,439 і 0,253 м. ч. (табл. 2).

Отже, заміщення положення 1 піримідинового кільця суттєво збільшує кислотність усіх протонів основи майже незалежно від природи замісника, але характер взаємодії з карбоксилат-іоном кардинально залежить від його природи. Саме наявність

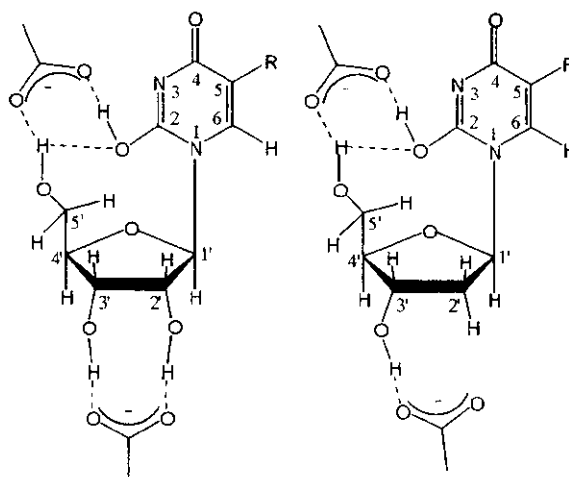


Схема взаємодії уридину (1, R = H) та тимідину (2, R = CH<sub>3</sub>) з карбоксилат-іоном у зневодненому ДМСО

гідроксильних груп у глікозидному фрагменті (а надто в положенні 5') визначає тип взаємодії нуклеозидів з карбоксилат-іоном. Відомо (див., наприклад, [8]), що для піримідинових нуклеозидів у вільному стані та розчині характерним є внутрішньомолекулярний Н-зв'язок O5H...O2, який фіксує суц-конформацію молекули. З урахуванням результатів роботи [10], де за допомогою методу  $^1H$  ЯМР та квантовохімічних розрахунків встановлено, що карбоксилат-іон утворює енергетично найвигідніші комплекси з Ura і Thy, перевозячи їх у O2-енол-O4-кетоформу, ми запропонували схеми взаємодії їхніх нуклеозидів з карбоксилат-іоном (рисунок). За нашою схемою, один карбоксилат-іон взаємодіє з нуклеозидами через два Н-зв'язки O<sup>-</sup>...HO2 і O<sup>-</sup>...HO5' (рисунок). Відмітимо, що другий із зазначених Н-зв'язків для протону O5'H є біфуркативним. Така схема пояснює згадане зникнення сигналів протонів N3H і O5'H. Зникнення ж сигналів гідроксильних протонів O2'H та O3'H зумовлене їхнім втягненням у Н-зв'язки з іншим карбоксилат-іоном (рисунок). Зазначимо, що будь-яка альтернативна схема взаємодії нуклеозидів Ura і Thy з карбоксилат-іоном без урахування зміни їхнього таутомерного статусу не може дати задовільної інтерпретації експериментальних результатів.

Порівняння зміщення в комплексах Ura,  $m^1$ Ura,  $chx^1$ Ura U, dU з карбоксилат-іоном (табл. 1)  $\Delta$  необмінних протонів C5H (−0,050; −0,007; −0,005; −0,050; −0,027 м. ч. відповідно) і C6H (+0,025; −0,005; −0,005; +0,025; +0,016 м. ч. відпо-

Таблиця 1

Хімізсуви (м. ч.) протонів урацилових нуклеозидів, споріднених сполук та їхніх комплексів з карбоксилат-іоном  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  у зневодненому ДМСО- $d_6$ 

Сполука	Протон					
	N11 (CH <sub>3</sub> )	N3H	C5H	C6H	O2'H	O3'H
U	—	11,299	5,638	7,880	5,080*	5,358
U + NaAc	—	—	5,608	7,889	—	—
Δ	—	—	-0,030	+0,009	—	—
dU	—	11,277	5,629	7,846	—	5,227
dU + NaAc	—	—	5,608	7,858	—	—
Δ	—	—	-0,021	+0,012	—	—
Ura	11,020	10,824	5,450	7,395	—	—
Ura + NaAc	—	—	5,400	7,420	—	—
Δ	—	—	-0,050	+0,025	—	—
m <sup>1</sup> Ura	3,217	11,210	5,513	7,609	—	—
m <sup>1</sup> Ura + NaAc	3,215	11,240	5,506	7,604	—	—
Δ	-0,002	+0,030	-0,007	-0,005	—	—
chx <sup>1</sup> Ura	—	11,216	5,548	7,724	—	—
chx <sup>1</sup> Ura + NaAc	—	11,260	5,543	7,719	—	—
Δ	—	+0,044	-0,005	-0,005	—	—

Сполука	Протон					
	O5'H	H1'	H2' (+H2'')	H3'	H4'	H5' + H5''
U	5,080*	5,775	~3,956	4,007	3,836	~3,580
U + NaAc	—	5,751	3,970*	3,970*	3,818	3,572
Δ	—	-0,024	+0,014	-0,037	-0,018	-0,008
dU	4,992	6,148	2,076	4,226	3,774	3,552
dU + NaAc	—	6,135	2,074	4,238	3,757	3,549
Δ	—	-0,013	-0,002	+0,012	-0,017	-0,003
Ura	—	—	—	—	—	—
Ura + NaAc	—	—	—	—	—	—
Δ	—	—	—	—	—	—
m <sup>1</sup> Ura	—	—	—	—	—	—
m <sup>1</sup> Ura + NaAc	—	—	—	—	—	—
Δ	—	—	—	—	—	—
chx <sup>1</sup> Ura	—	—	—	—	—	—
chx <sup>1</sup> Ura + NaAc	—	—	—	—	—	—
Δ	—	—	—	—	—	—

Примітка. Δ — зміщення сигналів протонів при комплексоутворенні; \*накладання сигналів.

відно), а для m<sup>1</sup>Ura, chx<sup>1</sup>Ura також протонів N3H (0,030; 0,044 м. ч. відповідно) дає такий ряд стабільності комплексів Ura:CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>>U:CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>>dU:CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>>chx<sup>1</sup>Ura:CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>>m<sup>1</sup>Ura:CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>.

Для комплексів з карбоксилат-іоном Thy, m<sup>1</sup>Thy, T, rT (табл. 2) аналогічне зміщення сигналів Δ необмінних протонів C6H складає +0,021; -0,003; +0,021, +0,013 м. ч. відповідно (для m<sup>1</sup>Thy

Таблиця 2

Хімізсуви (м. ч.) протонів тимінових нуклеозидів, споріднених сполук та їхніх комплексів з карбоксилат-іоном  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  у зневодненому ДМСО- $d_6$ 

Сполука	Протон					
	N1H (CH <sub>3</sub> )	N3H	C5H	C6H	O2H	O3H
T	—	11,262	1,768	7,691	—	5,514
T + NaAc	—	—	1,765	7,712	—	—
Δ	—	—	-0,003	+0,021	—	—
rT	—	11,280	1,768	7,727	5,059*	5,309
rT + NaAc	—	—	1,762	7,740	—	—
Δ	—	—	-0,006	+0,013	—	—
Thy	10,998	10,591	1,725	7,252	—	—
Thy + NaAc	—	—	1,720	7,273	—	—
Δ	—	—	-0,005	+0,021	—	—
m <sup>1</sup> Thy	3,181	11,231	1,734	7,505	—	—
m <sup>1</sup> Thy + NaAc	3,186	11,250	1,733	7,502	—	—
Δ	-0,001	+0,019	-0,001	-0,003	—	—

Сполука	Протон					
	O5'H	H1'	H2' (+ H2'')	H3'	H4'	H5' + H5''
T	5,007	6,163	2,067	4,229	3,753	3,561
T + NaAc	—	6,151	2,064	4,248	3,738	3,564
Δ	—	-0,012	-0,003	+0,019	-0,015	+0,003
rT	5,059*	5,772	3,961	4,004	3,818	3,586
rT + NaAc	—	5,748	3,973*	3,973*	3,796	3,576
Δ	—	-0,024	+0,012	-0,031	-0,022	-0,010
Thy	—	—	—	—	—	—
Thy + NaAc	—	—	—	—	—	—
Δ	—	—	—	—	—	—
m <sup>1</sup> Thy	—	—	—	—	—	—
m <sup>1</sup> Thy + NaAc	—	—	—	—	—	—
Δ	—	—	—	—	—	—

Примітка. Див. табл. 1.

зміщення протона N3H дорівнює +0,019 м. ч.). У цьому випадку маємо ряд стабільності комплексів — Thy:CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> > T:CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> > rT:CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> > m<sup>1</sup>Thy:CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>. Зіставлення цих двох рядів вказує на незначну кількісну відмінність між ними. Проте з них впливає цікаве спостереження: канонічні нуклеозиди рибозид U і дезоксирибозид T утворюють стабільніші комплекси з депротонованою карбоксильною групою, ніж метаболіти дезоксирибозид dU та рибозид rT.

Наприкінці наголосимо на біологічній значущості вперше встановленої нами раніше [10] для основ Ura і Thy та в цій статті для їхніх нуклеозидів U, dU, T і rT властивості змінювати таутомерний статус при специфічній взаємодії з депротонованою карбоксильною групою амінокислот. Цей факт не можна ігнорувати при дослідженні біохімічних процесів, що протікають за їхньої участі.

