

С. В. ЗЕНИН

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ
ХАРАКТЕРИСТИК ПЕРЕХОДА «СИН — АНТИ»
В АДЕНОЗИН-5'-ФОСФАТЕ МЕТОДОМ ЯДЕРНОГО
МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА**

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 9 IV 1974)

Для выяснения природы белок-нуклеинового взаимодействия необходимы данные о син — анти переходах в нуклеотидах. Теоретический расчет энергетического барьера между анти- и син-конформациями нуклеотидов осуществлен в работах (1, 2). Для пиримидиновых нуклеотидов оценены величины энергетического барьера из данных я.м.р. (3). Доказательство существования преимущественно анти-конформации в пуриновых нуклеотидах также получено методом я.м.р. (4). В производных аденозин-5'-фосфата нами показано наличие внутримолекулярных преобразований, возникающих в связи с переходом син — анти в нуклеотиде (5). В настоящей работе определены кинетические и термодинамические характеристики перехода син — анти в аденозин-5'-фосфате.

В опытах использовали аденозин и аденозин-5'-фосфат (АМФ) фирмы «Реанал» (АМФ в виде аммониевой соли). Спектры я.м.р. записывали на установке XL-100 «Вариан». В качестве внутреннего стандарта использовали трет-бутиловый спирт. Точность измерения химического сдвига составляла $\pm 0,2$ гц. Измерения проводили в температурном интервале 25—80°С. Измерение температуры проводили при помощи температурного стандарта (этиленгликоля) с точностью $\pm 1^\circ$ С. Для исключения влияния межмолекулярных взаимодействий в опытах выбрана концентрация аденозина и АМФ $6 \cdot 10^{-3}$ М при рД 9,5.

Зависимость величин химических сдвигов протонов Н-2 и Н-8 аденозина и АМФ от температуры представлена на рис. 1. Как видно, с увеличением температуры для АМФ наблюдается сдвиг линий поглощения протонов Н-8 в сильное поле, а протонов Н-2 в слабое поле. Данное явление можно объяснить тем, что доля син-конформации при более высокой температуре возрастает и поэтому влияние зарядов фосфатной группы на протоны Н-8 уменьшается, а на протоны Н-2 увеличивается. Аналогичные зависимости величин химических

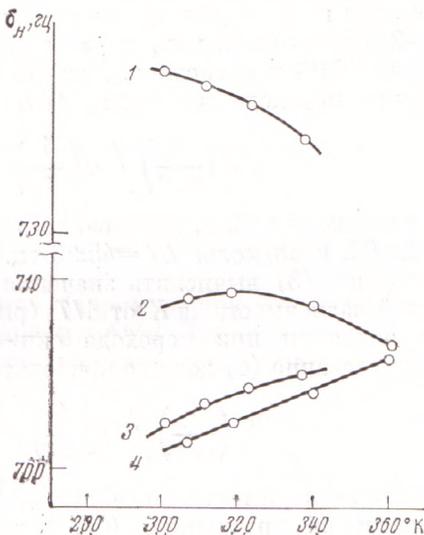


Рис. 1. Зависимость величин химических сдвигов линий поглощения (δ_H) протонов Н-8 и Н-2 аденозин-5'-фосфата и аденозина от температуры. 1 — Н-8 АМФ, 2 — Н-8 аденозина, 3 — Н-2 АМФ и 4 — Н-2 аденозина

ких сдвигов протонов Н-8 и Н-2 от температуры наблюдаются в аденозине, вероятно, за счет изменения с температурой влияния анизотропии рибозного цикла.

Наблюдаемый химический сдвиг для протонов Н-8 (δ_8^H) и Н-2 (δ_2^H) выражается в следующем виде:

$$\delta_8^H = \delta_8^a \frac{K}{1+K} + \delta_8^c \frac{1}{1+K}, \quad (1)$$

$$\delta_2^H = \delta_2^a \frac{K}{1+K} + \delta_2^c \frac{1}{1+K}, \quad (2)$$

где $K = [\text{анти}]/[\text{син}]$, δ_8^a , δ_8^c , δ_2^a , δ_2^c — величины химических сдвигов протонов Н-8 и Н-2 при анти- и син-ориентации гетероцикла относительно рибозы. Уравнения (1) и (2) можно преобразовать следующим образом:

$$\Delta_8^H = \Delta_8^0 K / (1+K), \quad (3)$$

$$\Delta_2^H = \Delta_2^0 / (1+K), \quad (4)$$

где $\Delta_8^H = \delta_8^H - \delta_8^c$, $\Delta_8^0 = \delta_8^a - \delta_8^c$, $\Delta_2^H = \delta_2^H - \delta_2^a$, $\Delta_2^0 = \delta_2^c - \delta_2^a$. Для использования уравнений (3) и (4) необходимо знать величины δ_8^c и δ_2^a . Поскольку для аденозина можно записать аналогичные уравнения (считая, что активационный барьер перехода син — анти остается таким же) и разность уравнений (3) или (4) для АМФ и соответствующих уравнений для аденозина не меняет их формы, то в уравнениях (3) и (4) вместо δ_8^c и δ_2^a можно взять наблюдаемые химические сдвиги для Н-8 и Н-2 аденозина. При этом предполагается, что величины химических сдвигов протонов Н-8 и Н-2 в том положении, где они удалены от рибозы (δ_8^c и δ_2^a), одинаковы для АМФ и аденозина. Для определения величины изменения энтальпии при переходе син — анти (ΔH) уравнение (3) можно преобразовать

$$d\left(\frac{1}{\Delta_8^H}\right) / d\left(\frac{1}{T}\right) = \frac{\Delta H}{R} \frac{1}{\Delta_8^H} - \frac{\Delta H}{R} \frac{1}{\Delta_8^0}. \quad (5)$$

Из данных рис. 2, 1, построенного по уравнению (5), следует, что $\Delta H = -2 \pm 0,2$ ккал/моль, $\Delta_8^0 = 45 \pm 3$ гц. Величина Δ_8^0 дает возможность по уравнению (3) вычислить значения K при разных температурах. Из линейной зависимости $\lg K$ от $1/T$ (рис. 2, 2) определена величина изменения энтропии при переходе син — анти ($-5,4 \pm 0,5$ э.е.). Аналогичное преобразование (4) должно приводить к соотношению

$$d\left(\frac{1}{\Delta_2^H}\right) / d\left(\frac{1}{T}\right) = -\frac{\Delta H}{R} \frac{1}{\Delta_2^H} + \frac{\Delta H}{R} \frac{1}{\Delta_2^0}. \quad (6)$$

Однако экспериментальные значения Δ_2^H не подчиняются зависимости, описываемой уравнением (6). Вероятно, в син-конформации в отличие от анти-конформации необходимо учитывать изменение с температурой Максвелл — Больцмановского распределения частиц, так как величина потенциального барьера перехода из син- в анти-конформацию (E_c) меньше, чем из анти- в син-конформацию (1, 2). В этом случае выражение для химического сдвига протона Н-2 в син-конформации (δ_2^c), согласно условию нормировки

$$\int_0^{E_c} \frac{e^{-E/RT}}{RT(1 - e^{-E_c/RT})} dE = 1, \quad (7)$$

и в соответствии с условием быстрого обмена следует записать в виде

$$\delta_2^c = \int_0^{E_c} \frac{\delta_2(E) e^{-E/RT}}{RT(1 - e^{-E_c/RT})} dE. \quad (8)$$

Для вычисления (8) необходимо знать вид функции $\delta_2(E)$. Взяв первые два члена в разложении функции $\delta_2(E)$ вблизи точки $E=0$ в ряд Тейлора и накладывая граничные условия $\delta_2=\delta_0^c$ при $E=0$ и $\delta_2=\delta_2^a$ при $E=E_c$, получим

$$\delta_2 = \delta_0^c + \frac{\delta_2^a - \delta_0^c}{E_c} E. \quad (9)$$

Подставляя (9) в (8) запишем:

$$\delta_2^c = \delta_0^c + (\delta_0^c - \delta_2^a) \left(\frac{e^{-E_c/RT}}{1 - e^{-E_c/RT}} - \frac{RT}{E_c} \right). \quad (10)$$

Используя соотношение (10), можно записать уравнение (4) в виде

$$\Delta_2^H = \Delta_2' \left(\frac{1}{1 - e^{-E_c/RT}} - \frac{RT}{E_c} \right) \frac{1}{1 + K}, \quad (11)$$

где $\Delta_2' = \delta_2^0 - \delta_2^a$. Зависимость величины Δ_2^H от температуры удовлетворяет уравнению (11). Использование значений K в уравнении (11) позволяет вычислить $E_c = 90 \pm 10$ кал/моль и $\Delta_2' = 8 \pm 1$ гц.

Таким образом, совокупность полученных данных полностью описывает переход син — анти в АМФ. На основании величин K можно вычис-

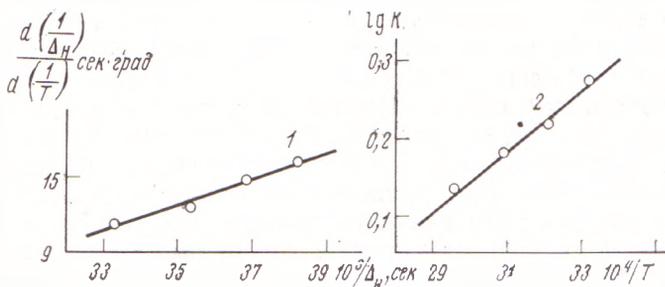


Рис. 2. График для определения изменения энтальпии (1) и энтропии (2) при переходе син — анти в аденозин-5'-фосфате

лить населенность в анти-конформации. Например, при $T=28^\circ\text{C}$ ($K=2$) в анти-конформации находится 66% молекул АМФ. Следует отметить, что полученная величина ΔH близка к расчетным значениям энергетического барьера перехода (1—2 ккал/моль (¹, ²)). Кроме того, предложенный способ расчета малых величин энергий активации по данным я.м.р. можно использовать также при изучении других равновесных процессов.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
12 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ B. Pullman, *Molecular Association in Biology*, N. Y. 1968, p. 77. ² F. Jordan, *J. Theor. Biol.*, v. 41, 23 (1973). ³ D. K. Lavallee, C. L. Coneter, *J. Am. Chem. Soc.*, v. 95, 576 (1973). ⁴ P. O. P. Ts'o, M. P. Schweizer, D. P. Hollis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 158, 256 (1969). ⁵ С. В. Зенин, Б. В. Тяглов и др., *Молекулярная биология*, т. 8, 331 (1974). ⁶ С. В. Зенин, Г. Б. Сергеев, *ЖФХ*, т. 48, 838 (1974).