

Ультрафіолетові спектри піримідинових основ і нуклеозидів у контексті метилзаміщення та взаємодії з карбоксильною групою амінокислот

А. В. Степанюгін, І. М. Коломієць, А. Л. Потягайло, С. П. Самійленко,
Д. М. Говорун

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного 150, Київ, 03143, Україна

E-mail: dhovorun@imbg.org.ua

У зневодненому ДМСО досліджено УФ спектри піримідинових нуклеотидних основ, нуклеозидів, низки їхніх похідних та аналогів. Простежено вплив на УФ спектри взаємодії з нейтральною та депротонованою формами карбоксильної групи амінокислот. Встановлено, що метилювання 1-го та 5-го положень піримідинових основ спричиняє bathochromний зсув максимуму смуги поглинання від 5 до 12 нм. Показано, що Cyt та більшість його похідних, за винятком m^3 Cyt та isoCyt, специфічно взаємодіють з нейтральною карбоксильною групою. Для Ura, Thy та їхніх похідних, крім chx^1 Ura, s^2 Ura і dU, характерною є взаємодія лише з депротонованою карбоксильною групою. Зроблено висновок про те, що заміщення 1-го положення піримідинових основ супроводжується падінням комплексотвірної здатності з обома формами карбоксильної групи, а заміщення 5-го положення підсилює взаємодію з нейтральною карбоксильною групою та послаблює взаємодію з карбоксилат-іоном. Обговорюється біологічна значущість отриманих результатів.

Вступ. Канонічні піримідинові основи цитозин (Cyt), урацил (Ura) і тимін (Thy) входять до складу всіх живих клітин. Їхні нуклеозиди C, dC, U, T є структурними елементами нуклеїнових кислот, низки коферментів та інших біологічно активних речовин.

Окрім канонічних нуклеозидів, до складу нуклеїнових кислот входять у малій кількості мінорні піримідинові нуклеозиди. Найхарактернішим мінором ДНК є 5-метилдезоксицитидин. Мінорний склад РНК, особливо транспортних, значно різноманітніший та багатший за кількістю, причому переважним типом модифікації гетероциклу є метилзаміщення. У природі зустрічаються нуклеозиди піримідинових основ з модифікованим гетероциклом чи нуклеозидним фрагментом, які є нуклеозидними антибіотиками [1].

Основи нуклеїнових кислот було знайдено в метеоритах (посилання [10] у роботі [2]), що

призвело до думки про вірогідність їхнього абіогенного синтезу та її експериментальної перевірки. В одному з таких досліджень [2] продемонстрована можливість синтезу 5'- та 2'-, 3'-циклоурацилмонофосфатів у тонкій плівці суміші U та NaH_2PO_4 під дією вакуумного УФ опромінення. Іншим прикладом є синтез Cyt і Ura з комплексної органічної речовини при охолодженні високотемпературної плазми $CO:N_2:H_2O$ [3]. Вивчення ізотерм адсорбції нуклеотидних основ на графіті [4] для моделювання їхнього можливого синтезу на твердій поверхні за пребіотичних умов дало елютропну послідовність $Gua > Ade > Hyp > Thy > Cyt > Ura$, в якій фазова рівновага для пуринів далеко зсунута в бік адсорбції у порівнянні з піримідинами. Отже, можливо, відбиває різну роль цих двох типів нуклеотидних основ у походженні життя.

Структуру та фізико-хімічні властивості піримідинових нуклеотидних основ Cyt, Ura, Thy, їхніх похідних та аналогів в ізольованому стані і в різному оточенні вивчали за допомогою методів молекулярної спектроскопії, рентгеноструктурного

аналізу та теоретичних квантовомеханічних методів.

Для дослідження коливальних спектрів незбурених молекул основ плідною виявилася техніка ІЧ спектроскопії у поєднанні з ізоляцією в низькотемпературних матрицях благородних газів [5–13]. Раманівські спектри досліджували для твердої фази основ та водних розчинів [14]. Структуру кристалічного стану основ встановлювали за допомогою рентгеноструктурного аналізу [15]. УФ спектри піримідинових основ вивчали переважно у водних розчинах [16–18], а спектри ЯМР—в органічних розчинниках [19].

В силу того, що піримідинові основи мають як протоноакцепторні, так і протодонорські групи, постало питання про їхню прототропну таутомерію як можливе джерело мутацій [20]. Дослідженню таутомерії піримідинових основ присвячено значну кількість робіт експериментального [6, 8–13, 21–26] та теоретичного плану [10–12, 23, 27–34]. Оскільки концентрації піримідинових основ, достатні для застосування методів вивчення молекулярної структури, можна отримати лише у воді та інших полярних розчинниках, здатних значно збурювати молекулярну структуру розчиненої речовини, а для оцінки впливу оточення на перебіг біохімічних реакцій потрібно знати незбурену структуру молекул-учасників, важливого значення набули експериментальні дослідження таутомерії методом ІЧ спектроскопії у поєднанні з матричною ізоляцією.

Так, у роботі [6] на основі ІЧ спектрів Cyt , $m^1\text{Cyt}$ та їхніх дейтероаналогів, ізольованих у низькотемпературній аргонній матриці, зроблено висновок, що Cyt у вільному стані існує як суміш кето- та енольної аміноформ 50:50 % (див. посилання у роботі [10]) на відміну від конденсованих станів (твердої фази та розчинів), для яких характерна амінокетоформа [35, 36]. Крім того, в аргонній матриці спостерігалася невелика кількість імінокетоформи Cyt (посилання [4] в роботі [10]).

Перехід від ізольованого стану Cyt до самоасоційованого та гідратованого в матриці супроводжується низькочастотним зсувом смуг на відтинку ІЧ спектра 4000–2000 cm^{-1} на десятки cm^{-1} [8], у той час як для твердої фази зсув у цьому ж інтервалі сягає сотень cm^{-1} , а частоти ділянки спектра 1800–499 cm^{-1} зміщуються на десятки cm^{-1} . На думку авторів, збурення частот кето- та енольного таутомерів свідчить про участь обох форм у утворенні комплексів.

Пізніше було показано, що ізольований у матриці $m^1\text{Cyt}$ характеризується таутомерною рівновагою амінокето- та імінокетоформи з константою

таутомеризації $K_i(a/i) = 7,2$, отриманою із співвідношення інтенсивності відповідних ІЧ смуг [12].

Найбільш точний на сьогоднішній день теоретичний розрахунок п'яти найстабільніших таутомерів Cyt у газовій фазі методом CCSD(T) з урахуванням збурення тричі збуджених рівнів та з використанням високої якості базису cc-pvtz(-f) [31] дає такий ряд стабільності відносних енергій (ккал/моль):

Аміногідроксо < Амінооксо < Імінооксо	
2b < 2a	1 3a < 3b
0 0,646	1,252 1,987 3,370,

де 2a — енольний таутомер з орієнтацією -ОН зв'язку в бік атома N1, 2b — у бік атома N3; 3a означає імінооксотатаутомер з орієнтацією зв'язку =NH в бік атома C5, 3b — у бік атома N3, що загалом узгоджується з цитованими експериментальними даними для ізольованої основи. Дві інші теоретичні роботи досить високого рівня [32, 33] також дають близькі значення енергій для аміноенольної, амінокетонної та імінокетонної таутомерних форм Cyt , проте порядки їхньої стабільності не збігаються з результатами [31].

Мала різниця енергій таутомерів Cyt робить результати розрахунків дуже чутливими до таких факторів, як геометрія, базисний набір та рівень кореляції. Розбіжність між результатами, отриманими в рамках методу CCSD, що вважається загалом вартим довіри, та методу CCSD(T) [31], свідчить про те, що не можна нехтувати потрібним збудженням і слід використовувати вищий порядок у серії збурень. До речі, на думку цього ж автора, метод DFT дає нереальні значення енергій, які дуже залежать від набору базисних функцій.

У недавній роботі [37] методом MP4/6-311 G(d, p) встановлено співвідношення в газовій фазі таутомерів Cyt оксоаміно, гідроксоаміно та оксоіміно 40,3:54,4:1,7. Можливу роль рідкісного іміноатаутомеру Cyt продемонстровано в роботі [38]. Відомо, що обернені Уотсон-Криківські пари АТ можуть утворювати стабільні паралельно розташовані тяжові спіралі ДНК, залучення до яких G:C пар знижує їхню стабільність. Показано, що в газовій фазі обернена пара Gua:Cyt стабільна на рівні оберненої пари Ade:Thy (енергія взаємодії у вакуумі $E = -14$ ккал/моль), якщо вона утворена між іміноатаутомером Cyt та енольним таутомером Gua. За теоретичною оцінкою [32, 33], вплив розчинника стабілізує амінокетонну форму Cyt , що узгоджується з даними експериментальних досліджень.

В результаті квантовомеханічних розрахунків рівня теорії MP4/6-311 G(d, p) енергії таутомерів

протонованого Cyt у газовій фазі [39] встановлено, що найімовірнішими місцями протонування в молекулі Cyt є атоми N3 та O2, причому енольний таутомер має незначну перевагу в 0,1 ккал/моль. Але завдяки значно більшому дипольному моменту в полярному водному середовищі домінує таутомер CytN3⁺H, хоча, за теоретичними оцінками, енольний таутомер CytO2⁺H може бути присутнім у кількості, достатній для його детекції. Пізніше теоретично розраховано співвідношення 45,8:54,2 в газовій фазі для цих двох найстабільніших таутомерів протонованого Cyt (амінокето з локалізацією H⁺ на атомі N3 та аміногідрокси з орієнтацією зв'язку O-H до атома N3) [37]. Принагідно відзначимо важливу роль протонованого Cyt у формуванні мультиплетних полінуклеотидних структур: від подвійних тяжів до тетрад (роботи [40–43] та посилання в них). Так, за допомогою рентгеноструктурного аналізу [40] встановлено, що тетради d(C₃) утворюються через інтеркаляцію двох паралельно спрямованих паралельних дуплексів CCH⁺. У роботах [41, 42] продемонстровано дестабілізацію тетрад через O2⁺H групи при включенні рибозних фрагментів. Пряме спостереження за допомогою методу ЯМР на ядрах ¹⁵N протонування Cyt у потрійній спіралі ДНК показало, що її формування не потребує протонування всіх Cyt у третій спіралі [43].

Увагу дослідників привертає також ізоцитозин (isoCyt) — аналог Cyt із зворотним розташуванням аміно- та карбонільної груп. Він цікавий тим, що його Уотсон-Криківський сайт адекватний відповідному сайтові піримідинового кільця Gua, в експериментальних та теоретичних дослідженнях якого часто замінюють на isoCyt з огляду на значно кращу розчинність останнього та значно менші розміри молекули.

Результати ІЧ досліджень в аргонівій матриці isoCyt та модельних сполук [7, 9] свідчать про таутомерну рівновагу амінокетонної та аміноенольної форм. На основі зіставлення пікових інтенсивностей смуг $\nu(\text{OH})$ та $\nu(\text{NH})$ оцінено константи енольно-кетонної рівноваги $K = I_{\text{OH}}/I_{\text{NH}}$: 4,6 для isoCyt та 9,7 для m⁵isoCyt.

На ґрунті вивчення ІЧ спектрів в аргонівій матриці та розрахунків *ab initio* автори роботи [11] показали співіснування аміноенольної та амінокетонної (N3H) форм isoCyt в ізольованому стані з чіткою перевагою енольного таутомеру. Експериментально встановлене значення константи таутомеризації $K_{\text{OH}/\text{N3H}}$ склало 0,11. Цікаво, що, за даними рентгеноструктурного аналізу [21], кристалічна форма isoCyt стабілізується трьома водневими зв'язками між двома амінокетотаутомерами isoCyt

(N3H) та isoCyt (N1H). Очевидно, під впливом цього результату автори [44, 45] інтерпретують свої дані для розчинів isoCyt як обумовлені присутністю саме цих двох амінокетотаутомерів.

Проте в роботі [22] наводяться аргументи на користь кетоаміно- та кетоімінотаутомерії isoCyt у воді та в метанолі. Спираючись на незмінність інтенсивності смуги $\nu(\text{C}=\text{O})$ та появу смуги 1660 см⁻¹, характерної для деформаційних коливань екзоциклічної групи =NH, при підвищенні температури водного розчину та при переході від водного до метанольного розчину, зроблено висновок про підвищення концентрації рідкісної імінної форми isoCyt.

На найвищому на даний час рівні теорії MP4-(SDQ)6-31+ G(d,p)//MP2/6311++ G(d,p)//MP2/6-31G(d) у роботі [32] розраховано енергію п'яти таутомерів isoCyt. Для газової фази найстабільнішим виявився аміногідроксотаутомер з орієнтацією OH групи в бік атома N3, другим близьким до нього за значенням енергії, є таутомер амінокето (N3H) ($E = 1,1$ ккал/моль), інші три таутомери мають набагато більші значення енергії. Співвідношення двох найстабільніших таутомерів у газовій фазі складає 88,3:11,7, а у водному розчині — 18,0:82,0. Для онзагерівського розчинника співвідношення енольного, N3H кето- та N1H кетотаутомерів має вигляд 11,0:83,4:4,56.

Теоретичні розрахунки енергій стандартних та обернених Уотсон-Криківських пар isoCyt:Cyt та Gua:Cyt [46, 47] вказують на те, що isoCyt та Gua у газовій фазі утворюють з Cyt комплекси однакової енергії.

Варто зауважити, що олігомери із вмістом m⁵isoCyt та isoGua можуть утворювати досить стабільні паралельні дуплекси з олігомерами ДНК і РНК [48]. Специфічність зв'язування, на думку авторів цієї роботи, розширює репертуар сайт-специфічних агентів в антисенсовій терапії.

Стабільність трьох таутомерів у газовій фазі isoCyt (кето N3H, кето N1H та енольного) в першому збудженому електронному стані розраховували в рамках підходу *ab initio* з базисом 6-311++ G(d,p) та з урахуванням конфігураційної взаємодії на рівні перших збуджених станів [49]. Оскільки порядок стабільності таутомерів isoCyt в основному стані енол > кето N3H > кето N1H (із сильною домінантою енольного таутомеру) в найнижчому синглетному збудженому стані S₁ ($\pi \rightarrow \pi^*$) змінюється на послідовність кето N3H > енол > кето N1H, то при електронному збудженні енольний таутомер релаксує до найнижчого кето N3H, з якого і повинна відбуватися люмінесценція. Тобто енольний таутомер фототаутомеризується в кето N3H.

Широко відомим завдяки терапевтичним властивостям є інший аналог цитозину — 6-азацитозин (6-azaCyt). Дослідження ІЧ спектрів та спектрів ^1H ЯМР 6-azaC та цілої низки його похідних у ДМСО та в твердій фазі [25, 26] свідчить про існування цього аналога Cyt та його похідних в конденсованій фазі у вигляді кетоамінного таутомеру з сильним внутрішнім водневим зв'язком між протоном аміногрупи та атомом N3.

Експериментальні дослідження таутомерії Ura і Thy методами ЯМР, УФ, ІЧ і Раманівської спектроскопії (див., наприклад, роботи [5, 13, 51] та посилання в роботі [28]) свідчать про те, що домінують стабільною таутомерною формою цих основ є 2,4-дикетотаутомер у газовій фазі, розчинах і твердій фазі. Лише дослідження люмінесценції у водних розчинах при різних значеннях рН та тривалості випромінювання τ за допомогою піко-секундного лазера [51, 52] вказують на співіснування поряд з дикетотаутомерами кетоенольних форм Ura і Thy (відповідні смуги люмінесценції для Thy 330 нм з $\tau = 0,7$ с та 390 нм з $\tau = 3,87$ с). Порівняльний аналіз спектрів збудження люмінесценції спектрів Ura і Thy в охолодженому струмені із спектрами їхніх фіксованих таутомерів $m_2^{1,3}\text{Ura}$ і 4(3H) піримідону [53] призводить до такого ж висновку.

Квантовохімічний розрахунок енергії восьми таутомерів Ura методом DFT з різними обмінно-кореляційними функціоналами та урахуванням нульової коливальної енергії [28] свідчить про значну енергетичну щільність між основною дикетотаутомерною формою Ura та енольних таутомерів, яка перевищує 10 ккал/моль. Відносні енергії другого в ряду стабільності 2-енол-4-оксо-N3H та третього 2-оксо-4-енол-N1H таутомерів Ura (з *cis*-орієнтацією O2H та O4H зв'язків відносно атомів азоту — донорів протону N1 та N3) майже збігаються і складають 11,6 та 11,7 ккал/моль відповідно. Біологічно значущим є саме третій таутомер, оскільки він може утворювати нормальний нуклеозид. Енергія ще одного, здатного до утворення нуклеозиду, таутомеру 2-енол-4-оксо N1H сягає 20,1 ккал/моль. Ці значення відрізняються не більше, ніж на 2 ккал/моль, від відносних енергій O2- та O4-енол-таутомерів N1-метилпохідних (із структурно зафіксованою N1H таутомерією) $m^1\text{Ura}$, $m^1\text{Thy}$ і $m^1br^5\text{Ura}$ [27]. До речі виявилось, що енергії цих таутомерів для всіх трьох метильованих основ майже не відрізняються між собою і мало залежать від методу розрахунку.

У недавній роботі [29] методом B3LYP/6-31+G(d,p) розраховано енергії 12 таутомерів Ura, крім основної дикетоформи. Порядок стабільності

перших трьох таутомерів збігається з отриманим у роботі [28].

Згідно з квантовохімічними розрахунками [37, 54, 55], найстабільніша протонувана форма Ura і Thy утворюється протонуванням атома O4 з *trans*-орієнтацією зв'язку O4-H⁺ відносно атома N3. При цьому в обох основах протонна спорідненість атома O4 перевищує таку атома O2 більш ніж на 10 ккал/моль [55]. Загалом обидва місця протонування Thy мають дещо більшу афінність порівняно з Ura. Різниця між ентальпіями депротонування іміногруп N1H і N3H в Ura і Thy перевищує 50 ккал/моль на користь останньої [55].

Експериментальне визначення газозаочної кислотності груп N1H та N3H в урацилі за допомогою фур'є мас-спектроскопії [56] показує, що група N3H ($\Delta H_{\text{acid}} = 347 \pm 4$ ккал/моль) значно менш кисла, ніж група N1H ($\Delta H_{\text{acid}} = 333 \pm 4$ ккал/моль). Проте у водних розчинах ці значення збігаються і звідси постає питання про механізм селекції місця глікозилювання. Ймовірна відповідь на це — реальний перебіг цієї реакції відбувається в неполярному оточенні активного центра ферменту.

Важливою характеристикою, що визначає взаємодію основ з оточенням, є дипольний момент. За теоретичною оцінкою рівня теорії MP26-31-G(d,p), з урахуванням кореляції електронів [57] дипольних моментів п'яти канонічних нуклеотидних основ Ura, Thy, Cyt, Ade, Gua та трьох споріднених молекул у газовій фазі серед незаміщених основ, найбільший дипольний момент має Gua (2,52 D), дещо менший — у Cyt (2,49 D), найменший — Ade (1,06 D), але чемпіоном є $m^5\text{Cyt}$ (2,67 D). В Ura і Thy дипольні моменти майже однакові: 1,71 та 1,70 D відповідно. Пізніше була висловлена думка, що абсолютні значення дипольних моментів занижені через завищену роль кореляції електронів у використаному методі [58].

Інтерес до тіокетопохідних нуклеотидних основ зумовлений їхніми протипухлинними властивостями і тим, що вони є мінорними основами тРНК, а також потенційними спектроскопічними зондами [59]. Ці похідні піримідинів можуть бути виділені з тРНК. Енергії перших шести таутомерів $s^4\text{Ura}$ було розраховано на рівні теорії MP4(SDQ)/6-311G(2d, 2p)//MP2/6-31 G(d,p) [23]. Найстабільнішим виявився 2-кето-4-тіотаутомер Ura, другим у цьому ряду — 4-тіо-2-енол-3H таутомер з *cis*-орієнтацією зв'язку O2-H в бік атома N3 та відносно енергією 10,4 ккал/моль (у воді зростає до 12,2 ккал/моль). Аналіз спектрів УФ поглинання і люмінесценції та кінетики фосфоресценції у воді та етанолі [23] свідчить про домінуючу кетотіонну форму $s^4\text{Ura}$ у воді та не виключає можливості її

співіснування з домішкою тієнольного таутомеру в етанолі.

Газофазну протонну спорідненість таутомерів $s^2\text{Ura}$, $s^4\text{Ura}$ та $s_2^{2,4}\text{Ura}$ визначено методом циклотроннорезонансної фур'є мас-спектрометрії та розраховано на рівні теорії MP2/6-31G* [24]. Встановлено, що нуклеофільні властивості всіх трьох сполук досить подібні, найосновнішим з них є $s_2^{2,4}\text{Ura}$. Автори вважають найважливішим результатом те, що $s^4\text{Ura}$ і $s_2^{2,4}\text{Ura}$ в газовій фазі є сірковими основами, а $s^2\text{Ura}$ — кисневою основою. Зроблено висновок, що тіокарбонільні похідні — сильніші основи, ніж їхні карбонільні аналоги. Цей висновок підтримується квантовохімічним розрахунком рівня ВЗЛҀР в комбінації з 6-31+G(d,p) у роботі [60], де показано, що притаманні тіоурацилам кислотності та основності більші, ніж у випадку Ura.

Як видно із вступу, що передувє викладові результатів даної роботи, квантовохімічні методи досить успішно прогнозують низку властивостей основного стану. Відтворення властивостей збудженого стану є набагато проблематичнішим, особливо для таких досить великих молекул, що і є причиною труднощів у розрахунках електронних спектрів нуклеотидних основ. Крім того, тривалість таких розрахунків на сучасній комп'ютерній техніці робить їх досить коштовними. Розвинена останнім часом теорія збудженого стану обіцяє в майбутньому прогноз УФ спектрів поглинання основ на рівні сучасних методів *ab initio*. Так, у роботі [61] методом *ab initio* на основі мультиконфігураційного підходу CASSF та урахуванням σ - π поляризаційного ефекту отримано значення енергії для переходів $\pi \rightarrow \pi^*$ 4,4; 5,4; 6,2; 6,7 еВ та одного переходу $n \rightarrow \pi^*$ 5,0 еВ в ізолюваному Cyt. У рамках такого ж рівня теорії розраховано енергії переходів для Ura і Thy [62]: в Ura $\pi \rightarrow \pi^*$ 5,0; 5,8; 6,5; 7,0 еВ та $n \rightarrow \pi^*$ 4,5; 6,0; 6,4; 7,0 еВ, в Thy $\pi \rightarrow \pi^*$ 4,9; 5,9; 6,1; 7,1 еВ та $n \rightarrow \pi^*$ 4,9; 5,9; 6,1; 7,1 еВ. Автори висловили припущення про те, що смуги біля 5 еВ у спектрах Ura та Thy обумовлені переходами $n \rightarrow \pi^*$.

Прямого експериментального значення ці результати не мають, оскільки точність цих розрахунків $\pm 0,3$ еВ набагато менша, ніж точність експериментального визначення максимумів смуг УФ поглинання, а також через важливість впливу оточення. Проте це є перший необхідний крок для розрахунку збудження електронних спектрів піримідинових основ при переході до конденсованої фази.

Нещодавно було запропоновано гібридний напівемпіричний квантовомеханічний і молекуляр-

но-механічний метод [63] для розрахунку електронних спектрів основ з метою дослідження впливу розчинника на електронні спектри Ura та $m_2^{1,3}\text{Ura}$. Встановлено, що принаймні одна молекула води досить міцно зв'язується з двома атомами карбонільних груп Ura і $m_2^{1,3}\text{Ura}$.

Показано, що низький квантовий вихід флуоресценції зумовлений коливаюльно (неплоскі коливання зв'язку C4=O) наведеним змішуванням стану $n \rightarrow \pi^*$ та близького до нього за енергією $\pi \rightarrow \pi^*$ стану. В апротонному розчиннику Ura має більший квантовий вихід для флуоресценції, ніж фосфоресценції, в той час як $m_2^{1,3}\text{Ura}$ демонструє лише флуоресценцію у будь-якому типі розчинника. Виходячи з цього автори припустили, що станом фосфоресценції є O4H — енольний таутомер Ura, що утворюється через внутрішнє перенесення протона в збудженому стані і може блокуватися протонним розчинником.

Застосування цього методу до розрахунків електронного спектра Cyt [64] показує, що в області 35000—50000 cm^{-1} він має три переходи: два $\pi \rightarrow \pi^*$ та один змішаний $\pi \rightarrow \pi^*$ і $n \rightarrow \pi^*$. При взаємодії з молекулою води найстабільнішим є комплекс із втягненням груп NH та C=O, причому кетотаутомер виграс в енольного всього лиш 4,47 кДж, при цьому дипольні моменти обох комплексів відрізняються на 0,25 D. Звідси автори роблять висновок, що енольна форма Cyt може бути присутня у воді та витягнутих плівках в кількості, достатній для детекції.

З наведених вище даних випливає, що фізикохімічні властивості піримідинових нуклеотидних основ, їхніх похідних і аналогів взагалі та їхніх УФ спектрів зокрема, вивчалися здебільшого у водних розчинах або твердій фазі експериментально і теоретично в — ізолюваному стані. При цьому використано різні методи за різних умов експерименту.

УФ спектроскопія має перевагу в концентраційній чутливості порівняно з іншими спектроскопічними методами, що робить її особливо зручною для вивчення структури біологічних молекул. Для коректного відстеження зміни електронної структури піримідинових нуклеотидних основ при заміщенні та комплексоутворенні необхідно проводити дослідження в рамках одного методу за ідентичних умов експерименту. У представленій роботі викладено результати вивчення в ДМСО УФ спектрів похідних піримідинових основ та їхніх комплексів з нейтральною та депротонною групою амінокислот, що моделюють точкові білково-нуклеїнові контакти. Отримані результати обговорюються з урахуванням літературних даних.

Матеріали і методи. В роботі використано

реактиви: 1-метилцитозин ($m^1\text{Cyt}$), гідрохлорид 3-метилцитозину ($m^3\text{Cyt}\cdot\text{HCl}$), 1,5-диметилцитозин ($m_2^{1,5}\text{Cyt}$), ізоцитозин (isoCyt), дезоксицитидин ($d\text{C}$), 5-метилдезоксицитидин ($m^5d\text{C}$), 1-метилурацил ($m^1\text{Ura}$), 1-циклогексаурацил (chx^1Ura), 3-метилурацил ($m^3\text{Ura}$), уридин (U), дезоксиуридин ($d\text{U}$), 5-метилуридин ($m^5\text{U}$), або інакше риботимідин ($r\text{T}$), 1-метилтимін ($m^1\text{Thy}$), тимідин (T) фірми «Sigma» (США), цитозин (Cyt), 5-метилцитозин ($m^5\text{Cyt}$), урацил (Ura), тимін (Thy) — «Calbiochem» (США), цитидин (C), 1,3-диметилурацил ($m^{1,3}\text{Ura}$) — «Fluka» (Німеччина), 6-азацитидин (6-azaC) — «Chemapol» (Чехія) з подальшою перекристалізацією, 2-тіоурацил ($s^2\text{Ura}$), люб'язно наданий Л. Г. Пальчиківською (Інститут молекулярної біології і генетики, Україна).

ДМСО фірми «Fluka» зневоднювали над молекулярними ситами (0,4 та 0,5 нм) фірми «Serva» (Німеччина). Спектри УФ поглинання реєстрували на спектрофотометрі MPS-2000 («Shimadzu», Японія) в кварцових кюветах з довжиною оптичного шляху 1 мм. Концентрація піримідинових основ та їхніх похідних дорівнювала $1\cdot 10^{-3}\text{M}$, концентрація лігандів — $1\cdot 10^{-2}\text{M}$.

Утворення комплексів піримідинових основ та їхніх похідних з нейтральною карбоксильною групою амінокислот вивчали в сумішах з N-ацетиласпарагіновою кислотою (ac-Asp), N-ацетилгліцином (ac-Gly) від фірми «Serva» та N-ацетилглутаміновою кислотою (ac-Glu) від фірми «Sigma», а з депротонованою карбоксильною групою — в сумішах з ацетатом натрію (NaAc) від фірми «Реахим» (Росія), натрієвими солями N-формілгліцину (f-GlyONa) та N-формілглутамінової кислоти (f-Glu(ONa)₂), люб'язно синтезованими для цієї роботи А. Г. Терентьевим (Інститут молекулярної біології і генетики, Україна).

Диференційні УФ спектри поглинання комплексів (ДС) отримували таким чином: до розчину основи додавали наважку ліганда (всі розчини лігандів були прозорі в області поглинання основ) і записували спектр суміші відносно розчину основи.

Результати і обговорення. Характеристики УФ спектрів піримідинових основ та їхніх похідних, а також їхніх комплексів з карбоксильною групою амінокислот представлено у чотирьох таблицях. Табл. 1 і 3 містять довжини хвиль λ_{max} та оптичні густини D максимумів УФ спектрів поглинання у безводному ДМСО похідних Cyt і Ura разом з Thy відповідно за присутності та за відсутності лігандів з нейтральною (ac-Asp) та депротонованою (NaAc) карбоксильною групою. Для порівняння наводяться літературні дані [1, 16, 65, 66] для водних розчинів і різних значень рН: значення pK , λ_{max} та ко-

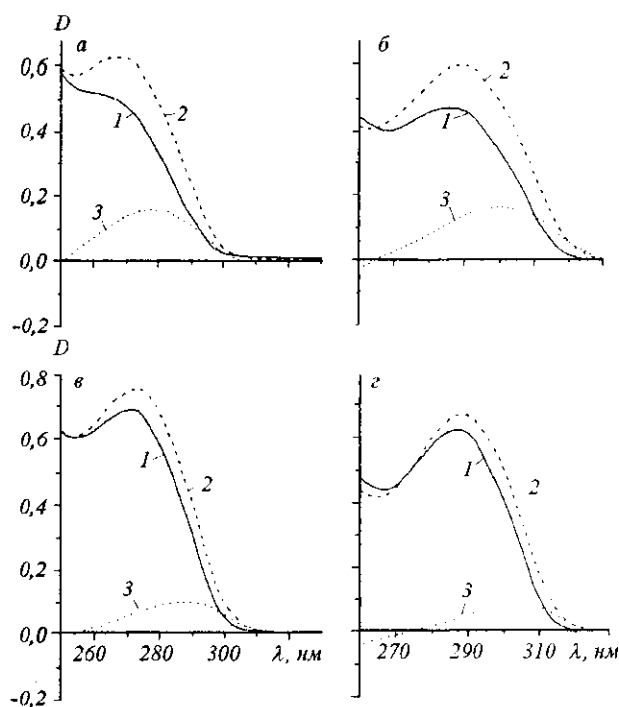


Рис. 1. УФ спектри поглинання у безводному ДМСО: а — Cyt (1), його суміш з ac-Asp (2), ДС (3); б — $m^5\text{Cyt}$ (1), його суміш з ac-Asp (2), ДС (3); в — $m^1\text{Cyt}$ (1), його суміш з ac-Asp (2), ДС (3); г — $m_2^{1,5}\text{Cyt}$ (1), його суміш з ac-Asp (2), ДС (3). Тут і на рис. 3–10 концентрація основ $1\cdot 10^{-3}\text{M}$, лігандів — $1\cdot 10^{-2}\text{M}$

ефіцієнт поглинання у максимумі ε_{max} або оптична густина.

Табл. 2 і 4 дають змогу простежити еволюцію УФ спектрів досліджуваних основ при взаємодії з різними лігандами, що містять карбоксильну групу у нейтральній та іонізованій формі. Для кожного ліганда наводяться характеристики як спектрів суміші, так і ДС.

Цитозин. У робочому інтервалі 250–320 нм УФ спектр Cyt в ДМСО має одну смугу поглинання з $\lambda_{\text{max}} = 271\text{ nm}$, яка є довгохвильовим плечем інтенсивної смуги, що залишається «за кадром» (рис. 1, а). У присутності ac-Asp спостерігається гіперхромний та батохромний ефекти (λ_{max} зміщується на 5 нм у бік довгих хвиль, інтенсивність у максимумі смуги поглинання значно підвищується), характерні для протонованого цитозину за кислих рН (табл. 1). Величина цих двох ефектів свідчить про те, що в складі комплексу Cyt протонований частково. Протонування Cyt , зв'язаного з нейтральною карбоксильною групою амінокислот, спостерігалось і для твердофазних комплексів, що вивчали методами ІЧ і Раманівської спектроскопії [67, 68] та рентгеноструктурного аналізу [69, 70].

Таблиця 1
 Характеристики УФ спектрів та значення рН цитозину, цитидину, їхніх похідних та аналогів

Сполука	У Н ₂ O [1, 65, 66]						У ДМСО (наші дані)				
	рК _b	рК _a	рН	λ _{max} , нм	ε _{max} · 10 ⁻³	рН	λ _{max} , нм	ε _{max} · 10 ⁻³ *	Сполука	λ _{max} , нм	D
Cyt	4,6	12,2	1	276	10,0	1	275	0,66	Cyt+ac-Asp	276	0,628
	4,58	12,5	7	267	6,1	—	—	—	Cyt	271	0,525
—	4,5	11,82	13	281,5	7,1	13	281	0,50	Cyt+NaAc	271	0,518
—	—	—	14	282	7,9	—	—	—	—	—	—
m ¹ Cyt	4,55	—	1	213	—	—	—	—	m ¹ Cyt+ac-Asp	280	0,755
—	4,61	—	—	283	—	—	—	—	m ¹ Cyt	279	0,693
—	—	—	14	274	—	—	—	—	m ¹ Cyt+NaAc	279	0,697
m ⁵ Cyt	4,6	12,4	1	283	9,8	—	—	—	m ⁵ Cyt+ac-Asp	286	0,608
	—	—	7	273	6,2	—	—	—	m ⁵ Cyt	283	0,482
	—	—	14	289	8,1	—	—	—	m ⁵ Cyt+NaAc	283	0,479
m ₂ ^{1,5} Cyt	4,76	—	1	291	—	—	—	—	m ₂ ^{1,5} Cyt+ac-Asp	289	0,667
	—	—	—	—	—	—	—	—	m ₂ ^{1,5} Cyt	288	0,603
	—	—	—	—	—	—	—	—	m ₂ ^{1,5} Cyt+NaAc	288	0,611
m ³ Cyt	—	—	4	274	9,4	2,2	274	0,48	m ³ Cyt+ac-Asp	280	1,194
	7,4	> 13	—	—	—	6,9	276	0,43	—	—	—
	7,49	—	12	294	11,9	7,6	290	0,42	m ³ Cyt	280	1,176
	—	—	—	—	—	8,3	292	0,55	—	310sh	0,030
	—	—	14	289	8,1	11,1	294	0,62	m ³ Cyt+NaAc	307	1,322
isoCyt	3,8	9,9	1	263	17,8	0,1	270	25,1	isoCyt+ac-Asp	292	0,905
	—	—	—	—	—	1	271	22,3	—	—	—
	—	—	7	264	13,8	7	273	—	isoCyt	292	0,911
	—	—	—	—	—	12	265	16,3	—	—	—
	—	—	13	262	9,8	—	—	—	isoCyt+NaAc	292	0,815
C	—	—	1	280	13,4	1	279	0,83	C+ac-Asp	256	0,754
	4,15	—	—	—	—	—	—	—	—	277	0,806
	4,11	—	7	271	9,1	7	228	0,50	C	254	0,760
	4,08	—	—	—	—	—	271	0,58	—	275	0,768
	—	—	13	272,5	9,15	13	272	0,58	C+NaAc	256	0,751
	—	—	14	273	9,2	—	—	—	—	275	0,770
dC	—	—	1	280	13,2	—	—	—	dC+ac-Asp	257	0,960
	4,3	—	—	—	—	—	—	—	—	277	1,074
	4,25	—	7	271	9,0	—	—	—	dC	254	1,008
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	275	1,041
	—	—	—	—	—	—	—	—	C+NaAc	256	1,002
—	—	—	—	—	—	—	—	—	275	1,048	
m ⁵ C	4,3	—	0	287	12,6	—	—	—	—	—	—
	—	—	7	277	8,9	—	—	—	—	—	—
	—	—	14	279	9,0	—	—	—	—	—	—

Закінчення табл. 1

Сполука	У Н ₂ O [1, 65, 66]						У ДМСО (наші дані)				
	pK _b	pK _a	pH	λ _{max} , нм	ε _{max} · 10 ⁻³	pH	λ _{max} , нм	ε _{max} · 10 ⁻³ *	Сполука	λ _{max} , нм	D
m ⁵ dC	—	—	4	287	12,4	—	—	—	m ⁵ dC+ac-Asp	—	—
	4,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4,5	—	7	277	8,5	—	—	—	m ⁵ dC	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
m ³ C	—	—	14	279	8,8	—	—	—	m ⁵ dC+NaAc	—	—
	8,7	—	4	278	11,8	1	280	8,6	—	—	—
	8,3	—	7	278	11,6	7	279	8,9	—	—	—
6-azaC	—	—	—	—	—	—	—	—	6-azaC+ac-Asp	270	0,779
	—	—	—	—	—	—	—	—	6-azaC	270	0,786
	—	—	—	—	—	—	—	—	6-azaC+NaAc	270	0,797

$$\varepsilon_{\max} \cdot 10^{-3*} = \varepsilon_{\max} \cdot 10^{-3} / D$$

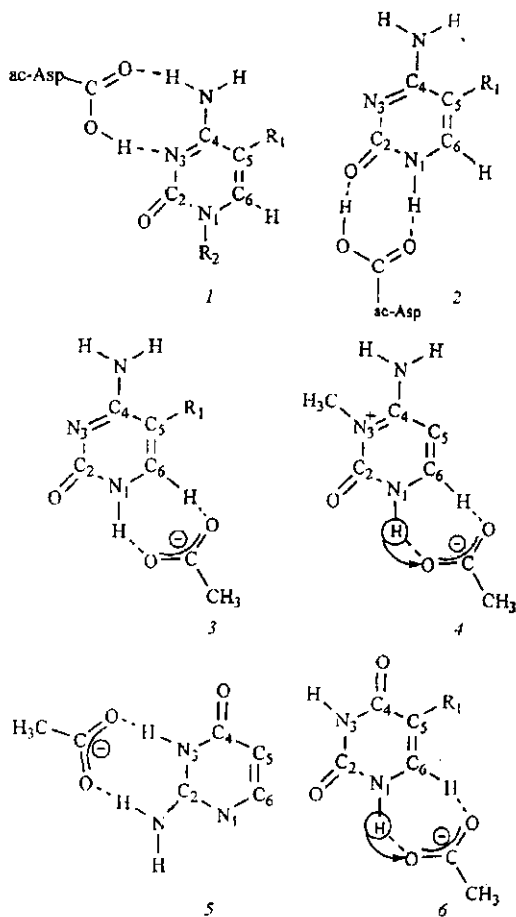


Рис. 2. Структурні схеми комплексів: 1, 2 — Cyt та його похідних з ac-Asp, 3—5 — Cyt, m³Cyt, isoCyt з NaAc відповідно; 6 — Ura, Thy з NaAc (R₁-R₂-H, CH₃)

Той факт, що Cyt у комплексі з нейтральною карбоксильною групою амінокислот значною мірою протонований, підтверджується також даними ЯМР на ядрах ¹H і ¹³C для розчину у безводному ДМСО-d₆ [71, 72]. Інтенсивність ДС суміші Cyt з N-ацилпохідними амінокислот знижується в ряду ac-Asp > ac-Glu > ac-Gly (табл. 2), що вказує на різну комплексотвірну здатність карбоксильних груп амінокислот у положеннях α, β, γ. Структуру комплексу Cyt з нейтральною карбоксильною групою (схема 1 на рис. 2) було встановлено для chx¹Cyt з масляною кислотою у хлороформі [73, 74] та для Cyt з N-ацилпохідними амінокислот у безводному ДМСО [71, 72] виходячи із значного слабкого зсуву сигналів аміногрупи у спектрах ¹H ЯМР. Проте зникнення сигналу іміногрупи у присутності лігандів з нейтральною групою [71] свідчить про те, що взаємодія із залученням карбонільної та NH іміногрупи Cyt (схема 2 на рис. 2) робить вагомий внесок у формування комплексу.

З дисоційованою карбоксильною групою Cyt утворює слабкий комплекс, про що свідчить слабкий ДС в УФ спектрі поглинання (табл. 2). За даними ЯМР [71], слабкий комплекс утворюється за участі NH та C6H протонів Cyt (схема 3 на рис. 2).

5-Метилцитозин. Метилзаміщення п'ятого положення у m⁵Cyt супроводжується батохромним зсувом смуги УФ поглинання в порівнянні з Cyt на 12 нм до значення 283 нм (рис. 1, б, табл. 2), що, очевидно, зумовлено надспряженням метильної групи з π-електронною системою піримідинового кільця. Взаємодія з нейтральною карбоксильною

Таблиця 2

Зміна смуг УФ поглинання цитозину, цитидину, їхніх метилпохідних та аналогів у ДМСО в присутності нейтральної та депротонованої карбоксильних груп

Назва	+ac-Asp		+ac-Glu		+ac-Gly		+f-GlyONa		+f-Glu(ONa)2		+NaAc		
	λ_{\max} (D)	λ_{\max} (D)	λ_{\max} (Δ D)	λ_{\max} (D)	λ_{\max} (Δ D)	λ_{\max} (D)	λ_{\max} (Δ D)	λ_{\max} (D)	λ_{\max} (Δ D)	λ_{\max} (D)	λ_{\max} (Δ D)	λ_{\max} (D)	λ_{\max} (Δ D)
Cyt	271	276	252	274	—	272	—	271	—	271	—	271	260
	(0,525)	(0,628)	(-0,025)	(0,532)	—	(0,523)	—	(0,525)	—	(0,525)	—	(0,518)	(-0,006)
	—	—	285	—	285	—	285	—	—	—	—	—	305
m ¹ Cyt	279	280	—	279	—	279	—	279	—	279	—	279	—
	(0,693)	(0,755)	—	(0,712)	—	(0,704)	—	(0,693)	—	(0,693)	—	(0,693)	—
	—	—	290	—	287	—	287	—	—	—	—	—	—
m ⁵ Cyt	283	286	254	283	256	283	257	283	—	283	—	283	275
	(0,482)	(0,608)	(-0,063)	(0,512)	(-0,007)	(0,489)	(-0,002)	(0,482)	—	(0,482)	—	(0,479)	(-0,009)
	—	—	296	—	296	—	301	—	—	—	—	—	310
m ₂ ^{1,5} -Cyt	288	289	253	288	—	288	—	288	—	288	—	288	—
	(0,603)	(0,667)	(-0,042)	(0,623)	—	(0,608)	—	(0,603)	—	(0,603)	—	(0,603)	—
	—	—	301	—	296	—	296	—	—	—	—	—	—
m ³ Cyt	280	280	277	280	277	280	274	307	277	307	276	307	277
	(1,176)	(1,194)	(+0,026)	(1,194)	(+0,014)	(1,174)	(+0,010)	(0,304)	(-0,860)	(1,235)	(-0,724)	(1,322)	(-0,860)
	310sh	—	307	—	307	—	305	—	308	—	307	—	308
isoCyt	292	292	257	292	262	292	263	292	282	292	282	292	—
	(0,911)	(0,905)	(+0,040)	(0,915)	(+0,013)	(0,907)	(+0,005)	(0,897)	(-0,021)	(0,911)	(-0,008)	(0,815)	—
	—	—	292	—	290	—	290	—	302sh	—	302	—	292
C	254	256	—	255	—	254	—	254	—	254	—	254	—
	(0,760)	(0,754)	—	(0,751)	—	(0,765)	—	(0,760)	—	(0,760)	—	(0,760)	—
	275	277	289	275	290	275	280	275	—	275	—	275	—
dC	254	257	—	257	—	257	—	254	—	254	—	254	—
	(1,008)	(0,960)	—	(0,994)	—	(1,011)	—	(0,008)	—	(0,008)	—	(0,008)	—
	275	277	289	275	282	275	275	275	—	275	—	275	—
m ⁵ dC	252	254	—	254	—	254	—	252	—	252	—	252	—
	(0,849)	(0,800)	—	(0,809)	—	(0,833)	—	(0,849)	—	(0,849)	—	(0,849)	—
	284	285	297	285	288	285	283	284	—	284	—	284	—
6-azaC	270	270	272	—	—	—	—	—	—	—	—	270	286
	(0,786)	(0,779)	(-0,010)	—	—	—	—	—	—	—	—	(0,797)	(0,011)

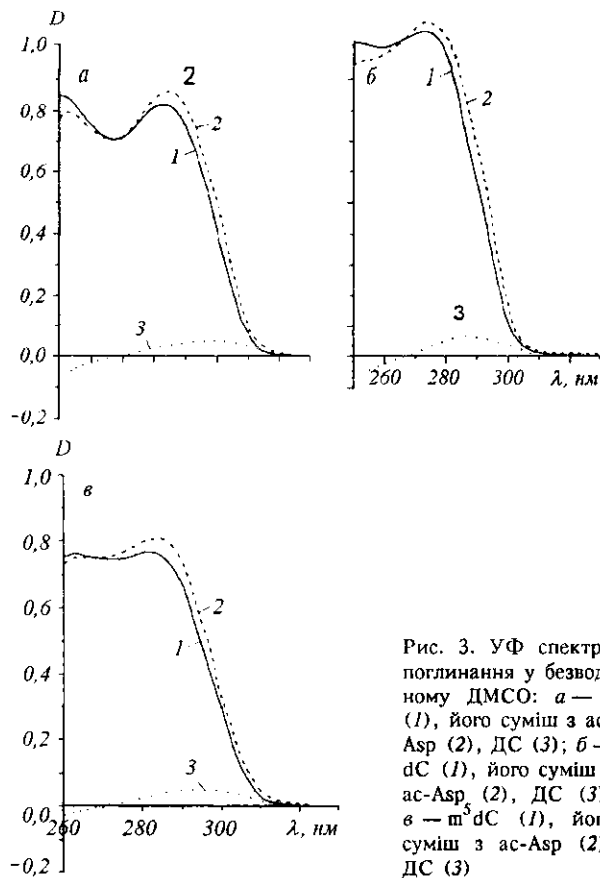


Рис. 3. УФ спектри поглинання у безводному ДМСО: а — С (1), його суміш з ас-Asp (2), ДС (3); б — dC (1), його суміш з ас-Asp (2), ДС (3); в — m^5dC (1), його суміш з ас-Asp (2), ДС (3)

групою викликає зміщення смуги 283 нм у бік довгих хвиль до значення 286 нм (табл. 2). Виходячи з більшої інтенсивності ДС можна говорити про утворення комплексу, стабільнішого порівняно з Cyt (табл. 2). Присутність депротонованої карбоксильної групи (карбоксилат-іона), як і у випадку Cyt, викликає незначні спектральні зміни (табл. 2). Вказані зміни УФ спектрів разом з даними ЯМР [71] дозволяють описувати взаємодію m^5Cyt з обома формами карбоксильної групи схемами 1—3 на рис. 2 подібно до Cyt.

1-Метилцитозин. Метилування положення N1 у m^1Cyt призводить до батохромного зсуву (в порівнянні з Cyt) на 8 нм до значення 279 нм (рис. 1, в, табл. 2). Взаємодія з нейтральною карбоксильною групою зсуває цю смугу ще на 3 нм у довгохвильовий бік. Значно нижча, ніж для Cyt, інтенсивність ДС вказує на меншу стабільність комплексу, що, ймовірно, зумовлено неможливістю взаємодії за схемою 2 (рис. 2). З карбоксилат-іоном m^1Cyt не взаємодіє (табл. 2).

1,5-Диметилцитозин. Подвійне метилування в $m_2^{1,5}Cyt$ призводить до значного батохромного

зсуву смуги УФ поглинання відносно Cyt на 17 нм (порівняймо: m^1Cyt — на 9 нм, m^5Cyt — на 5 нм) до значення 288 нм (рис. 1, г, табл. 1, 2). Спектральні прояви взаємодії $m_2^{1,5}Cyt$ з нейтральною карбоксильною групою менш виражені порівняно з m^5Cyt (табл. 2). Як і у випадку m^1Cyt , утворення комплексу за схемою 2 неможливо (рис. 2). Зіставлення даних для Cyt, m^1Cyt , m^5Cyt та $m_2^{1,5}Cyt$ дозволяє зробити висновок про те, що метилування групи NH зменшує, а групи C5H збільшує стабільність комплексів з лігандами, що містять нейтральну карбоксильну групу. Цей висновок збігається з результатами дослідження методом ЯМР [71]. Подібно до m^1Cyt з депротонованою карбоксильною групою $m_2^{1,5}Cyt$ не взаємодіє.

На думку авторів роботи [66], УФ спектри можуть бути джерелом інформації щодо відносної молекулярної поляризованості піримідинових основ, із збільшенням якої підсилюються стекінг-взаємодії: чим більший батохромний зсув УФ поглинання, тим більші поляризованість та енергія стекінгу. З табл. 1 і 2 видно, що метилування у 5-му положенні Cyt, m^1Cyt та dC супроводжується зсувом λ_{max} відповідно на 12, 3 та 3 нм. Цей факт можна розглядати як аргумент на користь того, що 5-метилпохідні Cyt і dC утворюють стабільніші стекінг-асоціати у порівнянні з неметильованими основами. Встановлений нами факт, що метилування Cyt у 5-му положенні підсилює його здатність до взаємодії як через водневі зв'язки, так і через стекінг, цілковито узгоджується з літературними даними [75], згідно з якими наявність m^5Cyt у подвійній спіралі ДНК підвищує її стабільність.

Цитидин, дезоксицитидин, 5-метилдезоксцитидин. У спектрах усіх трьох нуклеотидів, крім основної смуги 275 нм у спектрах С і dC та 284 нм у спектрі m^5dC , з'являється поглинання із максимумами 254 та 252 нм відповідно (рис. 3, табл. 1, 2), яке може бути наслідком батохромного зсуву смуги, що знаходиться за межами робочої області у випадку основ. Імовірно причиною цього є утворення внутрішньомолекулярних водневих зв'язків між глікозидними фрагментами та основами. Зауважимо, що в спектрах нейтральних водних розчинів така смуга відсутня (табл. 1).

Про взаємодію С, dC, m^5dC з нейтральною карбоксильною групою свідчить батохромний зсув на 1—3 нм обох смуг УФ поглинання, гіпохромізм короткохвильової та гіперхромізм довгохвильової смуг (рис. 3, табл. 2). Менша інтенсивність ДС у порівнянні з Cyt, m^5Cyt , m^1Cyt та $m_2^{1,5}Cyt$ вказує на меншу стабільність комплексів, утворених нуклеозидами з нейтральною карбоксильною групою. Як і у випадку з m^1Cyt та $m_2^{1,5}Cyt$, єдина

реальна структура комплексу відповідає схемі 1 на рис. 2. До речі саме за такою схемою нейтральна карбоксильна група бічного радикалу Glu-119 активного центра метилтрансферази HhaI взаємодіє з Cyt2 ДНК [76].

З карбоксилат-іоном взаємодії згаданих нуклеозидів Cyt не вдалося зареєструвати методом УФ спектроскопії, хоча невеликі слабкопольні зсуви сигналів протонів C6H (C — 0,028, dC — 0,019, m⁵dC — 0,024 м. ч. [71]) вказують на утворення слабких водневих зв'язків за їхньої участі.

3-Метилцитозин. Ця мінорна основа цікава тим, що входить до складу деяких тРНК та рРНК [1]. УФ спектр m³Cyt містить інтенсивну смугу 280 нм (у близькому до нейтрального водному розчині 276 нм) та слабе плече ≈310 нм (рис. 4, а, б; табл. 1, 2). За це плече, ймовірно, відповідає невелика кількість депротонованих молекул, які відновлюються до нейтральних при додаванні лігандів з нейтральною карбоксильною групою (табл. 2; рис. 4, а).

У присутності лігандів з депротонованою карбоксильною групою УФ спектр m³Cyt зазнає кардинальних змін. Смуга 280 нм зміщується на 27 нм у бік довгих хвиль, її інтенсивність значно підвищується (рис. 4, б; табл. 2). Характер змін у спектрі УФ поглинання m³Cyt, викликаний взаємодією з карбоксилат-іоном, подібний до змін УФ спектра його водного розчину при переході до лужних рН (табл. 1).

Очевидно, карбоксилат-іон при взаємодії депротонує іміногрупу N1H, оскільки з літератури відомо, що депротонування аміногрупи m³C супроводжується протилежними змінами в УФ спектрі — гіпсхромним зсувом на 8 нм та гіпсхромізмом смуги УФ поглинання [65]. На суттєву роль в утворенні комплексу перенесення протона від основи на карбоксилат-іон вказують також значні зміни у спектрі ЯМР на ядрах ¹H: зникнення сигналу протона N1H та сильнопольний зсув сигналів протонів C5H, C6H, CH₃ на 0,507; 0,133; 0,070 м. ч. відповідно [71]. У роботі [65] показано, що у водних розчинах при лужних рН m³Cyt втрачає протон N1H (а m³C — один протон аміногрупи, яка переходить в іміногрупу). Виходячи з цього можна припустити, що в безводному ДМСО відбувається перенесення глікозидного протона m³Cyt на карбоксилат-іон.

Ізоцитозин. Як згадувалося вище, цей аналог Cyt зустрічається у деяких тРНК, має цікаві біологічні та терапевтичні властивості. У спектрі isoCyt присутня одна інтенсивна смуга 292 нм. При додаванні лігандів з нейтральною карбоксильною групою відбуваються невеликі зміни в спектрі isoCyt

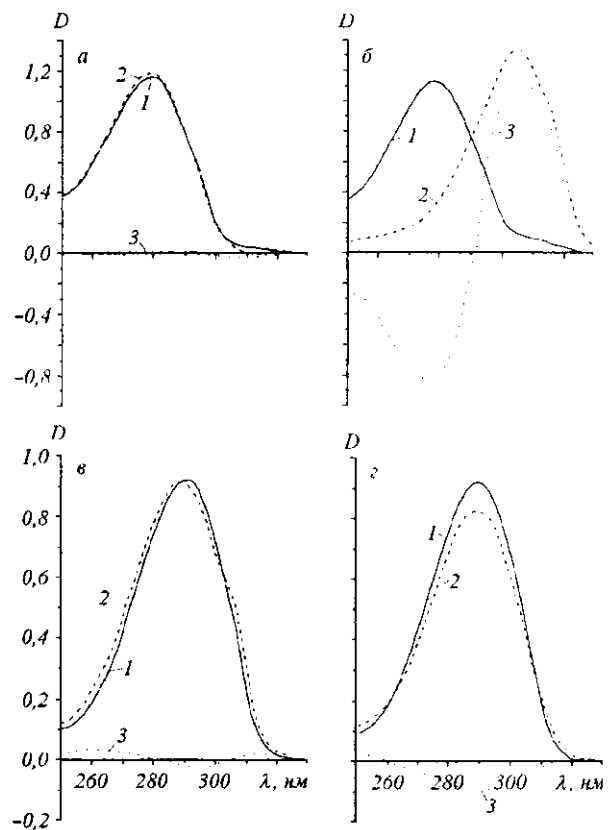


Рис. 4. УФ спектри поглинання у безводному ДМСО: а — m³Cyt (1), його суміш з ac-Asp (2), ДС (3); б — m³Cyt (1), його суміш з NaAc (2), ДС (3); в — isoCyt (1), його суміш з ac-Asp (2), ДС (3); г — isoCyt (1), його суміш з NaAc (2), ДС (3)

(рис. 4, а; табл. 1, 2), що вказують на слабку взаємодію. Значний гіпсхромний ефект спостерігається у присутності лігандів з депротонованою карбоксильною групою (рис. 4, г; табл. 2). Виходячи з подібності фрагмента isoCyt N1H-C2(NH₂)-N3H-C4=O до відповідного фрагмента Gua N3H-C2(NH₂)-N1H-C6=O слушно припустити, що і характер їхньої взаємодії з карбоксилат-іоном однаковий [77, 78] (рис. 2, схема 4). Отже, порівнюючи дані для isoCyt і Cyt, можна зробити висновок: зміна взаєморозташування карбонільної та аміногрупи призводить до зміни специфічності взаємодії з нейтральною та депротонованою групою. Як і Gua, isoCyt специфічно впізнається карбоксилат-іоном.

6-Азацитидин. УФ спектр поглинання 6-azaC, цікавого з огляду на терапевтичну дію цього аналога С, відрізняється від спектрів С і Cyt відсутністю височастотної смуги (або її плеча) і

Таблиця 3

Характеристики УФ спектрів та значення рН урацилу, уридину, тиміну, тимідину, їхніх похідних та аналогів

Сполука	У Н ₂ О [1, 16]									У ДМСО (наші дані)		
	рК _а	рК _б	рН	λ _{max} , нм	ε · 10 ⁻³	рН	λ _{max} , нм	D	Сполука	λ _{max} , нм	D	
Ura	0,5	9,5	0	260	7,8	1	258	0,86	Ura+ac-Asp	291	0,803	
	—	9,34	4	259,5	8,2	—	—	—	—	—	—	
	—	> 13	7	259,5	8,2	—	—	—	Ura	261	0,803	
	—	—	12	269	12,3	13	281	0,65	Ura+NaAc	262	0,656	
m ¹ Ura	—	—	—	—	—	—	—	—	—	295sh	0,227	
	1,8	9,7	2	272	—	1	208	—	m ¹ Ura+ac-Asp	267	0,901	
	—	—	7	267	9,8	—	268	—	m ¹ Ura	267	0,901	
	—	—	12	265	7,0	13	265	—	m ¹ Ura+NaAc	267	0,908	
m ³ Ura	—	—	—	—	—	1	257	0,73	m ³ Ura+ac-Asp	260	0,744,	
	—	10,0	3	259	7,3	—	—	—	—	293sh	—	
	—	—	7	259	7,3	—	—	—	m ³ Ura	260	0,730	
	—	—	—	—	—	—	218	—	—	295sh	0,009	
m ² ^{1,5} Ura	—	—	—	—	—	—	—	—	—	294	0,397	
	—	—	12	283	10,7	13	283	0,88	m ³ Ura+NaAc	262	0,532	
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	—	—	1	266	—	—	—	—	m ₂ ^{1,5} Ura+ac-Asp	267	0,886	
U	—	—	—	—	—	—	—	—	m ₂ ^{1,5} Ura	267	0,886	
	—	—	13	266	—	—	—	—	m ₂ ^{1,5} Ura+NaAc	267	0,886	
	—	9,2	1	262	10,1	1	262	0,79	U+ac-Asp	263	1,129	
dU	—	9,25	7	262	10,1	7	262	0,79	U	263	1,114	
	—	9,32	12	262	7,45	13	263	0,59	U+NaAc	263	1,104	
	—	—	14	264,5	7,5	—	—	—	—	—	—	
Thy	—	9,3	1	262	10,2	—	—	—	dU+ac-Asp	263	1,083	
	—	9,34	7	262	10,2	—	—	—	dU	263	1,049	
	—	—	12	262	7,6	—	—	—	dU+NaAc	263	1,043	
m ¹ Thy	0	9,9	4	264,5	7,9	1	263	0,75	Thy+ac-Asp	266	0,825	
	—	> 13	7	264,5	7,9	7	264	0,76	Thy	266	0,825	
	—	—	12	291	5,4	13	270	0,49	Thy+NaAc	267	0,747	
	—	—	—	—	—	—	290	0,48	—	304sh	0,124	
T	—	—	13	269	—	—	—	—	m ¹ Thy+ac-Asp	273	1,425	
	—	—	—	—	—	—	—	—	m ¹ Thy	273	1,425	
	—	—	—	—	—	—	—	—	m ¹ Thy+NaAc	272	1,459	
rT	—	9,8	1	267	9,65	1	267	0,68	T+ac-Asp	267	1,131	
	—	—	7	267	9,65	7	267	0,70	T	267	1,111	
	—	—	13	267	7,4	13	267	0,52	T+NaAc	267	1,099	
s ² Ura	—	9,7	1	267	9,9	—	—	—	rT+ac-Asp	267	1,131	
	—	—	7	267	9,8	—	—	—	rT	267	1,111	
	—	—	13	267	7,5	—	—	—	rT+NaAc	267	1,099	
s ² Ura	—	—	—	—	—	—	—	—	s ² Ura+ac-Asp	270	1,305	
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	296	1,420	
	—	—	—	—	—	—	—	—	s ² Ura	270	1,297	

Закінчення табл. 3

Сполука	pKa	pKb	pH	У Н ₂ O [1, 16]			У ДМСО (наші дані)				
				λ_{max} , нм	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	pH	λ_{max} , нм	D	Сполука	λ_{max} , нм	D
s ² Ura	—	—	—	—	—	—	—	—	—	296	1,393
	—	—	—	—	—	—	—	—	s ² Ura+NaAc	264	1,118
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	334	1,575
chx ¹ Ura	—	—	—	—	—	—	—	—	chx ¹ Ura+ac-Asp	268	1,107
	—	—	—	—	—	—	—	—	chx ¹ Ura	268	1,095
	—	—	—	—	—	—	—	—	chx ¹ Ura+NaAc	268	1,090

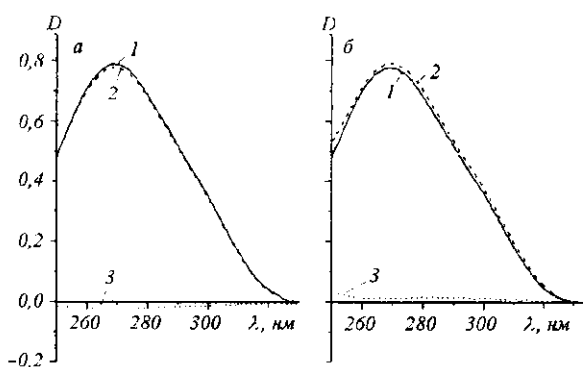


Рис. 5. УФ спектри поглинання у безводному ДМСО: а — 6-azaC (1), його суміш з f-Asp (2), ДС (3); б — 6-azaC (1), його суміш з NaAc (2), ДС (3)

містить лише одну широку смугу з максимумом 270 нм (рис. 5, а; табл. 1, 2). Спектральні прояви взаємодії з нейтральною карбоксильною групою набагато менші, ніж у випадках канонічних основ та нуклеозидів і зводяться до незначного гіпохромізму (рис. 5, а; табл. 2). Присутність ліганда з депротонованою карбоксильною групою спричиняє невеликий гіперхромізм (рис. 5, б; табл. 2). Ці дані узгоджуються з результатами вивчення взаємодії 6-azaCyt з двома формами карбоксильної групи методом ЯМР на ядрах ¹H [25, 26].

Урацил. Як видно з табл. 3, 4 та рис. 6, а, УФ спектр поглинання Ura складається з однієї інтенсивної смуги з максимумом 261 нм (у нейтральному водному розчині 260 нм) (рис. 6, а; табл. 3, 4). У спектрі суміші Ura з NaAc спостерігаються суттєві зміни: батохромний зсув на 1 нм і значний гіпохромізм смуги 261 нм та поява інтенсивного плеча з чітким максимумом 295 нм. Характер спектральних проявів взаємодії Ura з карбоксилат-іоном корелює зі змінами в УФ спектрі його водного розчину при переході до високих значень pH (табл. 3) і вказує на те, що значна частина

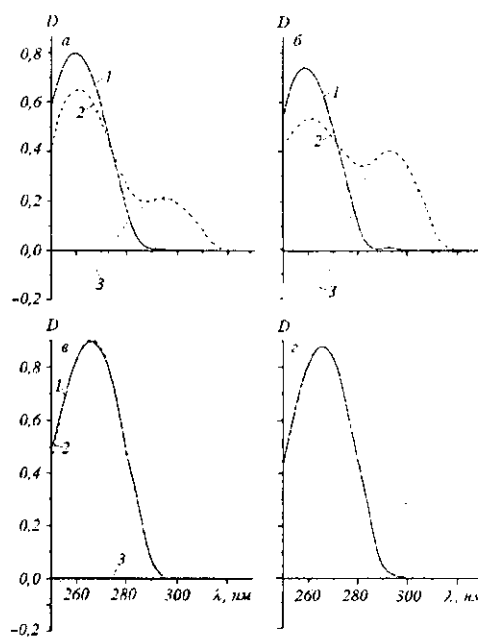


Рис. 6. УФ спектри поглинання у безводному ДМСО: а — Ura (1), його суміш з NaAc (2), ДС (3); б — m³Ura (1), його суміш з NaAc (2), ДС (3); z — m₂^{1,3}Ura

молекул основи знаходиться у депротонованому стані. Цей висновок підтримується даними ЯМР [71] (відсутність сигналів обох імінопротонів Ura). За допомогою УФ спектроскопії у безводному ДМСО не вдалося зареєструвати взаємодії Ura з нейтральною карбоксильною групою амінокислот, хоча в модельних кристалах [79, 80] такі взаємодії зафіксовано. Так, наприклад, встановлено, що карбоксильна група оцтової кислоти утворює зв'язки з m⁶Ura із залученням груп C4=O та N3H молекул

Таблиця 4

Зміни смуг УФ поглинання урацилу, тиміну, їхніх метиллохідних та аналогів у присутності нейтральної та депротонованої карбоксильної аміногрупи кислот

Назва	+ac-Asp			+ac-Glu		+ac-Gly		+f-GlyONa		+l-Glu(ONa) ₂		+NaAc	
	λ_{\max} (D)	λ_{\max} (D)	λ_{\max} (ΔD)	λ_{\max} (D)	λ_{\max} (ΔD)	λ_{\max} (D)	λ_{\max} (ΔD)	λ_{\max} (D)	λ_{\max} (ΔD)	λ_{\max} (D)	λ_{\max} (ΔD)	λ_{\max} (D)	λ_{\max} (ΔD)
Ura	261 (0,803)	261 (0,803)	—	261 (0,803)	—	261 (0,803)	—	261 (0,785)	259 (-0,015)	261 (0,803)	—	262 (0,656)	259 (-0,155)
	—	—	—	—	—	—	—	295sh (0,020)	295 (+0,019)	—	—	295sh (0,277)	296 (+0,232)
m ¹ Ura	267 (0,901)	267 (0,901)	—	267 (0,901)	—	267 (0,901)	—	267 (0,901)	—	267 (0,901)	—	267 (0,908)	270 (+0,009)
	260 (0,730)	260 (0,764)	260 (+0,035)	260 (0,750)	260 (+0,020)	260 0,070	260 (+0,040)	259 (0,738)	—	260 (0,730)	—	261 (0,532)	259 (-0,207)
	295sh (0,009)	—	295 (-0,009)	—	295 (-0,009)	—	295 (-0,009)	294 (0,040)	294 (+0,030)	295sh (0,009)	—	294 (0,397)	294 (+0,394)
m ₂ ^{1,3} - Ura	267 (0,886)	267 (0,886)	—	267 (0,886)	—	267 (0,886)	—	267 (0,886)	—	267 (0,886)	—	267 (0,886)	—
U	263 (1,114)	263 (1,129)	265 (+0,015)	263 (1,114)	—	263 (1,136)	260 (+0,021)	263 (1,114)	260 (-0,018)	263 (1,114)	—	263 (1,104)	260 (-0,017)
	—	—	—	—	—	—	—	—	283	—	—	—	283
	—	—	—	—	—	—	—	—	(+0,009)	—	—	—	(+0,009)
	—	—	—	—	—	—	—	—	302	—	—	—	305
	—	—	—	—	—	—	—	—	(+0,008)	—	—	—	(+0,008)
dU	263 (1,049)	263 (1,083)	260 (+0,038)	263 (1,054)	267 (+0,005)	263 (1,056)	266 (+0,009)	263 (1,057)	258 (+0,010)	263 (1,055)	263 (+0,009)	263 (1,043)	—
Thy	266 (0,825)	266 (0,825)	—	266 (0,825)	—	266 (0,825)	—	266 (0,831)	—	266 (0,825)	—	267 (0,747)	262 (-0,078)
	—	—	—	—	—	—	—	—	287	—	—	304sh (0,124)	304 (+0,123)
	—	—	—	—	—	—	—	—	(+),017)	—	—	—	—
m ¹ Thy	273 (1,425)	273 (1,425)	—	273 (1,425)	—	273 (1,425)	—	273 (1,425)	—	273 (1,425)	—	272 (1,459)	276 (+0,037)
T	267 (1,111)	267 (1,111)	—	267 (1,111)	—	267 (1,111)	—	267 (1,107)	267 (-0,012)	267 (1,099)	267 (-0,018)	267 (1,099)	267 (-0,018)
rT	267 (1,049)	267 (1,049)	—	267 (1,049)	—	267 (1,049)	—	267 (1,049)	—	267 (1,049)	—	268 (1,022)	267 (-0,025)
s ² Ura	270 (1,297)	270 (1,305)	294 (1,050)	—	—	270 (1,309)	295 (0,051)	293 (-0,427)	—	—	—	263,5 (1,118)	292,5 (-1,151)
	296 (1,393)	295 (1,420)	333 (-0,052)	—	—	295 (1,419)	333 (-0,052)	334 (0,508)	—	—	—	334 (1,575)	334 (+1,483)
chx ¹ - Ura	(1,095)	(1,107)	(1,013)	—	—	—	—	—	—	—	—	268 (1,090)	275 (-0,012)

основи, які утворюють димери через водневі зв'язки $N1H...O=C2$ [80].

3-Метилурацил. Метилзаміщення іміногрупи N3H в m^3Ura викликає гіпсхромне зміщення УФ смуги поглинання на 1 нм та помітний гіпсхромний ефект (табл. 3, 4; рис. 6, б). Крім основної смуги 260 нм, спостерігається слабке плече 295 нм. У присутності NaAc УФ спектр m^3Ura зазнає змін дещо більших, ніж у випадку незаміщеної основи: виразний гіпсхромний ефект смуги 260 нм та трансформація плеча 295 нм у смугу, інтенсивність якої наближається до інтенсивності основної смуги. Напрямок зміщення УФ поглинання m^3Ura при взаємодії з карбоксилат-іоном відповідає напрямку зміщення УФ смуги поглинання m^3Ura у водному розчині при переході від нейтральних до лужних рН (табл. 3), що вказує на депротонування основи карбоксилат-іоном. Зникнення сигналу протона N1H у спектрі ЯМР за присутності NaAc засвідчує те, що, як і у випадку Ura [71], взаємодія з карбоксилат-іоном відбувається із значним внеском перенесення протона від основи на карбоксилат-іон, імовірно, за схемою б (рис. 2).

Присутність ac-Asp спричинює невелике збільшення інтенсивності смуги 260 нм та зникнення плеча 295 нм, яке, скоріш за все, зумовлене невеликою частиною депротонованих молекул m^3Ura у безводному ДМСО, які при додаванні ac-Asp відновлюються до нейтральних за рахунок протонів карбоксильних груп.

1-Метилурацил та 1,3-диметилурацил. Заміщення 1-го положення в m^1Ura і $m_2^{1,3}Ura$ (на відміну від m^3Ura) дає відчутний батохромний зсув 6 нм смуг УФ поглинання відносно смуги Ura 261 нм (рис. 6, в, г; табл. 3, 4) і призводить до різкого зниження спектральних проявів взаємодії m^1Ura з NaAc (незначний гіперхромізм смуги 267 нм) та відсутності будь-якої взаємодії у випадку $m_2^{1,3}Ura$. Слабкий водневий зв'язок карбоксилат-іона з m^1Ura (слабопольний зсув у спектрі ЯМР сигналу протона N3H на 0,030 м. ч.) [71] узгоджується з нашими даними. Стрімке зниження комплексотвірної здатності m^1Ura з карбоксилат-іоном, можливо, пов'язане з успішною конкуренцією з боку автоасоціації молекул m^1Ura через групи N3H та C=O [80]. Низькопольний зсув сигналу протона N3H m^1Ura в спектрі ЯМР на 0,190 м. ч. у порівнянні з Ura [71] може розглядатися як аргумент на користь утворення самоасоціатів m^1Ura в ДМСО.

З нейтральною карбоксильною групою m^1Ura та $m_2^{1,3}Ura$ не взаємодіють (табл. 2).

1-Циклогексаурацил. При заміщенні 1-го положення піримідинового кільця об'ємним радикалом

в chx^1Ura смуга УФ поглинання зміщується до значення 268 нм (рис. 7, а, б; табл. 3, 4). Несподіваним є факт практично однаково малої величини спектральних проявів взаємодії chx^1Ura з обома формами карбоксильної групи (табл. 4). Карбоксилат-іон викликає невеликий гіпсхромізм УФ поглинання chx^1Ura , а нейтральна карбоксильна група призводить до незначного гіперхромізму. Малі слабопольні зсуви у спектрах ЯМР сигналів протонів N3H—0,011 та 0,044 м. ч. при взаємодії з ac-Asp та Na-Ac відповідно, за даними роботи [71], не протирічать цьому результату. Ймовірно, об'ємне циклогексанове кільце знижує локальне значення ϵ настільки, що стає можливим комплексоутворення з нейтральною карбоксильною групою.

Уридин та дезоксиуридин. Для УФ спектрів обох нуклеозидів U і dU характерна одна смуга 263 нм, зміщена на 2 нм у бік довгих хвиль відносно смуги Ura (рис. 7, а, в; табл. 3, 4). Про взаємодію U з нейтральною карбоксильною групою свідчить незначний гіперхромізм УФ поглинання (табл. 4). Присутність карбоксилат-іона також викликає невеликий ДС УФ поглинання (табл. 4). Двічі більший (порівняно до U в суміші з ac-Asp) гіперхромізм спостерігається для смуги поглинання dU в суміші з ac-Asp (рис. 8, в), а NaAc практично не збурює УФ поглинання dU. Слід зазначити, що ці результати не узгоджуються з даними дослідження ЯМР [71], які свідчать про досить сильну взаємодію обох нуклеозидів урацилу з карбоксилат-іоном. Останнє підтверджується зникненням сигналу протона N3H при додаванні NaAc до їхніх розчинів у безводному ДМСО. А взаємодії з нейтральною карбоксильною групою метод ЯМР не фіксує. Така розбіжність між даними двох методів може бути наслідком того, що втягнення N3H протона у Н-зв'язок мало впливає на електронну структуру хромофора, яким є π -електронна система піримідинового кільця. Зазначимо, що аналогічний ефект спостерігався і у випадку взаємодії m^9Gua з карбоксилат-іоном: при значних її проявах у спектрі ЯМР в спектрі УФ поглинання реєструвалися незначні зміни [81].

2-Тіоурацил. Цей аналог Ura , що має цікаві біологічні, фізико-хімічні та терапевтичні властивості, чітко відрізняється за спектральними характеристиками від канонічної основи та її похідних. Так, в УФ спектрі s^2Ura присутні дві смуги поглинання 270 та 295 нм (табл. 4; рис. 9, а, б). При додаванні ac-Asp для першої смуги фіксується невеликий гіперхромізм, а для другої (такої самої величини) — гіпсхромізм. Присутність NaAc радикально змінює УФ спектр s^2Ura : перша смуга зміщується в бік коротких хвиль на 6 нм до

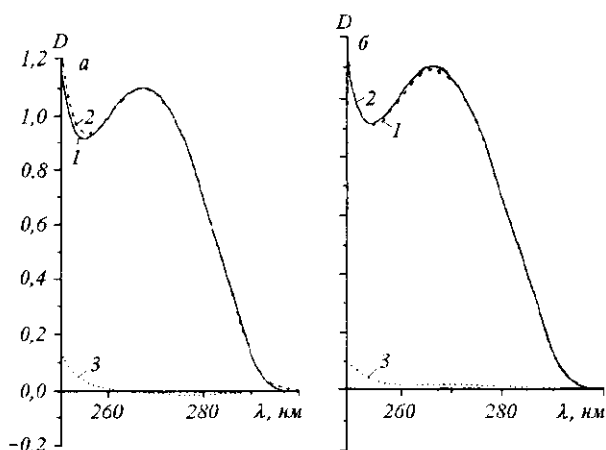


Рис. 7. УФ спектри поглинання у безводному ДМСО: а — chx^1Ura (1), його суміш з NaAc (2), ДС (3); б — chx^1Ura (1), його суміш з ac-Asp (2), ДС (3)

значення 264 нм, друга зазнає гігантського батохромного зсуву на 39 нм до значення 334 нм. Останнє вказує на те, що карбоксилат-іон, специфічно взаємодіючи з s^2Ura , кардинально змінює його електронну структуру. Ймовірно, саме ця властивість і зумовлює його специфічну роль як мінорної основи.

Тимін. В УФ спектрі Thy (m^5Ura) смуга поглинання 266 нм зміщена на 5 нм у бік довгих хвиль в порівнянні з Ura (рис. 10, а; табл. 3, 4). Подібний ефект метилювання 5-го положення піримідинового циклу спостерігався і для 5-метилпохідних Cyt (див. вище). Як і у випадку Ura, в спектрі суміші Thy з NaAc відбуваються істотні зміни: інтенсивність смуги 266 нм суттєво зменшується та виникає досить інтенсивне плече з чітким максимумом 304 нм. При цьому спектральні прояви взаємодії Thy з карбоксилат-іоном за характером такі ж, як і для Ura, але вдвічі менші за величиною (табл. 4). Базуючися на тому, що в спектрах водних розчинів Thy при переході від нейтральних до лужних рН також має місце значний батохромний ефект (табл. 3), можна стверджувати, що значна частина молекул Thy депротонувана в комплексі з карбоксилат-іоном. Така інтерпретація підтримується і зникненням у спектрі ЯМР сигналів обох імінопротонів Thy в присутності карбоксилат-іона [71]. З нейтральною карбоксильною групою не зареєстровано жодних ознак взаємодії.

1-Метилтимін. Метилювання положення N1 в Thy спричинює батохромний зсув смуги 266 нм до 273 нм, виразний гіперхромний ефект (рис. 10, б; табл. 3, 4) та стрімке падіння комплексотвірної здатності з карбоксилат-іоном (рис. 10, б; табл. 4).

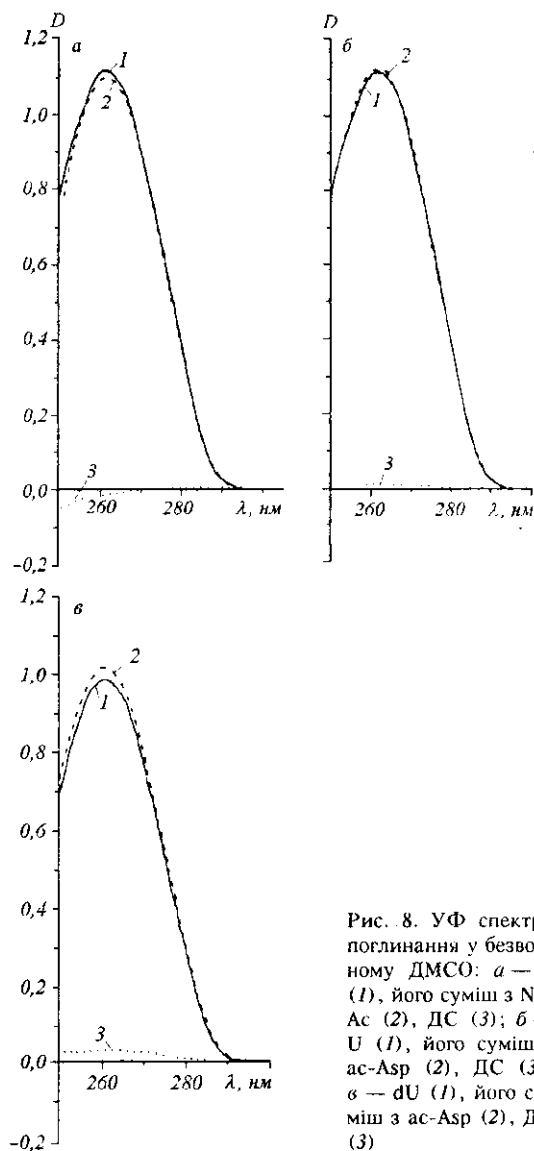


Рис. 8. УФ спектри поглинання у безводному ДМСО: а — U (1), його суміш з NaAc (2), ДС (3); б — U (1), його суміш з ac-Asp (2), ДС (3); в — dU (1), його суміш з ac-Asp (2), ДС (3)

Взаємодія m^1Thy з NaAc проявляється також у невеликому гіперхромізмі. Невеликий слабопольний зсув сигналу протона N3H на 0,019 м. ч. у присутності NaAc [71] узгоджується з цим результатом. Вірогідно, як і для m^1Ura , зв'язування m^1Thy з карбоксилат-іоном утруднюється конкурентним утворенням самоасоціатів через два зв'язки за участі груп N3H та C4=O. Димери, утворені такими зв'язками, знайдено в кристалах m^1Thy методом нейтронної кристалографії [82]. Як свідчення самоасоціації m^1Thy в ДМСО можна розглядати також слабопольний зсув сигналу імінопротона N3H у спектрі ЯМР m^1Thy на 0,235 м. ч. відносно Thy [71]. Не встановлено жодних ознак взаємодії m^1Thy з ac-Asp.

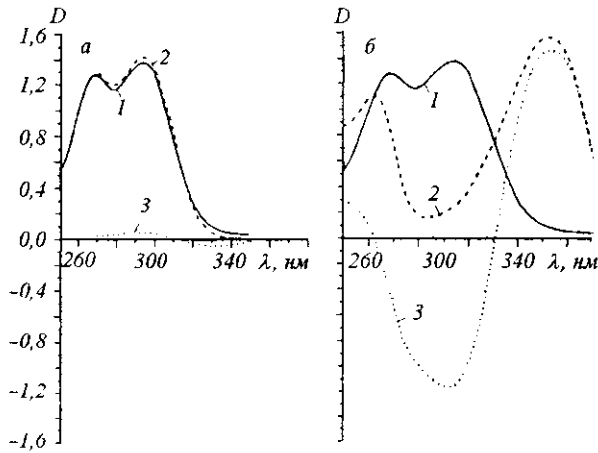


Рис. 9. УФ спектри поглинання у безводному ДМСО: а — $s^2\text{Ura}$ (1), його суміш з $ac\text{-Asp}$ (2), ДС (3); б — $s^2\text{Ura}$ (1), його суміш з NaAc (2), ДС (3)

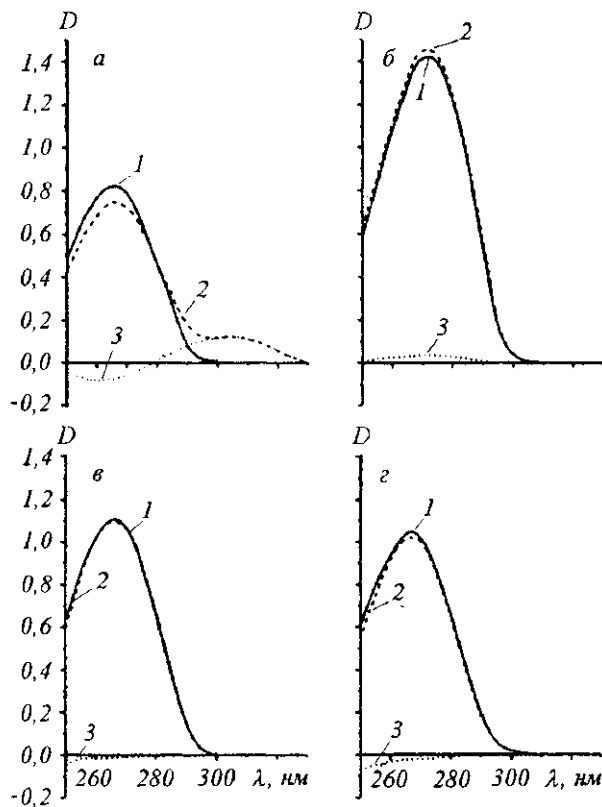


Рис. 10. УФ спектри поглинання у безводному ДМСО: а — Thy (1), його суміш з NaAc (2), ДС (3); б — $m^1\text{Thy}$ (1), його суміш з NaAc (2), ДС (3); в — T (1), його суміш з NaAc (2), ДС (3); з — $r\text{T}$ (1), його суміш з NaAc (2), ДС (3)

Тимідин та риботимідин. УФ спектри T і $r\text{T}$ містять смугу поглинання 267 нм практично однакової інтенсивності (рис. 10, в, з; табл. 3, 4). Взаємодія з NaAc характеризується невеликим гіпохромізмом в обох випадках. Проте, як і для U та $d\text{U}$, зникнення сигналів протонів N3H у спектрах ЯМР T і $r\text{T}$ за присутності NaAc свідчить про сильну взаємодію з карбоксилат-іоном, імовірно, з перенесенням протона N3H на депротоновану карбоксильну групу.

Методом УФ спектроскопії не зареєстровано взаємодії T і $r\text{T}$ з нейтральною карбоксильною групою, хоча в роботі [83] методом рентгеноструктурного аналізу показано, що в кристалах Thy зв'язується з нейтральною карбоксильною групою двома водневими зв'язками через N3H та C4=O .

Висновки. У зневодненому ДМСО досліджено УФ спектри низки піримідинових нуклеотидних основ, нуклеозидів, їхніх похідних та аналогів. Простежено зміну УФ спектрів під впливом заміщення та взаємодії з нейтральною і депротонованою карбоксильною групою амінокислот.

Зафіксовано у зневодненому ДМСО утворення специфічних комплексів між нейтральною карбоксильною групою амінокислот та Cyt , $m^5\text{Cyt}$, $m^1\text{Cyt}$, $m_2^{1,5}\text{Cyt}$, C , $d\text{C}$, $m^5d\text{C}$. Для $m^3\text{Cyt}$ та $iso\text{Cyt}$ спостерігається обернення специфічності щодо двох форм карбоксильної групи: для них характерна специфічна взаємодія з карбоксилат-іоном. Усім сполукам урацилового та тимінового ряду Ura , $m^3\text{Ura}$, $m^1\text{Ura}$, $chx^1\text{Ura}$, $s^2\text{Ura}$, Thy , $m^1\text{Thy}$, U , T , $r\text{T}$ ($m^5\text{U}$) притаманна властивість утворювати специфічні комплекси з депротонованою карбоксильною групою.

Крім того, встановлено, що $chx^1\text{Ura}$, $s^2\text{Ura}$ та $d\text{U}$ утворюють слабкі комплекси з нейтральною карбоксильною групою. Для неканонічного нуклеозиду $d\text{U}$ взаємодії з карбоксилат-іоном взагалі не зафіксовано.

Зроблено висновок про значний внесок перенесення протона від нейтральної карбоксильної групи до основи в комплексах з Cyt , $m^5\text{Cyt}$, $m^1\text{Cyt}$ і $m_2^{1,5}\text{Cyt}$. І, навпаки, в комплексах Ura , Thy , $m^3\text{Cyt}$, $s^2\text{Ura}$ з карбоксилат-іоном протон переноситься від основи до карбоксилат-іона.

Метилування першого положення піримідинового циклу викликає батохромний зсув максимуму поглинання на 8—5 нм. Метилування п'ятого положення Cyt дає батохромний ефект 12—9 нм, а Ura — 5 нм. Спираючись на уявлення про кореляцію між величиною батохромного ефекту та здатністю основи до стекінг-взаємодії, можна стверджувати, що метилування Cyt у ДНК зміцнює подвійну спіраль не лише через зміцнення

водневих зв'язків у парах GC, а й через підсилення вертикальних взаємодій.

Порівняння УФ спектрів комплексів Cyt з m^5 Cyt та m^1 Cyt з $m_2^{1,5}$ Cyt демонструє підсилення взаємодії з нейтральною карбоксильною групою через метилювання п'ятого положення циклу. Зіставлення спектрів комплексів Ura з Thy (m^5 Ura) свідчить про ослаблення взаємодії з карбоксилат-іоном при заміщенні п'ятого положення. Заміщення першого положення піримідинового циклу в усіх випадках супроводжується значним падінням комплексотворної властивості.

Зроблено припущення щодо локального зменшення полярності оточення chx^1 Ura в розчині за рахунок об'ємного аліфатичного замісника, що призводить до появи здатності утворювати слабкий комплекс з нейтральною карбоксильною групою.

Виходячи з меншої здатності m^1 Ura взаємодіяти з карбоксилат-іоном у порівнянні з m^3 Ura зроблено висновок про те, що в розчині ДМСО немає коалесценції кислотностей імінопротонів N1H та N3H, як це було встановлено для водного оточення [56]. Автори цитованої роботи у зв'язку з отриманими результатами вважають водне оточення далеким від фізіологічних умов біохімічних реакцій, оскільки глікозидна група N1H Ura повинна бути набагато кислішою, ніж група N3H (що, за даними [56], справедливо для газової фази), для того, щоб утворювався нормальний нуклеозид. Приєднуючися до цієї думки, зауважимо, що (хоча в літературі багато йдеться про роль водного оточення в білково-нуклеїнових взаємодіях [84]) відомі й інші погляди. Так, наприклад, ще в 1975 році було сформовано уявлення про те, що біохімічні реакції в активних центрах ферментів відбуваються в оточенні з діелектричною проникністю порядку кількох одиниць [85]. Автори більш пізньої роботи [86] висловилися ще радикальніше: для того, щоб субстрат поглинувся активним центром ферменту, потрібно «вичавити» з нього молекули води. В роботі [87] запропоновано модель точності полімерази ДНК, в якій різниця вільної енергії $\Delta\Delta G$ (енергії взаємодії як через стекинг, так і, особливо, через водневі зв'язки) між правильно і неправильно спареними нуклеотидами зростає в активному центрі ферменту внаслідок видалення з нього молекул води, що відновлює внутрішню притаманну основам здатність спарюватися через водневі зв'язки та стекинг, дуже занижену водним оточенням. Експериментально показано, що в активному центрі полімерази енергетична дискримінація між правильними і неправильними парами основ виявилася значно більшою (в 10 разів), ніж у водному оточенні [88]. Вичерпний аналіз рентге-

ноструктурних даних для 109 співкристалізаторів типу білок—ДНК у недавній роботі [89] свідчить про те, що в цих комплексах менше ніж 2 % молекул «кристалічної» води безпосередньо зв'язують біополімери через водневі зв'язки.

A. V. Stepanyugin, I. M. Kolomiets', A. L. Potyuhaylo,
S. P. Samijlenko, D. M. Hovorun

UV spectra of pyrimidine bases and nucleosides in the context of methylsubstitution and interaction with amino acid carboxylic group

Summary

UV spectra of pyrimidine nucleotide bases, nucleosides, a number of their derivatives and analogues were investigated in anhydrous DMSO. Effects of interaction with neutral and deprotonated carboxylic group of amino acids on the UV spectra were traced. It was established that methylation of pyrimidine bases at the positions 1 and 5 leads to the 5–12 nm bathochromic shift of the absorption bands. The majority of the Cyt derivatives excluding m^3 Cyt and iso Cyt were shown to interact specifically with neutral carboxylic group. Interactions with deprotonated carboxylic group is characteristic of Ura, Thy and their derivatives, except chx^1 Ura, s^2 Ura and dU . The conclusion was drawn that substitution at the positions 1 and 5 is accompanied by a decrease of a complex formation ability with the both forms of carboxylic groups, but substitution at the position 5 strengthens interaction with neutral carboxylic group but decreases interaction with carboxylate-ion. Biological significance of the results obtained is discussed.

A. B. Степанюгин, И. Н. Коломиец, А. Л. Потягайло,
С. А. Самойленко, Д. Н. Говорун

Ультрафиолетовые спектры пириимидиновых оснований и нуклеозидов в контексте метилзамещения и взаимодействия с карбоксильной группой аминокислот

Резюме

В безводном ДМСО исследованы УФ спектры пириимидиновых нуклеотидных оснований, нуклеозидов, ряда их производных и аналогов. Прослежено влияние на УФ спектры взаимодействия с нейтральной и депротонированной формами карбоксильной группы аминокислот. Установлено, что метилирование 1-го и 5-го положений пириимидиновых оснований вызывает bathochromic сдвиг максимума полосы поглощения от 5 до 12 нм. Показано, что Cyt и большинство его производных специфически взаимодействуют с нейтральной карбоксильной группой, за исключением m^3 Cyt и iso Cyt. Для Ura, Thy и их производных характерно взаимодействие только с депротонированной карбоксильной группой, кроме chx^1 Ura, s^2 Ura и dU . Сделан вывод о том, что замещение 1-го положения пириимидиновых оснований во всех случаях сопровождается снижением комплексообразующей способности с обеими формами карбоксильной группы, а замещение 5-го положения усиливает взаимодействие с нейтральной карбоксильной группой и ослабляет взаимодействие с карбоксилат-ионом. Обсуждается биологическая значимость полученных результатов.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Handbook of biochemistry and molecular biology. Nucleic acids / Ed. G. D. Fasman.— Boca Raton: CRC press, 1986.— 637 p.
2. Додонова Н. Я., Цыганенко Н. М., Кузичева Е. А., Симаков М. Б. Абиогенный синтез уридиновых нуклеозидов под действием вакуумного ультрафиолетового излучения // Биофизика.— 1994.— 39, № 1.— С. 26—31.

3. Miyakawa S., Murasava K., Kobayashi K., Sawaoka A. B. Cytosine and Uracil synthesis by quenching with high-temperature plasma // *J. Am. Chem. Soc.*—1999.—121, N 36.—P. 8144—8145.
4. Sowerby S. J., Cohn C. A., Heckl W. M., Holm H. G. Differential adsorption of nucleic acid bases: relevance to the origin of life // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2001.—98, N 3.—P. 820—822.
5. Шеина Г. Г., Радченко Е. Д., Плехотниченко А. М., Благой Ю. П. Электронно-колебательные спектры пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот в аргонных матрицах // *Биофизика.*—1982.—27, № 6.—С. 983—986.
6. Радченко Е. Д., Плехотниченко А. М., Шеина Г. Г., Благой Ю. П. Инфракрасные спектры цитозина и его производных в аргонной матрице при низкой температуре // *Биофизика.*—1983.—38, № 4.—С. 559—563.
7. Радченко Е. Д., Плехотниченко А. М., Иванов А. Ю., Шеина Г. Г., Благой Ю. П. Кетоенольная таутомерия молекул гуанина и изоцитозина // *Биофизика.*—1986.—31, № 3.—С. 373—381.
8. Шеина Г. Г., Радченко Е. Д., Плехотниченко А. М., Благой Ю. П. Инфракрасные спектры ассоциированных и гидратированных пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот в аргонной матрице // *Биофизика.*—1988.—33, № 5.—С. 741—746.
9. Степаньян С. Г., Шеина Г. Г., Радченко Е. Д., Благой Ю. П. Инфракрасные спектры и таутомерия изоцитидина в аргонной матрице // *Журн. физ. химии.*—1989.—63, № 11.—С. 3008—3014.
10. Stepanian S. G., Sheina G. G., Radchenko E. D., Blagoi Yu. P. Proton transfer in autoassociates and hydrates of pyrimidine bases: an MNDO/M study // *J. Mol. Struct.*—1992.—270.—P. 459—479.
11. Vranken H., Smets J., Maes G., Lapinski L., Nowak M. J., Adamowicz L. Infrared spectra and tautomerism of isocytosine: an *ab initio* and matrix isolation study // *Spectrochim. acta.*—1994.—50A, N 5.—P. 875—889.
12. Smets J., Adamowicz L., Maes G. Matrix isolation FT-IR studies and *ab initio* calculations of hydrogen bonded complexes of molecules modelling cytosine or isocytosine tautomers 5. 1-CH₃ cytosine complexes with H₂O in Ar matrices // *J. Phys. Chem.*—1996.—100, N 16.—P. 6434—6444.
13. Szczepaniak K., Person W. B., Leszczynski J., Kwiatkowski J. S. Matrix isolation and DFT quantum mechanical studies of vibrational spectra of uracil and its methylated derivatives // *Polish. J. Chem.*—1998.—72.—P. 402—420.
14. Tsuboi M. Infrared and Raman spectroscopy // *Basic principle in nucleic acid chemistry* / Ed. P. O. P. Ts'o.—New York; London: Acad. press, 1974.—636 p.
15. Clowney L., Jain S. C., Srinivasan A. R., Westbrook J., Olson W., Berman H. M. Geometric parameters in nucleic acids: nitrogenous bases // *J. Amer. Chem. Soc.*—1996.—118, N 3.—P. 509—518.
16. Бородавкин А. В., Будовский Э. И., Морозов Ю. В., Савин Ф. А., Симукова Н. А. Электронная структура, УФ-спектры поглощения и реакционная способность компонентов нуклеиновых кислот.—М.: ВИНТИ, 1977.—227 с. (Итоги науки и техники. Молекуляр. биология; Т. 14).
17. Callis P. R. Electronic states and luminescence of nucleic acid systems // *Ann. Rev. Phys. Chem.*—1983.—34.—P. 329—357.
18. Морозов Ю. В., Бажулина Н. П. Электронное строение, спектроскопия и реакционная способность молекул.—М.: Наука, 1989.—288 с.
19. *Biological applications of magnetic resonance* / Ed R. G. Shulman.—New York; San Francisco; London: Acad. press, 1979.—595 p.
20. Данилов В. И., Квенцель Г. Ф. Электронные представления в теории точечных мутаций.—Киев: Наук. думка, 1971.—82 с.
21. Sharma B. D., McConwell J. F. The crystal and molecular structure of isocytosine // *Acta cryst.*—1965.—19, N 5.—P. 797—806.
22. Пивоваров В. Б., Шеина Г. Г. Таутомерия изоцитозина в растворе // *Биополимеры и клетка.*—1992.—8, № 1.—С. 51—56.
23. Rubin Y. V., Morosov Y., Venkateswarlu D., Leszczynski J. Prototropic equilibria in 4-thiouracil: a combined spectroscopic and *ab initio* SCF-MO investigation // *J. Phys. Chem.*—1998.—102A, N 12.—P. 2194—2200.
24. Iamsabhi M., Alcamí M., Mo O., Bouab. W., Esseffar M., Abboud J. L.-M., Yanez M. Are the thiouracils sulfur bases in the gas-phase? // *J. Phys. Chem.*—2000.—104A, N 21.—P. 5122—5130.
25. Samijlenko S. P., Alexeeva I. V., Pal'chykivs'ka L. H., Kondratyuk I. V., Stepanyugin A. V., Shalamay A. S., Hovorun D. M. ¹H NMR investigation on 6-azacytidine and its derivatives // *Spectrochim. acta.*—1999.—55A.—P. 1133—1141.
26. Samijlenko S. P., Alexeeva I. V., Pal'chykivs'ka L. H., Kondratyuk I. V., Stepanyugin A. V., Shalamay A. S., Hovorun D. M. Structural peculiarities of 6-azacytidine and its derivatives imply intramolecular H-bonds // *J. Mol. Struct.*—1999.—484.—P. 31—38.
27. Orozco M., Hernandez B., Luque F. J. Tautomerism of N-methyl derivatives of uracil, thymine and 5-bromouracil. Is tautomerism the basis for mutagenicity of 5-bromouridine? // *J. Phys. Chem.*—1998.—102B, N 26.—P. 5228—5233.
28. Tian S. X., Zhang C. F., Zhang Z. J., Chen X. J., Xu K. Z. How many uracil tautomers there are? Density functional studies of stability ordering of tautomers // *Chem. Phys.*—1999.—242, N 2.—P. 217—225.
29. Kryachko E. S., Nguyen M. T., Zeegers-Huyskens T. Theoretical study of tautomeric forms of uracil. 1. Relative order of stabilities and their relations to proton affinities // *J. Phys. Chem.*—2001.—105A, N 8.—P. 1288—1295.
30. Kryachko E. S., Nguyen M. T., Zeegers-Huyskens T. Theoretical study of uracil tautomers. 2. Interaction with water // *J. Phys. Chem.*—2001.—105A, N 10.—P. 1934—1943.
31. Kobayashi R. A CCSD(T) study of relative stabilities of cytosine tautomers // *J. Phys. Chem.*—1998.—102A, N 52.—P. 10813—10817.
32. Gorb L., Podolyan Y., Yeszczynski. A theoretical investigation of tautomeric equilibria and proton transfer in isolated and monohydrated cytosine and isocytosine molecules // *J. Mol. Struct. (Theochem).*—1999.—487.—P. 47—55.
33. Columinas C., Gugue F. J., Orozco M. Tautomerism and protonation of guanine and cytosine. Implications in the formation of hydrogen-bonded complexes // *J. Amer. Chem. Soc.*—1996.—118, N 29.—P. 6811—6821.
34. Shukla M. K., Leszczynski J. Investigations of the excited-state properties of isocytosine: an *ab initio* approach // *Int. J. Quant. Chem.*—2000.—77.—P. 240—254.
35. Tsuboi M., Takahashi S., Harada I. Infrared and Raman spectra of nucleic acids—vibrations in the base-residues // *Phys.-Chem. Properties of Nucl. acids* / Ed. J. Duchesre.—New York: Acad. press, 1973.—P. 91—145.
36. Жижина Г. П., Олейник Э. Ф. Инфракрасная спектроскопия нуклеиновых кислот // *Успехи химии.*—1972.—41, № 2.—С. 474—511.
37. Podolyan Y., Gorb L., Leszczynski J. Protonation of nucleic

- acid bases. A comprehensive post-Hartree-Fock study of the energetics and proton affinities // *J. Phys. Chem.*—2000.—104A, N 31.—P. 7336—7352.
38. Barsky D., Colvin M. Guanine-cytosine base pairs in D study of the keto-amino wobble pair versus the enolimino minor tautomer pair // *J. Phys. Chem.*—2000.—104, N 37.—P. 8570—8576.
 39. Florian J., Baumruk V., Leszczynski J. IR and Raman spectra, tautomeric stabilities and scaled quantum mechanical force fields of protonated cytosine // *J. Phys. Chem.*—1996.—100, N 3.—P. 5578—5589.
 40. Chen L., Cai L., Zhang X., Rich A. Crystal structure of a four-stranded intercalated DNA: d(C₄) // *Biochemistry.*—1994.—33, N 46.—P. 13540—13546.
 41. Snoussi K., Nonin-Lecomte S., Leroy J.-L. The RNA I-motif // *J. Mol. Biol.*—2001.—309.—P. 139—153.
 42. Collin D., Gehring K. Stability of chimeric DNA/RNA cytosine tetrads: implications for I-motif formation by RNA // *J. Amer. Chem. Soc.*—1998.—120, N 17.—P. 4069—4072.
 43. Leitner D., Schroder W., Weisz K. Direct monitoring of cytosine protonation in an intermolecular DNA triple helix // *J. Amer. Chem. Soc.*—1988.—120, N 28.—P. 7123—7124.
 44. Семенов С. Г., Тулуб А. А., Стеценко А. И., Скалецкий Е. И. Квантовохимическое и УФ-спектроскопическое исследование изоцитозина // *Журн. общ. химии.*—1988.—58, № 4.—С. 901—905.
 45. Тулуб А. А., Семенов С. Г., Стеценко А. И., Юдович Е. Е. Спектроскопическое и квантовохимическое исследование изоцитозина // *Теор. и эксперим. химия.*—1988.—№ 1.—С. 29—36.
 46. Zhanpeisov N. U., Leszczynski J. Specific solvation effect on the structures and properties of Watson-Crick and reversed Watson-Crick isocytosine-cytosine and guanine-cytosine base pairs: a theoretical *ab initio* study // *J. Mol. Struct. (Theorchem).*—1999.—487.—P. 107—115.
 47. Zhanpeisov N. U., Leszczynski J. *Ab initio* study of the structure of isocytosine-cytosine standard Watson-Crick base pairs in the gas phase and in water // *Int. J. Quant. Chem.*—1998.—69.—P. 37—47.
 48. Shukla M. K., Leszczynski J. Investigations of the excited-state properties of isocytosine: an *ab initio* approach // *Int. J. Quant. Chem.*—2000.—77.—P. 240—254.
 49. Sugiyawa H., Ikeda S., Saito I. Remarkably stable parallel-stranded oligonucleotides containing 5-methyl isocytosine and isoguanine // *J. Amer. Chem. Soc.*—1996.—118, N 41.—P. 9994—9995.
 50. Toyama A., Takeuchi H., Harada I. Ultraviolet resonance Raman spectra of adenine, uracil and thymine derivatives in several solvents. Correlation between band frequencies and hydrogen-bonding states of the nucleic acid bases // *J. Mol. Struct.*—1991.—242.—P. 87—98.
 51. Morsy M. A., Al-Somali A. M., Suwaiyan A. Fluorescence of thymine tautomers at room temperature in aqueous solutions // *J. Phys. Chem.*—1999.—103B, N 50.—P. 11205—11210.
 52. Suwaiyan A., Morsy M. A., Odah K. A. Room temperature fluorescence of 5-chlorouracil tautomers // *Chem. Phys. Lett.*—1995.—237, N 2.—P. 249—254.
 53. Tsuchiya Y., Tamura T., Fujii M. Keto-enol tautomer of uracil and thymine // *J. Phys. Chem.*—1988.—92, N 7.—P. 1760—1765.
 54. Chandra A. K., Nguyen M. T., Zeegers-Huyskens T. Theoretical study of the interaction between thymine and water. Protonation and deprotonation enthalpies and comparison with uracil // *J. Phys. Chem.*—1998.—102A, N 29.—P. 6010—6016.
 55. Chandra A. K., Nguyen M. T., Uchimaru T., Zeegers-Huyskens T. Protonation and deprotonation enthalpies of guanine and adenine and its implications for the structure and energy of their complexes with water: comparison with uracil, thymine, and cytosine // *J. Phys. Chem.*—1999.—103A, N 44.—P. 8853—8860.
 56. Kurinovich M. A., Lee J. K. The acidity of uracil from the gas phase to solution: the coalescence of the N1 and N3 sites and implications for biological glycosylation // *J. Amer. Chem. Soc.*—2000.—122, N 26.—P. 6258—6262.
 57. Johnson R. C., Power T. D., Holt J. S., Immaraporn B., Monat J. E., Sissoko A. A., Yanik M. M., Zadorodny A. V., Cybulski S. M. Electron-correlated calculations of electric properties of nucleic acid bases // *J. Phys. Chem.*—1996.—100, N 48.—P. 18875—18881.
 58. Sporer J., Leszczynski J., Hobza P. Thioguanine and thiouracil: hydrogen-bonding and stacking properties // *J. Phys. Chem.*—1997.—101A, N 49.—P. 9489—9495.
 59. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот / Пер. с англ.—М.: Мир, 1987.—584 с.
 60. Kryachko E., Nguyen M. T., Zeegers-Huyskens T. Thiouracils: acidity, basicity, and interaction with water // *J. Phys. Chem.*—2001.—105A, N 13.—P. 3379—3387.
 61. Fulscher M. P., Roos B. O. Theoretical study of electronic spectrum of cytosine // *J. Amer. Chem. Soc.*—1995.—117, N 7.—P. 2089—2095.
 62. Lorentzon J., Fulsher M. P., Roos B. O. Theoretical study of electronic spectra of uracil and thymine // *J. Amer. Chem. Soc.*—1995.—117, N 36.—P. 9265—9273.
 63. Broo A., Pearl G., Zerner M. C. Development of a hybrid quantum chemical and molecular mechanisms method with application to solvent effects on the electronic spectra of uracil and uracil derivatives // *J. Phys. Chem.*—1997.—101A, N 13.—P. 2478—2488.
 64. Broo A., Holmen A. Calculations and characterization of the electronic spectra of DNA bases based on *ab initio* MP2 geometries of different tautomeric forms // *J. Phys. Chem.*—1997.—101A, N 19.—P. 3589—3600.
 65. Sowers L. C., Sedwick W. D., Shaw B. R. Hydrolysis of N³-methyl-2'-deoxycytidine: model compound for reactivity of protonated cytosine residues in DNA // *Mutat. Res.*—1989.—215, N 1.—P. 131—138.
 66. Sowers L. C., Shaw B. R., Sedwick W. D. Base stacking and molecular polarizability: effect of a methyl group in the 5-position of pyrimidines // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1987.—148, N 2.—P. 790—794.
 67. Желтовський М. В., Самійленко С. П., Губайдулін М. І., Кондратюк І. В. Коливальний спектр і структура комплексу цитозину з N-формілглїцином у твердій фазі // *Доп. АН УРСР, Сер. Б.*—1988.—№ 5.—С. 72—75.
 68. Zheltovsky N. V., Samoilenko S. A., Kolomiets I. N., Kondratyuk I. V., Gubaidullin M. I. Some structural aspects of protein-nucleic acid recognition point mechanisms involving amino acid carboxylic groups // *J. Mol. Struct.*—1989.—15.—P. 15—26.
 69. Tamura Ch., Hata T., Sato S., Sakurai N. Studies of intermolecular complex formation. II. Crystal structure of cytosine-N-benzoylglycine complex monohydrate // *Bull. Chem. Soc. Jap.*—1972.—45, N 11.—P. 3254—3261.
 70. Ohki M., Takenaka A., Shimanouchi H., Sasada Y. Complexes between nucleotide base and amino acid. I. Crystal structure of cytosine: N-formyl-glycine // *Bull. Chem. Soc. Jap.*—1975.—48, N 3.—P. 842—852.
 71. Желтовський М. В., Самійленко С. П., Коломісць І. М., Кондратюк І. В., Степанюгін А. В. Взаємодія метил- та глікозилпохідних піримідинових нуклеотидних основ з кар-

- боксильною групою амінокислот // Биополимеры и клетка.—1994.—10, № 6.—С. 45—51.
72. Кондратюк И. В., Коломиец И. Н., Самойленко С. А., Желтовский Н. В. Изучение комплексов цитозина с карбоксильной группой аминокислот методом спектроскопии ЯМР // Биополимеры и клетка.—1989.—5, № 6.—С. 21—25.
 73. Lancelot G. Hydrogen bonding of amino acid side chains to nucleic acid bases // Biochimie.—1977.—59, N 7.—P. 587—596.
 74. Lancelot G. Hydrogen bonding between nucleic acid bases and carboxylic acids // J. Amer. Chem. Soc.—1977.—99, N 21.—P. 7037—7042.
 75. Adams R. L. P. DNA methylation. The effect of minor bases on DNA-protein interactions // Biochem. J.—1990.—265.—P. 309—320.
 76. Klimasauskas S., Kumar S., Roberts R. J., Cheng X. HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix // Cell.—1984.—76.—P. 357—369.
 77. Желтовський М. В., Самійленко С. П., Коломієць І. М., Кондратюк І. В. Взаємодія нуклеотидних основ з карбоксильною групою амінокислот в ДМСО: модель точкових білково-нуклеїнових контактів // Доп. АН УРСР. Сер. Б.—1988.—№8.—С. 68—71.
 78. Samijlenko S. P., Kolomiets I. M., Kondratyuk I. V., Stepanyugin A. V. Model considerations on physico-chemical nature of protein-nucleic acid contacts through amino acid carboxylic groups: spectroscopic data // Biopolimery i kletka.—1998.—14, N 1.—P. 47—53.
 79. Takenaka A., Sasada Y. Studies on protein-nucleic acid interaction by model crystals // J. Crystallogr. Soc. Jap.—1985.—27.—P. 324—336.
 80. Destro R., Marsh R. E. The crystal structure of 6-methyluracil-5 acetic acid // Acta cryst.—1972.—28B, N 10.—P. 2971—2977.
 81. Kolomiets I. N., Kondratyuk I. V., Stepanyugin A. V., Samoilenko S. A., Zheltovsky N. V. Influence of methylation of nucleic acid purine base on their interactions with amino acids through the carboxylic group // J. Mol. Struct.—1991.—250.—P. 1—11.
 82. Kvick A. Hydrogen bond studies. 89. A neutron diffraction study in 1-methylthymine // J. Chem. Phys.—1974.—61, N 7.—P. 2711—2719.
 83. Suck P., Saenger W., Rohde W. X-ray structure of thymidine-5'-carboxylic acid, an inhibitor of thymidine and thymidylate-kinase: preferred nucleobase-carboxylic acid hydrogen bonding scheme // Biochim. et biophys. acta.—1974.—361.—P. 1—10.
 84. Schwabe J. W. R. The role of water in protein-DNA interactions // Cur. Opin. in Struct. Biol.—1997.—7, N 1.—P. 126—134.
 85. Богданов А. А., Леднева Р. К. Итоги науки и техники. Молекулярная биология. Т. 5. Нуклеиново-белковое узнавание.—М.: ВИНТИ, 1975.—151 с.
 86. Dewar M. J. S., Storch D. M. Alternative view of enzyme actions // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82, N 8.—P. 2225—2229.
 87. Petrushka J., Sowers L. C., Goodman M. F. Comparison of nucleotide interactions in water, proteins and vacuum: model for DNA polymerase fidelity // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 6.—P. 1559—1562.
 88. Petrushka J., Goodman M. F., Boosalis M. S., Sowers L. C., Cheong C., Tinoko I. Jr. Comparison between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85, N 17.—P. 6252—6256.
 89. Reddy C. R., Das A., Jayaram B. Do water molecules mediate protein-DNA recognition? // J. Mol. Biol.—2001.—314, N 3.—P. 619—632.

УДК 573.3

Надійшла до редакції 21.05.02