АКУСТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Том XX 1974 Вып. 5

УДК 534.286

ИЗУЧЕНИЕ РЕЛАКСАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ НУКЛЕОЗИДОВ МЕТОДОМ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Ф. И. Брагинская

Изучено поглощение ультразвуковых (УЗ) волн в водных растворах пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов с помощью импульсной УЗ установки в диапазоне частот 12—84 *Мгц*. Отмечены релаксационные процессы в растворах пуриновых нуклеозидов и вычислены акустические параметры релаксации для них.

Высказано предположение, что возможным механизмом, лежащим в основе релаксационного эффекта в водных растворах пуриновых нуклеозидов, является нарушение УЗ волной равновесия между син- и анти-конформацией молекул; рассчитано время релаксации и другие кинетические константы этого процесса.

В последние годы метод ультразвуковой (УЗ) спектроскопии используется для изучения гидродинамических свойств и кинетики таких биологически важных макромолекул, как нуклеиновые кислоты [1—3] и белки [4]. Изучение ультраакустических свойств биомакромолекул важно, с одной стороны, для понимания молекулярных механизмов процесса поглощения УЗ волн в связи с возрастающим применением ультразвука в диагностике и клинической медицине. С другой стороны, УЗ абсорбционная измерительная техника позволяет изучать термодинамические и кинетические характеристики быстрых конформационных переходов биомакромолекул, время которых сравнимо с периодом УЗ колебаний (10^{-9}—10^{-5} *сек*). Получаемые с помощью ультраакустических измерений кинетические характеристики ряда биохимических реакций (денатурации белков и нуклеиновых кислот, их гидролитических превращений, переходов спираль — клубок и т. д.) могут быть существенны для выяснения механизма функционирования этих биополимеров.

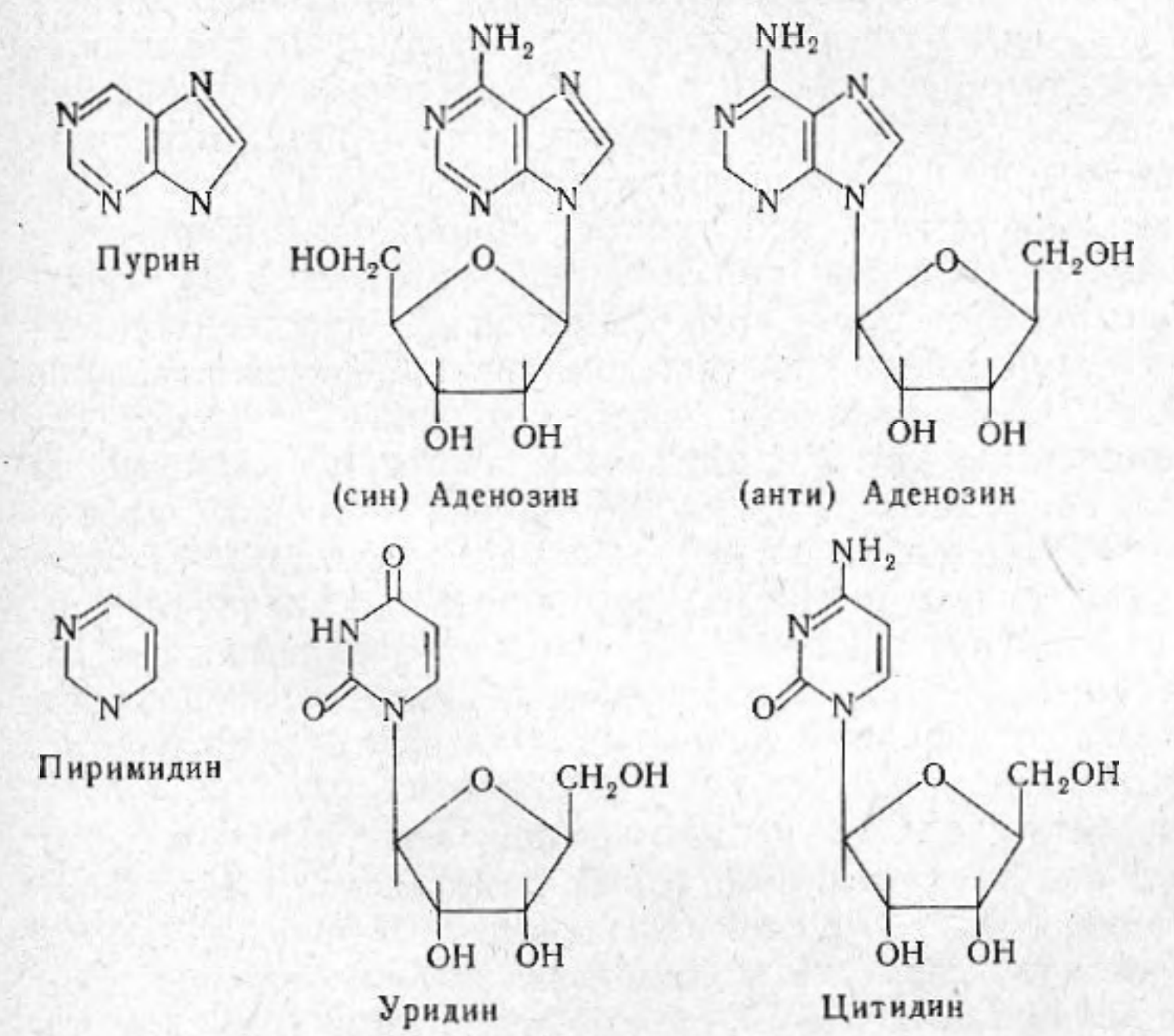
Полученные в работах [1—3] УЗ абсорбционные спектры для водных растворов нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) в мегагерцевой области частот указывают на наличие нескольких релаксационных процессов, в этих работах отмечена также определенная и закономерная корреляция между изученными конформационными переходами и изменением УЗ абсорбционных спектрограмм [2, 3]. Поскольку некоторые аспекты структурных превращений нуклеиновых кислот могут быть существенны для понимания конформационных изменений их низкомолекулярных производных (и наоборот), рассмотрим основные представления об относительном вкладе тех или иных процессов в релаксационное поглощение ультразвука в водных растворах нуклеиновых кислот и их производных.

Механизм поглощения УЗ волн в водных растворах нуклеиновых кислот в основном может быть обусловлен следующими факторами: вязкоэластическая релаксация (поглощение звука, обусловленное сдвиговой вязкостью, как известно, дается классической формулой Стокса); реакция переноса протона в карбоксильных и аминогруппах азотистых оснований

нуклеиновых кислот; переход спираль — клубок (в результате полной тепловой денатурации ДНК макромолекула ее, имеющая вначале форму жесткой спирали, приобретает форму беспорядочного клубка); взаимодействие акустической волны с гидратным слоем макромолекулы (при этом характер пертурбации УЗ волной равновесия раствор — растворитель может существенно изменяться в результате конформационных переходов биополимера). Поглощение ультразвука в нуклеиновых кислотах может быть связано с одним из возможных механизмов, с несколькими механизмами или со всеми сразу в зависимости от физико-химических условий.

Что касается мономолекулярных производных нуклеиновых кислот, в частности, нуклеозидов и нуклеотидов, то для них существенный вклад в поглощение могут давать реакции образования межмолекулярных водородных связей [5], «стэкинг»-взаимодействие планарных колец азотистых оснований [6], а также ионизация и гидратация карбоксильных, гидроксильных, фосфатных и аминогрупп. Известно, что в зависимости от взаимного расположения рибозы и основания в молекуле нуклеозида может происходить процесс взаимного перехода син-анти конформации гликозидной связи [7, 8]. Поскольку установлено, что временные константы реакций образования водородных связей [5], а также временные константы взаимных переходов ряда вращательных изомеров органических соединений [9] имеют величину порядка 10^{-8}—10^{-9} *сек*; при постановке настоящего исследования учитывалась возможность выявления релаксационных процессов, связанных со структурными переходами мононуклеозидов в изученной мегагерцевой области УЗ спектра поглощения их водных растворов.

Исследование проводилось с помощью импульсной УЗ установки, как и ранее в работах [2, 3]. Установка работает по принципу переменного акустического пути с использованием двух кварцевых преобразователей, в диапазоне частот 12—84 *Мгц*; погрешность измерений составляет ±3%. Измерялось поглощение ультразвука в водных растворах пуриновых нуклеозидов (аденозин, гуанозин); пиримидиновых нуклеозидов (уридин, цитидин); аденозин-5′-монофосфорной кислоты (АМФ); рибозы и рибозомонофосфата (РМФ). При измерениях использовались серийно изготавливаемые препараты этих веществ отечественного производства и производства венгерской фирмы «Реанал».

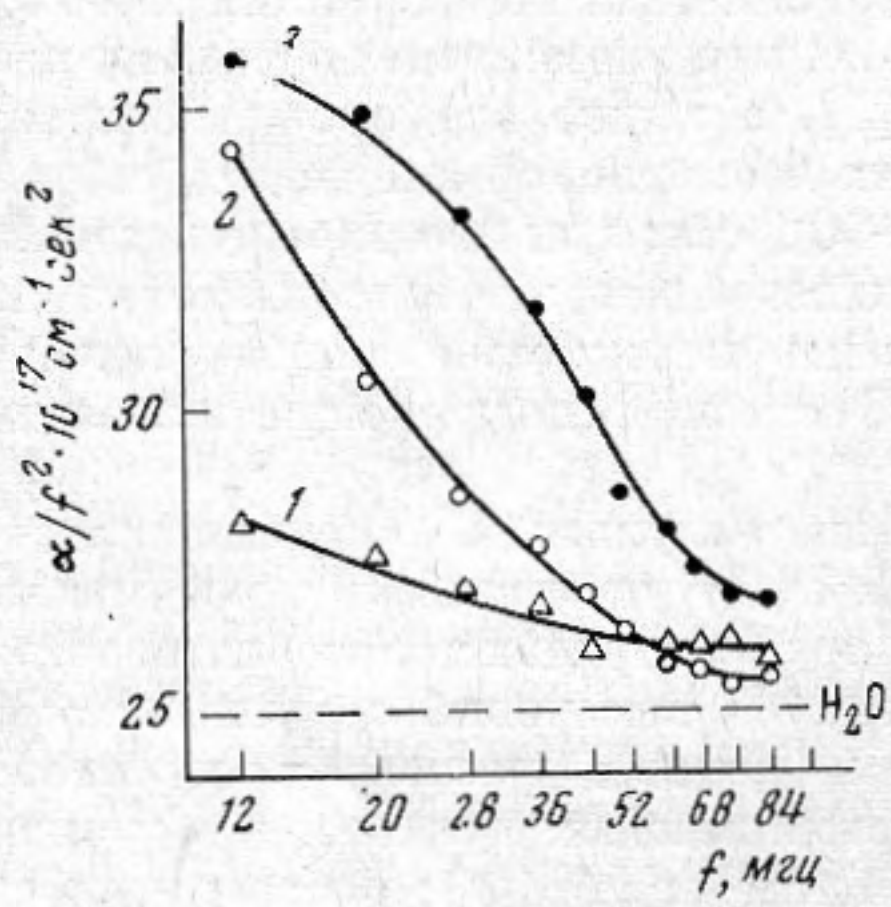


Приведем формулы некоторых пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов и их вращательных изомеров (син- и анти-конформация). Считается, что пиримидиновые нуклеозиды существуют преимущественно в анти-конформации [7].

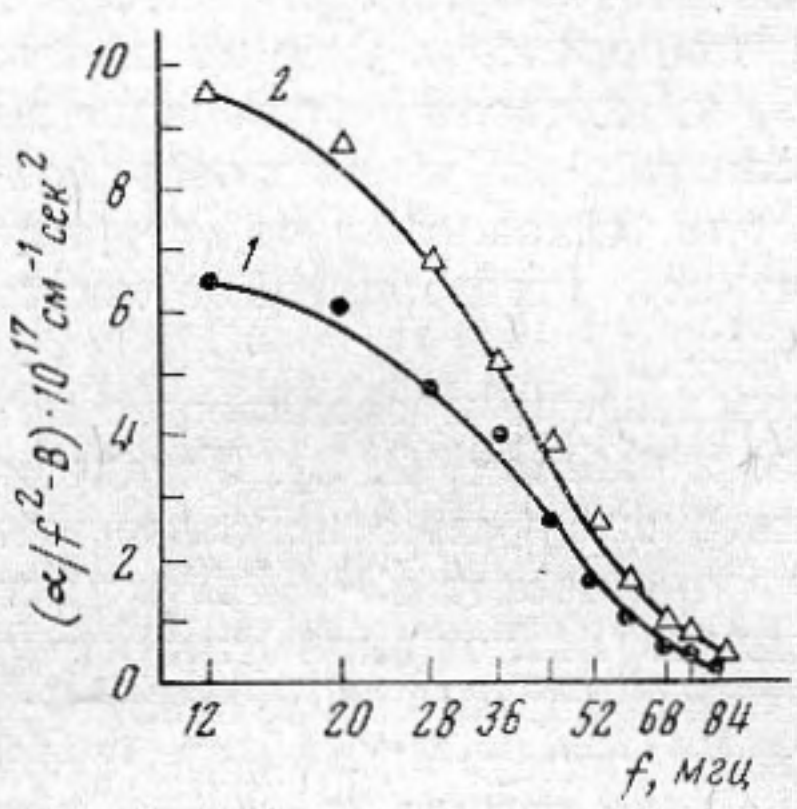
Для описания релаксационного процесса и определения частоты релаксации ($f_р$) в исследованиях применялась эмпирическая формула:

$$(1) \qquad (\alpha/f^2) = \frac{A}{1+(f/f_р)^2} + B,$$

где α — определенный экспериментально коэффициент поглощения ультразвука, f — соответствующая частота, A — релаксационная константа, зависящая от равновесного состояния системы и B — параметр, характеризующий предельные значения (α/f^2), достигаемые на высоких частотах, и определяемый непосредственно из экспериментальных кривых частотной зависимости α/f^2. Величина A вычислялась из соотношения $\mu_{макс} = Ac/2\pi$ [9],



Фиг. 1



Фиг. 2

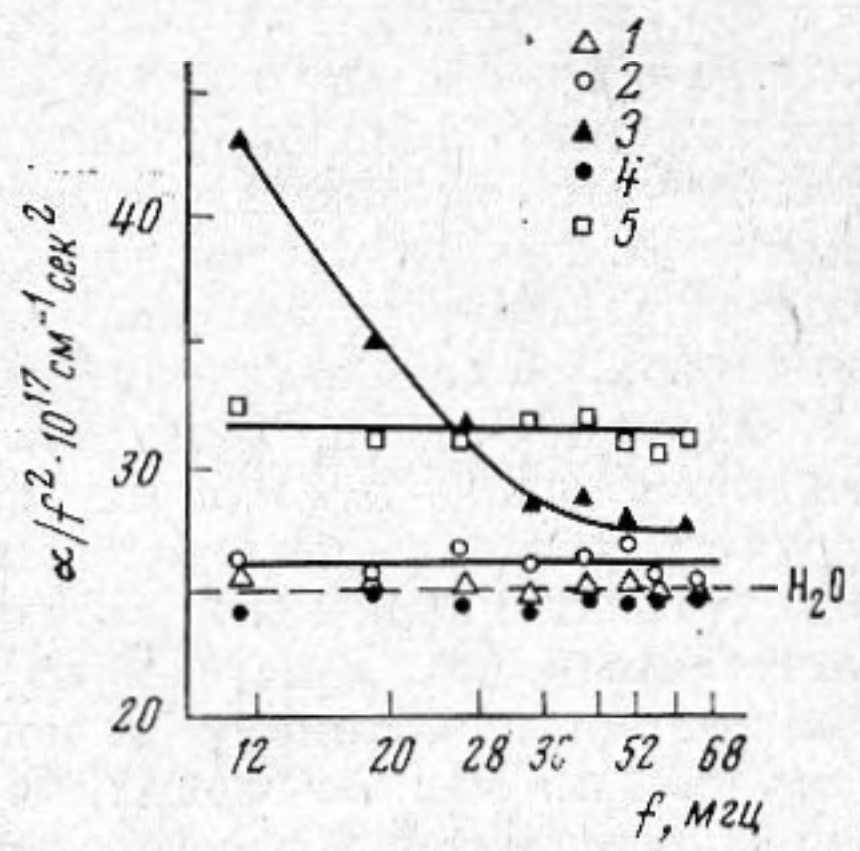
где c — скорость распространения ультразвука, а $\mu_{макс}$ — максимальное значение произведения коэффициента поглощения ультразвука на длину волны, соответствующее частоте релаксации, т. е. $(\alpha\lambda)_р$. После нахождения из эксперимента значений A, B и времени релаксации $\tau_р$ строились расчетные кривые зависимости α/f^2 от f по данным параметрам.

На фиг. 1 приведены частотные зависимости величины α/f^2 при температуре 20° С для водных растворов пиримидиновых нуклеозидов (кривая *1* — цитидин, концентрация 0,1 *М*, pH 6; кривая *2* — уридин, концентрация 0,09 *М*, pH 7) и пуринового нуклеозида (кривая *3* — гуанозин, концентрация 0,025 *М*, pH 5). Там же дана частотная зависимость α/f^2 для воды (пунктирная линия). На фиг. 2 представлены частотные зависимости релаксационной части поглощения (α/f^2-B) в водных растворах пуриновых нуклеозидов (кривая *1* — аденозин, 0,055 *М*, pH 7; кривая *2* — гуанозин 0,025 *М*, pH 5 при температуре 20° С). Из приводимых графиков видно, что в растворах пиримидиновых нуклеозидов в исследованном диапазоне частот релаксационный эффект не наблюдается, при этом поглощение ультразвука в цитидине значительно ниже, чем в других нуклеозидах, и близко к поглощению в воде.

Хотя поглощение ультразвука в уридине выше, чем в цитидине, и α/f^2 нелинейно уменьшается с частотой, что свидетельствует о наличии структурной релаксации (фиг. 1, кривая *2*), характеристическая частота наблюдается, по-видимому, за пределами исследованного диапазона частот в отличие от пуриновых нуклеозидов. Как видно из фиг. 1 и 2, кривые ча-

стотных зависимостей α / f^2 для растворов аденозина и гуанозина могут быть удовлетворительно описаны приведенным выше уравнением (1) для одиночного релаксационного процесса. В таблице даны значения параметров уравнения (1) A и B и времени релаксации τ_p для двух изученных пуриновых нуклеозидов при температуре 20° С.

Из приведенных на фиг. 1 и 2 и в таблице результатов видно, что релаксационные УЗ спектры обнаруживаются в растворах пуриновых нуклеозидов, в то время как в пиримидиновых нуклеозидах в изученном диапазоне частот этот эффект не наблюдается. Были проведены дополнительные исследования по измерению поглощения ультразвука в составных компонентах нуклеозида (пурия и рибоза), а также в мононуклеотиде (АМФ) и рибозомонофосфате для того, чтобы иметь возможность судить о вкладе тех или иных групп в избыточное поглощение. На фиг. 3 приведены результаты измерения поглощения ультразвука в водных растворах аденина с концентрацией 0,055 M pH 6 (значки *1*) рибозы с концентрацией 0,055 M, pH 6 (значки *2*), АМФ с концентрацией 0,055 M, pH 7 (значки *3*), неорганического фосфата с концентрацией 0,06 M, pH 7 (значки *4*) и рибозомонофосфата РМФ с концентрацией 0,05 M, pH 7 (значки *5*). Видно, что в растворах исследованных соединений, за исключением АМФ, не наблюдается УЗ релаксация, причем поглощение в аденине рибозе и фосфате весьма близко к поглощению в воде (α / f^2 составляет для воды при 20° С $25 \pm 0{,}7 \times 10^{17}$ $см^{-1} сек^2$; на фиг. 3 поглощение в воде отмечено пунктиром); значение α / f^2 для водного раствора РМФ выше, чем для воды на $8-10 \times 10^{17}$ $см^{-1} сек^2$, но и в этом случае нет релаксационного процесса в изученном диапазоне УЗ частот. Интересно отметить, что нуклеозидмонофосфат (АМФ) значительно в большей степени поглощает УЗ энергию, чем соответствующий нуклеозид аденозин (сравниваются одинаковые молярные концентрации), но при этом его релаксационная кривая в изученном диапазоне частот не описывается уравнением, учитывающим одиночное время релаксации.



Фиг. 3

Нуклеозид	$A \cdot 10^{17}$ $см^{-1}$ $сек^2$	$B \cdot 10^{17}$ $см^{-1}$ $сек^2$	$\tau_p \times 10^9$ сек
Аденозин pH 7	6,5	25,5	4,6
Гуанозин pH 5	9,5	26,4	5,5

Рассматривая вклад возможных механизмов в наблюдаемую УЗ релаксацию в растворах пуриновых мононуклеозидов, мы исходили из следующего. Поскольку зависимости времени релаксации от концентрации аденозина в исследованной области концентраций (от 0,02 до 0,06 M) практически не наблюдалось, мы предположили, что механизм, лежащий в основе обнаруженного релаксационного процесса, является внутримолекулярным. Незначительность вклада межмолекулярных связей в поглощение ультразвука подтверждается также результатами экспериментов, проведенных при низкой концентрации нуклеозидов, т. е. в отсутствие процессов самоассоциации. Отметим, что результаты измерений в растворах зна-

чительно более высокой концентрации нуклеозидов могли бы представить интерес для исследования роли «стэкинг»-взаимодействия планарных колец, однако, провести такие измерения было невозможно ввиду низкой растворимости этих веществ.

Чтобы исключить влияние реакций ионизации азотистых оснований или рибозного участка молекулы нуклеозида на поглощение ультразвука, измерения проводились при значениях pH, близких к нейтральному, с целью отдаления от области значений pH соответствующих ионизации этих групп. Однако эта предосторожность была, по-видимому, излишней, так как измерения показали, что УЗ абсорбционные спектрограммы в водных растворах аденозина при pH 7 и 3,4 почти идентичны, что исключает возможность вклада реакций ионизации в поглощение. Наличие вязкоэластической релаксации также приходится исключить, так как по величине вязкости и плотности изученные растворы нуклеозидов близки к воде; вычисление стоксовского (классического) значения α / f^2 для аденозина при 20° С дало величину около 10×10^{-7} *см*$^{-1}$*сек*^{2}, что в 2,5 раза меньше значения α / f^2 для воды. Мы не исключали также и такой вероятный механизм физико-химических релаксационных процессов для биоорганических молекул, как взаимодействие УЗ волны с гидратным слоем вокруг молекулы, т. е. нарушение УЗ волной равновесия взаимодействия растворрастворитель [1]. В изученных водных растворах нуклеозидов процесс сольватации, по-видимому, не мог быть определяющим для механизма релаксации, так как, во-первых, избыточное поглощение ультразвука почти не обнаруживается в растворах рибозы и аденина отдельно, а, во-вторых, релаксационный эффект не наблюдается в водных растворах изученных пиримидиновых нуклеозидов, обладающих близкими величинами гидратации.

Таким образом, для расшифровки природы релаксационного процесса в нуклеозидах мы исключили ряд существенных механизмов УЗ релаксации биологических жидкостей и перешли к рассмотрению корреляции между экспериментально установленным релаксационным эффектом и конформационным состоянием молекул исследуемых соединений. Приняв во внимание, что существуют две возможные ориентации рибозы относительно гликозидной связи в молекулах нуклеозидов (син- и антиконформация); что пиримидиновые нуклеозиды существуют преимущественно в антиконформации, [7] и в их растворах релаксационный эффект не наблюдается; что известные случаи релаксации в сложных органических эфирах, обусловленные нарушением равновесия между поворотными изомерами при прохождении УЗ волны через исследуемый раствор имеют времена релаксации того же порядка, что и наблюдавшиеся в данной работе, т. е. 10^{-8}—10^{-9} *сек*, мы предположили, что наблюдаемая релаксация в водных растворах пуриновых нуклеозидов, может, по-видимому, быть обусловлена нарушением равновесия реакции син-антиперехода в гликозидной связи молекулы.

Исходя из этого предположения и используя рассчитанные параметры предполагаемого релаксационного процесса, мы вычислили некоторые кинетические характеристики для аденозина. Константу равновесия (K), т. е. отношение констант скоростей обратной реакции и прямой, мы рассчитали по формуле [10]:

$$\Delta\alpha = \frac{(\Delta V^0)^2}{2c\beta RT} \frac{CK}{(1+K)^2} \frac{\omega\tau}{1+\omega^2\tau^2},$$

где $\Delta\alpha$ — измеренное избыточное поглощение ультразвука; ΔV^0 — изменение объема системы на моль реакции; C — моляльная концентрация на единицу объема раствора, c — скорость распространения УЗ волн, β — сжимаемость растворителя, τ — время релаксации, ω — угловая частота, T — абсолютная температура. Вычисленное значение K составило $3{,}3 \times 10^{-1}$.

В случае мономолекулярного процесса величина, обратная времени релаксации, равна сумме констант скоростей прямой — k_{12} и обратной — k_{21} реакций [11]: $1/\tau = k_{12} + k_{21}$.

Зная τ и K, можно отдельно рассчитать k_{12} и k_{21}, используя выражения $k_{21} = K/\tau(1+K)$ и $k_{12} = 1/\tau(1+K)$.

Для водного раствора аденозина (pH 7, температура 20° С) рассчитанные значения k составили: $k_{12} = 1{,}7 \times 10^8$ *сек*$^{-1}$ и $k_{21} = 5{,}5 \times 10^7$ *сек*$^{-1}$. Поскольку константы скоростей реакций не равны между собой, две конформации аденозина существуют, по-видимому, не с одинаковой вероятностью, и одна из них является преобладающей. В работе, посвященной расчету конформации нуклеозидов по значениям угла поворота вокруг гликозидной связи [12], было установлено, что антиконформация более выгодна для взаимного расположения рибозы и основания в нуклеозидах.

Таким образом, на основе экспериментального исследования сделано предположение, что возможным механизмом, ответственным за релаксационные процессы в водных растворах пуриновых нуклеозидов, является нарушение УЗ волной равновесия между син- и антиконформацией их молекул.

В заключение приношу искреннюю благодарность профессору К. Е. Кругляковой за внимание и интерес к работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. *W. D. O'Brien, C. L. Christman, F. Dunn.* Ultrasonic investigation of aqueous solutions of deoxyribose nucleic acid. J. Acoust. Soc. Amer., 1972, *52*, 4 (2), 1251–1254.
2. *Ф. И. Брагинская, С. Х. Садыхова, И. Е. Эльпинер.* Изучение конформационных изменений биополимеров методом ультразвуковой спектроскопии. Акуст. ж., 1971, *17*, 3, 465–466.
3. *Ф. И. Брагинская.* Об изучении гидролиза биополимера (РНК) ультразвуковым методом. Акуст. ж., 1973, *18*, 3, 446–448.
4. *L. W. Kessler, F. Dunn.* Ultrasonic investigation of the conformational changes of bovine serum albumin in aqueous solution, J. Phys. Chem., 1969, *73*, 12, 4256–4263.
5. *G. G. Hammes, A. C. Park.* Kinetic and thermodynamic studies of hydrogen bonding. J. Amer. Chem. Soc., 1969, *91*, 3, 956–961.
6. *D. Porschke, F. Eggers.* Thermodynamics and kinetics of base-stacking interactions. Europ. J. Biochem., 1972, *26*, 4, 490–498.
7. *M. Sundaralingam.* Stereochemistry of nucleic acids and their constituents IV Allowed and preferred conformations of nucleosides, nucleioside mono-, di-, tri-, tetraphosphates, nucleic acids and polynucleotides. Biopolymers, 1969, *7*, 6, 821–860.
8. *M. Ikehara, S. Uesugi, K. Joshida.* Studies on the conformation of purine nucleosides and their 5′-phosphates. Biochemistry, 1972, *11*, 5, 830–836.
9. *У. Мэзон.* В кн.: Физическая акустика, т. II, ч.а. М., «Мир», 1968, 265.
10. *K. Tamm, G. Kurtze, R. Kaiser.* Measurements of sound absorption in aqueous solutions of electrolytes. Akustica, 1954, *4*, 2, 380–386.
11. *M. Eigen, L. de Mayer.* Relaxation Methods. In: Techniques of organic chemistry, v. VIII, p. 2, S. L. Fuess, E. S. Lewis, A. Weissberger, E. d. Interrcience Publishers, N. Y., 1963, p. 895.
12. *А. Э. Кистер, В. Г. Дашевский, А. И. Китайгородский.* Расчеты конформации нуклеозидов. Молек. биол., 1971, *5*, 2, 232–237.

Институт химической физики
Академии наук СССР

Поступила
14 июня 1973 г.