

2. Studia literaturowe

Struktura oraz preferencje konformacyjne nukleozydów i ich analogów w ciele stałym

2.1. Ogólna charakterystyka właściwości strukturalnych nukleozydów

W niniejszym rozdziale szczegółowo przedstawię stan wiedzy na temat struktury przestrzennej nukleozydów. Głównym źródłem informacji była dzieło Wolframa Saengera „Principles of Nucleic Acid Structure” (Springer-Verlag New York Inc 1984) oraz wybrane publikacje dotyczące omawianego problemu.

2.1.1. Geometria części zasadowej

Liczne dane krystalograficzne nukleozydów wskazują, że wszystkie atomy układu heterocyklicznego imidazo[4,5-d]pirymidyny (adenozyna, guanozyna) oraz układu heterocyklicznego pirymidyn (cytydyna, urydyna i tymidyna) leżą w jednej płaszczyźnie.³³ Istnieją rzadkie przykłady odstępstwa od planarności części zasadowej zaobserwowane w nukleozydach purynowych pomiędzy płaszczyznami tworzonymi przez pierścienie imidazolu i pirymidyny. Prostopadłe do tych płaszczyzn przecinają się, tworząc niewielki kąt wynoszący od 0.5° do 1°.^{34,35}

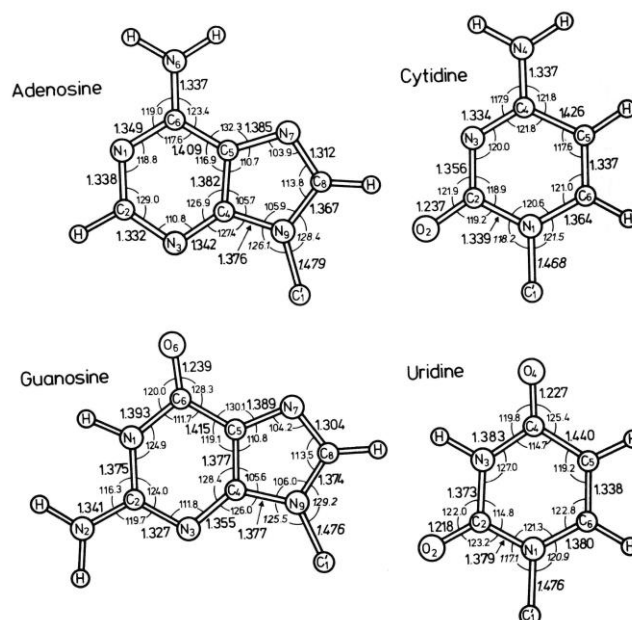
Wiązanie pomiędzy grupą aminową a układem heterocyklicznym puryny i cytozyny jest znacznie krótsze od wiązania C-N w układach alifatycznych (1.472(5) Å) i wynosi 1.34(1) Å.³⁶ Sugeruje to istnienie częściowo podwójnego charakteru wiązania C-NH₂³⁷ dla którego obliczony rząd wiązania podwójnego mieści się w zakresie 0.41-0.47³⁸ przyjmując pośredni charakter pomiędzy wiązaniem podwójnym a pojedynczym. Obecność częściowo podwójnego charakteru wiązania C-NH₂ implikuje pojawienie się bariery rotacyjnej wymuszając przyjęcie orientacji koplarnarnej przez egzocykliczną grupę aminową w stosunku do układu heterocyklicznego zasady. Wysokość bariery rotacji wiązania C-N uzyskana na podstawie obliczeń kwantowo-mechanicznych (CNDO/2) wynosiła od 15 do 25 kcal/mol w zależności od obecności wodoru lub grupy metylowej na egzocyklicznym atomie azotu w pochodnych cytozyny³⁹, adeniny⁴⁰ i guaniny⁴⁰. Dane uzyskane na drodze eksperymentów NMR wskazują na niższą wartość bariery rotacji dla puryn w porównaniu z cytozyną⁴¹ wynoszącą od 15 do 18 kcal/mol.⁴² Warto podkreślić iż obecność w bliskim sąsiedztwie grup metylowych w 1,5,N⁴,N⁴-tetrametylocytozynie nie wymusza w sposób wyraźny obrotu wokół

wiązania C⁴-N(CH₃)₂ wskutek sterycznego odpychania między grupami metylowymi, tym samym zachowując koplanarność heterocyklicznego układu z atomami węgla egzocyklicznego podstawnika N⁴,N⁴-dimetyloaminowego. Analiza rentgenostrukturalna 1,5,N⁴,N⁴-tetrametylocytozyny wykazała przyrost wartości kątów endocyklicznych N⁴-C4-C5 i C4-C5-CH₃ o odpowiednio 4.2° i 7.9°^{43,44} w stosunku do 1-podstawionej cytozyny.

Długość egzocyklicznego wiązania C-O w części zasadowej pirymidyn oraz guaniny wynosząca pomiędzy 1.22(1) Å-1.24(1)Å jest bardzo zbliżona do długości klasycznego wiązania podwójnego C=O [1.215(5)Å]. W porównaniu do egzocyklicznego wiązania C-NH₂ puryn i cytozyny, udział podwójnego charakteru w wiązaniu C-O jest zdecydowanie większy wynosząc od 0.84 do 0.89, wskazując na obecność tautomerycznej formy laktamowej.³⁸

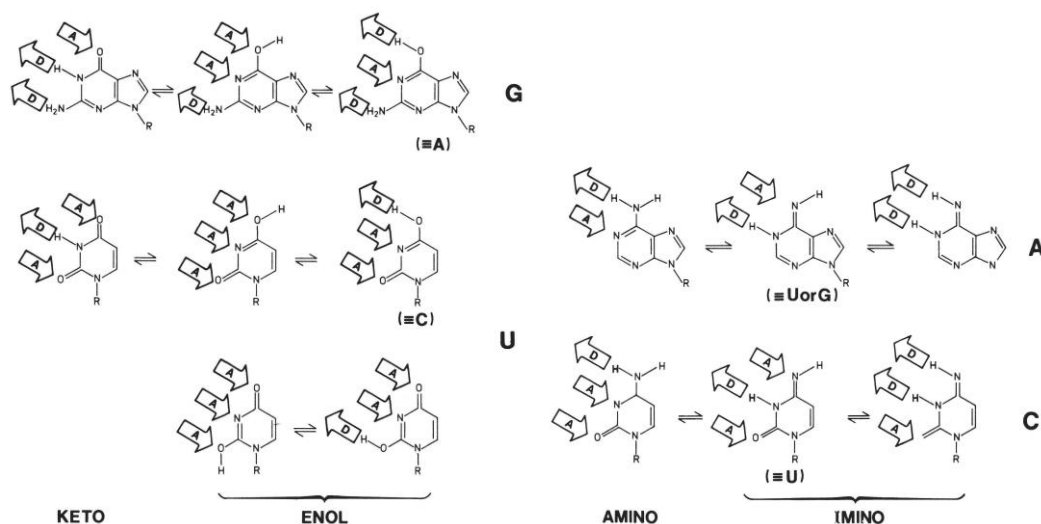
Obecność dodatkowych grup funkcyjnych oraz wzajemne ułożenie w jednej płaszczyźnie atomów azotu i węgla na różnych stopniach hybrydyzacji w układach heterocyklicznych puryn i pirymidyn powoduje wyraźne zróżnicowanie kątów endocyklicznych oraz długości poszczególnych wiązań.⁴⁵ (**Rysunek 2**)

Przykładowo wiązanie C2-N3 oraz N3-C4 w układzie puryn jest krótsze od odpowiadającego im wiązania N1-C2 i N1-C6 układu pirymidyn. Natomiast wiązanie C4-C5 zasady purynowej jest dłuższe od analogicznego wiązania C5-C6 w układzie pirymidyn. Ponadto w układzie puryn wiązanie N7-C8 jest wyraźnie krótsze od wiązania C8-N9, wskazując na zdecydowanie większy udział podwójnego wiązania w N7-C8 w porównaniu z C8-N9. Interesującą tendencję można zaobserwować



Rysunek 2. Długości wiązań oraz kątów układu heterocyklicznego puryn i pirymidyn. W. Saenger (1984), Principles of Nucleic Acids Structure; Springer-Verlag New York Inc, str.52

analizując zmiany wartości kątów endocyklicznych wokół atomów N.⁴⁶ Wielkość kąta tworzonego przez C6-N1-C2 w układzie puryn oraz C2-N3-C4 w układzie pirymidyn zależy od obecności lub braku podstawnika na atomie azotu N1 lub N3. Kąty te są większe średnio o 6° do 8° w przypadku obecności atomu wodoru na N1/N3 co ma miejsce odpowiednio w guanozynie i urydynie. Mniejszą różnicę w wielkości kąta wynoszącą od 2° do 3°, można również zaobserwować dla C5-N7-C8 w układzie imidazolu puryn. Omówione wyżej zmiany kątów walencyjnych w zależności od obecności lub braku podstawnika na atomie N kompensowane są zmianami w sąsiednich kątach N-C-C w celu utrzymania atomów układu



Rysunek 4. Tautomeria keto \leftrightarrow enolowa oraz amino \leftrightarrow iminowa części zasadowej nukleozydów.

W. Saenger (1984), Principles of Nucleic Acids Structure; Springer-Verlag New York Inc, str.113

Szczegółowe badania zjawiska tautomerii w nukleozydach pirymidynowych oraz purynowych za pomocą metod spektroskopowych UV, IR, NMR i rentgenostrukturalnych⁴⁹ oraz obliczeń kwantowomechanicznych⁵⁰ ujawniły zdecydowanie dominujący udział formy tautomerycznej keto i amino. Dla adenozyiny oraz 1-metylowouracylu udział formy keto i amino został oszacowany na wielkość 99,99%, powyższa przewaga została potwierdzona w szeregu rozpuszczalnikach o różnych stałych dielektrycznych.⁵¹

2.1.2. Pofałdowanie części cukrowej-koncepcja pseudorotacji

Dane krystalograficzne nukleozydów i nukleotydów jednoznacznie wskazują na niepłaski charakter układu pentofuranozy części cukrowej. Pięciodzłonowy pierścień furanozy może przyjąć dwa główne rodzaje konformacji: koperty (*E*, *envelope*) oraz skręconą/półkrzesłową (*T*, *twist*). W pierwszym przypadku jeden z pięciu atomów znajduje się w przybliżeniu o 0.5Å poza płaszczyznę utworzoną przez pozostałe cztery atomy, natomiast w drugim - dwa sąsiednie atomy pierścienia zajmują położenie po przeciwnych stronach płaszczyzny utworzonej przez pozostałe trzy atomy.⁵² W przypadku β ,D-rybofuranazy oraz jej 2'-deoksy analogu, atomy uczestniczące w pofałdowaniu pierścienia mogą zająć pozycję po tej samej stronie co grupa 5'-CH₂OH określaną jako *endo* lub po przeciwnej - określanej wówczas jako *egzo*.⁵³

Opis wszystkich możliwych pofałdowań pięciodzłonowego pierścienia został ujęty w formie koncepcji pseudorotacji wprowadzonej przez J.E. Kilpatrick'a i wsp w celu wyjaśnienia nieokreśloności (*indefiniteness*) konformacji cyklopentanu wynikającej z swobody rotacji wokół wszystkich wiązań C-C.⁵⁴ K.S. Pitzer i wsp stwierdzili iż obecność

dotychczasowych podstawników w badanych przez nich pochodnych cyklopentanu indukuje pojawienie się uprzywilejowanych energetycznie konformerów.⁵⁵ C. Altona i wsp rozwinęli badania konformacji asymetrycznie podstawionych układów pięcioczłonowych wiążąc wartości wszystkich pięciu kątów endocyklicznych w matematyczną zależność z dwoma parametrami: kąta fazowego pseudorotacji oraz maksymalnej amplitudy pofałdowania.⁵⁶ W późniejszej pracy C. Altona i M. Sundaralingam zaproponowali wykorzystanie tej metody po niewielkich modyfikacjach do przedstawienia konformacji części cukrowej nukleozydów za pomocą obu parametrów.⁶ W tej formie postać równań jest następująca:

$$\tan P = \frac{(v_4 + v_1) - (v_3 + v_0)}{2 \times v_2 \times (\sin 36^\circ + \sin 72^\circ)} \quad v_j = v_{\max} \times \cos(P + j \times \varphi)$$

P- kąt fazowy pseudorotacji, v_0 - v_4 endocykliczne kąty torsyjne: $v_0=C4'-O4'-C1'-C2'$, $v_1=O4'-C1'-C2'-C3'$, $v_2=C1'-C2'-C3'-C4'$, $v_3=C2'-C3'-C4'-O4'$, $v_4=C3'-C4'-O4'-C1'$

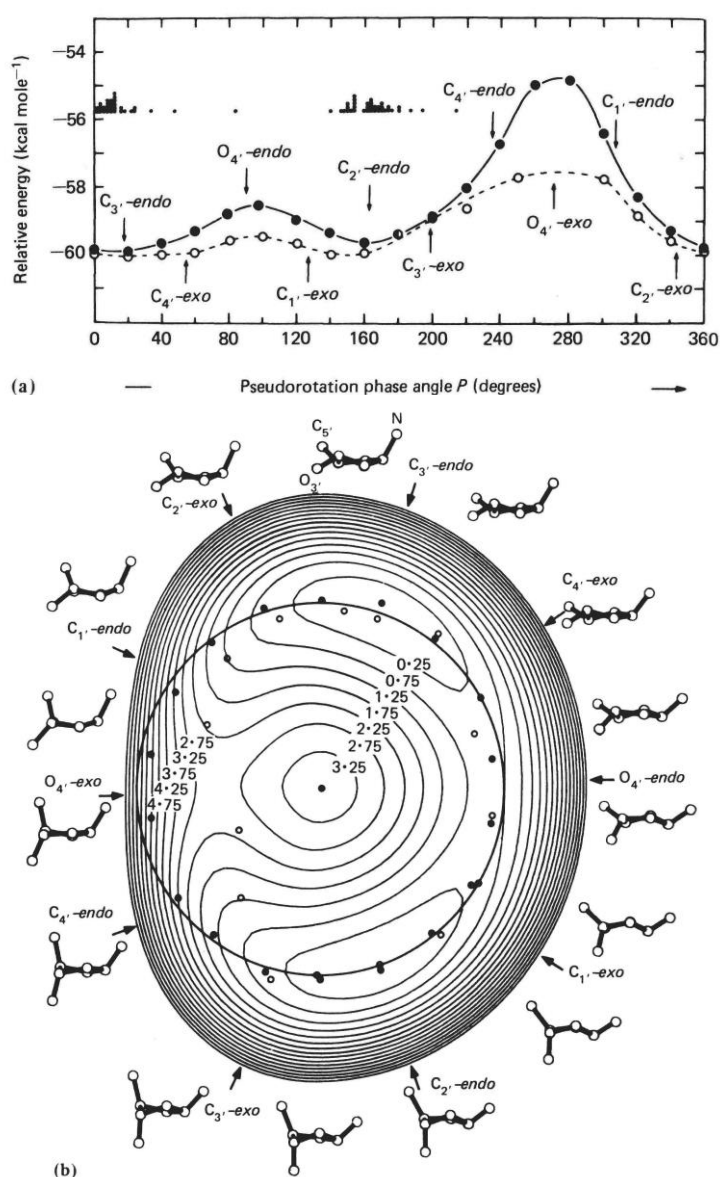
v_{\max} – maksymalna amplituda pofałdowania, $j=0$ do 4, $\varphi=144^\circ$.

Fizyczny sens tych parametrów jest następujący: P-wskazuje które atomy względnie atom pierścienia znajduje się poza płaszczyzną utworzoną przez pozostałe atomy nie uczestniczące w pofałdowaniu; v_{\max} - wyraża stopień pofałdowania, i odpowiada maksymalnej wartości kąta torsyjnego. Zmiany wartości kąta fazowego pseudorotacji a tym samym cykl przejść wszystkich konformerów pierścienia pentofuranozy w nukleozydach można przedstawić w formie graficznej jako koło pseudorotacji. (**Rysunek 1B**) Generalnie na kole pseudorotacji wyróżnić można 36 struktur granicznych („czystych” konformerów) z czego 18 reprezentuje pofałdowanie typu T (P jest wielokrotnością 36° i przyjmuje wartości 0° , 36° , 72° , ..., 324°), drugie 18 struktur reprezentuje pofałdowanie typu E (P przyjmuje wartości 18° , 54° , 90° , ..., 342°). Należy dodać, iż w literaturze znacznie częściej odnotowuje się struktury krystaliczne nukleozydów i ich pochodnych, w których pofałdowanie części cukrowej jest pośrednie pomiędzy konformerami granicznymi. Wówczas obserwuje się nierównomierne odchylenie atomów biorących udział w pofałdowaniu od płaszczyzny tworzonej przez pozostałe trzy atomy. Większe odchylenie od płaszczyzny określane jest jako główne pofałdowanie (*major puckering*), natomiast mniejsze odchylenie jako mniejsze pofałdowanie (*minor puckering*). W dalszej części studiów literaturowych dla uproszczenia analizowania zebranego materiału zaliczałem pofałdowanie części cukrowej omawianego nukleozydu do jednej z struktur granicznych, w zależności do której z nich podana wartość kąta fazowego pseudorotacji dla danego nukleozydu była zbliżona.

H. P. M. De Leeuw, C. A. G. Hasnoot oraz C. Altona przeanalizowali dane krystalograficzne 178 rybo- oraz deoksyrybonukleozydów i ich pochodnych ujawniając nierównomierną dystrybucję obliczonego dla wszystkich struktur wartości kąta fazowego na

kole pseudorotacji.⁷ Autorzy w swej pracy wyróżnili dwa główne obszary występowania konformerów części cukrowej w zakresie wartości kąta P od -1° do 34° (*North*) i od 137° do 194° (*South*), jakkolwiek obserwowane były również struktury posiadające konformery nie leżące w w/w zakresach kąta fazowego pseudorotacji. Preferencje konformacyjne części cukrowej nukleozydów można powiązać z dwoma faktami: niższą barierą rotacji wokół wiązania C-O w porównaniu z wiązaniem C-C⁵⁷ oraz mniejszą podatnością na zmiany endocyklicznego kąta C-O-C w porównaniu z kątem C-C-C.⁵⁸ W rezultacie endocykliczny kąt ν_0 lub ν_4 przyjmuje wartość około 0° powodując określony rodzaj pofałdowania odpowiednio $C3'$ -endo/egzo lub $C2'$ -endo/egzo. Generalnie, pofałdowanie $C3'$ -endo oraz $C2'$ -endo w przybliżeniu znajdują się w centrum powyższych zakresów wartości P .

Powyższe dane wskazują na możliwość istnienia dwóch przejść pomiędzy konformerami regionu North i South *via* region East lub West. Zmiany energii pierścienia rybozy i deoksyrybozy w zależności od rodzaju pofałdowania były przedmiotem licznych prac teoretycznych z wykorzystaniem różnych metod obliczeniowych.⁵⁸⁻⁶¹ Wyniki tych prac jednoznacznie pokazały, iż z pośród wszystkich możliwych pofałdowań, konformery $C3'$ -endo oraz $C2'$ -endo są najbardziej energetycznie uprzywilejowane oraz wysokość bariery energetycznej przy przejściu z $C3'$ -endo do $C2'$ -endo przez $O4'$ -endo (*East*) jest zdecydowanie niższa aniżeli przez $O4'$ -egzo (*West*). (Rysunek 5a, 5b) Należy dodać iż uzyskiwane wartości energii były znacząco różne w zależności od zastosowanej metody obliczeniowej. W pracy⁶¹ wysokość bariery energetycznej w regionie *East* i *West* wynoszą odpowiednio 1.8 i 5.8 kcal/mol dla 2'-deoksyrybozy oraz 3.8 i 7.5 kcal/mol dla rybozy.



Rysunek 5. Zmiany energii całkowitej w zależności od P ⁵⁸ obliczeniowej. W pracy⁶¹ wysokość bariery energetycznej w regionie *East* i *West* wynoszą odpowiednio 1.8 i 5.8 kcal/mol dla 2'-deoksyrybozy oraz 3.8 i 7.5 kcal/mol dla rybozy.

Wyniki eksperymentów NMR ujawniły istnienie szybkiej równowagi termodynamicznej pomiędzy konformerami C3'-endo (N) a C2'-endo (S) w roztworze. Położenie tej równowagi można w przybliżeniu określić na podstawie stosunku stałych sprzężeń $^3J_{1'2'}$ i $^3J_{3'4'}$ stosując następujące równanie: $K_{eq} \sim ^3J_{1'2'}/^3J_{3'4'}$.⁵¹ Wysokość bariery energetycznej interkonwersji pomiędzy obu konformerami w roztworze określono na drodze eksperymentów ^{13}C NMR; dla rybonukleozydów purynowych wynosiła 4.7 ± 0.5 kcal/mol.⁶²

Rezultaty licznych prac nad konformacją części cukrowej za pomocą pomiarów NMR ujawniły istnienie wpływu elektroujemności podstawnika w pozycji C2' lub C3' na położenie równowagi termodynamicznej C3'-endo (N) \leftrightarrow C2'-endo (S) spowodowane większą tendencją do przyjmowania orientacji pseudoaksjalnej przez bardziej elektroujemny podstawnik.⁶³⁻⁶⁵ Szczegółowe badania nad C2' podstawionymi pochodnymi adenozyiny⁶⁶ i urydyny⁶⁷ jednoznacznie potwierdziły zależność populacji konformeru C3'-endo (N) od elektroujemności podstawnika w położeniu C2'. Powyższe zależności konformacyjne zostały w późniejszych pracach powiązane z efektem *gauche*.^{60,65} Generalnie efekt ten kieruje kąt torsyjny X-C-C-Y (gdzie X, Y to elektroujemne podstawniki) w stronę orientacji + lub - *gauche* (odpowiednio + lub - synklinalna) jednocześnie unikając przyjęcia orientacji antyperiplanarnej.⁶⁵ Jakkolwiek pomiary spektroskopowe NMR w ND_3 pochodnych adenozyiny posiadających grupę NH_2 w miejsce grupy 2'-OH lub 3'-OH ujawniły istnienie odwrotnego efektu.⁶⁸ Wytlumaczenie tej odmiennej preferencji można powiązać z znaczącym udziałem rozpuszczalnika (ND_3) w determinowaniu konformacji lub istnieniem dodatkowych oddziaływań w obrębie samej cząsteczki. Obecność wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego $\text{N}2'\text{-H}\cdots\text{O}3'$ w strukturze krystalicznej α -D-2'-amino-2'-deoksyadenozyiny (W. Saenger podaje że β , jednak publikacja dotyczyła α) pozwoliła przyjąć drugie wytłumaczenie za bardziej prawdopodobne.⁶⁹

Pofałdowanie części cukrowej jest również determinowane przez modyfikacje części zasadowej.⁷⁰ Zależność ta jest szczególnie widoczna w sytuacji wymuszonej orientacji *syn* przez objętościowy podstawnik w pozycji C6 pirymidyn lub C8 puryn, co w większości przypadków koreluje z przyjęciem konformacji C2'-endo. Zastąpienie zasady grupą CH_3O - lub atomem H na anomerycznym atomie C1' pierścienia furanozy wymusza przyjęcie pofałdowania typu C3'-endo.⁷¹ Dodatkowych informacji dotyczących preferencji konformacyjnych pierścienia części cukrowej nukleozydów może dostarczyć porównanie geometrii pierścienia furanozy z jej macierzystą strukturą – tetrahydrofuranem (THF). Sumy uśrednionych kątów endocyklicznych tetrahydrofuranu⁷² oraz rybozy i 2'-deoksyrybozy obliczone na podstawie struktur krystalicznych konformerów C2' i C3'-endo,⁷³ są zbliżone.

(Tabela 1a) Natomiast długości wiązań C-C pierścienia części cukrowej są znacznie krótsze od analogicznych wiązań w THF ⁷², co jest spowodowane obecnością dodatkowych wiązań C-O w pozycji C2' i C3' oraz wiązaniem C-N na C1'. (Tabela 1b)⁷³ Podobną tendencję skracania wiązań C-C zaobserwowano w α -glukozie.⁷⁴

We wszystkich strukturach krystalicznych nukleozydów wiązanie C1'-O4' jest około 0.03 Å krótsze od C4'-O4' co tłumaczy się sprzężeniem wolnych par elektronowych atomu O4' z układem elektronów zasady. (Tabela 1c)⁷³ Na uwagę zasługuje fakt niewielkich zmian długości wiązań pierścienia rybozy i 2'-deoksyrybozy w zależności od rodzaju przyjmowanego pofałdowania (Tabela 1b i 1c).

Tabela 1a. Sumy uśrednionych kątów endocyklicznych dla THF, rybozy (R) i deoksyrybozy (dR) ⁷³

	THF	C2'-endo		C3'-endo	
		R	dR	R	dR
Suma kątów	524.9°	524.7°	525.2°	525°	527.3°

Tabela 1b. Długości wiązań C-C w THF, R i dR ⁷³

		C1'-C2'	C2'-C3'	C3'-C4'
C2'-endo	R	1.526Å	1.528Å	1.526Å
	dR	1.517Å	1.523Å	1.521Å
C3'-endo	R	1.530Å	1.525Å	1.519Å
	dR	1.526Å	1.527Å	1.526Å
THF		1.537Å	1.537Å	1.537Å

Tabela 1c. Długości wiązań C4'-O4' i O4'-C1' w R i dR ⁷³

		C4'-O4'	O4'-C1'
C2'-endo	R	1.453Å	1.415Å
	dR	1.447Å	1.420Å
C3'-endo	R	1.449Å	1.409Å
	dR	1.452Å	1.414Å

Dane krystalograficzne nukleozydów, w których ryboza przyjmuje konformację C2'-endo lub C3'-endo ujawniły istnienie zależności pomiędzy typem pofałdowania części cukrowej a długością wiązań C-O w pozycji C2' i C3' oraz wartościami kątów egzocyklicznych C-C-O. Wiązanie C2'-O2' jest krótsze w konformacji C2'-endo niż w C3'-endo natomiast dla wiązania C3'-O3' stwierdzono tendencję odwrotną. (Tabela 1d)⁷³ Dla C2'-endo wartości kątów C3'-C2'-O2' i C1'-C2'-O2' są większe niż C2'-C3'-O3' i C4'-C3'-O3', odwrotna sytuacja występuje w pofałdowaniu C3'-endo. Zależności te sugerują zwiększenie udziału hybrydyzacji sp^2 na atomie węgla będącego poza płaszczyzną tworzonej przez pozostałe atomy węgla.⁷⁵

Tabela 1d. Długości wiązania C-O oraz kąty egzocykliczne wokół atomów C2' i C3' ⁷³

	C2'-O2'	C3'-O3'	C1'-C2'-O2'	C3'-C2'-O2'	C2'-C3'-O3'	C4'-C3'-O3'
C2'-endo	1.409Å	1.424Å	112.7°	114.3°	110.0°	109.4°
C3'-endo	1.419Å	1.414Å	107.7°	110.4°	114.1°	112.5°

2.1.3. Orientacja zasady względem części cukrowej

Układ heterocykliczny zasady purynowej i pirymidynowej może przyjmować względem części cukrowej wskutek obrotu wokół wiązania glikozydowego dwie główne orientacje: *syn* i *anti*.⁷⁶ Umowny przedział występowania obu konformerów jest określany w odniesieniu do kąta torsyjnego χ tworzonego przez atomy O4'-C1'-N9-C4 dla nukleozydów purynowych oraz O4'-C1'-N1-C2 dla nukleozydów pirymidynowych. Według tej konwencji, w konformacji *syn* sześcioczłonowy fragment puryny oraz egzocykliczny atom tlenu O² pirymidyn znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie wiązania C1'-O4' lub nad pierścieniem D-rybozy lub 2'-deoksy-D-rybozy, czyli zajmuje orientację synklinalną (+ lub -) oraz synperiplanarną (zakresie kąta χ : 270°, 0°, 90°, **Rysunek 1A**). W konformacji *anti* część cukrowa oraz układ sześcioczłonowy puryn lub egzocykliczny atom O² pirymidyny zajmują względem siebie orientację antyklinalną lub antyperiplanarną (zakres kąta χ : 90°, 180°, 270°), jakkolwiek spotykane są struktury krystaliczne zarówno naturalnych jak i modyfikowanych nukleozydów w których wiązanie C1'-C2' części cukrowej zajmuje orientację synperiplanarną w odniesieniu do wiązania N1-C6 pirymidyny lub N8-C8 puryny. W takim przypadku przyjęto określać taką orientację jako *high anti* dla której kąt torsyjny χ przyjmuje wartość nieco większą niż 270°⁷⁷ i według notacji Klyne-Preloga odpowiada to orientacji -sc. Analogicznie, przyjęto określenie *high syn* w którym kąt torsyjny χ wynosi nieco powyżej 90° (+ac).

Analiza danych krystalograficznych nukleozydów ujawniła istnienie zależności między pofałdowaniem cukru a orientacją wokół wiązania glikozydowego χ . W nukleozydach purynowych posiadających konformację C2'-endo obserwuje się w przybliżeniu równomierny rozkład występowania orientacji *syn* i *anti*, natomiast dla konformeru C3'-endo -wyraźne zwiększenie udziału struktur krystalicznych o orientacji *anti*.⁷ W rybonukleozydach pirymidynowych dla których obserwowano orientację *syn* konformery C2'-endo i C3'-endo występują równomiernie. Z kolei dla orientacji *anti* pofałdowanie C3'-endo obecne jest w większości analizowanych struktur krystalicznych. Deoksyrybonukleozydy pirymidynowe przyjmujące orientację *anti* wykazują wyraźną preferencję do konformacji C2'-endo.⁷⁸

W 4-tiourydynie zaobserwowano stabilizację orientacji *syn* za pośrednictwem wiązań wodorowych wytworzonych przez cząsteczkę wody obecnej w strukturze kryształu wyhodowanego w środowisku wodnym.⁷⁹ Zmiana rozpuszczalnika na kwas masłowy prowadziła do otrzymania struktury kryształu z zachowaną orientacją *anti*.⁸⁰ Pofałdowanie części cukrowej w obu strukturach nieznacznie się różni: C3'-*endo*-C4'-*egzo* ³T₄ dla orientacji *syn* natomiast C3'-*endo*, ³E dla orientacji *anti*.^{7,79} Interesującym faktem jest obserwacja, iż 4-tiourydyna w roztworze wodnym wykazuje preferencje do orientacji *anti*.⁸¹ Przykład ten obrazuje trudność w ustaleniu ogólnych tendencji przyjmowania określonych konformacji w zależności od typu modyfikacji cząsteczki nukleozydu.

W rybonukleozydach pirymidynowych o orientacji *anti* zaobserwowano zjawisko subtelnego „dostrajania” kąta fazowego pseudorotacji P z przedziałem wartości kąta χ co przedstawia poniższa zależność:⁸²

$$-180^\circ \leq \chi \leq -138^\circ \text{ dla C3'-endo}$$

$$-144^\circ \leq \chi \leq -115^\circ \text{ dla C2'-endo}$$

Efekt ten prawdopodobnie można przypisać sterycznemu odpychaniu między aksjalnie zorientowanym atomem H3' a H6 w C3'-*endo* co powoduje zwiększenie wartości kąta glikozydowego χ . Natomiast w konformacji C2'-*endo* wiązanie C3'-H3' zajmuje pozycję pseudoekwatorialną co minimalizuje oddziaływanie pomiędzy atomami H3'-H6 umożliwiając obrót wiązania glikozydowego w kierunku niższych wartości kąta χ .⁸³ Dla nukleozydów purynowych nie zaobserwowano tego typu zależności z powodu odmiennej geometrii części zasadowej.

Kolejną relacją zaobserwowaną w obrębie struktury nukleozydów pirymidynowych jest zależność długości wiązania glikozydowego C1'-N1 od kąta wiązania glikozydowego χ .^{84,85} Stwierdzono prawie liniowy spadek długości wiązania glikozydowego z maksimum wynoszącego 1.52Å dla kąta χ w przybliżeniu równemu 180° do 1.48 Å gdy kąt χ osiąga wartość około -140°. Obserwacja ta pokazuje, iż atomy H2' i H3' nie są jedyną barierą hamującą rotację.⁸⁶ Atom O4' również wywiera wpływ na obrót wokół wiązania glikozydowego, wydłużenie C1'-N odzwierciedla steryczne oddziaływanie między O4' i atomem H6 zasady pirymidynowej. Średnia długość wiązania C1'-N1 wynosi 1.49Å. W przypadku nukleozydów purynowych długość wiązania glikozydowego jest mniej zmienna, wynosząca średnio 1.46Å.

Wyniki licznych badań uzyskanych za pomocą spektroskopii NMR i CD wskazują na istnienie w roztworach równowagi termodynamicznej *syn*↔*anti*.⁸⁷⁻⁹² Badania relaksacji ultradźwiękowej (ultrasonic relaxation studies) nukleozydów purynowych wskazują na czas

relaksacji rzędu 10^{-9} s co prawdopodobnie wiąże się z rotacją wokół wiązania glikozydowego.^{93,94} Temperaturowa zależność procesu relaksacji pozwoliła uzyskać termodynamiczne parametry opisujące równowagę *syn*↔*anti*. W przypadku nukleozydów pirymidynowych nie rejestrowano żadnej absorpcji w zakresie częstotliwości od 10 do 250MHz, co można przypisać większemu zahamowaniu rotacji wiązania glikozydowego nukleozydów pirymidynowych w porównaniu z nukleozydami purynowymi. Ponadto dane NMR również potwierdzają wzajemną zależność typu nukleozydu, pofałdowania cukru oraz orientacji wokół wiązania glikozydowego. Nukleozydy purynowe wykazują prawie identyczną preferencję do przyjmowania obu orientacji *syn* i *anti*, w przeciwieństwie do nukleozydów pirymidynowych preferujących zdecydowanie orientację *anti*. Generalnie orientacja *anti* wykazuje tendencję do występowania z pofałdowaniem cukru typu C3'-*endo* w rybonukleozydach, natomiast w 2'-deoksyrybonukleozydach zaobserwowano preferencje do przyjmowania pofałdowania typu C2'-*endo*. W nukleozydach purynowych orientacja *syn* występuje razem z konformerem C2'-*endo*, jednak w nukleozydach pirymidynowych o orientacji *syn* wymuszonej przez obecność dodatkowego podstawnika metylowego w pozycji C-6 zaobserwowano występowanie konformera C3'-*endo* w obu typach cukrów.⁹⁵

Wyniki obliczeń kwantowomechanicznych (PCILO) preferencji konformacyjnych nukleozydów purynowych wykazują zbieżność z danymi eksperymentalnymi tj. korelację orientacji *syn* z pofałdowaniem typu C2'-*endo* podczas gdy C3'-*endo* jest energetycznie mniej uprzywilejowane o 1-2 kcal/mol; równomierny rozkład populacji obu konformerów C2'-*endo* i C3'-*endo* dla orientacji *anti*.⁹⁶ Natomiast dla nukleozydów pirymidynowych o orientacji *syn* oba typy pofałdowań są energetycznie równoważne, a w orientacji *anti* C3'-*endo* jest energetycznie bardziej uprzywilejowany od C2'-*endo*. Ponadto wyniki powyższych obliczeń sugerują dla nukleozydów purynowych zakres dozwolonych wartości kąta χ w granicach od 180° do -60° tzn. od *anti* (*ap*) do *high-anti* (*-sc*).⁹⁷ W przypadku nukleozydów pirymidynowych zakres wartości kąta χ jest bardziej ograniczony do regionu *ap* (180°). Różnice w preferencjach wartości kąta χ w obu typach nukleozydów można powiązać z różnicami siły oddziaływania sterycznego między protonami części cukrowej (H2', H3') a H6 pirymidyn i H8 puryn gdy kąt χ przyjmuje wartość około -120° .⁹⁷ Potwierdzeniem tego przypuszczenia jest konformacja 6-azaurydyny przyjmującej niedozwoloną dla naturalnych nukleozydów pirymidynowych orientację *high-anti* (*-sc*). Podobne wyniki uzyskano dla modyfikowanych nukleozydów 8-azapurynowych.⁹⁸

2.1.4. Orientacja wokół wiązania C4'-C5'

Rotacja wokół egzocyklicznego wiązania C4'-C5' pozwala na przyjęcie przez wiązanie 5'C-O trzech głównych orientacji względem wiązania C4'-C3' określanych jako *+sc* (*gauche-gauche*), *ap* (*gauche-trans*) i *-sc* (*trans-gauche*, **Rysunek 1C**). Występowanie rotamerów *+sc*, *ap* i *-sc* w strukturach krystalicznych nukleozydów nie jest równomierne i zależy od konformacji części cukrowej i rodzaju zasady.⁷ Generalnie autorzy ci stwierdzili w przybliżeniu równomierny rozkład rotamerów *+sc* i *ap* w nukleozydach purynowych zarówno dla pofałdowania typu C2'-*endo* jak i C3'-*endo*, oraz rzadkie występowanie rotameru *-sc* w pofałdowaniu typu C2'-*endo*. Natomiast w nukleozydach pirymidynowych autorzy nie zaobserwowali tak wyraźnej zależności jak w nukleozydach purynowych. Najczęściej preferowanym rotamerem był *+sc* bez względu na typ pofałdowania cukru. W niektórych strukturach stwierdzili obecność rotamerów *-sc* i *ap* występujących w pofałdowaniu typu C2'-*endo*.

Określenie orientacji wokół wiązania C4'-C5' w roztworach nukleozydów za pomocą spektroskopii NMR jest ograniczone do podania udziału rotameru *+sc* oraz mieszaniny rotamerów *-sc* i *ap* ze względu na niemożność rozróżnienia tych dwóch ostatnich.⁹⁹ Niemniej jednak wyniki badań potwierdziły istnienie korelacji pomiędzy typem pofałdowania cukru a orientacją wokół wiązania C4'-C5'. Dane te wskazują że dla pofałdowania typu C3'-*endo* preferowany jest głównie rotamer *+sc* natomiast dla C2'-*endo*- mieszanina *-sc* i *ap*.¹⁰⁰

Wyniki prac teoretycznych są częściowo zbieżne z danymi eksperymentalnymi w zależności od zastosowanych metod obliczeniowych. Na drodze obliczeń klasycznej energii potencjalnej oraz „hard-sphere” wykazano prawie równomierny rozkład występowania trzech rotamerów wokół wiązania C4'-C5'.¹⁰¹ Bardziej zbliżone do danych eksperymentalnych wyniki przedstawiono w pracy¹⁰² wykorzystując metody obliczeniowe oparte na mechanice kwantowej (PCILO). Autorzy wyliczyli, że rotamer *+sc* jest bardziej preferowany o 1-2 kcal/mol od pozostałych oraz że istnieje korelacja pomiędzy preferowanym rotamerem γ a pofałdowaniem cukru i typem zasady o niższej energii rzędu 0.5-1 kcal/mol. W przedstawionym obrazie mapy energii nukleozydy pirymidynowe preferują rotamer *+sc* bardziej z pofałdowaniem C3'-*endo* aniżeli C2'-*endo*, natomiast nukleozydy purynowe preferują go w mniejszym stopniu niezależnie od typu pofałdowania.

Dokładna analiza struktur uzyskanych na podstawie danych krystalograficznych ujawniła iż atom C8/C6 puryny/pirymidyny jest odległy od atomu O5' o najczęściej występujący dystans 3.1-3.3Å, natomiast suma promieni van der Waalsa atomów O i H oraz długości wiązania C-H wynosi 3.68Å dla odległości C...O.¹⁰³ Różnica pomiędzy tymi odległościami

sugeruje istnienie dodatkowego oddziaływania pomiędzy zasadą a resztą cukrową. Istotnym czynnikiem stabilizującym rotamer *+sc* w nukleozydach posiadających zasadę w orientacji *anti* jest wiązanie wodorowe pomiędzy atomem H6/8 puryn/pirymidyn a O5'.^{104,105} Powyższe obserwacje znajdują potwierdzenie w eksperymentach NMR wymiany z deuterem na mono- i oligonukleotydach purynowych, w których zauważono częściową kwasowość protonu H8 i interakcję z fosfoestrowym tlenem O5'.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ W przypadku pirymidyn zaobserwowano częściowy charakter kwasowy zarówno protonów H6 jak i H5.¹⁰⁹ Obliczenia kwantowomechaniczne (CNDO/2) energii oddziaływań C-H...O5' dla urydyny, tymidyny i 5-fluorourydyny ujawniły stabilizację rotameru *+sc* i orientacji *anti* w zakresie 1.84-2.27 kcal/mol.¹¹⁰ Natomiast dla adenozyiny wartość energii stabilizacji wynosiła tylko 1.11 kcal/mol co potwierdza mniejszą preferencję rotameru *+sc* w nukleozydach purynowych w porównaniu z pirymidynowymi.

W następnych rozdziałach przeanalizuję właściwości strukturalne naturalnych i modyfikowanych nukleozydów w ciele stałym, stosując powszechnie stosowane parametry konformacyjne: P, ν_{\max} , χ oraz γ . Dane konformacyjne wszystkich związków zostały zebrane w **Tabelach 2-7**. Sposób prezentacji własności konformacyjnych jest częściowo wzorowany na pracach ^{6,7}. Podziału związków na poszczególne grupy dokonałem samodzielnie, w oparciu o ustalone przeze mnie kryteria strukturalne. Wartości P i ν_{\max} w zdecydowanej większości były podawane w publikacjach przez autorów. W niektórych strukturach wartości parametrów obliczałem na podstawie podanych kątów torsyjnych lub korzystałem z prac ^{6,7}. Dla kąta χ przyjąłem następującą jego definicję: O4'-C1'-N9-C8 dla puryn, O4'-C1'-N1-C6 dla pirymidyn, z kolei jako obowiązujący zakres wartości kąta χ przyjąłem od 0° do 359°. W części prac autorzy podawali wartości kąta χ definiowanych jako: O4'-C1'-N9-C4 dla puryn, O4'-C1'-N1-C2 dla pirymidyn lub wg zakresu -180°, -90°, 0°, 90°, 180°. W takich przypadkach, w celu zachowania przejrzystości tekstu, dokonywałem stosownych obliczeń wartości kąta χ , natomiast w tabelach umieściłem wartości literaturowe. Powyższe odstępstwa zostały oznaczone odpowiednimi odnośnikami, których objaśnienia znajdują się na końcu każdej z tabel. Ze względu na znaczną liczbę związków przedstawionych w pracy, wprowadziłem osobną ich numerację dla części „Studia Literaturowe.” (kursywa i czcionka pogrubiona) i dla części „Badania własne” (czcionka pogrubiona).