

К вопросу о таутомерии оснований нуклеиновых кислот

А. И. Болдескул, Л. Ф. Суходуб

Институт прикладной физики НАН Украины
244030, Сумы, ул. Петропавловская, 58

Полуэмпирическим квантовохимическим методом MNDO/H при полной оптимизации всех структурных параметров исследована протонная таутомерия оснований нуклеиновых кислот. Использование метода MNDO/H в подобных исследованиях вполне оправдано, так как полученные расчетные данные хорошо согласуются с экспериментальными. Кроме «классических» кето-аминных таутомерных форм оснований, в газовой фазе существует вероятность реализации редких енольных или иминных форм в изолированном состоянии и в составе пары. Например, енольный таутомер гуанина оказался на 7,2 ккал/моль предпочтительнее кето-аминной формы, а O(4) енольный таутомер тимина на 0,6 ккал/моль менее предпочтителен, чем дикетоформа. Из анализа протон-акцепторной способности азотистых оснований авторы сделали вывод о том, что для молекул азотистых оснований преобладает термодинамический контроль протонирования нуклеофильных центров, каковыми являются атомы O(2) цитозина, O(4) тимина, N(1), N(3) аденина, N(7) гуанина.

Введение. Возможность реализации редких (иминных и енольных) таутомерных форм азотистых оснований в составе «неправильных» пар, а также их участие в процессах мутагенеза обсуждаются довольно долго [1—4]. Однако вследствие недостаточной чувствительности инструментальных методов не удается определить количество редких таутомерных форм ниже предела 10—3 % [5]. Вместе с тем имеются данные, подтверждающие возможность существования редких таутомеров в газовой фазе [6—8]. Остается открытым вопрос о роли таутомерии азотистых оснований в процессах мутагенеза [9]. Интересным также представляется исследование предпочтительности того или иного протон-акцепторного центра и влияния протонирования на стабилизацию/дестабилизацию ассоциатов оснований нуклеиновых кислот в газовой фазе, что вполне оправдано, поскольку в соответствии с моделью ферментативного катализа Дьюара и Сторча [10] при образовании фермент-субстратного комплекса молекулы растворителя вытесняются из области активного центра, и взаимодействия осуществляются как бы без воздействия среды.

Методы. Изучение нейтральных азотистых ос-

нований, их таутомерных форм и протонирования проводили с использованием пакета квантовохимических программ AMPAC (AM1) [11, 12], который включает модифицированный полуэмпирический метод MNDO/H, позволяющий производить расчеты систем с водородными связями.

Для выяснения вопроса о предпочтительности той или иной таутомерной формы оснований или центра протонирования использовали относительные значения теплот образования в сравнении с каноническими таутомерами азотистых оснований (ΔH , ккал/моль). Причем для получения объективных данных сравнение проводили в рядах молекул с одинаковым количеством атомов одного типа. Все расчеты выполнены с полной оптимизацией геометрии, что позволило получить значения длин связей и углов, достаточно хорошо согласующиеся с экспериментальными данными. Метод MNDO разработан Дьюаром и Тилем специально для изучения органических молекул [13] и является развитием приближения NDDO. Преимущество метода MNDO перед неэмпирическими методами (*ab initio*) заключается в том, что он требует машинного времени на несколько порядков меньше. Это позволяет проводить расчеты достаточно сложных систем.

Результаты и обсуждение. При отборе таутомерных форм азотистых оснований необходимым условием является наличие атомов водорода в положениях N(1) для пиримидинов и N(9) для пуринов. Ниже мы остановимся на изолированных основаниях, так как, согласно расчету нуклеозидов, добавление остатка рибозы (дезоксирибозы) практически не приводит к перераспределению электронной плотности, а изменения валентных углов и длин связей настолько незначительны, что для целей данной работы их можно не рассматривать. Анализ геометрии молекул показал непланарность экзациклической аминогруппы цитозина, аденина и гуанина, геометрия которой играет большую роль в образовании межмолекулярных водородных мостиков [14, 15]. Подробный анализ ее конфигурации приведен в литературе [16—19]. Ниже в таблице представлены геометрические параметры некоторых молекул изолированных азотистых оснований, рассчитанные методом MNDO/H, а также по данным других авторов [18, 20, 21].

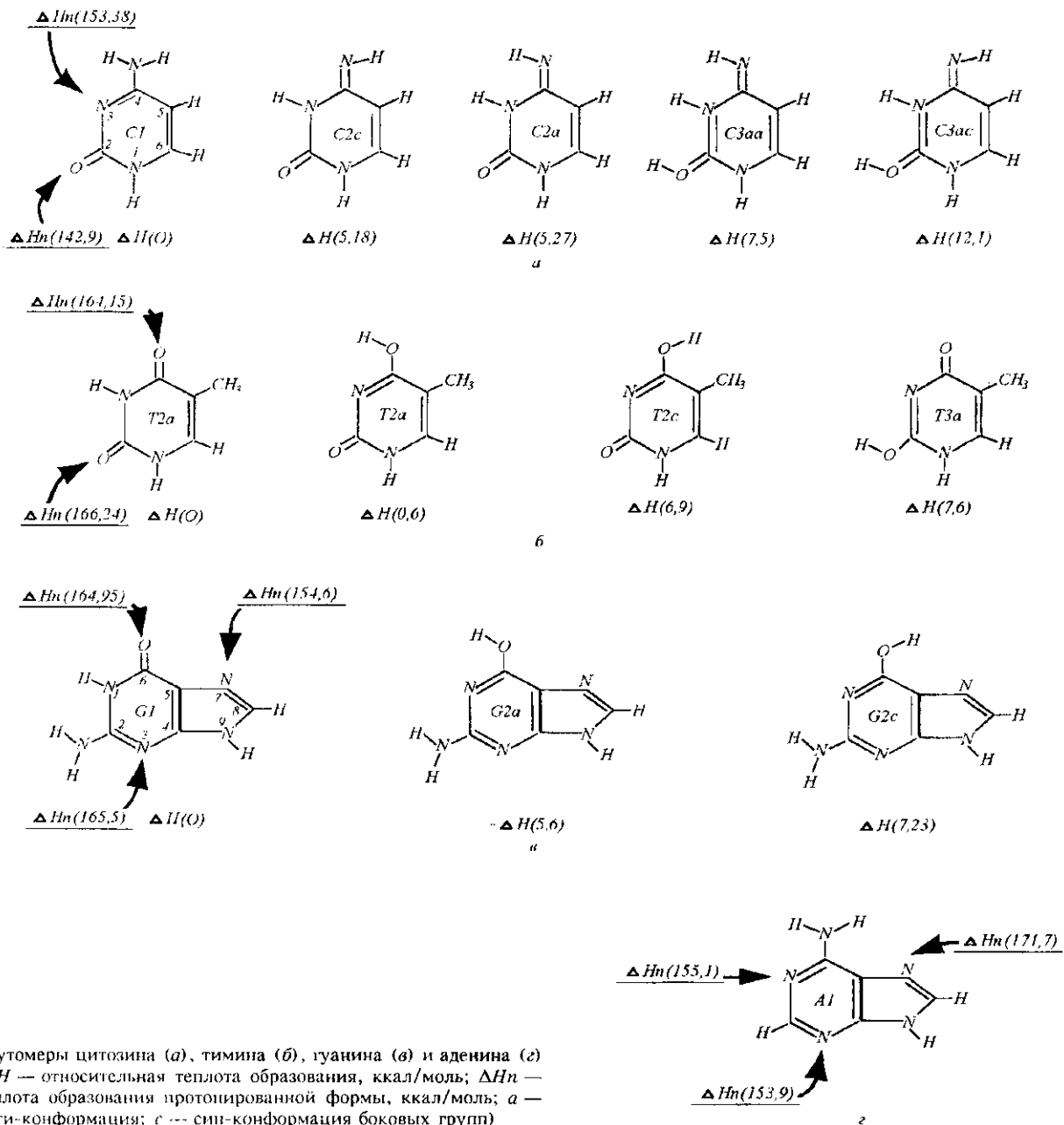
Как видно из таблицы, метод MNDO/H достаточно хорошо воспроизводит молекулярное строение рассматриваемых соединений в сравнении с экспериментальными данными.

Таутомерия азотистых оснований. Основания нуклеиновых кислот обнаруживают прототропную таутомерию при участии подвижных протонов у атомов азота и кислорода [5, 8, 22].

Начнем рассмотрение с пиримидиновых оснований. Согласно расчетам нейтральной молекулы цитозина и его таутомеров, кроме «обычной» кето-аминной формы можно выделить следующие за ней по энергии таутомерные формы: кето-иминную и энол-иминную (и их поворотные конформеры) (рисунков, а). Остальные таутомеры не представляют интереса в рамках данного исследования, поскольку они либо не отвечают условию, приведенному выше, либо энергетически невыгодны. Среди таутомеров цитозина, представленных на рисунке (а), кето-аминная форма (структура С1) является энергетически предпочтительной, что согласуется с

Значения длин связей (r) и валентных углов (ω)

Связь	$r, \text{Å}$			$\omega, \text{град}$			
	MNDO/H	<i>Ab initio</i>	Эксперимент	Угол	MNDO/H	<i>Ab initio</i>	Эксперимент
<i>Тимин [18, 20, 21]</i>							
N1-C2	1,41	1,39	1,38	H1-N1-C2	118,2	114,9	118,2
C2-O2	1,23	1,23	1,21	C2-N1-C6	123,6	124,1	120,6
C2-N3	1,4	1,39	1,38	N1-C2-N3	114,7	112,2	115,4
N3-C4	1,42	1,4	1,38	O2-C2-N3	123,6	124,2	121,3
C4-O4	1,23	1,23	1,24	C2-N3-C4	125,4	128,6	126,3
C4-C5	1,48	1,46	1,43	N3-C4-C5	115,4	114,4	116,1
C5-C6	1,36	1,35	1,34	C4-C5-C6	119,4	118,4	118,3
C6-N1	1,39	1,38	1,38	C4-C5-C5'	118,9	—	119,3
<i>Цитозин [18, 21]</i>							
N1-H1	1,002	1,009	0,88	H1-N1-C2	119,36	—	120,0
N1-C2	1,44	1,42	1,37	C2-N1-C6	122,5	124,0	122,7
C2-O2	1,224	1,226	1,23	O2-C2-N3	124,0	—	222,2
C2-N3	1,4	1,38	1,36	C4-N4-H4'	115,2	114,4	123,0
N3-C4	1,33	1,32	1,337	C4-N4-H4''	114,0	118,4	124,0
C4-N4	1,4	1,37	1,33	C4-C5-C6	117,8	116,0	117,3
N4-H4'	1,005	1,008	0,87	N1-C2-N3	117,3	115,9	118,1
N4-H4''	1,003	1,006	0,86	C5-C6-N1	119,3	119,6	120,1
C5-C6	1,37	1,36	1,34	—	—	—	—



Таутомеры цитозина (а), тимина (б), гуанина (в) и аденина (г) (ΔH — относительная теплота образования, ккал/моль; ΔH_n — теплота образования протонированной формы, ккал/моль; а — анти-конформация; с — син-конформация боковых групп)

данными других авторов [23]. Несмотря на то, что в литературе нет сообщений об обнаружении других таутомерных форм цитозина в кристалле или растворе, редкие таутомерные формы все же удаётся наблюдать методом ИК спектроскопии в низкотемпературной матрице инертного газа [29] или в вакууме [24]. Следовательно, полностью исключить возможность их реализации как в изолированном состоянии, так и в составе неправильной пары нельзя. Вероятность участия таутомеров цитозина в мутагенезе обсуждалась в литературе в рамках различных модельных схем [2, 7, 25, 26]. Расчеты других пиримидиновых оснований тимина (Т) и урацила (У) показывают, что введение метильной группы в положение С(5) урацила приводит лишь к незначительному локальному изменению электронной плотности на атомах С(5), С(6), вызванному, очевидно, гиперконъюгационным влиянием CH_3 -группы. Изменения длин связей и значений валентных углов практически не происходит. Сравнение рядов стабильности урацила, тимина и их таутомерных форм показало их симбатность, значения ΔH также совпадают:

тимин	$T(\text{дикето}) \approx T(\text{O4-енол}) > T(\text{O2-енол})$
ΔH , ккал/моль	0 0,6 7,67
урацил	$U(\text{дикето}) \approx U(\text{O4-енол}) > U(\text{O2-енол})$
ΔH , ккал/моль	0 0,7 7,92

По этой причине в дальнейшем остановимся лишь на обсуждении молекулы тимина. Из расчета следует, что, кроме энергетически наиболее предпочтительной дикетоформы, имеется вероятность существования тимина в газовой фазе в енольной форме как по атому О(2), так и по О(4) (рисунок, б, структуры Т2 и Т3). Причем О(4) енольный таутомер (структура Т2а) отличается от классической дикетоформы всего на ($\Delta H = 0,6$ ккал/моль). Столь незначительная разница, возможно, связана с тем, что метод MNDO обнаруживает тенденцию к переоценке стабильности енольных таутомеров [27]. В случае пуринового основания гуанина его amino-енольный таутомер и поворотный конформер (рисунок, б, структуры G2a и G2c) соответственно оказались на 7,2 и 5,6 ккал/моль более выгодными, чем кето-аминная форма. Этот факт можно связать с появлением у енольного таутомера циклической сопряженной π -электронной системы и дополнительной его стабилизацией. Эти данные хорошо согласуются с ИК-исследованиями в низкотемпературной газовой матрице, где для гуанина было обнаружено кето-енольное таутомерное равновесие [5, 28]. В случае молекулы аденина иминный таутомер (рисунок, г) оказался на $\Delta H = 15$ ккал/моль менее выгодным, чем классическая

аминоформа, из чего можно сделать вывод о предпочтительности последней в газовой фазе. Это хорошо согласуется с данными ИК-исследования, когда в матрице аргона иминоформа аденина не наблюдалась [6].

Протонирование азотистых оснований. Сравнительные расчеты протонирования различных нуклеофильных центров азотистых оснований позволяют оценить относительное изменение их сродства к протону. Из распределения электронной плотности молекулы цитозина следует, что на атоме N(3) имеется больший отрицательный заряд ($-0,36$), чем на атоме O(2) ($-0,33$). Можно было ожидать, что атом N(3) должен быть более предпочтительным центром для протонирования, однако это не так ввиду незначительной разницы в зарядах. Анализ молекулярных орбиталей показал, что неподеленная пара атома O(2) вносит гораздо больший вклад в высшие заполненные s -орбитали, чем неподеленная пара атома N(3). Следовательно, именно атом кислорода будет протонироваться в первую очередь. Действительно, расчет показывает, что протонирование по атому O(2) на 10,5 ккал/моль энергетически более выгодно. Заряд на атомах O(2), O(4) дикетоформы тимина составляет $-0,36$ и $-0,33$ соответственно. Однако, как и в случае с цитозином, атом O(4) вносит больший вклад в высшую заполненную орбиталь и поэтому также является преимущественным центром протонирования. Согласно расчету, разность теплот образования протонированных форм составляет 2 ккал/моль. В молекуле аденина имеются три вероятных отрицательно заряженных центра протонирования N(1) ($-0,36$), N(3) ($-0,29$) и N(7) ($-0,19$). Анализ MO показал, что неподеленные электронные пары атомов N(1) и N(3) имеют приблизительно одинаковый вклад в высшие заполненные молекулярные орбитали s -типа, однако протонирование атома азота в положении N(3) оказалось на 1 ккал/моль более предпочтительным, чем в положении N(1). В случае гуанина неподеленная электронная пара атома O(6) вносит больший вклад в высшую заполненную орбиталь s -типа. Заряды на атомах O(6), N(3) и N(7) составляют $-0,31$, $-0,32$ и $-0,15$ соответственно. При этом протонирование молекулы гуанина по атому N(7) оказалось на 2,5 ккал/моль более предпочтительным. Не исключено, что дополнительный выигрыш энергии происходит за счет изменения конфигурации реакционного центра, однако этот вопрос выходит за рамки данного исследования.

Таким образом, можно заключить, что для оснований нуклеиновых кислот осуществляется

термодинамический контроль в механизме протонирования различных активных центров.

Заключение. Анализ результатов квантовохимических расчетов позволяет сделать следующие выводы: 1) метод MNDO/H достаточно хорошо воспроизводит геометрические параметры таких гетероциклических соединений, как азотистые основания; 2) кроме обычных кето-аминных таутомерных форм оснований существует вероятность реализации минорных енольных или иминных таутомеров в газовой фазе, хотя для молекулы тимина такая возможность, по-видимому, преувеличена; 3) для молекул азотистых оснований преобладает термодинамический контроль протонирования нуклеофильных центров, каковыми являются атомы O(2) цитозина, O(4) тимина, N(1), N(3) аденина, N(7) гуанина. В результате протонирования изменяются геометрические параметры молекул оснований, меняется ряд параметров, например, геометрия молекулы. Происходит перераспределение электронной плотности, усиливаются или ослабевают [30] водородные связи между основаниями, что, вероятно, может играть важную роль в процессах функционирования нуклеиновых кислот.

О. І. Болдескул, Л. Ф. Суходуб

До питання про таутомерію основ нуклеїнових кислот

Резюме

Прототропну таутомерію основ нуклеїнових кислот досліджено напівемпіричним квантовохімічним методом MNDO/H при повній оптимізації усіх структурних параметрів. Використання методу MNDO/H у таких дослідженнях є доцільним, оскільки отримані розрахункові дані добре узгоджуються з експериментальними. Поряд з «класичними» кето-амініними таутомерними формами основ у газовій фазі існує вірогідність реалізації рідких енольних або імінних таутомерних форм як у ізолюваному стані, так і у складі пари. Наприклад, енольний таутомер гуаніну виявився на 7,2 ккал/моль вигіднішим, ніж кето-амінна форма, а O(4) енольний таутомер тиміну на 0,6 ккал/моль поступається дикетоформі. Грунтуючись на результатах аналізу протонно-акцепторної здатності азотистих основ, автори дійшли висновку, що для останніх переважає термодинамічний контроль протонування нуклеофільних центрів, якими є атоми O(2) цитозину, O(4) тиміну, N(1), N(3) аденіну та N(7) гуаніну.

А. І. Болдескул, Л. Ф. Суходуб

To the question of tautomerism of nucleic acid bases

Summary

The tautomerism of nucleic acids bases was investigated by semi-empirical method MNDO/H with optimization of all structural parameters. Utilization of MNDO method in similar investigations is fully justified, since the obtained calculated data are in good agreement with the experimental ones. Besides «classical» keto-amine tautomeric forms of the bases, there is the possibility of realization of isolated and paired liquid enole or imine forms in gaseous phase. Enole tautomer of guanine, for example, appeared

7.2 kcal/mol more preferable that keto-amine form, and O(4) enole tautomer of thymine is 0.6 kcal/mol more preferable than diketoform. The conclusion was drawn on the bases of proton-acceptor ability of nitrous bases that for the molecules of nitrous bases there is the preference of thermodynamic control over the protonation of nucleophilic centres represented by O(2) cytosine, O(4) thymine, N(1), N(3) adenine and N(7) guanine

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Данилов В. И., Квенцель Г. Ф. Электронные представления в теории точечных мутаций.—Киев: Наук. думка, 1971.—83 с.
2. Topal M. D., Fresco I. R. Complementary base pairing and the origin of substitution mutations // Nature.—1976.—263, N 23.—P. 285.
3. Brown T., Hunter W. N., Leonard G. A. Mismatches in DNA duplexes // Chem. Brit.—1993.—29, N 6.—P. 484—488.
4. Florian J., Hroudá V., Hobza P. Proton transfer in the adenine-thymine base pair // J. Amer. Chem. Soc.—1994.—116.—P. 1457—1460.
5. Sheina G. G., Radchenko E. D., Stepanian S. G. et al. Prototropic tautomerism of nucleic acid purine bases // Stud. biophys.—1986.—114, N 1—3.—P. 123—131.
6. Родченко Е. Д., Плохотиченко А. М., Шевца А. Г., Благой Ю. П. ИК и электронно-колебательные спектры аденина и его производных в матрице аргона // Биофизика.—1984.—29, № 4.—С. 553—559.
7. Czerminski R., Szczepaniak K. Intermolecular interactions and tautomerism of NA bases and their analogues // J. Mol. Struct.—1990.—237.—P. 151—163. 8.
8. Пивоваров В. Б., Рева И. Д. Изучение иминоформы 1-метил аденина в криоматрице аргона и в растворах методом ИК-спектроскопии // Биофизика.—1995.—40, № 6.—С. 1178—1186.
9. Гребнева Е. А. Роль водородных связей в процессах образования генных мутаций // Хим. физика.—1993.—12, № 7.—С. 1027—1031.
10. Dewar M. J. S. // Enzyme.—1986.—36, N 11.—P. 8—20.
11. Dewar M., Zoebisch E. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model // J. Amer. Chem. Soc.—1985.—107.—P. 3902—3909.
12. Кларк Т. Компьютерная химия.—М.: Мир, 1990.—383 с.
13. Dewar M., Thiel W. Ground states of molecules. 38. The MNDO method. Approximations and parameters // J. Amer. Chem. Soc.—1977.—99.—P. 4899—4907.
14. Говорун Д. М., Міщук Я. Р., Кондратюк І. В., Желтовський М. В. Про непланарність водневоз'язаних комплементарних пар основ ДНК // Тез. І Укр.-польск. симпоз. по водородній зв'язі.—Одеса, 1992.—С. 26
15. Говорун Д. М., Міщук Я. Р., Кондратюк І. В., Желтовський М. В. Динамічна стереоізомерія Уотсон-Кріківських пар нуклеотидних основ // Доп. НАН України, 1995.—№ 11.—С. 121—123.
16. Говорун Д. Н., Данчук В. Д., Кондратюк І. В. и др. Изучение структурно-динамических особенностей нуклеотидных оснований и их некоторых метилпроизводных методом AM1 // Тез. Докл. VII конф. по спектроскопии биополимеров.—Харьков, 1991.—С. 63.
17. Говорун Д. М., Данчук В. Д., Кондратюк І. В. та ін. Дзеркально-симетричні конформаційні стани канонічних нуклеотидних основ // Доп. НАН України.—1992.—№ 2.—С. 66—69.
18. Spomer J., Hobza P. Nonplanar geometries of DNA bases. Ab initio second-order meller-plasset study // Phys. Chem.—1994.—98.—P. 3161—3164.

19. *Говорун Д. М., Кондратиук І. В.* Нееквівалентність амініх атомів водню в канонічних нуклеїнових основах // *Доп. НАН України.*—1995.—№ 8.—С. 130—132.
20. *Hoogsteen K.* The crystal and molecular structure of a hydrogen bonded complex between 1-methyl thymine and 9-methyl adenine // *Acta crystallogr.*—1963.—16, N 9.—P. 907—916.
21. *Barker D. L., Marsh R. E.* The crystal structure of cytosine // *Ibid.*—1964.—17, N 1581.
22. *Сухоруков Б. И., Гуковская И. С., Сухоручкина Л. В., Лавренова Г. И.* Оптические свойства и молекулярное строение нуклеиновых кислот и их компонентов. V. Спектрофотометрическое определение термодинамических параметров протеолитических реакций цитозина и его N- и O-производных // *Биофизика.*—1972.—17, № 1.—С. 5—11.
23. *Войтюк А. А., Близнюк А. А.* Влияние протонирования оснований нуклеиновых кислот на энергию образования Уотсон-Кртковских пар // *Молекуляр. биология.*—1988.—22, № 4.—С. 1080—1086.
24. *Суходуб Л. Ф., Аксенов С. А., Болдескул А. И.* Масс-спектрометрическое и квантовохимическое исследование димерных ассоциатов нуклеозидов // *Биофизика.*—1995.—40, № 3.—С. 506—512.
25. *Кругляк А. Ю., Данилов В. И., Шрамко О. В. и др.* Схемы спаривания оснований НК // *Там же.*—1965.—10, № 3.—С. 399—403.
26. *Шрамко О. В., Данилов В. И., Кругляк Ю. А.* Пилэлектронная структура редких пар оснований ДНК и механизм спонтанных мутаций, связанных с таутомерией оснований // *Там же.*— № 4.—С. 561—566.
27. *Mirck J., Sygula A.* MNDO study of the tautomers of nucleic bases // *J. Mol. Struct. THEOCHEM.*—1987.—86.—P. 275—292.
28. *Sheina G. G., Stepanian S. G., Radchenko E. D., Blagoi Yu. P.* IR spectra of guanine and hypoxanthine isolated molecules // *J. Mol. Struct.*—1987.—158.—P. 275—292.
29. *Радченко Е. Д., Плехотниченко А. М., Шеина Г. Г., Благой Ю. П.* ИК-спектры дигозина и его производных в аргонной матрице при низкой температуре // *Биофизика.*—1983.—28, № 4.—С. 559—563.
30. *Sukhodub L. F., Aksenov S. A., Boldeskul A. I.* Mass spectrometric and quantumchemical investigation of dimeric nucleoside associates // *Biophysic.*—1995.—40, N 3.—P. 487—493.

УДК 577.3

Поступила в редакцию 10.10.96