

Д. М. Говорун, І. В. Кондратюк, М. В. Желтовський

ПРО ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ МЕХАНІЗМ ВОДНЕВО-ТРИТІЄВОГО ОБМІНУ ГРУПИ С8Н8 НУКЛЕОТИДНИХ ОСНОВ ПУРИНОВОГО РЯДУ З ВОДОЮ *

Напівемпіричним квантовохімічним методом АМ1 в режимі оптимізації всіх структурних параметрів з нормою градієнта $< 0,01$ встановлено, що механізм воднево-тритієвого ($H \rightarrow T$) обміну групи С8Н8 нуклеотидних основ пуринового ряду та групи С2Н2 імідазолу (Іт) з водою зводиться до механізму молекулярно-цвітеріонної таутомерії цих сполук за участю карбопротона Н8 (Н2 у випадку Іт). Цей висновок зроблено на тій підставі, що у вільному стані для кожної нуклеотидної основи пуринового ряду та Іт основним таутомером-цвітеріоном з-поміж сімейства таутомерів-цвітеріонів, які формуються шляхом міграції карбопротонів Н8 і Н2 на атоми — акцептори протона, є такий, що утворюється в результаті переходу карбопротона Н8 (Н2 у випадку Іт) на сусідній в імідазольному кільці атом азоту, з'єднаний з атомом С8 (С2 в Іт) подвійним валентним зв'язком. По суті ця ілідна форма є перехідним станом реакції $H \rightarrow T$ -обміну групи С8Н8 нуклеотидних основ пуринового ряду — аденіну (Аде), гуаніну (Гуа), ксантину (Хан), гіпоксантину (Нур) і пурину (Пур) та групи С2Н2 імідазолу з водою. Молекулярно-кінетичний механізм її формування у водному середовищі при сприятливих значеннях рН — естафетне протонування (атома N 7) основ пуринового ряду і атома N 3 імідазолу) — депротонування (атома Н8 пуринів і атома Н2 імідазолу). На прикладі Аде показано, що навіть на низькомолекулярному рівні процес $H \rightarrow T$ -обміну є конформаційно чутливим. При цьому наголошується, що швидкість $H \rightarrow T$ -обміну по групі С8Н8 Аде і Гуа визначається власне не конформацією нуклеїнової кислоти, а збуренням цієї конформації, яке детермінує енергію активації обміну, при переході Гуа і (або) Аде з основної молекулярної форми в ілідну. З позицій молекулярно-цвітеріонної таутомерії нуклеотидних основ пуринового ряду та Іт за участю карбопротона Н8 (Н2 в Іт) зроблено спробу пояснити фізико-хімічний механізм ініційованої теплом реакції утворення 8-оксипуринів з відповідних пуринів та 2-оксимидазолу з Іт у воді: реакція уявляється як взаємодія позитивно зарядженого атома С8 (С2 в Іт) ілідної форми з негативно зарядженим атомом кисню гідроксилу, що супроводжується відщепленням зайвого атома водню.

Вступ. Незважаючи на те, що явище воднево-тритієвого ($H \rightarrow T$)-обміну групи С8Н8 нуклеотидних основ пуринового ряду з водою тривалий час успішно використовується в молекулярній біології як один з ефективних експериментальних методів конформаційного аналізу нуклеїнових кислот, зокрема ДНК та нуклеопротейдних комплексів (див., наприклад, [1—4] і цитовану там літературу), уявлення про його глибинну фізико-хімічну природу залишаються, на наш погляд, досить схематичними. Ця праця ставить за мету заповнити існуючу прогалину і дослідити в деталях фізико-хімічний механізм $H \rightarrow T$ -обміну групи С8Н8 широкого сімейства пуринів та групи С2Н2 імідазолу (Іт) з водою при сприятливих рН із залученням сучасних напівемпіричних квантовохімічних методів [5] та уявлень про молекулярно-цвітеріонну таутомерію нуклеотидних основ з участю карбопротонів. Під таким кутом зору кількісній закономірності $H \rightarrow T$ -обміну азотистих основ з водою раніше не аналізувалися — перші кроки в цьому напрямку зроблено нами в роботах [6, 7].

Матеріали і методи. Техніка розрахунків із застосуванням напівемпіричного квантовохімічного методу АМ1 в режимі оптимізації всіх структурних параметрів з нормою градієнта $< 0,01$ детально викладена в попередніх наших роботах [6, 7]. При цьому методологія дослід-

* Роботу виконано при фінансовій підтримці Державного комітету України з питань науки і технологій.

ження зводилася до комп'ютерного синтезу в рамках методу AM1 для кожної основи повного сімейства таутомерів-цвітеріонів, яке формується за участю рухливих (кислих) карбопротонів (H8 у випадку Gua і Xap, H2 у випадку Im та H2 і H8 у випадку Ade, Hур і Pur) з метою встановлення енергетично найвигіднішої цвітеріонної структури для кожної сполуки та розрахунку основних її фізико-хімічних характеристик.

Результати і обговорення. Встановлено, що у вільному стані для кожної нуклеотидної основи пуринового ряду та Im основним (енергетично найвигіднішим) таутомером-цвітеріоном з-поміж сімейства таутомерів-цвітеріонів, які формуються шляхом міграції кислих карбопротонів H8 і H2 на атоми — акцептори протона, є таутомер-цвітеріон, що утворюється внаслідок переходу карбопротона H8 (H2 у випадку Im) на сусідній в імідазольному кільці атом азоту, з'єднаний з атомом C8 (C2 у випадку Im) подвійним валентним зв'язком, — так звана ілідна форма [1—3]. При цьому ілідні форми Ade і Gua є суттєво непланарними (симетрія C_1) стереохімічно нежорсткими структурами. Ілідні форми Xap, Hур, Pur та Im мають планарну (симетрія C_s) будову.

По суті ілідна форма є перехідним станом реакції $H \rightarrow T$ -обміну групи $C8H8$ нуклеотидних основ пуринового ряду (Ade, Gua, Xap, Hур і Pur) та групи $C2H2$ Im з водою [1—4]. Молекулярно-кінетичний механізм її формування у водному середовищі при сприятливих рН — естафетне протонування (атома N7 основ пуринового ряду і атома N3 імідазолу) — депротонування (атома H8 пуринів і атома H2 імідазолу). Характерними її фізико-хімічними ознаками (табл. 1) є позитивний заряд ($\approx 0.06 e$) на атомі вуглецю без атома водню (за винятком Im, у якого атом C2 має невеликий негативний заряд $-0.022 e$), менша порівняно з основною молекулярною формою полярність (для всіх основ, крім Ade, ілідна форма має менший дипольний момент, ніж основна молекулярна форма), більший, ніж в основній молекулярній формі, перший адиабатичний потенціал іонізації (для Xap і Xap_i та Im і Im_i ці величини майже співпадають) та практично однакова відносна енергія (за винятком Xap_i, Ade_i та Im_i, які мають помітно більші, ніж ілідні форми інших основ, відносні енергії). Окрім того, ілідні форми у порівнянні з основними молекулярними формами мають набагато більший негативний заряд на тому атомі азоту імідазольного кільця, до якого приєднується рухливий карбопротон (табл. 2). Характер перерозподілу

Таблиця 1

Фізико-хімічні параметри основних таутомерів-цвітеріонів (ілідних форм) і основних молекулярних таутомерів нуклеотидних основ пуринового ряду та імідазолу у вільному стані, розраховані методом AM1 в режимі оптимізації всіх структурних параметрів з нормою градієнта $< 0,01$

Параметр	Ade	Ade _i	Gua	Gua _i	Xap	Xap _i
Відносна енергія, ккал/моль	0	17,06	0	14,50	0	18,24
Дипольний момент, D	2,18	2,63	5,91	4,95	3,97	2,88
Потенціал іонізації, eВ	8,77	9,19	8,69	8,78	9,34	9,32
Заряд на атомі C8, e	-0,056	0,051	-0,097	0,024	-0,036	0,037

Параметр	Hур	Hур _i	Pur	Pur _i	Im	Im _i
Відносна енергія, ккал/моль	0	14,48	0	14,47	0	16,82
Дипольний момент, D	4,86	3,53	3,24	1,22	3,60	2,42
Потенціал іонізації, eВ	9,04	9,14	9,64	9,75	9,16	9,14
Заряд на атомі C8, e	-0,090	0,027	-0,033	0,062	-0,105*	-0,022*

Примітка. Тут і в табл. 2 назва основи без індексу відповідає основній молекулярній формі, назва з нижнім індексом «i» відповідає ілідній формі. * Заряд на атомі C2.

Т а б л и ц я 2

Заряди на атомах (e) основних тавтомерів-цатеріонів (лідних форм) і основних молекулярних тавтомерів нуклеотидних основ нуклеозидного ряду та імідазолу у великому стани, розраховані методом АМІ в режимі оптимізації всіх структурних параметрів з нормою градієнта $\langle 0,01$

Атом	Ade	Ade _i	Gua	Gua _i	Xan	Xan _i	Hyp	Hyp _i	Pur	Pur _i	Im	Im _i
N1	-0,273	-0,231	-0,350	-0,337	-0,362	-0,363	-0,338	-0,323	-0,185	-0,167	-0,210	-0,248
N3	-0,212	-0,182	-0,249	-0,235	-0,281	-0,299	-0,180	-0,165	-0,159	-0,150	-0,142	-0,248
N6	-0,360	-0,324	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N7	0,066	-0,238	-0,058	-0,200	-0,153	-0,193	-0,063	-0,201	-0,110	-0,243	-	-
N9	-0,228	-0,250	-0,203	-0,235	-0,159	-0,254	-0,191	-0,226	-0,228	-0,250	-	-
C2	0,028	0,004	0,237	0,229	0,407	0,410	0,075	0,064	-0,020	-0,033	-0,105	-0,022
C4	0,066	0,064	0,060	0,073	0,080	0,100	0,016	0,029	0,024	0,036	-0,174	-0,170
C5	-0,245	-0,202	-0,241	-0,253	-0,244	-0,246	-0,213	-0,219	-0,170	-0,144	-0,171	-0,170
C6	0,246	0,164	0,399	0,386	0,400	0,399	0,382	0,368	0,031	-0,019	-	-
C8	-0,056	0,051	-0,097	0,024	-0,036	0,037	-0,090	0,027	-0,033	0,062	-	-
O2	-	-	-	-	-	-0,358	-	-	-	-	-	-
O6	-	-	-0,321	-0,352	-0,341	-0,300	-0,316	-0,347	-	-	0,250	0,253
H1	0,189	0,195	0,249	0,252	0,273	0,275	0,253	0,257	0,194	0,197	0,197	-
H2	-	-	-	-	-	-	0,186	0,190	-	-	-	-
H'2*	-	-	0,205	0,206	-	-	-	-	-	-	-	-
H'2**	-	-	0,226	0,229	-	-	-	-	-	-	-	-
H3	-	-	-	-	0,283	0,274	-	-	-	-	-	0,253
H4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,179	0,175
H5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,176	0,175
H6	-	-	-	-	-	-	-	-	0,180	0,171	-	-
H'6*	0,241	0,216	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H'6**	0,250	0,200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H7	-	0,261	-	0,273	0,279	0,279	-	0,275	-	0,266	-	-
H8	0,202	-	0,205	0,205	0,211	-	0,207	-	0,206	-	-	-
H9	0,269	0,272	0,267	0,268	-	0,265	0,270	0,271	0,272	0,274	-	-

* Н — атом водню аміногрупи, котрий вступає у водневий зв'язок у водневий зв'язок при Уотсон-Краківському спарюванні; ** Н — інший атом водню аміногрупи, який при цьому не бере участі у водневому зв'язку.

зарядів на атомах при переході від основної молекулярної форми до ілідної (табл. 2) вказує на те, що самі основи є гетерополярнішими структурами, ніж їхні ілідні форми. Саме ці відмінності фізико-хімічних характеристик основної молекулярної форми нуклеотидної основи пуринового ряду і імідазолу та їхніх ілідних форм, зумовлюючи різницю в ентальпійних гідратації, призводять до того, що бар'єр реакції $H \rightarrow T$ у воді (21 ± 1 ккал/моль [2, 3]) помітно більший, ніж у вакуумі ($14,5 \div 18,2$ ккал/моль (див. табл. 1)).

Характерно, що процес $H \rightarrow T$ -обміну навіть на низькомолекулярному рівні є конформаційно чутливим, причому цей ефект проявляється найбільше в тому випадку, коли нуклеотидна основа є стереохімічно нежорсткою молекулою [8, 9]. З-поміж досліджених нами основ найбільша залежність відносної енергії ілідної форми (саме ця величина, що ототожнюється з бар'єром реакції $H \rightarrow T$ -обміну, визначає її швидкість) від конформації спостерігається для Ade — молекули, для якої площинна інверсія аміногрупи має надбар'єрний характер [8, 9]. Так, відносна енергія ілідної форми Ade, обчислена в планарному наближенні (планарна конфігурація з симетрією C_s), перевищує аналогічну величину, отриману для оптимальної конфігурації (непланарна конформація з симетрією C_1), на 0,5 ккал/моль. Ця різниця зумовлена, в основному, стеричним фактором, а саме: відштовхуванням двох сусідніх атомів водню — імінного $H7$ і амінного $H''6$, а також деяким порушенням р π -спряження при переході Ade в ілідну форму. В цьому контексті необхідно зробити одне принципово важливе зауваження: швидкість $H \rightarrow T$ -обміну групи $C8H8$ Ade і Gua визначається власне не конформацією нуклеїнової кислоти, зокрема ДНК [3], а збуренням цієї конформації, яке детермінує бар'єр реакції обміну, при переході Ade і (або) Gua з основної молекулярної форми в ілідну, що далі не одне й те ж саме. При цьому втягування атома $H8$ і (або) $N7$ пуринових основ нуклеїнових кислот у водневий зв'язок, наприклад, з лігандами білкової природи, істотно підвищує енергетичний бар'єр утворення ілідної форми, знижуючи тим самим швидкість $H \rightarrow T$ -обміну.

Таким чином, механізм $H \rightarrow T$ -обміну групи $C8H8$ нуклеотидних основ пуринового ряду та групи $C2H2$ Im з водою зводиться до механізму молекулярно-цвітеріонної таутомерії цих сполук з участю карбопротона $H8$ ($H2$ у випадку Im). Схильність останніх до молекулярно-цвітеріонної таутомерії за участю карбопротонів пояснюється їхніми амфотерними властивостями, тобто поєднанням достатньо високої $C1H$ -кислотності [10] (поряд з NH -кислотністю) з яскраво вираженою лужністю [11, 12].

Насамкінець зазначимо, що молекулярно-цвітеріонною таутомерією нуклеотидних основ пуринового ряду та Im за участю карбопротона $H8$ ($H2$ в Im) можна пояснити також, на наш погляд, фізико-хімічний механізм ініційованої теплом реакції утворення 8-оксипуринів — продуктів пошкодження ДНК кисневими радикалами, що мають неабияке біологічне значення (див., наприклад, [13] і цитовану там літературу) — з відповідних пуринів та 2-оксимидазолу з Im у воді. Дійсно, молекулярно-кінетичний перебіг цієї реакції можна уявити як взаємодію позитивно зарядженого атома $C8$ ($C2$ в Im) ілідної форми з негативно зарядженим атомом кисню гідроксилу, що супроводжується відщепленням атома водню від атома $O8$ ($O2$ в Im). Енергія активації цієї реакції (24 ккал/моль для Gua при $37^\circ C$, [14]) близька до енергії активації $H \rightarrow T$ -обміну (21 ± 1 ккал/моль [2—4]).

Крім того, уявлення про молекулярно-цвітеріонну таутомерію пуринових основ за участю карбопротонів можуть виявитися плідними для пояснення елементарних механізмів перебігу інших біохімічних реакцій, зокрема метаболічного розпаду пуринів під дією ксантин-оксидази [15].

Автори вдячні фірмі «Комп'ютер Центр» (Київ) за люб'язне надання комп'ютерів «Texas Systems» для проведення розрахунків.

ABOUT PHYSICAL-CHEMICAL MECHANISM OF HYDROGEN-TRITIUM EXCHANGE OF PURINE NUCLEOTIDE BASES C8H8 GROUPS WITH WATER

Summary

The fact that the mechanism of hydrogen-tritium ($H \rightarrow T$) exchange of C8H8 group of purine nucleotide bases and of C2H2 group of imidazole (Im) with water reduces to the mechanism of molecular-zwitterion tautomerism with H8 (H2 in the case of Im) carboproton participation has been established by means of semiempirical quantum mechanical AM1 method with optimization (gradient norm $< 0,01$) of all structural parameters. This conclusion was made on the ground that in every purine nucleotide base and Im the main tautomer-zwitterion in the row of tautomer-zwitterions formed by H8 and H2 carboproton migration on the proton acceptor atoms is the tautomer-zwitterion formed by H8 (H2 in case of the Im) carboproton transition on the neighboring nitrogen atom of imidazole ring, which is connected with C8 (C2 in the case of Im) by double chemical bond. Actually this ilid form is the transitional state of $H \rightarrow T$ exchange of C8H8 group of purine nucleotide bases (adenine, guanine, xanthine, hypoxanthine, purine) and C2H2 group of Im with water. The relay protonation (of purine N7 atom and of imidazole N3 atom) — deprotonation (of purine H8 atom and of imidazole H2 atom) is the molecular-kinetic mechanism of formation of this transitional state in water under the corresponding pH. For example, in the case of adenine it was showed, that $H \rightarrow T$ exchange process is sensitive to conformation. It was particularly underlined, that the velocity of $H \rightarrow T$ exchange of adenine and guanine C8H8 groups is determined not by nucleic acid conformation, but by indignation of this conformation under adenine and (or) guanine transition from the molecular form to the ilid one. The attempt to elucidate the physical-chemical mechanism of heat induced reaction of 8-oxypurines formation from corresponding purines and 2-oximidazole from Im in water was undertaken from the position of molecular-zwitterion tautomerism of purine nucleotide bases and Im with H8 (H2 in the case of Im) participation: this reaction is a interaction of positive charged C8 atom (C2 in Im) of the ilid form with negative charged hydroxyl oxygen atom and this reaction is accompanied by separation of excess hydrogen atom from O8 atom (O2 in Im).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Boerth D. W., Harding F. X., Jr. Theoretical investigation of acidity and isotope exchange in purine nucleotide cations // J. Amer. Chem. Soc.—1985.—107, N 10.—P. 2952—2969.
2. Маслова Р. Н., Лесник Е. А., Варшавский Я. М. Кинетика и механизм $^1H \rightarrow ^3H$ -обмена в $C_{(8)}H$ -группах производных пурина // Молекуляр. биология.—1975.—9, № 2.—С. 310—320.
3. Агранович И. М. Конформационные особенности ДНК в растворе и в биологических объектах, выявляемые методом медленного $^1H \rightarrow ^3H$ -обмена: Автореф. дис. ... канд. хим. наук.—М.: ИМБ АН СССР, 1985.—21 с.
4. Benevides J. M., Lemeur D., Thomas G. J., Jr. Molecular conformation and 8-CH exchange rates of purine ribo- and deoxyribonucleotides: investigation by Raman spectroscopy // Biopolymers.—1984.—23, N 6.—P. 1011—1024.
5. Clark T. Semiempirical molecular orbital theory: facts, myths and legends // Recent experimental and computational advances in molecular spectroscopy.—Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1993.—P. 369—380.
6. Кондратюк І. В., Говорун Д. М., [Желтовський М. В.]. Прототропна молекулярно-цвітеріонна таутомерія ксантину: розрахунок методом AM1 // Біополімери і клітина.—1994.—10, № 6.—С. 52—60.
7. Говорун Д. М., Кондратюк І. В., [Желтовський М. В.]. Прототропна молекулярно-цвітеріонна таутомерія гіпоксантину: розрахунок методом AM1 у вакуумному наближенні // Там же.—1995.—11, № 1.—С. 30—35.
8. Govorun D. N., Danchuk V. D., Mishchuk Ya. R. et al. AM1 calculation of the nucleic acid bases structure and vibrational spectra // J. Mol. Struct.—1992.—267.—P. 99—103.
9. Говорун Д. М., Данчук В. Д., Міщук Я. Р. та ін. Дзеркально-симетричні конформаційні стани канонічних нуклеотидних основ // Доп. АН України.—1992.—№ 2.—С. 66—69.

Закінчення див. на с. 34

9. Говорун Д. М., Кондратюк І. В., Желтовський М. В. Газофазні кислотнo-лужні властивості молекулярного гіпоксантину // Там же.—1995.—11, № 1.— С. 36—39.
10. Денисов Г. С., Кузина Л. А. Неаддитивні свойства водородних зв'язей в комплексах складного складу // Молекуляр. спектроскопія.—Л.: Изд-во ЛГУ, 1990.— Вып. 8.— С. 127—160.
11. Пюльман Б., Пюльман А. Квантова біохімія.—М.: Мир, 1965.—654 с.
12. Коптева Т. С., Шигорин Д. Н. К вопросу о природе внутримолекулярной водородной связи в молекулах с π -електронами и ее влияние на их колебательные спектры // Журн. физ. химии.—1974.—48, № 3.— С. 532—536.
13. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.—М.: Мир, 1987.—584 с.
14. Ромм И. П., Гурьянова Е. Н. р π -сопряженіе в ароматических соединениях элементов V и VI групп // Успехи химии.—1986.—55, № 2.— С. 225—250.
15. Шорыгин П. П., Буриштейн К. Я. Сопряженіе и периодическая система элементов // Там же.—1991.—60, № 1.— С. 3—44.
16. Верещагин А. Н. Индуктивный эффект.—М.: Наука, 1987.—326 с.
17. Литвиненко Л. М., Дадали В. А. Некоторые физико-химические аспекты взаимосвязи имидазольного и ферментативного катализа // Механизмы орг. реакций и межмолекуляр. взаимодействия.—Киев: Наук. думка, 1979.— С. 3—32.
18. Говорун Д. М., Кондратюк І. В., Желтовський М. В. Кислотнo-лужні властивості піримідину, імідазолу та пурину у вільному стані: розрахунок методом AM1 // Біополімери і клітина.—1995.—11, № 5 (У друці).

Ин-т молекуляр. біології і генетики НАН України, Київ

Одержано 02.02.95

Закінчення. Початок див. на с. 24—28

10. Говорун Д. М., Кондратюк І. В., Желтовський М. В. Нуклеотидні основи як СН-кислоти // Біополімери і клітина.—1995.—11, № 5. (В друці).
11. Говорун Д. М., Кондратюк І. В., Желтовський М. В. Кислотнo-лужні властивості молекулярного ксантину та його комплексотвірна здатність // Там же.—1994.—10, № 6.— С. 61—64.
12. Говорун Д. М., Кондратюк І. В., Желтовський М. В. Газофазні кислотнo-лужні властивості молекулярного гіпоксантину // Там же.—1995.—11, № 1.— С. 36—39.
13. Полтев В. И., Брусков В. И., Шулюпина Н. В. и др. Генотоксическая модификация оснований нуклеиновых кислот и ее биологические последствия. Обзор и перспективы экспериментальных и расчетно-теоретических исследований // Молекуляр. биология.—1993.—27, № 4.— С. 737—757.
14. Брусков В. И., Петров А. И. Кинетика образования 8-окси-2'-дезоксигуанозин-5'-монофосфата под влиянием тепла: определение констант скоростей и энергии активации // Там же.—1992.—26, № 6.— С. 1362—1369.
15. Пюльман Б., Пюльман А. Квантова біохімія.—М.: Мир, 1965.—654 с.

Ин-т молекуляр. біології та генетики НАН України, Київ

Одержано 12.01.95