

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

ПРОТОТРОПНА**МОЛЕКУЛЯРНО-ЦВІТЕРІОННА ТАУТОМЕРІЯ ГІПОКСАНТИНУ:
РОЗРАХУНОК МЕТОДОМ АМ1 У ВАКУУМНОМУ НАБЛИЖЕННІ**

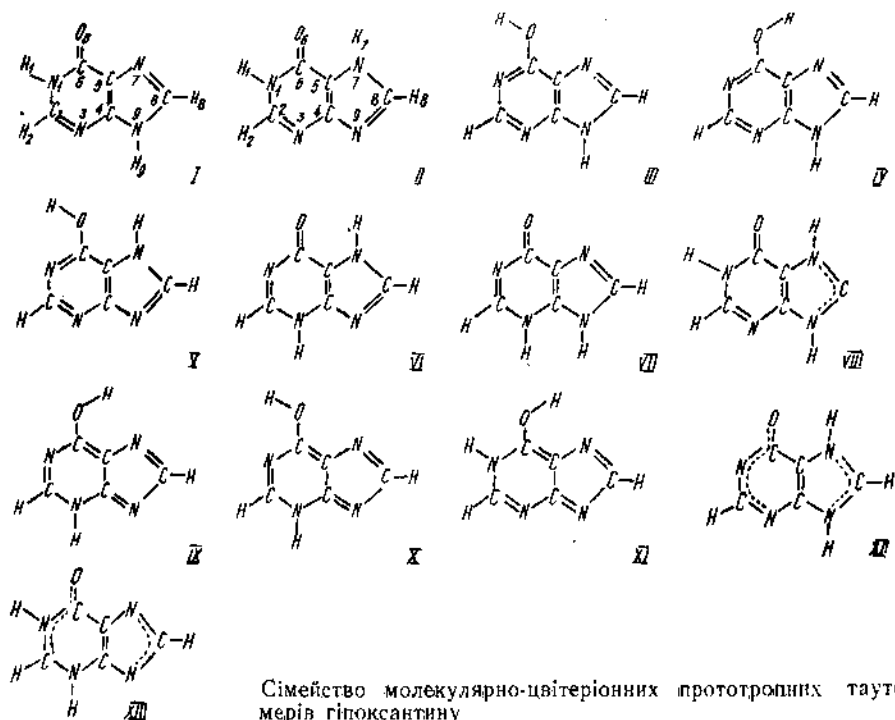
Напівемпіричним квантовохімічним методом АМ1 в режимі оптимізації всіх структурних параметрів досліджено прототропну молекулярно-цвітеріонну таутомерію мінорної нуклеотидної основи — гіпоксантину (Нур) у вільному стані. Встановлено, що сімейство його молекулярно-цвітеріонних таутомерів, займаючи діапазон відносних енергій близько 26 ккал/моль, складається з 12 плоскосиметричних динольно-стійких структурних ізомерів — 10 молекулярних і 2 цвітеріонних. За результатами розрахунків, при кімнатній температурі у газовій фазі співіснують два найбільш енергетично вигідні молекулярні кетонні таутомери Нур N9H і N7H, причому більш полярна форма N9H є основною (82 %); за цих же умов концентрація енольних таутомерів не перевищує 0,2 %. Це кількісно підтверджує висновки щодо характеру таутомерної рівноваги Нур у вакуумі, зроблені на основі дослідження його 14 коливальних спектрів в умовах криосенсильним механізмом сольватації ще більше зсуває таутомерну рівновагу в бік високополярного таутомера N9H (98,6 %); концентрація всіх інших таутомерів, за винятком таутомера N7H (1,4 %), за цих же умов надто низька, щоб брати її до уваги. Встановлено, що основна ілідна форма Нур, що характеризується локалізацією імінопротонів при атомах N1, N7, N9 без атома водню при атомі C8, є перехідним станом воднево-дейтеро-тритієвого обміну групи C8H у вільному стані. Близькість розрахованої величини енергетичного бар'єра цієї реакції до експериментальної підтверджує, на думку авторів, ілідний механізм воднево-дейтеро-тритієвого обміну групи C8H Нур з водою при кислих і нейтральних рН. В рамках отриманих результатів обговорюються причини «заміни» гуаніну на Нур в антикодонових триплетах тРНК.

Вступ. До складу антикодонових триплетів багатьох транспортних РНК замість канонічної нуклеотидної основи гуаніну входить мінорна основа гіпоксантин (Нур) [1]. Основну причину такої «заміни» вбачають у тому, що Нур на противагу гуанінові (Gua) при температурах, близьких до фізіологічних, практично не утворює енольних таутомерів, що значно підвищує безпомилковість високоспецифічного кодон-антикодонового впізнавання [2, 3]. Проте саме явище прототропної таутомерії Нур, на відміну від канонічних нуклеотидних основ (див. [4] і наведену там бібліографію), вивчено, на наш погляд, недостатньо. Так, зокрема, в літературі відсутня вичерпна інформація про геометричну і електронну структуру та найбільш важливі фізико-хімічні характеристики всіх його як молекулярних, так і цвітеріонних таутомерів.

Матеріали і методи. Молекулярно-цвітеріонне сімейство таутомерів Нур, джерелом якого є три рухливих (кислі) протони і п'ять атомів — акцепторів протона (один ексциклічний атом кисню та чотири ендциклічні атоми азоту), може налічувати, як показує якісний стереохімічний аналіз у планарному наближенні, до 14 можливих структурних ізомерів — 12 молекулярних та 2 цвітеріонних. Топологічні властивості багатовимірної поверхні адіабатичного потенціалу для кожної з цих 14 можливих таутомерних форм Нур вивчали методом АМ1, який з-поміж сучасних напівемпіричних квантовохімічних методів [5] є найбільш прийнятним для такого кола задач і об'єктів досліджень [6—9]. Розрахунки проводили в широкому просторі стартових геометрій, які формували шляхом різноманітних збурень попередньо зоптимізованих

таутомерних структур, при нормі градієнта, що не перевищувала 0,01, в режимі оптимізації всіх структурних параметрів.

Результати і обговорення. Згідно з результатами розрахунків, таутомерне молекулярно-цвітеріонне сімейство Нур, займаючи діапазон відносних енергій близько 26 ккал/моль, складається з 12 структурних ізомерів — 10 молекулярних (I—VII, IX—XI) і 2 цвітеріонних (XII—XIII) (див. рисунок і табл. 1). Решта інших з числа 14 можливих — це плоскосиметричні перехідні стани обертання гідроксильної групи



навколо ординарного зв'язку С—О в енольних молекулярних таутомерах V і XI, які відповідають сідловим точкам на поверхні адиабатичної потенціальної енергії. Всі без винятку таутомери Нур є плоскосиметричними (симетрія C_s) дипольно-стійкими структурами: відхилення атомів від площинності для них ($< 7,5 \cdot 10^{-4}$ Å) значно менші за амплітуди непланарних теплових коливань.

Енольні молекулярні таутомери IV і X є високоенергетичними ро-тамерами молекулярних таутомерів III і IX відповідно: вони утворюються з низькоенергетичних таутомерів за рахунок повороту гідроксильної групи на кут 180° навколо ординарного зв'язку С—О. При цьому сідловим точкам відповідають пари дзеркально-симетричних перехідних станів з ортогональною орієнтацією гідроксильної групи відносно «площини» пуринового кільця (симетрія C_1) і суттєво непланарною геометрією останнього. Звертає на себе увагу те, що енергетично вигіднішою орієнтацією гідроксильної групи є *цис*-положення, коли вона «затіняє» сусідній подвійний зв'язок С6=N1 або С5=C6 (див. рисунок і табл. 1). Така ж ситуація має місце і для молекулярних таутомерів канонічних нуклеотидних основ [6, 7] і ксантину [9] з поодинокими винятками. Очевидно, в енольних молекулярних таутомерах нуклеотидних основ взаємодія гідроксильної групи з π -електронною системою сусіднього подвійного зв'язку є вирішальною для її *цис*-орієнтації.

Таутомери Нур є квазіжорсткими [10] структурами — на це вказує наявність низькочастотних ($\nu < 150$ см $^{-1}$) фундаментальних коливань в їхніх спектрах. Так, наприклад, частоти найбільш низькоенергетичних непланарних коливань «метеликового» типу (згин пуриново-

го кільця уздовж зв'язку C4=C5) для найбільш енергетично вигідних таутомерів I (N9H) і II (N7H) становлять 134 і 145 см⁻¹ відповідно (тут і нижче наведено немасштабовані значення розрахованих частот). Отже, найвірогіднішою формою анізотропної агрегаційної мінливості [11] Нур є згин пуринового кільця по зв'язку C4=C5.

Отримані результати (див. рисунок і табл. 1—3) свідчать, що протропна таутомерія Нур зумовлена, в основному, таутомерією його

Таблиця 1

Деякі фізико-хімічні характеристики молекулярно-цвітеріонного сімейства таутомерів глікоксантину у вільному стані, включаючи основну ілідну форму VIII*

Таутомер	Теплота утворення, ккал/моль	Дипольний момент, D	Потенціал іонізації, eВ
I	43,10	4,86	9,04
II	44,04	1,72	9,21
III	46,94	2,41	9,40
IV	48,50	4,38	9,53
V	49,31	4,62	9,53
VI	50,15	4,00	9,09
VII	57,06	9,78	8,98
VIII	57,58	3,53	9,14
IX	60,76	3,55	9,28
X	60,87	5,62	9,14
XI	63,44	6,07	9,30
XII	67,74	9,84	8,46
XIII	68,99	9,72	8,45

* Іонна енергія основного молекулярного таутомера I (N9H) з нерухомими ядрами — 2475,09 ккал/моль

імідазольного кільця: при кімнатній температурі у газовій фазі співіснують два енергетично найбільш вигідні кетонні таутомери N9H (I) і N7H (II), причому більш полярна форма N9H є основною (82 %). За цих же умов концентрація основного енольного таутомера III становить лише 0,15 %, а енергетична щільність між таутомерами I (N9H) і II (N7H) з урахуванням нульової коливальної енергії (63,14 і 63,10 ккал/моль для таутомерів I і II відповідно) складає $E_{II} - E_I = 0,89$ ккал/моль. Це кількісно підтверджує висновки щодо характеру таутомерної рівноваги Нур у вакуумі, зроблені на основі експериментального дослідження його ІЧ коливальних спектрів

в умовах криогенної матричної ізоляції [2, 3]. Варто лише зауважити, що для інтерпретації малоінтенсивних коливальних смуг, які спостерігаються при значному накопиченні сигналу за температури випаровування Нур 262 °С і належать енольним таутомерам, слід брати до уваги поряд з основним енольним таутомером III в першу чергу його ротамер IV, а не більш високоенергетичний таутомер V, як це зроблено в [2].

Перехід Нур з газоподібного стану до розчину з універсальним механізмом сольватації («інертний» розчинник) практично повністю зсуває таутомерну рівновагу в бік високополярного таутомера I (98,6 % при кімнатній температурі). Дійсно, енергетична щільність між таутомерами II і I у розчині з $\epsilon \gg 1$ збільшується, як показує оцінка за формулою [12]

$$\Delta E = \left(\frac{\mu_I^2}{a_I^3} - \frac{\mu_{II}^2}{a_{II}^3} \right) \cdot \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1},$$

де ϵ — діелектрична проникність розчинника; a_I, a_{II} — радіуси онзагєрівських сферичних порожнин для таутомерів I і II відповідно ($a_I \approx a_{II} = 4,5$ Å); μ_I, μ_{II} — дипольні моменти таутомерів I і II відповідно (див. табл. 1), порівняно з вакуумом на $\Delta E = 1,63$ ккал/моль і становить 2,53 ккал/моль. Концентрація всіх інших таутомерів, за винятком таутомера II (1,4 %), за цих же умов надто низька, щоб брати її до уваги.

Слід зазначити, що метилювання Нур по положенню глікозидного азоту, як показує розрахунок, не призводить до збільшення вмісту енольних таутомерів як у вакуумі, так і в «інертному» розчиннику. У водному розчині практично єдиним таутомером електрично нейтральних Нур і 9-МсНур є також кетонна форма I [13].

Таким чином, в умовах, близьких до фізіологічних, вмістом енольної форми Нур і 9-МеНур порівняно зі вмістом такої Gua і 9-МеGua [3] можна знехтувати як на півтора порядку меншою величиною. Отже, зроблене раніше припущення [2, 3] про те, що саме ця обставина, сприяючи істотному зменшенню імовірності утворення неправильних пар Нур : Уга і, значить, можливих помилок кодон-антикодонового впізнавання, пояснює «заміну» Gua на Нур в антикодонових триплетах тРНК, є цілком слушним, але, на наш погляд, не зовсім повним. Очевидно, що не менш істотним значенням такої «заміни» за умов, коли кооперативний фактор специфічності кодон-антикодонового впізнавання зведений до мінімуму, є і те, що вона дозволяє усунути інші, не менш важливі чинники можливих помилок кодон-антикодонового впізнавання, зокрема спонтанну реакцію дезамінування Gua, який з-поміж канонічних нуклеотидних основ є найбільш схильним до неї [14], і поліморфізм уотсон-кріківської пари Gua : Cyt [15].

Аналіз електронних характеристик молекулярно-цвітеріонних таутомерів Нур (див. табл. 1, 3) вказує на істотну відмінність їхньої ре-

Таблиця 2

Геометричні характеристики молекулярних таутомерів гіпоксантину I і II, основної ілідної форми VIII та таутомера-цвітеріона XII

Зв'язки та кут					Зв'язки та кут				
	I	II	VIII	XII		I	II	VIII	XII
C2H2	1,112	1,112	1,112	1,113	N9H9	0,986	—	0,987	0,989
N1C2	1,385	1,394	1,388	1,326	N1C2H2	116,2	115,4	116,1	115,9
C2N3	1,323	1,318	1,323	1,387	H2C2N3	116,6	116,9	116,8	113,0
N1H1	0,996	0,995	0,996	—	H1N1C2	119,9	120,1	120,1	—
N1C6	1,423	1,409	1,417	1,409	C2N1C6	122,1	121,5	121,6	119,5
C6O6	1,238	1,244	1,242	1,245	N1C6O6	118,7	120,8	120,0	124,4
C4C5	1,444	1,445	1,429	1,454	N1C6C5	113,3	112,7	113,0	114,4
C5C6	1,456	1,453	1,449	1,472	C6C5N7	130,5	131,3	132,0	133,0
C5N7	1,394	1,389	1,405	1,389	C2N3C4	113,7	115,0	114,2	111,6
N3C4	1,393	1,396	1,391	1,347	C5C4N9	105,8	109,1	106,2	105,5
C4N9	1,393	1,404	1,408	1,417	C5N7C8	104,9	105,9	109,5	108,7
N7C8	1,349	1,397	1,381	1,364	N7C8H8	125,3	122,2	—	125,7
C8H8	1,096	1,097	—	1,097	C5N7H7	—	125,8	123,8	124,6
N7H7	—	0,987	0,988	0,994	C4N9H9	126,4	—	124,6	126,2

Примітка. Довжина валентних зв'язків наведені в ангстремах, величини валентних кутів — в градусах.

Таблиця 3

Заряди на атомах (e) та електронні густини (відн. од.) молекулярних таутомерів гіпоксантину I і II, основної ілідної форми VIII та таутомера-цвітеріона XII

Атом	I		II		VIII		XII	
	Заряд	Густина	Заряд	Густина	Заряд	Густина	Заряд	Густина
N1	-0,338	5,338	-0,326	5,326	-0,323	5,323	-0,273	5,273
C2	0,075	3,925	0,047	3,953	0,064	3,936	0,053	3,947
N3	-0,180	5,180	-0,123	5,123	-0,165	5,165	-0,285	5,285
C4	0,016	3,984	0,007	3,993	0,029	3,971	0,117	3,883
C5	-0,213	4,213	-0,218	4,218	-0,219	4,219	-0,311	4,311
C6	0,382	3,618	0,371	3,629	0,368	3,632	0,338	3,662
O6	-0,316	6,316	-0,357	6,357	-0,347	6,347	-0,355	6,355
N7	-0,063	5,063	-0,165	5,165	-0,201	5,201	-0,045	5,045
C8	-0,090	4,090	-0,052	4,052	0,027	3,973	-0,039	4,039
N9	-0,191	5,191	-0,108	5,108	-0,226	5,226	-0,188	5,188
H1	0,253	0,747	0,255	0,745	0,257	0,743	—	—
H2	0,186	0,814	0,188	0,812	0,190	0,810	0,184	0,816
H7	—	—	0,275	0,725	0,275	0,725	0,294	0,706
H8	0,207	0,793	0,207	0,793	—	—	0,224	0,776
H9	0,270	0,730	—	—	0,271	0,729	0,285	0,715

акційної здатності, зокрема протонодонорних-протоноакцепторних властивостей. При цьому найбільші зміни зарядів на атомах та відповідних електронних густин, а також найвиразніші коливання перших потенціалів іонізації спостерігаються при переході від молекулярної до цвітеріонної форми. Характер цих змін свідчить [5] про більшу реакційну здатність цвітеріонної форми Нур порівняно з молекулярною.

Завершуючи розгляд молекулярно-цвітеріонної прототропної таутомерії Нур, торкнемося, заради повноти картини, ще одного важливого аспекту цього явища, а саме: прототропної ілідної таутомерії. Детальний аналіз цього вельми цікавого як з теоретичної, так і з практичної точки зору питання [16] виходить за межі даної праці: найбільшої уваги заслуговує ілідна форма, що характеризується локалізацією імінопротонів при атомах N1, N7 і N9 без атома водню при атомі C8. З її існуванням пов'язують молекулярно-кінетичний механізм воднево-дейтеро-третієвого обміну групи C8H Нур з водою при кислих і нейтральних значеннях рН (див., наприклад, [16] і цитовану там літературу). Отримані нами результати (див. також табл. 1—3) підтверджують ілідний механізм $H \leftrightarrow D \leftrightarrow T$ -обміну [16]. Дійсно, ілідна форма Нур VIII у вільному стані є основною, тобто енергетично найвірогіднішою з-поміж сімейства ілідних таутомерів. Для неї характерна висока протонна спорідненість атома C8 (232,77 ккал/моль), причому енергетичний бар'єр реакції утворення ілідної форми VIII з молекулярної I у вакуумі за участю вільного протона (14,48 ккал/моль) узгоджується з експериментальною енергією активації воднево-третієвого обміну в групі C8H Нур (21 ± 1 ккал/моль [17]) у водному розчині при кислих і нейтральних величинах рН. Основна ілідна форма VIII є, по суті, перехідним станом реакції $H \leftrightarrow D \leftrightarrow T$ -обміну в групі C8H Нур у газовій фазі.

Насамкінець зазначимо, що, запобігаючи перевантаженості статті числовими масивами, ми навели геометричні та електронні характеристики (див. табл. 2, 3) лише для тих молекулярно-цвітеріонних форм Нур, які мають найбільшу практичну цінність. Повна числова інформація зберігається в комп'ютерному банку даних відділу молекулярної біофізики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Роботу виконано при фінансовій підтримці Держкомітету України з питань науки і технологій.

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

D. M. Govorun, I. V. Kondratyuk, N. V. Zheltovsky

PROTOTROPIC MOLECULAR-ZWITTERION TAUTOMERISM OF HYPOXANTHINE: AM1 CALCULATION IN VACUUM

Summary

The prototropic molecular-zwitterion tautomerism of hypoxanthine (Hyp) was investigated by means of semiempirical quantum mechanical AM1 method with full parameters optimization in vacuum. It was established that molecular-zwitterion family of Xan occupies the energetical range about 26 kcal/mol and it consists of 12 structural isomers — 10 molecular and 2 zwitterion; all they are planar dipole-stable structures. According to calculation, at the room temperature in the gase phase there are two energetically prevalent molecular ketone tautomers of Hyp—N9H and N7H. More polar form N9H is the main (82 %). At the same condition concentration of enol tautomers is less than 0.2 %. These results are quantitative conformation of tautomeric equilibrium of Hyp in vacuum, which was investigate from IR spectra of low temperature matrix isolation (Sheina G. G. et al., 1986). Under transition to solvent with universal solvation mechanism the equilibrium shifts some more to the N9H tautomer (98.6 %); concentrations of all other tautomers except N7H (1.4 %) are very small. It was established, that the main ilid form (which has iminoproton at N1, N7 and N9 atoms and has no C8H proton) is an intermediate state of hydrogen-deutero-tritium exchange of C8H group in vacuum. The cal-

culated value of energetical barrier of this reaction is in a good agreement with the experimental data, and, to our mind, this agree confirms the ilid mechanism of hydrogen-deutero-tritium exchange of C8H group in the water under the acidic and neutral pH. In the frame of results obtained the reasons of «substitution» of guanine to Hyp in anticodon triplets of tRNA are discussed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.— М.: Мир, 1987.— 584 с.
2. Шеина Г. Г., Радченко Е. Д., Степаньян С. Г. и др. Колебательные спектры гипоксантина // Биофизика.— 1986.— 31, № 4.— С. 555—560.
3. 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.
4. Шеина Г. Г. Прототропная таутомерия пуриновых и пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот: Автореф. дис. ... д-ра хим. наук.— Киев: Ин-т биоорг. химии и нефтехимии АН Украины, 1992.— 42 с.
5. Бурштейн К. Я., Шорыгин П. П. Квантово-химические расчеты в органической химии и молекулярной спектроскопии.— М.: Наука, 1989.— 104 с.
6. Norinder U. A theoretical reinvestigation of the nucleic bases adenine, guanine, cytosine, thymine and uracil using AM1 // J. Mol. Struct.— 1987.— 151.— P. 259—269.
7. Sabio M., Topiol S., Lumma W. C., Jr. An investigation of tautomerism in adenine and guanine // J. Phys. Chem.— 1990.— 94, N 4.— P. 1366—1372.
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, N 1.— P. 99—103.
9. Кондратюк І. В., Говорун Д. М., Желтовський М. В. Прототропна таутомерія молекулярного ксантину // Доп. НАН України.— 1995.— (Прийнято до друку).
10. Рамбиди Н. Г. Молекулярная структура с точки зрения экспериментатора — эволюция понятия и возникающие проблемы // Журн. структ. химии.— 1982.— 23, № 6.— С. 113—133.
11. Уразовский С. С. О молекулярной полиморфии (к построению новой теории полиморфизма).— Киев: Изд-во АН УССР, 1950.— 72 с.
12. Самошин В. В., Зефирова Н. С. Конформационные превращения органических молекул в растворах // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева.— 1984.— 29, № 5.— С. 521—530.
13. Морозов Ю. В., Бажулина Н. П. Электронное строение, спектроскопия и реакционная способность молекул: нуклеиновые основания, витамины В6 и их аналоги.— М.: Наука, 1989.— 288 с.
14. Полтев В. И., Брусков В. И., Шумюпина Н. В. и др. Генетоксическая модификация оснований нуклеиновых кислот и ее биологические последствия. Обзор и перспективы экспериментальных и расчетно-теоретических исследований // Молекуляр. биология.— 1993.— 27, № 4.— С. 734—757.
15. Говорун Д. М., Міщук Я. Р., Кондратюк І. В., Желтовський М. В. Про непланарність водневозв'язаних комплементарних пар основ ДНК: Тез. I українсько-польського симпоз. по водородній зв'язі.— Одесса, 1992.— С. 26.
16. Voerth 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.
17. Агранович І. М. Конформаційні особливості ДНК в розчині і в біологічних об'єктах, виявляемі методом повільного $^1\text{H} \rightarrow ^2\text{H}$ обміну: Автореф. дис. ... канд. хім. наук.— М.: Ін-т молекуляр. біології АН СРСР, 1985.— 21 с.

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

Одержано 12.07.94