

Д. М. Говорун, І. В. Кондратюк, М. В. Желтовський**ВПЛИВ ПРОТОНУВАННЯ ТА ДЕПРОТОНУВАННЯ
НА КИСЛОТНО-ЛУЖНІ ВЛАСТИВОСТІ ПУРИНУ,
ПІРИМІДИНУ ТА ІМІДАЗОЛУ ***

Напівемпіричним квантовохімічним методом АМІ в режимі оптимізації всіх структурних параметрів з нормою градієнта $<0,01$ розраховано енергії протонування та депротонування електрично нейтральної, протонованих (катіонних) і депротонуваних (аніонних) форм пурину (Pur), піримідину (Pyr) та імідазолу (Im) у вільному стані, а також заряди на атомах для всіх цих форм. Встановлено, що зміна зарядового стану молекули шляхом протонування чи депротонування радикально змінює її кислотно-лужні властивості. Так, протонування Pur, Pyr та Im, зводячи нанівець їхні лужні властивості, значно підвищує кислотні; відриє будь-якого протона пригнічує практично до нуля кислотні властивості, значно підсилюючи лужні. При цьому найкислішою є іміногрупа, утворена прив'язаним протоном, а найпротофільнішим — той атом, від якого відірвано протон. На основі отриманих результатів зроблено практично важливі висновки: взаємопідсилення двох міжмолекулярних водневих зв'язків має місце в тому і лише в тому випадку, коли основа виступає одночасно донором і акцептором цих зв'язків. В інших випадках відбувається їхнє взаємне ослаблення. В світлі отриманих результатів по взаємодії (кооперативності) міжмолекулярних Н-зв'язків обговорюються квантовохімічні засади самоасоціації Im та Pyr шляхом водневого зв'язування, а також уточнюються деталі фізико-хімічного механізму каталітичної активності серин-гістидинових естераз, зокрема хімотрипсину.

Вступ. Реакційна здатність нуклеотидних основ, зокрема їхня комплексотворна здатність, що лежить в основі високої специфічності нуклеїново-нуклеїнового і білково-нуклеїнового впізнавання [1—5], визначається донорно-акцепторними властивостями. Розрахувавши із залученням сучасних квантовохімічних методів кислотно-лужні властивості ізольованих нуклеотидних основ (експериментальні фізико-хімічні методи дозволяють отримувати аналогічні характеристики лише для найвірогідніших місць протонування чи депротонування (див., наприклад, [6] і наведену там бібліографію)), можна спрогнозувати, використовуючи адитивне наближення, найімовірніші схеми водневого зв'язування як основ з основами, так і з лігандами білкової природи (див. [7—9]). Проте вже для оцінки енергії міжмолекулярних зв'язків в таких комплексах адитивне наближення може виявитися непридатним, оскільки міжмолекулярні Н-зв'язки за участю нуклеотидних основ є суттєво взаємозалежними [10] — втягування одного місця впізнавання в Н-зв'язок з необхідністю збуджує здатність інших місць впізнавання вступати в аналогічні зв'язки через те, що нуклеотидні основи належать до класу сполук із сильним електронним спряженням [11]. Найбільшого ефекту неадитивності (кооперативності) міжмолекулярних Н-зв'язків слід очікувати в тому випадку, коли вони утворюють так звані квазіароматичні цикли [12], що є досить розповсюдженими мотивами в структурній біології [13].

Необхідним етапом у розумінні квантовохімічної природи взаємозалежності Н-зв'язків при комплексоутворенні є вивчення впливу протонування і депротонування на кислотно-лужні властивості нуклеотидних основ.

Ця праця започатковує цикл робіт, присвячених такому вельми цікавому як з практичної, так і з теоретичної точки зору колу питань.

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

© Д. М. ГОВОРУН, І. В. КОНДРАТЮК, М. В. ЖЕЛТОВСЬКИЙ, 1996

Матеріали і методи. Методика квантовомеханічних розрахунків в рамках напівемпіричного квантовохімічного методу AM1 (режим оптимізації всіх структурних параметрів з нормою градієнта $< 0,01$) детально викладена в роботах [8, 9]. Об'єктами дослідження вибрано молекули пурину (Pur), піримідину (Pyr) та імідазолу (Im) з огляду на їхнє важливе біохімічне значення.

Результати і обговорення. Результати розрахунків, а саме: енергії протонування та депротонування електрично нейтральної, протонованих (катіонних) і депротонованих (аніонних) форм пурину, піримідину (катіонних) і депротонованих (аніонних) форм Pur, Pyr та Im у вільному стані, а також заряди на атомах для всіх цих форм подані в табл. 1, 2.

Таблиця 1

Енергії протонування та депротонування (ккал/моль) електрично нейтральної, протонованих (катіонних) і депротонованих (аніонних) форм пурину, піримідину та імідазолу у вільному стані, розраховані методом AM1 в режимі оптимізації всіх структурних параметрів з нормою градієнта $< 0,01$. Верхнім індексом позначено зарядовий стан, нижнім — місце протонування чи депротонування

Зарядова форма	Місце протонування					
	N1	N3	N7	N9	C2	C8
Pur	-214,14	-210,35	-212,54	—	—	—
Pur ⁺ _{N1}	—	-101,39	-119,73	—	—	—
Pur ⁺ _{N3}	-105,18	—	-118,05	—	—	—
Pur ⁺ _{N7}	-121,33	-115,86	—	—	—	—
Pur ⁻ _{H9}	-312,72	-318,71	-327,97	-331,99	—	—
Pur ⁻ _{H8}	-307,19	-307,65	-342,45	—	—	-356,92
Pyr	-208,93	-208,93	—	—	—	—
Pyr ⁺ _{N1}	—	-93,85	—	—	—	—
Pyr ⁺ _{N3}	-93,85	—	—	—	—	—
Pyr ⁻ _{H2}	-343,78	-343,78	—	—	-377,39	—
Im	—	-222,75	—	—	—	—
Im ⁺ _{N3}	—	—	—	—	—	—
Im ⁻ _{H1}	-348,78	-348,78	—	—	—	—
Im ⁻ _{H2}	—	—	—	—	-381,24	—

Зарядова форма	Місце депротонування								
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
Pur	—	371,37	—	—	—	379,60	—	356,92	331,99
Pur ⁺ _{N1}	214,14	246,54	—	—	—	253,11	—	263,87	233,41
Pur ⁺ _{N3}	—	243,19	210,35	—	—	270,06	—	259,62	223,63
Pur ⁺ _{N7}	—	278,24	—	—	—	277,27	212,54	227,01	166,56
Pur ⁻ _{H9}	—	471,71	—	—	—	479,53	—	480,54	—
Pur ⁻ _{H8}	—	465,85	—	—	—	454,60	—	—	—
Pyr	—	377,39	—	382,67	389,91	382,67	—	—	—
Pyr ⁺ _{N1}	208,93	238,54	—	266,45	273,99	248,37	—	—	—
Pyr ⁺ _{N3}	—	238,54	208,93	248,37	273,99	266,45	—	—	—
Pyr ⁻ _{H2}	—	—	—	502,30	507,83	502,30	—	—	—
Im	348,78	381,24	—	403,37	387,98	—	—	—	—
Im ⁺ _{N3}	222,75	—	222,75	—	—	—	—	—	—
Im ⁻ _{H1}	—	525,07	—	529,21	529,21	—	—	—	—
Im ⁻ _{H2}	492,62	—	—	521,64	515,04	—	—	—	—

Іх аналіз свідчить, що протонування Pur, Pур та Іm по будь-якому місцю — акцептору протона істотно пригнічує у порівнянні з електрично нейтральним станом лужні властивості (енергія протонування зменшується за абсолютною величиною більше, ніж на 100 ккал/моль) і значно підсилює кислотні. Катионні форми Pur, Pур та Іm є надзвичайно сильними кислотами з малою енергією депротонування (209÷223 ккал/моль), практично нульовою лужністю (протофільність лежить в діапазоні 94÷121 ккал/моль), причому в усіх без винятку випадках найкислішою є іміногрупа, утворена додатковим протоном (див. табл. 1).

Відрив будь-якого протона від Pur, Pур та Іm значно пригнічує у порівнянні з електрично нейтральним станом кислотні властивості (енергія депротонування збільшується більше, ніж на 200 ккал/моль), істотно підсилюючи при цьому лужність. Аніонні форми Pur, Pур та Іm є надзвичайно сильними лугами з великою протофільністю (313÷349 ккал/моль) і практично нульовою протонодонорною функцією,

Таблиця 2

Заряди на атомах (e) електрично нейтральної, протонованих (катионних) і депротонованих (аніонних) форм пурину, піримідину та імідазолу у вільному стані, розраховані методом АМ1 в режимі оптимізації всіх структурних параметрів з нормою градієнта < 0,01. Верхнім індексом позначено зарядовий стан, нижнім — місце протонування чи депротонування

Атом	Pur	Pur ⁺ _{N1}	Pur ⁺ _{N3}	Pur ⁺ _{N7}	Pur ⁻ _{H9}	Pur ⁻ _{H8}	Pур
N1	-0,185	-0,166	-0,131	-0,114	-0,242	-0,215	-0,167
N3	-0,159	-0,088	-0,150	-0,107	-0,158	-0,202	-0,167
N7	-0,110	-0,064	-0,051	-0,119	-0,240	-0,311	—
N9	-0,228	-0,186	-0,215	-0,146	-0,236	-0,267	—
C2	-0,020	0,068	0,104	0,035	-0,107	-0,114	-0,034
C4	0,024	0,090	0,074	0,063	-0,065	-0,052	-0,039
C5	-0,170	-0,145	-0,124	-0,154	-0,190	-0,087	-0,233
C6	0,031	0,113	0,127	0,049	-0,037	-0,093	-0,039
C8	-0,033	0,031	0,026	0,121	-0,139	-0,158	—
H1	—	0,303	—	—	—	—	—
H2	0,194	0,249	0,249	0,244	0,141	0,145	0,193
H3	—	—	0,296	—	0,141	—	—
H4	—	—	—	—	—	—	0,166
H5	—	—	—	—	—	—	0,155
H6	0,180	0,232	0,240	0,211	0,128	0,138	0,166
H7	—	—	—	0,320	—	—	—
H8	0,206	0,253	0,255	0,268	0,144	—	—
H9	0,272	0,310	0,300	0,328	—	0,217	—

Атом	Pур ⁺ _{N1}	Pур ⁺ _{N3}	Pур ⁻ _{H2}	Іm	Іm ⁺ _{N3}	Іm ⁻ _{H1}	Іm ⁻ _{H2}
N1	-0,141	-0,104	-0,253	-0,210	-0,132	-0,250	-0,256
N3	-0,104	-0,141	-0,253	-0,142	-0,132	-0,250	-0,334
N7	—	—	—	—	—	—	—
N9	—	—	—	—	—	—	—
C2	0,083	0,083	-0,248	-0,105	0,040	-0,267	-0,271
C4	0,068	0,044	-0,078	-0,174	-0,082	-0,285	-0,193
C5	-0,186	-0,186	-0,357	-0,171	-0,082	-0,285	-0,339
C6	0,044	0,068	-0,078	—	—	—	—
C8	—	—	—	—	—	—	—
H1	0,307	—	—	0,250	0,317	—	0,181
H2	0,254	0,254	—	0,197	0,268	0,125	—
H3	—	0,307	—	—	0,317	—	—
H4	0,232	0,224	0,088	0,179	0,243	0,106	0,105
H5	0,218	0,218	0,090	0,176	0,243	0,106	0,107
H6	0,224	0,232	0,088	—	—	—	—
H7	—	—	—	—	—	—	—
H8	—	—	—	—	—	—	—
H9	—	—	—	—	—	—	—

причому в усіх без винятку випадках найпротофільнішим є той атом, від якого відірвано протон.

При цьому пріоритетність місць протонування і депротонування (за винятком задіяних в процесі протонування і депротонування) в катіонних і аніонних формах залишається здебільшого тією ж, що й в електрично нейтральній формі. Як виняток, в Pur^{+N_3} найімовірнішим місцем протонування є атом N7, хоча в Pur найпротофільнішим є атом N1; крім того, в Pur^{+N_7} атом N6 кислійший, ніж атом N2, в той час, коли в Pur реалізується протилежна ситуація. Для аніонних форм спостерігається тенденція зміни пріоритетності місць протонування і депротонування на протилежну.

Радикальна зміна кислотно-лужних властивостей Pur , Pur^+ та Im при зміні їхнього зарядового стану шляхом протонування чи депротонування пояснюється в першу чергу ефектами електронного спряження [11, 14, 15], які спричиняють сильну делокалізацію надлишкового заряду, що заторкує всі без винятку атоми (див. табл. 2), а також меншою мірою — дією індуктивного механізму [16].

В аніонних формах усі атоми (за винятком атомів водню) мають негативний заряд, який для всіх них (за винятком атома N3 в Pur^{-N_3}) є негативнішим у порівнянні з електрично нейтральною формою. В катіонних формах порівняно з електрично нейтральним станом заряди всіх атомів (за винятком атома N7 в Pur^{+N_7}) стають додагнішими (менш негативними), причому в деяких випадках відбувається зміна знаків (з мінуса на плюс) заряду (див. табл. 2). Як для електрично нейтральних, так і для катіонних та аніонних форм Pur , Pur^+ та Im не існує простого кореляційного співвідношення між донорно-акцепторними властивостями атомів та зарядами на них (див. табл. 1 і 2).

Отримані результати дозволяють зробити практично важливі висновки про взаємозалежність міжмолекулярних водневих зв'язків, які утворюють з молекулами-партнерами Pur , Pur^+ чи Im . Взаємопідсилення двох міжмолекулярних водневих зв'язків має місце в тому і лише в тому випадку, коли основа виступає одночасно як їхній донор, так і акцептор. В усіх інших випадках, коли основи виконують лише донорні чи акцепторні функції Н-зв'язків, відбувається їхнє взаємне послаблення. При цьому кількісний ефект залежить від того, які конкретно атоми є донорами і акцепторами водневого зв'язку.

Це дозволяє, зокрема, зрозуміти квантовохімічні засади самоасоціації Im [17] та Pur [18].

Імідазолу вигідно утворювати ланцюгові самоасоціації з періодичними міжмолекулярними водневими зв'язками $\text{N1N1} \dots \text{N3} \dots + \text{N1N1} \dots \dots \text{N3}$ тому, що вони взаємопідсилюються (втягування атома N3 у Н-зв'язок підсилює кислотність іміногрупи N1N1 і навпаки — втягування іміногрупи N1N1 у Н-зв'язок підсилює протоноакцепторну здатність атома N3), причому ефект наростає зі збільшенням кількості утворених Н-зв'язків, поступово насичуючись. При цьому кінцеві групи ланцюга N1N1 і N3 мають набагато більші кислотні і лужні властивості відповідно, ніж ізольована молекула Im . Саме цей кооперативний механізм лежить в основі естафетної рухливості протонів в деяких молекулярно-біологічних системах [17].

Отримані нами результати про взаємозалежність водневих зв'язків за участю Im дозволяють уточнити деталі фізико-хімічного механізму каталітичної активності серин-гістидинових естераз, зокрема хімотрипсину [17]. В його активному центрі імідазольне кільце His-57 утворює три суттєво кооперативні міжмолекулярні Н-зв'язки — один з гідроксильною групою Ser-195 (OH ... N3) і два циклічних Н-зв'язки з депротонованою карбоксильною групою Asp-102 (CO-...N1N1+CO-...N2C2); які значно підвищують протофільність атома кисню гідроксилу Ser-195. Запуск реакції ацилювання відбувається в процесі «стискувальної» конформаційної деформації кишені, в якій знаходиться активний центр, що спричиняє перенесення протону від гідроксильної групи Ser-195 через імідазольний фрагмент His-57 до карбоксилат-аніону Asp-102, провоку-

ючи тим самим нуклеофільну атаку активізованого (тобто з високою протофільністю) атома кисню депротонованої гідроксильної групи Asp-102. Характерно, що циклічні Н-зв'язки карбоксильної групи Ser-195 з імідазольним фрагментом His-57, об'єднані в квазіароматичний цикл (CO ... H₂C₂+OH ... N₁), значно підсилюючи один одного, виконують роль динамічної «протонної пастки».

Самоасоціація Pur відбувається за рахунок двох циклічних міжмолекулярних водневих зв'язків N₁ ... H₂C₂ (або N₃ ... H₂C₂, що одне й те ж саме) [18], котрі взаємопідсилюють один одного: втягування атома N₁ (N₃) першої молекули у міжмолекулярний Н-зв'язок з групою C₂H₂ другої молекули Pur підвищує кислотність групи C₂H₂ першої молекули та лужність атома N₁ (N₃) другої молекули і навпаки.

Наостанок зазначимо, що одержані в цій праці результати можуть бути також використані при вивченні сольватації електрично нейтральних і заряджених форм Pur, Pur та Im в органічних розчинниках, а також для інтерпретації хімічних зсувів ¹³C в спектрах ЯМР цих біологічно важливих сполук.

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

THE INFLUENCE OF PROTONATION AND DEPROTONATION ON THE ACIDIC-BASIC PROPERTIES OF PURINE, PYRIMIDINE AND IMIDAZOLE

Summary

The energies of protonation and deprotonation of neutral, protonated (cation) and deprotonated (anion) forms of purine (Pur), pyrimidine (Pyr) and imidazole (Im) and charges on atoms for all these forms have been calculated in vacuum by means of semiempirical quantum mechanical AM1 method with optimization (gradient norm < 0,01) of all structural parameters. It was established that charge state deviation of molecule through protonation or deprotonation changes its acidic-basic properties considerably. So, Pur, Pyr and Im protonation reduces basic properties to zero and considerably increasing acidic ones; any proton separation depresses acidic properties to zero practically, increasing basic ones. The iminogroup with accepted proton is the most acid site and the atom, from which the proton has been removed is the most protonophilic. On the ground of data obtained the important conclusion was made: mutual amplification of two intermolecular hydrogen bonds occurs only in the case when the base is donor and acceptor of protons simultaneously. There is mutual decrease of H-bonds in the rest cases. Based on a results of intermolecular H-bonds mutual influence study, the quantum chemical foundations of Im and Pyr selfassociation through hydrogen bonding are under discussion.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Брусков В. И. Модельные системы белково-нуклеинового узнавания: Дис. ... д-ра хим. наук.— М.: МГУ, 1990.—38 с.
2. Helene C., Lancelot G. Interactions between functional groups in protein-nucleic acid associations // Prog. Biophys. and Mol. Biol.—1982.—39, N 1.—P. 1—68.
3. 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.
4. [Zheltovsky N. V.], Samoilenko S. A., Kolomiets I. N. et al. Some structural aspects of protein-nucleic acid recognition point mechanisms involving amino acid // J. Mol. Struct.—1989.—214.—P. 15—26.
5. Раевский О. А. Структура и свойства комплексов, моделирующих молекулярное распознавание // Успехи химии.—1990.—59, № 3.—С. 375—400.
6. Вилков Л. В., Пентин Ю. А. Физические методы исследования в химии. Структурные методы и оптическая спектроскопия.— М.: Высш. школа, 1987.—367 с.
7. Мищук Я. Р. Вивчення фізико-хімічної природи елементарних актів білково-нуклеїнового та нуклеїново-нуклеїнового впізнавання на низькомолекулярних модельних системах: Автореф. ... дис. канд. біол. наук.— Київ, 1993.—21 с.
8. Govorun D. M., Kondratyuk I. V., [Zheltovsky M. V.]. Кислотно-лужні властивості молекулярного ксантину та його комплексотвірна здатність // Біополімери і клітина.— 1994.— 10, № 6.—С. 61—64.

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. Неаддитивные свойства водородных связей в комплексах сложного состава // Молекуляр. спектроскопия.—Л.: Изд-во ЛГУ, 1990.—Вып. 8.—С. 127—160.
11. Пюльман Б., Пюльман А. Квантовая биохимия.—М.: Мир, 1965.—654 с.
12. Коптева Т. С., Шигорин Д. Н. К вопросу о природе внутримолекулярной водородной связи в молекулах с π -электронами 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 -сопряжение в ароматических соединениях элементов V и VI групп // Успехи химии.—1986.—55, № 2.—С. 225—250.
15. Шорыгин П. П., Буриштейн К. Я. Сопряжение 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. Квантовая биохимия.—М.: Мир, 1965.—654 с.

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

Одержано 12.01.95