

Самоасоціація цитозину у зневодненому ДМСО за допомогою двох еквівалентних Н-зв'язків $N1H...O=C2$ знижує бар'єр повертання аміногрупи: дані 1H ЯМР спектроскопії

С. П. Самійленко, І. В. Кондратюк, А. Л. Потягайло, Д. М. Говорун

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна
E-mail: dhovorun@imbg.org.ua

Методом 1H ЯМР спектроскопії у зневодненому ДМСО-д₆ встановлено, що при збільшенні концентрації цитозину від 5 до 35 мМ дублетний сигнал його аміногрупи поступово трансформується у синглетний. Спостережений факт інтерпретовано як результат зменшення бар'єра повертання аміногрупи внаслідок центросиметричної самоасоціації основи через два еквівалентні міжмолекулярні Н-зв'язки $N1H...O=C2$, що, ймовірно, послаблює р π -спряження вільної електронної пари амінного атома азоту з π -електронною системою кільця. Показано, що N1-метилзаміщення цитозину справляє такий самий ефект на аміногрупу, як і самоасоціація.

Вступ. Великоамплітудна, нелінійна поведінка нуклеїнових кислот та їхніх мономерів є важливим структурно-динамічним чинником, що визначає їхнє функціонування [1]. Характерним прикладом може слугувати інтерконверсія (конформаційне перетворення асиметричної молекули у свій енантіомер) нуклеотидних основ, що містять аміногрупу, яка відбувається трьома топологічно і енергетично нееквівалентними шляхами: через площинну інверсію амінного фрагмента C-NH₂ та два протилежно спрямовані анізотропно загальмовані поворотальні рухи аміногрупи навколо екзоциклічного зв'язку C-N [2]. При цьому останні два процеси значно енергетичніші, ніж перший [3]. Для ізольованих аденіну (Ade), гуаніну (Gua) та цитозину (Cyt) анізотропне повертання аміногрупи практично реалізується в діапазоні відповідних двограних кутів $\pm 180^\circ$ внаслідок суттєво різної величини бар'єрів *цис*- і *транс*-повертання [4].

Відомо, що інтерконверсія амінного фрагмента ізольованих нуклеотидних основ контролюється р π -спряженням вільної електронної пари (ВЕР) амінного атома азоту з π -електронною системою

гетероциклу, внутрішньомолекулярною гіпервалентною взаємодією за участі аміногрупи та стеричним фактором [5]. Саме тому аміногрупа не є жорстким ротатором: геометрична структура амінного фрагмента суттєво змінюється під час його інтерконверсії — сплющується у перехідному стані площинної інверсії та пірамідалізується в перехідних станах анізотропно загальмованого повертання [2, 3]. Якраз пірамідалізація аміногруп основ при повертанні зумовлює унікальні структурно-динамічні властивості їхніх Вотсон-Криківських пар [6]: аміногрупи повертаються на кути $\pm 180^\circ$, не розриваючи водневих зв'язків у парах, а лише послаблюючи їх.

Встановлений за допомогою спектроскопії ЯМР факт [7], що в парі Gua:Cyt повертається лише аміногрупа Gua, а не Cyt, пояснюється їхньою антикооперативною динамічною поведінкою [6]. Зроблено припущення, що загальмоване повертання аміногруп нуклеотидних основ у дволанцюгових полінуклеотидах, зокрема ДНК, є основним чинником, що відповідає за механізм утворення так званих напіврозкритих конформаційних станів [6]. Вважається, що ці стани можуть бути джерелом солітонної далекодії [8], передплавлення ДНК [9] тощо.

Хімізсуви сигналів протонів (м. ч.) цитозину у розчинах різної концентрації у зневодненому ДМСО- d_6

Протон (див. рис. 2)	Концентрація основи, мМ						
	5	10	15	20	25	30	35
N1H	10,330	10,340	10,350	10,351	10,366	10,390	10,407
N4H _a	7,020	7,021	7,022	7,024	7,025	7,032	7,035
N4H _b	6,930	6,950	6,960	6,965*	6,970*	**	**
C5H	5,550	5,552	5,553	5,556	5,556	5,558	5,560
C6H	7,310	7,310	7,310	7,312	7,314	7,316	7,318

*Плече; **зливається з N4H_a.

Втягування одного чи двох протонів аміногрупи у міжмолекулярні Н-зв'язки підвищує бар'єр її повертання. З цієї причини бар'єр повертання аміногруп Gua і Ade у відповідних Вотсон-Криківських парах вищий, ніж для ізольованих основ [6].

Нещодавно теоретично встановлено ефект дистанційного впливу на динамічну поведінку аміногрупи основ модельних нуклеотидів [10, 11]. Виявилось, що зміна зарядового стану фосфатної групи суттєво впливає на нелінійно-динамічну поведінку аміногрупи: при зростанні надлишкового негативного заряду бар'єр повертання знижується, а бар'єр площинної інверсії зростає. Це пояснюється дистанційним впливом некомпенсованого негативного заряду через систему хімічних зв'язків на $\rho\pi$ -спряження ВЕП аміногрупи з π -електронною системою кільця. Однак експериментальних доказів такого ефекту поки що немає.

Ця робота ставить за мету на прикладі Cyt зафіксувати ефект опосередкованого впливу міжмолекулярних Н-зв'язків, дистанційованих від амінного фрагмента основи, на повертальну рухливість аміногрупи. Головна ідея дослідження полягає в тому, що міжмолекулярними Н-зв'язками — опосередкованими регуляторами інтерконверсії аміногрупи шляхом збурення $\rho\pi$ -спряження ВЕП амінного атома азоту з π -електронною системою гетероциклу — можуть виступати ті з них, які спричиняють самоасоціацію основи у неводному розчиннику, а саме — зневодненому ДМСО. Є всі підстави вважати, що самоасоціація Cyt у зневодненому оточенні є центросиметричною і відбувається через утворення двох еквівалентних міжмолекулярних зв'язків N1H...O=C2, оскільки карбонільна група Cyt є найкращим акцептором, а сусідня іміногрупа N1H — найкращим донором протонів [12].

Матеріали і методи. В роботі використано Cyt фірми «Calbiochem» (США), 1-метилцитозин

(m¹Cyt) та деоксицитидин (dC) фірми «Sigma» (США), цитидин (C) фірми «Serva» (Німеччина), ДМСО- d_6 фірми «Fluka» (Чехія), зневоднений надситями 0,4 та 0,5 мМ фірми «Serva».

Спектри ЯМР на ядрах ¹H (¹H ЯМР) реєстрували на спектрометрі фірми «Bruker» з робочою частотою 200 МГц у кюветах діаметром 5 мм.

Результати і обговорення. Досліджуючи Cyt у зневодненому ДМСО- d_6 методом ¹H ЯМР, ми звернули увагу на деяку відмінність між спектрами, зареєстрованими для розчинів різної концентрації. Це спонукало нас вивчити вплив самоасоціації Cyt на його спектри ¹H ЯМР, для чого концентрацію основи варіювали від 5 до 35 мМ.

При збільшенні концентрації сигнали протонів N1H, C5H і C6H поступово зсувалися у бік слабших полів внаслідок зростання числа молекул, що взаємодіють між собою (таблиця).

Особливу увагу привернула нестандартна поведінка сигналів амінопротонів (рис. 1). При концентраціях 35 та 30 мМ вони дають один симетричний сигнал (7,035 та 7,032 м. ч. відповідно). Але вже при розведенні до 25 мМ з боку сильних полів з'являється плече ~6,95 м. ч., яке при подальшому зменшенні концентрації випикується все чіткіше. При концентрації 5 мМ вже маємо два сигнали з чітко виписаними максимумами 7,02 та 6,93 м. ч. Це свідчить про те, що в ДМСО у неасоційованих молекул Cyt амінопротони нееквівалентні [13] і причина цієї нееквівалентності у її внутрішньо-молекулярній природі. На нашу думку, це, перш за все, гіпервалентна взаємодія N4H_a...N3 [14].

Вплив зростання концентрації на сигнали амінопротонів подібний до ефекту підвищення температури [15]. Отже, коалесценція (збіг) сигналів амінопротонів зумовлена зниженням бар'єра повертання аміногрупи в результаті ослаблення $\rho\pi$ -спряження ВЕП амінного атома азоту з π -електронною системою гетероциклу, спричиненого самоасоціацією Cyt. Про те, що самоасоціація Cyt

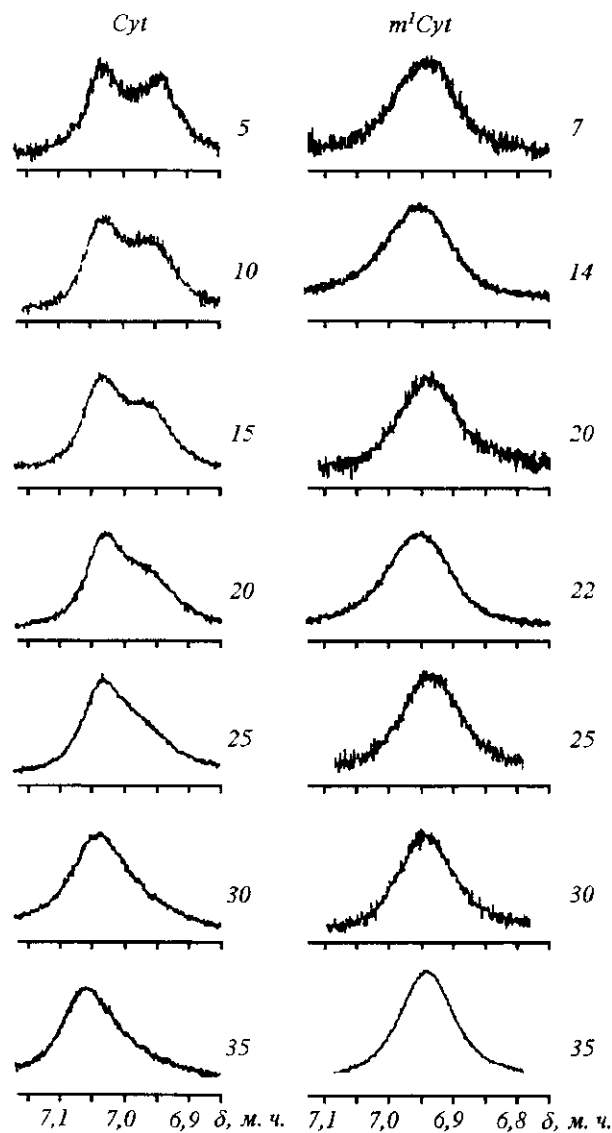


Рис. 1. Концентраційна залежність сигналів в спектрі ^1H ЯМР аміногрупи цитозину та 1-метилцитозину у зневодненому DMCO-d_6 . Концентрації основ (праворуч кожної спектрограми) наведено у мМ

збурює всю електронну систему молекули, свідчить також зсув до слабких полів сигналів обох карбопротонів (таблиця).

Найімовірнішим типом самоасоціації Cyt є утворення центросиметричних комплексів із залученням іміногрупи NH та карбонільної групи (рис. 2). Про це, зокрема, свідчить зсув сигналу імінопротона NH у бік слабких полів з ростом концентрації основи (таблиця).

Дослідження в DMCO-d_6 спектрів ^1H ЯМР

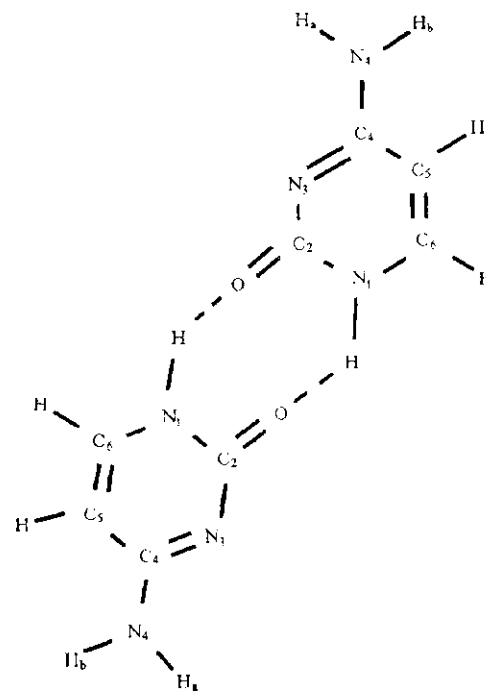


Рис. 2. Схема центросиметричної самоасоціації цитозину у зневодненому DMCO-d_6 . Нумерація атомів стандартна

$m^1\text{Cyt}$ в межах концентрацій від 7 до 35 мМ вказує на концентраційну незалежність хімсумів усіх його протонів, у тому числі й амінопротонів (рис. 1). Цей факт свідчить про відсутність помітної кількості самоасоціатів $m^1\text{Cyt}$ у зазначеному інтервалі концентрацій, оскільки така модифікація основи блокує її самоасоціацію через пару еквівалентних зв'язків $\text{NH}\dots\text{O}=\text{C}_2$, властивих для канонічного Cyt , і є переконливим доказом запропонованої схеми самоасоціації Cyt .

Синглетна форма сигналу амінопротонів $m^1\text{Cyt}$ 6,940 м. ч. зумовлена нижчим бар'єром повертання аміногрупи в порівнянні з Cyt за одних і тих же експериментальних умов. Вірогідно, метилзаміщення положення 1 піримідинового кільця Cyt послаблює π -спряження ВЕП аміноного атома азоту з π -електронною системою гетероциклу, що й спричиняє збільшення повертальної рухливості аміногрупи. Зауважимо, що для нуклеозидів C і dC при концентрації 30 мМ у зневодненому DMCO-d_6 зареєстровано дублети амінопротонів 7,165 та 7,130 м. ч. і 7,129 та 7,084 м. ч. відповідно. Очевидно, цукровий залишок на відміну від метильної групи знижує повертальну рухливість аміногрупи. Таким чином, у цьому випадку для досліджуваного ефекту вирішальне значення має природа групи, що заміщує положення 1 в Cyt .

Правомірним виглядає висновок, що бар'єр повертання аміногрупи Су_т знижується як втягненням іміногрупи N1H Су_т та сусідньої карбонільної групи O=C2 у водневий зв'язок при утворенні центросиметричних самоасоціатів, так і утворенням ковалентного зв'язку N1-C при метилюванні.

Висновки. Отже, вперше експериментально встановлено, що центросиметрична самоасоціація Су_т у зневодненому ДМСО-d₆, яка відбувається за участі двох еквівалентних Н-зв'язків N1H...O=C2, суттєво впливає на нелінійну динаміку амінного фрагмента основи, знижуючи бар'єр повертання аміногрупи. Цей результат поряд з раніше отриманими теоретичними даними [10, 11] свідчить про те, що дистанційне збурення в той чи інший спосіб (втягування основи у міжмолекулярні Н-зв'язки, зміна її зарядового стану тощо) електронного спряження аміногрупи з гетероциклом є ефективним інструментом далекодії впливу на великоамплітудну динаміку нуклеїнових кислот, пов'язану із стереохімічною нежорсткістю основ з аміногрупою.

Це підтверджує думку про винятково важливу біологічну роль ефектів електронного спряження у структурно-динамічній організації і функціонуванні нуклеїнових кислот [16—17].

S. P. Samijlenko, I. V. Kondratyuk, A. L. Potyahaylo,
D. M. Hovorun

Cytosine self-association in anhydrous DMSO through two equivalent H-bonds N1H...O=C2 lowers the barrier of amino group turn: ¹H NMR spectroscopy data

Summary

By ¹H NMR spectroscopy it was established in anhydrous DMSO-d₆ that under increase of cytosine concentration from 5 up to 35 mM the doublet signal of its amino group becomes gradually transformed into the singlet one. This observation is interpreted as a result of lowering the barrier of amino group turn due to central symmetrical self-association of the base through two equivalent intermolecular H-bonds N1H...O=C2, which is likely to weaken π-conjugation of the lone electron pair of amino nitrogen atom with the ring π-electron system. Cytosine N1-methylsubstitution was shown to impact amino group in the similar way as self-association.

С. А. Самоїленко, І. В. Кондратюк, А. Л. Потягайло,
Д. М. Говорун

Самоасоціація цитозина в обезвоженому ДМСО посредством двох еквівалентних Н-связей N1H...O=C2 снижает барьер поворота аминогруппы: данные ¹H ЯМР спектроскопии

Резюме

Методом ¹H ЯМР спектроскопии в обезвоженном ДМСО-d₆ установлено, что при увеличении концентрации цитозина от 5 до 35 mM дублетный сигнал его аминогруппы постепенно трансформируется в синглетный. Наблюдаемый факт интерпретирован как результат уменьшения барьера поворота аминогруппы вследствие центросимметричной самоассоциации основания посредством двух эквивалентных межмолекулярных

Н-связей N1H...O=C2, что, вероятно, ослабляет π-сопряжение неподеленной электронной пары аминного атома азота с π-электронной системой кольца. Показано, что N1-метилзамещение цитозина производит тот же эффект на аминогруппу, что и самоассоциация.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. McCammon J. A., Harvey S. C. Dynamics of proteins and nucleic acids.—Cambridge; Sydney: Cambridge Univ. press, 1987.—234 p.
2. Говорун Д. М., Міщук Я. Р., Кондратюк І. В. Про квантовохімічну природу стереохімічної нежорсткості канонічних нуклеотидних основ // Біополімери и клетка.—1996.—12, № 5.—С. 5—12.
3. Говорун Д. М., Міщук Я. Р., Кондратюк І. В. Топологічні властивості гіперповерхні потенціальної енергії канонічних нуклеотидних основ // Біополімери и клетка.—1996.—12, № 5.—С. 13—17.
4. Говорун Д. М., Кондратюк І. В. Анізотропія обертальної рухливості аміногрупи в канонічних нуклеотидних основах // Доповіді НАН України.—1996.—№ 10.—С. 152—155.
5. Говорун Д. М., Данчук В. Д., Міщук Я. Р., Кондратюк І. В., Радомський М. Ф., Желтовський М. В. Дзеркально-симетричні конформаційні стани канонічних нуклеотидних основ // Доповіді АН України.—1992.—№ 2.—С. 66—69.
6. Говорун Д. М. Структурно-динамічна модель спонтанних напіврозкритих станів ДНК // Біополімери и клетка.—1997.—13, № 1.—С. 39—45.
7. Williams N. G., Williams L. D., Show B. R. Dimers, trimers and tetramers of cytosine with guanine // J. Amer. Chem. Soc.—1988.—111, N 8.—P. 7205—7209.
8. Говорун Д. М., Міщук Я. Р. Далекодія в ДНК: нові модельні уявлення і підходи // Доповіді НАН України.—1999.—№ 7.—С. 161—165.
9. Говорун Д. М., Міщук Я. Р., Харченко В. М. Структурно-динамічна природа передплавлення ДНК та його біофізична значущість // Тези доп. II з'їзду Укр. біофіз. тов.—Харків, 1998.—С. 10.
10. Mishchuk Ya. R., Hovorun D. M. Intramolecular hydrogen bonds and structural nonrigidity of pyrimidine nucleosides // Biopolymers and Cell.—1998.—14, N 4.—P. 360—370.
11. Міщук Я. Р., Говорун Д. М. Взаємозалежні внутрішньомолекулярні водневі зв'язки в цитидині і дезоксицитидині та їхня стереохімічна нежорсткість // Доповіді НАН України.—1999.—№ 5.—С. 193—199.
12. Говорун Д. М., Кондратюк І. В. Газофазні кислотно-лужні властивості канонічних нуклеотидних основ // Доповіді НАН України.—1998.—№ 1.—С. 207—212.
13. Говорун Д. М., Кондратюк І. В., Міщук Я. Р., Желтовський М. В. Нееквівалентність амінних атомів водню в канонічних нуклеотидних основах // Доповіді НАН України.—1995.—№ 8.—С. 130—132.
14. Говорун Д. М., Міщук Я. Р., Кондратюк І. В., Желтовський М. В. Внутрішньомолекулярні кооперативні водневі зв'язки в нуклеотидних основах // Доповіді НАН України.—1996.—№ 8.—С. 141—144.
15. Limbach H.-H. The use of NMR spectroscopy in the study of hydrogen bonding in solution // Aggregat. Process Solut.—Amsterdam, 1983.—P. 410—461.
16. Пюльман Б., Пюльман А. Квантовая биохимия.—М.: Мир, 1965.—654 с.
17. Сент-Дьерди А. Введение в субмолекулярную биологию.—М.: Наука, 1964.—140 с.

УДК 573.3

Надійшла до редакції 26.08.02