DOI: 10. 3969/j. issn. 1003-0972. 2014. 03. 008

5-甲基胞嘧啶水解反应机理的理论研究

张爱华*,杨宝华,李 琳

(首都医科大学 燕京医学院,北京 顺义 101300)

摘 要:采用密度泛函理论方法,在 B3LYP/6-31G**水平下研究了 5-甲基胞嘧啶(m⁵C)水解反应的微观 机理和势能剖面.计算结果表明,5-甲基胞嘧啶的水解反应有两条反应途径:(A)水分子进攻 m⁵C 生成中间体 IM1,然后氨分子充当桥生成终产物胸腺嘧啶;(B)水分子进攻 m⁵C 首先生成四配位的中间体 IM2,然后中间体 分解成终产物胸腺嘧啶和氨分子.能量计算结果表明,5-甲基胞嘧啶的水解反应决速步的活化能垒较高,在自 发状态下,5-甲基胞嘧啶的水解反应难于进行.

关键词:5-甲基胞嘧啶;水解反应;胸腺嘧啶

中图分类号: 064 文献标志码: A 文章编号: 1003-0972(2014) 03-0341-03

Theoretical Study on the Hydrolysis Reaction Mechanism of 5-methylcytosine Zhang Aihua^{*}, Yang Baohua, Li Lin

(Yanjing Medical College, Capital Medical University, Beijing 101300, China)

Abstract: The hydrolysis reaction mechanism and potential energy surface of 5-methylcytosine (m^5C) were investigated using density functional theory (DFT) at the B3LYP/6-31G^{**} level. The results show that the hydrolysis reaction of m^5C includes two pathways: (A) With the water attacking at m^5C , thymine is formed; (B) This pathway is associated with a tetracoordinated intermediate formed and decomposed. Because the hydrolysis reaction of m^5C has a higher barrier, the hydrolysis reaction of m^5C does not take place for the opening system , which is agreement with the experimental result. The present calculations have rationalized and verified all the possible reaction channels.

Key words: 5-methylcytosine; the hydrolysis reaction; thymine

0 引言

DNA 分子复制是由碱基配对完成的,由于碱 基之间形成的氢键具有固定的数目,碱基对任何 结构上的重大变化都有可能导致链的断裂、碱基对 的错配以及突变,从而导致 DNA 的损伤^[1-2].DNA 碱基水解脱氨势必会造成碱基配对情况的改变,碱 基的这种变化将改变基因的序列.DNA 的这种损 伤有可能遗传给子代,因此被认为是生物机体衰老 和人类各种遗传性疾病、癌症的主要诱因^[34].理论 化学工作者对几种常见碱基(胞嘧啶、腺嘌呤和鸟 嘌呤)的环外氨基的水解机理已经进行了理论研 究^[5-7],而对稀有碱基 5-甲基胞嘧啶水解反应机理 则研究的相对较少.5-甲基胞嘧啶作为稀有碱基, 是许多动物、植物 DNA 的脱氧核苷酸的嘧啶碱基 之一,在 DNA 中有大量存在,在动物、植物的 RNA 中也含有微量,其在控制基因表达方面起重要作 用 5-甲基胞嘧啶也出现在脊椎动物基因的转录起 始点附近高度密集的 CpG 序列中. 虽然 5-甲基胞 嘧啶自发的水解反应进行得很慢^[8],反应后生成 的胸腺嘧啶(T)是 DNA 中正常的碱基,其转化过 程见图 1,所以没有一种修复机制能觉察和改正这 种突变.



图 1 5-甲基胞嘧啶的水解反应示意图

Fig. 1 The profile of hydrolysis reaction for 5-methylcytosine 5-甲基胞嘧啶脱氨基结果是 m⁵C-G 对转换成 一个 T-A,产生了碱基转换突变,且 m⁵C 脱氨基突 变不能通过修复机制得到校正. 因此对 5-甲基胞 嘧啶的水解反应进行研究,具有重要的意义. 采用 密度泛函理论方法,在 B3LYP/6-31G**水平下研

收稿日期: 2014-01-03; 修订日期: 2014-04-26; * . 通信联系人 E-mail: zah9201@163.com

基金项目:首都医科大学科研启动基金项目(1300-1300171010)

作者简介:张爱华(1978-),女,北京人,讲师,博士,主要从事计算化学研究.

究了5-甲基胞嘧啶水解反应的微观机理.

1 计算方法

本文采用 B3LYP 方法^[941] 在 6-31G**水平上 对所研究反应的反应物、过渡态和产物的几何构型 进行了全优化计算,得到各反应的活化能垒.同时 计算振动频率,以确认所得到的构型为能量极小点 或过渡态.根据过渡态的虚振动模式判断它们位于 正确的反应途径上.用同样的方法计算了内禀反应 坐标(IRC)^[1243],得到了随反应进程的能量变化和 几何参数的变化,详细了解了反应过程,进一步确 认了过渡态连接相应的驻点.用极化连续介质模型 (PCM)^[1421]和水溶剂(介电常数 ε = 78.39),温度 298.15 K 时对反应途径中的各点做了单点能计 算.所有计算均采用 Gaussian 09^[22]程序完成.

2 结果和讨论

图 2 给出了本文所研究的目标分子 5-甲基胞 嘧啶的水解反应涉及的主要几何构型的关键键参 数.为了便于讨论,只有复合物 COM1 给出了所有 原子的元素符号和标号,其余的只给出了发生反应 关键部位的原子的元素符号和标号.图 3 为基态下 各反应途径的相对势能面,其中,相对能量是以反 应物的零点校正能为标准,各驻点的能量均经过零 点能校正.

我们总共找到了两条可能的反应途径如下:

$$m^{5}C + H_{2}O \rightarrow COM1 \rightarrow TS11 \rightarrow$$

IM1 \rightarrow TS12 \rightarrow COM2 , (1)

 $m^{3}C + H_{2}O \rightarrow COM1 \rightarrow TS21 \rightarrow$ IM2 $\rightarrow TS22 \rightarrow COM2.$ (2)

我们的坐标计算表明反应途径(1)可以认为 是一个两步历程的反应.第一步反应是水分子的氧 原子进攻 5-甲基胞嘧啶的 6C 原子,吸收 254.14 kJ/mol 能量 经过过渡态 TS11,生成了胸腺嘧啶的 烯醇式结构和氨分子,其间水分子上的一个质子 (15H)转移给了 11N 原子,水分子上的氧原子逐 渐向 5-甲基胞嘧啶的 6C 原子靠近.第二步反应是 中间体胸腺嘧啶的烯醇式结构和酮式结构的转换. 中间体 IM1 要吸收 22.61 kJ/mol 的能量经过过渡 态 TS12,变成胸腺嘧啶的酮式结构.这是一个氨分 子充当桥的协同的氢迁移反应,反应的能垒比较 低.TS11 是一个四元环结构,在该结构中,6C— 11N,11N—15H,15H—140 和 140—6C 的键距分 别为0.154 3、0.1117、0.145 9 和0.184 0 nm. TS12 • 342 • 是一个六元环结构,经过过渡态,16H从140迁移 到11N,15H 原子从11N原子迁移到1N原子;同时140—6C(0.1278 nm)键具有了双键的性质. 胸腺嘧啶(T),在DNA中它是一个正常的碱基,所以没有一种修复机制能觉察和改正这种突变.5-甲基胞嘧啶水解的结果是m⁵C-G对转换成一个T-A, 产生了碱基转换突变,且m⁵C脱氨基突变不能通过修复机制得到校正.



的分子结构(键长: nm; 键角: °)

Fig. 2 Molecular structures of the reactants , products , various intermediates and transition states

反应途径(2)则为一个真正的两步历程的反 应.水分子进攻 m⁵C 首先生成生成四配位的中间 体 IM2 ,然后中间体经过氢原子的扭转最终分解成 终产物胸腺嘧啶(酮式结构)和氨分子.过渡态 TS21 和过渡态 TS22 均是四元环状结构.

反应(1) 与反应(2) 都是水和 5-甲基胞嘧啶作 用最终生成胸腺嘧啶和氨 微观机理方面的区别在 于反应(1) 先脱氨 反应(2) 先生成中间体 ,再发生

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

脱氨反应;势能剖面方面研究表明 5-甲基胞嘧啶发 生水解反应的能垒很高,区别在于反应(2)决速步 的能垒是 221.06 kJ/mol 比反应(1)的低.因此 5-甲基胞嘧啶的水解反应在气相条件下是很难进行 的,这与实验研究相符^[8].



 Fig. 3
 The relative potential energy profile of the reaction

 另外 5-甲胞嘧啶比胞嘧啶水解反应决速步的

能垒(223.16 kJ/mol) 低,这从理论上证明胞嘧啶 被甲基化后增大了基因突变的概率.PCM 模型计 算的溶剂化能(单点能) 与气相中的吻合,不容忽 视的一点是,TS11和TS21之间的能垒在气相中之 差为33.08 kJ/mol,PCM 模型的计算结果(13.82 kJ/mol)对二者的能垒起拉平作用.

3 结论

本文采用 DFT-B3LYP/6-31G**方法研究了 5-甲基胞嘧啶水解反应,中间体胸腺嘧啶的醇式与其 烯酮式结构转化的能垒较低,易发生碱基转换突 变,且 m⁵C 脱氨基突变不能通过修复机制得到校 正,从理论上证明了胞嘧啶被甲基化后增大了基因 突变的概率.

参考文献:

- [1] Singh N P, Mccoy M T, Tice R R, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. Experimental Cell Research, 1988, 175(1): 184-191.
- [2] Vigreux C, Poul J M, Deslandes E, et al. DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOK1 cells[J]. Mutation Research, 1998, 419(1/2/3): 79-90.
- [3] Lane D P. Exploiting the p53 pathway for cancer diagnosis and therapy [J]. British Journal of Cancer , 1999 , 80(S1): 1-5.
- [4] Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, et al. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2002, 32(11): 1102-1115.
- [5] 张爱华 杨宝华. 胞嘧啶水化去氨基反应机理的理论研究 [J]. 信阳师范学院学报: 自然科学版 2011 24(1): 56-58.
- [6] Zhang A H, Yang B H, Li Z H. Theoretical study on the hydrolytic deamination reaction mechanism of adenine (H₂O) n(n = 1 ~ 4) [J]. Journal of Molecular Structure - Theochem, 2007, 819(1): 95 - 101.
- [7] Lin X J, Wang Q, Wu J, et al. DFT study on the mechanism of DNA damage caused by the isomerization of DNA purine base [J]. Journal of Theoretical and Computational Chemistry 2008, 7(4): 457-472.
- [8] Frederico L A, Kunkel T A, Shaw B R. A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy [J]. Biochemistry, 1990, 29(10): 2532-2537.
- [9] Becke A D. A new mixing of hartree-fock and local density-functional theories [J]. Journal of Chemical Physics , 1993 , 98(2): 1372-1377.
- [10] Becke A D. Density-function exchange-energy approximation with correct asymptotic behaviour [J]. Physical Review A , 1988 , 38(6): 3098-3100.
- [11] Lee C, Yang W, Parr R G. Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density [J]. Physical Review. B, Condensed Matter, 1988, 37(2): 785–789.
- [12] Gonzalez C, Schlegel H B. An improved algorithm for reaction path following [J]. Journal of Chemical Physics , 1989 , 90(4): 2154-2159.
- [13] Gonzalez C, Schlegel H B. Reaction path following in mass-weighted internal coordinates [J]. The Journal of Physical Chemistry, 1990, 94 (14): 5523-5527.
- [14] Miertus S, Scrocco E, Tomaso J. Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of ab initio molecular potentials for the prevision of solvent effects [J]. Journal Chemical Physics, 1981, 55(1): 117-129.
- [15] Miertus S, Tomaso J. Approximate evaluations of the electrostatic free energy and internal energy changes in solution processes [J]. Journal of Chemical Physics, 1982, 65(2): 239-245.
- [16] Cossi M, Barone V, Cammi R, Tomasi J. Ab initio study of solvated molecules: a new implementation of the polarizable continuum model [J]. Chemical Physics Letters, 1996, 255(4), 327-335.
- [17] Cances M T, Mennucci V, Tomaso J. A new integral equation formalism for the polarizable continuum model: Theoretical back ground and applications to isotropic and anisotropic dielectrics [J]. Journal of Chemical Physics, 1997, 107(8): 3032–3041.
- [18] Barone V, Cossi M, Tomaso J. A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model [J]. Journal of Chemical Physics, 1997, 107(8): 3210-3221.
- [19] Cossi M, Barone V, Tomaso J. Ab initio study of ionic solutions by a polarizable continuum dielectric model [J]. Chemical Physics Letters, 1998, 286(3), 253-260.
- [20] Barone V, Cossi M, Tomaso J. Geometry optimization of molecular structures in solution by the polarizable continuum model [J]. Journal of computational chemistry, 1998, 19(4): 404-417.
- [21] Mennucci B, Mennucci B. Analytical derivatives for geometry optimization in solvation continuum models [J]. Journal of Chemical Physics, 1998, 109(1): 249-259.
- [22] Frisch M J, Trucks G W, Schlegel H B, et al. *Gaussian* 09 *Revision A*. 02[Z]. Wallingford, CT: Gaussian Inc, 2009. 责任编辑: 张建合