

Estructura electrónica de análogos sintéticos de las bases nitrogenadas del ADN

Fusari, Corina M.¹; Sferco, Silvano J.^{1,2}

1- Departamento de Física. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Casilla de Correo 242, (3000) Santa Fe, Argentina.

2- INTEC (UNL – CONICET), Güemes 3450, (3000) Santa Fe, Argentina. e-mail: corina_fusari@hotmail.com

RESUMEN: Se estudiaron mediante cálculos cuánticos semiempíricos los pares de bases del ADN formados por las bases naturales y por análogos sintéticos de la adenina (Z) y timina (F). Estas moléculas sintéticas, en los procesos de replicación, sustituyen a las naturales replicando perfectamente el ADN. Se obtuvieron gráficos de densidad de carga y potencial electrostático que permiten comprender la formación de los enlaces de hidrógeno necesarios para la estabilidad de las bases apareadas. Se estudiaron los pares A-T, A-F, Z-T y Z-F a los efectos de determinar las interacciones del apareamiento. Nuestros resultados indican que, para la replicación del ADN, es de mayor importancia la complementariedad estructural (el efecto estérico), que los posibles enlaces de hidrógeno formados entre pares cuando incluyen algún análogo sintético.

Palabras Claves: Bases de ADN – análogos sintéticos – adenina – timina.

SUMMARY: Electronic Structure of Synthetic Analogous of DNA Bases. Fusari, Corina M.¹; Sferco, Silvano J.^{1,2}. Semiempirical quantum mechanics calculations for the natural base pairs of DNA, and pairs containing structural analogues to adenine (Z) and thymine (F) are presented. The synthetic molecules substitute the natural bases with no consequences in the double strand elongation and stabilization when the DNA's replication process takes place. We show total charge density and electrostatic potential plots in two and three dimensions that help to understand the hydrogen bond formation necessary for the stability of the base pair. We study the base pairs A-T, A-F, Z-T and Z-F to determine the base-pairing interactions. Our results indicate that the shape matching between bases (steric effect) is more important for the replication than the ability to form hydrogen bonds when the base pair include a synthetic analogue.

Key Words: DNA basis – synthetic analogues – adenine – thymine.

Introducción

Desde la propuesta original de Watson y Crick (1) la estructura del ADN ha sido una fuente inagotable de estudio. El fundamento de su forma y estabilidad está basado en los puentes de hidrógeno que se forman entre las bases apareadas. La naturaleza de estos puentes de hidrógeno y la predicción teórica de las distancias y ángulos de enlace todavía hoy continúa siendo estudiada (2-4). La especificidad y fidelidad en la replicación del ADN, se consideró desde siempre que dependía de los enlaces de hidrógeno que existen entre las bases enfrentadas en la doble hélice. Sin embargo, experiencias de replicación in vitro del ADN con análogos sintéticos de adenina (4-metilbenzimidazol, que denominaremos Z) y timina (2,4-difluorotolueno, que denomi-

remos F), mostraron que la replicación era igualmente eficiente, ya que los análogos se incorporaban en el lugar de las bases naturales y permitían la formación estable de la doble hebra (5-6). Las moléculas sintéticas eran análogas en forma y tamaño a las bases naturales. Dado que no había inconvenientes en la replicación, se suponía que se formaban pares del tipo A-F, Z-T y Z-F, en lugar del par natural A-T pero se argumentó que los análogos sintéticos Z y F eran moléculas esencialmente no polares, y como tales, incapaces de formar enlaces de hidrógeno con sus respectivos pares en el ADN (5-6). Estos resultados implicaban que la piedra angular en la que se basa la estructura tridimensional del ADN, y la calidad en el proceso hereditario se cuestionara, dando lugar a numerosas discusiones y revisiones de estas experiencias. Así, se continuó con diversos estu-

dios experimentales para comprobar la naturaleza apolar de estas moléculas análogas a las bases naturales (7-8). Asimismo, se reportaron cálculos cuánticos sobre 1-metil timina y 1-metil difluorotolueno (9-10), que revelan que el análogo sintético de la timina es levemente polar, pero significativamente menos polar que la timina misma. El problema planteado lleva al análisis de enlaces de hidrógeno entre átomos de carbono, hidrógeno y flúor, no observados habitualmente en moléculas biológicas, pero que de hecho existen y están bien caracterizados, aunque en estructuras cristalinas que no poseen otros átomos como oxígeno o nitrógeno más susceptibles a la formación de este tipo de enlace (11). Finalmente, se discutió las consecuencias de la incorporación de estos pseudonucleótidos sobre la estabilidad de una doble hebra de ADN de doce bases de extensión mediante cálculos cuánticos y de dinámica molecular (12), concluyendo que a pesar de la falta de puentes de hidrógeno entre los nucleótidos análogos, la doble hebra era igualmente estable. Es indudable que es necesario un mejor conocimiento de las interacciones que se dan entre los análogos y las bases naturales para comprender mejor los mecanismos de las enzimas implicadas en los procesos de replicación, la identificación de sus sitios activos, y como se generan o no los errores de transcripción.

En este trabajo presentamos resultados de la estructura electrónica obtenidos con cálculos cuánticos semiempíricos, correspondientes a los pares de bases naturales del ADN (A-T), de los pares mixtos (A-F y Z-T) y del par sintético (Z-F). Nuestro objetivo es determinar la polaridad de las moléculas y la formación de enlaces de hidrógeno entre los pares estudiados. Para ello presentamos gráficos de potencial electrostático y densidad total de carga para cada una de las moléculas y los pares considerados. Nuestros resultados indican que existe un débil enlace de hidrógeno entre los pares mixtos, que se encuentra también presente en el par sintético. Sin embargo, y en lo concerniente a la replicación del ADN en presencia de análogos sintéticos, el efecto estérico (es decir, la similitud de una base natural con su análogo sintético) sería el efecto dominante, y no la formación de enlaces de hidrógeno entre las bases.

Materiales y Métodos

Los cálculos cuánticos fueron realizados utilizando el método semiempírico PM3 dentro de la aproximación Restricted Hartree-Fock (RHF), tal como están implementados en el paquete de programas Hyperchem 6.0. Las geometrías obtenidas corresponden a la minimización de la energía total, tanto para las moléculas aisladas, como para los sistemas formados por pares de bases. Se obtuvieron los gráficos de la densidad de carga y los potenciales electrostáticos de los análogos individuales y formando pares, en dos y tres dimensiones. Esto sirvió para identificar zonas de potencial enfrentado que estarían relacionados con las zonas de interacciones puente de hidrógeno. También se analizaron las energías de los pares de bases A-T, A-F, Z-T y Z-F, identificando la energía de enlace y la contribución a la misma debido a la formación de enlaces de hidrógeno.

Resultados y discusión

En la Figura 1 se muestran las estructuras de las bases naturales del ADN, adenina y timina, indicando los átomos que intervienen en la formación de los enlaces de hidrógeno en el ADN.

En la figura 2 se muestran las estructuras de los análogos sintéticos de la adenina (Z) y timina (F). También se indican los átomos que intervienen en el apareamiento.

Respecto de la molécula adenina, la energía mínima se encontró variando su geometría, resultando en una estructura plana que coincide con la evidencia experimental. Las propiedades electrónicas mostradas en la figura 3 son la densidad de carga de la molécula mostrada como curvas de nivel sobre el plano que contiene todos los átomos de la misma y el potencial electrostático en 2D. Los nitrógenos que no están enlazados con hidrógenos (N1, N3 y N7), muestran una simetría diferente a los que si lo están (N9 y N6), evidenciando los primeros mayor acumulación de carga que los segundos. Si se observan los gráficos del potencial electrostático en 2D al acercarse una carga positiva por el plano observado se sentirá atraída por las zonas de potencial negativo, es decir, hacia donde están los nitrógenos no unidos a hidrógeno. Esta es clara coincidencia con el gráfico anterior, ya que los nitrógenos

más electronegativos son los que ejercen un potencial atractivo sobre los protones.

En los gráficos de la figura 4 se muestran las mismas propiedades sobre la molécula de timina, observándose claramente la gran acumulación de carga que presentan los oxígenos, y por lo tanto, el potencial atractivo que ejercen sobre los protones.

También se presentan a continuación los potenciales electrostáticos de los análogos sintéticos Z y F, en dos dimensiones (figura 5). Existen zonas de potencial negativo atractivo, en F, ejercido por los átomos de flúor. En Z, el potencial electrostático es esencialmente repulsivo de protones, ya que a diferencia de la adenina perdió los nitrógenos de apareamiento y con ellos el potencial electronegativo que estos ejercían.

Los gráficos tridimensionales de las mismas propiedades (figura 6) tienen otro enfoque. La densidad de carga en 3D da una idea de la forma espacial de la molécula. Los valores del potencial electrostático, están hallados sobre la isosuperficie de densidad de carga (igual valor de contorno en ambos gráficos). Aquí, los átomos de potencial negativo (zonas de líneas pálidas marcadas con una flecha), ejercerán un potencial atractivo sea cualquiera la dirección de acercamiento del protón. Este es el caso de los nitrógenos en la adenina, de los oxígenos en la timina y de los átomos de flúor en el análogo F. Esta característica se utilizará para determinar cuáles son los átomos que serán aceptores en los enlaces de hidrógeno formados cuando las bases se aparean. Es decir, esperamos que tanto los oxígenos, como los nitrógenos y los átomos de flúor sean buenos aceptores de protones al enfrentarlos a la base complementaria correspondiente. Es necesario recalcar que la forma tridimensional de las moléculas análogas no difiere de las naturales, pero los potenciales electrostáticos demuestran menor capacidad de aceptar protones en la formación de los enlaces de hidrógeno.

Para el par de bases naturales A-T (mostrado en la figura 7), se obtuvieron los gráficos de la isosuperficie de densidad de carga y sobre ésta, el potencial electrostático. La densidad de carga, como para las bases individuales, sirve para caracterizar la geometría del par y observar la perfecta complementariedad estructural que existe entre las moléculas. El potencial electrostático muestra claramente las interacciones intermoleculares que explican el apareamiento entre las bases nitrogenadas. Los va-

lores de potencial electrostático negativo de A se enfrentan perfectamente con los valores positivos de T y a distancias tales de permitir la formación de enlaces de hidrógeno, es decir, distancias menores a 3 Å (13).

Los resultados para el par sintético Z-F se muestran en la figura 8. Al comparar las mismas propiedades que en los pares normales, se encuentra que el potencial electrostático, ha perdido las zonas de enfrentamiento positivo/negativo que había en el par A-T, sobre todo los que formaban el enlace de hidrógeno central. Pero aún en condiciones menos favorables hay potencial enfrentado en las zonas que involucran los átomos de flúor. Además, hay que tener en cuenta que las distancias intermoleculares son mayores, debilitando por lo tanto los posibles puentes de hidrógeno. Sin embargo, se detecta la formación de un enlace de hidrógeno entre el F4 del análogo F y el H6 del análogo Z (indicado en la figura 8 con la doble flecha), enlace caracterizado como débil, tal que la estabilización del par depende enteramente de la formación de este enlace de hidrógeno.

Los resultados para los pares A-F y Z-T, están dados en las figuras 9 y 10 respectivamente. Se desea dar énfasis al hecho de que el rango de potenciales aquí mostrado es el mismo que el tenido en cuenta al graficar los pares naturales de bases. Se observa que hay zonas de interacción de potencial enfrentado, pero las cargas distribuidas que dan lugar al potencial no son lo suficientemente localizadas en F como para generar un potencial de magnitud similar al provocado por T.

En el par mixto Z-T (análogo-base natural), se podría llegar a pensar que los oxígenos de la timina, al ser más electronegativos pueden ser mejores aceptores de protones en la formación de los enlaces de hidrógeno. Sin embargo, los hidrógenos de la pseudo base que enfrentan están enlazados a carbonos y no a nitrógenos como en el caso de la adenina. Esto está además agravado por la interacción repulsiva que se ejercen mutuamente los hidrógenos que tendrían que formar el puente de hidrógeno central en el par analizado.

La Tabla 1 resume los resultados de los cálculos cuánticos efectuados, incluyendo la optimización de las geometrías a través de la minimización de la energía total de las moléculas. Como se puede observar en la Tabla 1, el par A-T es el que obtiene mayor ganancia energética por el apareamiento (5.7 kcal/mol), es decir es el par más estable de los cua-

tro. Por el contrario el par menos ligado corresponde a las bases Z-T. Observando las longitudes de enlace y la energía por enlace de hidrógeno podemos clasificar los enlaces de hidrógeno entre los pares naturales W-

C como moderados en intensidad, coincidiendo con los enlaces de hidrógeno presentes en las moléculas biológicas, mientras que los formados por los pares mixtos y por el par sintético son caracterizados como enlaces de hidrógeno débiles (13).

Figura 1: Bases naturales del ADN: Adenina y Timina

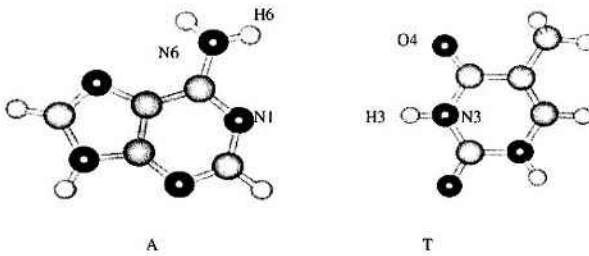


Figura 2: Análogos sintéticos de las bases nitrogenadas naturales. 4-Metilbenzimidazol (Z), análogo de la adenina; 2,4-difluorotolueno (F), análogo de la timina.

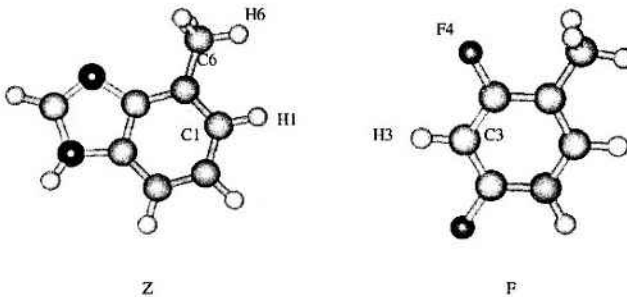


Figura 3: Adenina: Densidad total de carga como curvas de nivel, sobre el plano de la molécula (e/a_0^3) y potencial electrostático en 2D (en e/a_0), respectivamente.

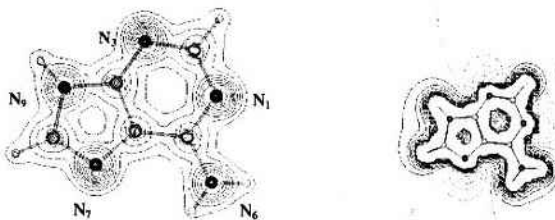


Figura 4: Timina: Densidad de carga y potencial electrostático en 2D. Las unidades son las mismas que en la Fig. 3.

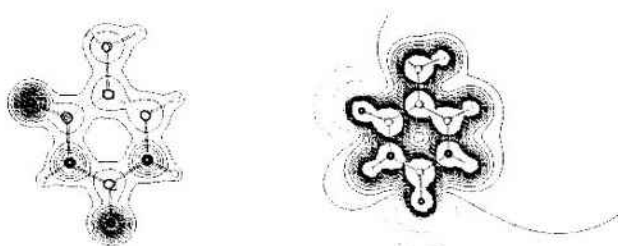


Figura 5: Potenciales electrostáticos en 2D del análogo Z y el F, respectivamente (en e/a_0).

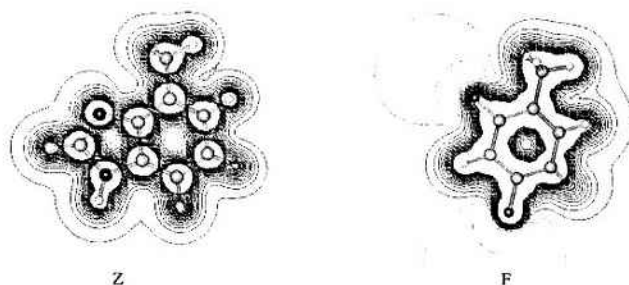


Figura 6: Potencial electrostático mapeado en la isosuperficie de densidad de carga (en e/a_0), de las bases A, T, Z y F respectivamente. Las flechas indican las zonas de potencial electrostático negativo (zonas más pálidas).

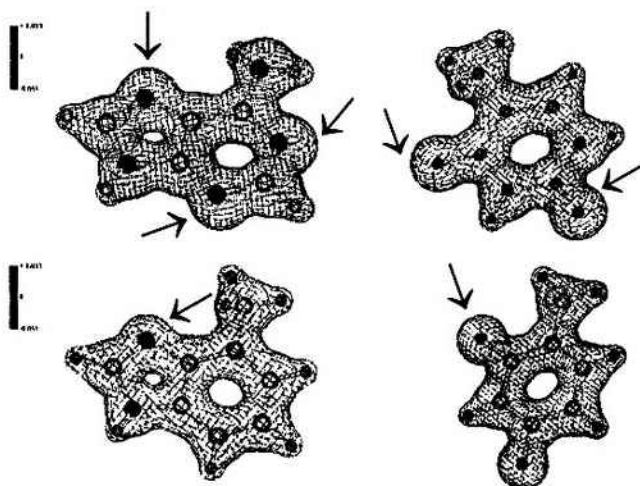


Figura 7: Pares de bases A-T, densidad de carga en e/a_0^3 y potencial electrostático en unidades e/a_0 . Las flechas indican las zonas de potencial electrostático atractivo de protones.

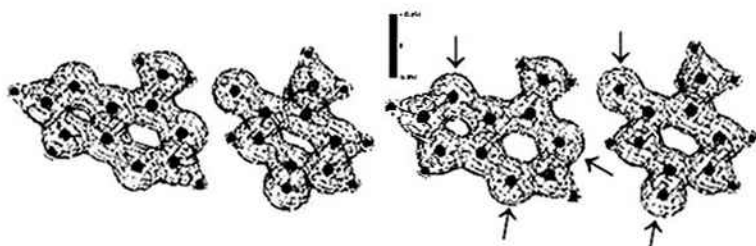


Figura 8: Pares de bases Z-F, densidad de carga en e/a_0^3 y potencial electrostático en unidades e/a_0 . Las flechas indican las zonas de potencial atractivo de protones. La flecha de doble punta indica la formación de un enlace de hidrógeno débil C-H F.

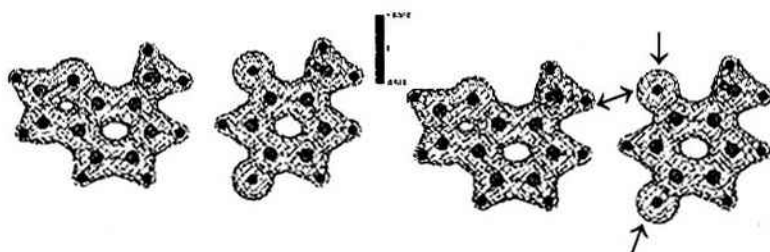


Figura 9: Par A-F, densidad de carga en e/a_0^3 y potencial electrostático en unidades e/a_0 . Las flechas indican las zonas del espacio con potencial negativo, atractivo de protones.

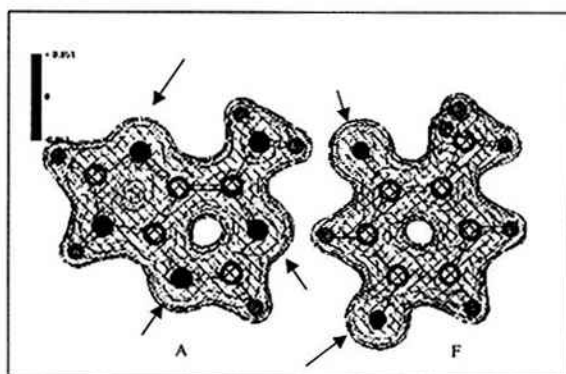


Figura 10: Par Z-T. Densidad de carga en e/a_0^3 y potencial electrostático. Las flechas indican las zonas de potencial negativo, atractivo de protones, en unidades e/a_0 .

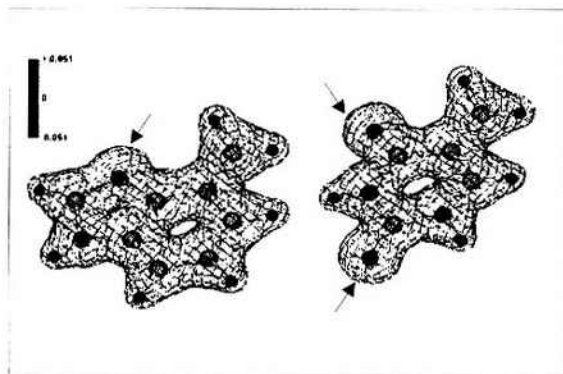


Tabla 1: Distancias y energías de enlace, de reordenamiento, y de enlaces de hidrógeno para las geometrías optimizadas utilizando el método semiempírico PM3. La energía de enlace de hidrógeno se obtiene restando a la $E_{\text{total del par}}$ (en su geometría optimizada), la suma de las $E_{\text{total de cada base aislada}}$ (cada base calculada en la geometría que tiene dentro del par optimizado). Ya que para una base aislada su geometría de energía mínima difiere de su geometría dentro del par optimizado, llamamos $E_{\text{de reordenamiento}}$ para cada base, a las diferencias de energías entre las geometrías mencionadas. Finalmente, $E_{\text{de enlace}}$ de un par, corresponde a la ganancia por formación de enlaces de hidrógeno, menos la $E_{\text{de reordenamiento}}$ de las bases que forman el correspondiente par.

Par de bases	Átomos que intervienen		Longitud (Å)	E de enlace (Kcal/mol)	E de reordenamiento (Kcal/mol)	Energía de enlace de H (Kcal/mol)	Energía por enlace de H (Kcal/mol)	Tipo de enlace (Ref. 13)
A - T	H6	O4	1.82	-5.7	1.2	-6.9	-3.5	Moderado
	N6	O4	2.82					
	N1	H3	1.78					
	N1	N3	2.81					
Z - F	H6	F4	2.7	-2.9	0	-2.9	-2.9	Débil
	C6	F4	3.77					
A - F	H6	F4	1.8	-2.5	0.4	-2.9	-1.5	Débil
	N6	F4	2.81					
	N1	H3	1.83					
	N1	C3	2.95					
Z - T	H6	O4	2.82	-1.9	0.8	-3.7	-3.7	Débil
	C6	O4	3.91					

Conclusiones

A través de la resolución de la ecuación de Schrödinger para los electrones de las moléculas según la aproximación de Restricted Hartree-Fock y utilizando el método PM3, se pudo conocer la distribución electrónica de moléculas de fundamental importancia bioquímica como son las bases nitrogenadas: adenina y timina. Esta mirada cuántica permitió identificar los lugares (átomos) de protonación de cada molécula y predecir en los análisis de las moléculas aisladas cuáles serían los sitios donde efectivamente se producirían los enlaces de hidrógeno.

Los análisis de las longitudes de enlace entre los átomos implicados en la formación de los puentes de hidrógeno, para las bases naturales, mostraron que la fuerza de estas uniones se clasifican como moderadas pero suficientes para conferirles estabilidad en el apareamiento. Se debe tener en cuenta que la complementariedad espacial de estas moléculas no es de menor importancia.

Se estudiaron moléculas análogas a las bases, que se utilizan en experimentos de replicación in Vitro del ADN, las moléculas Z y F. Respecto a la discusión actual planteada sobre su polaridad, nuestros resultados permiten concluir en que son polares, pero con momentos dipolares mucho menores que las correspondientes bases naturales. Por lo tanto, concluimos que las moléculas estructuralmente similares a adenina (Z) y timina (F) establecen puentes débiles de hidrógeno en la formación de los pares Z-F, A-F y Z-T. Sin embargo, en presencia de agua, estos enlaces serían aún más débiles, o simplemente inexistentes, por la competencia en la formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas del solvente y las bases sintéticas. Por lo tanto, en lo que a la replicación del ADN se refiere, la complementariedad estérica sería el factor de mayor importancia y no la formación de débiles enlaces de hidrógeno entre las bases que incluyen análogos sintéticos.

Bibliografía

- 1- Watson, J.D., Crick, F.H.C., 1953. "Molecular structure of Nucleic Acids. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid", *Nature* **171**, 737-738.
- 2- Fonseca Guerra, C., Bickelhaupt, F.M., 1999. "Charge Transfer and Environment Effects Responsible for characteristics of DNA Base Piring". *Angew. Chem. Int.* **38**, 2942-2945.
- 3- Fonseca Guerra, C., Bickelhaupt, F.M., Snijders, J.G., Baerends, E.J., 1999. "The Nature of Hydrogen Bond in DNA Base Pairs: The Role of Charge Transfer and Resonance Assistance". *Chem. Eur. J.* **5**, 3581-3594.
- 4- Fonseca Guerra, C., Bickelhaupt, F.M., Snijders, J.G., Baerends, E.J., 2000. "Hydrogen Bonding en DNA Base Pairs: Reconciliation of Theory and Experiment". *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4117-4128.
- 5- Moran, S., Ren, R X-F, Rumney IV, S., Kool, E.T., 1997. "Difluorotoluene, a Nonpolar Isostere for Thymine, Codes Specifically and Efficiently for Adenine in DNA Rplication". *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 2056-2057.
- 6- Morales, J.C., Kool, E.T., 1999. "Minor Groove Interactions between Polymerase and DNA: More Essential to Replication than Watson-Crick Hydrogen Bonds?". *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 2323-2324.
- 7- Morales, J.C., Kool, E.T., 2000. "Varied Molecular Interactions at the Active Sites of Several DNA Polymerases: Nonpolar Nucleoside Isostere as Probes". *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 1001-1007.
- 8- Guckian, K.M., Krugh, T.R., Kool, E.T., 2000. "Solution Structure of a Nonpolar, Non-Hydrogen-Bonded Base Pair Surrogate in DNA". *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 6841-6847.
- 9- Evans, T.A., Seddon, K.R., 1997. "Hydrogen bonding in DNA - a return to the *status quo*". *Chem. Commun.* 2023-2024.
- 10- Wang, X; Houk, K.N., 1998. "Difluorotoluene, a Thymine isostere, does not hydrogen bond after all". *Chem. Commun.* 2631-2632.
- 11- Thalladi, V.R, Weiss, H-C, Bläser, D., Boese, R., Nagia, A., Desiraju, G.R., 1998. "C-H... F Interactions in the Crystal Structures of Some Fluorobenzenes". *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 8702-8710.
- 12- Cubero, E., Shere, E.C., Luque, F.J., Orozco, M., Laughton, C.A., 1999. "Observations of Spontaneous Base Pair Breathing Events in the Molecular Dynamics Simulations of a Difluorotoluene-Containing DNA Oligonucleotide". *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 8653-8654.
- 13- Jeffrey, G.A., 1997. "An introduction to Hydrogen Bonding". Oxford University Press.