

5R,6S - Tg 立体异构体稳定构型的理论研究

王树栋¹, 龚卫平¹, 王 椰¹, 孙 涛², 吴敬杰¹

(1. 贵州警察学院 实验中心, 贵阳 550000; 2. 贵州大学 贵州省高性能计算化学重点实验室, 贵阳 550000)

摘要: 胸腺嘧啶二醇 (Thymine glycol, Tg) 是最常见的 DNA 氧化损伤, 人体基因组内含有数千个 Tg 损伤. Tg 对 DNA 聚合酶有强的阻断, 可能导致细胞死亡、癌症等严重后果. 一旦生成, Tg 就以两对顺反立体异构体混合物的形式存在, 修复酶对 Tg 的修复表现出立体选择性. 在所有的异构体中, 5R,6S - Tg 数量最多. NMR 实验表明 5R,6S - Tg 5 - CH₃ 可能存在轴向或赤道两种不同构象, 但是 5R,6S - Tg 最稳定构象依然存在争论. 基于碱基水平的理论研究表明 5R,6S - Tg 5 - CH₃ 取向为轴向时最稳定. 然而, 本研究在核苷水平的计算表明, 5 - CH₃ 取向为赤道时最稳定, 高精度的簇耦合理论 CCSD(T)/6 - 311 ++ G(d,p) 对结果进行了验证. 进一步的分析表明, 分子内氢键和氧孤电子对之间的 $\pi - \pi$ 共轭协同作用稳定了 5R,6S - Tg 的赤道构象.

关键词: 胸腺嘧啶二醇; 密度泛函理论; 氢键; 立体异构体

中图分类号: O641.3

文献标志码: A

DOI: 10.19855/j.1000-0364.2025.046008

Theoretical study on the stable conformation of 5R, 6S - Tg stereoisomers

WANG Shu-Dong¹, GONG Wei-Ping¹, WANG Ye¹, SUN Tao², WU Jing-Jie¹

(1. Center of Laboratory, Guizhou Police College, Guiyang 550000, China;

2. Key Laboratory of Guizhou High Performance Computational Chemistry, Guizhou University, Guiyang 550000, China)

Abstract: Thymine glycol (Tg) is the most common DNA oxidative damage, and there are thousands of Tg damages in human genome. Tg has a strong blocking effect on DNA polymerase and may lead to serious consequences such as cell death and cancer. Once Tg is generated, it exists in the form of a mixture of two cis - trans stereoisomers, and the repair enzyme exhibits stereoselectivity for Tg repair. Among all isomers, 5R,6S - Tg with the highest quantity. NMR study have shown that the 5 - CH₃ of 5R,6S - Tg may have two different conformations, axial or equatorial, however, the most stable conformation of 5R,6S - Tg is still debated. Studies based on the base level indicate that the 5R,6S - Tg is most stable when the 5 - CH₃ is axial, however, our calculations at the nucleoside level indicate that the 5R,6S - Tg with 5 - CH₃ in equatorial is the most stable conformation, CCSD(T)/6 - 311 ++ G(d,p) calculation confirms the results. Further analysis showed that the synergistic effect of intramolecular hydrogen bonding and $\pi - \pi$ conjugation stabilized the equatorial conformation of 5R,6S - Tg.

Key words: Thymine glycol; DFT; Hydrogen bond; Stereoisomer

1 引言

细胞内呼吸作用和细胞外遗传毒性物质如化学物质、紫外辐射和电离辐射能导致生物体内产生大量活性氧 (ROS), 这些活性氧能导致 DNA

损伤, 从而导致疾病. 羟基自由基 (OH[·]) 是生物体内氧化能力最强的活性氧, 它能加成到电子密度高的胸腺嘧啶 C5 = C6 双键位置, 生成 5(6) - 羟基 - 胸腺嘧啶 - C6(C5) 自由基, 这种自由基能快速与 O₂ 反应生成胸腺嘧啶过氧自由基, 并最终

收稿日期: 2023-11-25

基金项目: 贵州省教育厅自然科学研究项目 ([2021]053); 贵州警察学院博士创新人才支持计划项目 (KY2024XJPD001)

作者简介: 王树栋 (1985—), 男, 博士, 主要从事理论化学研究. E-mail: wsd@gzpc.edu.cn

通信作者: 孙涛. E-mail: tsun@gzu.edu.cn; 吴敬杰. E-mail: Wjj972@163.com

生成重要的氧化损伤产物——胸腺嘧啶二醇 (Tg)^[1-3]. 此外, 5-甲基-胞嘧啶(5-mC)可以被氧化为5-mC 二醇, 脱氨基产生 Tg^[4, 5].

Tg 是人体内最常见的氧化产物, 正常细胞每天产生大量的 Tg^[2, 3, 6, 7], Wang 等人的最新研究发现, 人类基因组中包含数千个 Tg, 其在核小体结合位点分布丰富^[8]. 由于 C5 和 C6 原子的手性, Tg 一旦生成就可能以两对立体异构体混合物的形式存在, 即 5R 立体异构体(5R, 6S: 5R, 6R)和 5S 立体异构体(5S, 6R: 5S, 6S). 研究表明, 在所有的 DNA 氧化损伤类型中, Tg 对 DNA 聚合酶表现出最强的阻断能力. Tg 能对 DNA 双螺旋结构稳定性产生影响, 而修复蛋白对 Tg 的修复表现出明显的立体选择性, 一旦不能及时修复, Tg 可以导致细胞死亡、癌症等严重后果^[9-13]. 此外, Tg 还是电离辐射诱导 DNA 损伤的主要类型, 其与癌症放射治疗有密切关系^[14, 15]. 由于不宜受到意外氧化等因素的干扰, Tg 也是比 8-oxo-dG 更可靠的人体氧化应激标记物^[16]. 由于这些特殊的性质, Tg 一直备受关注^[17-21].

由于数量上的优势, 在 Tg 所有的异构体中, 5R, 6S-Tg 受到的关注最多(图 1(a)). NMR 实验表明 5R, 6S-Tg 的 C5 甲基(5-CH₃)可能存在轴向或赤道两种不同构象, 并对 DNA 的双螺旋结构产生不同的影响. 然而由于 NMR 未能确定 5-CH₃ 的取向, 5R, 6S-Tg 最稳定构象依然存在争论^[22-24]. 研究者通过量子化学计算方法对 5R, 6S-Tg 的稳定结构进行预测, 并判断 5-CH₃ 的构象^[5, 7, 25]. Stone 等人用 B3LYP 泛函, 分别在 6-31G(d)、6-31+G(d,p)、6-31G(d,p)、6-311++G(d,p) 水平对基于碱基的 Tg 模型(图 1(b), 简称 Tg')进行优化得到两种稳定结构, 认为当 5-CH₃ 取向为轴向时最稳定^[5], 而 Haranczyk 等人的研究认为当糖环存在时, Tg 的稳定构象发生重要反转, 原本不稳定的结构变得稳定^[7], 遗憾的是该研究并未考虑甲基的取向.

在本研究中, 从 PDB 晶体结构数据库中提取了两种不同构象的 5R, 6S-Tg(简称 Tg)(图 1(a)), 以及文献报道中使用的模型(图 1(b))作为初始结构, 运用量子化学计算方法对其最优结构进行探究. 选择 M06-2X 泛函结合 6-31+G(d,p)、6-311++G(d,p) 基函数对 Tg 进行优化^[26, 27], 同时选择 B3LYP 泛函作为比较和对照, 两种泛函分别得到三种稳定构象. MP2 和高精度

的簇耦合理论 CCSD(T)单点能计算表明, 当 5-CH₃ 取向为赤道构象时最稳定. 进一步的研究发现, 当 5-CH₃ 取向为赤道构象时, Tg 6-羟基(6-OH)能与 O6' 形成分子内氢键, 这种氢键与 π - π 共轭协同作用进一步稳定了构象, 这可能是影响 Tg 异构体稳定性的主要因素, 而文献报道所使用的模型(图 1(b)、1(c))忽略了这一重要问题. Tg 一直受到广泛关注, 因此这一发现应当引起研究者的重视.

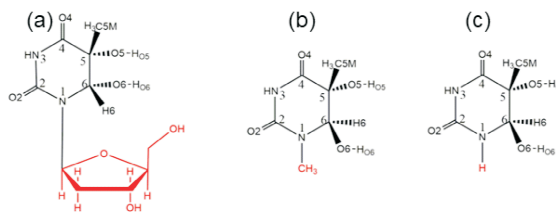


图 1 (a) 本研究使用的 5R, 6S-Tg 模型; (b)、(c) 文献报道使用的 5R, 6S-Tg 模型, 原子的命名根据通用规则

Fig. 1 (a) The 5R, 6S-Tg models used in the study; (b)、(c) the 5R, 6S-Tg models used in reports, and the naming of atoms follows general rules.

2 模型与计算方法

Tg 立体异构体的初始结构全部来自 PDB 晶体结构数据库(PDBID: 2KH5, 2KH6)^[22], 基于之前的研究, 对磷酸基团进行了质子化处理^[28, 29]. 因为在非共价相互作用、DNA 以及异构体能量预测等领域的可靠性质, 使用 M06-2X 泛函在 6-31+G(d,p) 和 6-311++G(d,p) 水平分别对基于甲基和核苷的 Tg 模型在气相进行几何优化, 分别得到三种稳定构象, 并在同一水平上进行频率计算, 确认结构为真实极小值^[27, 30, 31]. 基于优化得到的模型, 分别在 MP2 和高精度的簇耦合理论 CCSD(T) 水平计算了相应的单点能, 以确定 Tg 最稳定构型. 为了对比, 使用 B3LYP/6-31+G(d,p) 和 B3LYP/6-311++G(d,p) 对基于核苷水平的 Tg 模型进行几何优化, 同样得到三种稳定构象. 所有的结构优化使用 Gaussian09 程序包^[32], CCSD(T)单点能的计算使用 PSI4 程序包. 自然键轨道(NBO)分析在 M06-2X/6-311++G(d,p) 水平进行^[33]. 根据对嘧啶碱基的研究经验, 本文涉及到的 5-CH₃ 轴向或赤道构象, 根据 α (C₂-N₃-C₅-C₅M) 二面角确定, 而对于 5-OH 和 6-OH 分别用二面角 β (C₂-N₃-C₅-O₅)、 γ (N₃-C₄-C₆-O₆) 确

定^[29], $80^{\circ} \leq |\alpha|$, $|\beta|$, $|\gamma| \leq 100^{\circ}$ 定义为轴向构象, $120^{\circ} \leq |\alpha|$, $|\beta|$, $|\gamma| \leq 180^{\circ}$ 定义为赤道构象.

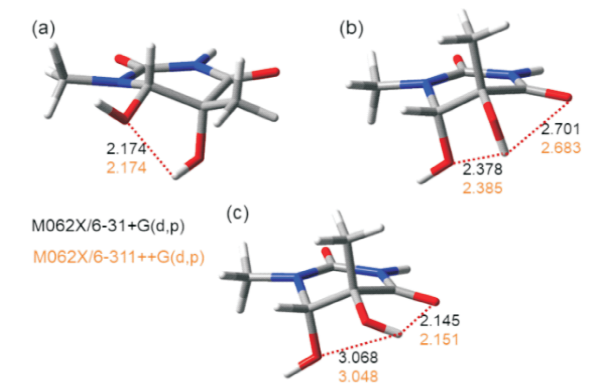


图 2 M06-2X/6-31+G(d,p) 和 M06-2X/6-311++G(d,p) 优化得到的 Tg' 稳定结构: (a) Tg'-eq; (b) Tg'-ax1; (c) Tg'-ax2, (Å)

Fig. 2 The Tg' stable structures optimized by M06-2X/6-31+G(d,p) and M06-2X/6-311++G(d,p): (a) Tg'-eq; (b) Tg'-ax1; (c) Tg'-ax2, (Å)

3 结果与讨论

3.1 碱基水平优化得到的结构

考虑到计算成本, 研究者往往使用简化模型研究碱基的结构, 如图 1(b) 或 1(c). 因此, 为了与文献报道进行对比, 本研究首先在 M06-2X/6-31+G(d,p) 和 M06-2X/6-311++G(d,p) 水平, 使用 N1 端甲基取代的碱基作为模型(如图 1(b), 标记为 Tg'), 对 Tg' 的全部异构体进行了优化, 得到三种稳定构象, 如图 2. 图 2(a) 代表 5-CH₃ 取向为赤道构象, 图 2(b) 和图 2(c) 都代表 5-CH₃ 取向为轴向构象, 但是 5-OH 的取向不同. 发现在图 2(a), $\alpha_{(C2-N3-C5-C5M)} = -142.0^{\circ}$, 5-CH₃ 取向为赤道构象(定义为 Tg'-eq), $\beta_{(C2-N3-C5-O5)} = 81.9^{\circ}$, 表明 5-OH 呈轴向构象, $\gamma_{(N3-C4-C6-O6)} = 130.0^{\circ}$, 表明 6-OH 呈赤道构象. 可以看出, 对于 Tg'-eq 构象(图 2(a)), 唯一的分子内氢键为 5-OH...O6, 此时, $\angle O5H_{O5} \cdots O6$ 为 109.8° , $dH_{O5} \cdots O6$ 为 2.174 \AA . 而对于图 2(b), $\alpha_{(C2-N3-C5-C5M)} = -83.8^{\circ}$, 5-CH₃ 取向为轴向构象(定义为 Tg'-ax1), $\beta_{(C2-N3-C5-O5)} = 140.1^{\circ}$, 表明 5-OH 呈赤道构象, $\gamma_{(N3-C4-C6-O6)} = 97.6^{\circ}$, 表明 6-OH 呈轴向构象. 此时, Tg'-ax1 同样只有唯一的分子内氢键 5-OH...O6,

$\angle O5H_{O5} \cdots O6$ 为 98.3° , $dH_{O5} \cdots O6$ 为 2.378 \AA . 图 2(c) 得到的结构与图 2(b) 非常接近, $\alpha_{(C2-N3-C5-C5M)} = -82.2^{\circ}$, 5-CH₃ 取向为轴向构象(定义为 Tg'-ax2), $\beta_{(C2-N3-C5-O5)} = 141.0^{\circ}$, 表明 5-OH 呈赤道构象, $\gamma_{(N3-C4-C6-O6)} = 96.0^{\circ}$, 表明 6-OH 呈轴向构象. 不同的是, 在 Tg'-ax2 中, 5-OH 与 O4 形成氢键, 此时 $\angle O5H_{O5} \cdots O4$ 为 115.2° , $dH_{O5} \cdots O4$ 为 2.145 \AA . 可以看出, 在得到的所有异构体中, 均存在由 5-OH 参与形成的氢键, 但是由于糖环被甲基替代, 所有构象中 6-OH 均不能与其它原子形成氢键.

为进一步对结果进行验证, 本文继续在 M06-2X/6-311+G(d,p) 水平对 Tg' 进行了优化, 得到的主要几何参数见图 1, 可以看出不同水平基函数得到的几何结构非常接近. M06-2X/6-311+G(d,p) 水平的能量表明, 5-CH₃ 为赤道构象时(Tg'-eq)体系的能量最高, 分别比 Tg'-ax1 和 Tg'-ax2 构象高 4.77 和 $4.67 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 这一结果与 Stone 等人 B3LYP/6-311++G(d,p) 得到的结果(赤道构象比轴向构象高 $4.42 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) 非常接近, 说明计算结果是可靠的^[5]. 而 MP2/6-311++G(d,p) 和 CCSD(T)/6-311++G(d,p) 计算同样表明 Tg'-eq 体系的能量最高, 分别比 Tg'-ax1 和 Tg'-ax2 高 6.13 和 $5.97 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (MP2) 或 5.76 和 $5.64 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (CCSD(T)).

3.2 核苷水平优化得到的结构

Haranczyk 等人的研究认为当糖环存在时, Tg 的稳定构象发生重要反转, 不稳定的结构变得稳定^[7]. 为了进一步探究 Tg 的稳定结构, 在核苷水平对 Tg 进行了优化, 初始结构全部来自 PDB 晶体结构数据库(PDBID: 2KH5, 2KH6)^[22]. 图(3) 是在 M06-2X/6-31+G(d,p) 水平优化得到的 Tg 结构, 在相同水平进行了频率验证, 证明得到的结构为局部极小值. 图 3(a) 代表 5-CH₃ 取向为赤道构象, 图 3(b) 和图 3(c) 都代表 5-CH₃ 取向为轴向构象, 但是 5-OH 的取向不同. 对于图 3(a), $\alpha_{(C2-N3-C5-C5M)} = -142.8^{\circ}$, 5-CH₃ 取向为赤道构象(定义为 Tg-eq), $\beta_{(C2-N3-C5-O5)} = 82.0^{\circ}$, 表明 5-OH 呈轴向构象, $\gamma_{(N3-C4-C6-O6)} = 129.2^{\circ}$, 表明 6-OH 呈赤道构象. 此时, 从距离上看 6-OH 靠近 O4' 或 O6', 可能与 O4' 或 O6' 形成分子内氢键, 几何结构分析表明, $\angle O6H_{O6} \cdots$

O4'为113.2°, $dH_{O_6} \cdots O4'$ 为2.347 Å, 而 $\angle O6H_{O_6} \cdots O6'$ 为159.1°, $dH_{O_6} \cdots O6'$ 为1.875 Å, 从几何参数分析, 6-OH更容易与O6'形成氢键. 同时, $\angle O5H_{O_5} \cdots O6$ 为112.0°, $dH_{O_5} \cdots O6$ 为2.132 Å, 表明5-OH可以与O6形成氢键. 可以看出, 由于特殊的结构, 两个氢键可能存在协同作用. 对于5-CH₃基团为轴向构象的体系(定义为Tg-ax), 研究发现, 由于5-OH的取向不同, 同样得到两种稳定结构, 如图3(b)和图3(c). 图3(b)中, $\alpha_{(C_2-N_3-C_5-C_{5M})} = -76.3^\circ$, 5-CH₃为轴向构象(定义为Tg-ax1), 5-OH为赤道构象($\beta_{(C_2-N_3-C_5-O_5)} = 146.2^\circ$), 6-OH为轴向构象($\gamma_{(N_3-C_4-C_6-O_6)} = 98.3^\circ$). 此时, 由于取向的原因, 6-OH不再与O4'或O6'形成分子内氢键, 但是5-OH与O6分子内氢键依然存在. 几何结构分析

表明, $\angle O5H_{O_5} \cdots O6$ 为97.2°, $dH_{O_5} \cdots O6$ 仅为2.400 Å. 而此时 $dH_{O_5} \cdots O4$ 为2.658 Å, $\angle O5H_{O_5} \cdots O4$ 为86.3°. 与Tg-ax1非常相似, 在图3(c)中, $\alpha_{(C_2-N_3-C_5-C_{5M})} = -75.0^\circ$, 5-CH₃同样为轴向构象(定义为Tg-ax2), 5-OH为赤道构象($\beta_{(C_2-N_3-C_5-O_5)} = 146.8^\circ$), 6-OH为轴向构象($\gamma_{(N_3-C_4-C_6-O_6)} = 96.8^\circ$). 不同的是, 此时5-OH明显偏向于O4, $\angle O5H_{O_5} \cdots O4$ 为115.6°, $dH_{O_5} \cdots O4$ 为2.149 Å, 而 $dH_{O_5} \cdots O6$ 增加到3.079 Å, $\angle O5H_{O_5} \cdots O6$ 为59.5°, 说明5-OH与O4形成一个比较强的氢键, 而不能与O6形成氢键. 同样, 6-OH均不能与O4'或O6'形成氢键, 分子内氢键的详细几何参数见表1. 从三种结构可以看出, 由于嘧啶环特殊的褶皱结构, 6-OH的取向与5-CH₃的取向保持一致.

表1 M06-2X/6-31+G(d,p)和M06-2X/6-311++G(d,p)(括号内)优化得到的分子内氢键参数, 键长: Å, 角度: °
Table 1 Intramolecular hydrogen bonding parameters optimized by M06-2X/6-31+G(d, p) and M06-2X/6-311++G(d, p) (in parentheses), bond: Å, angle: °

	Tg-eq	Tg-ax1	Tg-ax2	Tg'-eq	Tg'-ax1	Tg'-ax2
$dH_{O_6} - O_6'$	1.875 (1.872)	-	-	-	-	-
$O_6H_{O_6} - O_6'$	159.1 (160.8)	-	-	-	-	-
$dH_{O_6} - O_4'$	2.347 (2.369)	-	-	-	-	-
$O_6H_{O_6} - O_4'$	113.2 (113.1)	-	-	-	-	-
$dH_{O_5} - O_6$	2.132 (2.124)	2.400 (2.397)	3.079 (3.046)	2.174 (2.174)	2.378 (2.385)	3.068 (3.048)
$O_5H_{O_5} - O_6$	112.0 (112.4)	97.2 (97.6)	59.5 (61.4)	109.8 (110.1)	98.3 (98.0)	59.5 (61.8)
$dH_{O_5} - O_4$	-	2.658 (2.657)	2.149 (2.156)	-	2.701 (2.683)	2.145 (2.151)
$O_5H_{O_5} - O_4$	-	86.3 (86.2)	115.6 (115.2)	-	83.6 (84.4)	115.2 (115.0)

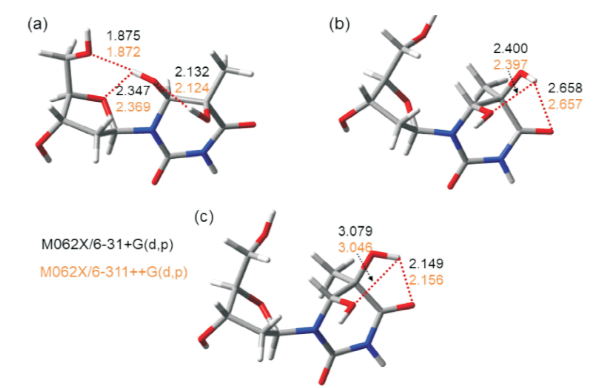


图3 M06-2X/6-31+G(d,p)和M06-2X/6-311++G(d,p)优化得到的Tg稳定结构(a)Tg-eq; (b)Tg-ax1; (c)Tg-ax2, (Å)
Fig. 3 The Tg stable structures optimized by M06-2X/6-31+G(d, p) and M06-2X/6-311++G(d, p): (a) Tg-eq; (b) Tg-ax1; (c) Tg-ax2, (Å)

M06-2X/6-31+G(d,p)能量计算表明, Tg-ax1和Tg-ax2异构体能量非常接近, 但是比Tg-eq构象的能量要分别高3.51和3.56 kcal·mol⁻¹(表2, 括号外为绝对能量, 括号内为相对能量). 显然, 计算结果表明当5-CH₃为赤道构象时5R, 6S-Tg更稳定. 为了进一步对结果进行验证, 本文在M06-2X/6-311++G(d,p)水平对三种结构进行优化并同样进行了频率验证, 得到的结果如图2和表1(由于两种方法优化得到的结构基本一致, 仅在图中用橙色标出主要几何参数的数值, 氢键详细几何参数在表1括号内). 可以看到, 不同基函数得到的结果非常一致. 此时, Tg-eq构象中 $\angle O6H_{O_6} \cdots O4'$ 为113.1°, $dH_{O_6} \cdots O4'$ 为2.369 Å, $\angle O6H_{O_6} \cdots O6'$ 为160.8°, $dH_{O_6} \cdots O6'$ 为1.872 Å; $\angle O5H_{O_5} \cdots O6$ 为112.4°, $dH_{O_5} \cdots O6$ 为2.124 Å. 而对于Tg-ax1, 5-OH同样偏

向于 6-OH, $\angle O5H_{O5}\cdots O6$ 为 97.6° , $dH_{O5}\cdots O6$ 仅为 2.397 \AA , $dH_{O5}\cdots O4$ 为 2.657 \AA , $\angle O5H_{O5}\cdots O4$ 为 86.2° ; 对于 Tg-ax2, $\angle O5H_{O5}\cdots O4$ 为 115.2° , $dH_{O5}\cdots O4$ 仅为 2.156 \AA , 而 $dH_{O5}\cdots O6$ 为 3.046 \AA , $\angle O5H_{O5}\cdots O6$ 为 61.4° . 能量计算表

表 2 M06-2X 泛函不同水平计算得到的 Tg(Tg') 异构体能量 (kcal·mol⁻¹)
Table 2 The energies of the Tg(Tg') isomers calculated at different levels of M06-2X (kcal·mol⁻¹)

	Tg-eq	Tg-ax1	Tg-ax2	Tg'-eq	Tg'-ax1	Tg'-ax2
M06-2X/6-31+G(d,p)	-643918.17 (0.00)	-643914.66 (3.51)	-643914.61 (3.56)	-404544.94 (0.00)	-404549.77 (-4.83)	-404549.80 (-4.86)
MP2/6-31+G(d,p)	-642391.21 (0.00)	-642388.35 (2.86)	-642388.09 (3.12)	-403584.66 (0.00)	-403590.93 (-6.27)	-403590.83 (-6.17)
M06-2X/6-311++G(d,p)	-644086.06 (0.00)	-644082.76 (3.30)	-644082.64 (3.42)	-404650.29 (0.00)	-404655.06 (-4.77)	-404654.96 (-4.67)
MP2/6-311++G(d,p)	-642652.42 (0.00)	-642650.48 (1.94)	-642650.22 (2.20)	-403746.82 (0.00)	-403752.95 (-6.13)	-403752.79 (-5.97)
CCSD(T)/6-311++G(d,p)	-642772.79 (0.00)	-642769.92 (2.87)	-642769.77 (3.02)	-403829.14 (0.00)	-403834.90 (-5.70)	-403834.78 (-5.64)

同样使用 MP2 和高精度的簇耦合理论 CCSD(T) 对 Tg 异构体的单点能进行了计算, 得到的结果见表 2. CCSD(T)/6-311++G(d,p) 计算显示 Tg-eq 构象能量分别低于 Tg-ax1 和 Tg-ax2 构象 2.87 、 $3.02\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, 这一结果与 M062X/6-31+G(d,p)//M062X/6-311++G(d,p) 计算得到的结果非常接近, 但是与使用简化模型(Tg') 得到的结论完全相反.

B3LYP 是一种常用的杂化泛函^[34, 35], 文献对 Tg 的研究也使用了该泛函^[5]. 为了进一步验证泛函对结果的影响, 使用 B3LYP 泛函分别在 6-31+G(d,p) 和 6-311++G(d,p) 水平对 Tg 进行优化. 初始结构同样来自 PDB 蛋白晶体结构数据库 (PDBID: 2KH5, 2KH6)^[22]. 可以看到, B3LYP 泛函得到的氢键的主要几何参数与 M06-2X 泛函得到的结果非常一致(表 3). B3LYP/6-31+G(d,p)//MP2/6-31+G(d,p) 计算结果表明, Tg-eq 分别比 Tg-ax1、Tg-ax2 构象低 3.41 和 $3.50\text{ kca}\cdot\text{mol}^{-1}$ (表 4), 绝对值略高于 M06-2X/6-31+G(d,p)//MP2/6-31+G(d,p) 计算结果. 而 B3LYP/6-311++G(d,p)//MP2/6-311++G(d,p) 计算结果表明, 赤道构象分别比轴向 1 和轴向 2 构象低 2.02 和 $2.16\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, 与 M06-2X/6-311++G(d,p)//MP2/6-311++G(d,p) 计算结果非常一致, 这说明 M06-2X 泛函计算得到的结果是可靠的.

明, Tg-ax1 和 Tg-ax2 异构体能量比 Tg-eq 构象的能量要分别高 3.30 和 $3.42\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (表 2). 说明对于 Tg 体系, 无论是 6-31+G(d,p) 还是更高水平的 6-311++G(d,p) 的基函数, 使用 M06-2X 泛函优化得到的结果一致.

表 3 B3LYP/6-31+G(d,p) 和 B3LYP/6-311++G(d,p) (括号内) 优化得到的分子内氢键参数, 键长: \AA , 角度: $^\circ$
Table 3 Intramolecular hydrogen bonding parameters optimized by B3LYP/6-31+G(d,p) and B3LYP/6-311++G(d,p) (in parentheses), bond: \AA , angle: $^\circ$

	Tg-eq	Tg-ax1	Tg-ax2
$dH_{O6}-O6'$	1.856 (1.862)	-	-
$O6H_{O6}-O6'$	164.1 (165.1)	-	-
$dH_{O6}-O4'$	2.485 (2.497)	-	-
$O6H_{O6}-O4'$	109.7 (109.4)	-	-
$dH_{O5}-O6$	2.130 (2.123)	2.322 (2.307)	3.103 (3.088)
$O5H_{O5}-O6$	112.6 (112.9)	101.7 (102.5)	58.6 (59.4)
$dH_{O5}-O4$	-	2.804 (2.810)	2.138 (2.139)
$O5H_{O5}-O4$	-	79.8 (79.2)	116.4 (116.3)

4 NBO 及氢键相互作用能分析

从图 2 和图 3 可以看到, 两种不同模型最大的区别在于 6-OH 能否与周围的 O 形成氢键. 本研究使用 Bartolotti 等人提出的 MTA (Molecular tailoring approach) 方法^[36], 计算了分子内氢键的相

表4 B3LYP 不同水平计算得到的 Tg 异构体能量 (kcal·mol⁻¹)

Table 4 The energy of the Tg isomers calculated at different levels of B3LYP(kcal·mol⁻¹)

	Tg - eq	Tg - ax1	Tg - ax2
B3LYP/6 - 31 + G (d,p)	-644171. 17 (0. 00)	-644168. 76 (2. 41)	-644168. 83 (2. 34)
MP2/6 - 31 + G (d,p)	-642394. 00 (0. 00)	-642390. 59 (3. 41)	-642390. 50 (3. 50)
B3LYP/6 - 311 ++ G (d,p)	-644326. 81 (0. 00)	-644324. 72 (2. 09)	-633324. 78 (2. 03)
MP2/6 - 311 ++ G (d,p)	-642654. 89 (0. 00)	-642652. 87 (2. 02)	-642652. 73 (2. 16)

相互作用能. M062X/6 - 311 ++ G(d,p) 计算表明, 这一氢键的相互作用能约为 5.50 kcal·mol⁻¹. 自然键轨道理论(NBO)分析用定域轨道相互作用的角度来描述分子内或分子间成键, 自然键轨道二阶微扰能能够提供分子内或分子间相互作用的本质和强弱. $E^{(2)}$ 定义为:

$$E^{(2)} = \Delta E_{ij}^{(2)} = q_i \frac{F(i,j)^2}{\varepsilon_j - \varepsilon_i}$$

其中, $F(i, j)$ 为由给体轨道(NBOs) φ_i 与受体轨道 φ_j 构成的 Fock 矩阵元, q_i 为给体轨道 φ_i 的占据数, ε_j 和 ε_i 为自然键轨道能量.

基于 M062X/6 - 311 ++ G(d,p) 优化得到的结构, 在相同水平进行了 NBO 分析, 计算了 O4' 和 O6' 孤电子对对相邻轨道的二阶微扰能 $E^{(2)}$, 结果显示 O4' 孤电子对(LP O4') 与 $\sigma^*(O_6 - H_{O6})$ 的二阶微扰能 $E^{(2)}$ 为 1.01 kcal·mol⁻¹, 而 O6' 孤电子对(LP O6') 与 $\sigma^*(O_6 - H_{O6})$ 的二阶微扰能 $E^{(2)}$ 高达 9.45 kcal·mol⁻¹, 这表明 O6' 与 6 - OH 的相互作用更强烈, 结果与优化得到的几何结构参数一致. 同时, 二阶微扰能计算结果与体系能量计算结果非常一致. (M06 - 2X/6 - 311 ++ G(d,p) 能量计算表明, 由于考虑了糖环部分, 赤道构象的 Tg 能量相对两种轴向构象分别降低 8.07 和 8.09 kcal·mol⁻¹, 非常接近二阶微扰稳定化能的贡献).

使用 Multiwfn 对分子轨道分析显示^[37], 由于特殊的几何结构, O6' 的 π 轨道与 O6 的 π 轨道非常接近面对面的共轭关系, 这种特殊的氢键和 $\pi - \pi$ 共轭的协同作用让 Tg - eq 构象更加稳定(图4).

5 结 论

本研究中, 分别使用可靠的 M06 - 2X 和 B3LYP 泛函, 结合 6 - 31 + G(d,p) 和 6 - 311 ++

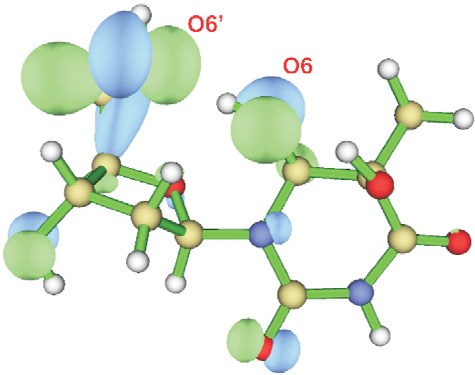


图4 LPO6 和 LPO6' - 相互作用示意图
Fig. 4 The - interaction of LPO6 and LPO6'

G(d,p) 基函数对 5R, 6S - Tg 的两种模型进行优化, 分别得到三种稳定构象, 使用高精度的耦合簇理论 CCSD(T) 计算了体系的单点能. 研究表明, Tg 6 - OH 可以与 O6' 以氢键和 $\pi - \pi$ 共轭协同作用的方式稳定 Tg, 并对 Tg 立体结构的稳定性产生重要影响. 基于碱基水平的模型由于忽略了糖环和 O6' 的影响, 得到的结论并不可靠. 因此, 本研究认为对于胸腺嘧啶二醇(Tg)的理论研究, 选取模型应至少基于核苷水平. 而基于合理的模型, M06 - 2X 和 B3LYP 泛函结合 6 - 31 + G(d,p) 基函数得到的结论是可靠的. 研究还表明, 6 - OH 取向的变化对于 Tg 的结构非常重要. 由于靠近 DNA 磷酸骨架的外侧, 6 - OH 除了可以形成分子内氢键, 还可能与相邻碱基或氨基酸的 N、O 等电负性强的原子形成分子间氢键, 进而对 Tg 异构体的分布产生影响. Tg 是一种著名的氧化损伤, 且存在多种立体异构体, 因此 Tg 稳定异构体的确定对于 DNA 氧化损伤领域的研究有重要的意义. 本文的研究为 Tg 以及其它类型 DNA 氧化损伤的研究提供了重要的启示.

参考文献:

[1] Yu Y, Cui Y, Niedernhofer L J, *et al.* Occurrence, biological consequences, and human health relevance of oxidative stress - induced DNA damage[J]. *Chem. Res. Toxicol.*, 2016, 29: 2008.

[2] Wagner J R, Madugundu G S, Cadet J. Ozone - induced DNA damage: a pandora's box of oxidatively modified DNA bases[J]. *Chem. Res. Toxicol.*, 2021, 34: 80.

[3] Sun H, Taverna Porro M L, Greenberg M M. Independent generation and reactivity of thymidine radical cations[J]. *J. Org. Chem.*, 2017, 82: 11072.

- [4] Cao H, Jiang Y, Wang Y. Kinetics of deamination and Cu(II)/H₂O₂/ascorbate-induced formation of 5-methylcytosine glycol at CpG sites in duplex DNA[J]. *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37: 6635.
- [5] Brown K L, Adams T, Jasti V P, *et al.* Interconversion of the cis-5R,6S- and trans-5R,6R-thymine glycol lesions in duplex DNA[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130: 11701.
- [6] Frenkel K, Goldstein M S, Teebor G W. Identification of the cis-thymine glycol moiety in chemically oxidized and gamma-irradiated deoxyribonucleic acid by high-pressure liquid chromatography analysis[J]. *Biochemistry*, 1981, 20: 7566.
- [7] Haranczyk M, Lupica G, Dabkowska I, *et al.* Cylindrical projection of electrostatic potential and image analysis tools for damaged DNA: the substitution of thymine with thymine glycol[J]. *J. Phys. Chem. B*, 2008, 112: 2198.
- [8] Bellon S, Ravanat J L, Gasparutto D, *et al.* Cross-linked thymine-purine base tandem lesions: synthesis, characterization, and measurement in gamma-irradiated isolated DNA[J]. *Chem. Res. Toxicol.*, 2002, 15: 598.
- [9] Makarova A V, Boldinova E O, Belousova E A, *et al.* In vitro lesion bypass by human primpol[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2018, 70: 18.
- [10] Aller P, Rould M A, Hogg M, *et al.* A structural rationale for stalling of a replicative DNA polymerase at the most common oxidative thymine lesion, thymine glycol[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104: 814.
- [11] Ocampo-Hafalla M T, Altamirano A, Basu A K, *et al.* Repair of thymine glycol by hNth1 and hNei1 is modulated by base pairing and cis-trans epimerization[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2006, 5: 444.
- [12] Kao J Y, Goljer I, Phan T A, *et al.* Characterization of the effects of a thymine glycol residue on the structure, dynamics, and stability of duplex DNA by NMR[J]. *J. Biol. Chem.*, 1993, 268: 17787.
- [13] Aller P, Duclos S, Wallace S S, *et al.* A crystallographic study of the role of sequence context in thymine glycol bypass by a replicative DNA polymerase serendipitously sheds light on the exonuclease complex[J]. *J. Mol. Biol.*, 2011, 412: 22.
- [14] Breimer L H, Lindahl T. Thymine lesions produced by ionizing radiation in double-stranded DNA[J]. *Biochemistry*, 1985, 24: 4018.
- [15] Hruska F E, Sebastian R, Grand A, *et al.* Characterization of a gamma-radiation-induced decomposition product of thymidine. Crystal and molecular structure of the cis(5R,6S) thymidine glycol[J]. *Can. J. Chem.*, 1987, 65: 2618.
- [16] Collins A R, Cadet J, Möller L, *et al.* Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells[J]. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004, 423: 57.
- [17] Tang F, Yuan J, Yuan B F, *et al.* DNA-protein cross-linking sequencing for genome-wide mapping of thymidine glycol[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2022, 144: 454.
- [18] Sato Y, Takaku Y, Nakano T, *et al.* Synthetic DNA binders for fluorescent sensing of thymine glycol-containing DNA duplexes and inhibition of endonuclease activity[J]. *Chem. Commun.*, 2023, 59: 6088.
- [19] Naldiga S, Huang H, Greenberg M M, *et al.* Mutagenic effects of a 2-deoxyribonolactone-thymine glycol tandem DNA lesion in human cells[J]. *Biochemistry*, 2020, 59: 417.
- [20] Tomar R, Minko I G, Sharma P, *et al.* Base excision repair of the N-(2-deoxy-d-erythro-pentofuranosyl)-urea lesion by the hNEIL1 glycosylase[J]. *Nucleic Acids Res.*, 2023, 51: 3754.
- [21] Sarmini L, Meabed M, Emmanouil E, *et al.* Requirement of transcription-coupled nucleotide excision repair for the removal of a specific type of oxidatively induced DNA damage[J]. *Nucleic Acids Res.*, 2023, 51: 4982.
- [22] Brown K L, Roginskaya M, Zou Y, *et al.* Binding of the human nucleotide excision repair proteins XPA and XPC/HR23B to the 5R-thymine glycol lesion and structure of the cis-(5R,6S) thymine glycol epimer in the 5'-GTgG-3' sequence: destabilization of two base pairs at the lesion site[J]. *Nucleic Acids Res.*, 2010, 38: 428.
- [23] Brown K L, Basu A K, Stone M P. The cis-(5R,6S)-thymine glycol lesion occupies the wobble position when mismatched with deoxyguanosine in DNA[J]. *Biochemistry*, 2009, 48: 9722.
- [24] Kung H C, Bolton P H. Structure of a duplex DNA containing a thymine glycol residue in solution[J]. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272: 9227.
- [25] Miaskiewicz K, Miller J, Osman R. *Ab initio* theoretical study of the structures of thymine glycol and dihydrothymine[J]. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1993, 63: 677.
- [26] Walker M, Harvey A J A, Sen A, *et al.* Performance

- of M06, M06 – 2X, and M06 – HF density functionals for conformationally flexible anionic clusters: M06 functionals perform better than B3LYP for a model system with dispersion and ionic hydrogen – bonding interactions[J]. *J. Phys. Chem. A*, 2013, 117: 12590.
- [27] Zubatiuk T, Shishkin O, Gorb L, *et al.* B – DNA characteristics are preserved in double stranded d(A)₃ [round bullet, filled] d(T)₃ and d(G)₃ [round bullet, filled] d(C)₃ mini – helixes: conclusions from DFT/M06 – 2X study [J]. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, 15: 18155.
- [28] Dupont C, Patel C, Ravanat J L, *et al.* Addressing the competitive formation of tandem DNA lesions by a nucleobase peroxy radical: a DFT – D screening[J]. *Org. Biomol. Chem.*, 2013, 11: 3038.
- [29] Wang S D, Zhang R B, Cadet J. Enhanced reactivity of the pyrimidine peroxy radical towards the C – H bond in duplex DNA – a theoretical study[J]. *Org. Biomol. Chem.*, 2020, 18: 3536.
- [30] Zhao Y, Truhlar D G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06 – class functionals and 12 other functionals[J]. *Theor. Chem. Acc.*, 2008, 120: 215.
- [31] Rayne S, Forest K. Performance of the M062X density functional against the ISOL set of benchmark isomerization energies for large organic molecules [J]. *Nat. Prec.*, 2010, 5183: 1.
- [32] Frisch M J, Trucks G W, Schlegel H B, *et al.* Gaussian 09, Revision A. 01. Wallingford: Gaussian, Inc., Wallingford. 2009.
- [33] Reed A E, Curtiss L A, Weinhold F. Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor – acceptor viewpoint[J]. *Chem. Rev.*, 1988, 88: 899.
- [34] Liu C, Yu G, Huang C Y, *et al.* Site preferences of nucleic acids bases hydrogen bonding to glycine dipeptide[J]. *Acta Chim. Sinica*, 2015, 73: 357 (in Chinese) [刘畅, 于歌, 黄翠英, 等. 核酸碱基与甘氨酸二肽间氢键作用的最佳位点[J]. 化学学报, 2015, 73: 357]
- [35] Xin G P, Mao M, Liu X P, *et al.* Density functional theory study on molecular structural and properties of dihydromyricetin[J]. *J. At. Mol. Phys.*, 2025, 42: 011005 (in Chinese) [辛国鹏, 毛敏, 刘信平, 等. 二氢杨梅素分子结构与性质的密度泛函理论研究[J]. 原子与分子物理学报, 2025, 42: 011005]
- [36] Deshmukh M M, Gadre S R, Bartolotti L J. Estimation of intramolecular hydrogen bond energy via molecular tailoring approach [J]. *J. Phys. Chem. A*, 2006, 110: 12519.
- [37] Lu T, Chen F W. Multiwfn: a multifunctional wavefunction analyzer[J]. *J. Comput. Chem.*, 2012, 33: 580.