



УДК 577.3

© 2010

О. О. Броварець, академік НАН України **Л. А. Булавін**,
член-кореспондент НАН України **Д. М. Говорун**

Чи можуть білки таутомеризувати основи ДНК: фізична відповідь на біологічно важливе запитання

На простих модельних системах сучасними квантово-механічними методами доведено, що біологічно приваблива ідея про таутомеризацію основ ДНК білками, зокрема реплікативного комплексу, є неадекватною з фізичної точки зору. Висловлено припущення про те, що ці білки, швидше за все, виконують діаметрально протилежні функції, а саме — контролюють таутомерний статус основ ДНК.

Прототропна таутомерія нуклеотидних основ є одним із фізичних джерел спонтанних точкових мутацій ДНК. Вперше це було постульовано Вотсоном і Криком та якісно обгрунтовано Топалом і Фреско у роботах [1, 2], які вважаються класичними. Логічним продовженням цих досліджень стало їхнє експериментальне підтвердження [3–5] та квантово-механічне обгрунтування [6]. У попередніх наших роботах [7, 8] запропоновано прості фізичні механізми інгібування синтезу пар нуклеотидів за участі рідкісних таутомерів білками реплікативного комплексу.

Разом з тим у літературі тривалий час дискутується питання про елементарні фізичні механізми власне таутомеризації (тобто переходу із основної, канонічної таутомерної форми у рідкісну, мутагенну [9]) основ ДНК (див., наприклад, [10] та наведену там бібліографію). Виокремилися два підходи: таутомеризація водою, а саме — макро-, мікрооточенням або поодинокими молекулами, і таутомеризація основ у комплементарних парах за рахунок перенесення протонів — так званий механізм Льовдіна [10]. Перший із них є універсальним і, в принципі, пояснює як таутомеризацію основ ДНК у процесі реплікації останньої, так і основ нуклеотидів, що включаються в ДНК під час її біосинтезу. Другий стосується виключно основ ДНК, що реплікуються.

Враховуючи певні труднощі, з якими пов'язані вищезгадані підходи, у роботі [11] висловлену оригінальну думку про можливість таутомеризації основ ДНК білками, які разом із нею функціонують, або, іншими словами, — про можливий “мутагенний” тиск білків на ДНК.

Метою даної роботи є фізична перевірка цієї біологічно важливої гіпотези. Використовуючи прості молекулярні моделі таутомеризації основ ДНК бічними радикалами деяких амінокислот та сучасні квантово-механічні методи, нам вдалося показати, що вона не має під собою фізичного підґрунтя. Це, швидше за все, означає, що білки реплікативного комплексу відіграють роль, протилежну тій, що постулювалася у роботі [11], а саме — пригнічують, інгібують спонтанну таутомеризацію основ ДНК.

Об'єкти і методи дослідження. Об'єктами дослідження слугували воднево-зв'язані (за місцем Вотсон–Криківського спарювання) комплекси, утворені усіма чотирма канонічними основами ДНК з мурашиною кислотою — найпростішою молекулярною моделлю бічних залишків аспарагінової та глютамінової кислот. Саме ці амінокислоти вибрані нами з огляду на те, що їхні бічні залишки, маючи нульову енергію таутомеризації, практично не змінюють свого просторового розміщення відносно основи при такому процесі і не створюють тим самим стеричних ускладнень.

Квантово-механічні розрахунки геометричної та електронної будови досліджуваних об'єктів проведено на рівні теорії DFT B3LYP/6-311 + +G(d,p) у вакуумному наближенні.

Усі зоптимізовані структури перевірено на стійкість за відсутністю уявних частот у їхніх коливальних спектрах, які розраховували у гармонійному наближенні.

Електронну енергію взаємодії у комплексах визначали на рівні теорії MP2/6-311 + +G(2df, pd)//B3LYP/6-311 + +G(d,p) з урахуванням так званої BSSE-поправки на базисний набір функцій [12].

Квантово-механічні розрахунки проведено із використанням програмного пакету "GAUSSIAN03" для платформи Win32 [13].

Міжмолекулярні Н-зв'язки ідентифікували та досліджували методом аналізу топології електронної густини [14] (так звана квантово-механічна теорія Бейдера атомів у молекулах), використовуючи хвильові функції, отримані на рівні теорії B3LYP/6-311 + +G(d,p).

Топологію електронної густини аналізували за допомогою програмного пакету AIM2000.

Перехідні стани таутомеризації локалізували на рівні теорії MP2/6-311 + +G(2df, pd)//B3LYP/6-311 + +G(d,p). Енергію класичних міжмолекулярних водневих (Н) зв'язків визначали за методом Йогансена [15], що ґрунтується на зсуві частоти валентних коливань атомних груп — донорів Н-зв'язку, використовуючи при цьому вибіркоче дейтерування, зокрема одного із амінних атомів водню, не задіяних у Вотсон–Криківському спарюванні, для усунення механічних резонансів тестових нормальних коливань із сусідніми.

Результати та їх обговорення. Підхід, використаний у нашій роботі, ґрунтується, по суті, на відомій моделі Льовдіна, з тією лише різницею, що роль комплементарної основи відіграє модельний залишок амінокислоти, а саме — мурашина кислота, що взаємодіє з основою парою Н-зв'язків за місцем Вотсон–Криківського спарювання. При цьому, як і за Льовдіним, таутомеризація основ має відбуватися у три етапи: 1) залишок амінокислоти зв'язується двома Н-зв'язками з основою; 2) у процесі теплових флуктуацій відбувається таутомеризація основи у комплексі за рахунок перенесення протонів вздовж міжмолекулярних Н-зв'язків; 3) комплекс, що утворився, дисоціює у процесі теплових флуктуацій на складові — в результаті отримуємо основу ДНК у рідкісній, мутагенній формі.

Зрозуміло, що ефективність таутомеризації буде визначатися, з одного боку, її енергетичним бар'єром, а з іншого — відносною енергією комплексу за участі рідкісного таутомера порівняно зі стартовим комплексом за участі канонічного таутомера. Необхідною ж умовою цього процесу є динамічна стійкість комплексу за участі мутагенного таутомера, тобто

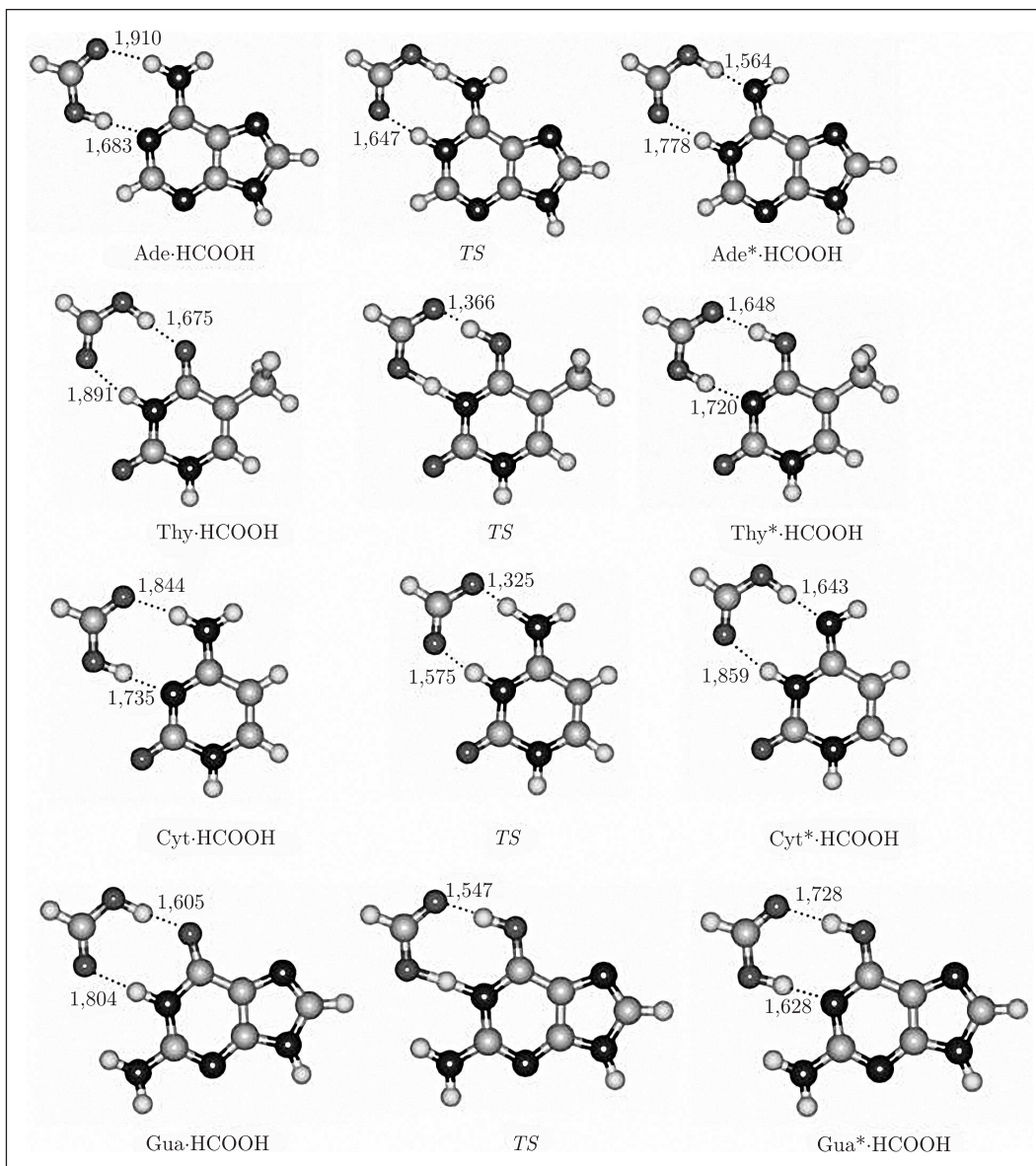


Рис. 1. Геометрична структура досліджених комплексів: міжмолекулярні водневі зв'язки АН... В зображено пунктиром, їхні довжини подано в Å; *TS* — перехідний стан таутомеризації

енергетичний бар'єр переходу із цього стану у стартовий повинен бути високим порівняно з енергією нульових коливань, термічне збудження яких проковує згаданий зворотний перехід.

Отримані нами результати наведено на рис. 1 та у табл. 1 і 2. Аналізуючи їх та узагальнюючи, доходимо таких висновків.

Кожен із зображених на рис. 1 стартових та таутомеризованих комплексів стабілізується двома нееквівалентними Н-зв'язками: згідно з існуючою класифікацією, їх можна віднести до середніх та сильних, оскільки їхня енергія лежить у межах 4,69–12,28 ккал/моль. Такий же самий висновок можна зробити, спираючись на їхні електронно-топологічні та геометричні характеристики. Характерно, що у таутомеризованих комплексах сумарна енергія

міжмолекулярних Н-зв'язків, що їх стабілізують, помітно посилюється порівняно зі стартовими комплексами. При цьому найбільший ефект спостерігається у комплексі за участі Ade: якщо енергія Н-зв'язку N4H...O у стартовому комплексі становить лише 4,69 ккал/моль (це найменше значення серед усіх досліджуваних комплексів), то при його таутомеризації вона посилюється до 12,28 ккал/моль, тобто більше, ніж удвічі. Характерно, що енергетичні параметри чітко корелюють з електронно-топологічними та геометричними, які змінюються при цьому від мінімальних ($\rho = 0,027$ ат. од., $\Delta\rho = 0,084$ ат. од., $\Delta d_{AH} = 0,015$ Å) до максимальних ($\rho = 0,075$ ат. од., $\Delta\rho = 0,144$ ат. од., $\Delta d_{AH} = 0,080$ Å). Цікаво, що у всіх шістьох

Таблиця 1. Електронно-топологічні, геометричні, спектрально-коливальні та енергетичні характеристики міжмолекулярних Н-зв'язків у досліджуваних структурах

Комплекси	Н-зв'язок АН...В	ρ , ат. од.	$\nabla^2\rho$, ат. од.	$100 \cdot \varepsilon$	$d_{A...B}$, Å	$d_{H...B}$, Å	$\angle AN...B$, град.	Δd_{AH} , Å	$-\Delta\nu$, см ⁻¹	$E_{НВ}$, ккал/моль
Ade · HCOOH	ОН...N1	0,057	0,097	5,13	2,704	1,683	174,60	0,051	940,1	9,90
	N6H...O	0,027	0,096	3,78	2,932	1,910	168,60	0,015	242,0	4,69
Ade* · HCOOH	N1H...O	0,038	0,119	3,24	2,813	1,778	172,49	0,023	392,9	6,20
	ОН...N6	0,075	0,084	4,68	2,614	1,564	178,02	0,080	1425,6	12,28
Thy · HCOOH	ОН...O4	0,046	0,138	2,14	2,674	1,675	178,80	0,029	545,4	7,42
	N3H...O	0,028	0,098	2,77	2,920	1,891	166,20	0,017	275,2	5,06
Thy* · HCOOH	O4H...O	0,050	0,139	2,09	2,650	1,648	176,80	0,032	610,4	7,88
	ОН...N3	0,051	0,097	5,16	2,735	1,720	176,00	0,044	821,4	9,22
Gua · HCOOH	N1H...O	0,036	0,116	3,34	2,834	1,804	173,58	0,018	319,1	5,51
	ОН...O6	0,056	0,144	2,09	2,620	1,605	177,18	0,043	801,0	9,10
Gua* · HCOOH	ОН...N1	0,065	0,094	4,96	2,659	1,628	175,67	0,061	1118,2	10,84
	O6H...O	0,041	0,125	2,25	2,719	1,728	177,58	0,023	457,6	6,74
Cyt · HCOOH	ОН...N3	0,049	0,096	5,59	2,749	1,735	179,00	0,043	808,0	9,14
	N4H...O	0,032	0,108	3,76	2,868	1,844	172,00	0,017	293,5	5,25
Cyt* · HCOOH	N3H...O	0,030	0,103	3,17	2,890	1,859	169,30	0,019	319,8	5,52
	ОН...N4	0,061	0,099	4,98	2,669	1,643	177,80	0,055	1025,4	10,36

Примітка. ρ і $\Delta\rho$ — значення електронної густини і лапласіану електронної густини у критичній точці відповідно; ε — еліптичність; $d_{ВСР-РСР}$ — відстань від критичної точки зв'язку (ВСР) до кругової критичної точки (РСР) [14]; $E_{НВ}$ — енергія Н-зв'язку [15]. Зірочкою позначено мутагенні таутомери основ.

Таблиця 2. Енергетичні характеристики досліджуваних комплексів: результати квантово-механічних розрахунків на рівні теорії MP2/6-311 + +G(2df,pd)//B3LYP/6-311 + +G(d,p)

Комплекси	E_{int} , ккал/моль	$\Sigma E_{НВ}$, ккал/моль	$\Sigma E_{НВ}/E_{int}$, %	$\Delta\Delta G_{TS}$, ккал/моль	$\Delta\Delta G$		ΔG , ккал/моль
					ккал/моль	см ⁻¹	
Ade · HCOOH	17,90	14,59	81,53	6,42	-1,10	-355,3	7,53
Ade* · HCOOH	25,54	18,48	72,37				
Thy · HCOOH	14,88	12,48	83,86	7,34	0,20	64,4	7,14
Thy* · HCOOH	21,76	17,11	78,62				
Gua · HCOOH	21,61	14,62	67,62	1,92	-0,60	-194,6	2,52
Gua* · HCOOH	19,45	17,58	90,39				
Cyt · HCOOH	19,54	14,40	73,69	4,05	1,36	440,1	2,69
Cyt* · HCOOH	18,92	15,88	83,94				
Ade · Thy	14,92	13,02	87,25	11,05	-1,01	-326,8	12,07
Ade* · Thy*	33,80	22,49	66,55				
Gua · Cyt	29,28	17,04	58,20	9,70	1,49	479,9	8,22
Gua* · Cyt*	22,94	19,72	85,99				

Примітка. E_{int} — електронна енергія міжмолекулярної взаємодії; $\Sigma E_{НВ}$ — сумарна енергія міжмолекулярних внутрішньопарних Н-зв'язків; $\Delta\Delta G_{TS}$ — енергетичний бар'єр таутомеризації; $\Delta\Delta G$ — зворотний енергетичний бар'єр; ΔG — відносна енергія таутомеризованого комплексу.

випадках, про які щойно йшлося, сумарна енергія міжмолекулярних Н-зв'язків становить лише 67,6–90,4% від електронної енергії міжмолекулярної взаємодії. Це вкотре говорить про те, що не можна ототожнювати енергію міжмолекулярної взаємодії у Н-зв'язаних комплексах з енергією останніх.

Привертає до себе увагу той факт, що електронна енергія взаємодії у комплексі Ade · НСООН (17,90 ккал/моль) помітно перевищує аналогічну величину для Вотсон–Криківської пари Ade·Thy (14,92 ккал/моль). Це свідчить про те, що карбоксильні залишки амінокислот можуть конкурувати із Thy/Ade за зв'язування з Ade/Thy, тобто маємо елементарний фізичний механізм розкриття пари Ade · Thy (або у більш узагальненому вигляді — розплітання ділянок подвійної спіралі ДНК, збагаченої на пари Ade · Thy) спеціалізованими білками.

Не можна оминати увагою також і те, що утворення комплексу Ade · НСООН поляризує сусідню групу С2Н таким чином, що її довжина порівняно з вільним станом скорочується на $2 \cdot 10^{-5}$ Å, а частота валентного коливання $\nu(\text{C2H})$ зростає на $3,6 \text{ см}^{-1}$. Це частково пояснює, чому утворення третього Н-зв'язку С2Н...О2 у Вотсон–Криківській парі Ade · Thy [9, 10] не супроводжується низькочастотним зсувом нормального коливання $\nu(\text{C2H})$.

Для комплексів Cyt·НСООН та Cyt*·НСООН перехідний стан таутомеризації *TS* являє собою Н-зв'язану йонну пару “депротонована мурашина кислота · протонувана основа”, що стабілізується двома Н-зв'язками. Це означає, що механізм перенесення протонів уздовж міжмолекулярних Н-зв'язків, що стабілізують комплекси, є естафетним: спочатку вздовж одного із міжмолекулярних Н-зв'язків переноситься протон від амінокислотного залишку до основи, протонуючи її; потім сусідній протон основи, що задіяний у іншому Н-зв'язку, переноситься від основи на атом кисню депротонованої мурашиної кислоти, що несе на собі значний негативний заряд. Для трьох інших комплексів фізичний механізм таутомеризації теж естафетний — він починається з перенесення гідроксильного протону карбоксильної групи на атом кисню основи у комплексах Thy · НСООН, Gua · НСООН та на атом азоту основи у комплексі Ade · НСООН вздовж міжмолекулярного Н-зв'язку. При цьому сусідній зв'язок NH основи (N3H в Thy, N1H в Gua та N6H в Ade) подовжується настільки, що утворюються два розрихлені хімічні зв'язки N–H–O (позначені рисками).

Порівнюючи енергетичні бар'єри таутомеризації та відносну енергію таутомеризованих комплексів з аналогічними величинами для Вотсон–Криківських пар Ade · Thy і Gua · Cyt (див. табл. 2), неважко переконатися у тому, що перші мають незаперечні переваги над останніми. Проте ці переваги зводяться нанівець доведеним фактом динамічної нестабільності таутомеризованих комплексів: для комплексу Gua · НСООН зворотний бар'єр взагалі відсутній. Дійсно, енергетичні бар'єри зворотного переходу комплексів із таутомеризованої форми у основну (див. табл. 2) значно менші, ніж нульова енергія відповідних коливань, термічне збудження яких спричиняє вищезгаданий зворотний перехід. Для прикладу, у комплексі Cyt* · НСООН, який має найбільшу енергію зворотного переходу ($440,1 \text{ см}^{-1}$), його величина помітно менша за енергію відповідних нульових коливань ($1334,5 \text{ см}^{-1}$). Для двох інших комплексів ця умова виконується й поготів.

Для порівняння відзначимо, що аналогічні величини зворотніх переходів Ade* · Thy* → Ade · Thy і Gua* · Cyt* → Gua · Cyt (зірочками позначено мутагенні таутомери) становлять $-1,01$ ккал/моль і $1,49$ ккал/моль, відповідно, що свідчить про динамічну нестабільність їхніх таутомеризованих станів, яка може долатися за рахунок стекінгових взаємодій.

Таким чином, приваблива з біологічної точки зору ідея про таутомеризацію основ ДНК білками з мутагенним механізмом дії [11] не знайшла свого фізичного підтвердження. На наше переконання, білки, що “обслуговують” ДНК під час збереження та відтворення генетичної інформації, виконують протилежну функцію — контролю за таутомерним статусом основ.

Автори висловлюють щирі вдячність канд. біол. наук Є. П. Юренку (Інститут молекулярної біології та генетики НАН України) за увагу до роботи та корпорації “Gaussian”(США) за люб’язно наданий одному із співавторів (Д. М. Говоруну) грант — програмний пакет “Gaussian03” для платформи Win32, а також Інформаційно-обчислювальному центру Київського національного університету ім. Тараса Шевченка за надання обчислювальних ресурсів.

1. *Watson J. D., Crick F. H. C.* The structure of DNA // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. — 1953. — **18**. — P. 123–131.
2. *Topal M. D., Fresco J. R.* Complementary base pairing and the origin of substitution mutations // Nature. — 1976. — **263**. — P. 285–289.
3. *Harris V. H., Smith C. L., Cummins W. J. et al.* Recognition of base-pairing by DNA polymerases during nucleotide incorporation: the properties of the mutagenic nucleotide dPTP α S // Org. Biomol. Chem. — 2003. — **1**. — P. 2070. — 2074.
4. *Harris V. H., Smith C. L., Cummins W. J. et al.* The effect of tautomeric constant on the specificity of nucleotide incorporation during DNA replication: support for the rare tautomer hypothesis of substitution mutagenesis // J. Mol. Biol. — 2003. — **362**. — P. 1389–1401.
5. *Sinha N. K., Haimes M. D.* Molecular mechanisms of substitution mutagenesis. An experimental test of the Watson-Crick and Topal Fresco models of base mispairs // J. Biol. Chem. — 1981. — **256**, No 20. — P. 10671–10683.
6. *Danilov V. I., Anisimov V. M., Kurita N., Hovorun D. M.* MP2 and DFT studies of the DNA rare base pairs: the molecular mechanism of the spontaneous substitution mutations conditioned by tautomerism of bases // Chem. Phys. Letters. — 2005. — **412**. — P. 285–293.
7. *Броварець О. О., Булавін Л. А., Говорун Д. М.* Фізична модель впізнання Вотсон–Кріківських пар основ ДНК білками реплікативного комплексу // Доп. НАН України. — 2009. — № 10. — С. 194–200.
8. *Броварець О. О., Булавін Л. А., Говорун Д. М.* Як білки реплікативного комплексу блокують синтез пар основ ДНК за участі мутагенних таутомерів: просте фізичне пояснення // Там само. — № 11. — С. 175–182.
9. *Ладик Я.* Квантовая биохимия для химиков и биологов. — Москва: Мир, 1975. — 256 с.
10. *Данилов В. И., Квенцель Г. Ф.* Электронные представления в теории точечных мутаций. — Киев: Наук. думка, 1971. — 83 с.
11. *Strazewski P., Tamm C.* Replication experiments with nucleotide base analogues // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. — 1990. — **29**. — P. 36–57.
12. *Boys S. F., Bernardi F.* The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors // Mol. Phys. — 1970. — **19**, No 4. — P. 553–566.
13. *Gaussian 03*, Revision C. 02, Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Montgomery Jr. J. A., Vreven T., Kudin K. N., Burant J. C., Millam J. M., Iyengar S. S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G. A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Li X., Knox J. E., Hratchian H. P., Cross J. B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Ayala P. Y., Morokuma K., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Zakrzewski V. G., Dapprich S., Daniels A. D., Strain M. C., Farkas O., Malick D. K., Rabuck A. D., Raghavachari K., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cui Q., Baboul A. G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B. B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Martin R. L., Fox D. J., Keith T., Al-Laham M. A., Peng C. Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P. M. W., Johnson B., Chen W., Wong M. W., Gonzalez C., Pople J. A. / Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
14. *Бейдер Р.* Атомы в молекулах. Квантовая теория. — Москва: Мир, 2001. — 532 с.

15. *Йогансен А. В.* Инфракрасная спектроскопия и спектральное определение энергии водородной связи // Водородная связь. – Москва: Наука, 1981. – С. 112–155.

*Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка
Інститут молекулярної біології та генетики
НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 22.06.2009

O. O. Brovarets', Academician of the NAS of Ukraine **L. A. Bulavin**,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **D. M. Hovorun**

Can the proteins tautomerize the DNA base pairs: the physical answer to the biologically important question

Using simple modeling systems and modern quantum-mechanical methods, it is shown that the biologically alluring concept of the tautomerization of base pairs of DNA by proteins is inadequate from the physical point of view. The assumption that these proteins probably execute antipodal functions, namely they control the tautomeric status of the base pairs of DNA, is made.