

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

Фізичний механізм молекулярного керування таутомерним статусом основ ДНК та його квантово-механічне обґрунтування

Вперше запропоновано і обґрунтовано на належному квантово-механічному рівні фізичний механізм молекулярного керування таутомерним статусом основ ДНК. Наведені у роботі його найпростіші структурні реалізації дозволяють пригнічувати ймовірність знаходження нуклеотидної основи у мутагенній таутомерній формі від $1,26 \cdot 10^1$ для Ade та $4,20 \cdot 10^6$ разів для Cyt, доводячи її до значень, що не перевищують частоту спонтанних точкових мутацій у живій клітині.

Відомо, що спонтанна таутомеризація основ ДНК, тобто їхній перехід із основної, енергетично вигідної таутомерної форми у високоенергетичну, мутагенну, які різняться лише положенням одного лабільного атома водню, є фізичним джерелом точкових мутацій ДНК. Нині біофізичну значущість останніх розглядають не лише в еволюційному контексті, а й все частіше пов'язують з виникненням низки недуг, зокрема ракових.

Те, що прототропна таутомерія нуклеотидних основ є одним із фізичних джерел спонтанних точкових мутацій ДНК, вперше було постульовано Вотсоном і Криком та якісно обґрунтовано Топалом і Фреско у роботах [1, 2], які вважаються класичними. Логічним продовженням цих досліджень стало їхнє експериментальне підтвердження [3–5] та квантово-механічне обґрунтування [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 чи 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 реплікується.

Виникає цілком логічне запитання — чи є процеси таутомеризації основ ДНК у живій клітині спонтанними, випадковими, чи вони все-таки знаходяться “під наглядом” інших біополімерів, які функціонують разом з ДНК, зокрема білків.

Вперше це надзвичайно важливе з біофізичної точки зору питання порушив Льовдін у своїй класичній роботі (див. [10] та наведену там бібліографію), яка не втратила своєї актуальності і понині, вбачаючи кричущу невідповідність між частотою точкових мутацій у живій клітині ($\sim 10^{-9}$) і частотою таутомеризації нуклеотидних основ у водному середовищі ($\sim 10^{-4}$ – 10^{-5}). Ним вперше запропоновано елементарний фізичний механізм “самозахисту” ДНК від спонтанної таутомеризації її основ, хоча заради справедливості треба сказати, що він блискуче розв'язав цю задачу у рамках помилкової, на наш по-

гляд, парадигми, приписуючи функцію молекулярного керування таутомерним статусом нуклеотидних основ не білкам, а самій макромолекулі ДНК, що суперечить сучасним поглядам на біофізичну значущість, насамперед функціональну, білково-нуклеїнових взаємодій.

У даній роботі ми вперше робимо спробу обґрунтувати з квантово-механічної точки зору фізичний механізм молекулярного керування таутомерним статусом основ ДНК. При використанні найпростіших молекулярних моделей білково-нуклеїнових взаємодій та сучасних чисельних методів прикладної квантової механіки нам вдалося показати, що втягування одного із аміних атомів водню аденіну (Ade) і цитозину (Cyt), який не бере участі у вотсон-криківському спарюванні, та тієї вільної електронної пари атомів O6 і O4 гуаніну (Gua) і тиміну (Thu), відповідно, яка теж не бере участі у вотсон-криківському спарюванні, у міжмолекулярний водневий зв'язок із відповідними амінокислотними залишками білків дозволяє істотно інгібувати спонтанну таутомеризацію основ ДНК, значно зменшивши ймовірність знайти основу у мутагенній таутомерній формі.

Об'єкти і методи дослідження. Нами обрано такі об'єкти дослідження: найпростішими моделями нуклеотидних основ у складі ДНК слугували власне основи Ade, Gua, Cyt і Thu, а елементарними воднево-зв'язаними комплексами, відповідальними за інгібування таутомеризації основ, вибрано комплекси основ ДНК з найпростішими молекулярними моделями бічних залишків деяких амінокислот, а саме — мурашиною кислотою у електро-нейтральній HCOOH та депротонованій HCOO^- формі та протонованою групою CN_3H_6^+ .

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 [11].

Квантово-механічні розрахунки проведено із використанням програмного пакету "GAUSSIAN03" для платформи Win32 [12].

Міжмолекулярні Н-зв'язки ідентифікували та досліджували методом аналізу топології електронної густини [13], 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 [14], що ґрунтується на зсуві частоти валентних коливань атомних груп — донорів Н-зв'язку, використовуючи при цьому вибіркове дейтерування, зокрема одного із аміних атомів водню, не задіяних у вотсон-криківському спарюванні, для усунення механічних резонансів тестових нормальних коливань із сусідніми. Енергію Н-зв'язків C5H...O визначали за формулою, запропонованою авторами роботи [15].

Одержані результати та їхнє обговорення. Запропонований нами розв'язок задачі про молекулярне керування таутомерним статусом основ ДНК ґрунтується на простій фізичній ідеї. Відомо, що мутагенна таутомеризація нуклеотидних основ має аміно-імінний (у випадку Ade і Cyt, що мають у своєму складі аміногрупу NH_2) та кетоенольний (у випадку Gua і Thu — основ з карбонільною групою $\text{C}=\text{O}$) характер. З іншого боку, доконаним є факт, що іміногрупа = NH є значно гіршим донором Н-зв'язку, ніж аміногрупа NH_2 ,

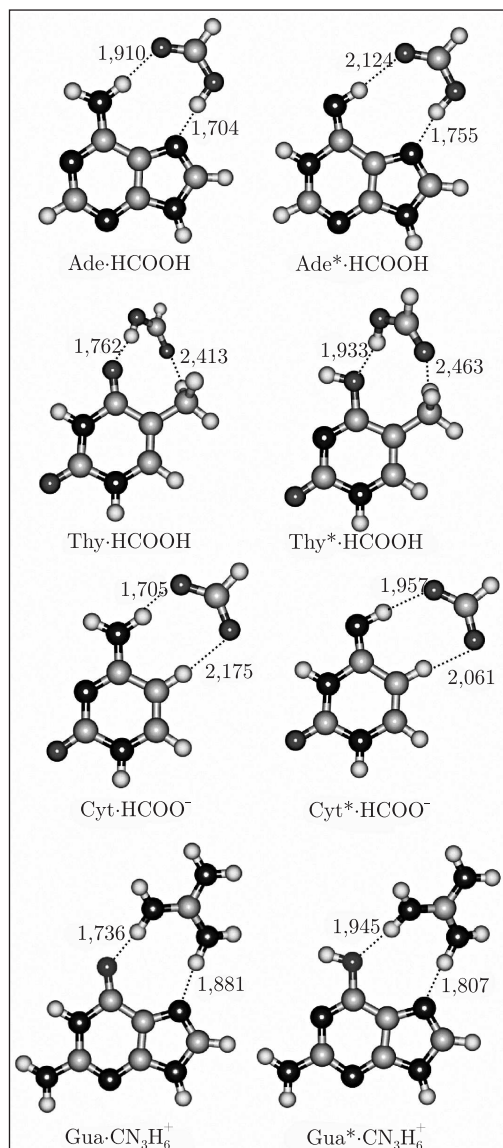


Рис. 1. Геометрична структура досліджених комплексів (міжмолекулярні водневі зв'язки АН... В зображено пунктиром, а їхні довжини НВ подано в Å)

а атом кисню карбонільної групи $C=O$ є значно кращим акцептором Н-зв'язку, ніж атом кисню гідроксильної групи $C-OH$.

Таким чином, можна очікувати, що втягування у міжмолекулярний Н-зв'язок одного із амічних атомів водню Ade і Cyt, які не беруть участі у вотсон-криківському спарюванні, та однієї з вільних пар карбонільного атома кисню O_6 і O_4 Gua та Thy, відповідно, які теж не задіяні у вотсон-криківському спарюванні, спричинить зростання енергії таутомеризації, зокрема за рахунок послаблення вищезгаданих Н-зв'язків при переході основи із канонічної у мутагенну таутомерну форму.

Ці очікування повністю підтверджено квантово-механічними розрахунками, результати яких наведено на рис. 1 та в табл. 1, 2 і 3. Дійсно, енергія таутомеризації основ ДНК у Н-зв'яз-

Таблиця 1. Електронно-топологічні, енергетичні, геометричні та спектрально-коливальні характеристики міжмолекулярних водневих зв'язків у досліджених комплексах основ (у основній та мутагенній формах) з модельними бічними радикалами деяких амінокислот

Комплекси	Н-зв'язок АН...В	ρ , ат. од.	$\nabla^2 \rho$, ат. од.	$100 \cdot \varepsilon$	$E_{\text{НВ}}$, ккал/моль	$d_{\text{А...В}}$, Å	$d_{\text{Н...В}}$, Å	$\angle \text{АН...В}$, град.	$\Delta d_{\text{АН}}$, Å	$-\Delta\nu$, см^{-1}
Ade · HCOOH	N4H...O	0,026	0,097	3,39	4,28	2,926	1,910	174,9	0,010	208,0
	OH...N7	0,052	0,102	4,53	9,07	2,715	1,704	171,0	0,040	794,8
Ade* · HCOOH	N4H...O	0,016	0,059	0,62	0,66	3,145	2,124	173,3	0,003	44,0
	OH...N7	0,046	0,102	4,58	8,10	2,759	1,755	168,9	0,033	643,0
Thy · HCOOH	C5H...O	0,010	0,032	2,03	1,83	3,505	2,413	159,8	-0,00047	—
	OH...O4	0,034	0,126	3,6	5,44	2,750	1,762	169,8	0,017	312,0
Thy* · HCOOH	C5H...O	0,009	0,028	1,63	1,66	3,556	2,463	165,1	-0,00027	—
	OH...O4	0,024	0,090	7,31	3,57	2,912	1,933	160,3	0,008	156,8
Gua · CN ₃ H ₆ ⁺	NH...O6	0,040	0,131	2,97	11,14	2,769	1,736	172,0	0,025	439,3
	NH...N7	0,035	0,091	5,57	8,11	2,917	1,881	175,1	0,027	487,1
Gua* · CN ₃ H ₆ ⁺	NH...O6	0,024	0,090	8,86	5,47	2,963	1,945	172,5	0,010	170,9
	NH...N7	0,042	0,096	4,93	10,58	2,852	1,807	177,2	0,037	641,3
Cyt · HCOO ⁻	N4H...O	0,046	0,127	4,47	8,43	2,752	1,705	175,3	0,042	693,1
	C5H...O	0,017	0,054	4,67	3,25	3,263	2,175	168,9	0,007	97,0
Cyt* · HCOO ⁻	N4H...O	0,025	0,084	2,63	4,79	2,991	1,957	176,5	0,016	250,3
	C5H...O	0,022	0,069	5,01	4,29	3,153	2,061	179,4	0,012	169,3

Примітка. ρ і $\Delta\rho$ — значення електронної густини і лапласіану електронної густини у критичній точці відповідно; ε — еліптичність; $E_{\text{НВ}}$ — енергія Н-зв'язку. Зірочкою позначено мутагенні таутомери основ.

заних комплексах помітно зростає порівняно з аналогічною величиною для основ у вільному стані (див. табл. 2), причому це зростання супроводжується зменшенням енергії Н-зв'язків саме за участі атомних груп, які перебудовуються у процесі таутомеризації (див. табл. 1), і відповідно зменшенням електронної енергії взаємодії. При таутомеризації основ у комплексах взаємна орієнтація амінокислотних залишків відносно основи змінюється незначно — це вказує на те, що вибрані нами амінокислоти є чи не найкращими претендентами на роль молекулярного керування таутомерним статусом основ ДНК. При цьому найбільший ефект інгібування спостерігається у комплексі Cyt · HCOO⁻ — це пояснюється тим, що саме тут реалізується найбільша енергія міжмолекулярної взаємодії (а значить — і найбільші її зміни при таутомеризації основи), яка має, в основному, електростатичний характер і внесок у яку сумарної енергії міжмолекулярних Н-зв'язків найменший (35,53–42,52%) серед усіх комплексів (див. табл. 3).

Характерно, що навіть за умови досить сильного інгібування процесу таутомеризації Gua і Cyt кінцева енергія таутомеризації, що при цьому досягається (9,15 ккал/моль та 11,66 ккал/моль відповідно), не перевищує відповідну енергію вільного Ade (14,00 ккал/моль) і ненабагато перевищує енергію вільного Thy (11,64 ккал/моль). Це означає, що навіть за наявності молекулярного керування таутомерним статусом основ ДНК її ділянки, збагачені на пари Gua · Cyt, будуть мутувати значно частіше, ніж ділянки, збагачені на пари Ade · Thy.

Закінчуючи обговорення одержаних результатів, відзначимо, що за даними квантово-механічних розрахунків на рівні теорії MP2/6-311++G(2df, pd)//V3LYP/6-311++G(d,p) запропонований нами фізичний механізм молекулярного управління таутомерним статусом

Таблиця 2. Енергія таутомеризації Гіббса ΔG вільних основ ДНК та основ у Н-зв'язаних комплексах з деякими амінокислотними залишками та імовірність P знайти нуклеотидну основу у рідкісній таутомерній формі

Основи/Комплекси	ΔG , ккал/моль	P
Ade	14,00	$15,7 \cdot 10^{-11}$
Ade · HCOOH	15,57	$1,25 \cdot 10^{-11}$
Thy	11,64	$6,98 \cdot 10^{-9}$
Thy · HCOOH	15,11	$2,60 \cdot 10^{-11}$
Gua	0,13	$8,06 \cdot 10^{-1}$
Gua · CN ₃ H ₆ ⁺	9,15	$3,87 \cdot 10^{-7}$
Cyt	2,21	$2,85 \cdot 10^{-2}$
Cyt · HCOO ⁻	11,66	$6,79 \cdot 10^{-9}$

Примітка. $P = e^{-\Delta G/kT}$.

Таблиця 3. Енергетичні характеристики досліджуваних комплексів: E_{int} — електронна енергія взаємодії; $E_{\text{НВ}}$ — сумарна енергія Н-зв'язків

Комплекси	$-E_{\text{int}}$, ккал/моль	$E_{\text{НВ}}$, ккал/моль	$E_{\text{НВ}}/E_{\text{int}}$, %
Ade · HCOOH	17,08	13,34	78,1
Ade* · HCOOH	12,92	8,76	67,8
Thy · HCOOH	9,59	7,27	75,9
Thy* · HCOOH	5,46	5,23	95,7
Gua · CN ₃ H ₆ ⁺	39,45	13,57	34,4
Gua* · CN ₃ H ₆ ⁺	30,04	11,87	39,5
Cyt · HCOO ⁻	32,88	11,68	35,5
Cyt* · HCOO ⁻	21,35	9,08	42,5

основ ДНК повністю блокує механізм таутомеризації основ у вотсон-криківських парах Ade · Thy і Gua · Cyt, запропонований свого часу Льовднім.

Таким чином, у роботі вперше запропоновано і обґрунтовано на належному квантово-механічному рівні фізичний механізм молекулярного керування таутомерним статусом основ ДНК. Наведені у статті його найпростіші структурні реалізації дозволяють пригнічувати ймовірність знаходження нуклеотидної основи у мутагенній таутомерній формі від $1,26 \cdot 10^1$ для Ade та $4,20 \cdot 10^6$ разів для Cyt, доводячи її до значень, що не перевищують частоту спонтанних точкових мутацій у живій клітині.

Автори висловлюють щирю 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. Lett. – 2005. – **412**. – P. 285–293.
7. *Броварець О. О., Булавін Л. А., Говорун Д. М.* Фізична модель впізнання вотсон-криківських 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. – 2009. – № 11. – С. 175–182.
9. *Ладик Я.* Квантовая биохимия для химиков и биологов. – Москва: Мир, 1975. – 256 с.
10. *Данилов В. И., Кеенцель Г. Ф.* Электронные представления в теории точечных мутаций. – Киев: Наук. думка, 1971. – 83 с.
11. *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.
12. *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. and Pople J. A. / Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.*
13. *Бейдер Р.* Атомы в молекулах. Квантовая теория. – Москва: Мир, 2001. – 532 с.

14. *Йогансен А. В.* Инфракрасная спектроскопия и спектральное определение энергии водородной связи // Водородная связь. – Москва: Наука, 1981. – С. 112–155.
15. *Espinosa E., Molins E., Lecomte C.* Hydrogen bond strenghts revealed by topological analyses of experimentally observed electron densities // Chem. Phys. Lett. – 1998. – **285**. – P. 170–173.

*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**

The physical mechanism of the molecular control over the tautomeric status of DNA base pairs and its quantum-mechanical foundation

For the first time, it is suggested and proved the physical mechanism of the molecular control over the tautomeric status of DNA base pairs on the proper quantum-mechanical level of theory. Its simplest structural realization prohibits the probability of the existence of a nucleobase in the mutagenic tautomeric form from $1.26 \cdot 10^1$ for Ade base to $4.20 \cdot 10^6$ times for Cyt base taking it to the values that don't exceed the frequency of point spontaneous mutations in a living cell.