



УДК 577.3

© 2009

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

Як білки реплікативного комплексу блокують синтез пар основ ДНК за участю мутагенних таутомерів: просте фізичне пояснення

Неемпіричним квантово-механічним дослідженням доведено, що запропонований нами раніше фізичний механізм високої точності біосинтезу ДНК є універсальним, оскільки він дозволяє впізнавати вотсон-криківські пари нуклеотидних основ, елімінуючи при цьому з процесу біосинтезу неправильні пуриново-піримідинові пари основ як у основній таутомерній формі, так і мутагенній.

Висока точність реплікації ДНК є чи не найважливішим молекулярно-біологічним атрибутом живого [1, 2]. З метою з'ясування елементарних фізико-хімічних засад цих біологічно важливих процесів проведені численні теоретичні [3, 4] та експериментальні модельні дослідження [5, 6]. Проте до цього часу так і не створено переконливих фізичних моделей, які б описували біосинтез ДНК з урахуванням мікроструктурних особливостей як правильних та неправильних пар нуклеотидних основ, так і центру їхнього розпізнавання ферментом.

У попередній нашій роботі [7] запропоновано та обгрунтовано з квантово-механічних позицій просту фізичну модель впізнавання вотсон-криківських пар нуклеотидних основ білками реплікативного комплексу з боку великої (неглікозидної) борозенки ДНК. Доведено, що лише чотири амінокислоти (із 20 можливих) — аспарагінова, глутамінова, аспарагін та глутамін — за допомогою своїх бічних радикалів можуть реалізувати цю функцію для кожної з чотирьох вотсон-криківських пар за допомогою водневих зв'язків. Запропонована модель дозволяє практично повністю блокувати біосинтез неправильних пар А · С/С · А і G · T/T · G основ ДНК у канонічній таутомерній формі.

Виникає закономірне питання — наскільки цей підхід є універсальним і чи дозволяє він у такому разі пригнічувати синтез неправильних пар основ ДНК за участю мутагенних таутомерів. Відомі підходи [3, 4], зокрема модель Полтева–Брускова [8], яка спирається на уявлення про інваріантні атомні групи, не дають у цьому сенсі позитивної відповіді, оскільки пари основ за участю мутагенних таутомерів квазіізоморфні вотсон-криківським парам основ [9], тобто мають приблизно однакове просторове розміщення інваріантних атомних

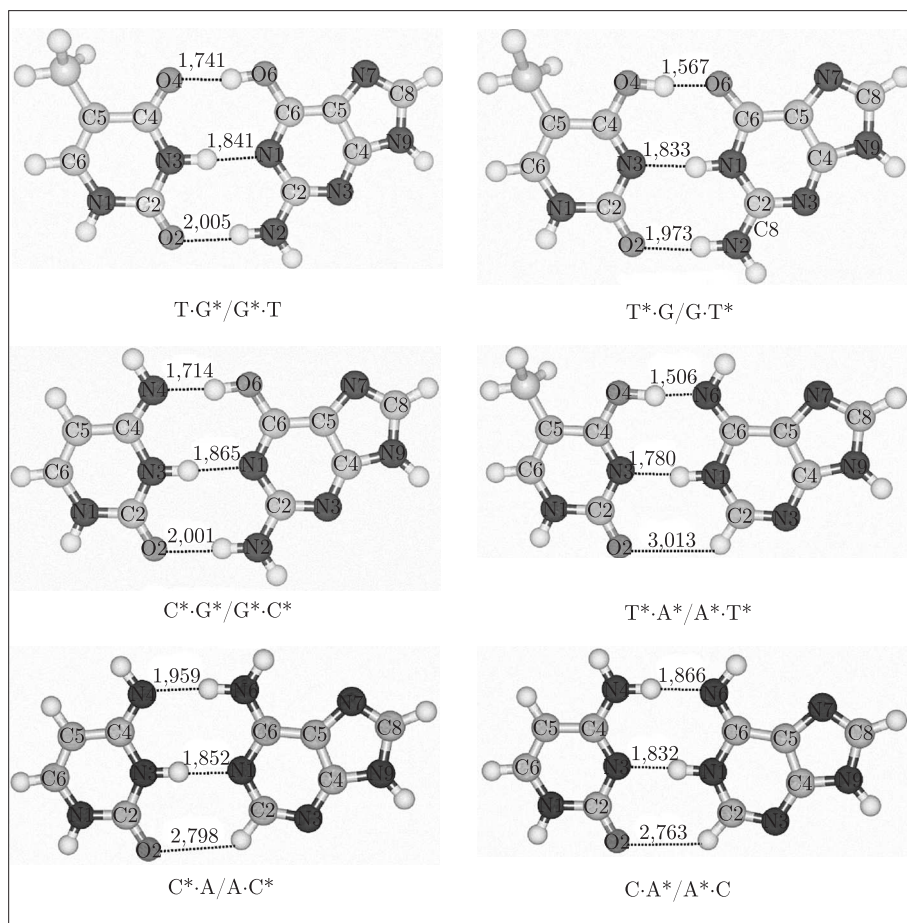


Рис. 1. Геометрична структура усіх можливих водневозв'язаних пар основ ДНК за участю рідкісних мутагенних таутомерів за даними квантово-механічних розрахунків на рівні теорії V3LYP/6-311++G(d,p). Пунктиром зображено міжмолекулярні Н-зв'язки, біля кожного з них вказано його довжину (Å) — відстань між атомами Н і В. Позначення атомів — стандартне [10]

груп і відтак не можуть бути заблокованими для подальшого їхнього біохімічного включення в структуру ДНК, що синтезується.

У цій роботі зроблено спробу дати просту і водночас переконливу з фізичної точки зору відповідь на вищесформульоване питання. Відштовхуючись від результатів квантово-механічних розрахунків, ми дійшли висновку про універсальний характер запропонованого нами раніше підходу [7], довівши, що він може також досить ефективно блокувати і синтез неправильних пар основ ДНК за участю мутагенних таутомерів.

Методика досліджень описана в попередній роботі [7]. Об'єктами, що вивчалися, були всі можливі пари нуклеотидних основ за участю рідкісних таутомерів (рис. 1, табл. 1), квазіізоморфні вотсон-кріківським парам, та їхні комплекси з найпростішими моделями амінокислотних залишків, що належать білкам реплікативного комплексу (рис. 2, табл. 2). Тут використано ті ж самі позначення, що й у роботі [7].

Перш ніж перейти до обговорення структурно-енергетичних особливостей комплексів, коротко охарактеризуємо пари нуклеотидних основ за участю мутагенних таутомерів (позначено зірочками) (див. рис. 1, табл. 1). Усі вони без винятку є квазіізоморфними вот-

Таблиця 1. Геометричні, електронно-топологічні та енергетичні характеристики міжмолекулярних Н-зв'язків у парах основ ДНК за участю мутагенних таутомерів

Пари основ	Н-зв'язок АН...В	ρ , ат. од.	$\nabla^2\rho$, ат. од.	$100 \cdot \varepsilon$	$d_{\text{ВСП-RCP}}$, ат. од.	$E_{\text{НВ}}$, ккал/моль	$d_{\text{А...В}}$, Å	$d_{\text{Н...В}}$, Å	$\angle\text{АН...В}$, град.	$\Delta d_{\text{АН}}$, Å
G* · T	O4H...O6	0,039	0,125	2,67	2,11	10,88	2,730	1,741	171,4	0,020
	N3H...N1	0,040	0,091	6,17	2,13	9,72	2,889	1,841	175,9	0,035
	N2H...O2	0,022	0,079	5,81	2,06	4,68	3,019	2,005	177,7	0,007
G · T*	O4H...O6	0,062	0,146	2,06	2,19	19,85	2,589	1,567	173,1	0,053
	N1H...N3	0,040	0,100	6,31	2,05	10,07	2,868	1,833	172,1	-0,002
	N2H...O2	0,023	0,083	5,67	2,05	5,12	2,993	1,973	174,4	-0,005
G* · C*	O6H...N4	0,051	0,103	5,27	2,19	14,36	2,720	1,714	172,1	0,038
	N3H...N1	0,038	0,089	6,36	2,10	8,94	2,910	1,865	176,7	0,034
	N2H...O2	0,022	0,080	5,73	2,29	4,76	3,014	2,001	177,3	0,007
A* · T*	O4H...N6	0,087	0,065	4,56	2,27	27,76	2,578	1,506	174,8	0,102
	N1H...N3	0,045	0,101	6,24	2,08	12,01	2,825	1,780	171,1	0,034
	C2H...O2	0,003	0,012	16,42	0,90	0,57	4,098	3,013	125,1	-0,00041
A · C*	N6H...N4	0,029	0,083	7,60	2,19	6,28	2,987	1,959	173,8	0,021
	N3H...N1	0,039	0,092	6,64	2,27	9,33	2,895	1,852	178,9	0,031
	C2H...O2	0,005	0,016	1,86	1,37	0,89	3,884	2,798	133,1	0,00021
A* · C	N4H...N6	0,037	0,091	7,18	2,21	8,63	2,907	1,866	176,2	0,034
	N1H...N3	0,040	0,097	6,89	2,22	10,00	2,871	1,832	180,0	0,027
	C2H...O2	0,005	0,017	1,63	1,36	0,96	3,848	2,763	132,2	0,00005

Примітка. Тут і в табл. 2 ρ і $\nabla^2\rho$ — значення електронної густини і лапласіана електронної густини в критичній точці відповідно; ε — еліптичність; $d_{\text{ВСП-RCP}}$ — відстань від критичної точки зв'язку (ВСП) до кругової критичної точки (RCP) [12]; $E_{\text{НВ}}$ — енергія Н-зв'язку [14]; $d_{\text{А...В}}$, $d_{\text{Н...В}}$ — відстань між атомами А і В та Н і В відповідно, які беруть участь у Н-зв'язку АН...В; $\angle\text{АН...В}$ — кут Н-зв'язування; $\Delta d_{\text{АН}}$ — подовження хімічного зв'язку АН при утворенні Н-зв'язку АН...В.

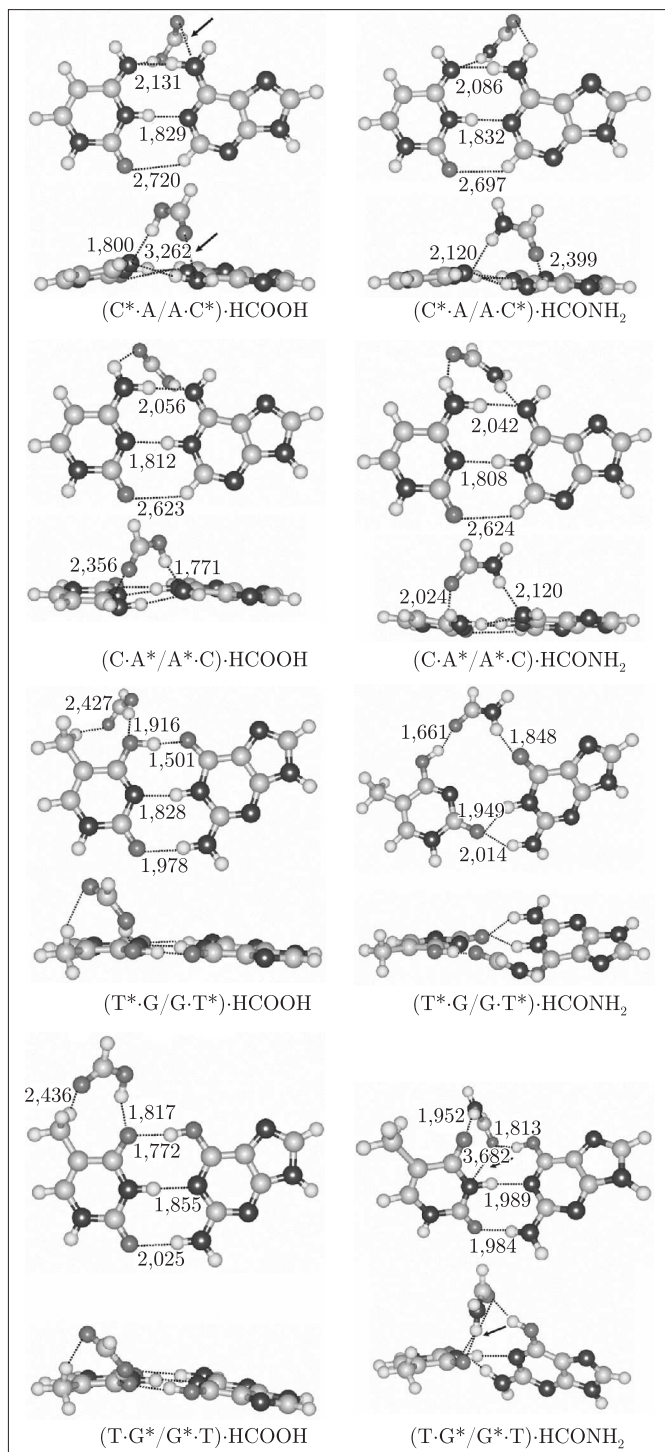


Рис. 2. Геометрична структура комплексів пар основ ДНК за участю рідкісних мутагенних таутомерів з модельними залишками амінокислот за даними квантово-механічних розрахунків на рівні теорії V3LYP/6-311++G(d,p). Пунктиром зображено міжмолекулярні Н-зв'язки, біля кожного з них вказано його довжину (Å) — відстань між атомами Н і В. Стрілкою позначено ван-дер-ваальсовий контакт N6...O ($d_{N6...O} = 3,262\text{Å}$, $\rho = 0,005$, $\nabla^2\rho = 0,019$) у комплексі $(C^* \cdot A/A \cdot C^*) \cdot HCOOH$ та N3...O у комплексі $(T \cdot G^*/G^* \cdot T) \cdot HCONH_2$

Таблиця 2. Геометричні, електронно-топологічні та енергетичні характеристики міжмолекулярних Н-зв'язків у досліджуваних комплексах

Комплекси	Н-зв'язок АН...В	ρ , ат. од.	$\nabla^2\rho$, ат. од.	$100 \cdot \varepsilon$	$d_{\text{BCP-RCP}}$, ат. од.	$E_{\text{НВ}}$, ккал/моль	$d_{\text{A...B}}$, Å	$d_{\text{H...B}}$, Å	$\angle\text{АН...В}$, град.	$\Delta d_{\text{АН}}$, Å
$(\text{C}^* \cdot \text{A}/\text{A} \cdot \text{C}^*) \cdot \text{HCOOH}$	ОН...N4	0,040	0,096	5,54	2,684	10,24	2,799	1,800	172,1	0,028
	N6H...N4	0,020	0,062	10,00	2,089	3,69	3,148	2,131	169,4	0,011
	N3H...N1	0,041	0,093	6,60	2,335	10,09	2,877	1,829	172,0	0,035
	C2H...O2	0,006	0,019	4,20	1,427	1,06	3,806	2,720	132,7	-0,00005
$(\text{C}^* \cdot \text{A}/\text{A} \cdot \text{C}^*) \cdot \text{HCONH}_2$	NH...N4	0,019	0,061	5,19	2,988	3,57	3,140	2,120	167,6	0,011
	N6H...O	0,011	0,037	19,29	2,380	2,11	3,409	2,399	122,3	0,004
	N6H...N4	0,022	0,068	9,06	2,106	4,24	3,105	2,086	171,4	0,013
	N3H...N1	0,041	0,093	6,65	2,305	10,01	2,879	1,832	174,5	0,036
	C2H...O2	0,006	0,019	1,67	1,458	1,11	3,783	2,697	134,0	0,00013
$(\text{C} \cdot \text{A}^*/\text{A}^* \cdot \text{C}) \cdot \text{HCOOH}$	N4H...O	0,012	0,044	32,57	2,461	2,47	3,365	2,356	117,4	0,004
	ОН...N6	0,043	0,095	4,69	2,596	11,26	2,777	1,771	167,9	0,035
	N4H...N6	0,024	0,070	9,87	2,106	4,70	3,081	2,056	169,6	0,016
	N1H...N3	0,042	0,097	6,94	2,287	10,7	2,856	1,812	172,3	0,031
	C2H...O2	0,007	0,022	0,52	1,475	1,27	3,708	2,623	134,1	-0,00002
$(\text{C} \cdot \text{A}^*/\text{A}^* \cdot \text{C}) \cdot \text{HCONH}_2$	N4H...O	0,022	0,079	3,09	2,483	4,78	3,040	2,024	145,5	0,011
	NH...N6	0,02	0,061	2,87	2,867	3,59	3,142	2,120	163,1	0,004
	N4H...N6	0,025	0,073	9,30	2,110	4,96	3,068	2,042	166,2	0,017
	N1H...N3	0,043	0,097	6,87	2,280	10,85	2,852	1,808	176,8	0,032
	C2H...O2	0,007	0,022	0,32	1,494	1,26	3,710	2,624	135,3	0,00024

сон-криківським парам основ: розбіжність просторового розміщення інваріантних атомних груп не перевищує 0,5 Å (N3/O2) і 0,6 Å (H6/H8), а розкид значень кутів, утворених глікозидними зв'язками основ, що включаються, не перевищує 6 град. Як і вотсон-криківські пари, вони стабілізуються трьома внутрішньопарними Н-зв'язками. Найслабшими з-поміж них є Н-зв'язки C2H...O2 (пари A*·C, A·C* та A*·T*) — їхні енергії лежать у діапазоні 0,57–0,96 ккал/моль. Найміцніші Н-зв'язки реалізуються в парах A*·T* ($E_{O4H...N6} = 27,76$ ккал/моль), G·T* ($E_{O4H...O6} = 19,85$ ккал/моль) і G*·C* ($E_{O6H...O4} = 14,36$ ккал/моль). Проміжні енергії інших Н-зв'язків лежать у межах від 4,68 до 12,01 ккал/моль. Цікаво, що енергія стабілізації пар більша, ніж аналогічна величина в парі A·T (13,50 ккал/моль), і лише у двох випадках — A·C* (14,32 ккал/моль) і A*·C (21,92 ккал/моль) — менша, ніж енергія стабілізації пари G·C (27,19 ккал/моль). Вищенаведені факти свідчать про те, що поняття комплементарності, яке зазвичай застосовують лише для вотсон-криківських пар A·T і G·C, поширюється такою ж мірою на усі шість пар за участю рідкісних таутомерів. Це дає підстави припустити, що генетична інформація в ДНК кодується, строго кажучи, не чотирма, а вісьмома літерами.

Треба також зазначити, що пара G*·T енергетично вигідніша за пару G·T* на 2,31 ккал/моль, пара A·C* має меншу енергію Гіббса, ніж пара A*·C, на 4,21 ккал/моль, енергія пари G*·C* перевищує енергію пари G·C на 7,46 ккал/моль і, нарешті, пара A*·T* має енергію на 13,18 ккал/моль вищу, ніж пара A·T. Проте це зовсім не означає, що біологічна значущість пар за участю рідкісних таутомерів визначається їхньою енергетичною вигідністю: класичним прикладом у цьому сенсі є високоенергетичні пари A*·T* і G*·C*, які за механізмом Льовдіна (див. бібліогр. у [11]) відповідальні за таутомеризацію основ ДНК, тобто їхній перехід із канонічної в рідкісну мутагенну форму.

Зупинимось тепер на структурно-енергетичних характеристиках досліджених нами комплексів (див. рис. 2, табл. 2).

По-перше, вони є істотно неплоскими — їх можна назвати квазіортогональними, тому що модельні амінокислотні залишки лежать у площині, яка квазіортогональна “середній” площині, у якій знаходяться основи, що утворюють пари. Геометричний аналіз показує, що головною фізичною причиною некопланарності основ у складі комплексів (C*·A/A·C*)·НСООН, (C*·A/A·C*)·НСОН₂, (C·A*/A*·C)·НСООН, (C·A*/A*·C)·НСОН₂ є пірамідалізація аміногрупи основ А і С, обумовлена взаємодією з амінокислотними залишками (HN6C6N1 = 8,2÷10,2 град.; HN4C4N3 = 8,7÷9,8 град. відповідно). Фізичною причиною виходу амінокислотних залишків із “середньої” площини пар основ є відштовхування чи, іншими словами, стеричне ускладнення, яке виникає між атомами водню іміногрупи =NH A* та C*, з одного боку, та атомом водню залишка, який вступає в Н-зв'язок з атомом азоту групи =NH, з іншого. Уникаючи ситуації, коли зазначені атоми водню знаходяться на відстані, яка менша за суму їхніх ван-дер-ваальсових радіусів (це б мало місце у випадку планарного комплексу), амінокислотний залишок істотно виходить із “середньої” площини.

Істотна неплоскість комплексів за участю пар G*·T і G·T* та модельного амінокислотного залишку НСОН₂ зумовлена, з одного боку, вищезгаданим стеричним фактором, а з іншого — інтеграцією модельного цукрового залишку в пару, що суттєво збурює її геометричну будову, змінюючи навіть тип внутрішньопарних Н-зв'язків. Неплоскість комплексів (T*·G/G·T*)·НСООН і (T·G*/G*·T)·НСООН пов'язана з неплоским характером Н-зв'язку C5_{Me} H...O = C. Цікавий факт спостерігається при утворенні комплексів за участю пар A*·T* і G*·C* — взаємодія із модельними залишками переводить їх у класичні вотсон-криківські пари A·T і G·C. Це означає, що ми маємо фізичний механізм

інгібування процесів таутомеризації основ ДНК за Льовдіним, який, на наше переконання, має біологічну значущість.

Іншою особливістю зазначених комплексів є те, що енергія їхньої стабілізації, тобто електронна енергія взаємодії модельного амінокислотного залишку з парою у всіх випадках менша, ніж аналогічна величина для вотсон-криківських пар.

Наведені дані дають підстави стверджувати, що досліджені нами комплекси не є ізоморфними. Більше того, вони не ізоморфні комплексам за участю вотсон-криківських пар основ і їх не вдається в розумному інтервалі енергій привести у стан вищезгаданої подібності. Це однозначно свідчить про те, що вони є некомпетентними з точки зору біохімічного акту інкорпорації розглянутих нами пар у структуру подвійної спіралі ДНК.

Таким чином, запропонований нами фізичний механізм [7], який пояснює на елементарному мікроструктурному рівні високу точність біосинтезу ДНК у клітині, є універсальним. Наповнюючи конкретним фізичним сенсом так зване “правило примусу” [1], він дозволяє впізнавати вотсон-криківські пари нуклеотидних основ, елімінуючи з процесу біосинтезу неправильні пуриново-піримідинові пари основ як у канонічній таутомерій формі, так і в рідкісній мутагенній.

Автори сподіваються, що отримані результати дадуть поштовх до відповідних експериментальних досліджень методами рентгеноструктурного аналізу, ЯМР та сайт-спрямованого мутагенезу.

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 Д. М. Говоруну грант – програмний пакет “Gaussian03” для платформи Win32 [14].

1. *Физиологическая генетика* / Под. ред. М. Е. Лобашева, С. Г. Инге-Вечтомова. – Ленинград: Медицина, 1976. – 472 с.
2. *Льюин Б.* Гены. – Москва: Мир, 1987. – 544 с.
3. *Полтев В. И., Шулюпина Н. В., Брусков В. И.* Молекулярные механизмы правильности биосинтеза нуклеиновых кислот. Компьютерное изучение роли полимераз в образовании неправильных пар модифицированных оснований // Молекуляр. биология. – 1996. – **30**, вып. 6. – С. 1284–1298.
4. *Полтев В. И., Шулюпина Н. В., Брусков В. И.* Молекулярные механизмы правильности биосинтеза нуклеиновых кислот. Сравнение результатов компьютерного моделирования с экспериментальными данными // Там же. – 1998. – **32**, № 2. – С. 268–276.
5. *Beard W. A., Wilson S. H.* Structural insights into DNA polymerase β fidelity: hold tight if you want it right // Chem. Biol. – 1998. – **5**, No 1. – P. R7-R13.
6. *Beard W. A., Wilson S. H.* Structural insights into the origins of DNA polymerase fidelity // Structure. – 2003. – **11**. – P. 489–496.
7. *Броварець О. О., Булавін Л. А., Говорун Д. М.* Фізична модель впізнавання вотсон-криківських пар основ ДНК білками реплікативного комплексу // Доп. НАН України. – 2009. – № 10. – С. 194–200.
8. *Брусков В. И., Полтев В. И.* Узнавание ферментами комплементарных пар азотистых оснований и усиление специфичности взаимодействий в процессах матричного синтеза // Докл. АН СССР. – 1974. – **219**, № 1. – С. 231–234.
9. *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.
10. *Зенгер В.* Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. – Москва: Мир, 1987. – 584 с.
11. *Данилов В. И., Квенцель Г. Ф.* Электронные представления в теории точечных мутаций. – Киев: Наук. думка, 1971. – 84 с.
12. *Бейдер Р.* Атомы в молекулах. Квантовая теория. – Москва: Мир, 2001. – 532 с.
13. *Koch U., Popelier P. L. A.* Characterization of C-H – O hydrogen bonds on the basis of the charge density // J. Phys. Chem. – 1995. – **99**. – P. 9747–9754.

14. *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.
15. *Gaussian 03, Revision C. 02* / M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople. – Gaussian Inc., Wallingford CT, 2004.

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

Надійшло до редакції 13.05.2009

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

How the proteins of a replicative complex block the synthesis of DNA base pairs at the participation of mutational tautomers: a simple physical explanation

It is proved, using a non-empirical quantum-mechanical approach, that the physical mechanism, being proposed earlier by the authors, of high fidelity biosynthesis of DNA is universal, as it allows recognizing Watson-Crick nucleotide base pairs, by eliminating purine-pyrimidine mispairs in both the ground tautomeric and mutational forms from the process of biosynthesis.