УДК 573.3

Кречківська О. М., Косач Д. А., Говорун Д. М.

ЯК ДНК-ПОЛІМЕРАЗА ПІДТРИМУЄ НУКЛЕОТИДНІ ОСНОВИ В КАНОНІЧНІЙ ТАУТОМЕРНІЙ ФОРМІ: ПРОСТИЙ ФІЗИЧНИЙ МЕХАНІЗМ

Запропоновано новий фізичний механізм мінімізації помилок при біосинтезі ДНК, причиною яких є прототропні перетворення нуклеотидних основ. Він ґрунтується на втягуванні одного з амінопротонів цитозину і аденіну та однієї з вільних електронних пар атома кисню в положенні 6 і 4 гуаніну та тиміну, відповідно, що не беруть участі у Вотсон-Криківському спарюванні, у водневий зв 'язок із амінокислотними залишками білків.

Однією з фундаментальних проблем сучасної молекулярної біофізики є з'ясування елементарних фізичних механізмів унікальної безпомилковості відтворення генетичної інформації. Точність копіювання генетичного матеріалу надзвичайно висока - при біосинтезі ДНК *in vivo*

© *Кречківська О.* М, *Косач Д. А., Говорун Д.* М, 2002

на 10^7 -г $10^{й}$ правильних нуклеотидів (тих, що утворюють класичні Вотсон-Криківські пари) включається лише один неправильний [1]. Вона досягається за рахунок декількох послідовних етапів селекції неправильного спарювання нуклеотидів [1, 2]. З-поміж них перший етап, на якому білки, що забезпечують процес реплікації ДНК, зокрема ДНК-полімераза, значною мірою унеможливлюють неправильне спарювання, є чи не найважливішим [2, 3]. На цій стадії - етапі комплексоутворення, що передує власне полімеризації, точність селекції досягає 10^{-4} -г 10^{-7}, в той час як імовірність помилок при неферментативному синтезі не перевищує 10^{-1}:10^{-2} [1-3].

Вважається, що ДНК-полімераза на цьому етапі впізнає структурні інваріанти правильних нуклеотидних пар (тобто вступає з ними у специфічні водневі зв'язки), зокрема, атоми N^3 пуринових і 0^2 піримідинових нуклеотидних основ, взаємне розміщення яких в чотирьох правильних парах практично збігається, суттєво відрізняючись водночас від аналогічного розміщення у неправильних [4]. Іншими словами, центр впізнавання полімерази правильних пар нуклеотидних основ відіграє в процесі біосинтезу роль додаткової матриці, що і забезпечує високу точність копіювання генетичної інформації за рахунок значного підвищення енергетичного виграшу специфічної взаємодії центру впізнавання ДНК-полімерази з Вотсон-Криківськими парами основ у порівнянні з неправильними. Такий молекулярний механізм у цілому пояснює основні закономірності виникнення помилок при біосинтезі ДНК як при утворенні неправильних пар природних нуклеотидів, так і при включенні їх аналогів неприродного походження [4]. Однак він не дає відповіді на запитання, як елімінуються неправильні пари нуклеотидів, причиною яких є прототропна таутомерія (тобто здатність нуклеотидних основ спонтанно за внутрішньомолекулярним механізмом чи з використанням молекули-посередника, зокрема води, переходити у високоенергетичну (неканонічну) таутомерну форму [5]), оскільки структурні інваріанти цих пар практично не відрізняються від аналогічних інваріантів Вотсон-Криківських пар.

Пропонується новий фізичний механізм мінімізації помилок при біосинтезі ДНК, причиною яких є прототропні перетворення нуклеотидних основ із канонічної в неканонічну таутомерну форму. Він ґрунтується на специфічній взаємодії основ ДНК з амінокислотними залишками білків ДНК-полімерази, а саме - втягуванні одного із протонів цитозину і аденіну та однієї з вільних електронних пар атома кисню в положенні 6 та 4 гуаніну і тиміну, відповідно, що не беруть участі у Вотсон-Криківському спарюванні, у водневі зв'язки. Зрозуміло, що зменшення імовірності перебування основи у неканонічній таутомерній формі корелює з енергією вищезгаданих Н-зв'язків. Це пов'язано з тим, що іміноформа аміногрупи є значно гіршим донором протона, ніж сама аміногрупа, а атом кисню карбонільної групи є помітно кращим акцептором протона, ніж атом кисню гідроксильної групи. Таким чином, перехід нуклеотидної основи в неканонічну таутомерну форму - аденіну і цитозину із аміно- в іміно-, гуаніну і тиміну - із кето- в енольну - з необхідністю тягне за собою значно більше підвищення енергії у тому випадку, коли основа взаємодіє з амінокислотним залишком за вищезазначеною схемою, аніж тоді, коли вона перебуває в ізольованому стані. Іншими словами, відбувається фіксація канонічної таутомерної форми нуклеотидних основ і, як наслідок,- мінімізація помилок при реплікації ДНК, спричинених спонтанними прототропними таутомерними перетвореннями її основ.

Дієвість запропонованого механізму продемонстровано на прикладі специфічної взаємодії гуаніну і цитозину - основ ДНК, які мають найбільшу схильність до таутомерних перетворень [6] (відносна енергія неканонічних таутомерів для них співмірна з κT при кімнатній температурі - 0,6 ккал/моль), з бічними радикалами гістидину та аспарагінової і глутамінової кислот відповідно. При цьому ізольовані нуклеотидні основи моделювали основи у складі ДНК, а протонований імідазол і депротонована оцтова кислота - протонований бічний радикал гістидину та депротоновану аспарагінову і глутамінову кислоти відповідно. Енергії канонічної і неканонічної таутомерних форм ізольованих основ і основ у складі специфічних комплексів з модельними радикалами амінокислот розраховували квантово-механічним методом *ah initio* на рівні теорії MP2/6-31G(d,p)//HF/6-31G(d,p) у вакуумі. Є ціла низка переконливих аргументів на користь того, що саме вакуум, а не водне оточення, є адекватною моделлю гідрофобних центрів впізнавання ДНК-полімерази [7].

Результати розрахунків представлено на рисунках і в таблиці. Вони переконливо засвідчують «працездатність» запропонованого механізму. Втягування основ у Н-зв'язки з амінокислотними залишками, які не заважають ані Вотсон-Криківському спарюванню, ані взаємодії інваріантних груп з центром впізнавання ДНК-полімерази, дозволяє зменшити імовірність

Таблиця **і.Енергетичні характеристики (ккал/моль) - відносна енергія неканонічних bb таутомерів цитозину і гуаніну в ізольованому стані та у складі комплексу з депротонованою оцтовою кислотою і протонованим імідазолом відповідно, і енергія їх міжмолекулярної взаємодії (значення в дужках)**

Сполука	Ізольований стан		Основа в комплексі	
	Канонічний таутомер	Неканонічний таутомер	Канонічний таутомер	Неканонічний таутомер
Цитозин	0,00	0,98	0,00 (36,69)	11,64 (26,03)
Гуанін	0,00	0,10	0,00 (40,60)	12,05 (28,80)

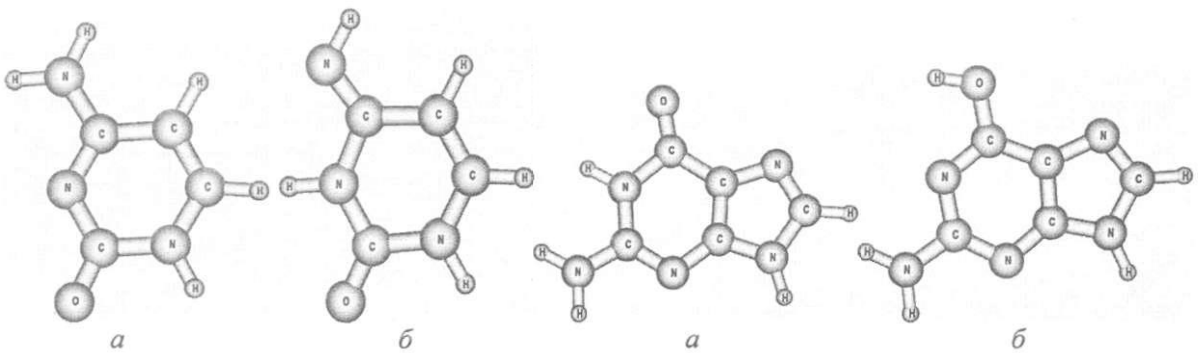

Рис. 1. Геометричні структури канонічних *(а)* і неканонічних (високоенергетичних) (б) таутомерів цитозину і гуаніну, розраховані квантово-механічним методом ab initio на рівні теорії HF/6-3 lG(d, ρ)

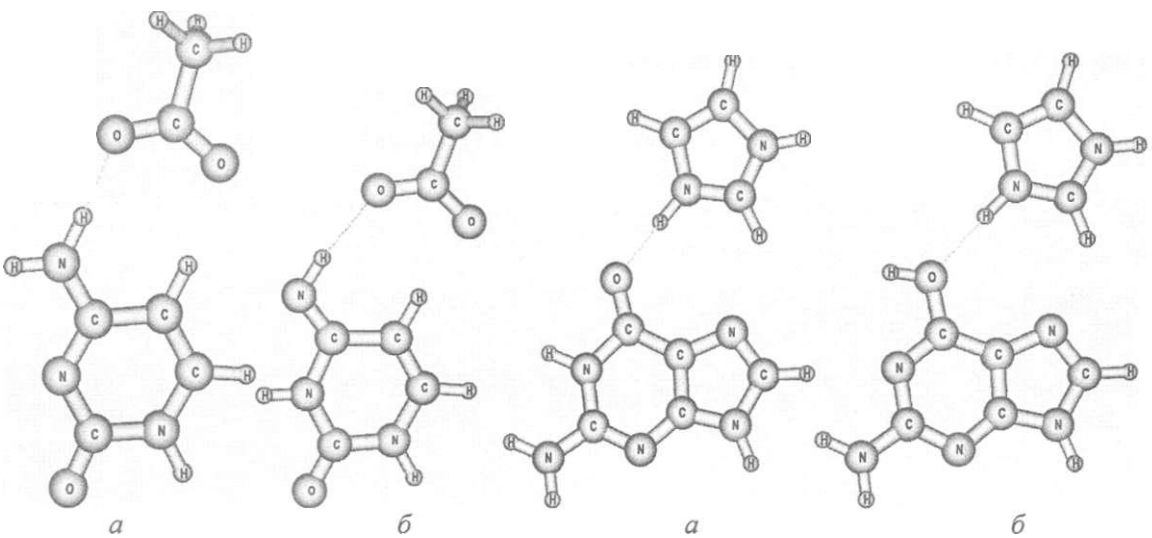

Рис. 2. Геометричні структури воднево-зв'язаних комплексів канонічних *(а)* і неканонічних (б) таутомерів цитозину та гуаніну з депротонованою оцтовою кислотою і протонованим імідазолом відповідно. Водневі зв'язки позначені пунктирними лініями

перебування основи в неканонічній таутомерній формі більше ніж на сім порядків при кімнатній температурі (цю величину розрахували як $exp[(\Delta E_{компл.} - \Delta E_{із.})/kT])$, $_I\Delta E_{із.}$ і $\Delta E_{компл.}$ - відносна енергія неканонічних таутомерів у ізольованому стані та у складі комплексу з амінокислотним залишком амінокислоти відповідно), мінімізуючи тим самим частоту виникнення відповідних потенційних точкових мутацій. Ефект досягається за рахунок суттєвого (понад 10 ккал/моль) зменшення енергії міжмолекулярної взаємодії між амінокислотним залишком і основою при переході останньої в неканонічну таутомерну форму. В результаті відносна енергія неканонічного таутомера в складі комплексу істотно перевищує аналогічну енергію для ізольованої нуклеотидної основи.

На основі отриманих результатів можна зробити припущення, що точкові мутації, причиною яких є спонтанні переходи основ у неканонічну таутомерну форму, виникають лише тоді, коли послаблюється білковий контроль за

таутомерним статусом неспарених основ через послаблення чи дисоціацію водневих зв'язків, відповідальних за цей контроль, у процесі теплових флуктуацій, особливо нерівноважних.

Таким чином, молекулярно-біологічні системи білково-нуклеїнового впізнавання, вочевидь, мають ефективні і водночас прості засоби підтримання основ ДНК при перебігові процесів відтворення генетичної інформації в канонічній таутомерній формі, а відтак - мінімізації частоти спонтанних точкових мутацій, пов'язаних з прототропною таутомерією основ.

1. *ЛьюинБ.* Гены.-М: Мир, 1987.-544 с.
2. *Краевский А. А.* Механизмы, обеспечивающие точность синтеза ДНК // Структурно-функциональные аспекты репликации и репарации ДНК.- Путино, 1983 - С. 75-90.
3. *Goodman M. F.* Mutations cought in the act // Nature.- 1995- V. 378.- N 6554.- P. 237-238.
4. *Поіітев В. К, Шулюпина Н. В., Брусков В. И.* Молекулярные механизмы правильности биосинтеза нуклеиновых кислот. Компьютерное изучение роли полимераз в образовании неправильных пар модифицированными основаниями // Молекулярная биология.-1996,-№ 30.- Вып. 6.-С. 1284-1299.
5. *Gorb L, Leszczynski J.* Intramolecular proton transfer in monohydrated tautomers of cytosine: an *ab initio* post-Hartree-Fock study // Int. J. Quant. Chem - 1998 - N 70- P. 855-862.
6. *Говорун Д. М.* Прототропна таутомерія азотистих основ: новий погляд на стару проблему // Биополимеры и клетка- 1997.-Т. 13-№ 3-С. 191-196.
7. *Войтюк А. А., Близнюк А. А.* Влияние протонирования оснований нуклеиновых кислот на энергию образования Уотсон-Криковских пар // Молекулярная биология.- 1988.— № 22.- Вып. 4.- С. 1080-1086.

O. M. Krechkivska, D. A. Kosach, D. M. Hovorun

HOW DOES DNA-POLIMERASE KEEP NUCLEOTIDE BASIS IN CANONICAL TAUTOMERIC FORM: A SIMPLE PHYSICAL MECHANISM

A new physical mechanism of minimizing mistakes, caused by prototropic tautomerism of nucleotide basis, during biosynthesis ofDNA is proposed. It consists in drawing one of the amino protons of cytosine and adenine, and one of alone electronic pair at position 6 and 4 guanine and thymine, that don't participate in Watson-Crick pairing, in H-bond with aminoacid protein residues.