

Регуляція прототропної таутомерії основ ДНК протонуванням: результати квантово-хімічного дослідження

А. Л. Потягайло, Д. М. Говорун

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

E-mail: dhovorun@imbg.org.ua

Напівемпіричними квантово-хімічними розрахунками (AM1) вперше встановлено, що одноразове протонування основ ДНК, яке не заважає їхньому Вотсон-Криківському спарюванню, суттєво змінює в той чи інший бік (у залежності від його місця) прототропну таутомерну рівновагу останніх. Так, протонування атомів N3 Ade, O6 і N7 Gua, O2 Cyt і O4 Thy стабілізує канонічну таутомерну форму; високоенергетичні неканонічні таутомери — імінний Ade і енольні Gua і Thy — стабілізуються протонуванням атомів N7 Ade, N3 Gua і O2 Thy. Висловлено припущення, що фіксація канонічних таутомерів основ ДНК вибіркоvim протонуванням бічними залишками лізину, аргініну і гістидину може використовуватися ДНК-полімеразою для мінімізації спонтанних помилок біосинтезу ДНК, спричинених прототропною таутомерією основ, на стадії, що передус їхньому спарюванню в центрі розпізнавання правильних пар полімерази.

Вступ. Унікально високий рівень безпомилковості копіювання генетичної інформації (*in vivo* на 10^9+10^{11} нуклеотидів, що включаються в ДНК, трапляється лише одна помилка [1]) є одним з фундаментальних атрибутів живого. Вже на першому етапі полімеразного запобігання помилок біосинтезу, що передус власне поліконденсації, точність досягає $10^{-4}+10^{-7}$, у той час як точність неензиматичного синтезу не перевищує $10^{-1}+10^{-2}$ [1].

Однією з фізико-хімічних причин спонтанних точкових мутацій, що виникають при реплікації ДНК, є прототропні таутомерні перетворення основ із канонічної у високоенергетичну неканонічну форму (див [2] і наведену там бібліографію). Оскільки енергія взаємодії основ у класичній Вотсон-Криківській парі Gua:Cyt ненабагато відрізняється від енергії взаємодії основ у парах, утворених за участі неканонічних таутомерів [2], то підтримання нуклеотидних основ, особливо на стадії, що передус їхньому спарюванню в центрі розпізнавання правильних пар ДНК-полімерази, в

канонічній таутомерній формі є життєво важливою функцією останньої. Фізико-хімічні механізми, на яких вона ґрунтується, залишаються до цього часу незрозумілими [2], оскільки так звані структурні інваріанти класичних Вотсон-Криківських пар — атоми N3 пуринів і O2 піримідинів, що, ймовірно, відіграють роль додаткової матриці розпізнавання правильних пар ДНК-полімеразою [3], практично не змінюють своєї взаємної орієнтації в парах основ, утворених за участі неканонічних таутомерних форм.

Ця робота присвячена квантово-хімічному обґрунтуванню одного з можливих механізмів підтримання нуклеотидних основ ДНК-полімеразою в канонічній таутомерній формі, а саме — за рахунок їхнього протонування. Його привабливість зумовлена, по-перше, тим, що протонування основ ДНК деякими амінокислотними залишками не потребує затрат вільної енергії [4] і, по-друге, що більш важливо, в ряді випадків значно підвищує стабільність Вотсон-Криківських пар [4], що цілком може слугувати чинником додаткової селекції неправильності спарювання.

Матеріали і методи. Розрахунки виконували

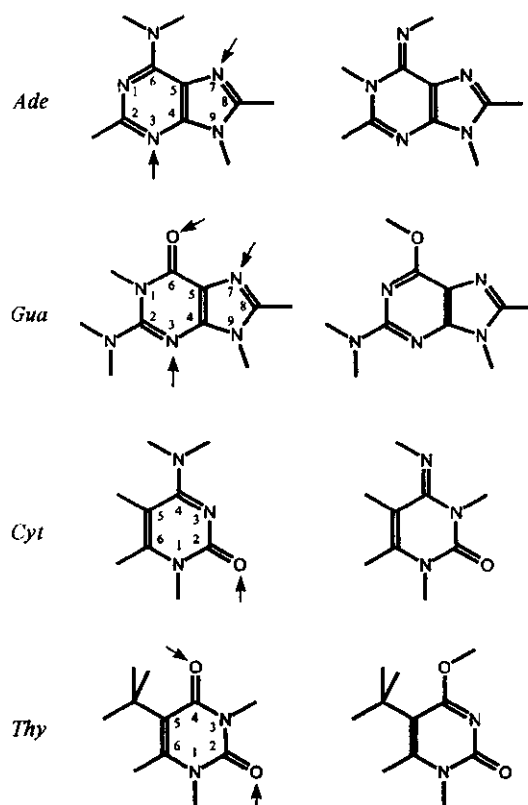
напівемпіричним квантово-хімічним методом AM1, який добре зарекомендував себе для подібного класу задач [5], у вакуумному наближенні. Існує ціла низка переконливих аргументів на користь того, що саме вакуум, а не водне оточення є прийнятною імітацією гідрофобного локального середовища центра впізнавання правильних пар ДНК-полімерази (див., наприклад, [4, 2] і наведену там бібліографію). Здійснювали повну оптимізацію геометричної структури електронейтральних і протонуваних основ ДНК у канонічній і високоенергетичній таутомерній формі (рисунок); відносну енергію останніх визначали як різницю між теплотою утворення неканонічної і канонічної таутомерних форм як для електронейтральної, так і для протонованої основи. Змінами нульової коливальної енергії при цьому нехтували, оскільки їхній внесок у ефект, що визначався, незначний [6].

Результати і обговорення. Аналіз отриманих числових результатів, наведених нижче, свідчить про те, що одноразове протонування основ ДНК, яке не заважає комплементарному Вотсон-Кріківському спарюванню, суттєво впливає на прототропну таутомерію, а саме — істотно змінює відносну енергію високоенергетичних (неканонічних) таутомерів, які спричиняють точкові мутації. При цьому величина і знак ефекту залежать від місця протонування:

Нуклеотидна основа (рисунок) Відносна енергія неканонічного таутомеру, ккал/моль

Ade	13,56
Ade ⁺ (N3)	25,45
Ade ⁺ (N7)	12,07
Thy	16,28
Thy ⁺ (O4)	56,07
Thy ⁺ (O2)	3,47
Gua	3,39
Gua ⁺ (O6)	48,29
Gua ⁺ (N7)	4,62
Gua ⁺ (N3)	-3,04
Cyt	3,45
Cyt ⁺ (O2)	18,16

Так, протонування атомів N3 Ade, O6 і N7 Gua, O2 Cyt і O4 Thy стабілізує канонічну таутомерну форму і призводить до суттєвого зростання відносної енергії відповідних неканонічних форм. При цьому найбільший ефект спостерігається при протонуванні атома O6 Gua: відносна енергія енольного таутомеру протонованої основи зростає на



Канонічні (зліва) та неканонічні (справа) таутомери основ ДНК, що спричиняють точкові мутації під час її реплікації. Нумерація атомів стандартна; місця протонування показано стрілками

44,9 ккал/моль у порівнянні з непротонованою. Іншими словами, протонування основи спричинює зменшення ймовірності її перебування в енольній таутомерній формі при кімнатній температурі в $3 \cdot 10^{32}$ рази, тобто більше ніж на 32 порядки (цю величину розраховували як $\exp(\Delta E/kT)$, де ΔE — збільшення відносної енергії неканонічного таутомеру при протонуванні основи; k — постійна Больцмана; T — абсолютна температура). Найменший ефект стабілізації канонічної таутомерної форми має місце для Gua, протонованого по атому N7: імовірність перебування протонованої основи у рідкісній таутомерній формі зменшується у 7,8 разу в порівнянні з непротонованою.

І, навпаки, високоенергетичні неканонічні таутомери — імінний Ade і енольні Gua і Thy — стабілізуються протонуванням атомів N7 Ade, N3 Gua і O2 Thy. Найменший ефект спостерігається для Ade: значення відносної енергії імінного таутомеру знижується при протонуванні основи всього на 1,5 ккал/моль (для електронейтральної основи

амінний таутомер вигідніший, ніж імінний, на 13,56 ккал/моль), а найбільший для Gua: в протонуваній по атому N3 основі енольна таутомерна форма є навіть вигіднішою (на 3,04 ккал/моль), ніж канонічна кетоформа.

Висновки. Отримані результати дозволяють припустити, що стабілізація канонічних таутомерів основ ДНК адресним протонуванням бічними залишками лізину, аргініну і гістидину (співставлення протофільності нуклеотидних основ з протофільністю цих амінних залишків вказує на те, що вони є найприйнятнішими претендентами на цю роль [4]) використовується ДНК-полімеразою для мінімізації спонтанних помилок біосинтезу ДНК, спричинених прототропною таутомерією основ, на стадії, що передує їхньому спарюванню в її центрі розпізнавання правильних пар. Тим більше, що протонування основ по тих місцях, які сприяють стабілізації канонічної таутомерної форми, значно підвищує також стабільність Вотсон-Крікських пар Ade^{*}:Thy, Ade:Thy^{*} і Gua^{*}:Cyt [4]. Цілком можливо, що такий механізм стабілізації правильних нуклеотидних пар у центрі розпізнавання ДНК-полімерази можна розцінювати як доповнюючий чи навіть альтернативний механізмові, запропонованому раніше Брусковим і Полтєвим (див. [3] і наведену там бібліографію).

A. L. Potyaylo, D. M. Hovorun

Regulation of DNA base prototropic tautomerism by protonation: quantum chemical data

Summary

By means of semi-empirical quantum chemical calculations (AM1) it was first established that a single protonation of DNA bases, that doesn't disrupt Watson-Crick base pairing, substantially changed their tautomeric equilibrium in both directions depending on a protonation site. The protonation of N3 Ade, O6 and N7 Gua, O2 Cyt and O4 Thy atoms stabilizes the canonical tautomeric form, while the high-energy non-canonical tautomers (imino Ade and enolic Gua) are stabilized by the protonation of N7 Ade, N3 Gua and O2 Thy atoms. The stabilization of DNA base canonical tautomers by selected protonation with the Lys, Arg and His side chains was supposed to be used by DNA-polymerase in DNA synthesis to minimize spontaneous mismatches caused by pro-

totropic tautomerism of the bases at the stage previous to their pairing in polymerase sites for matched pairs recognition.

A. L. Potyaylo, D. M. Hovorun

Регуляция прототропной таутомерии оснований ДНК протонированием: результаты квантово-химического исследования

Резюме

Полуэмпирическими квантово-химическими расчетами (AM1) впервые установлено, что однократное протонирование оснований ДНК, не мешающее их Уотсон-Криковскому спариванию, существенно изменяет в ту или иную сторону (в зависимости от его места) прототропное таутомерное равновесие последних. Так, протонирование атомов N3 Ade, O6 и N7 Gua, O2 Cyt и O4 Thy стабилизирует каноническую таутомерную форму; высокоэнергетические неканонические таутомеры — иминный Ade и енольные Gua и Thy — стабилизируются протонированием атомов N7 Ade, N3 Gua и O2 Thy. Высказано предположение, что стабилизация канонических таутомеров оснований ДНК адресным протонированием боковыми остатками лизина, аргинина и гистидина используется ДНК-полимеразой для минимизации спонтанных ошибок биосинтеза ДНК, вызванных прототропной таутомерией оснований, на стадии, предшествующей их спариванию в центре узнавания правильных пар полимеразы.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Краевский А. А., Куханова М. К. Репликация ДНК у Эукариот.—М.: ВИНТИ, 1986.—С. 5—164 (Итоги науки и техники. Сер. Молекуляр. биология; Т. 22).
2. Goodman M. F. Mutations caught in the act // Nature.—1995.—378, N 6554.—Р. 237—238.
3. Полтєв В. И., Шулюпина Н. В., Брусков В. И. Молекулярные механизмы правильности биосинтеза нуклеиновых кислот. Сравнение результатов компьютерного моделирования с экспериментальными данными // Молекуляр. биология.—1998.—32, № 2.—С. 268—276.
4. Войтюк А. А., Елизнюк А. А. Влияние протонирования оснований нуклеиновых кислот на энергию образования Уотсон-Криковских пар // Молекуляр. биология.—1988.—22, № 4.—С. 1080—1086.
5. Говорун Д. М. Прототропна таутомерія азотистих основ: новий погляд на стару проблему // Биополимеры и клетка.—1997.—13, № 3.—С. 191—196.
6. Говорун Д. М., Кондратюк І. В. Газофазні кислотно-лужні властивості канонічних нуклеотидних основ // Доповіді НАН України.—1998.—№ 1.—С. 207—212.

УДК 573.3

Надійшла до редакції 28.12.01