

Наскільки стійкими структурами є мутагенні таутомери основ ДНК?

О. О. Броварець^{1, 2}, Д. М. Говорун^{1, 3}

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03143

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, Україна, 01033

³Інститут високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка
Просп. Академіка Глушкова, 2, корп. 5, Київ, Україна, 03127

brovarets@list.ru

Мета. Визначити час життя мутагенних таутомерів основ ДНК, досліджуючи фізико-хімічні механізми їхньої внутрішньомолекулярної таутомеризації. **Методи.** Неемпірична квантова хімія, аналіз топології електронної густини за Бейдером, фізико-хімічна кінетика. **Результати.** Вивчено фізико-хімічну природу перехідного стану внутрішньомолекулярної таутомеризації основ ДНК, встановлено час життя мутагенних таутомерів останніх. **Висновки.** Час життя мутагенних таутомерів основ ДНК на 3–10 порядків перевищує характерний час реплікації ДНК в клітині ($\sim 10^3$ с). Це підтверджує адекватність постулату, на якому ґрунтується таутомерна гіпотеза Вотсона-Крика щодо спонтанних транзицій. Їхня висока стійкість обумовлена відсутністю як в основній, так і мутагенній таутомерній формі внутрішньомолекулярних Н-зв'язків.

Ключові слова: основи ДНК, мутагенні таутомери, час життя, внутрішньомолекулярне перенесення протона, квантово-хімічні розрахунки.

Вступ. Наріжним каменем так званої таутомерної гіпотези Вотсона і Крика стосовно фундаментальних фізико-хімічних засад спонтанних точкових мутацій ДНК [1], яка отримала подальший розвиток у роботах Топала і Фреско [2, 3] та деяких інших працях [4, 5], є постулат про стабільність мутагенних таутомерів як їхню іманентну структурну властивість. Експериментальна реєстрація деяких із них – імінної форми цитозину [6–8] та енольної форми гуаніну [9] – методами мікрохвильової та інфрачервоної спектроскопії залишає питання відкритим, бо характерний для цих методів час набагато менший за час реплікації ДНК у клітині ($\sim 10^3$ с

[10]). У теоретичних (зазвичай квантово-хімічних) дослідженнях мутагенних таутомерів основ ДНК [11–13] здебільшого не розглядають внутрішньомолекулярні механізми їхньої таутомеризації: на жаль, цьому важливому питанню присвячені лише поодинокі роботи [14, 15]. Нині в літературі відсутні оцінки часу життя мутагенних таутомерів та послідовний аналіз основних фізико-хімічних чинників, які його обмежують.

У цій роботі досліджено елементарні фізико-хімічні механізми внутрішньомолекулярної таутомеризації усіх канонічних основ ДНК з утворенням відповідних мутагенних аналогів та вперше показано, що середній час життя останніх на 3–10 порядків перевищує характерний час реплікації ДНК

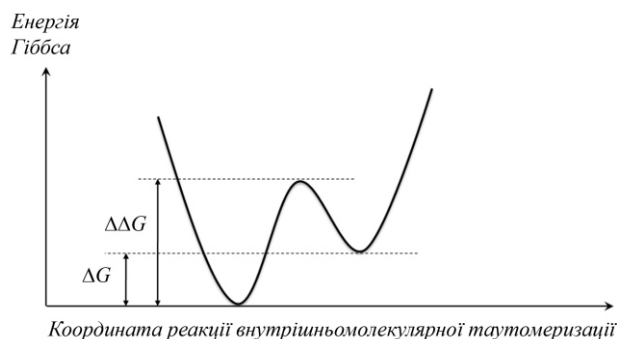


Рис. 1. Енергетичне представлення внутрішньомолекулярної таутомеризації основ ДНК: G – бар'єр прямої таутомеризації основа → основа*; G – енергія таутомеризації; G – бар'єр зворотної таутомеризації основа* → основа

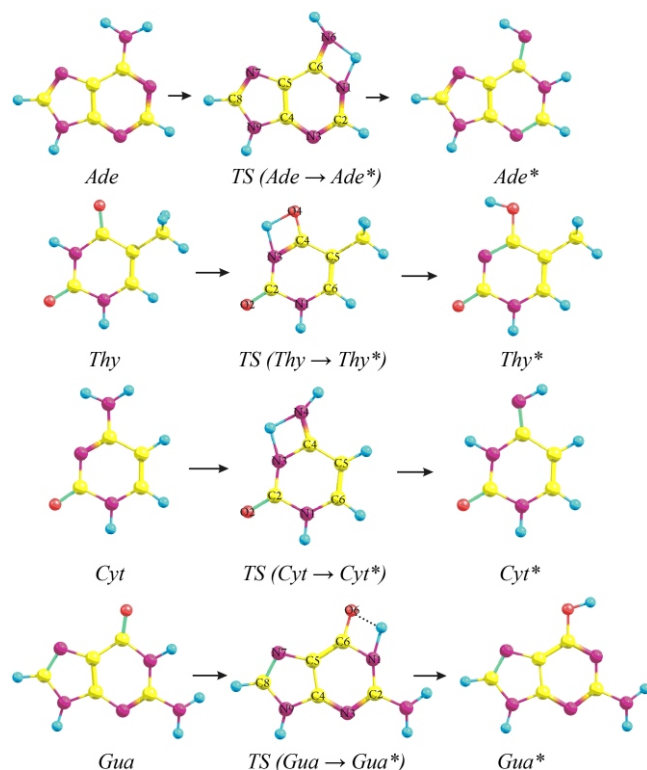


Рис. 2. Внутрішньомолекулярна таутомеризація основ ДНК: геометричне представлення

у клітині. Це підтверджує адекватність вищезгаданого постулату Вотсона і Крика з квантово-механічної точки зору.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження слугували канонічні основи ДНК – аденін (Ade), гуанін (Gua), цитозин (Cyt) і тимін (Thy) – та їхні мутагенні таутомери (позначено зірочками) – Ade*, Gua*, Cyt* і Thy* відповідно. Предмет вивчення –

фізико-хімічна природа внутрішньомолекулярної таутомеризації основ ДНК, що визначає час їхнього життя.

У роботі використано квантово-хімічний метод дослідження на рівні теорії MP2/6-311++G(2df,pd)//V3LYP/6-311++G(d,p), при цьому перехідні стани внутрішньомолекулярної таутомеризації ідентифікували методом STQN [16, 17]. Сталі швидкості для прямої (основа → основа*) та зворотної (основа* → основа) таутомеризації розраховували за формулою [15]

$$k = \Gamma \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{G}{RT}},$$

де

$$\Gamma = 1 + \frac{1}{24} \left(\frac{h \nu_i}{k_B T} \right)^2$$

є множителем Вігнера, що враховує тунелювання (позначення такі ж самі, що й в роботі [15]). Середній час життя (час релаксації) та час напіврозпаду $t_{1/2}$ канонічних і мутагенних таутомерів обчислювали як $t = k^{-1}$ та $t_{1/2} = \ln 2 / k$ [18]. Для ідентифікації можливих внутрішньомолекулярних водневих (H) зв'язків в основах та їхніх таутомерах, а також для з'ясування характеру взаємодій, що утримують протон, який мігрує, у перехідному стані внутрішньомолекулярної таутомеризації застосовано метод аналізу топології електронної густини за Бейдером [19]. Нами використано стандартну нумерацію атомів. Процес внутрішньомолекулярної таутомеризації основ з енергетичної точки зору демонструє рис. 1.

Результати і обговорення. Отримані результати наведено на рис. 2 і в табл. 1, 2. Їхній аналіз дозволяє виокремити такі основні закономірності.

Час життя основ у канонічному таутомерному стані значно перевищує час життя їхніх мутагенних таутомерів. Це означає, що за умов клітини таутомеризація основ відбувається не за внутрішньомолекулярним сценарієм, а з використанням молекул-партнерів, зокрема основ, наприклад комплементарних [20–22]. Час життя мутагенних таутомерів на багато (3–10) порядків перевищує характерний час реплікації ДНК у клітині. Останнє свідчить про те, що постулат, покладений в основу таутомерної

Таблиця 1

Основні кінетичні характеристики внутрішньомолекулярної таутомеризації основ ДНК

| Перехід | G , ккал/моль | k , с ⁻¹ | t , с | $t_{1/2}$, с | ν , см ⁻¹ | G , ккал/моль | K |
|----------|-----------------|-----------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|-----------------|-----------------------|
| Ade Ade* | 45,65 | $9,58 \cdot 10^{-21}$ | $1,04 \cdot 10^{20}$ | $7,24 \cdot 10^{19}$ | 1891,3 | 13,93 | $6,07 \cdot 10^{-11}$ |
| Ade* Ade | 31,72 | $1,58 \cdot 10^{-10}$ | $6,33 \cdot 10^9$ | $4,39 \cdot 10^9$ | 1891,3 | 13,93 | $6,07 \cdot 10^{-11}$ |
| Thy Thy* | 39,22 | $5,04 \cdot 10^{-16}$ | $1,98 \cdot 10^{15}$ | $1,38 \cdot 10^{15}$ | 1903,1 | 11,65 | $2,86 \cdot 10^{-9}$ |
| Thy* Thy | 27,58 | $1,76 \cdot 10^{-7}$ | $5,68 \cdot 10^6$ | $3,94 \cdot 10^6$ | 1903,1 | 11,65 | $2,86 \cdot 10^{-9}$ |
| Cyt Cyt* | 38,59 | $1,48 \cdot 10^{-15}$ | $6,78 \cdot 10^{14}$ | $4,70 \cdot 10^{14}$ | 1912,3 | 2,18 | $2,52 \cdot 10^{-2}$ |
| Cyt* Cyt | 36,41 | $5,85 \cdot 10^{-14}$ | $1,71 \cdot 10^{13}$ | $1,19 \cdot 10^{13}$ | 1912,3 | 2,18 | $2,52 \cdot 10^{-2}$ |
| Gua Gua* | 32,29 | $5,94 \cdot 10^{-11}$ | $1,68 \cdot 10^{10}$ | $1,17 \cdot 10^{10}$ | 1873,1 | 0,13 | 0,80 |
| Gua* Gua | 32,16 | $7,40 \cdot 10^{-11}$ | $1,35 \cdot 10^{10}$ | $9,36 \cdot 10^{10}$ | 1873,1 | 0,13 | 0,80 |

Примітка. Позначення параметрів див. на рис. 1 та в тексті; K – стала таутомерної рівноваги.

Таблиця 2

Вибрані геометричні, електричні та електронно-топологічні характеристики перехідних станів внутрішньомолекулярної таутомеризації основ ДНК

| Перехідний стан | Розрихлені хімічні зв'язки (Å) та кут (град), який вони утворюють | ρ , а. о. | μ , а. о. | μ , D | |
|-----------------|---|----------------|---------------|-----------|------|
| TS (Ade Ade*) | N1H | 1,317 | 0,142 | -0,154 | 2,39 |
| | N6H | 1,392 | 0,119 | -0,034 | 2,39 |
| | N1HN6 | 102,4 | – | – | 2,39 |
| TS (Thy Thy*) | N3H | 1,328 | 0,137 | -0,100 | 5,63 |
| | O4H | 1,331 | 0,132 | -0,026 | 5,63 |
| | N3HN4 | 104,3 | – | – | 5,63 |
| TS (Gua Gua*) | N3H | 1,337 | 0,135 | -0,111 | 5,85 |
| | N4H | 1,363 | 0,127 | -0,071 | 5,85 |
| | N3HN4 | 102,0 | – | – | 5,85 |
| TS (Gua Gua*) | N1H | 1,300 | 0,146 | -0,152 | 5,62 |
| | O6H | 1,362 | 0,123 | 0,022 | 5,62 |
| | N1HO6 | 104,8 | – | – | 5,62 |

Примітка. Н – протон, що мігрує; N1H...O6 – Н-зв'язок; ρ та μ – значення електронної густини та лапласіану електронної густини у критичній точці зв'язку відповідно; μ – дипольний момент.

гіпотези Вотсона і Крика, є адекватним, а припущення стосовно використання додаткових літер для запису генетичної інформації в ДНК (власні дані, які нині друкуються) не позбавлене фізико-хімічного і біологічного [23] сенсу.

Доволі висока стійкість мутагенних таутомерів пов'язана із відсутністю як в основній, так і мутагенній таутомерній формі основ ДНК внутрішньомолекулярних Н-зв'язків, які, зазвичай, є ефективним каналом міграції протона вздовж них.

Перехідні стани внутрішньомолекулярної таутомеризації основ ДНК є планарними, полярними структурами. У разі таутомеризації Gua треба мати на увазі ефективну планарність, оскільки вільна енергія Гіббса сплюснення пірамідального амінного фрагмента C2N2H₂ (N3C2N2H = 14,4 і N1C2N2H = 18,0 град), яка становить 207,4 см⁻¹, помітно менша, ніж нульова енергія (354,7 см⁻¹) відповідного віялового коливання. Протон, що мігрує, утримується в них парою розрихлених хімічних зв'язків (рис. 2, табл. 2). Що ж до Gua, то один із них, а саме – N1H...O6 є доволі сильним внутрішньомолекулярним Н-зв'язком. У перехідному стані молекула суттєво деформована порівняно з основним таутомерним станом: зміни довжини хімічних зв'язків сягають 0,067 Å, а валентних кутів – 8,7 град.

Квантово-механічне тунелювання зменшує час життя мутагенних таутомерів, розрахований у класичному наближенні, майже в 5 разів, і збільшується (також майже в 5 разів) при заміні водню, що мігрує, на дейтерій.

Висновки. Час життя мутагенних таутомерів основ ДНК на 3–10 порядків перевищує характерний час реплікації ДНК у клітині (~10³ с). Це підтверджує адекватність постулату, на якому ґрунтується таутомерна гіпотеза Вотсона-Крика щодо спонтанних транзицій. Висока стійкість мутагенних таутомерів обумовлена відсутністю як в основній, так і в мутагенній таутомерній формі внутрішньомолекулярних Н-зв'язків. Втягування атомних груп основ ДНК у міжмолекулярні Н-зв'язки, між якими мігрує протон, призводитиме до зменшення часу життя деяких мутагенних таутомерів.

O. O. Brovarets', D. M. Hovorun

How stable are the mutagenic tautomers of DNA bases?

Summary

Aim. To determine the lifetime of the mutagenic tautomers of DNA base pairs through the investigation of the physicochemical mechanisms of their intramolecular proton transfer. **Methods.** Non-empirical quantum chemistry, the analysis of the electron density by means of Bader's atom in molecules (AIM) theory and physicochemical kinetics were used. **Results.** Physicochemical character of the transition state of the intramolecular tautomerisation of DNA bases was investigated, the lifetime of mutagenic tautomers was calculated. **Conclusions.** The lifetime of the DNA

bases mutagenic tautomers by 3–10 orders exceeds typical time of DNA replication in the cell (~10³ s). This fact confirms that the postulate, on which the Watson-Crick tautomeric hypothesis of spontaneous transitions grounds, is adequate. The absence of intramolecular H-bonds in the canonical and mutagenic tautomeric forms determine their high stability.

Keywords: DNA bases, mutagenic tautomers, the lifetime, intramolecular proton transfer, quantum-chemical calculations.

O. A. Brovarets, D. M. Hovorun

Насколько стабильными являются мутагенные таутомеры оснований ДНК?

Резюме

Цель. Определить время жизни мутагенных таутомеров оснований ДНК, исследуя физико-химические механизмы их внутримолекулярной таутомеризации. **Методы.** Неэмпирическая квантовая химия, анализ топологии электронной плотности по Бейдеру, физико-химическая кинетика. **Результаты.** Изучена физико-химическая природа переходного состояния внутримолекулярной таутомеризации оснований ДНК, установлено время жизни мутагенных таутомеров последних. **Выводы.** Время жизни мутагенных таутомеров оснований ДНК на 3–10 порядков превышает характерное время репликации ДНК в клетке (~10³ с). Это подтверждает адекватность постулата, на котором базируется таутомерная гипотеза Вотсона-Крика спонтанных транзиций. Высокая стабильность мутагенных таутомеров обусловлена отсутствием как в основной, так и мутагенной таутомерной форме внутримолекулярных Н-связей.

Ключевые слова: основания ДНК, мутагенные таутомеры, время жизни, внутримолекулярный перенос протона, квантово-химические расчеты.

PERELIK LITERATURI

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 the substitution mutations // Nature.–1976.–**263**, N 5575.–P. 285–289.
3. Topal M. D., Fresco J. R. Base pairing and fidelity in codon-anticodon interaction // Nature.–1976.–**263**, N 5575.–P. 289–293.
4. Kwiatkowski J. S., Pullman B. Tautomerism and electronic structure of biological pyrimidines // Adv. Heterocycl. Chem.–1975.–**18**.–P. 199–335.
5. 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**, N 4–6.–P. 285–293.
6. Dreyfus M., Bensaude O., Dodin G., Dubois J. E. Tautomerism in cytosine and 3-methylcytosine. A thermodynamic and kinetic study // J. Am. Chem. Soc.–1976.–**98**, N 20.–P. 6338–6349.
7. Brown R. D., Godfrey P. D., McNaughton D., Pierlot A. P. Tautomers of cytosine by microwave spectroscopy // J. Am. Chem. Soc.–1989.–**111**, N 6.–P. 2308–2310.
8. Szczesniak M., Szczepaniak K., Kwiatkowski J. S., KuBulat K., Person W. B. Matrix isolation infrared studies of nucleic

- acid constituents. 5. Experimental matrix-isolation and theoretical *ab initio* SCF molecular orbital studies of the infrared spectra of cytosine monomers // *J. Am. Chem. Soc.*—1988.—**110**, N 25.—P. 8319–8330.
9. *Szczepaniak K., Szczesniak M.* Matrix isolation infrared studies of nucleic acid constituents: Part 4. Guanine and 9-methylguanine monomers and their keto-enol tautomerism // *J. Mol. Struct.*—1987.—**156**, N 1–2.—P. 29–42.
 10. *Fowler R. G., Degnen G. E., Cox E. C.* Mutational specificity of a conditional *Escherichia coli* mutator, mutD5 // *Mol. Gen. Genet.*—1974.—**133**, N 3.—P. 179–191.
 11. *Les A., Adamowicz L., Bartlett R. J.* Relative stability of cytosine tautomers with the coupled cluster method and first-order correlation orbitals // *J. Phys. Chem.*—1989.—**93**, N 10.—P. 4001–4005.
 12. *Estrin D. A., Paglieri L., Corongiu G.* A density functional study of tautomerism of uracil and cytosine // *J. Phys. Chem.*—1994.—**98**, N 22.—P. 5653–5660.
 13. *Ha T.-K., Keller H.-J., Gunde R., Gunthard H.-H.* Energy increment method based on quantum chemical results: a general recipe for approximative prediction of isomerization and tautomerization energies of pyrimidine and purine nucleic acid bases and related compounds // *J. Phys. Chem. A.*—1999.—**103**, N 33.—P. 6612–6623.
 14. *Podolyan Y., Gorb L., Leszczynski J.* *Ab initio* study of the prototropic tautomerism of cytosine and guanine and their mutations // *Int. J. Mol. Sci.*—2003.—**4**, N 7.—P. 410–421.
 15. *Morpurgo S., Bossa M., Morpurgo G. O.* *Ab initio* study of intramolecular proton transfer reactions in cytosine // *Chem. Phys. Lett.*—1997.—**280**, N 3–4.—P. 233–238.
 16. *Peng C., Schlegel H. B.* Combining synchronous transit and quasi-newton methods to find transition states // *Israel J. Chem.*—1993.—**33**, N 4.—P. 449–454.
 17. *Peng C., Ayala P. Y., Schlegel H. B., Frisch M. J.* Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states // *J. Comput. Chem.*—1996.—**17**, N 1.—P. 49–56.
 18. *Marshall A. G.* Biophysical chemistry, principles, techniques and applications.—New York: Wiley & Sons, 1978.—482 p.
 19. *Bader R. W. F.* Atoms in molecules. A quantum theory.—Oxford: Clarendon Press, 1990.—532 p.
 20. *Florjan J., Hroudá V., Hobza P.* Proton transfer in the adenine-thymine base pair // *J. Am. Chem. Soc.*—1994.—**116**, N 4.—P. 1457–1460.
 21. *Hroudá V., Florian J., Hobza P.* Structure, energetics, and harmonic vibrational spectra of the adenine-thymine and adenine*-thymine* base pairs: gradient nonempirical and semiempirical study // *J. Phys. Chem.*—1993.—**97**, N 8.—P. 1542–1557.
 22. *Gorb L., Podolyan Y., Dziekonski P., Sokalski W. A., Leszczynski J.* Double-proton transfer in adenine-thymine and guanine-cytosine base pairs. A post-Hartree-Fock *ab initio* study // *J. Am. Chem. Soc.*—2004.—**126**, N 32.—P. 10119–10129.
 23. *Inge-Vechtomov S. G.* Neodnoznachnost' matrichnykh protsessov kak faktor adaptatsii // *Sistemy nadezhnosti kletki / Pod red. D. M. Grodzinskogo.*—Kyiv: Naukova dumka, 1977.—P. 75–85.

УДК 577.3

Надійшла до редакції 14.12.09