



УДК 577.3

© 2009

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

Фізична модель впізнавання вотсон-криківських пар основ ДНК білками реплікативного комплексу

Вперше запропоновано та обгрунтовано з використанням неемпіричних квантово-механічних методів просту фізичну модель впізнавання вотсон-криківських пар основ білками реплікативного комплексу з боку мажорної борозенки ДНК. Показано, що найімовірнішими претендентами на цю роль є аспарагін або глутамін, які своїм амідним бічним радикалом взаємодіють (з урахуванням його повороту на 180° навколо одинарного зв'язку С–С) двома Н-зв'язками NH...O4/6 і C=O...HN6/4 з кожною із чотирьох вотсон-криківських пар основ.

Реплікація ДНК *in vivo* має високу точність — у середньому 10^{-9} помилок на пару основ [1]. Незважаючи на неабияку біологічну роль цих процесів у функціонуванні клітини, їхні фізичні механізми нині до кінця не з'ясовано (див. [2–5] та наведену там бібліюгр.).

Теоретично [2, 3] і експериментально [6, 7] на моделях встановлено, що ДНК-полімераза *in vitro* впізнає вотсон-криківські пари нуклеотидів водневими (Н) зв'язками між її амінокислотними залишками, що утворюють досить жорсткий центр впізнавання, та так звані інваріантні атомні групи нуклеотидних основ, а також цукрових залишків. Проте такі модельні уявлення є неповними, оскільки вони не враховують роль білків реплікативного комплексу, які, функціонуючи *in vivo* разом з ДНК-полімеразою [1], підвищують точність реплікації на три–чотири порядки порівняно з аналогічною величиною в експериментах *in vitro*, коли ці білки відсутні.

У цій роботі вперше описано просту фізичну модель впізнавання вотсон-криківських пар основ білками реплікативного комплексу з боку мажорної борозенки ДНК, для обгрунтування якої використано сучасні неемпіричні квантово-механічні методи. Показано, що найімовірнішими претендентами на цю роль є аспарагін або глутамін, які за допомогою своїх амідних бічних радикалів інваріантно (з урахуванням повороту на 180° навколо одинарного зв'язку С–С) взаємодіють двома Н-зв'язками NH...O4/6 і C=O...HN6/4 з кожною із чотирьох вотсон-криківських пар основ ДНК Т · А, А · Т, С · G і G · С.

Об'єкти та методи дослідження. У дослідженні використовували найпростіші модельні об'єкти — класичні вотсон-криківські пари нуклеотидних основ, які моделюють структури, утворені комплементарними нуклеотидами, та їхні комплекси з найпростішими молекулами амінокислотних залишків, що належать білкам реплікативного комплексу.

Квантово-механічні розрахунки геометричної та електронної будови досліджуваних об'єктів проводили на рівні теорії DFT B3LYP/6-311++G(d,p) у вакуумному наближенні, яке є адекватним для даного класу задач [8, 9], бо задовільно моделює гідрофобне середовище центру впізнавання ДНК-полімерази з низькою діелектричною проникністю. Усі зоптимізовані структури перевіряли на стійкість за відсутністю уявних частот у їхніх коливальних спектрах, які розраховували в гармонійному наближенні. Електронну енергію взаємодії в парах основ та між парами основ і модельними амінокислотними залишками визначали на рівні теорії MP2/6-311++G(d,p)//B3LYP/6-311++G(d,p) з урахуванням так званої BSSE-поправки на базисний набір функцій [10]. Усі квантово-механічні розрахунки виконували з використанням програмного пакета "GAUSSIAN03" для платформи Win32 [11].

Міжмолекулярні Н-зв'язки ідентифікували та досліджували методом аналізу топології електронної густини [12, 13] (так звана квантово-механічна теорія атомів у молекулах Бейдера), використовуючи хвильові функції, отримані на рівні теорії B3LYP/6-311++G(d,p). При цьому енергію Н-зв'язків визначали за формулою, запропонованою в роботі [14]. Топологію електронної густини аналізували за допомогою програмного пакета AIM2000.

У роботі використовували загальноприйнятну нумерацію атомів [15].

Результати та їхнє обговорення. Моделювання гіпотетичного центру впізнавання вотсон-криківських пар основ білками реплікативного комплексу ДНК здійснювали у два етапи. Спочатку, спираючись на якісний просторовий аналіз, з усіх 20 амінокислот були вибрані лише ті, що здатні своїми бічними радикалами утворювати найпростішу структуру, яка б була комплементарною до всіх чотирьох пар основ, що розпізнаються нею, і не зазнавала при цьому істотної просторової реорганізації при переході від однієї пари до іншої. Виявилось, що вимогам інваріантної взаємодії відповідають лише чотири амінокислоти — аспарагінова і глутамінова та аспарагін і глутамін, які мають карбоксильний та амідний залишки відповідно. Потім, узявши цей результат за основу, вивчали електронну та просторову будову водневозв'язаних комплексів найпростіших моделей цих залишків — HCOOH і HCONH₂ відповідно — із вотсон-криківськими парами основ ДНК.

Аналіз одержаних результатів свідчить про те, що обидва модельні амінокислотні залишки утворюють досить міцні копланарні Н-комплекси з вотсон-криківськими парами основ, зв'язуючись з ними за допомогою двох (у одному випадку — лише одного) нееквівалентних міжмолекулярних Н-зв'язків (табл. 1, 2, рис. 1). При цьому карбоксильна група HCOOH забезпечує більшу електронну енергію взаємодії з парами у комплексах (Т·А/А·Т)·HCOOH та (С·G/G·C)·HCOOH — 10,46 і 15,39 ккал/моль відповідно, ніж амідна група HCONH₂ у комплексах (Т·А/А·Т)·HCONH₂ і (С·G/G·C)·HCONH₂ — 7,78 і 14,50 ккал/моль відповідно. Зазначимо, що електронна енергія взаємодії модельних амінокислотних залишків у всіх комплексах з вотсон-криківськими парами основ ДНК помітно менша, ніж аналогічна величина в останніх (13,50 ккал/моль у парі А·Т/Т·А і 27,19 ккал/моль у парі G·C/C·G), хоч і співмірна з нею. Порівнюючи електронну енергію взаємодії для всіх досліджених структур із сумарною енергією відповідних Н-зв'язків (див. табл. 1), бачимо, що внесок останніх є домінуючим. Унікальна, на наш погляд, притягувальна взаємодія спостерігається в комплексі (Т·А/А·Т)·HCOOH, а саме — ван-дер-ваальсівський контакт N6...O ($d_{N6...O} = 3,016 \text{ \AA}$, $\rho = 0,008 \text{ ат. од.}$, $\Delta\rho = 0,034 \text{ ат. од.}$). На жаль, у літературі відсутні да-

ні про співвідношення, які б дозволяли оцінювати енергію таких взаємодій на основі їхніх електронно-топологічних характеристик. Попри те що карбоксильна група має енергетичні переваги над амідною в розпізнаванні вотсон-криківських пар (див. табл. 1), остання забезпечує помітно кращу просторову інваріантність центру розпізнавання, ніж перша (рис. 2).

Привертає до себе увагу те, що при утворенні комплексів модельних бічних радикалів амінокислот із вотсон-криківськими парами основ ДНК змінюється енергія всіх Н-зв'язків між основами. У всіх комплексах енергія верхнього (з боку мажорної борозенки) внутрішньопарного Н-зв'язку знижується, а нижнього (з боку малої борозенки) і середнього — посилюється таким чином, що їхня сумарна енергія мало відрізняється від аналогічної величини в ізольованих вотсон-криківських парах (див. табл. 2). Ці зміни енергії Н-зв'язків корелюють зі змінами їхніх довжин $d_{A...B}$ та $d_{H...B}$, подовжень Δd_{AH} і такими електронно-топологічними характеристиками, як ρ і $\Delta\rho$ (див. табл. 1, 2): при зміцненні Н-зв'язку перші два параметри зменшуються, а останні три — зростають, і навпаки. Цікаво, що третій (нижній) Н-зв'язок C2H...O2 у парі T · A/A · T, енергія якого становить 0,74 ккал/моль, що перевищує kT (0,62 ккал/моль за кімнатної температури), помітно посилюється в комплексах і його енергія зростає до 1,14 ккал/моль у структурі (T · A/A · T) · HCOOH. Це,

Таблиця 1. Електронно-топологічні та енергетичні характеристики міжмолекулярних Н-зв'язків у досліджуваних структурах

Пари основ та їхні комплекси	Н-зв'язок АН...В	ρ , ат.од.	$\nabla^2\rho$, ат.од.	100ε	$d_{BCP-RCP}$, ат.од.	$E_{НВ}$, ккал/моль
(T · A/A · T) · HCOOH	OH...O4	0,039	0,134	1,27	2,74	11,25
	N6H...O4	0,019	0,069	4,93	2,02	4,01
	N3H...N1	0,045	0,094	6,23	2,35	11,47
	C2H...O2	0,006	0,020	0,22	1,47	1,14
(T · A/A · T) · HCONH ₂	NH...O4	0,020	0,082	0,93	2,60	4,49
	N6H...O	0,012	0,047	7,88	3,02	2,46
	N6H...O4	0,021	0,076	4,79	2,04	4,55
	N3H...N1	0,044	0,093	6,31	2,31	11,04
T · A/A · T	C2H...O2	0,006	0,018	1,12	1,42	1,03
	N6H...O4	0,026	0,093	4,39	2,13	5,98
	N3H...N1	0,040	0,093	6,49	2,28	9,68
	C2H...O2	0,004	0,014	3,40	1,27	0,74
(C · G/G · C) · HCOOH	N4H...O	0,012	0,050	27,28	2,71	2,56
	OH...O6	0,043	0,137	2,34	2,68	12,57
	N4H...O6	0,031	0,108	4,84	2,14	7,83
	N1H...N3	0,033	0,087	6,81	2,18	7,54
	N2H...O2	0,031	0,105	5,45	2,18	7,51
	N4H...O	0,018	0,069	1,50	2,87	3,80
(C · G/G · C) · HCONH ₂	NH...O6	0,026	0,101	2,45	2,59	6,28
	N4H...O6	0,033	0,114	4,28	2,14	8,63
	N1H...N3	0,034	0,087	6,83	2,15	7,63
	N2H...O2	0,030	0,101	5,56	2,17	7,14
	N4H...O6	0,037	0,120	3,71	2,20	9,95
	N1H...N3	0,033	0,088	6,93	2,15	7,36
C · G/G · C	N2H...O2	0,027	0,094	5,78	2,14	6,22

Примітка. ρ і $\Delta\rho$ — значення електронної густини і лапласіана електронної густини в критичній точці відповідно; ε — еліптичність; $d_{BCP-RCP}$ — відстань від критичної точки зв'язку (BCP) до кругової критичної точки (RCP) [12]; $E_{НВ}$ — енергія Н-зв'язку [14].

зокрема, може бути свідченням його біологічної ролі, попри його незначний внесок ($\sim 5,5\%$) у енергію стабілізації ізольованої пари (13,5 ккал/моль). Побіжно зазначимо, що отримані нами дані дозволяють дати відповідь на запитання щодо відносної енергії Н-зв'язків у вотсон-криківських парах — за своєю енергетикою вони утворюють такі ряди пріоритетності: $E_{N3H...N1} > E_{N6H...O4} > E_{C2H...O2}$ у парі $T \cdot A/A \cdot T$ і $E_{N4H...O6} > E_{N1H...N3} > E_{N2H...O2}$ у парі $C \cdot G/G \cdot C$.

Виходячи із стеричних міркувань, легко зрозуміти, чому запропонований нами механізм впізнавання дозволяє ефективно пригнічувати синтез неправильних пар $G \cdot T/T \cdot G$ та $A \cdot C/C \cdot A$: причина вельми проста і полягає в істотній відмінності геометрії цих пар від вотсон-криківських [2–4]. Згадані пари не можуть комплементарно розміститися в центрі впізнавання, внаслідок чого останній не набуває компетентної конфігурації і не запусить хімічну стадію процесу біосинтезу ДНК.

Насамкінець зазначимо, що всі вивчені та охарактеризовані нами Н-зв'язки задовольняють усі критерії, запропоновані Кохом і Попельє [11]. Тут ці дані не наведено, вони будуть предметом наших наступних публікацій.

Таким чином, уперше із залученням неемпіричного квантово-механічного моделювання запропоновано і обгрунтовано просту фізичну модель розпізнавання вотсон-криківських пар основ ДНК та інгібування біосинтезу неправильних пар, утворених основами в канонічній таутомерній формі, білками реплікативного комплексу з боку мажорної борозен-

Таблиця 2. Геометричні характеристики Н-зв'язків у досліджуваних структурах

Пари основ та їхні комплекси	Н-зв'язок АН...В	$d_{A...B}$, Å	$d_{H...B}$, Å	$\angle AN...B$, град.	Δd_{AN} , Å
$(T \cdot A/A \cdot T) \cdot HCOOH$	OH...O4	2,715	1,723	179,8	0,021
	N6H...O4	3,076	2,062	170,0	0,008
	N3H...N1	2,846	1,792	177,9	0,042
	C2H...O2	3,768	2,682	135,1	0,00013
$(T \cdot A/A \cdot T) \cdot HCONH_2$	NH...O4	3,010	1,992	177,7	0,009
	N6H...O	3,304	2,295	145,1	0,003
	N6H...O4	3,037	2,022	175,0	0,008
	N3H...N1	2,857	1,803	178,1	0,041
$T \cdot A/A \cdot T$	C2H...O2	3,818	2,732	133,6	0,00021
	N6AH...O4	2,946	1,926	173,5	0,014
	N3H...N1	2,886	1,841	178,8	0,032
	C2H...O2	3,975	2,890	132,3	0,00022
$(C \cdot G/G \cdot C) \cdot HCOOH$	N4H...O	3,320	2,312	115,4	0,003
	OH...O6	2,693	1,694	175,4	0,027
	N4H...O6	2,874	1,851	178,7	0,016
	N1H...N3	2,950	1,913	178,8	0,025
$(C \cdot G/G \cdot C) \cdot HCONH_2$	N2H...O2	2,883	1,859	179,4	0,015
	N4H...O	3,113	2,101	134,5	0,007
	NH...O6	2,919	1,896	175,2	0,014
	N4H...O6	2,849	1,825	178,1	0,017
$C \cdot G/G \cdot C$	N1H...N3	2,948	1,911	178,5	0,025
	N2H...O2	2,898	1,874	179,4	0,016
	N4H...O6	2,809	1,774	178,8	0,027
	N1H...N3	2,954	1,922	177,1	0,020
	N2H...O2	2,936	1,915	178,4	0,012

Примітка. $d_{A...B}$, $d_{H...B}$ — відстань між атомами А і В та Н і В відповідно, які беруть участь у Н-зв'язку АН...В; $\angle AN...B$ — кут Н-зв'язування; Δd_{AN} — подовження хімічного зв'язку АН при утворенні Н-зв'язку АН...В.

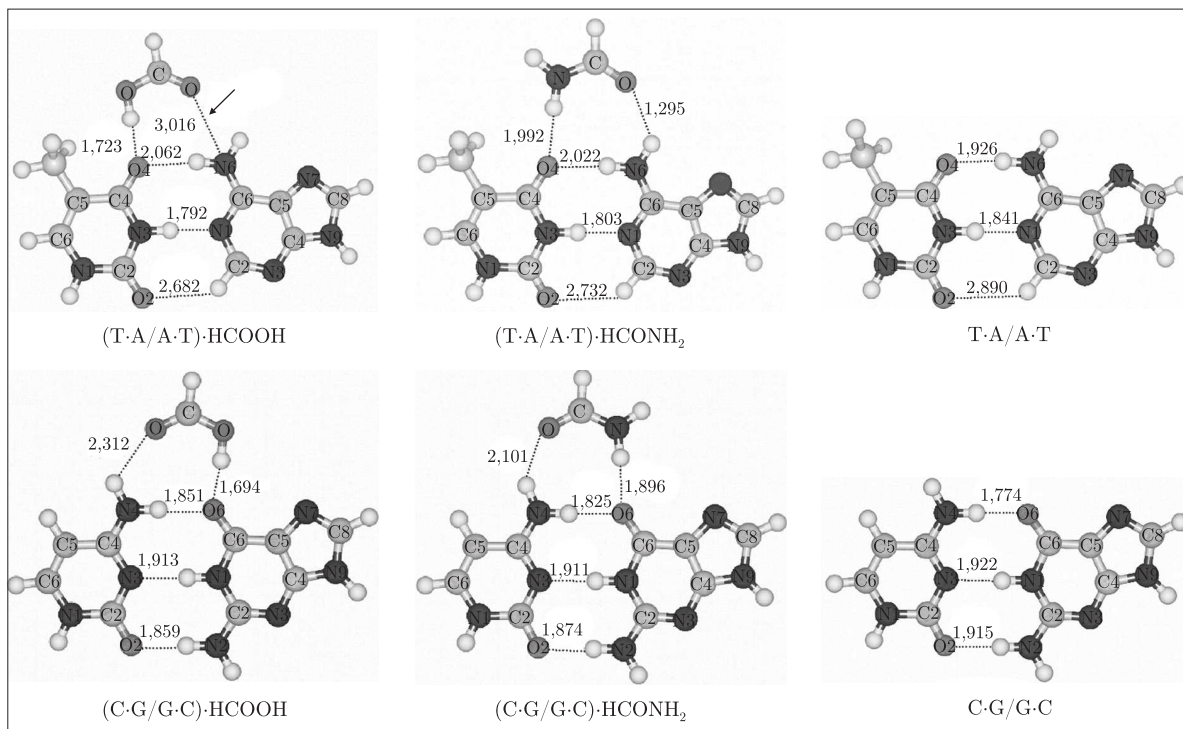


Рис. 1. Геометрична структура водсон-кріківських пар основ ДНК (праворуч) та їхніх комплексів з модельними залишками аспарагінової і глутамінової кислот (ліворуч) та аспарагіну і глутаміну (посередині) за даними квантово-механічних розрахунків на рівні теорії B3LYP/6-311++G(d,p). Пунктиром зображено міжмолекулярні Н-зв'язки, біля кожного з них вказано його довжину (Å) — відстань між атомами Н і В; у комплексі (Т · А/А · Т) · НСООН стрілкою позначено ван-дер-ваальсівський контакт N6...O

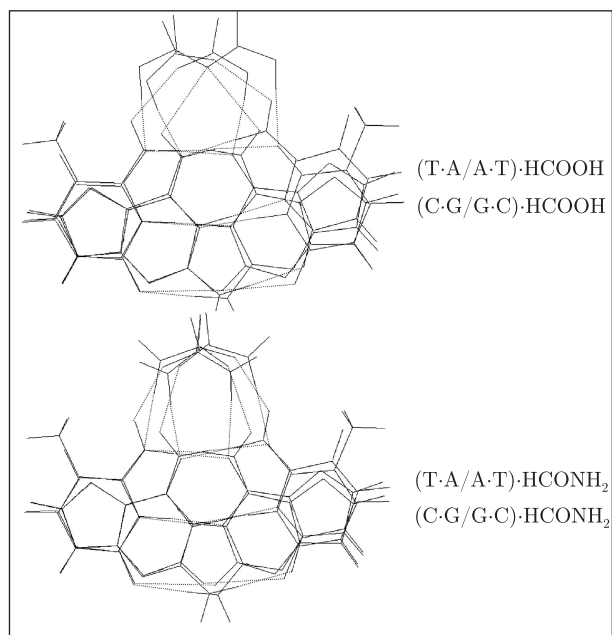


Рис. 2. Просторова квазіізоморфність досліджуваних комплексів

ки ДНК. Доведено, що найімовірнішим кандидатом на роль амінокислот, які забезпечують цей сценарій, є аспарагін та глутамін, бічні радикали яких інваріантно взаємодіють з усіма чотирма правильними парами двома нееквівалентними Н-зв'язками NH...O4/O6 і C=O...HN6/N4. Така модель фактично унеможливорює помилки біосинтезу ДНК, пов'язані з утворенням неправильних пар AC/CA та GT/TG основами в канонічній (основній) таутомерній формі [2, 3], і свідчить на користь таутомерного механізму спонтанних точкових мутацій [4], вперше запропонованого Вотсоном і Криком (відповідну бібліогр. див. у роботі [4]).

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.

1. *Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al.* Molecular biology of the cell. – 5th ed. – New York: Garland Science. Taylor & Francis Group, 2008. – 1268 p.
2. *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.
3. *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.
4. *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.
5. *Sun L., Cuckier R. I., Bu Yu.* Factors determining the deriving force of DNA formation: geometrical differences of base pairs, dehydration of bases, and the arginine assisting // J. Phys. Chem. B. – 2007. – **111**, No 7. – P. 1802–1808.
6. *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.
7. *Beard W. A., Wilson S. H.* Structural insights into the origins of DNA polymerase fidelity // Structure. – 2003. – **11**. – P. 489–496.
8. *Dewar M. J. S., Storch D. M.* Alternative view of enzyme reactions // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1985. – **82**. – P. 2225–2229.
9. *Petrushka J., Sowers L. C., Goodman M. F.* Comparison of nucleotide interactions in water, proteins, and vacuum: model for DNA polymerase fidelity // Ibid. – 1986. – **83**. – P. 1559–1562.
10. *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.
11. *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.
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. *Зенгер В.* Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. – Москва: Мир, 1987. – 584 с.

*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**

A physical model of Watson-Crick base pairs DNA recognition by proteins of the replicative complex

A simple physical model of Watson-Crick base pairs recognition by the proteins of a replicative complex from the side of the major groove of DNA using modern non-empirical quantum-mechanical methods is suggested and proved for the first time. It is shown that the most credible candidate for this role is asparagin or glutamine which interacts with his own amide residue (taking into account its rotation by 180° around single bond C–C) by both H-bonds NH...O4/6 and C–O...HN6/4 with each of four Watson-Crick base pairs.