

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

БРОВАРЕЦЬ ОЛЬГА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 577.3: 577.32: 577.338

**МІКРОСТРУКТУРНІ МЕХАНІЗМИ ВИНИКНЕННЯ СПОНТАННИХ
ТОЧКОВИХ МУТАЦІЙ**

03.00.02 – біофізика (фізико-математичні науки)

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора фізико-математичних наук

Київ – 2015

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі молекулярної та квантової біофізики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ.

Науковий консультант: доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Говорун Дмитро Миколайович,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
заступник директора інституту з наукової роботи,
завідувач відділу молекулярної та квантової біофізики.

Офіційні опоненти: доктор фізико-математичних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Суходуб Леонід Федорович,
Сумський державний університет Міністерства освіти і
науки України,
завідувач кафедри біофізики, біохімії, фармакології та
біомолекулярної інженерії Медичного інституту;

доктор фізико-математичних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Чалий Олександр Васильович,
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця
Міністерства охорони здоров'я України,
завідувач кафедри медичної і біологічної фізики;

доктор фізико-математичних наук,
старший науковий співробітник
Єсилевський Семен Олександрович,
Інститут фізики НАН України,
провідний науковий співробітник відділу фізики
біологічних систем.

Захист відбудеться “29” грудня 2015 р. о 14³⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.08 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 03022, м. Київ, пр-кт Академіка Глушкова, 4, корпус 1, фізичний факультет, ауд. 500.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01033, м. Київ, вул. Володимирська, 58.

Автореферат розіслано “___” листопада 2015 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.08
кандидат фізико-математичних наук

О. С. Свечнікова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Пошук елементарних фізико-хімічних механізмів виникнення спонтанних та індукованих аналогами нуклеотидних основ точкових мутацій ДНК, з-поміж яких левову частку складають транзиції та трансверсії, є однією із центральних задач молекулярної та квантової біофізики (Watson *et al.*, 1953; Freese, 1959; von Borstel, 1994; Drake, 1998; Friedberg *et al.*, 2006; Lynch, 2010; Lee *et al.*, 2012; Fijalkowska *et al.*, 2012). Попри помітні теоретичні успіхи, досягнуті у цій біологічно важливій царині знань, отримання, накопичення та систематизація експериментального матеріалу помітно випереджає темпи її осмислення та інтерпретації на мікроструктурному рівні (Huang *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2011; Vebenek *et al.*, 2011; Kimsey *et al.*, 2015). Аналіз літератури вказує на те, що причиною цього є відсутність продуктивних модельних уявлень якісно нового гатунку (Topal *et al.*, 1976; Poltev *et al.*, 1977; Jacquemin *et al.*, 2014; Cerón-Carrasco *et al.*, 2012-2015; Rossetti *et al.*, 2015).

Нині достеменно відомо, що першопрчиною виникнення спонтанних точкових мутацій є утворення у кишені впізнавання високоточної ДНК-полімерази неправильних пар основ ДНК, здатних набувати ензиматично-компетентної конформації, що гарантує їхню хімічну інкорпорацію у структуру подвійної спіралі ДНК, що синтезується. Водночас експериментальні дані стосовно структури неправильних пар нуклеотидних основ, утворення яких спричиняє виникнення мутацій, залишаються вельми обмеженими: виняток становлять лише дві пуриново-піримідинові пари А·С і G·T (Brown *et al.*, 1986; Leonard *et al.*, 1990; Boulard *et al.*, 1997). Методом рентгеноструктурного аналізу встановлено, що їхньою ензиматично-компетентною конформацією є Вотсон-Криківська будова, яка реалізується за умови перебування однієї із двох основ у кожній парі у мутагенній, рідкісній таутомерній формі (Wang *et al.*, 2011; Vebenek *et al.*, 2011). Для решти неправильних пар, активних гравців на полі спонтанного точкового мутагенезу, експериментальні дані про їхню ензиматично-компетентну конформацію, яка реалізується у закритому стані високоточної ДНК-полімерази, відсутні. Такий стан речей стримує дослідження структурно-динамічних властивостей як ДНК-реплікативної машинерії, так і реплісоми.

Більше того, до цього часу так і не викристалізувалася усталена точка зору щодо елементарних фізико-хімічних механізмів виникнення спонтанних та індукованих аналогами нуклеотидних основ точкових мутацій.

Одні дослідники притримуються таутомерної гіпотези, яка пов'язує точковий мутагенез із спонтанним переходом основ ДНК із канонічної у мінорну, мутагенну таутомерну форму (Watson & Crick, 1953). "Вузьким місцем" таких підходів є відсутність чітких уявлень про механізми виникнення рідкісних таутомерів нуклеотидних основ (Harris, *et al.*, 2003). Так, класична модель Льовдіна (Löwdin, 1963, 1966) зводить процес формування мутагенних таутомерів у складі Вотсон-Криківських пар основ ДНК до подвійного перенесення протонів вздовж сусідніх міжмолекулярних Н-зв'язків. Тривалий час вона вважалася адекватною, проте останні дослідження вказують на те, що таутомеризовані пари Льовдіна А*·Т* та G*·С* є короткоживучими структурами (Gorb *et al.*, 2004), які можуть "вислизати із рук" інертної реплікативної машинерії, не спричиняючи мутацій.

Такий стан речей спонукає дослідників до розробки альтернативних моделей мутагенної таутомеризації основ ДНК. Найобґрунтованішим із таких підходів є таутомеризація основ поодинокую молекулою води (Furmanchuk *et al.*, 2011) – найбільшою його вадою є постулювання у суттєво гідрофобному активному центрі ДНК-полімерази (Mertz & Krishtalik, 2000), що входить до складу реплісоми, молекул води.

Інші вчені переконані, що спонтанні точкові мутації спричиняються неправильними парами, до складу яких входять основи ДНК у основній, канонічній таутомерній формі (Brown *et al.*, 1985). У цьому разі залишається незрозумілим механізм адаптації вобл-пар до ензиматично-компетентних розмірів у доволі жорсткій, слабо деформовній кишені впізнавання високоточної ДНК-полімерази (Kool *et al.*, 2002).

Об'єднує ці два підходи лише те, що у обох випадках відсутня загальна фізико-хімічна концепція природи спонтанних точкових помилок і виникнення кожної із 12 з них розглядається як унікальне явище. У літературі не представлені спроби чи ідеї, спрямовані на об'єднання вищезгаданих підходів у єдину, внутрішньонепротивну концепцію.

Наразі створення такої концепції є вкрай актуальною міждисциплінарною задачею, покликаною нагальними фундаментальними і прикладними потребами. Так, без розуміння елементарних механізмів виникнення спонтанних точкових мутацій неможливо просунути вперед у розробці стратегії управління нестабільністю геному, у розумінні фізико-хімічних підвалин еволюції, при дизайні високоефективних мутагенів – аналогів нуклеотидних основ із адресною дією для цільового використання, зокрема, у антивірусній та антиканцерній терапії, сподіватися на істотне підвищення у недалекому майбутньому точності нанопристроїв біомолекулярної електроніки, які використовують ДНК як носій інформації, створення синтетичних макромолекулярних структур, зданих самореплікуватися із наперед заданою точністю тощо.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано відповідно до плану науково-дослідної роботи відділу молекулярної та квантової біофізики Інституту молекулярної біології і генетики (ІМБіГ) НАН України за держбюджетною темою "Фізико-хімічна природа спонтанних та індукованих аналогами нуклеотидних основ транзицій та трансверсій" (№ держреєстрації: 0110U000690, 2011-2015 р.р.), у рамках низки грантів, отриманих на конкурсних засадах, за науковим керівництвом здобувача: гранту Президента України для обдарованої молоді на 2012 рік "Квантово-хімічний скринінг високоефективних мутагенів медико-біологічного призначення", гранту Президента України для підтримки наукових досліджень молодих учених на 2012 рік "Молекулярна природа точкових мутацій, індукованих модифікованими основами ДНК: модельне квантово-хімічне дослідження" (проект № GP/F44/086, № держреєстрації: 0112U006872), гранту Президента України для підтримки наукових досліджень молодих учених на 2013 рік "Молекулярні механізми точкових мутацій ДНК, спричинених окисненням її пуринових основ: модельне квантово-хімічне дослідження" (проект № GP/F49/024, № держреєстрації: 0113U005884), гранту Президента України для підтримки наукових досліджень молодих учених на 2014 рік "Мутагенна таутомеризація Вотсон-Криківських пар основ ДНК одинарним перенесенням протону: квантово-хімічне

дослідження" (проект № GP/F56/074, № держреєстрації: 0114U006522), гранту Президента України для підтримки наукових досліджень молодих учених на 2015 рік "Фізико-хімічна природа спонтанних точкових помилок реплікації ДНК: квантово-механічне дослідження" (проект № GP/F61/028, № держреєстрації: 0115U005424), гранту НАН України на реалізацію проектів науково-дослідних робіт молодих учених НАН України "Фізико-хімічні механізми спонтанних точкових мутацій: модельне квантово-хімічне дослідження" (№ держреєстрації: 0115U004564, 2015-2016 р.р.) та гранту УНТЦ–НАН України "Розробка апаратури для отримання іонних та рентгенівських мікропучків з використанням електростатичних прискорювачів та дослідження радіаційних пошкоджень клітин при адронній терапії: квантово-хімічне дослідження опромінених біооб'єктів" (№ держреєстрації: 0114U005202, 2013-2014 р.р.); у рамках кількох міжнародних грантів, у яких дисертант була відповідальним виконавцем: українсько-російського гранту "Теоретичне дослідження біологічно важливих молекулярних систем у рамках континуальної моделі середовища, що явно враховує його неоднорідність" (проект № F 40.4/039, № держреєстрації: 0111U006629/0112U003651, 2011-2012 р.р.), українсько-словенського гранту "Конформаційна мінливість 2'-дезоксирибонуклеозидів та 2'-рибонуклеозидів: квантово-хімічне дослідження" (проект № F 40.4/039, № держреєстрації: 0111U007526/0112U005368, 2011-2012 р.р.), українсько-японського гранту "Дослідження прямої та непрямої дії радіаційного опромінення на біологічні системи" (проект № F 52.2/001, № держреєстрації: 0113U006456, 2013-2014 р.р.), а також у рамках гранту Науково-навчального центру "Державна ключова лабораторія молекулярної та клітинної біології" "Макромолекули та їх комплекси в реалізації генетичної інформації" (проект № F 46.1/011, № держреєстрації: 0111U005988, 2011-2012 р.р.).

Мета і завдання досліджень. *Мета роботи* – встановити елементарні мікроструктурні механізми, які визначають молекулярну логіку спонтанного точкового мутагенезу – виникнення та закріплення помилок включення і реплікації при біосинтезі ДНК.

Для реалізації цієї мети вирішувалися наступні комплексні завдання:

1. Спираючись на літературні джерела та власний досвід, вибрати належний рівень квантово-хімічної теорії, який би гарантував оптимальний компроміс між витратами часу, необхідного для високопродуктивних обчислень, та точністю останніх і дозволяв кваліфікувати комп'ютерні розрахунки як числовий експеримент. Розробити формат подачі результатів обчислювального експерименту.
2. Враховуючи попередній власний досвід та підходи інших авторів, представлені у літературі, обґрунтувати адекватність робочої моделі – Н-зв'язаних пар нуклеотидних основ.
3. Із усіх можливих пуриново-пуринових, пуриново-піримідинових та піримідиново-піримідинових неправильних пар основ ДНК виокремити структури із *цис*-орієнтованими глікозидними зв'язками, здатні набувати у процесі теплових флуктуацій розмірів, характерних для канонічних пар основ ДНК.
4. Розробити методіку дослідження механізмів перенесення протонів у біологічно-важливих парах нуклеотидних основ, яка би дозволяла відслідковувати зміни геометричних, енергетичних, полярних, зарядових та електронно-топологічних характе-

ристик міжмолекулярних Н-зв'язків вздовж внутрішньої координати реакції (ВКР) таутомеризації, чисельно оцінювати кооперативність останніх та робити об'єктивний висновок про характер перебігу реакції.

5. Вивчити фізико-хімічні механізми таутомеризації пар основ ДНК, які є структурними учасниками процесів спонтанного точкового мутагенезу, зацентрувавши особливу увагу на мутагенну таутомеризацію як канонічних, так і неправильних пар нуклеотидних основ. Дослідити усі можливі маршрути таутомеризації пар та вибрати із них найприйнятніші з огляду на їхні енергетичні та кінетичні характеристики. Встановити, у який спосіб реалізується спонтанна мутагенна таутомеризація Вотсон-Криківських пар основ ДНК та як вобл-пари нуклеотидних основ набувають каталітично-компетентної конформації безпосередньо у гідрофобній кишені впізнання високоточної ДНК-полімерази.

6. Розробити підходи щодо механізмів розпізнавання та видалення із геному репараційними системами неправильних пар основ ДНК, які спричиняють спонтанні точкові мутації.

7. Спираючись на геометричні критерії Н-зв'язування, вибрати із літературних джерел пари канонічних та модифікованих нуклеотидних основ із специфічними міжмолекулярними контактами $\text{CH}\cdots\text{O}/\text{N}$. Використовуючи найширший арсенал квантово-хімічних підходів, ідентифікувати серед них Н-зв'язки та визначити їхні основні фізико-хімічні параметри. Встановити найнадійніші дескриптори Н-зв'язків $\text{CH}\cdots\text{O}/\text{N}$ та окреслити можливу біологічну роль останніх.

8. Провести вичерпний конформаційний аналіз класичних мутагенів – модифікованих пуринових та піримідинових нуклеотидних основ. Встановити основні фізико-хімічні чинники, відповідальні за конформаційні рівноваги.

9. Співставити результати обчислювального експерименту із даними молекулярно-біологічних та біофізичних експериментів, представлених у літературі. Узагальнити результати досліджень та зробити висновки.

Об'єкт дослідження – мікроструктурні засади виникнення спонтанних та індукованих деякими класичними мутагенами – аналогами нуклеотидних основ – транзицій і трансверсій та механізми їхнього контролю репараційними системами.

Предмет дослідження – фізико-хімічні механізми таутомерних взаємоперетворень усіх можливих пуриново-пуринових, піримідиново-піримідинових та пуриново-піримідинових пар основ ДНК за участю канонічних основ у відповідні пари з Вотсон-Криківською геометрією, які містять рідкісні (мутагенні) таутомери, подвійним перенесенням протонів, що супроводжуються або ні суттєвою зміною геометрії комплексу, що таутомеризується; фізико-хімічні механізми набуття неправильними парами основ ДНК, активними учасниками спонтанного точкового мутагенезу, ензиматично-компетентної конформації.

Методи дослідження – неемпіричні (*ab initio*) квантово-хімічні розрахункові методи, які реалізовано з використанням програмного пакету «Gaussian'09» (Frisch *et al.*, 2010), а саме – методи функціоналу електронної густини (DFT) – гібридні функціонали B3LYP (Tirado-Rives *et al.*, 2008) та M05 (Zhao *et al.*, 2005), метод теорії збурень другого порядку Меллера-Плесета MP2 (Frisch *et al.*, 1990); метод STQN локалізації перехідного стану (Peng *et al.*, 1996); розрахунок шляху реакції вздовж внутрішньої координати реакції (Hratchian *et al.*, 2005); методи фізико-хімічної кінетики,

які ґрунтуються на теорії перехідного стану (Atkins, 2006); метод спектральної “калориметрії” за Йогансеном (Jogansen, 1999); аналіз топології електронної густини за Бейдером (так звана теорія “Атомів у молекулах”) (Bader, 1990) за допомогою програмного пакету AIMAll (Keith, 2010); метод оцінки енергії класичних Н-зв’язків за формулою Ніколаєнка-Булавіна-Говоруна (Nikolaïenko *et al.*, 2012); метод оцінки енергії слабких Н-зв’язків СН \cdots О/Н та притягувальних Ван-дер-Ваальсових контактів за формулою Еспінози-Молінса-Лекомте (ЕМЛ) (Espinosa *et al.*, 1998); часткове дейтерування як метод запобігання механічним резонансам коливань; статистичні методи оцінки похибок та апроксимації даних обчислювального експерименту.

Наукова новизна одержаних результатів. Наукова новизна дисертаційного дослідження визначається низкою вперше отриманих у його рамках пріоритетних результатів.

1. Пари основ ДНК (класичні, довгі та короткі) із Вотсон-Криківською геометрією та вобл-пари, до складу яких входять одні й ті ж самі основи, знаходяться у повільній у порівнянні із часом, який витрачає високоточна ДНК-полімераза на інкорпорацію одного нуклеотиду у подвійну спіраль ДНК, таутомерній рівновазі, тобто взаємно перетворюються одна в одну внутрішньопарним перенесенням протонів через високостабільний перехідний стан – тісну йонну пару типу (протонована основа)·(депротонована основа).

Це важливо для розуміння мікроструктурних механізмів виникнення мутагенних таутомерів основ ДНК, набуття неправильними парами нуклеотидних основ ДНК ензиматично компетентної конформації безпосередньо у гідрофобній кишені впізнавання високоточної ДНК-полімерази та оцінки імовірності цих процесів.

2. Класичні, довгі та короткі Вотсон-Криківські і вобл-пари основ ДНК не таутомеризуються подвійним перенесенням протонів вздовж міжмолекулярних Н-зв’язків. Це означає, що таутомерний статус цих структур залишається незмінним при їхній дисоціації ДНК-реплікативною машинерією на мономери: це важливо для розуміння механізмів закріплення мутацій при наступних раундах реплікації ДНК.

3. Якщо припустити, що репараційні системи розпізнають саме воблівську (w) конфігурацію неправильних пар основ ДНК, то тоді точність видалення останніх буде визначатися таутомерною рівновагою $w \leftrightarrow WC$. Чим сильніше ця рівновага зсунута праворуч (Вотсон-Криківська (WC) геометрія неправильної пари – це схованка від її репарації), тим більша імовірність уникнення неправильною парою її репарації.

Ґрунтуючись на таких уявленнях, відтворено молекулярну логіку взаємоперетворень, що зв’язує скінченну множину пар основ ДНК, – зародження та закріплення спонтанних точкових мутацій, – яка задовільно віддзеркалює експериментальні факти: $T \cdot G / G \cdot T > A \cdot C / C \cdot A \gg C \cdot T / T \cdot C > A \cdot A > G \cdot A / A \cdot G \gg G \cdot G \approx C \cdot C$ (Huang *et al.*, 1991).

4. У рамках розвиненої теорії спонтанного точкового мутагенезу вперше з’ясовано мікроструктурні механізми мутагенної дії класичних мутагенів – аналогів нуклеотидних основ – галоген-похідних урацилу, 2-амінопурину та модифікованого цитозину.

Як підсумок – у роботі вперше встановлено елементарні мікроструктурні механізми, які визначають молекулярну логіку спонтанного точкового мутагенезу –

виникнення та закріплення помилок включення і реплікації при біосинтезі ДНК, та зроблено висновок про те, що спонтанні точкові мутації еволюційно запрограмовані у електронній будові канонічних основ ДНК і є відтак невідворотними.

Наукові праці здобувача, у яких викладено результати дисертаційного дослідження, активно цитуються міжнародною науковою спільнотою у поважних фахових журналах таких, зокрема, як *Nature*, *Acc. Chem. Res.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, *Neuroscientist*, *J. Chem. Theory Comput.*, *Chemistry*, *J. Phys. Chem. C*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *CrystEngComm*, *RSC Adv.*, *ChemPhysChem*, *J. Phys. Chem. B*, *J. Chem. Phys.*, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, *J. Phys. Chem. A*, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectr.*, *Superlattices Microstruct.*, *Struct. Chem.*, *J. Mol. Model.*, *Pharmaceuticals*, *Chem. Phys.*, *Comp. Theor. Chem.*, *Mol. Inform.*, *J. Mol. Struct.*, *Chemical Papers*, *J. Phys. Org. Chem.*, *Monatshefte für Chemie*, *Syst. Synth. Biol.*, *Quimica Nova*, *J. Theor. Comput. Chem.*, *Chem. Hetero. Comp.*, *Molecules*, *Crystals*, *Mol. Biol.*, *Ukr. Biochem. J.*

Практичне значення одержаних результатів. Отримані у дисертації результати можуть бути використані у науково-дослідній практиці при вивченні механізмів таутомеризації Н-зв'язаних комплексів будь-якого походження та будови, при з'ясуванні елементарних фізико-хімічних механізмів мутагенної дії на ДНК модифікованих нуклеотидних основ, при плануванні “прицільних” молекулярно-біологічних експериментів у області спонтанного та індукованого аналогами нуклеотидних основ точкового мутагенезу, при ідентифікації та встановленні можливої біологічної значущості слабких неканонічних Н-зв'язків та притягувальних ван-дер-Ваальсових контактів, при плануванні ЯМР- і рентгеноструктурних експериментів, спрямованих на з'ясування мікроструктурних засад точності кодон-атикодонових взаємодій, та інтерпретації отриманих за їхньою допомогою даних. Узагальнений висновок дисертанта про природу екстремумів першої похідної електронної енергії комплексу за ВКР його таутомеризації значно розширює сфери ефективного застосування цієї функції, зокрема, у фізичній хімії та молекулярній фізиці при дослідженні процесів протонної мобільності. Отримані у дисертації дані можуть бути корисними також при розробці алгоритмів комп'ютерного скринінгу потенційних мутагенів – похідних нуклеотидних основ із адресною дією, у біомолекулярній наноелектроніці, при створенні вискоефективних мутагенів для потреб антивірусної та антиканцерної терапії, а також при викладанні спецкурсів та проведенні лабораторних робіт, що стосуються механізмів нестабільності геному, студентам ВНЗ України, котрі спеціалізуються у галузі молекулярної біології та молекулярної біофізики. Значну частину дисертаційного матеріалу впроваджено у педагогічну практику при читанні курсу “Молекулярна та квантова біофізика” студентам, які навчалися у магістратурі Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка протягом 2011-2015 навчальних років, проф. Говоруном Д.М. за безпосередньої участі дисертанта.

Дослідження за темою дисертації відзначено низкою нагород, зокрема: золотою медаллю ХХІІІ Міжнародної агропромислової виставки «АГРО-2011» за науково-практичну розробку "Дизайн *in silico* вискоефективних мутагенів" у номінації "За високі досягнення у галузі новітніх біотехнологій" (2011 р.), Премією Верховної Ради України найталановитішим молодим ученим в галузі фундаментальних і прикладних досліджень та науково-технічних розробок за роботу "Елементарні квантово-

хімічні моделі точкових мутацій ДНК" (2012 р.), Премією Кабінету Міністрів України за особливі досягнення молоді у розбудові України у номінації "За наукові досягнення" (2012 р.), Премією Національної академії наук України для молодих учених за серію робіт "Природа спонтанних точкових мутацій ДНК: квантово-хімічні моделі" (2013 р.), першою Премією Інституту молекулярної біології і генетики НАН України у конкурсі наукових публікацій молодих вчених (2013 р.) та відзнакою Голосіївської районної у місті Києві державної адміністрації "Жінка року-2014" у номінації "Жінка – науковець року".

Особистий внесок здобувача. Усі наукові результати, положення і висновки, що складають суть дисертації і виносяться на її захист, отримано та сформульовано здобувачем особисто.

Дисертантом одноосібно здійснено пошук, аналіз та опрацювання літературних джерел, оформлення табличних та графічних даних, а також текстів усіх статей. Мету та постановку задачі, обговорення та аналіз результатів досліджень, а також підготовку до друку та публікацію наукових праць здійснено разом із науковим консультантом – членом-кореспондентом НАН України, проф. Говоруном Д.М.

Особистий внесок дисертанта до основних робіт [1-60] полягає у наступному. У розділі монографії [1] здобувач брала безпосередню участь у пошуці, аналізі та опрацюванні літературних джерел, а також написанні тексту розділу, власноруч провела квантово-хімічні розрахунки, узагальнила отримані дані, оформила табличні та графічні дані. У працях [2-10, 25-17, 19-30] дисертант брала безпосередню участь у вивченні мікроструктурних механізмів та пошуку всеможливих шляхів таутомеризації Вотсон-Криківських пар основ ДНК та неправильних пар нуклеотидних основ подвійним перенесенням протонів, використовуючи методи квантової хімії, отриманні фізико-хімічних параметрів, що характеризують таутомеризацію Н-зв'язаних комплексів вздовж ВКР, аналізі отриманих даних та оформленні результатів досліджень як наукових статей. У працях [11, 18] здобувачу належить провідна роль у пошуці в літературних джерелах та кристалографічних базах даних пар основ, які містять слабкі Н-зв'язки, дослідженні квантово-хімічними методами їхніх геометричних, коливальних та енергетичних характеристик, оформленні отриманих даних, побудові кореляційних залежностей; також вона брала безпосередню участь у формулюванні проблеми, обговоренні отриманих результатів та оформленні статей. У роботах [35, 36, 39-41] автор самостійно проводила квантово-хімічні дослідження таутомеризації нуклеотидних основ у модельних білково-нуклеїнових комплексах, внутрішньомолекулярної таутомеризації та конформаційного різноманіття класичних мутагенів – похідних цитозину та пуринів, ІЧ-спектрів Н-зв'язаних пар основ та мутагенних властивостей гіпоксантину, брала безпосередню участь у інтерпретації отриманих результатів, оформленні табличних та графічних даних, а також написанні текстів статей. Роботи [31-34, 38] виконано автором одноосібно.

Здобувачем одоноосібно зроблено низку усних і стендових доповідей на українських та міжнародних наукових фахових конференціях та симпозиумах.

Дисертантка висловлює глибоку вдячність усім співавторам публікацій за плідну співпрацю, насамперед, к.ф.-м.н. Р.О. Жураківському, к.б.н., с.н.с. І.М. Коломієць, к.б.н., с.н.с. Є.П. Юренку і д.х.н., с.н.с. І.Я. Дубею. Особливу вдячність здобувач висловлює науковому консультанту – члену-кореспонденту НАН

України, професору, заслуженому діячеві науки і техніки України Д.М. Говоруну – за неоціненну допомогу при постановці задач дослідження, проведенні обчислювального експерименту, обговоренні та аналізі отриманих результатів і написанні статей, а також за чуйне, делікатне і терпляче ставлення та моральну підтримку.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації доповідалися та обговорювалися на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях у вигляді усних та стендових доповідей, а саме: XII Міжнародна конференція з біоніки і прикладної біофізики (м. Київ, Україна, 2013 р.), IX International Science-Technical Conference «Modern Trends in Biological Physics and Chemistry» (Sevastopol, Ukraine, 2013), VII Annual Conference of Young Scientist of the Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine dedicated to 175 anniversary of O.Ya. Danylevsky (Kyiv, Ukraine, 2013), 5th International Symposium «Methods and Applications of Computational Chemistry» (Kharkiv, Ukraine, 2013), VIII International Science-Technical Conference «Modern Trends in Biological Physics and Chemistry» (Sevastopol, Ukraine, 2012), International Conference «Modeling & Design of Molecular Materials 2012» (Wrocław, Poland, 2012), International Scientific Conference «Actual Problems of Chemistry and Technology of Organic Substances» (Lviv, Ukraine, 2012), 6th Annual Scientific Meeting of RECOOP HST Consortium «Bridges in Life Sciences» (Bratislava, Slovak Republic, 2011), International Youth Scientific Forum «Lomonosov-2011» (Moscow, Russia, 2011), VII Міжнародна науково-технічна конференція «Актуальні питання біологічної фізики та хімії» (Севастополь, Крим, Україна, 2011 р.), Науково-практична конференція з міжнародною участю «YouthNanoBioTech-2011. Молодіжний форум з нанобіотехнологій», присвячена 170-річчю кафедри фармакології та клінічної фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (Київ, Україна, 2011 р.), II International Conference For Young Scientists «Low Temperature Physics» (Kharkiv, Ukraine, 2011), V З'їзд Українського біофізичного товариства (Луцьк, Україна, 2011 р.), 4th International Symposium «Methods and Applications of Computational Chemistry» (Lviv, Ukraine, 2011), 14th International Conference on the Application of Density Functional Theory in Chemistry and Physics (Athens, Greece, 2011), International Conference «Modeling Interactions in Biomolecules» (Kutná Hora, Czech Republic, 2011), XX International School-Seminar of Galyna Puchkovska «Spectroscopy of molecules and crystals» (Beregove, Crimea, Ukraine, 2011), International Conference «Multi-Pole Approach to Structural Biology» (Warsaw, Poland, 2011) та I Міжнародна конференція молодих вчених ССТ-2010 «Хімія та хімічні технології» (Львів, Україна, 2010 р.), а також на наукових семінарах відділу молекулярної та квантової біофізики ІМБіГ НАН України та загальноінститутських наукових семінарах ІМБіГ НАН України.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 60 наукових праць – 40 статей (з-поміж них – 6 одноосібних) у вітчизняних та міжнародних фахових наукових журналах, які входять до наукометричних баз даних, зокрема Scopus (*Physical Chemistry Chemical Physics* (IF=4,493), *RSC Advances* (IF=3,840), *Journal of Computational Chemistry* (IF=3,589), *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* (IF=2,919), *Chemical Physics Letters* (IF=1,897), *Structural Chemistry* (IF=1,837), *Journal of Molecular Modeling* (IF=1,736), *Molecular Physics* (IF=1,720), *Optics and Spectroscopy* (IF=0,723), *Ukrainian Journal of Physics*, *Biopolymers and Cell* та *Ukrainian Biochemical Journal*), із сумарним імпаکت-фактором 90,11, 1 розділ у міжнародній монографії

та 19 тез доповідей на вітчизняних та міжнародних наукових фахових конференціях. У всіх публікаціях здобувач є першим автором. Наукові праці дисертанта процитовано більше 700 разів, а вищезгаданий розділ завантажено через Інтернет більше 3450 разів та процитовано 19 разів. Дисертант посідає шосте місце у рейтингу найцитованіших молодих науковців України, складеному за показниками наукометричної бази даних Scopus, із індексом Гірша 19.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із переліку основних понять та умовних позначень, вступу, огляду літератури, результатів дослідження, які викладені у п'яти розділах, висновків і переліку використаних літературних джерел, який налічує 550 найменувань, із них 530 – англomовних. Зміст дисертації викладено на 380 сторінках машинописного тексту, вона містить 46 рисунків і 48 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність роботи і доцільність обраної теми дослідження, висвітлено зв'язок із науковими програмами і темами, що виконувалися, зокрема, у відділі молекулярної та квантової біофізики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, сформульовано мету і завдання дисертаційної роботи, визначено об'єкт і предмет досліджень, охарактеризовано використані методи. Наведено також наукову новизну, теоретичне і практичне значення роботи, інформацію про апробацію її результатів та особистий внесок здобувача.

Перший розділ дисертації присвячено критичному огляду наявної літератури щодо фізико-хімічних засад спонтанних та індукованих аналогами основ ДНК транзицій та трансверсій. Описано загальноприйняті підходи щодо фізико-хімічних механізмів виникнення спонтанних та індукованих точкових мутацій. Зроблено критичний огляд існуючих фізичних уявлень та експериментальних даних, отриманих методами рентгеноструктурного аналізу, ЯМР-спектроскопії, сайт-спрямованого мутагенезу, фізико-хімічної кінетики, обчислювальної структурної біології тощо. Визначено основні проблеми, із якими стикаються дослідники при вивченні елементарних фізичних механізмів спонтанних точкових мутацій в ДНК. Сформульовано робочу гіпотезу щодо мікроструктурних механізмів точності біосинтезу ДНК та її порушень, індукованих низькомолекулярними мутагенами – аналогами канонічних нуклеотидних основ.

У **другому розділі** дисертації викладено методологію досліджень, вичерпно охарактеризовано матеріали і методи. Описано застосовані у роботі квантово-хімічні рівні теорії, використані для оптимізації геометрії досліджуваних структур, локалізації перехідних станів реакції таутомеризації та для розрахунків енергій у одній точці, теоретичні підходи до розрахунку термодинамічних і кінетичних величин, методи ідентифікації Н-зв'язків та визначення їхньої енергії.

У **третьому розділі** дисертаційної роботи представлено структурно-енергетичні та таутомерні властивості повної множини неправильних пар нуклеотидних основ, які спричиняють спонтанні точкові мутації.

Через причини, окреслені нами вище, до цього часу так і не описано повну множину неправильних пар основ ДНК, відповідальних за виникнення спонтанних точкових мутацій, та не з'ясовано механізми набуття останніми ензиматично-компетентної конформації у гідрофобній кишені впізнавання високоточної реплікативної ДНК-полімерази. Окрім того, залишається незрозумілим принципово важливе питання: чи збігаються ці множини пар для помилок включення і реплікації, чи вони є різними.

3.1. Структурно-енергетичні властивості.

Нами вперше у рамках найпростішої фізичної моделі – Н-зв'язаних пар основ ДНК – визначено низку базових фізико-хімічних закономірностей, які визначають мікроструктурну природу зародження спонтанних точкових помилок включення і реплікації при біосинтезі ДНК і дозволяють адекватно пояснити існуючі експериментальні дані.

Так, спираючись на результати власних досліджень та на відомі літературні дані, вперше окреслено повний набір 12 неправильних пар основ ДНК $A \cdot C^*/C^* \cdot A$, $G^* \cdot T/T \cdot G^*$, $G \cdot A_{syn}$, $A^* \cdot G^*_{syn}$, $A^* \cdot A_{syn}$, $G \cdot G^*_{syn}$, $C \cdot T/T \cdot C$, $C \cdot C^*$ і $T \cdot T^*$ (тут і нижче зірочкою позначено мутагенні таутомери), які є першопричиною виникнення транзицій і трансверсій, детермінуючи як помилки включення, так і помилки реплікації (Рис. 1). Саме ці пари, які у процесі теплових флуктуацій набувають ензиматично компетентної конформації (до складу трьох із них – $G \cdot A_{syn}$, $C \cdot T$ і $T \cdot C$ – входять основи у канонічній таутомерній формі) у суттєво гідрофобній кишені впізнавання високоточної реплікативної ДНК-полімерази, повинні експериментально спостерігатися у закритій конформації останньої. Дві із них спостережено методом рентгеност-

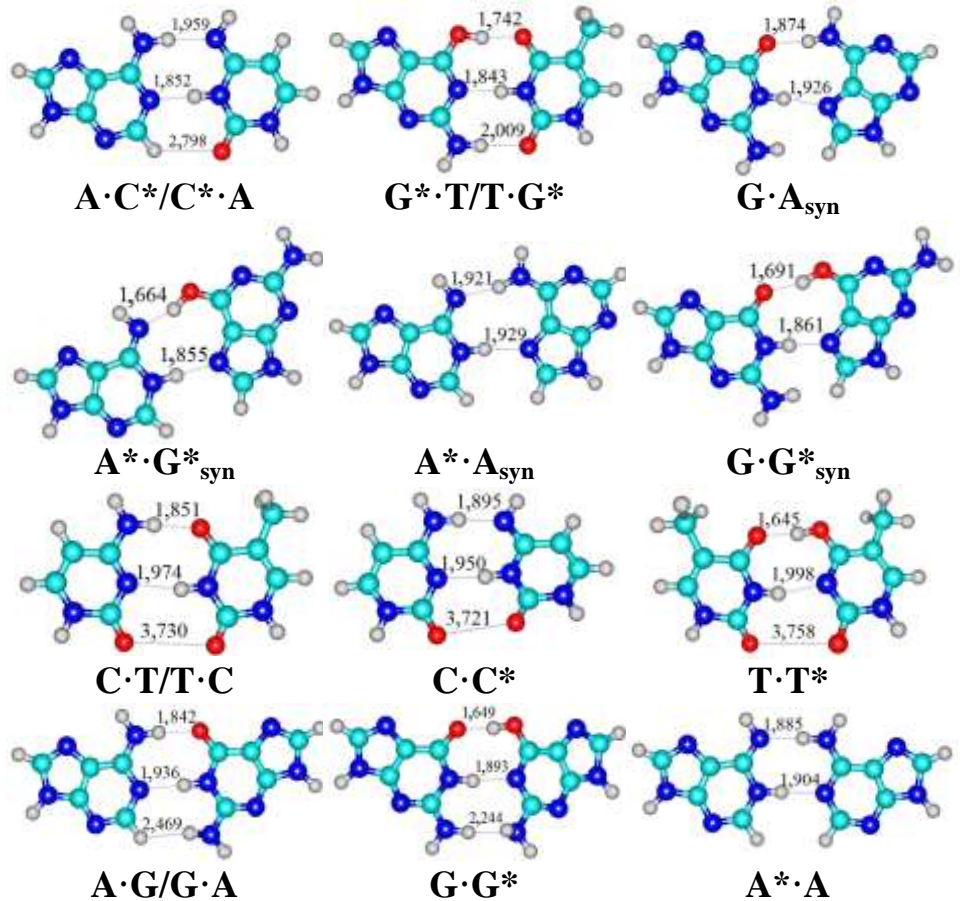


Рис. 1. Геометричні структури 12 неправильних пар основ ДНК, які спричиняють виникнення спонтанних точкових помилок включення і реплікації, та довгих пуриново-пуринових пар з Вотсон-Криківською геометрією (нижній ряд), які відіграють роль інтермедіатів у цих процесах. Тут і нижче пунктиром позначено Н-зв'язки $AH \cdots V$ та притягувальні ван-дер-Ваальсівські контакти $A \cdots V$: їхні довжини $H \cdots V$ та $A \cdots V$ подано у Å . Розрахунок на рівні теорії B3LYP/6-311++G(d,p) у ізольованому стані.

руктурного аналізу (Wang *et al.*, 2011; Vebenek *et al.*, 2011) – нами вперше доведено, що ці пуриново-піримідинові пари, геометрія яких близька до класичної Вотсон-Криківської, знаходяться у таутомерних формах $A \cdot C^*$ і $G^* \cdot T$.

Вперше виокремлено так звані довгі Вотсон-Криківські пари основ ДНК $A^* \cdot A$, $G \cdot A/A \cdot G$ і $G \cdot G^*$, які є “вузловими станціями” на шляху утворення ензиматично-компетентних конформацій неправильних пар основ ДНК $A^* \cdot A_{syn}$, $G \cdot A_{syn}$, $A^* \cdot G^*_{syn}$ і $G \cdot G^*_{syn}$, відповідно, що утворюються у кишені високоточної реплікативної ДНК-полімерази при переході останньої із відкритого у закритий стан (Рис. 2). У цих парах основа, що належить материнському ланцюгу ДНК, завжди знаходиться у *анти*-конформації, а інша – у *син*-орієнтації до цукрово-фосфатного залишку. Така будова неправильних пуриново-пуринових пар основ ДНК забезпечує близькість їхніх геометричних параметрів до аналогічних характеристик Вотсон-Криківських пар основ ДНК (Табл. 1).

Вперше досліджено структурно-енергетичні та динамічні особливості конформаційних переходів $A^* \cdot A \rightarrow A^* \cdot A_{syn}(TF)$, $G \cdot A \rightarrow G \cdot A_{syn}$, $A^* \cdot G^* \rightarrow A^* \cdot G^*_{syn}$ та $G \cdot G^* \rightarrow G \cdot G^*_{syn}$, у яких беруть участь вищезгадані пари-інтермедіати (Рис. 2). Вперше показано, що характерний час цих недисоціативних структурних перетворень

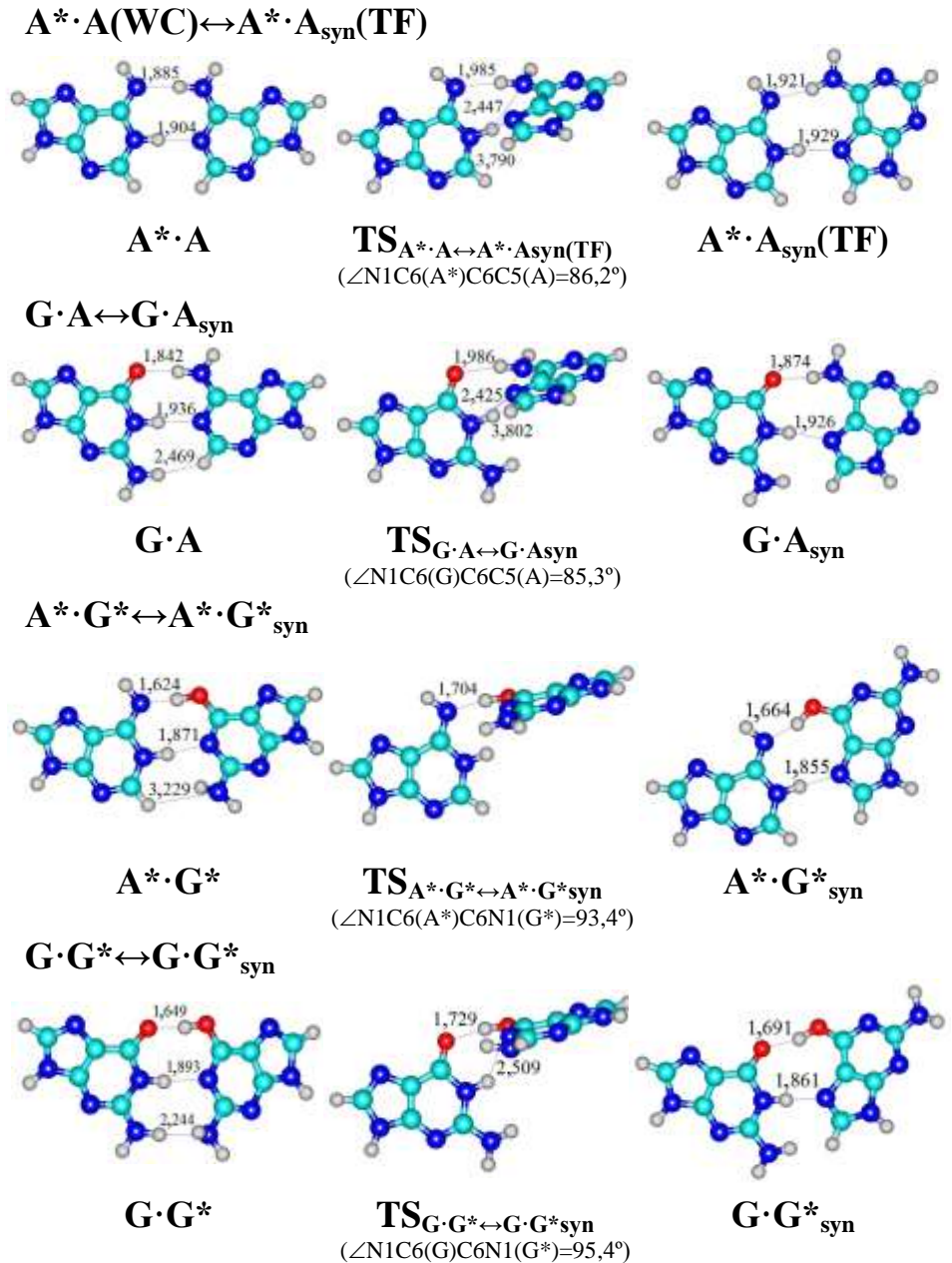


Рис. 2. Структури, що відповідають стаціонарним точкам на шляху *анти* \leftrightarrow *син* великоамплітудних перебудов основ одна відносно одної у довгих парах з Вотсон-Криківською геометрією. Розрахунок на рівні теорії V3LYP/6-311++G(d,p) у ізольованому стані. TF – Топал-Фреско (Torpal *et al.*, 1976).

($\tau_{99,9\%} = (1,3 \div 3,5) \cdot 10^{-7}$ с) значно менший періоду часу, який витрачає високоточна реплікативна ДНК-полімераза на інкорпорацію одного нуклеотиду у подвійну спіраль ДНК, що синтезується ($\sim 8,3 \cdot 10^{-4}$ с). Порівняння енергетичних характеристик цих перетворень із аналогічними даними для *анти*↔*син* переходів у пуринових 2'-дезоксирибонуклеозидах (Жураківський *та ін.*, 2012) засвідчує, що лімітуючою стадією набуття довгими Вотсон-Криківськими парами основ ДНК ензиматично компетентної конформації є конформаційні перетворення саме пар основ, а не нуклеозидів. Останній, низькоенергетичніший процес асистує перший, високоенергетичніший.

Показано, що усі неправильні пари основ ДНК, які є активними гравцями на полі спонтанного точкового мутагенезу, доволі легко у процесі теплових флуктуацій набувають характерних Вотсон-Криківських розмірів, що забезпечує їхню ензиматичну компетентність, тобто хімічне включення у подвійну спіраль ДНК (Табл. 1). З'ясовано, що так звані короткі пари основ ДНК Т·Т*, С·С* і С·Т, які відіграють роль трансверсій, характеризуються помітно більшою енергією, яку треба витратити, аби підлаштувати їхню геометрію до класичних Вотсон-Криківських розмірів. У всіх досліджених парах домінуючий внесок у енергію взаємодії основ забезпечують Н-зв'язки, причому для усіх структур ця енергія не перевищує аналогічну величину для Вотсон-Криківської пари Г·С (Табл. 1).

Ретельним порівнянням ван-дер-Ваальсових обрисів усіх 12 пуриново-пуринових, пуриново-піримідинових та піримідиново-піримідинових пар основ ДНК у їхній ензиматично-компетентній конформації з боку мінорної борозенки ДНК із аналогічними сумарними обрисами канонічних пар основ встановлено, що

Таблиця 1. Деякі структурні та енергетичні характеристики неправильних пар основ ДНК, відповідальних за виникнення спонтанних транзицій та трансверсій, отримані на рівні теорії MP2/6-311++G(2df,pd)//B3LYP/6-311++G(d,p) у вільному стані.

Неправильні пари основ	Геометричні параметри			Енергетичні параметри				
	R(H _{N1/N9} -H _{N1/N9}) ^a	α_1^b	α_2^b	$\Delta E_{\text{def}}^{\Gamma}$		- $\Delta E_{\text{int}}^{\Delta}$	$\Sigma E_{\text{HB}}/ \Delta E_{\text{int}} ^e$	- ΔG_{int}^e
				A·T(WC)	G·C(WC)			
A*·A _{syn}	10,322	53,9	41,2	2,18	2,72	16,73	74,8	3,83
G·A _{syn}	10,399	51,6	38,5	3,00	3,61	17,00	65,9	2,80
A*·G* _{syn}	10,411	50,3	37,5	3,18	3,72	23,00	72,6	11,47
G·G* _{syn}	10,425	48,7	36,1	4,04	4,66	19,82	69,5	7,28
A·C*	9,996	55,3	58,2	0,10	0,29	15,73	91,8	2,27
A*·C	10,059	55,3	57,2	0,29	0,53	23,50	65,9	10,76
G*·T	10,291	51,5	51,1	0,14	0,40	19,79	87,7	7,09
G·T*	10,202	50,6	52,2	0,45	0,90	33,40	61,3	20,66
C·C*	8,086	60,3	59,5	8,57	8,76	14,75	91,2	2,34
C·T	8,215	59,7	57,0	8,67	8,87	13,86	85,4	1,54
T·T*	8,385	53,6	58,1	10,97	10,91	16,67	84,0	4,69
A·T	10,130	54,3	54,8	0,00	0,25	14,92	86,9	1,43
G·C	10,209	52,9	55,3	0,11	0,00	29,28	60,8	15,97

^aВідстань між глікозидними протонами при атомах азоту N1/N9, Å; ^bГлікозидний кут основи, розташованої ліворуч у парі основ, °; ^cГлікозидний кут основи, розташованої праворуч у парі основ, °; ^dЕлектронна енергія деформації, яка необхідна, аби надати місметчу розмірів Вотсон-Криківських пар основ ДНК А·Т та Г·С, ккал·моль⁻¹; ^eЕлектронна енергія взаємодії основ у парі, ккал·моль⁻¹; ^fВнесок сумарної енергії міжмолекулярних Н-зв'язків у електронну енергію взаємодії, %; ^gВільна енергія взаємодії основ у парі (T=298,15 K), ккал·моль⁻¹.

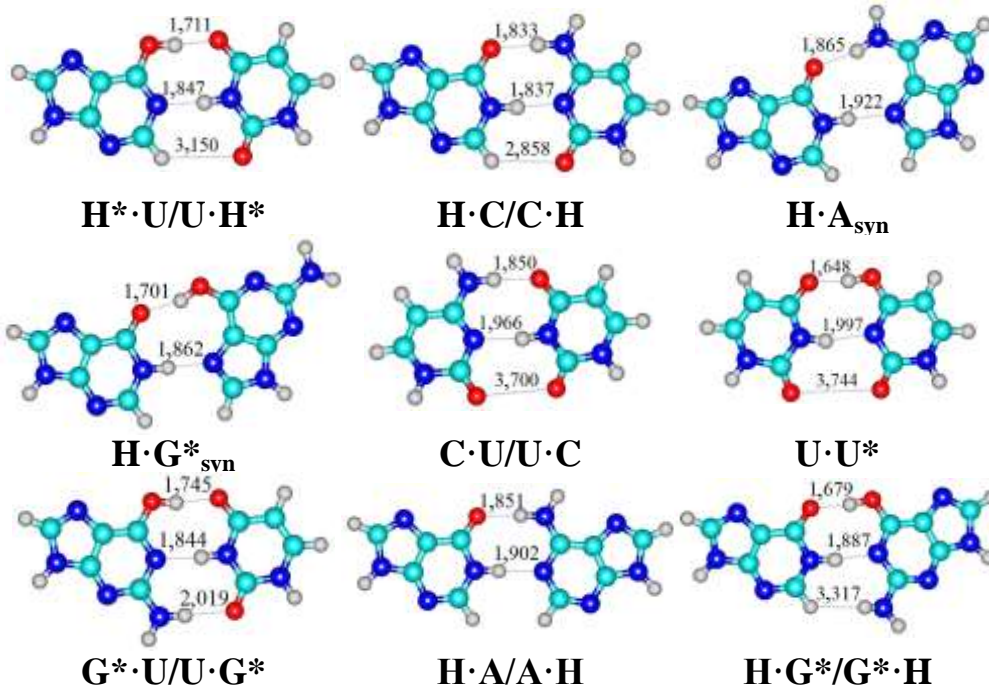


Рис. 3. Геометрична структура неправильних пар нуклеотидних основ, які вкупі із деякими парами, зображеними на Рис. 1, детермінують точність синтезу білка. Дані отримано на рівні теорії B3LYP/6-311++G(d,p) у ізольованому стані.

із 12 неправильних пар нуклеотидних основ має бути доповнена та частково замінена низкою пар, а саме – $H^* \cdot U/U \cdot H^*$, $H \cdot C/C \cdot H$, $H \cdot A_{syn}$, $H \cdot G^*_{syn}$, $C \cdot U/U \cdot C$, $U \cdot U^*$ і $G^* \cdot U/U \cdot G^*$, – та довгими Вотсон-Криківськими парами $H \cdot A/A \cdot H$ і $H \cdot G^*/G^* \cdot H$ (H – гіпоксантин), що відіграють роль інтермедіатів переходу деяких неправильних пар нуклеотидних основ у ензиматично-компетентну конформацію (Рис. 3). Нещодавно подібні результати отримано іншими авторами (Westhof *et al.*, 2014).

3.2. *Таутомерні властивості.* Зазвичай, досліджуючи мікроструктурні механізми таутомеризації молекулярних комплексів подвійним перенесенням протонів вздовж сусідніх міжмолекулярних Н-зв'язків, послуговуються фізико-хімічними характеристиками стаціонарних точок на їхній гіперповерхні потенціальної (електронної) енергії, а саме – двох локальних мінімумів, що відповідають стартовому (початковому) та таутомеризованому (фінальному) комплексам, та перехідного стану реакції таутомеризації, котрий зв'язує ці мінімуми. Суттєвим недоліком такого підходу є те, що він не дозволяє об'єктивно визначити характер реакції та прослідкувати за зміною її основних фізико-хімічних характеристик – геометричних, полярних, енергетичних, електронно-топологічних тощо – вздовж усієї ВКР таутомеризації, що істотно збіднює уявлення про детальний перебіг останньої.

жодна із них не створює стеричних перепон у кишені впізнавання високо-точної ДНК-полімерази з боку мінорної борозенки ДНК.

Сформульовані закономірності є універсальними і стосуються не лише природи спонтанних точкових помилок, що виникають при біосинтезі ДНК, а й можуть бути поширені на процеси, що детермінують точність синтезу білка. При цьому множина

Аби усунути ці суттєві перешкоди, ми розробили оригінальну методику, яка дозволяє відслідковувати еволюцію усіх фізико-хімічних параметрів, що характеризують таутомеризацію будь-яких Н-зв'язаних комплексів, вздовж ВКР. Окрім того, спираючись на електронно-топологічні характеристики сусідніх водневих містків, вздовж яких мігрують протони, а саме – значення електронної густини та її лапласіану у відповідних критичних точках, – ми вперше ввели поняття про ключові точки (максимальна їхня кількість сягає 9), котрі вичерпно описують механізм таутомеризації. При цьому 3 ключові точки відповідають двом вищезгаданим локальним мінімумам (перша і остання, дев'ята) та перехідному стану таутомеризації. Решта 6 ключових точок включає 2 точки, у яких мігруючий протон знаходиться посередині між електронегативними атомами і характеризуються еквівалентними розрихленими ковалентними зв'язками (саме у цих місцях спостерігається перехрещення χ -подібних залежностей енергетичних, електронно-топологічних і геометричних характеристик міжмолекулярних Н-зв'язків), а також 4 ключові точки, у яких класичні Н-зв'язки починають набувати ознак ковалентних, тобто для яких лапласіан електронної густини проходить через нульове значення. Положення екстремумів похідної від енергії за ВКР, які збігаються із другою та передостанньою ключовими точками, дозволяє розмежувати маршрут таутомеризації на область реагента, перехідного стану та продукту реакції. Сукупність цих ключових точок можна розглядати, образно кажучи, як своєрідний портрет чи “відбитки пальців” процесу таутомеризації.

Така методологія дозволяє, зокрема, робити об'єктивний висновок про характер таутомеризації (про її концертність, синхронність чи асинхронність), кількісно оцінювати кооперативність специфічних міжмолекулярних взаємодій – Н-зв'язків та притягувальних ван-дер-Ваальсових контактів – та відслідковувати, як ці взаємодії

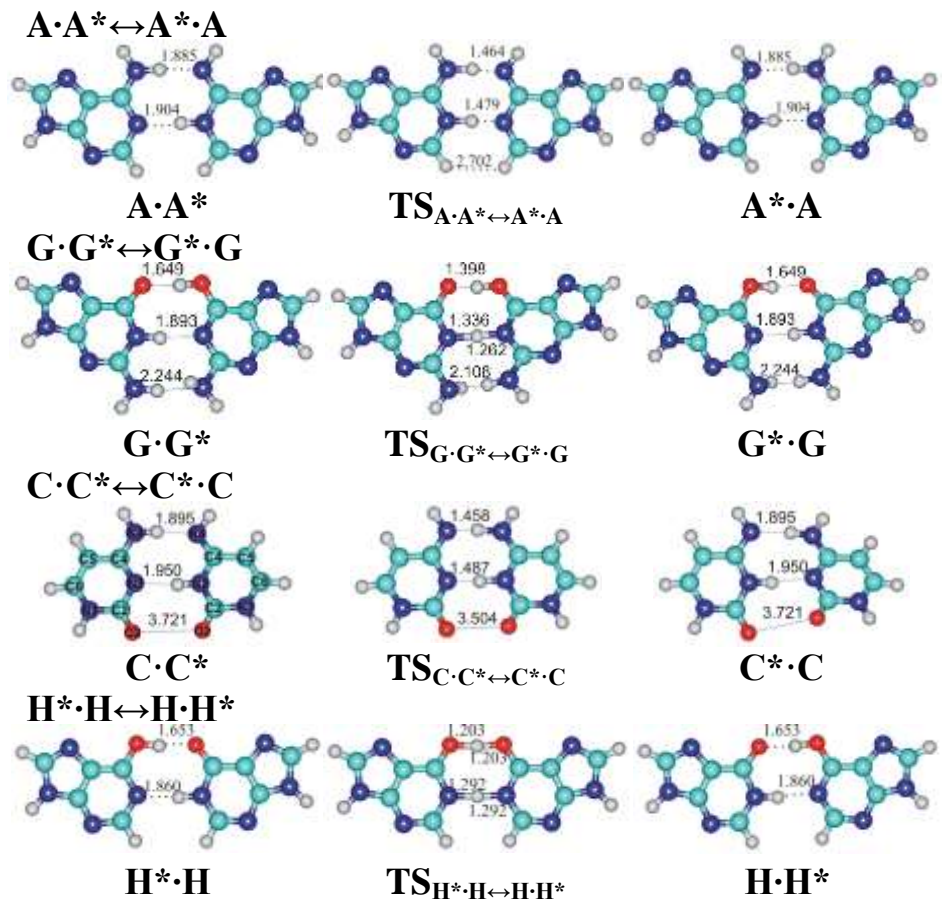


Рис. 4. Геометричні структури 3 ключових точок (стартового, кінцевого комплексів та перехідного стану), які описують еволюцію таутомеризації подвійним перенесення протонів вздовж міжмолекулярних Н-зв'язків у деяких неправильних парах нуклеотидних основ. Дані отримано на рівні теорії B3LYP/6-311++G(d,p) у вакуумі.

групується у патерни і як вони послідовно змінюють один одного вздовж ВКР таутомеризації. Нині цей протокол досліджень використовують інші автори (Inostroza-Rivera *et al.*, 2015) як ефективний інструментарій вивчення механізмів таутомеризації Н-зв'язаних комплексів будь-якої будови та походження.

У рамках такого підходу нами вперше вивчено мікроструктурні механізми таутомеризації неправильних пар нуклеотидних основ, причетних до виникнення спонтанних точкових мутацій, а також неправильних пар, що детермінують появу помилок, що супроводжують кодон-антикодонові взаємодії (Рис. 4, Табл. 2). Отримані результати дозволяють дійти низки важливих із біофізичної точки зору висновків та узагальнень.

Вперше об'єктивно визначено характер реакції таутомеризації досліджених комплексів: у переважній більшості випадків подвійне перенесення протонів уздовж сусідніх міжмолекулярних Н-зв'язків є концертним, асинхронним процесом. Реакції таутомеризації $T \cdot T^* \leftrightarrow T^* \cdot T$, $H \cdot H \leftrightarrow H^* \cdot H^*$ і $H^* \cdot H \leftrightarrow H \cdot H^*$ є концертними і синхронними – це пов'язано як із симетрією самих комплексів, так і з симетрією перехідного стану їхньої таутомеризації. При цьому неправильна пара основ ДНК $G \cdot A_{syn}$ не таутомеризується взагалі – на її гіперповерхні потенціальної енергії відсутній локальний мінімум, який відповідає таутомеризованій парі $G^* \cdot A^*_{syn}$.

Доведено, що короткоживучі, слабкозаселені пари $A^* \cdot C$ і $G \cdot T^*$ є “постачальниками” довгоживучих ензиматично-компетентних пар $A \cdot C^*$ і $G^* \cdot T$, відповідно, при виникненні помилок реплікації ДНК.

Переважна більшість актів таутомеризації є дипольно-активними процесами, що супроводжуються значними змінами дипольного моменту пари, що таутомеризується; виняток складає симетричний (C_{2h}) дипольно-неактивний процес таутомеризації $H \cdot H \leftrightarrow H^* \cdot H^*$.

Усі без винятку процеси таутомеризації за Льовдіним супроводжуються зміною геометрії комплексу: образно кажучи, пари при таутомеризації “дихають”, стискаючись у перехідних станах.

Кількість ключових точок, котрі вичерпно описують процес таутомеризації, набуває трьох значень – 9 (для несиметричних пар), 6 ($H \cdot H \leftrightarrow H^* \cdot H^*$) і 5 ($H^* \cdot H \leftrightarrow H \cdot H^*$ і $T \cdot T^* \leftrightarrow T^* \cdot T$); у останніх випадках має місце виродження ключових точок, пов'язане, зокрема, із симетрією системи.

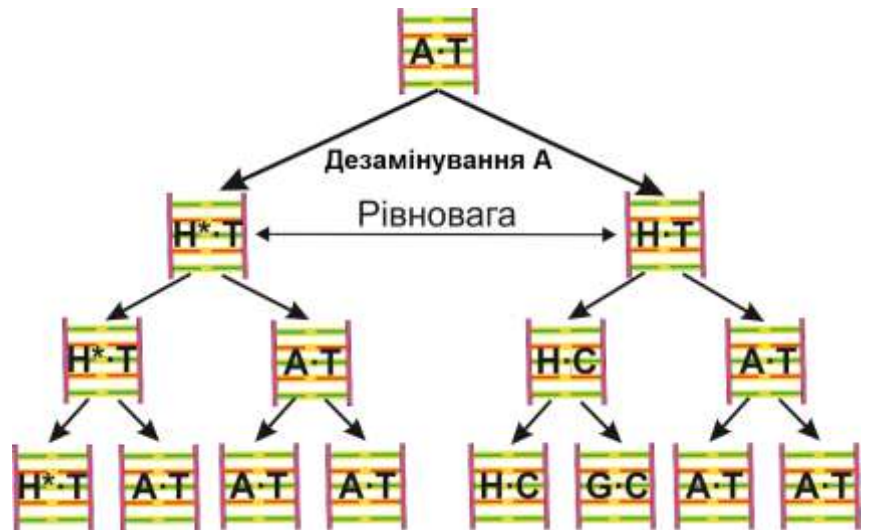


Рис. 5. Схематичне зображення мікроструктурного механізму виникнення транзицій А·Т→Г·С, індукованих гіпоксантином – продуктом спонтанного дезамінування А.

Таблиця 2. Енергетичні та кінетичні характеристики перетворень неправильних довгих, коротких та подібних до Вотсон-Криківських пар нуклеотидних основ подвійним перенесенням протонів вздовж сусідніх Н-зв'язків, отримані на рівні теорії MP2/cc-pVQZ//B3LYP/6-311++G(d,p) у вільному стані.

Таутомерне перетворення	Характер таутомеризації	Кількість ключових точок	ΔG^a	ΔE^b	$\Delta \Delta G_{TS}^B$	$\Delta \Delta E_{TS}^r$	$\Delta \Delta G^d$	$\Delta \Delta E^e$	τ^c
$A \cdot A^* \leftrightarrow A^* \cdot A$	К, АС	9	0,00	0,00	7,01	10,33	7,01	10,33	$1,82 \cdot 10^{-8}$
$A \cdot G \leftrightarrow A^* \cdot G^*$	К, АС	9	10,07	9,58	9,63	11,46	-0,44	1,88	$4,83 \cdot 10^{-14}$
$G \cdot G^* \leftrightarrow G^* \cdot G$	К, АС	9	0,00	0,00	5,51	8,33	5,51	8,33	$8,22 \cdot 10^{-10}$
$A \cdot C^* \leftrightarrow A^* \cdot C$	К, АС	9	3,99	3,64	8,17	10,53	4,18	6,89	$1,08 \cdot 10^{-10}$
$G^* \cdot T \leftrightarrow G \cdot T^*$	К, АС	9	1,22	1,19	2,63	5,61	2,63	5,61	$8,13 \cdot 10^{-13}$
$C \cdot C^* \leftrightarrow C^* \cdot C$	К, АС	9	0,00	0,00	8,28	10,83	8,28	10,83	$1,53 \cdot 10^{-7}$
$C \cdot T \leftrightarrow C^* \cdot T^*$	К, АС	9	9,15	8,99	9,55	11,38	0,40	2,39	$2,13 \cdot 10^{-13}$
$T \cdot T^* \leftrightarrow T^* \cdot T$	К, С	5	0,00	0,00	4,64	8,18	4,64	8,18	$1,58 \cdot 10^{-10}$
$G \cdot G^*_{syn} \leftrightarrow G^* \cdot G^*_{syn}$	К, АС	9	11,02	11,15	9,07	12,17	-1,96	1,02	$4,10 \cdot 10^{-15}$
$A^* \cdot A_{syn} \leftrightarrow A \cdot A^*_{syn}$	К, АС	9	13,98	14,71	14,15	16,43	0,16	1,72	$1,12 \cdot 10^{-13}$
$A^* \cdot G^*_{syn} \leftrightarrow A \cdot G^*_{syn}$	К, АС	9	1,89	2,20	2,42	4,60	0,52	2,40	$2,17 \cdot 10^{-13}$
$H \cdot C \leftrightarrow H^* \cdot C^*$	К, АС	9	6,83	6,74	8,39	11,06	1,57	4,32	$1,89 \cdot 10^{-12}$
$H^* \cdot T \leftrightarrow H \cdot T^*$	К, АС	9	2,94	2,67	4,75	7,75	1,82	5,07	$2,65 \cdot 10^{-12}$
$H \cdot H \leftrightarrow H^* \cdot H^*$	К, С	6	5,68	6,01	5,57	9,62	-0,11	3,61	$6,57 \cdot 10^{-14}$
$H^* \cdot H \leftrightarrow H \cdot H^*$	К, С	5	0,00	0,00	2,87	7,27	2,87	7,27	$8,15 \cdot 10^{-12}$
$H \cdot A \leftrightarrow H^* \cdot A^*$	К, АС	9	10,32	10,20	9,52	11,78	-0,80	1,58	$2,68 \cdot 10^{-14}$

^aВільна енергія Гіббса таутомеризованої пари основ відносно початкової пари основ (T=298.15 K), ккал·моль⁻¹; ^bЕлектронна енергія таутомеризованої пари основ відносно початкової пари основ, ккал·моль⁻¹; ^BВільна енергія Гіббса активації реакції таутомеризації, ккал·моль⁻¹; ^rЕлектронна енергія активації реакції таутомеризації, ккал·моль⁻¹; ^dВільна енергія Гіббса зворотнього бар'єру реакції таутомеризації, ккал·моль⁻¹; ^eЕлектронна енергія зворотнього бар'єру реакції таутомеризації, ккал·моль⁻¹; ^cЧас життя таутомеризованої пари основ, с.

Позначення: К – концертний, С – синхронний, АС – асинхронний.

Н-зв'язки та притягувальні ван-дер-Ваальсові контакти, що беруть участь у стабілізації пар, є взаємозалежними. Антипаралельні Н-зв'язки, зазвичай, взаємно посилюють один одного, паралельні ж навпаки – взаємопослаблюються. При цьому характер кооперативності нав'язує, як правило, найсильніший Н-зв'язок.

Для низки процесів таутомеризації, а саме – $A \cdot G \leftrightarrow A^* \cdot G^*$, $A \cdot C^* \leftrightarrow A^* \cdot C$, $G^* \cdot T \leftrightarrow G \cdot T^*$, $C \cdot T \leftrightarrow C^* \cdot T^*$, $G \cdot G^*_{syn} \leftrightarrow G^* \cdot G^*_{syn}$, $A^* \cdot A_{syn} \leftrightarrow A \cdot A^*_{syn}$, $A^* \cdot G^*_{syn} \leftrightarrow A \cdot G^*_{syn}$, $H \cdot C \leftrightarrow H^* \cdot C^*$, $H^* \cdot T \leftrightarrow H \cdot T^*$, $H \cdot H \leftrightarrow H^* \cdot H^*$ і $H \cdot A \leftrightarrow H^* \cdot A^*$ – таутомеризовані пари є динамічно-нестійкими структурами: за час їхнього життя не встигають розвиватися низькочастотні міжмолекулярні коливання. Це означає, що ці процеси не реалізуються як фізико-хімічні реакції.

У тих випадках, коли таутомеризовані комплекси є динамічно-стійкими структурами ($A^* \cdot A$, $G^* \cdot G$, $A^* \cdot C$ і $C^* \cdot C$) лише у двох стартових парах, що їм відповідають ($A \cdot A^*$ і $C \cdot C^*$), основи можуть змінювати свій таутомерний статус при примусовій дисоціації пар доволі інертною реплікативною машинерією. Це відбувається у тому випадку, коли час життя таутомеризованої пари помітно перевищує характерний час ($\tau_{pol} \approx 10^{-9}$ с), який витрачає ДНК-полімераза на примусову дисоціацію Вотсон-Криківських пар основ ДНК.

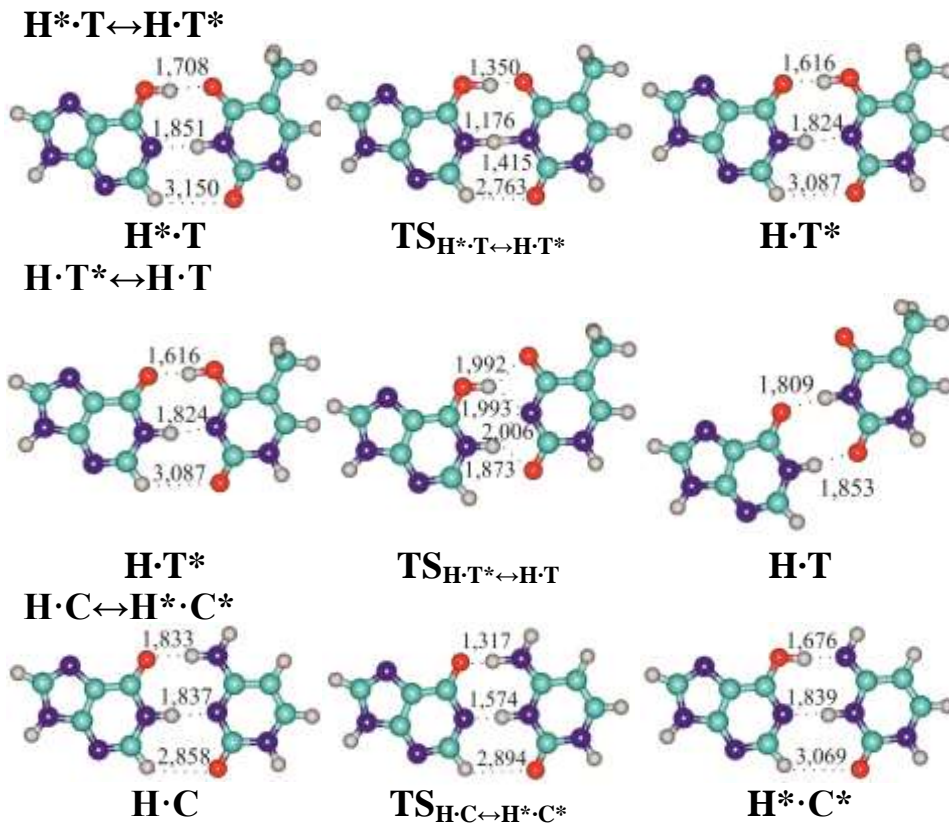


Рис. 6. Геометричні структури 3 стаціонарних точок (стартового комплексу, перехідного стану та кінцевого комплексу) на шляху таутомеризації подвійним перенесенням протонів вздовж Н-зв'язків неправильних пар нуклеотидних основ за участю гіпоксантину. Дані отримано на рівні теорії B3LYP/6-311++G(d,p) у вакуумі.

узагальнень.

Аналізом розподілу електронної густини вперше встановлено, що таутомеризація деяких досліджених неправильних пар нуклеотидних основ подвійним перенесенням протонів вздовж сусідніх Н-зв'язків асистується третім міжмолекулярним Н-зв'язком чи специфічним контактом, а саме: $N2H \cdots O2$ ($G^* \cdot T \leftrightarrow G \cdot T^*$), $N2H \cdots N2$, який без розриву змінюється на притягувальний ван-дер-Ваальсовий контакт $N2 \cdots N2$ ($G \cdot G^* \leftrightarrow G^* \cdot G$), $C2H \cdots HC2$ ($A \cdot A^* \leftrightarrow A^* \cdot A$), $N2H \cdots HC2$, який плавно і без біфуркації трансформується в $C2H \cdots N2$ ($A \cdot G \leftrightarrow A^* \cdot G^*$), $C2H \cdots O2$ ($A \cdot C^* \leftrightarrow A^* \cdot C$, $H \cdot C \leftrightarrow H^* \cdot C^*$ і $H^* \cdot T \leftrightarrow H \cdot T^*$) та притягувальним ван-дер-Ваальсовим контактом $O2 \cdots O2$ ($C \cdot C^* \leftrightarrow C^* \cdot C$, $C \cdot T \leftrightarrow C^* \cdot T^*$ і $T \cdot T^* \leftrightarrow T^* \cdot T$).

Також нами вперше детально проаналізовано молекулярні механізми мутагенного тиску Н як продукту спонтанного дезамінування А на ДНК, який реалізується переходом неправильної пари $H^* \cdot T$, подібної до класичної Вотсон-Криківської, у вобл-пару $H \cdot T$ перенесенням протонів через перехідний стан – тісну йонну пару $H^+ \cdot T^-$ (Рис. 6). Беручи до уваги значний час життя енольного таутомера H^* ($\tau = 7,1 \cdot 10^9$ с) із *cis*-орієнтацією гідроксилу ObH відносно сусіднього $N1C6$ зв'язку, який на багато порядків перевищує час реплікації ДНК в клітині ($\sim 10^6$ с), висловлено і обґрунтовано думку про те, що кето-таутомер Н є мутагенною, а енольний таутомер – немутагенною сполукою. Співіснування кето- та енольного таутомерів Н у

При таутомеризації коротких $T \cdot T^*$ і $C \cdot C^*$, а також довгих $A \cdot A^*$, $G \cdot G^*$ і $H \cdot H^*$ Вотсон-Криківських пар нуклеотидних основ мутагенні таутомери розподіляються між мономерами із однаковою імовірністю. Це важливо для розуміння процесів закріплення точкових мутацій при наступних раундах реплікації ДНК.

Перехід із вакууму в середовище з $\epsilon = 4$, характерне для гідрофобних інтерфейсів взаємодій у білково-нуклеїнових комплексах, впливає на перебіг таутомеризації як невелике збурення і не змінює характеру висновків та

системі та їхня взаємодія із основами С та Т, відповідно, визначають частоту транзицій $A \cdot T \rightarrow G \cdot C$ (Рис. 5).

У четвертому розділі дисертації детально досліджено класичні механізми таутомеризації подвійним перенесенням протонів вздовж сусідніх міжмолекулярних Н-зв'язків Вотсон-Криківських, воблівських пар основ ДНК та білково-нуклеїнових точкових контактів.

Одним із найвразливіших місць класичної таутомерної гіпотези (Watson & Crick, 1953) щодо мікроструктурної природи спонтанних точкових мутацій, які виникають під час біосинтезу ДНК, є відсутність уявлень про конкретні фізико-хімічні механізми мутагенної таутомеризації нуклеотидних основ. Відомо, що мутагенна таутомеризація основ ДНК внутрішньомолекулярною міграцією протону є надзвичайно повільним процесом ($\tau_{99,9\%} = 3,9 \cdot 10^7 \div 1,2 \cdot 10^{14}$ с (Brovarets' *et al.*, 2010)) навіть у порівнянні з часом реплікації ДНК у живій клітині ($\sim 10^6$ с (Friedberg *et al.*, 2006)). Відтак дослідники апелюють до міжмолекулярних механізмів перенесення протонів, яке забезпечується молекулою-посередником, що взаємодіє із основою ДНК – претендентом на мутагенну таутомеризацію – міжмолекулярними Н-зв'язками, у які втягнуті кислі групи атомів, здатні легко відщеплювати протон.

У літературі представлено три моделі мутагенної таутомеризації основ ДНК такого ґатунку, а саме:

- класична модель Льовдіна (Löwdin, 1963, 1966), яка пов'язує мутагенну таутомеризацію основ ДНК із подвійним перенесенням протонів вздовж сусідніх міжмолекулярних Н-зв'язків у Вотсон-Криківських парах нуклеотидних основ $A \cdot T$ і $G \cdot C$;
- модель мутагенної таутомеризації основ ДНК при утворенні ними вобл-пари із *цис*-орієнтованими глікозидними зв'язками (Padermshoke *et al.*, 2008) – у цю-

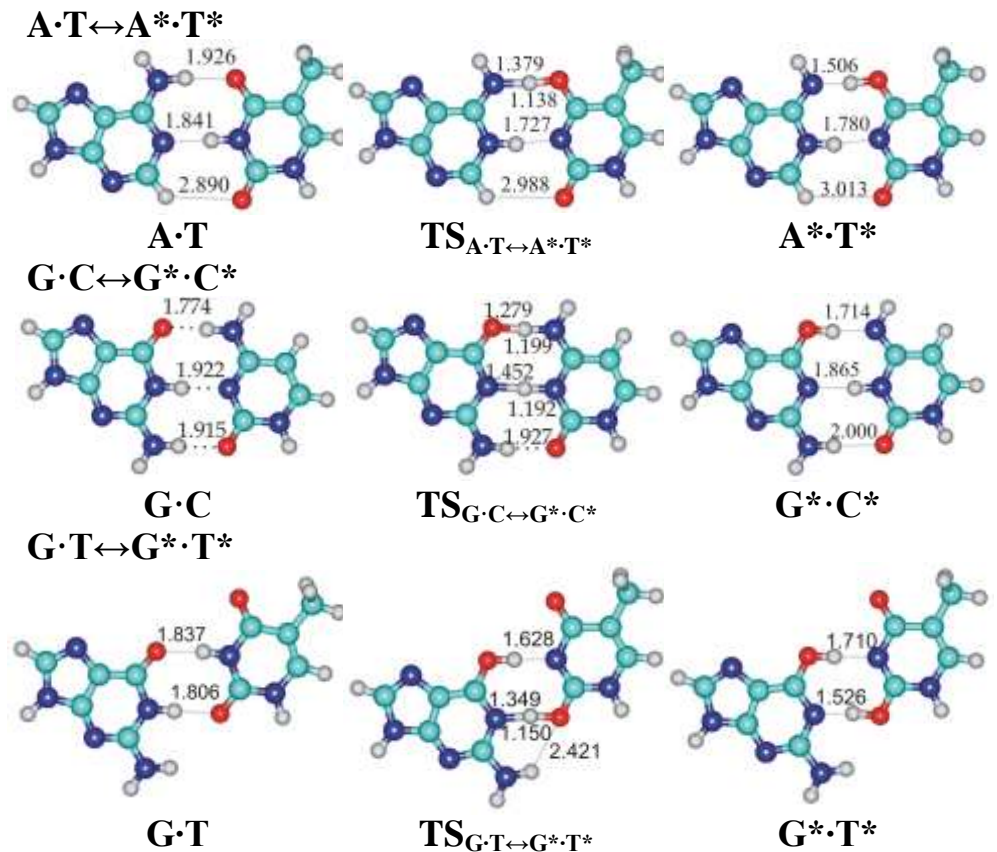


Рис. 7. Геометричні структури 3 ключових точок (стартового, кінцевого комплексів та перехідного стану), які описують еволюцію таутомеризації подвійним перенесенням протонів вздовж міжмолекулярних Н-зв'язків класичних Вотсон-Криківських та вобл-пари основ ДНК. Дані отримано на рівні теорії B3LYP/6-311++G(d,p) у вакуумі.

Таблиця 3. Енергетичні та кінетичні характеристики перетворень вобл- та класичних Вотсон-Криківських пар основ ДНК подвійним перенесенням протонів вздовж сусідніх міжмолекулярних Н-зв'язків.

Таутомерне перетворення	Характер таутомеризації	Кількість ключових точок	ΔG	ΔE	$\Delta\Delta G_{TS}$	$\Delta\Delta E_{TS}$	$\Delta\Delta G$	$\Delta\Delta E$	τ
$A \cdot T \leftrightarrow A^* \cdot T^{*\$}$	К, АС	9	11,95	12,26	10,29	12,40	-1,66	0,14	$6,53 \cdot 10^{-15}$
$G \cdot C \leftrightarrow G^* \cdot C^{*\$}$	К, АС	9	9,22	8,22	9,69	13,28	0,47	5,06	$1,57 \cdot 10^{-13}$
$G \cdot T \leftrightarrow G^* \cdot T^{*\$}$	К, АС	9	11,78	12,12	9,47	12,58	-2,31	0,46	$2,14 \cdot 10^{-15}$

Дані отримано на рівні теорії $^{\$}MP2/aug-cc-pVTZ//MP2/6-311++G(d,p)$ та $^{\$\$}MP2/cc-pVQZ//MP2/6-311++G(d,p)$ у вакуумі. Див. позначення у Табл. 2.

му випадку таутомеризація теж забезпечується подвійним перенесенням протонів вздовж сусідніх міжмолекулярних Н-зв'язків, які беруть участь у її стабілізації;

- гіпотетична модель Стражевського (Strazewski *et al.*, 1990) мутагенної таутомеризації основ ДНК білками, а саме – кислими бічними радикалами їхніх амінокислотних залишків, котрі випадково вступають у взаємодію Н-зв'язками з нуклеотидними основами. У рамках цієї моделі мутагенна таутомеризація – це подвійна міграція протонів вздовж міжмолекулярних Н-зв'язків, які беруть участь у підтриманні цих стохастичних білково-нуклеїнових точкових контактів.

При цьому вважається, що необхідною і достатньою умовою мутагенної таутомеризації основ ДНК є наявність на гіперповерхні потенціальної енергії локального мінімуму, що відповідає таутомеризованому стану комплексу, а також прийнятна ($\geq 10^{-9}$ - 10^{-11}) заселеність останнього за нормальних умов. У той же час ні енергетичні, ні кінетичні умови, за яких високоточна ДНК-полімераза здатна примусово дисоціювати таутомеризований комплекс на мономери у мутагенній таутомерній формі, у літературі не обговорюються.

Спираючись на аналіз літературних даних та запропоновану нами молекулярну логіку спонтанного точкового мутагенезу, ми вперше сформулювали енергетичні (енергія взаємодії мономерів таутомеризованого комплексу не повинна перевищувати аналогічну величину для Вотсон-Криківської пари основ ДНК G·C) та кінетичні (час життя таутомеризованого комплексу має перевищити характерний час ($\tau_{\text{pol}} \approx 10^{-9}$ с), який витрачає високоточна ДНК-полімераза на примусову дисоціацію Вотсон-Криківських пар основ ДНК на мономери) засади, які детермінують виникнення спонтанних точкових помилок, зумовлених мутагенною таутомеризацією нуклеотидних основ, при функціонуванні ДНК-полімеразної машинерії.

У рамках такого підходу ми детально дослідили процеси мутагенної таутомеризації класичних Вотсон-Криківських пар основ ДНК А·Т і G·C за механізмом Льовдіна (Рис. 7, Табл. 3). Встановлено, що з формальної точки зору обидві реакції таутомеризації $A \cdot T \leftrightarrow A^* \cdot T^{*\$}$ і $G \cdot C \leftrightarrow G^* \cdot C^{*\$}$ є концертними асинхронними процесами подвійного перенесення протонів вздовж сусідніх міжмолекулярних Н-зв'язків, які асистуються третім Н-зв'язком C2H \cdots O2 (для першої реакції) і N2H \cdots O2 (для другої реакції таутомеризації). З-поміж усіх досліджених нами несиметричних пар нуклеотидних основ, що таутомеризуються подвійним перенесенням протонів (Табл. 2),

са́ме для пари G·C реалізується найменша ступінь асинхронності. Профілі дипольних моментів вздовж ВКР свідчать про те, що таутомеризації $A·T \leftrightarrow A^*·T^*$ і $G·C \leftrightarrow G^*·C^*$ є дипольно-активними переходами, що може бути корисним при врахуванні впливу полярного розчинника на перебіг цих реакцій. У обох випадках спостерігаються локальні мінімуми, що відповідають таутомеризованим станам пар $A^*·T^*$ і $G^*·C^*$. При цьому пара $A^*·T^*$, на відміну від пари $G^*·C^*$, є динамічно нестійкою – її час життя на 6 порядків менший характерного часу τ_{pol} . Як і пара $A^*·T^*$, динамічно стійка пара $G^*·C^*$ є короткоживучою структурою, яка “вислизає” із рук високоточної ДНК-полімерази. Іншими словами – процес примусової дисоціації класичних Вотсон-Криківських пар основ ДНК відбувається без зміни канонічного таутомерного статусу основ за схемою – $A·T \rightarrow A+T$ і $G·C \rightarrow G+C$, тобто механізм Льовдіна не забезпечує генерацію мутагенних таутомерів основ ДНК при реплікації останньої.

Таблиця 4. Параметри одновимірного двох’ямого потенціалу, який описує перебіг реакції таутомеризації $A·T \leftrightarrow A^*·T^*$ подвійним перенесенням протонів вздовж міжмолекулярних Н-зв’язків.

Література	E_B^a	ΔE^b	$E_B - \Delta E^b$	ζ_{TS}^r	N^d	n^e	$\nu(\text{NH})^e$
Godbeer <i>et al.</i> , 2015	8066	4597/4613,5 [§]	3469/3452,5	0,24	11	6	1146
Brovarets' & Novorun, 2014 ^{§§}	4337,5	4288,5	49 ^{§§§}	0,66	1	0	3248,6

^aЕлектронний бар’єр прямої реакції таутомеризації $A·T \leftrightarrow A^*·T^*$, см^{-1} ; ^bРізниця електронних енергій між канонічною $A·T$ та таутомеризованою $A^*·T^*$ парами основ, см^{-1} ; ^cЕлектронний бар’єр зворотної реакції таутомеризації $A·T \leftrightarrow A^*·T^*$, см^{-1} ; ^dБезрозмірна нормована координата, яка відповідає перехідному стану $TS_{A·T(WC) \leftrightarrow A^*·T^*(L)}$; ^eКількість коливальних рівнів, які локалізуються у глибокій потенціальній ямі – основному таутомерному стані $A·T$; ^fКількість коливальних рівнів, які локалізуються у мілкій потенціальній ямі – рідкісному таутомерному стані $A^*·T^*$; ^gЕфективна частота валентного коливання групи NH, що втягнута у Н-зв’язки в парі основ ДНК $A·T$. [§]Для параметру ΔE представлено два значення у роботі (Godbeer *et al.*, 2015) на стор. 13036 (4613,5 см^{-1}) та у Табл. 1 на стор. 13037 (4597 см^{-1}); ^{§§}Дані отримано на рівні теорії MP2/aug-cc-pVTZ//MP2/6-311++G(d,p) у вакуумі; ^{§§§}49 $\text{см}^{-1} = 0,25 \cdot kT$ за нормальних умов.

Нещодавно представлено зручну, надійно обґрунтовану і гнучку (адаптабельну) одновимірну модель протонного тунелювання (Godbeer *et al.*, 2015), яку автори застосували для Вотсон-Криківської пари основ ДНК $A·T$. Попри те, що фізико-хімічні параметри, закладені у цю модель, дають карт-бланш тунелюванню у парі $A·T$, автори дійшли висновку про те, що імовірність тунелювання дуже низька ($\sim 10^{-9}$). Автори, на наш погляд, невдало параметризували свою модель (Табл. 4): вони значно завищили зворотній бар’єр таутомеризації $A·T \rightarrow A^*·T^*$, значно занизили ефективну частоту валентного коливання $\nu(\text{NH})$ у Н-містках $\text{NH} \cdots \text{N}$ та асиметрію двох’ямого потенціалу. За умов адекватної параметризації моделі тунелювання протонів у парі $A·T$ не повинно спостерігатися взагалі.

На прикладі вобл-пари G·T ми також ретельно проаналізували адекватність моделі мутагенної таутомеризації основ ДНК подвійним перенесенням протонів вздовж міжмолекулярних Н-зв’язків (Padermshoke *et al.*, 2008) (Рис. 7, Табл. 3). Вперше показано, що таутомеризація воблівської пари G·T у пару $G^*·T^*$ за участю рідкісних таутомерів (Padermshoke *et al.*, 2008), яка формально відбувається за концертним асинхронним механізмом, не є мутагенною. Вона не призводить до

Таблиця 5. Енергетичні та кінетичні характеристики таутомерних перетворень у модельних білково-нуклеїнових комплексах подвійним перенесенням протонів вздовж сусідніх міжмолекулярних Н-зв'язків, отримані на рівні теорії MP2/6-311++G(3df,2pd)//M05/6-311++G(2df,pd).

Таутомерні перетворення	ΔG	ΔE	$\Delta\Delta G_{TS}$	$\Delta\Delta E_{TS}$	$\Delta\Delta G$	$\Delta\Delta E$	τ
$m^1T \cdot CH_3COOH \leftrightarrow m^1T^* \cdot CH_3COOH$	5,63	6,48	7,24	10,45	1,60	3,97	$1,86 \cdot 10^{-12}$
$m^9A \cdot CH_3COOH \leftrightarrow m^9A^* \cdot CH_3COOH$	8,21	7,23	6,68	8,52	-1,53	1,29	$6,08 \cdot 10^{-15}$
$m^1C \cdot CH_3COOH \leftrightarrow m^1C^* \cdot CH_3COOH$	3,35	2,91	6,12	7,43	2,77	4,52	$1,61 \cdot 10^{-11}$
$m^9G \cdot CH_3COOH \leftrightarrow m^9G^* \cdot CH_3COOH$	1,93	2,75	2,08	5,96	0,15	3,21	$1,03 \cdot 10^{-13}$

Див. позначення у Табл. 2.

переходу G у мутагенну таутомерну форму, здатну неправильно спарюватися із T за Вотсон-Криківською схемою $G^*+T \rightarrow G^* \cdot T$. Причиною цьому є динамічна нестійкість і як наслідок – дуже короткий час життя таутомеризованої вобл-пари $G^* \cdot T^*$. Принагідно зазначимо, що саме використання методології розгортки основних фізико-хімічних параметрів, що характеризують процес таутомеризації вздовж ВКР $G \cdot T \rightarrow G^* \cdot T^*$, дозволила нам зафіксувати додатковий міжмолекулярний Н-зв'язок $N2H \cdots O2$, відсутній у стаціонарних точках.

У дисертації показано, що висновок про неможливість мутагенної таутомеризації вобл-пар основ ДНК має загальний характер і поширюється на усі без винятку вобл-пари, які беруть участь у процесах спонтанного точкового мутагенезу.

Аналізуючи гіпотетичну модель Стражевського (Strazewski *et al.*, 1990), ми скористалися найпростішими репрезентативними моделями точкових білково-нуклеїнових контактів – Н-зв'язаними за мі-

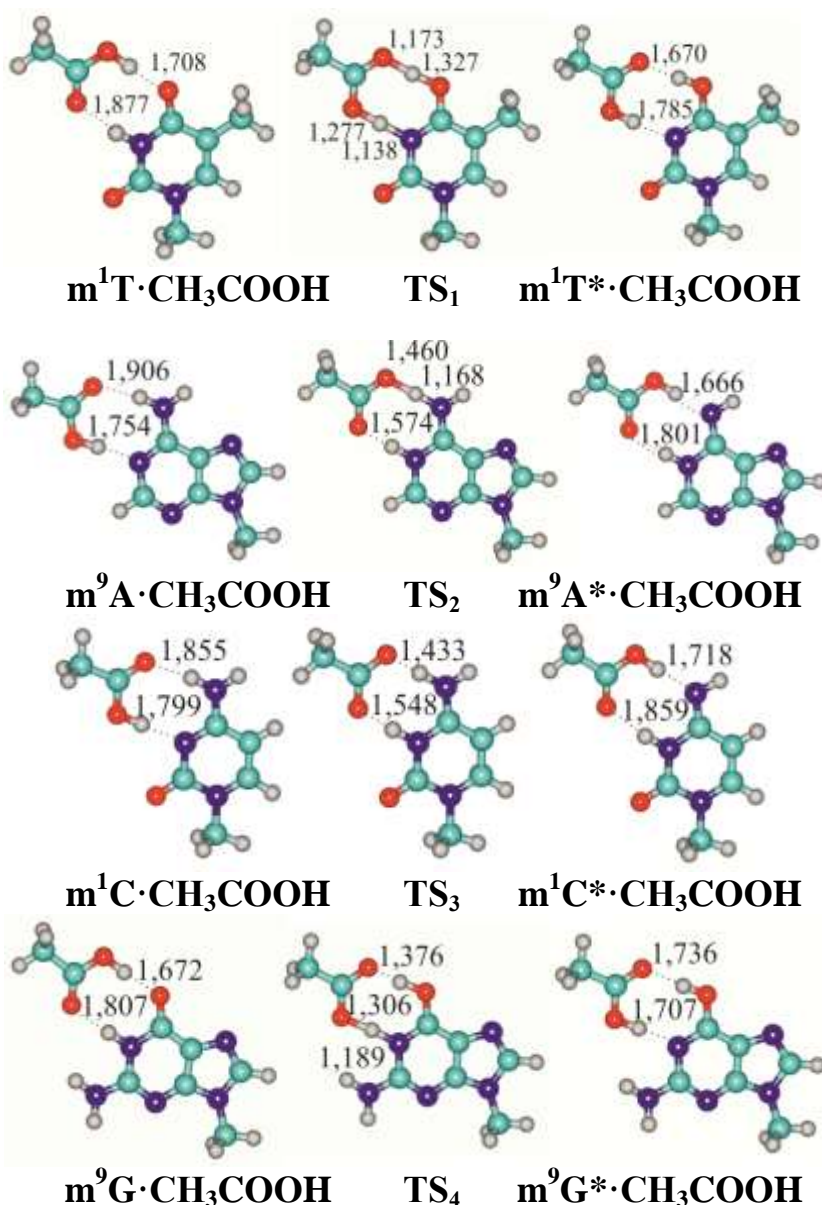


Рис. 8. Просторові геометричні структури Н-зв'язаних комплексів нуклеотидних основ із мурашиною кислотою CH_3COOH , що відповідають стаціонарним точкам на їхній гіперповерхні потенціальної енергії (рівень теорії MP2/6-311++G(3df,2pd)//M05/6-311++G(2df,pd), $\epsilon=1$).

сцями Вотсон-Криківського спарювання комплексами нуклеотидних основ із мурашиною кислотою (Рис. 8, Табл. 5). При цьому враховано, що бічні радикали амінокислот, які містять карбоксильну групу, є найімовірнішими претендентами на роль мутагенної таутомеризації основ подвійним перенесенням протонів вздовж міжмолекулярних Н-зв'язків (Samijlenko *et al.*, 2011).

Доведено, що всі таутомеризовані комплекси, які містять мутагенні таутомери основ ДНК, є динамічно-нестійкими структурами, для яких зворотній бар'єр реакції не перевищує енергію нульового коливання, що відповідає коливальній моді, частота якої стає уявною у перехідному стані таутомеризації.

Цей результат свідчить про те, що рідкісні таутомери основ ДНК, індуковані випадковою взаємодією останніх із ДНК-зв'язувальними білками, не спричиняють виникнення спонтанних точкових мутацій з огляду на низький зворотній бар'єр таутомеризації, який сприяє швидкому поверненню основи із мутагенної до канонічної таутомерної форми.

У **п'ятому розділі** дисертації викладено результати досліджень взаємних таутомерних перетворень Вотсон-Криківських і воблівських пар основ ДНК як ключ до розуміння природи спонтанного точкового мутагенезу.

Результати, отримані у попередніх двох розділах, свідчать про те, що таутомерна гіпотеза стикається із суттєвими труднощами при поясненні механізмів мутагенної таутомеризації основ ДНК, які не можуть бути подолані без виходу за класичні рамки уявлень про те, що мутагенні таутомери нуклеотидних основ генеруються у тих чи інших комплексах подвійним перенесенням протонів вздовж сусідніх міжмолекулярних Н-зв'язків. Відсутність якісно нових підходів до цієї проблеми змушує дослідників думати, що мутагенні таутомери нуклеотидних основ не утворюються безпосередньо у суттєво гідрофобній кишені впізнавання високоточної ДНК-полімерази, а заносяться туди із навколишнього водного оточення. При цьому зазвичай вважають, що стала таутомерної рівноваги не змінюється при переході основи із водного середовища у гідрофобну кишеню впізнавання: до цього часу це припущення залишається гіпотетичним і, строго кажучи, не має під собою належного фізико-хімічного підґрунтя.

Нам вдалося отримати принципово нові результати щодо механізмів мутагенної таутомеризації основ ДНК і, спираючись на них, пояснити на напівкількісному рівні мікроструктурні засади виникнення спонтанних точкових помилок реплікації і включення, які трапляються під час біосинтезу ДНК.

Так, вперше показано, що пари нуклеотидних основ із Вотсон-Криківською архітектурою Н-зв'язування – класичні, довгі, короткі, один чи обидва мономери яких знаходяться у основній чи рідкісній таутомерних формах, – знаходяться у повільній (порівняно із часом, який витрачає високоточна ДНК-полімераза на інкорпорацію у подвійну спіраль ДНК одного нуклеотиду) таутомерній рівновазі із відповідними вобл-парами (Рис. 9, 10, Табл. 6). По суті, відкрито новий тип таутомеризації молекулярних Н-зв'язаних комплексів, який супроводжується істотною зміною їхньої геометрії (від Вотсон-Криківської до воблівської і навпаки). Доведено, що у всіх без винятку випадках ці процеси таутомеризації реалізуються через високостабільні (енергія взаємодії ~ 100 ккал·моль⁻¹), полярні перехідні стани – тісні йонні пари типу (протонована основа)·(депротонована основа) і відбуваються без

безпосередньої участі молекул води як хімічного агента. Вони контролюються патернами (від 9 до 15) специфічних міжмолекулярних взаємодій – Н-зв'язків АН \cdots В (подекуди некласичних СН \cdots О/Н), розрихлених хімічних зв'язків А-Н-В та у окремих випадках –притягувальних ван-дер-Ваальсових контактів, – які послідовно змінюють один одного вздовж ВКР таутомеризації.

Характерно, що для усіх таутомерних перетворень такого типу екстремуми похідної від електронної енергії за ВКР збігаються із другою та передостанніми ключовими точками, у яких відбувається перетворення Н-зв'язку у ковалентний та навпаки, для яких $\Delta\rho=0$.

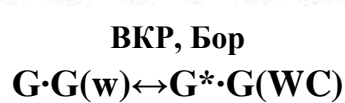
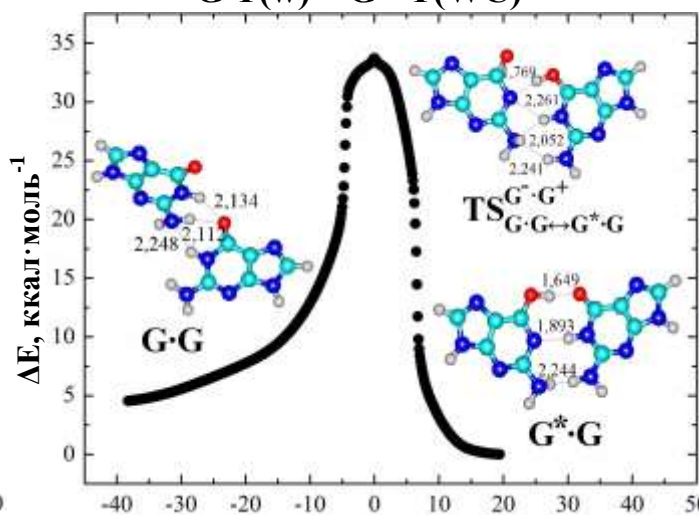
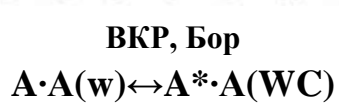
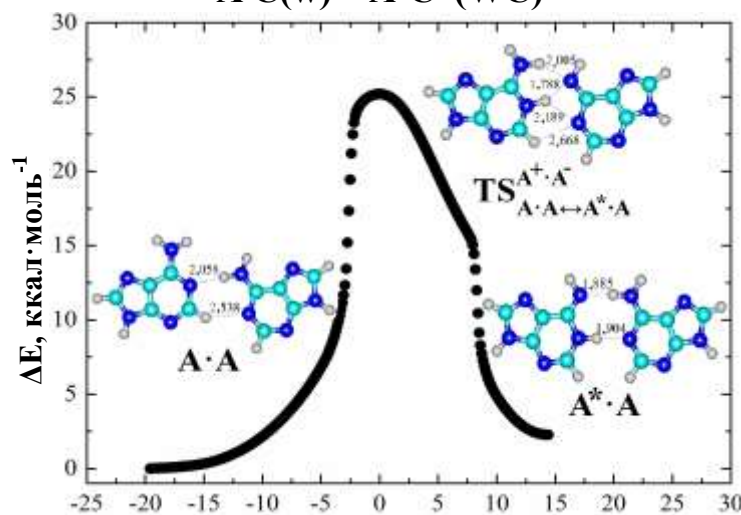
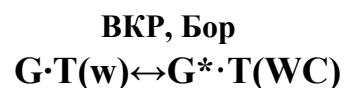
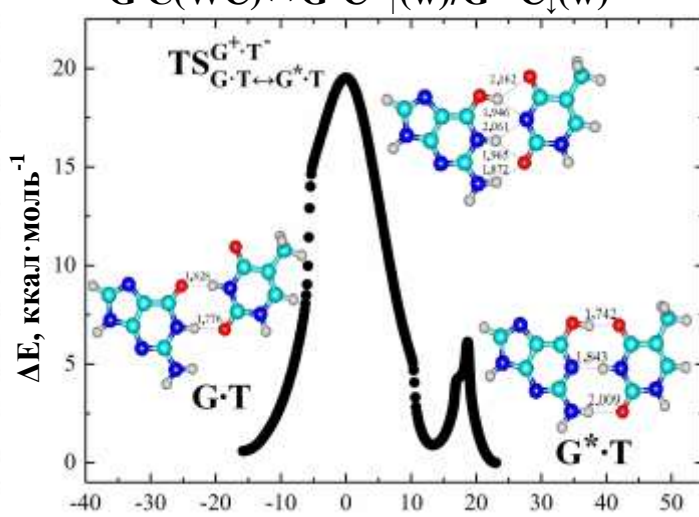
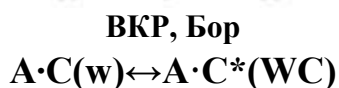
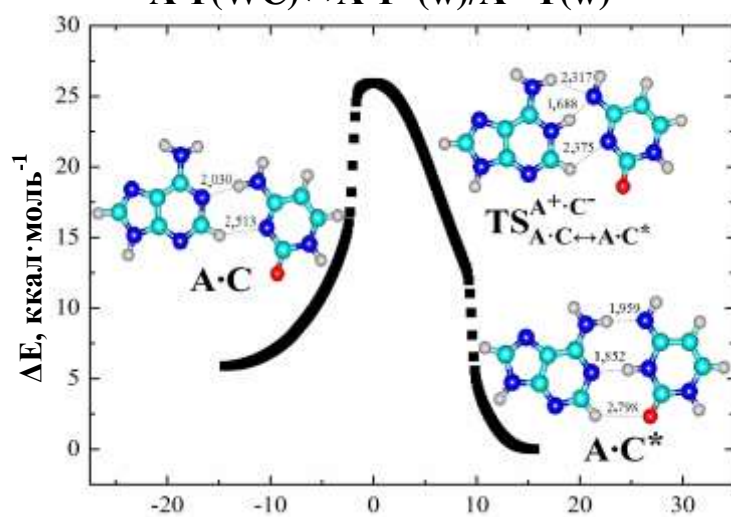
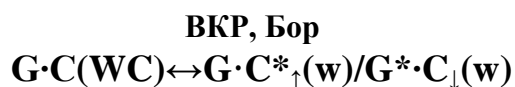
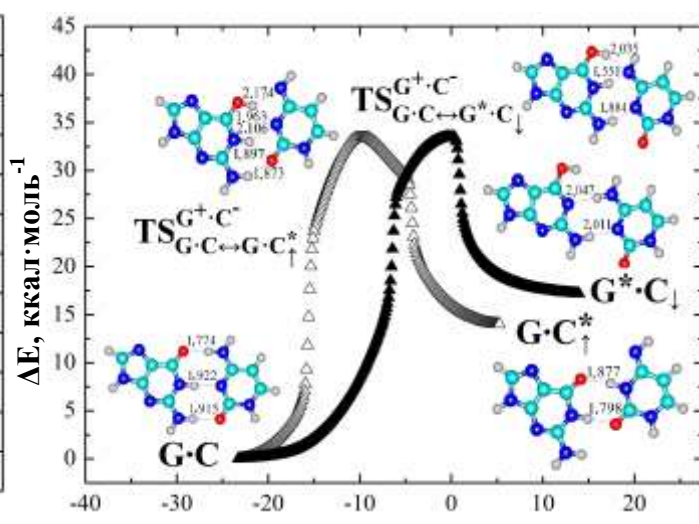
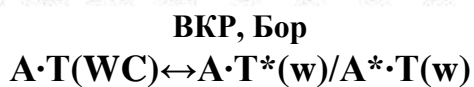
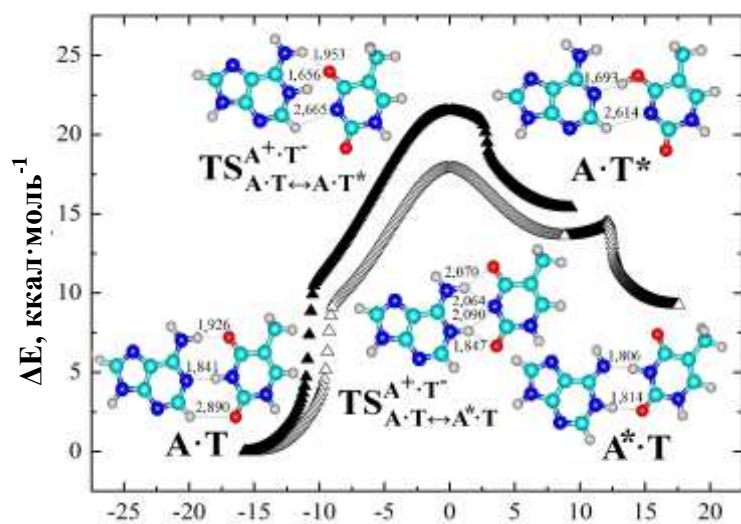
Окрім того, нами доведено, що процеси таутомеризації, що обговорюються, реалізуються чотирма різними (у топологічному та енергетичному відношеннях) маршрутами. Ця кількість шляхів таутомеризації не випадкова – вона визначається, з одного боку, кількістю кислих протонів, що мігрують (у кожній парі їх 2), та напрямками воблізації Вотсон-Криківських пар (їх теж 2 – за кількістю борозенок ДНК). Характерно, що у кожному випадку здебільшого лише один маршрут є прийнятним з огляду на його значущість для процесів зародження спонтанних точкових мутацій.

У рамках таких якісно нових модельних уявлень нам вдалося пролити світло на мікроструктурні механізми виникнення точкових мутацій – помилок реплікації та включення.

Так, джерелом генерації мутагенних таутомерів, які виникають при розходженні ланцюгів ДНК, є спонтанна мутагенна таутомеризація Вотсон-Криківських пар нуклеотидних основ у вобл-пари, до складу яких входять мутагенні таутомери А*, Т*, G* і С*. При цьому *помилки реплікації* (нехай для прикладу А* належить материнському ланцюгу ДНК) виникають наступним чином: А*+С \rightarrow А*·С \rightarrow А·С*, А*+А \rightarrow А*·А \rightarrow А*·А_{syn}, А*+G \rightarrow А·G \rightarrow А*·G* \rightarrow А*·G*_{syn}. Подібні схеми структурних перетворень, які відбуваються безпосередньо у кишені впізнавання високоточної ДНК-полімерази, для трьох інших випадків, коли материнському ланцюгу ДНК належать G*, Т* і С*, ми не наводимо за браком місця. Вони детально проаналізовані у дисертації.

У рамках таких модельних уявлень нами вперше показано, що при заміні аденіну на 2-амінопурин (2АР) відбувається зростання частоти мутацій у 1887 разів за нормальних умов внаслідок збільшення заселеності пари 2АР·Т* при таутомеризації 2АР·Т \rightarrow 2АР·Т* у порівнянні із процесом А·Т \rightarrow А·Т*.

Відповідно до запропонованої нами моделі мутагенної таутомеризації класичної Вотсон-Криківської пари основ G·С, збільшення заселеності неправильних пар основ G·Р*_↑ ($4,5 \cdot 10^{-3}$) та G·Р*_↓ ($1,4 \cdot 10^{-4}$) за участю мутагена 6-(2-деокси-β-D-рибофуранозил)-3,4-дигідро-6Н,8Н-піримідо[4,5-с][1,2]оксазин-7-он (Р) – аналога цитозину, – на декілька порядків порівняно із аналогічними значеннями для пар основ G·С*_↑ та G·С*_↓ пояснює їхній мутагенний тиск на ДНК та дозволяє зареєструвати їх експериментально (Nedderman *et al.*, 1991, 1993).



(продовження Рис. 10)

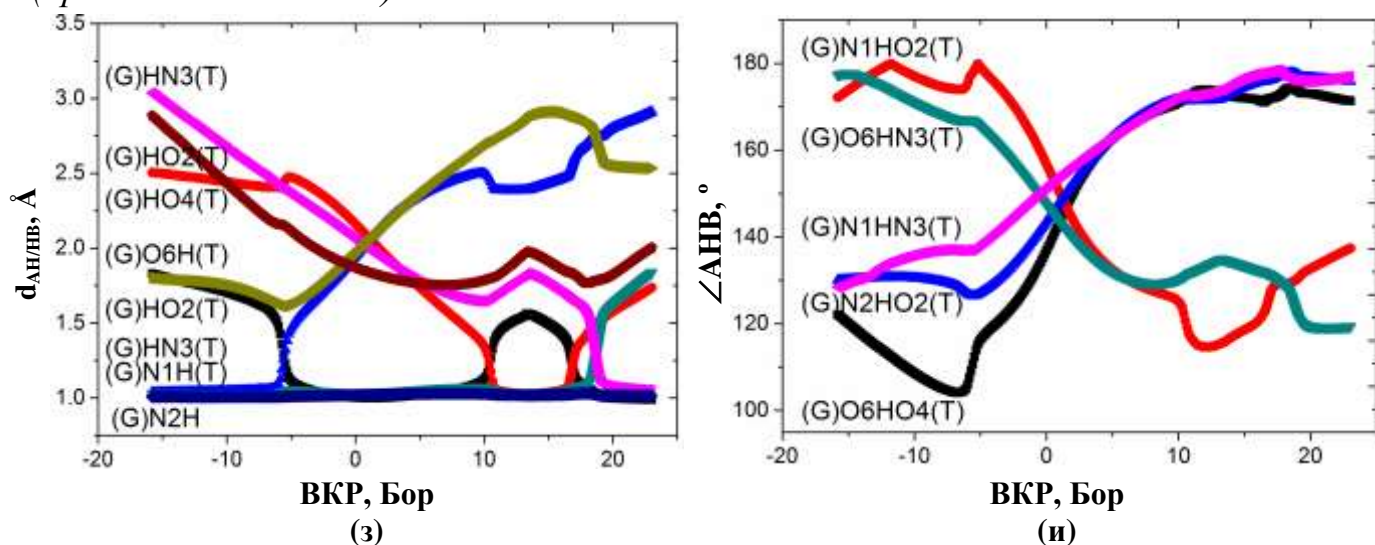


Рис. 10. Профілі: (а) відносної електронної енергії ΔE пари основ; (б) похідної електронної енергії за ВКР $dE/dIRC$; (в) дипольного моменту μ пари основ; (г) енергії міжмолекулярних Н-зв'язків $\text{АН}\cdots\text{В}$, оціненої за формулою ЕМЛ; (д) електронної густини ρ ; (е) лапласіану електронної густини $\Delta\rho$; (є) еліптичності ε у критичних точках (3,-1) ковалентних та водневих зв'язків; (ж) відстані між електронегативними атомами $d_{\text{А}\cdots\text{В}}$; (з) відстані між воднем та електронегативними атомами $d_{\text{АН/В}}$ та (и) кута Н-зв'язування $\angle \text{АНВ}$ вздовж ВКР таутомеризації $\text{G}\cdot\text{T}(\text{w})\leftrightarrow\text{G}^*\cdot\text{T}(\text{WC})$ подвійним перенесенням протонів, яке супроводжується зміщенням основ одна відносно одної (рівень теорії $\text{B3LYP}/6\text{-}311++\text{G}(\text{d},\text{p})$, $\varepsilon=1$).

Обидва ці процеси мають дві спільні риси – вони включають одні й ті ж самі пари, що відіграють роль інтермедіатів на шляху утворення ензиматично-компетентних конформацій деяких неправильних пар, а також один і той же набір фінальних неправильних пар, здатних набувати у процесі теплових флуктуацій ензиматично-компетентної конформації.

У рамках такої моделі вперше з'ясовано, що мутагенна активність галогенпохідних U пов'язана зі зниження бар'єру таутомеризації воблівських пар $\text{G}\cdot^5\text{XU}$ ($\text{X} = \text{H}, \text{CH}_3, \text{Br}, \text{Cl}, \text{F}$) у пари з Вотсон-Криківською геометрією $\text{G}^*\cdot^5\text{XU}$ у порівнянні з канонічними основами: відтак вони забезпечують більшу частоту індукованих ними транзицій – помилок включення. При цьому максимальний ефект спостерігається саме для ^5BrU – частота індукованих мутацій збільшується у 35 разів, що задовільно узгоджується із експериментальними даними – від 20 (Lasken *et al.*, 1985) до 29 (Kaufman *et al.*, 1978).

Врешті-решт стає зрозумілим, чому спонтанні точкові помилки трапляються доволі рідко – це, зокрема, пов'язано із тим, що механізми їхнього виникнення є кінетично-контрольованими, причому $\tau_{99,9\%}\gg$ часу, який витрачає ДНК-полімераза на інкорпорацію одного нуклеотиду у подвійну спіраль ДНК, що синтезується ($\sim 8,3\cdot 10^4$ с).

Спираючись на теоретичні дані, які витримали експериментальну перевірку на життєздатність (Kimsey *et al.*, 2015), можна висловити припущення про те, чому

репараційні ферменти, “заточені” саме під воблівські пари, не забезпечують 100 % точності. Справа у тому, що здатність цієї пари переходити у пару з Вотсон-Криківською геометрією, яка, образно кажучи, є схожанкою від ферменту, бо ним не розпізнається, обмежує кінцеву точність процесу репарації. Отримані дані дозволяють, в принципі, зрозуміти, за яким механізмом із геному елімінуються мутагенні таутомери основ, час життя яких на порядки перевищує час реплікації ДНК у клітині. Знову-

Таблиця 6. Енергетичні та кінетичні характеристики перетворень класичних Вотсон-Криківських (WC) та воблівських (w) пар основ ДНК, учасників процесів спонтанного точкового мутагенезу, подвійним перенесенням протонів, які проводяться суттєвою зміною їхньої геометрії (отримано на рівні теорії MP2/cc-pVQZ//B3LYP/6-311++G(d,p)). Див. також Рис. 9.

Таутомерне перетворення	ΔG	ΔE	$\Delta\Delta G_{TS}$	$\Delta\Delta E_{TS}$	$\Delta\Delta G$	$\Delta\Delta E$	$\tau_{99,9\%}^a$
$A \cdot T(WC) \leftrightarrow A^* \cdot T_{\uparrow}(w)$	9,90	9,59	16,72	16,02	6,82	6,43	$1,10 \cdot 10^{-7}$
$A \cdot T(WC) \leftrightarrow A \cdot T^*_{\downarrow}(w)$	13,08	14,84	20,28	20,41	7,20	5,57	$2,09 \cdot 10^{-7}$
$G \cdot C(WC) \leftrightarrow G \cdot C^*_{\uparrow}(w)$	12,08	12,55	31,35	31,73	19,27	19,18	148,66
$G \cdot C(WC) \leftrightarrow G^* \cdot C_{\downarrow}(w)$	14,14	15,40	32,50	32,40	18,36	17,00	32,45
$A \cdot C(w) \leftrightarrow A \cdot C^*(WC)$	4,87	6,77	19,98	18,85	24,84	25,62	$4,94 \cdot 10^2$
$G \cdot T(w) \leftrightarrow G^* \cdot T(WC)$	-1,69	-2,46	17,04	16,37	18,73	18,83	8,83
$A \cdot A(w) \leftrightarrow A^* \cdot A(WC)$	4,18	1,64	26,89	23,59	22,71	21,94	$4,39 \cdot 10^4$
$G \cdot G^*(WC) \leftrightarrow G^* \cdot G^*(w)$	5,00	7,14	13,94	15,17	8,94	8,03	$3,98 \cdot 10^{-6}$
$A \cdot G(WC) \leftrightarrow A \cdot G^*_{\downarrow}(w)$	3,76	6,19	17,01	17,07	13,25	10,88	$5,31 \cdot 10^{-3}$
$A \cdot G(WC) \leftrightarrow A^* \cdot G_{\uparrow}(w)$	14,29	14,09	25,29	24,39	11,00	10,30	$1,21 \cdot 10^{-4}$
$T \cdot T(w) \leftrightarrow T \cdot T^*(WC)$	8,98	8,64	31,06	31,90	22,09	23,26	$1,65 \cdot 10^4$
$C \cdot C(w) \leftrightarrow C \cdot C^*(WC)$	-8,90	-10,73	25,38	24,32	34,28	35,05	$4,35 \cdot 10^6$
$C \cdot T(WC) \leftrightarrow C^* \cdot T_{\uparrow}(w)$	0,56	0,55	17,05	17,36	16,48	16,81	$6,76 \cdot 10^{-7}$
$C \cdot T(WC) \leftrightarrow C \cdot T^*_{\downarrow}(w)$	12,07	14,57	26,64	25,32	14,57	10,75	$5,38 \cdot 10^{-2}$

Див. позначення у Табл. 2. ^aЧас, за який досягається 99,9% рівноважної концентрації реагенту та продукту реакції таутомеризації, с.

таки, здатність пари із Вотсон-Криківською геометрією за участю мутагенного таутомера переходити у вобл-пару дозволяє елімінувати мутагенні таутомери основ ДНК із геному репараційними системами за кілька циклів реплікації ДНК.

Шостий розділ дисертації присвячено вивченню фізико-хімічних властивостей міжмолекулярних Н-зв'язків $CN \cdots O/N$ у парах за участю канонічних та модифікованих основ ДНК та РНК та встановленню їхньої ролі у спонтанному точковому мутагенезі.

Відомо, що водневі зв'язки, як класичні, так і слабкі, неканонічні, відіграють вирішальну роль у функціонуванні живого на всіх ієрархічних рівнях його організації. Так, зокрема, встановлено, що неканонічні Н-зв'язки, у яких донором зв'язування виступають групи CN , беруть участь у підтриманні просторової структури білків (Scheiner, 2015), білково-нуклеїнових комплексів (Mandel-Gutfreund et al., 1998) та НК (Hermann et al., 1999; Mandel-Gutfreund et al., 1999), зокрема ДНК (Yurenko et al., 2007, 2011). У останньому випадку найгірше ці зв'язки досліджено у парах нуклеотидних основ – принаймні саме у цій царині знань маємо найбільш літературну інформацію.

Використовуючи найширший арсенал квантово-хімічних підходів, зокрема – квантову теорію Бейдера “Атомів у Молекулах”, аналіз природних зв'язувальних орбіталей (Natural Bond Orbital (NBO) analysis), формалізм сталих гнучкості Грюненберга, геометричний та коливальний аналіз, – нами вперше із множини експеримен-

тально спостережуваних пар нуклеотидних основ, до складу яких входять як канонічні, так і модифіковані нуклеотидні основи, виокремлено 75 структур із міжмолекулярними Н-зв'язками $\text{CH}\cdots\text{O}/\text{N}$. Всього досліджено 38 Н-зв'язків $\text{CH}\cdots\text{O}/\text{N}$ (25 $\text{CH}\cdots\text{O}$ та 13 $\text{CH}\cdots\text{N}$) у 36 парах, які містять канонічні основи, та 41 Н-зв'язок $\text{CH}\cdots\text{O}/\text{N}$ (34 $\text{CH}\cdots\text{O}$ та 7 $\text{CH}\cdots\text{N}$) у 39 парах, до складу яких входять модифіковані основи (Рис. 11). При цьому отримано такі узагальнені результати:

- Встановлено, що усі досліджені специфічні контакти $\text{CH}\cdots\text{O}$ та $\text{CH}\cdots\text{N}$ є Н-зв'язками, оскільки вони задовольняють усім критеріям Н-зв'язування.
- Виявлено дві пари основ ($\text{A}\cdot\text{U}$ та $\text{U}\cdot\text{U}$), які стабілізуються неklasичними Н-зв'язками $\text{CH}\cdots\text{O}/\text{N}$: їхній внесок у енергію стабілізації пар складає $54\div 72\%$.
- Показано, що класичне правило зсуву коливальних частот $\nu(\text{CH})$ при Н-зв'язуванні $\text{CH}\cdots\text{O}/\text{N}$ не спрацьовує у 95% випадках.
- Встановлено, що найнадійнішими коливальними критеріями Н-зв'язування є зростання частоти неплосинних коливань $\gamma(\text{CH})$ та відповідні зміни їхніх інтенсивностей в інфрачервоних спектрах поглинання.
- Показано, що як за своїм фізико-хімічним сенсом, так і за найвищим ступенем

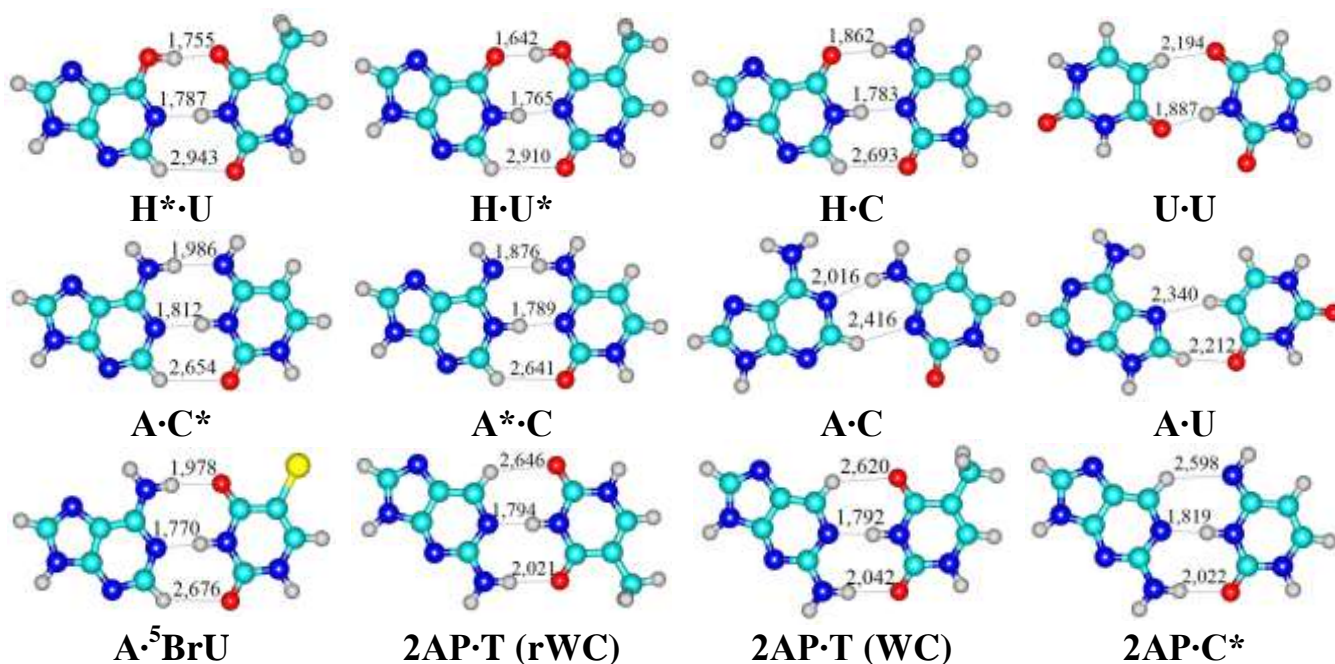


Рис. 11. Геометричні структури деяких пар, що містять канонічні та модифіковані основи ДНК та РНК, які підтримуються за участю слабких Н-зв'язків $\text{CH}\cdots\text{O}/\text{N}$ (рівень теорії $\text{MP2}/6\text{-}31\text{G}(\text{d},\text{p})$, $\epsilon=1$).

кореляції із енергією Н-зв'язування, найнадійнішими дескрипторами Н-зв'язків $\text{CH}\cdots\text{O}/\text{N}$ є електронна густина ρ у відповідній критичній точці та енергія взаємодії відповідних орбіталей $E^{(2)}$: $E_{\text{CH}\cdots\text{O}}=260,7\cdot\rho - 0,4$ / $E_{\text{CH}\cdots\text{N}}=251,2\cdot\rho - 0,5$ та $E_{\text{CH}\cdots\text{O}}=0,594\cdot E^{(2)} - 0,608$ / $E_{\text{CH}\cdots\text{N}}=0,336\cdot E^{(2)} - 1,128$.

- Енергія Н-зв'язків $\text{CH}\cdots\text{O}/\text{N}$ у досліджених парах лежить у межах $0,43\div 4,10$ ккал·моль⁻¹.
- Визначено, що у переважній більшості випадків внесок енергії Н-зв'язків $\text{CH}\cdots\text{O}/\text{N}$ у енергію взаємодії між мономерами у комплексах варіюється від ~ 4 до $\sim 45\%$.

- Показано, що Н-зв'язки $\text{CH}\cdots\text{O}$ та $\text{CH}\cdots\text{N}$ мають близькі фізико-хімічні властивості, відрізняючись лише тим, що останні, у середньому, дещо міцніші і коротші, ніж перші.
- Висунуто та обґрунтовано гіпотези щодо біологічної значущості Н-зв'язків $\text{CH}\cdots\text{O}/\text{N}$ у процесах спонтанного точкового мутагенезу: вони забезпечують структурну та динамічну подібність неправильних пар основ із Вотсон-Криківською геометрією до канонічних, що полегшує їхню ензиматичну інкорпорацію при синтезі ДНК, та відіграють роль “останньої краплі” при передачі електронного сигналу, що забезпечує хімічну інкорпорацію вхідного нуклеозидтрифосфату в ДНК, що синтезується.

Структурно-енергетичні властивості чотирьох конфігурацій пар основ ДНК А·Т і G·C. Показано, що Вотсон-Криківська пара основ ДНК А·Т, як і Льовдінівська пара основ $\text{G}^*\cdot\text{C}^*(\text{L})$, може набувати чотирьох біологічно важливих конфігурацій, а саме – Вотсон-Криківської (WC) / Льовдінівської (L), оберненої Вотсон-Криківської (rWC) / оберненої Льовдінівської (rL), Хугстинівської (H) і оберненої Хугстинівської (rH) (Рис. 12). Продемонстровано, що всі ці конфігурації пар основ ДНК є ізоелектронними та ізоморфними структурами із близькими динамічними властивостями, та виявлено, що у їхній стабілізації беруть участь Н-зв'язки $\text{CH}\cdots\text{O}/\text{N}$.

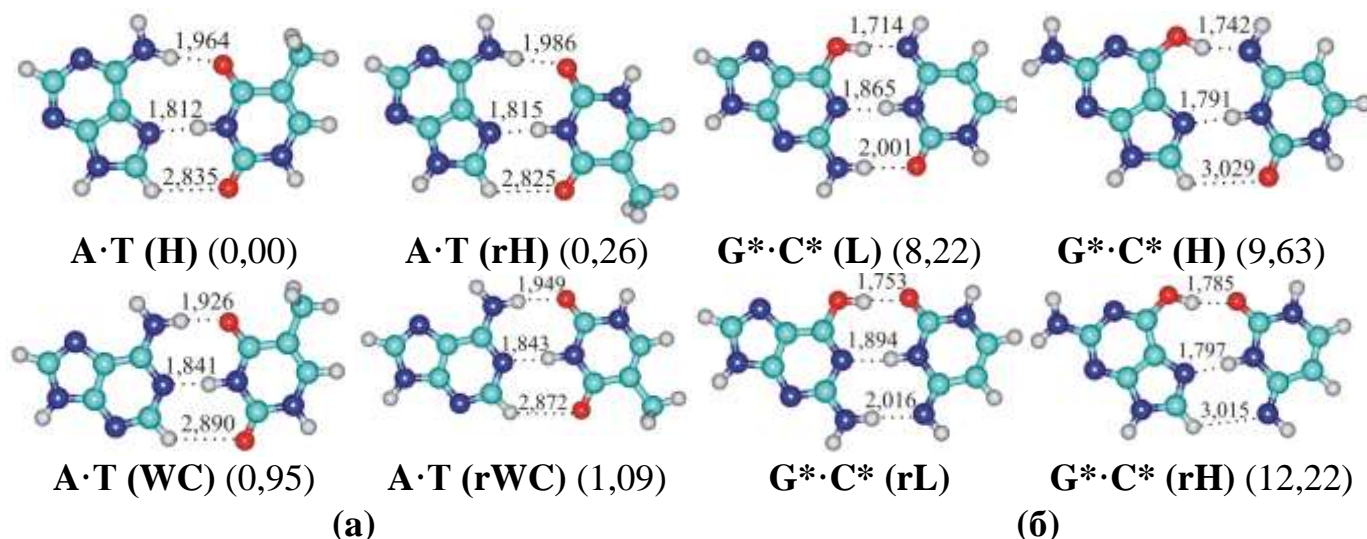


Рис. 12. Геометрична будова чотирьох біологічно важливих конфігурацій, яких здатні набувати канонічні пари основ ДНК **(а)** А·Т та **(б)** G*·C*, отримані на рівні теорії V3LYP/6-311++G(d,p) у ізольованому стані. Біля кожної структури у дужках вказано її відносну енергію Гіббса у ккал/моль за стандартних умов, визначену на рівні теорії MP2/6-311++G(2df,pd)//V3LYP/6-311++G(d,p).

Підтвердження гіпотези Вахтерсхаузера про еволюційне походження комплементарних пар основ ДНК. Вперше отримано квантово-хімічні докази, що підтверджують гіпотезу про еволюційне походження комплементарних пар основ ДНК (Wächtershäuser, 1988). Показано, що Н-зв'язані пари – еволюційні попередники Вотсон-Криківських пар основ ДНК – є, з одного боку, ізоморфними та ізоелектронними структурами, а з іншого – вони ізоморфні та ізоелектронні Вотсон-Криківським парам (Рис. 13). Більше того, усі чотири пари мають близькі динамічні властивості, причому еволюційні аналоги Вотсон-Криківських пар, у яких вперше зафіксовано

Н-зв'язки $\text{CH}\cdots\text{O}/\text{N}$, можуть набувати усіх чотирьох конфігурацій, характерних для Вотсон-Криківських пар основ ДНК (Рис. 12).

У цьому розділі дисертації вивчено внутрішньомолекулярну таутомеризацію та конформаційну мінливість деяких класичних мутагенів – похідних пуринових основ ДНК та цитозину.

Неодмінною запорукою встановлення елементарних механізмів дії мутагенів – похідних нуклеотидних основ – є наявність вичерпної структурної інформації про їхні конформаційні властивості. Нині навіть для класичних мутагенів, які десятки років використовують у молекулярно-біологічних експериментах, такі дані у повному обсязі у літературі не представлені. Нами вперше досліджено конформаційне різноманіття, включаючи структурну нежорсткість та фізико-хімічні механізми внутрішньомолекулярної таутомеризації, низки класичних мутагенів, що є похідними пуринових нуклеотидних основ: 2-амінопурин (2AP), 2,6-діамінопурин (2,6-DAP), гідроксиамінопурин (HAP) і тіогуанін (^6SG) та цитозину (6-(2-деокси- β -D-рибофуранозил)-3,4-дигідро-6Н,8Н-піримідо[4,5-с][1,2]оксазин-7-он (P), N4-аміноцитозин (^4amC), N4-метоксицитозин (^4moC), N4-гідроксицитозин (^4hoC) і N4-метилцитозин (^4meC) (Табл. 7, Рис. 14).

Вперше встановлено, що на досліджені молекули формально поширюється таутомерна гіпотеза Вотсона-Крика, оскільки час життя їхніх мутагенних таутомерів набагато перевищує характерний час, який витрачає реплікативна машинерія на інкорпорацію однієї пари нуклеотидів в ДНК, що синтезується. Можна очікувати, що саме в рамках цієї гіпотези вдасться адекватно пояснити механізми мутагенної дії ^6SG , ^4amC , ^4moC , P та ^4hoC – саме ці мутагени мають енергетично вигіднішу імінну таутомерну форму, аніж амінну. Цілком логічно пов'язати мутагенні властивості ^6SG , DAP, HAP, ^4amC , ^4meC , ^4moC та ^4hoC із їхньою полегшеною здатністю у порівнянні з канонічними основами G, A та C, відповідно, переходити у мутагенну таутомерну форму. Водночас для 2AP і P треба шукати пояснення їхньої мутагенної

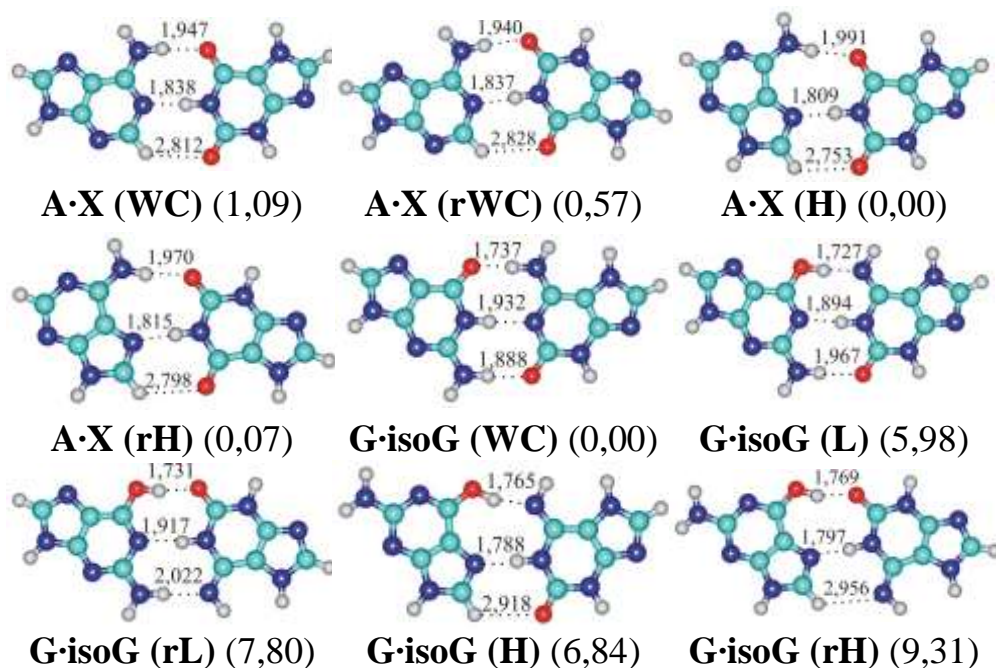


Рис. 13. Геометричні структури чотирьох можливих конфігурацій, які можуть набувати пари основ А·Х (верхній ряд) і G·isoG – (нижній ряд) – еволюційні попередники Вотсон-Криківських пар основ ДНК А·Т і G·С відповідно. Біля кожної пари у дужках наведено її відносну енергію Гіббса за нормальних умов, визначену на рівні теорії MP2/6-311++G(2df,pd)//B3LYP/6-311++G(d,p) у вільному стані. Х – ксантин, isoG – ізогуанін.

Таблиця 7. Основні енергетичні та кінетичні характеристики внутрішньомолекулярної гаутомеризації досліджених мутагенів – похідних пуринових основ та цитозину.

Аміно-імінне/кетонольне таутомерне перетворення	ΔG	$\Delta\Delta G_{TS}$	$\Delta\Delta G$	τ
$G \rightarrow G^*$	0,13	32,17	32,04	$6,38 \cdot 10^{10}$
${}^6SG \rightarrow {}^6SG^*$	-3,68	22,95	26,62	$1,09 \cdot 10^4$
$A \rightarrow A^*$	14,00	45,58	31,58	$4,36 \cdot 10^{20}$
$2AP \rightarrow 2AP^*$	21,74	46,46	24,73	$1,94 \cdot 10^{21}$
$DAP \rightarrow DAP^*$	14,79	44,96	30,16	$1,52 \cdot 10^{20}$
$HAP \rightarrow HAP^*$	6,79	43,26	36,47	$8,64 \cdot 10^{18}$
$C \rightarrow C^*$	2,18	38,59	36,41	$6,78 \cdot 10^{14}$
${}^4amC \rightarrow {}^4amC^*$	-0,94	35,49	36,43	$1,74 \cdot 10^{13}$
${}^4meC \rightarrow {}^4meC^*$	1,34	35,45	34,11	$1,61 \cdot 10^{13}$
${}^4moC \rightarrow {}^4moC^*$	-7,18	35,44	42,62	$1,58 \cdot 10^{13}$
$P \rightarrow P^*$	-5,97	39,74	45,71	$2,27 \cdot 10^{16}$
${}^4hoC \rightarrow {}^4hoC^*$	-7,16	35,97	43,13	$3,88 \cdot 10^{13}$

Див. позначення у Табл. 2.

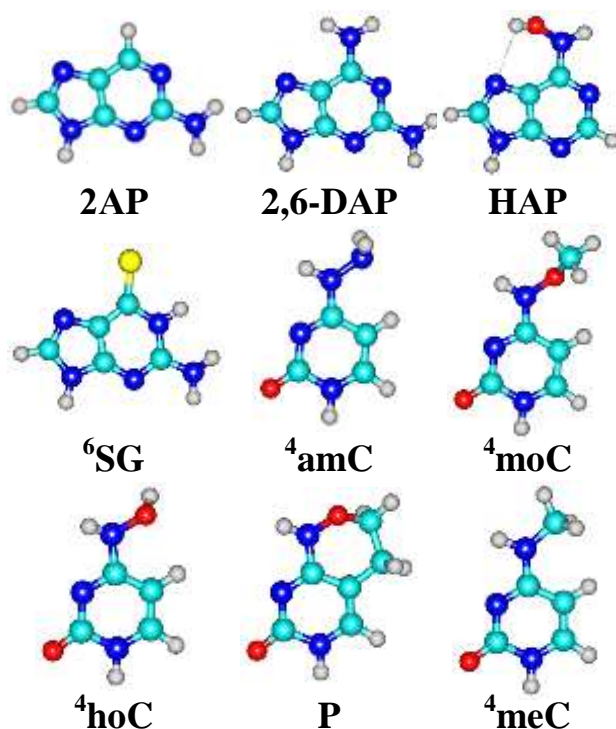


Рис. 14. Геометричні структури досліджених мутагенів – похідних пуринових нуклеотидних основ та цитозину.

активності за межами таутомерної гіпотези у класичному її розумінні, оскільки вони у порівнянні з А та С, відповідно, мають значно гіршу здатність переходити у мутагенну таутомерну форму.

ВИСНОВКИ

У роботі вперше встановлено елементарні мікроструктурні механізми, які визначають молекулярну логіку спонтанного точкового мутагенезу – виникнення та закріплення помилок включення і реплікації при біосинтезі ДНК, та зроблено підсумовуючий висновок про те, що спонтанні точкові мутації еволюційно запрограмовані у електронній будові канонічних основ ДНК і є відтак невідворотними.

1. Вперше виокремлено повну множину неправильних пар нуклеотидних основ – $A \cdot C^*/C^* \cdot A$, $G^* \cdot T/T \cdot G^*$, $G \cdot A_{syn}$, $A^* \cdot G^*_{syn}$, $A^* \cdot A_{syn}$, $G \cdot G^*_{syn}$, $C \cdot T/T \cdot C$, $C \cdot C^*$ і $T \cdot T^*$, – які набуваючи у кишені впізнавання високоточної ДНК-полімерази ензиматично-компетентної конформації, інкорпуються у структуру ДНК під час її біосинтезу. Показано, що ця сукупність пар основ ДНК є спільною як для помилок включення, так і помилок реплікації. Детально вивчено їхні структурно-енергетичні властивості, зокрема механізми набуття неправильними парами основ ензиматично-компетентної конформації.

2. Вперше показано, що неправильні пари нуклеотидних основ $G \cdot A/A \cdot G$, $G \cdot G^*$ і $A \cdot A^*$ є спільними інтермедіатами виникнення відповідних помилок реплікації та включення. З'ясовано конформаційні механізми набуття цими парами ензиматично-компетентної конформації.

3. Вперше вивчено механізми таутомеризації пар $A \cdot C^* \leftrightarrow A^* \cdot C$ і $G^* \cdot T \leftrightarrow G \cdot T^*$, що мають геометрію, подібну до Вотсон-Криківської, подвійним перенесенням прото-

нів вздовж сусідніх міжмолекулярних Н-зв'язків. Доведено, що короткоживучі, слабкозаселені пари $A^* \cdot C$ і $G \cdot T^*$ є “постачальниками” довгоживучих ензиматично-компетентних пар $A \cdot C^*$ і $G^* \cdot T$ при виникненні помилок реплікації ДНК.

Порівнянням розрахункових даних із результатами рентгеноструктурного аналізу вперше показано, що неправильні пари основ з Вотсон-Криківською геометрією $A \cdot C$ і $G \cdot T$ знаходяться у активному центрі високоточної ДНК-полімерази у її закритому стані у таутомерних формах $A \cdot C^*$ і $G^* \cdot T$, які відповідають глобальному мінімумові вільної енергії.

4. Вперше досліджено фізико-хімічні механізми таутомеризації подвійним перенесенням протонів вздовж сусідніх міжмолекулярних Н-зв'язків неправильних пар основ ДНК, які спричиняють виникнення спонтанних точкових помилок включення і реплікації. Показано, що їхня примусова дисоціація реплікативною машинерією на мономери відбувається без зміни таутомерного статусу останніх. У випадку симетричних пар $T \cdot T^*/T^* \cdot T$, $C \cdot C^*/C^* \cdot C$, $A \cdot A^*/A^* \cdot A$ і $G \cdot G^*/G^* \cdot G$ мутагенні таутомери основ розподіляються при цьому між обома мономерами із однаковою імовірністю.

5. Вперше показано, що класичний механізм Льовдіна не забезпечує мутагенної таутомеризації Вотсон-Криківських та вобл-пар основ ДНК подвійним перенесенням протонів вздовж сусідніх Н-зв'язків – причиною цього є динамічна нестійкість таутомеризованих пар.

Доведено, що із тієї ж самої причини ДНК-зв'язувальні білки, взаємодіючи карбоксильними групами відповідних амінокислотних залишків із основами ДНК, не переводять останні у мутагенні таутомерні форми подвійним перенесенням протону вздовж сусідніх Н-зв'язків.

6. Вперше виявлено нову, принципово важливу для розуміння природи спонтанного точкового мутагенезу фізико-хімічну властивість пар нуклеотидних основ із вобл- та Вотсон-Криківською геометрією взаємно перетворюватися внутрішньопарним перенесенням протонів, яка дозволяє зрозуміти, з одного боку, у який спосіб неправильні пари основ ДНК набувають ензиматично-компетентної конформації безпосередньо у гідрофобній кишені впізнавання високоточної ДНК-полімерази, а з іншого – механізм мутагенної таутомеризації Вотсон-Криківських пар основ ДНК $A \cdot T$ і $G \cdot C$. Вперше показано, що цей біологічно важливий процес є кінетично контрольованим, відбувається без розриву пар та без прямої участі молекул води, контролюється високостабільним перехідним станом, що є тісною іонною парою типу (протонована основа)·(депротонована основа), і підтримується патернами специфічних міжмолекулярних взаємодій, що включають Н-зв'язки $AH \cdots B$, розрихлені хімічні зв'язки $A-H-B$ та у деяких випадках притягувальні Ван-дер-Ваальсівські контакти $A \cdots B$, які послідовно змінюють один одного вздовж внутрішньої координати реакції (ВКР) таутомеризації.

Вперше запропоновано мікроструктурний сценарій зародження і закріплення усіх без винятку спонтанних точкових помилок включення і реплікації. Числові оцінки імовірності цих процесів узгоджуються із експериментальними даними, що вказує на адекватність запропонованих модельних уявлень.

7. Вперше створено внутрішньонепротиречиву, логічно замкнуту теорію спонтанного точкового мутагенезу. У її рамках вперше з'ясовано мікроструктурні механізми мутагенної дії класичних мутагенів – галоген-похідних урацилу, 2-амінопурину та

деяких похідних цитозину – підвищувати у порівнянні із канонічними основами імовірність виникнення помилок включення і реплікації, який полягає у зниженні прямого бар'єру таутомеризації вобл-пар у Вотсон-Криківські пари, які містять мутагени, та/або підвищенні заселеності їхніх таутомеризованих станів.

8. Вперше розроблено методику, яка дозволяє відслідкувати еволюцію усіх фізико-хімічних параметрів, що характеризують таутомеризацію будь-яких Н-зв'язаних комплексів, вздовж ВКР. Вперше введено поняття про ключові точки, що характеризують перебіг цих процесів, які використано для вичерпного аналізу останніх. Вперше доведено, що незалежно від природи процесу таутомеризації (супроводжується він суттєвою зміною геометрії комплексу, що таутомеризується, чи ні) екстремуми першої похідної від електронної енергії за ВКР збігаються із ключовими точками (другою і передостанньою), у яких зануляється лапласіан електронної густини у відповідних критичних точках водневих містків, вздовж яких мігрують протони.

9. Вперше показано, що гіпоксантин утворює Н-зв'язані комплекси із усіма канонічними основами ДНК і РНК, геометрія яких близька до Вотсон-Криківської: це важливо для розуміння природи помилок спарювання, які трапляються під час кодон-антикодонових взаємодій.

10. Вперше із множини експериментально спостережених Н-зв'язаних пар нуклеотидних основ, до складу яких входять як канонічні, так і модифіковані нуклеотидні основи, вперше виокремлено, спираючись на геометричні критерії Н-зв'язування, структури з міжмолекулярними контактами $\text{C}\text{H}\cdots\text{O}/\text{N}$. Використовуючи найширший арсенал квантово-хімічних підходів доведено, що вони задовольняють усім загальноприйнятим критеріям Н-зв'язування: визначено основні фізико-хімічні характеристики Н-зв'язків $\text{C}\text{H}\cdots\text{O}/\text{N}$, показано, що найнадійнішими їхніми дескрипторами є значення електронної густини у відповідній критичній точці та енергія взаємодії природних зв'язувальних орбіталей. Висунуто та обґрунтовано гіпотези щодо біологічної значущості цих Н-зв'язків у процесах спонтанного точкового мутагенезу.

11. Вперше проведено вичерпний конформаційний аналіз класичних мутагенів – похідних цитозину, аденіну та гуаніну. Визначено основні структурно-енергетичні характеристики конформерів та динамічні параметри конформаційних переходів. Показано, що далеко не завжди енергетично найвигідніша конформація мутагену є біологічно функціональною.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Розділ у міжнародній науковій монографії:

1. Brovarets' O.O. Elementary molecular mechanisms of the spontaneous point mutations in DNA: a novel quantum-chemical insight into the classical understanding / O.O. Brovarets', I.M. Kolomiets', D.M. Hovorun // *Quantum Chemistry – Molecules for Innovations* / Ed. by Tomofumi Tada. – Rijeka: In Tech Open Access Publishing, 2012. – P. 59-102.

Статті у фахових вітчизняних та міжнародних наукових журналах:

2. Brovarets' O.O. New structural hypostasis of the A·T and G·C Watson-Crick DNA base pairs caused by their mutagenic tautomerisation in a wobble manner: a QM/QTAIM prediction / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // *RSC Advances (Communication)*. – 2015. – DOI: 10.1039/C5RA19971A.

3. Brovarets' O.O. Proton tunneling in the A·T Watson-Crick DNA base pair: myth or reality? / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics (Communication)*. – 2015. – DOI: 10.1080/07391102.2015.1092886.

4. Brovarets' O.O. By how many tautomerisation routes the Watson-Crick-like A·C* DNA base mispair is linked with the wobble mismatches? A QM/QTAIM vision from a biological point of view / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // *Structural Chemistry*. – 2015. – DOI: 10.1007/s11224-015-0687-4.

5. Brovarets' O.O. Wobble↔Watson-Crick tautomeric transitions in the homo-purine DNA mismatches: a key to the intimate mechanisms of the spontaneous transversions / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. – 2015. – DOI: 10.1080/07391102.2015.1077737.

6. Brovarets' O.O. Novel physico-chemical mechanism of the mutagenic tautomerisation of the Watson-Crick-like A·G and C·T DNA base mispairs: a quantum-chemical picture / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // *RSC Advances*. – 2015. – V. 5, N 81. – P. 66318-66333.

7. Brovarets' O.O. A novel conception for spontaneous transversions caused by homopyrimidine DNA mismatches: a QM/QTAIM highlight / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // *Physical Chemistry Chemical Physics (Communication)*. – 2015. – V. 17, N 33. – P. 21381-21388.

8. Brovarets' O.O. How do long improper purine-purine pairs of DNA bases adapt the enzymatically competent conformation? Structural mechanism and its quantum-mechanical grounds / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // *Ukrainian Journal of Physics (Special Issue devoted to Acad. L.A. Bulavin)*. – 2015. – V. 60, N 8. – P. 748-756.

9. Brovarets' O.O. Tautomeric transition between wobble A·C DNA base mispair and Watson-Crick-like A·C* mismatch: microstructural mechanism and biological significance / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // *Physical Chemistry Chemical Physics (Communication)*. – 2015. – V. 17, N 23. – P. 15103-15110.

10. Brovarets' O.O. How many tautomerisation pathways connect Watson-Crick-like G*·T DNA base mispair and wobble mismatches? / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. – 2015. – V. 33, N 11. – P. 2297-2315.

11. Brovarets' O.O. The significant role of the intermolecular CH \cdots O/N hydrogen bonds in governing the biologically important pairs of the DNA and RNA modified bases: a comprehensive theoretical investigation / O.O. Brovarets', Ye.P. Yurenko, D.M. Hovorun // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. – 2015. – V. 33, N 8. – P. 1624-1652.
12. Brovarets' O.O. The nature of the transition mismatches with Watson-Crick architecture: the G \cdot T or G \cdot T* DNA base mispair or both? A QM/QTAIM perspective for the biological problem / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. – 2015. – V. 33, N 5. – P. 925-945.
13. Brovarets' O.O. DPT tautomerisation of the wobble guanine \cdot thymine DNA base mispair is not mutagenic: QM and QTAIM arguments / O.O. Brovarets', R.O. Zhurakivsky, D.M. Hovorun // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. – 2015. – V. 33, N 3. – P. 674-689.
14. Brovarets' O.O. The physicochemical essence of the purine \cdot pyrimidine transition mismatches with Watson-Crick geometry in DNA: A \cdot C* *versa* A* \cdot C. A QM and QTAIM atomistic understanding / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. – 2015. – V. 33, N 1. – P. 28-55.
15. Brovarets' O.O. Why the tautomerization of the G \cdot C Watson-Crick base pair *via* the DPT does not cause point mutations during DNA replication? QM and QTAIM comprehensive analysis / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. – 2014. – V. 32, N 9. – P. 1474-1499.
16. Brovarets' O.O. How does the long G \cdot G* Watson-Crick DNA base mispair comprising keto and enol tautomers of the guanine tautomerises? The results of the QM/QTAIM investigation / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2014. – V. 16, N 30. – P. 15886-15899.
17. Brovarets' O.O. A QM/QTAIM microstructural analysis of the tautomerisation *via* the DPT of the hypoxanthine \cdot adenine nucleobase pair / O.O. Brovarets', R.O. Zhurakivsky, D.M. Hovorun // *Molecular Physics*. – 2014. – V. 112, N 15. – P. 2005-2016.
18. Brovarets' O.O. Intermolecular CH \cdots O/N H-bonds in the biologically important pairs of natural nucleobases: a thorough quantum-chemical study / O.O. Brovarets', Ye.P. Yurenko, D.M. Hovorun // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. – 2014. – V. 32, N 6. – P. 993-1052.
19. Brovarets' O.O. DPT tautomerisation of the G \cdot A_{syn} and A* \cdot G*_{syn} DNA mismatches: a QM/QTAIM combined atomistic investigation / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2014. – V. 16, N 19. – P. 9074-9085.
20. Brovarets' O.O. Is the DPT tautomerisation of the long A \cdot G Watson-Crick DNA base mispair a source of the adenine and guanine mutagenic tautomers? A QM and QTAIM response to the biologically important question / O.O. Brovarets', R.O. Zhurakivsky, D.M. Hovorun // *Journal of Computational Chemistry*. – 2014. – V. 35, N 6. – P. 451-466.
21. Brovarets' O.O. Does the tautomeric status of the adenine bases change under the dissociation of the A* \cdot A_{syn} Topal-Fresco DNA mismatch? A combined QM and QTAIM atomistic insight / O.O. Brovarets', R.O. Zhurakivsky, D.M. Hovorun // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2014. – V. 16, N 8. – P. 3715-3725.
22. Brovarets' O.O. Structural, energetic and tautomeric properties of the T \cdot T*/T* \cdot T DNA mismatch with *cis*-oriented glycosidic bonds involving mutagenic tautomer of thymine: a

QM and QTAIM insight / O.O. Brovarets', R.O. Zhurakivsky, D.M. Hovorun // Chemical Physics Letters. – 2014. – V. 592. – P. 247-255.

23. Brovarets' O.O. Can tautomerisation of the A·T Watson-Crick base pair *via* double proton transfer provoke point mutations during DNA replication? A comprehensive QM and QTAIM analysis / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. – 2014. – V. 32, N 1. – P. 127-157.

24. Brovarets' O.O. Does the G·G*_{syn} DNA mismatch containing canonical and rare tautomers of the guanine tautomerise through the DPT? A QM/QTAIM microstructural study / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Molecular Physics. – 2014. – V. 112, N 23. – P. 3033-3046.

25. Броварець О.О. Молекулярна логіка спонтанного точкового мутагенезу: варіація на тему ... / О.О. Броварець, Д.М. Говорун // Ukrainica Bioorganica Acta. – 2014. – Т. 12, № 1. – С. 48-55.

26. Brovarets' O.O. Atomistic nature of the DPT tautomerisation of the biologically important C·C* DNA base mispair containing amino and imino tautomers of cytosine: a QM and QTAIM approach / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2013. – V. 15, N 46. – P. 20091-20104.

27. Brovarets' O.O. Atomistic understanding of the C·T mismatched DNA base pair tautomerization *via* the DPT: QM and QTAIM computational approaches / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Journal of Computational Chemistry. – 2013. – V. 34, N 30. – P. 2577-2590.

28. Brovarets' O.O. The physico-chemical mechanism of the tautomerisation *via* the DPT of the long Hyp*·Hyp Watson-Crick base pair containing rare tautomer: a QM and QTAIM detailed look / O.O. Brovarets', R.O. Zhurakivsky, D.M. Hovorun // Chemical Physics Letters. – 2013. – V. 34, N 30. – P. 126-132.

29. Brovarets' O.O. DPT tautomerization of the long A·A* Watson-Crick base pair formed by the amino and imino tautomers of adenine: combined QM and QTAIM investigation / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Journal of Molecular Modeling. – 2013. – V. 19, N 10. – P. 4223-4237.

30. Brovarets' O.O. The physico-chemical "anatomy" of the tautomerisation through the DPT of the biologically important pairs of hypoxanthine with DNA bases: QM and QTAIM perspectives / O.O. Brovarets', R.O. Zhurakivsky, D.M. Hovorun // Journal of Molecular Modeling. – 2013. – V. 19, N 10. – P. 4119-4137.

31. Броварець О.О. Вплив модифікації урацилу на бар'єр таутомеризації зміщеної пари Gua·⁵XUra у парі з Вотсон-Криківською геометрією Gua*·⁵XUra: квантово-хімічне дослідження / О.О. Броварець // Доповіді НАН України. – 2013. – № 4. – С. 154-158.

32. Броварець О.О. Квантово-хімічне підтвердження гіпотези Вахтерсхаузера про еволюційне походження комплементарних пар основ ДНК / О.О. Броварець // Ukrainica Bioorganica Acta. – 2013. – Т. 11, № 1. – С. 3-8.

33. Броварець О.О. За яких умов Вотсон-Криківська пара основ ДНК G·C набуває всіх чотирьох конфігурацій, характерних для Вотсон-Криківської пари основ ДНК A·T? / О.О. Броварець // Український біохімічний журнал. – 2013. – V. 85, N 4. – P. 98-103.

34. Броварець О.О. Структурно-енергетичні властивості чотирьох конфігурацій пар основ ДНК А·Т і G·C / О.О. Броварець // Український біохімічний журнал. – 2013. – V. 85, N 4. – P. 104-110.
35. Brovarets' O.O. Prototropic tautomerism and basic molecular principles of hypoxanthine mutagenicity: an exhaustive quantum-chemical analysis / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. – 2013. – V. 31, N 8. – P. 913-936.
36. Can DNA-binding proteins of replisome tautomerize nucleotide bases? *Ab initio* model study / O.O. Brovarets', Ye.P. Yurenko, I.Ya. Dubey, D.M. Hovorun // Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. – 2012. – V. 29, N 6. – P. 1101–1109.
37. Brovarets' O.O. Mutagenic properties of 5-halogen derivatives of uracil: Quantum-chemical investigation / O.O. Brovarets' // Ukrainica Bioorganica Acta. – 2012. – V. 10, N 2. – P. 17-24.
38. Броварець О.О. Структурно-динамічні властивості піримідиново-піримідинових пар основ ДНК з *цис*-орієнтованими глікозидними зв'язками: квантово-хімічне дослідження / О.О. Броварець // Ukrainica Bioorganica Acta. – 2012. – Т. 10, № 2. – С. 39-46.
39. Brovarets' O.O. IR vibrational spectra of H-bonded complexes of adenine, 2-aminopurine and 2-aminopurine⁺ with cytosine and thymine: quantum-chemical study / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Optics and Spectroscopy. – 2011. – V. 111, N 5. – P. 750–757.
40. Броварець О.О. Внутрішньомолекулярна таутомеризація та конформаційна мінливість деяких класичних мутагенів – похідних цитозину: квантово-хімічне дослідження / О.О. Броварець, Д.М. Говорун // Biopolymers and Cell. – 2011. – V. 27, N 3. – P. 221–230.
41. Броварець О.О. Внутрішньомолекулярна таутомеризація та конформаційна мінливість деяких класичних мутагенів – похідних пуринових основ ДНК: квантово-хімічне дослідження / О.О. Броварець, Д.М. Говорун // Фізика живого. – 2010. – Т. 18, № 1. – С. 5-17.

Тези доповідей на українських та міжнародних наукових фахових конференціях:

42. Броварець О.О. Динамічна стабільність мутагенних таутомерів основ ДНК та неправильних пар з Вотсон-Кріківською геометрією: квантово-хімічне дослідження / О.О. Броварець, Д.М. Говорун // Матеріали XII Міжнародної конференції з біоніки і прикладної біофізики, м. Київ, Україна, 28-29 березня 2013 р. – Київ, 2013. – С. 82.
43. Brovarets' O.O. Can tautomerisation of the G·C Watson-Crick base pair through double proton transfer induce point mutations during DNA replication? Exhausting QM and QTAIM analysis / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Materials of IX International Science-Technical Conference «Modern Trends in Biological Physics and Chemistry», Sevastopol, Ukraine, April 22-26, 2013. – Sevastopol, 2013. – P. 62-63.
44. Brovarets' O.O. Structural and energetic properties of the four biologically important configurations of the A·T and G·C DNA base pairs: comparative quantum-chemical analysis / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Biopolymers and Cell. Materials of VII Annual Conference of Young Scientist of the Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of

Ukraine dedicated to 175 anniversary of O.Ya. Danylevsky, Kyiv, Ukraine, May 28-29, 2013. – Kyiv, 2013. – V. 29 (Special Issue). – P. 2.

45. Brovarets' O.O. Physico-chemical characteristics of the intermolecular CH \cdots O/N H-bonds in the biologically important pairs of natural nucleobases: quantum-chemical survey / O.O. Brovarets', Ye.P. Yurenko, D.M. Hovorun // Book of Abstracts of 5th International Symposium «Methods and Applications of Computational Chemistry», Kharkiv, Ukraine, July 1-5, 2013. – Kharkiv, 2013. – P. 147.

46. Brovarets' O.O. Prototropic tautomerism and elementary molecular mechanisms of hypoxanthine mutagenicity: quantum-chemical study / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Materials of VIII International Science-Technical Conference «Modern Trends in Biological Physics and Chemistry», Sevastopol, Ukraine, April 23-27, 2012. – Sevastopol, 2012. – P. 339.

47. Brovarets' O.O. Molecular mechanisms of DNA point mutations induced by the deamination of adenine: comprehensive quantum-chemical study / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Conference Information & Abstracts of the International Conference «Modeling & Design of Molecular Materials 2012», Wrocław, Poland, September 10-14, 2012. – Wrocław, 2012. – P. 48B.

48. Brovarets' O.O. Tautomerisation of the A·T Watson-Crick base pair *via* the double proton transfer as a possible source of point mutations in DNA: QM and QTAIM perspectives / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Materials of the International Scientific Conference «Actual Problems of Chemistry and Technology of Organic Substances», Lviv, Ukraine, November 6-8, 2012. – Lviv, 2012. – P. 46.

49. Brovarets' O.O. Origin of spontaneous and induced by the chemical mutagens point mutations and enzymatic control over them / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Biopolymers and Cell. 6th Annual Scientific Meeting of RECOOP HST Consortium «Bridges in Life Sciences», Bratislava, Slovak Republic, April 8-10, 2011. – Bratislava, 2011. – V. 27, N 2 (Supplementary). – P. 134.

50. Brovarets' O.O. Intramolecular tautomerization and stability of Thy, Ura and its halogen derivatives / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Materials of the International Youth Scientific Forum «Lomonosov-2011», Moscow, Russia, April 11-15, 2011. – Moscow, 2011. – P. 46.

51. Броварець О.О. Квантово-хімічна природа спонтанних трансверсій / О.О. Броварець, Д.М. Говорун // Матеріали VII Міжнародної науково-технічної конференції «Актуальні питання біологічної фізики та хімії», м. Севастополь, Крим, Україна, 26-30 квітня 2011 р. – Севастополь, 2011. – С. 157-159.

52. Броварець О.О. Квантово-хімічний скринінг мутагенів та антимутагенів ДНК / О.О. Броварець, Д.М. Говорун // Український науково-медичний молодіжний журнал. Спеціальний випуск № 4. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «YouthNanoBioTech-2011. Молодіжний форум з нанобіотехнологій», присвяченої 170-річчю кафедри фармакології та клінічної фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна, 25-26 травня 2011 р. – Київ, 2011. – С. 34-35.

53. Brovarets' O.O. Quantum-chemical investigation of the ionization mechanism of the spontaneous point mutations / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Abstracts of II Interna-

tional Conference For Young Scientists «Low Temperature Physics», Kharkiv, Ukraine, June 6-10, 2011. – Kharkiv, 2011. – P. 127.

54. Броварець О.О. Квантово-хімічне дослідження конформаційного різноманіття та внутрішньомолекулярної таутомеризації класичних мутагенів – похідних основ ДНК / О.О. Броварець, Д.М. Говорун // Тези V З'їзду Українського біофізичного товариства, м. Луцьк, Україна, 22-25 червня 2011 р. – Луцьк, 2011. – С. 29.

55. Brovarets' O.O. Conformational variety and intramolecular tautomerization of mutagenic base analogues: quantum-chemical study / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Book of Abstracts of the 4th International Symposium «Methods and Applications of Computational Chemistry», Lviv, Ukraine, June 28 - July 2, 2011. – Lviv, 2011. – P. 45.

56. Brovarets' O.O. Dynamic stability of tautomers of the DNA bases and mispairs with Watson-Crick geometry: quantum-chemical investigation / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Materials of the 14th International Conference on the Application of Density Functional Theory in Chemistry and Physics, Athens, Greece, August 29 - September 2, 2011. – Athens, 2011. – P. 16.

57. Brovarets' O.O. Theoretical and spectroscopic investigations of the tautomeric equilibrium of biologically important molecules within the framework of the continuum model of the environment / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Program and Book of Abstracts «Modeling Interactions in Biomolecules», Kutná Hora, Czech Republic, September 4-9, 2011. – Phara, 2011. – P. 15.

58. Brovarets' O.O. Quantum-chemical interpretation of the IR vibrational spectra of 2-aminopurine with cytosine and thymine / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Book of abstracts of the XX International School-Seminar of Galyna Puchkovska «Spectroscopy of molecules and crystals», Beregove, Crimea, Ukraine, September 20-27, 2011. – Beregove, 2011. – P. 299.

59. Brovarets' O.O. Self-association of m¹Ura as the model of the intramolecular RNA-RNA point contacts: comprehensive quantum-chemical analysis / O.O. Brovarets', D.M. Hovorun // Program & Abstracts of the International Conference «Multi-Pole Approach to Structural Biology», Warsaw, Poland, November 16-19, 2011. – Warsaw, 2011. – P. 148.

60. Броварець О.О. Елементарні молекулярні механізми виникнення трансверсій: квантово-хімічне дослідження / О.О. Броварець, Д.М. Говорун // Матеріали I Міжнародної конференції молодих вчених ССТ-2010 «Хімія та хімічні технології», м. Львів, Україна, 25–27 листопада 2010 р. – Львів, 2010. – С. 50–51.

АНОТАЦІЯ

Броварець О.О. Мікроструктурні механізми виникнення спонтанних точкових мутацій. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика (фізико-математичні науки). – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2015.

Дисертацію присвячено з'ясуванню мікроструктурних механізмів виникнення помилок включення і реплікації при біосинтезі ДНК. Вперше виявлено нову, принципово важливу для розуміння природи спонтанного та індукованого аналогами нуклеотидних основ точкового мутагенезу фізико-хімічну властивість пар основ із вобл- та Вотсон-Криківською геометрією взаємно перетворюватися внутрішньопарним перенесенням протонів, яка дозволяє зрозуміти, з одного боку, у який спосіб неправильні пари основ ДНК набувають ензиматично-компетентної конформації безпосередньо у гідрофобній кишені впізнавання високоточної реплікативної ДНК-полімерази, а з іншого – механізм мутагенної таутомеризації Вотсон-Криківських пар основ ДНК. Вперше показано, що цей процес відбувається без розриву пар та без прямої участі молекул води, контролюється високостабільним перехідним станом – тісною йонною парою – і підтримується патернами специфічних міжмолекулярних взаємодій, які послідовно змінюються вздовж внутрішньої координати реакції таутомеризації. Вперше створено внутрішньонепротиречиву, логічно замкнуту теорію спонтанного точкового мутагенезу. Зроблено висновок про те, що спонтанні точкові мутації еволюційно запрограмовані у електронній будові канонічних основ ДНК і є невідворотним процесом.

Ключові слова: спонтанний точковий мутагенез, помилки включення та реплікації, таутомеризація, пари нуклеотидних основ, ензиматично-компетентна конформація, водневий зв'язок, квантова хімія.

АННОТАЦИЯ

Броварец О.А. Микроструктурные механизмы возникновения спонтанных точечных мутаций. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 03.00.02 – биофизика (физико-математические науки). – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, 2015.

Диссертация посвящена выяснению микроструктурных механизмов возникновения ошибок включения и репликации при биосинтезе ДНК. Впервые обнаружено новое, принципиально важное для понимания природы спонтанного и индуцированного аналогами нуклеотидных оснований точечного мутагенеза физико-химическое свойство пар оснований с вобл- и Уотсон-Криковской геометрией взаимно превращаться внутривпарным переносом протонов, которое позволяет понять, с одной стороны, каким образом неправильные пары оснований ДНК приобретают энзиматически-компетентную конформацию непосредственно в гидрофобном кармане узнавания высокоточной реплікативной ДНК-полімерази, а с другой – механізм мутагенної таутомеризації Уотсон-Криковських пар оснований ДНК. Впервые показано,

что этот процесс происходит без разрыва пар и без прямого участия молекул воды, контролируется высокостабильным переходным состоянием – контактной ионной парой – и поддерживается паттернами специфических межмолекулярных взаимодействий, которые последовательно сменяют друг друга вдоль внутренней координаты реакции таутомеризации. Впервые создано внутренне непротиворечивую, логически замкнутую теорию спонтанного точечного мутагенеза. Сделан вывод о том, что спонтанные точечные мутации эволюционно запрограммированы в электронном строении канонических оснований ДНК и являются неизбежным процессом.

Ключевые слова: спонтанный точечный мутагенез, ошибки включения и репликации, таутомеризация, пары нуклеотидных оснований, ферментатически-компетентная конформация, водородная связь, квантовая химия.

SUMMARY

Brovarets' O.O. Microstructural mechanisms of the origin of the spontaneous point mutations. – Manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Sciences in Physics and Mathematics by the speciality 03.00.02 – biophysics (physico-mathematical sciences). – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, 2015.

This thesis is devoted to the elucidation of the microstructural mechanisms of the incorporation and replication errors arising at the DNA replication. For the first time we have outlined a full set of the 12 incorrect DNA base pairs representing a primary cause of the spontaneous point mutations and determining both incorporation and replication errors: $A \cdot C^*/C^* \cdot A$, $G^* \cdot T/T \cdot G^*$, $G \cdot A_{syn}$, $A^* \cdot G^*_{syn}$, $A^* \cdot A_{syn}$, $G \cdot G^*_{syn}$, $C \cdot T/T \cdot C$, $C^* \cdot C$ and $T^* \cdot T$. Exactly these mismatches, which quite easily acquire enzymatically competent conformations in the substantially hydrophobic pocket of the high-fidelity replication DNA-polymerase in the process of thermal fluctuations, should be experimentally observed in the closed conformation of the latter. Ultimately, we came to the conclusion that spontaneous point mutations are evolutionarily programmed in the electronic structure of the canonical DNA bases and are inevitable process.

Moreover, it was shown that hypoxanthine forms H-bonded complexes with canonical DNA and RNA bases, that is important for understanding of the nature of the errors that occur during codon-anticodon interactions.

For the first time it was investigated the physico-chemical mechanisms of the tautomerisation *via* the double proton transfer (DPT) along neighboring intermolecular H-bonds in the incorrect DNA base pairs, entailing spontaneous point incorporation and replication errors, and it was shown that their forced dissociation into the monomers by the replicative machinery occurs without changing of their tautomeric status. Tautomers of the DNA bases are distributed between the two DNA chains with nearly equal probability in the case of the $T \cdot T^*$, $C \cdot C^*$, $A \cdot A^*$ and $G \cdot G^*$ base mispairs.

Furthermore, it was found that Löwdin's mechanism also can't ensure mutagenic tautomerisation of the Watson-Crick and wobble DNA base pairs, as well as DNA bases involved in the model protein-nucleic acids contacts in view of the dynamical instability of the terminal tautomerised complexes.

It has been developed a novel methodology allowing to track the evolution of all physico-chemical parameters characterizing tautomerisation of any H-connected complexes along the internal reaction coordinate. For the first time it was introduced the conception of the key points to characterize the course of the tautomerisation reaction and to comprehensively analyze these processes.

The intrinsic capability of the purine·pyrimidine (A·T, G·C, G·T and A·C), purine·purine (A·A, A·G and G·G) and pyrimidine·pyrimidine (C·C, C·T and T·T) DNA base mispairs to perform wobble↔Watson-Crick tautomeric transitions *via* the sequential intrapair DPT was discovered for the first time, that are crucial for understanding of the microstructural mechanisms of the spontaneous transitions and transversions.

It was revealed that these non-dissociative tautomerisations *via* the sequential DPT are controlled by the highly stable and highly polar transition states as tight ion pairs like (protonated base)·(deprotonated base). These processes are accompanied by a significant rebuilding of the base mispairs with Watson-Crick architecture into the mismatches wobbled towards both minor and major DNA grooves and *vice versa*. Moreover, it was established that these tautomerisation reactions occur non-dissociatively and are accompanied by the consequent replacement along the intrinsic reaction coordinate of the unique patterns of the specific intermolecular interactions, including AH···B H-bonds, loosened A-H-B covalent bridges and, in some cases, attractive van der Waals contacts.

It was found out that all long purine·purine DNA base mispairs, playing the pivotal role of transversions at the DNA biosynthesis, are able to acquire enzymatically competent conformations through the $A^*·A(WC)→A^*·A_{syn}(TF)$, $G·A(WC)→G·A_{syn}$, $A^*·G^*(WC)→A^*·G^*_{syn}$ and $G·G^*(WC)→G·G^*_{syn}$ conformational transitions by adapting the geometry of the initial long mispairs to Watson-Crick architecture at the transition of the enzyme into its working conformation, that eventually guarantees their chemical incorporation into the structure of the DNA double helix that is synthesized.

Reported results are crucial for understanding of the microstructural mechanisms of the spontaneous transitions and transversions, since they allow us to explain in what way occurs the adaptation of the purine·pyrimidine, purine·purine and pyrimidine·pyrimidine wobble pairs to the enzymatically competent sizes in the hydrophobic recognition pocket of the high-fidelity DNA-polymerase. Numerical estimations of the frequencies of the transitions and transversions within their simplest microstructural models satisfactorily explain experimental data.

From the other side, presented here physico-chemical ability of the incorrect DNA base pairs to acquire wobble configuration let us postulate universal microstructural mechanism of the recognition and reparation from the genome of the mismatches with Watson-Crick architecture.

Created internally non-contradictable and logical theory of spontaneous point mutagenesis allows us to clarify microstructural mechanisms of the mutations induced by the classical mutagens – halogen-derivatives of uracil, 2-aminopurine and some cytosine derivatives. Thus, within the framework of this theory increased probability of the incorporation and replication errors arising is directly related to the decreasing of the forward barrier of the wobble→Watson-Crick tautomerisation reaction and/or increasing of the population of the tautomerised states containing mutagens.

For the first time, using the widest arsenal of the quantum-chemical approaches, it was analysed non-conventional CH \cdots O/N contacts found in the biologically important and experimentally observed H-bonded pairs including both canonical and modified nucleotide bases. Consequently, it was established that they satisfy all generally accepted criteria of the H-bonding and their most reliable descriptors are values of the electron density in the corresponding critical point and interaction energy of the natural bond orbitals.

Key words: spontaneous point mutagenesis, incorporation and replication errors, tautomerisation, pairs of nucleotide bases, enzymatically-competent conformation, hydrogen bond, quantum chemistry.