

В работе с данными категориями детей используются все методы обучения. Однако, учитывая особенности восприятия ими учебного материала, есть некоторые различия в приемах, которые изменяются в зависимости от физических возможностей ребенка, запаса знаний и умений, наличия предыдущего зрительного и двигательного опыта, навыка пространственной ориентировки.

До питання виникнення мутацій ДНК шляхом трансформації цитозин-урацил.

**Я.О. Дмитренко, ст. гр. 53 ПГФ
Л.К. Святенко, доц., канд. хім. наук**

Кіровоградський державний педагогічний університет ім. Володимира Винниченка

Змодельовано механізм лужного гідролітичного дезамінування цитозинового фрагменту ДНК. Встановлено механізм даного процесу.

Мутації або зміни нуклеотидної послідовності дезоксирибонуклеїнових кислот (ДНК) можуть виникнути кількома шляхами. Помилки можуть бути зроблені під час реплікації ДНК, що призводить до включення неправильної основи. Ці зміни можуть потім бути поширені за допомогою подальшої реплікації ДНК. Спонтанні мутації можуть виникати в результаті хімічних змін в окремих основах в ДНК. Однією з таких змін є хімічне перетворення цитозина в урацил, яке класифікується як реакція дезамінування. Встановлено, що гідролітичне дезамінування цитозинової основи ДНК є надзвичайно рідкісною подією за нормальних фізіологічних умов (40-100 дезамінувань в геномі людини за 1 день, рН 7,4), хоча швидкість дезамінування може бути значно збільшена в присутності різних реагентів таких як NO, HNO₂ і бісульфіт [1]. Вміст урацилу в ДНК є дуже серйозною проблемою. Клітини, однак, мають специфічний фермент ДНК урацил-N-глікозилаза для його видалення з ДНК. Утворений шляхом дезамінування цитозину урацил потенційно мутагенний. Зміна кодуєчої інформації під час реплікації ДНК і транскрипції РНК призводить до зміни пар основ в геномі [1].

Дезамінування цитозину і ряду його похідних були предметом багатьох експериментальних досліджень [2-3]. Федеріко і співр. змогли визначити константу швидкості дезамінування цитозину для подвійної спіралі ДНК за фізіологічних умов (37 °С і рН 7,4) використовуючи чутливий генетичний тест на мутанті бактеріофага [2]. Константа швидкості дорівнює $7 \cdot 10^{-13} \text{ c}^{-1}$, з енергією активації 27,96 ккал/моль. Оскільки ця реакція відбувається у слабо лужному середовищі, автори припустили, що вірогідність дезамінування збільшиться у разі атаки гідроксид-аніону на залишки цитозину. Теоретичне вивчення можливих механізмів дезамінування цитозину показало, що лужний каталіз гідролітичного дезамінування наближує розрахункові значення енергетики реакції до експериментальних значень [4]. Однак, дані дослідження проведені на молекулі цитозину, тоді як для достовірного відтворення реальних процесів у клітині, необхідно розглядати дану реакцію на фрагменті молекули ДНК. До того ж, незважаючи на ряд припущень, точний механізм перетворення цитозину в урацил невідомий. Тому метою нашої роботи є пошук механізму гідролітичного дезамінування цитозину шляхом моделювання даної реакції на прикладі В-форми цитозин-гуанінового декамера (CG декамера), як фрагмента молекули ДНК.

Моделювання реакцій за участю нуклеїнових кислот потребує адекватного урахування електростатичних взаємодій з навколишнім середовищем. Необхідною

умовою для формування подвійної спіралі ДНК є нейтралізація фосфатних груп остова макромолекули, які несуть на собі від'ємний заряд ($\sim 1 e$). В природних умовах цей заряд нейтралізується іонами лужних металів, найчастіше Na^+ . Приєднуючись до макромолекули, протиіони визначають структурні та динамічні властивості подвійної спіралі і тому відіграють важливу роль в механізмах біологічного функціонування ДНК. Результати експериментальних досліджень структури НК засвідчують, що протиіони можуть утворювати порівняно стійкі зв'язки із самою макромолекулою або брати участь у дифузному оточенні НК. У першому випадку утворюється металокомплекс, час життя якого становить 10^{-7} с, у другому – навколо спіралі ДНК з'являється іонна атмосфера, яка може простягатися навколо неї на сотні А. Ці іони зберігають гідратну оболонку і в процесі динамічної рівноваги вступають в електростатичну взаємодію з полііоном [5]. Молекулярна динаміка (МД) є одним з найбільш потужних розрахункових методів, які ефективно використовуються для моделювання біологічних систем. Методи МД дозволяють обчислювати класичні траєкторії окремих атомів і полімерних ланцюгів, досліджувати динаміку взаємодії частинок у конденсованих системах на молекулярному рівні.

Першим етапом дослідження був пошук найбільш стабільної конформації CG декамера у водному оточенні за допомогою метода МД, який дозволяє моделювати рух молекул у водному середовищі, імітуючи фізіологічні умови клітини. За фрагмент ДНК вибрано декамер, оскільки саме 10 пар основ становлять один виток подвійної спіралі біополімеру. Просторову структуру CG декамеру створено у програмі NAB. Розрахунки траєкторії руху декамеру виконано за допомогою пакету програм Amber 8. Водне оточення створено шляхом розміщення декамеру у октаедрі, який містив 3572 молекул води. Результуюча крива середньоквадратичного відхилення (СКВ) положення остовних атомів за 1,8 нс наведена на рис.1.

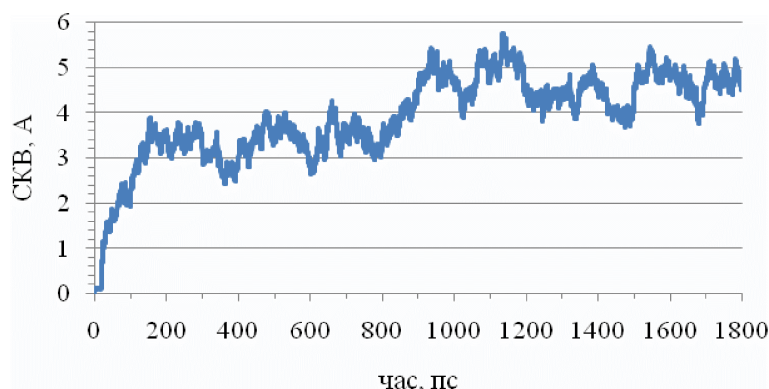


Рисунок 1 – Крива середньоквадратичного відхилення положення остовних атомів

Аналізуючи траєкторію руху CG декамеру у водному оточенні знайдено його найбільш стабільну конформацію, яка наведена на рис. 2. Вона була використана в подальших розрахунках механізму реакції дезамінування цитозинового фрагменту, за допомогою пакету програм Gaussian09.

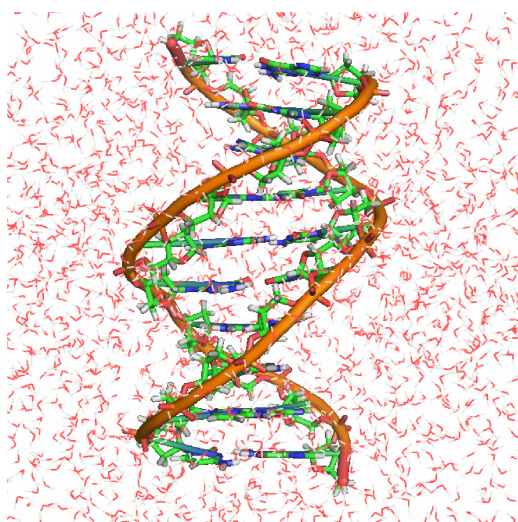


Рисунок 2 – Оптимізована конформація CG декамера у водному оточенні

Виходячи з великої кількості атомів розрахункової моделі застосовано схему ONIOM. Згідно схеми, декамер був розділений на три рівні. Центральна CG пара і перша оболонка гідратації розраховані високим рівнем в схемі ONIOM, представлені кулями і паличками на рис. 3. Сусідні пари основ біля центральних CG, включені в середній шар, відображаються трубками. Вся інша частина декамеру розрахована на нижньому рівні (на рис. 3 показана каркасом).

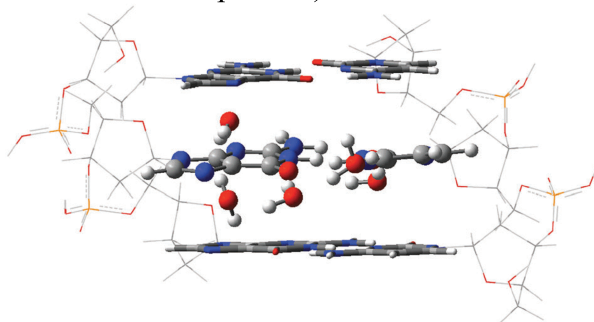


Рисунок 3 – Фрагмент моделі гідратованої двухланцюгової В-форми декамеру

Згідно розрахованим даним, механізм реакції дезамінування складається з чотирьох стадій (рис. 4). На першій стадії відбувається атака гідроксид-аніона на атом Карбону, який зв'язаний з аміногрупою. Далі перенос протона від атома Оксигену до атома Нітрогену призводить до утворення інтермедіату **ІНТ2**. Наступна стадія – відщеплення аміногрупи. Завершується реакція лактим-лактамім таутомерним перетворенням інтермедіату **ІНТ3** у продукт **ПР**. З Рис.4 видно, що лімітуючою стадією є утворення інтермедіату **ІНТ1**. Енергія Гіббса активації даної стадії дорівнює 29,17 ккал/моль, що знаходиться у гарній відповідності з експериментально визначеним значенням енергії реакції дезамінування цитозинового фрагменту ДНК, яке становить 27,96 ккал/моль [2]. Молекули води оточуючого середовища активно приймають участь у реакції шляхом утворення водневих зв'язків.

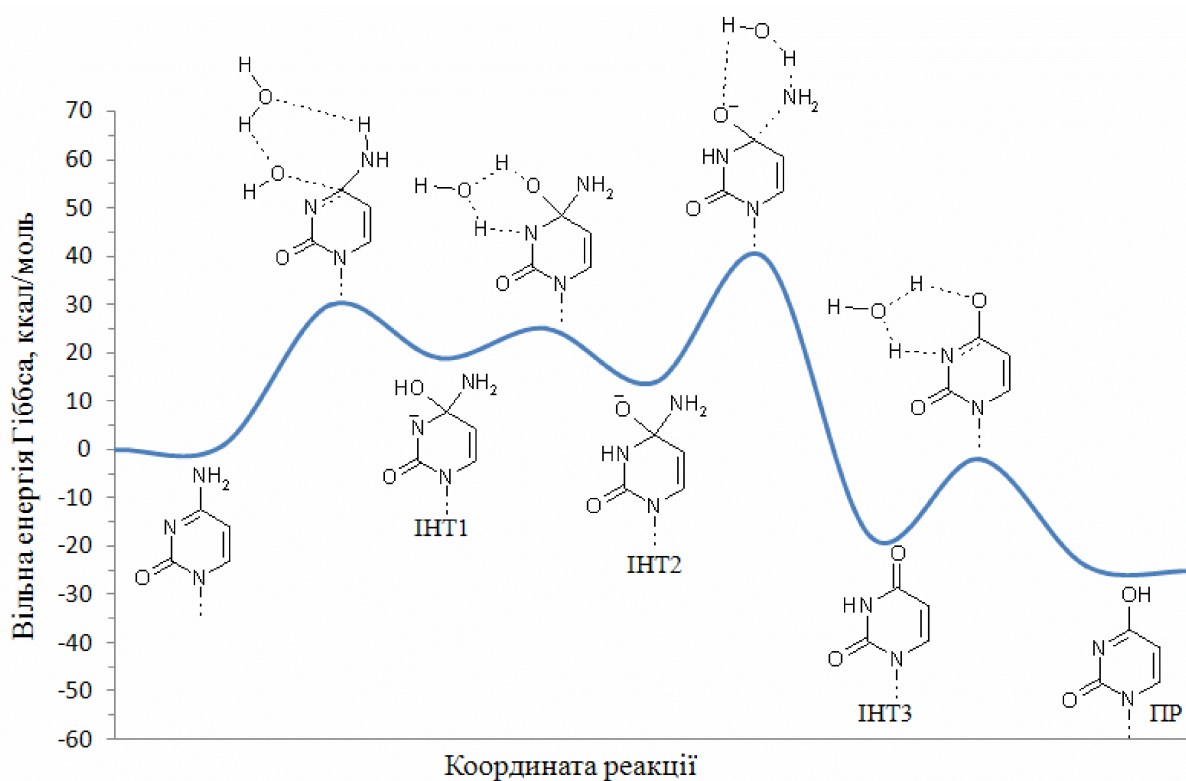


Рисунок 4 – Розрахований механізм реакції дезамінування цитозинового фрагменту CG декамера з відповідною енергетичною кривою

В результаті проведеного дослідження розраховано механізм гідролітичного дезамінування цитозину шляхом моделювання даної реакції на прикладі В-форми CG декамера, як фрагмента молекули ДНК. Встановлено, що дезамінування є чотирьохстадійним процесом і енергія лімітуючої стадії відповідає експериментально встановленій.

Література:

1. Peng W. Accelerated Deamination of Cytosine Residues in UV-Induced Cyclobutane Pyrimidine Dimers Leads to CC to TT Transitions / Peng W., Shaw B. R. // *Biochemistry* 1996. – Vol. 35. – P. 10172–10181.
2. Frederico L. A. A Sensitive Genetic Assay for the Detection of Cytosine Deamination: Determination of Rate Constants and the Activation Energy. / Frederico L. A., Kunkel T. A., Shaw B. R. // *Biochemistry*. – 1990. – Vol. 29. – P. 2532–2537.
3. Lindahl T. Heat-Induced Deamination of Cytosine Residues in Deoxyribonucleic Acid / Lindahl T., Nyberg B. // *Biochemistry*. – 1974. – Vol. 13. – P. 3405–3410.
4. Almatarneh M. H. Mechanisms for the Deamination Reaction of Cytosine with $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$ and $2\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$: A Computational Study / Almatarneh M.H., Flinn C.G., Poirier R.A. // *J. Chem. Inf. Model.* – 2008. – Vol. 48, N. 4. – P. 831–843.
5. Алексеев О.М. Динаміка протионів Na^+ в іонно-гідратному шарі молекули ДНК/ Алексеев О.М., Булавін Л.А., Шамайко Д.О. // *Ukrainica Bioorganica Acta*. – 2009. – Vol.1. – P. 45–49.