

Новий фізико-хімічний механізм мутагенної дії 5-бромурацилу

О.О. Броварець^{1,2*}, Д.М. Говорун²

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка
просп. Акад. Глушкова, 2, корп. 5, Київ, 03187, Україна

² Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
вул. Акад. Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

Резюме. Уперше запропоновано й обґрунтовано універсальний молекулярний механізм мутагенної дії $^5\text{BrUra}$, який зводиться до кінетичного і ґрунтується на тому, що бар'єр реакції $^5\text{BrUra}\cdot\text{Gua} \rightarrow ^5\text{BrUra}\cdot\text{Gua}^*$ істотно менший (2,17 ккал/моль), ніж аналогічна величина для реакції $\text{Thy}\cdot\text{Gua} \rightarrow \text{Thy}\cdot\text{Gua}^*$, яка спричиняє спонтанні транзиції.

Ключові слова: 5-бромурацил, спонтанні транзиції, помилки включення, помилки реплікації, мутагенний механізм, міжмолекулярні водневі зв'язки, аналіз топології електронної густини, DFT.

Вступ. 5-бромурацил ($^5\text{BrUra}$), модифікований тимін, — класичний мутаген, мутагенна дія якого відома понад півстоліття (див., наприклад, [1-4] і наведену там бібліографію), починаючи з 1956-го року [5]. Численними дослідженнями експериментально доведено, що $^5\text{BrUra}$ доволі інтенсивно викликає точкові мутації, зокрема транзиції включення і реплікації [6], у бактеріофагів [7-11], бактерій [5, 12] і деяких вищих організмів [2-4]. У більшості випадків це транзиції гуанін-цитозин ($\text{Gua}\cdot\text{Cyt}$) → аденін-тимін ($\text{Ade}\cdot\text{Thy}$) [1-3], проте зафіксовано й непоодинокі відхилення від цієї закономірності [1]. Зазвичай $^5\text{BrUra}$ включається у ДНК випадковим чином у невеликих кількостях [1], проте в спеціально поставлених дослідках [1, 2] він може практично повністю заміщувати Thy . Учені наголошують [11], що мутагенез під дією $^5\text{BrUra}$ відбувається як результат його включення в ДНК, проте лише останнього недостатньо для того, аби викликати перше.

Попри тривалу і наполегливу роботу із з'ясування фізико-хімічних механізмів мутагенної дії $^5\text{BrUra}$ [12-16], до кінця вони так і не встановлені. Так, зокрема, нині відсутні універсальні уявлення, які б з єдиних фізико-хімічних позицій дозволяли кількісно пояснювати як походження помилок включення, так і помилок реплікації. Значного успіху в цьому напрямі досягнуто в роботі [16], де показано, що в мікрооточенні молекул води у $^5\text{BrUra}$ домінує мутагенна таутомерна форма, а у Thy — канонічна. Це дає змогу пояснити походження помилок включення, але не реплікації через її суттєво гідрофобний характер [17].

Автори цієї роботи пропонують і обґрунтовують кінетичний фізико-хімічний механізм мутагенної дії $^5\text{BrUra}$, який зводиться до того, що бар'єр переходу зміщеної пари $^5\text{BrUra}\cdot\text{Gua}$ у пару за участі рідкісного таутомера (позначено зірочкою), квазіізоморфну Вотсон-Кріківським, $^5\text{BrUra}\cdot\text{Gua}^*$ помітно менший, ніж аналогічна величина для переходу $\text{Thy}\cdot\text{Gua} \rightarrow \text{Thy}\cdot\text{Gua}^*$ [18]. Цей механізм, на наше переконання, може цілком претендувати на універсальну складову як помилок включення, так і помилок реплікації.

* Corresponding author.

Tel.: +38068-8148504

E-mail address: brovarets@list.ru

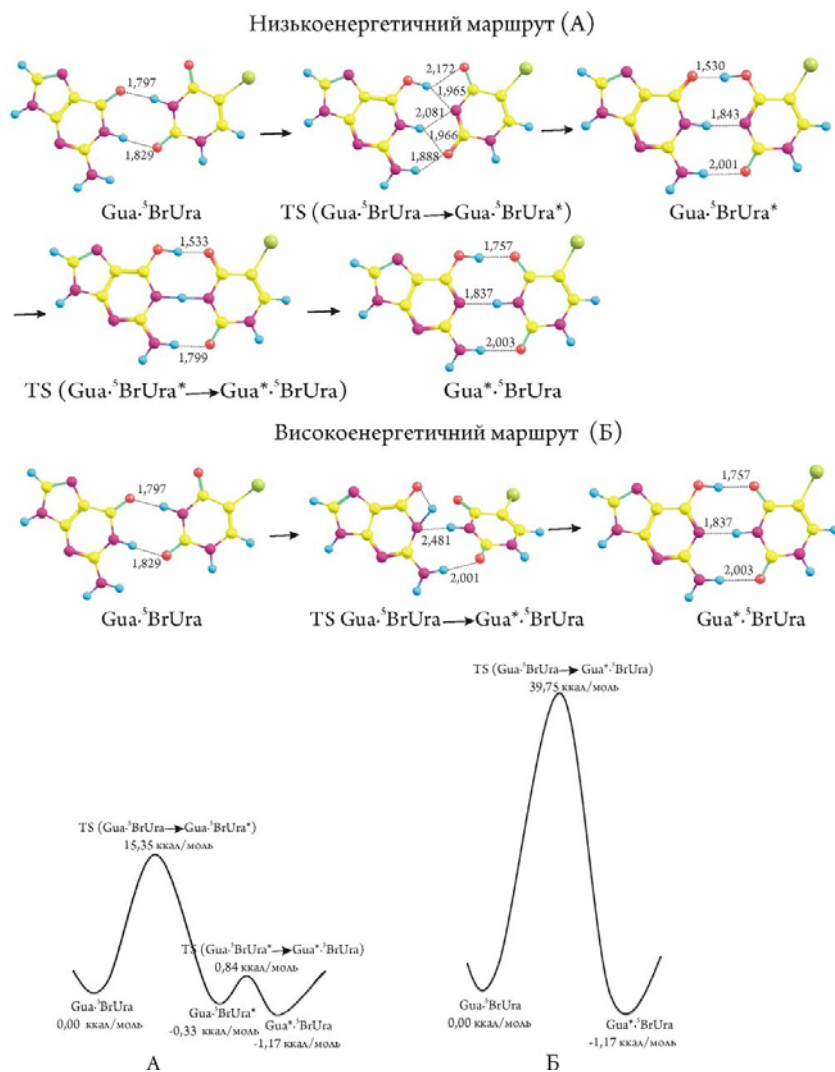


Рис. 1. Фізико-хімічний механізм перетворення зміщеної пари Gua^5BrUra у пару за участі рідкісного таутомера $\text{Gua}^{*5}\text{BrUra}$. Пунктиром позначено Н-зв'язки за даними електронно-топологічного аналізу. Знизу рисунка подано відповідні потенціальні криві в термінах енергії Гіббса за нормальних умов. Квантово-хімічний розрахунок на рівні теорії $\text{MP2}/6\text{-}311++\text{G}(2\text{df},\text{pd})//\text{B3LYP}/6\text{-}311++\text{G}(\text{d},\text{p})$.

Об'єкт, предмет і методи дослідження. Об'єкт дослідження — $^5\text{BrUra}$, предмет — фізико-хімічний механізм його мутагенної активності. Застосовані нами квантово-хімічні методи дослідження детально описано в нашій попередній роботі [18].

Результати та їхнє обговорення. Аналіз здобутих результатів, представлених у табл. 1 та на рис. 1, дає змогу зробити низку біологічно важливих висновків, основними з-поміж яких є такі.

1. Електронна енергія взаємодії у зміщеній парі $^5\text{BrUra}\cdot\text{Gua}$ (16,69 ккал/моль) практично не відрізняється від такої в аналогічній парі $\text{Thy}\cdot\text{Gua}$ (16,72 ккал/моль [18]). Так само можна охарактеризувати сумарну енергію пари класичних Н-зв'язків (11,90 і 11,43 ккал/моль

[18] відповідно), які їх стабілізують. Це означає, що ці пари утворюються з практично однаковою імовірністю, а несуттєві енергетичні відмінності між ними не в змозі пояснити мутагенну дію $^5\text{BrUra}$. Те саме можна сказати про аналогічні характеристики пар $^5\text{BrUra}\cdot\text{Gua}^*$ і $^5\text{BrUra}^*\cdot\text{Gua}$ та $\text{Thy}\cdot\text{Gua}^*$ і $\text{Thy}^*\cdot\text{Gua}$ відповідно й енергетичні бар'єри їхнього взаємного перетворення.

2. У рамках моделі, що розглядається [18], мутагенна дія $^5\text{BrUra}$ пояснюється нижчим на 2,17 ккал/моль бар'єром перетворення пар $^5\text{BrUra}\cdot\text{Gua} \rightarrow ^5\text{BrUra}^*\cdot\text{Gua} \rightarrow ^5\text{BrUra}\cdot\text{Gua}^*$ у порівнянні з перетворення пар $\text{Thy}\cdot\text{Gua} \rightarrow \text{Thy}^*\cdot\text{Gua} \rightarrow \text{Thy}\cdot\text{Gua}^*$. Оцінка відповідної сталої швидкості реакції, що досліджується, у класичному наближенні вказує, що в першому

Таблиця 1

Електронно-топологічні, геометричні, спектрально-коливальні й енергетичні характеристики міжмолекулярних водневих зв'язків у досліджених парах основ ДНК за участі Gua, ⁵BrUra та їхніх мутагенних таутомерів і перехідних станах їхнього взаємного перетворення

| Комплекси | H-зв'язок AH...B | ρ , ат.од | $\Delta\rho$, ат.од | 100· ε | $d_{A..B}$, Å | $d_{H..B}$, Å | $\angle AH..B$, град. | Δd_{AH} , Å | $-\Delta\nu$, см ⁻¹ | E_{HB} , ккал/моль |
|---|---------------------|-------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|----------------|---------------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| Низькоенергетичний маршрут | | | | | | | | | | |
| Gua- ⁵ BrUra | N3H...O6 | 0,035 | 0,114 | 2,98 | 2,836 | 1,797 | 172,4 | 0,026 | 482,8 | 6,94 |
| | N1H...O2 | 0,033 | 0,114 | 4,41 | 2,856 | 1,829 | 175,7 | 0,015 | 265,2 | 4,95 |
| TS (Gua- ⁵ BrUra → Gua* ⁵ BrUra*) | O6H...O4 | 0,016 | 0,054 | 131,30 | 3,172 | 2,172 | 137,3 | 0,033↓ | 562,1↓ | 2,6 |
| | O6H...N3 | 0,028 | 0,076 | 1,06 | 2,965 | 1,965 | 156,8 | | | 4,93 |
| | N1H...N3 | 0,022 | 0,074 | 22,70 | 3,115 | 2,081 | 143,6 | 0,020↓ | 327,3↓ | 2,44 |
| | N1H...O2 | 0,026 | 0,085 | 9,69 | 3,000 | 1,966 | 147,9 | | | 3,15 |
| | N2H...O2 | 0,027 | 0,108 | 1,10 | 2,907 | 1,888 | 150,9 | 0,012 | 200,2 | 4,18 |
| Gua* ⁵ BrUra* | O4H...O6 | 0,068 | 0,149 | 1,87 | 2,561 | 1,530 | 173,0 | 0,061 | 1109,3 | 10,79 |
| | N1H...N3 | 0,039 | 0,099 | 6,40 | 2,876 | 1,843 | 171,2 | 0,021 | 390,6 | 6,18 |
| | N2H...O2 | 0,022 | 0,078 | 5,61 | 3,019 | 2,001 | 173,3 | 0,009 | 164,4 | 3,68 |
| TS (Gua* ⁵ BrUra* → Gua* ⁵ BrUra) | O6H...N4 | 0,068 | 0,078 | 2,18 | 2,550 | 1,533 | 175,0 | – | – | – |
| | N2H...O2 | 0,035 | 0,120 | 5,13 | 2,822 | 1,799 | 175,6 | – | – | – |
| Gua* ⁵ BrUra | O6H...O4 | 0,038 | 0,123 | 2,55 | 2,743 | 1,757 | 171,8 | 0,018 | 359,5 | 5,90 |
| | N3H...N1 | 0,041 | 0,090 | 6,14 | 2,887 | 1,837 | 176,2 | 0,038 | 705,3 | 8,51 |
| | N2H...O2 | 0,022 | 0,079 | 5,69 | 3,016 | 2,003 | 177,3 | 0,007 | 125,1 | 3,05 |
| Високоенергетичний маршрут | | | | | | | | | | |
| Gua- ⁵ BrUra | N3H...O6 | 0,035 | 0,114 | 2,98 | 2,836 | 1,797 | 172,4 | 0,026 | 482,8 | 6,94 |
| | N1H...O2 | 0,033 | 0,114 | 4,41 | 2,856 | 1,829 | 175,7 | 0,015 | 265,2 | 4,95 |
| TS (Gua- ⁵ BrUra → Gua* ⁵ BrUra) | N3H...N2 | 0,009 | 0,005 | 15,69 | 3,498 | 2,481 | 154,4 | 0,004 | 107,5 | 2,71 |
| | N2H...O2 | 0,021 | 0,005 | 2,41 | 3,016 | 2,001 | 164,4 | 0,008 | 133,7 | 3,19 |
| Gua* ⁵ BrUra | O6H...O4 | 0,038 | 0,005 | 2,55 | 2,743 | 1,757 | 171,8 | 0,018 | 359,5 | 5,90 |
| | N3H...N1 | 0,041 | 0,005 | 6,14 | 2,887 | 1,837 | 176,2 | 0,038 | 705,3 | 8,51 |
| | N2H...O2 | 0,022 | 0,005 | 5,69 | 3,016 | 2,003 | 177,3 | 0,007 | 125,1 | 3,05 |

Примітки: ρ і $\Delta\rho$ – значення електронної густини і лапласіану електронної густини в критичній точці відповідно; ε – еліптичність; E_{HB} – енергія H-зв'язку; $d_{A..B}$, $d_{H..B}$ – відстань між атомами A і B та H і B відповідно, які беруть участь у H-зв'язку; $\angle AH..B$ – кут H-зв'язування; $-\Delta\nu$ – зсув частоти валентного коливання $\nu(AH)$ при втягуванні групи AH у H-зв'язок, розрахований за методом Йогансена [19]; Δd_{AH} – подовження хімічного зв'язку AH при утворенні H-зв'язку AH...B; TS – перехідний стан перетворення пар; енергію біфуркативних H-зв'язків розраховували, беручи до уваги їхнє співвідношення, обчислене за формулою [20].

випадку вона зростає у ~39 разів за нормальних умов у порівнянні з другим випадком, що відповідає спонтанним мутаціям.

Класичний підхід є адекватним, оскільки уявна частота $\nu_i = 144,7i$ см⁻¹ і при цьому фактор Вігнера відрізняється від 1 лише на 0,02 %. Зниження бар'єру реакції логічно пов'язати із добре відомою властивістю ⁵BrUra краще від-

щеплювати протон із положення N3, ніж Thy [14].

3. Запропонований кінетичний механізм мутагенної дії ⁵BrUra ⁵BrUra+Gua→⁵BrUra·Gua→⁵BrUra·Gua* є універсальною складовою як у процесі виникнення помилок включення, так і при утворенні помилок реплікації, причому в першому випадку він працює у парі з тауто-

мерним механізмом ${}^5\text{BrUra}^* + \text{Gua} \rightarrow {}^5\text{BrUra}^* \cdot \text{Gua} \rightarrow {}^5\text{BrUra} \cdot \text{Gua}^*$ [16]. На жаль, нині недостатньо відповідних числових даних, щоб підрахувати їхні парціальні внески: залишається сподіватися, що вони з'являться в найближчому майбутньому.

4. Розглянутий нами механізм мутагенної дії ${}^5\text{BrUra}$ є доволі спрощеним, оскільки він не враховує стекінгових взаємодій. Саме вони, зокрема, можуть відповідати за кластеризацію транзицій [9], їхню залежність від сиквенсу [1, 2] та високу частоту зустрічальності піримідинових блоків у ДНК, збагаченої ${}^5\text{BrUra}$

[21, 22]. Спроба вирішення цих нагальних питань входить у наші найближчі плани.

Висновки. Уперше запропоновано й обґрунтовано універсальний молекулярний механізм мутагенної дії ${}^5\text{BrUra}$, який зводиться до кінетичного і ґрунтується на тому, що бар'єр реакції ${}^5\text{BrUra} \cdot \text{Gua} \rightarrow {}^5\text{BrUra} \cdot \text{Gua}^*$ істотно менший (на 2,17 ккал/моль), ніж аналогічна величина для реакції $\text{Thy} \cdot \text{Gua} \rightarrow \text{Thy} \cdot \text{Gua}^*$, яка спричиняє спонтанні транзиції.

Надійшла в редакцію 03.12.2009 р.

The new physicochemical mechanism of the mutagenic action of 5-bromouracil

О.О. Brovarets^{1,2}, D.M. Hovorun²

¹ Taras Shevchenko National University of Kyiv
2 Glushkova Ave., Kyiv, 03187, Ukraine

² Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150 Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

Summary. For the first time the universal molecular mechanism of ${}^5\text{BrUra}$ mutagenic action which lead to the kinetic and based on that fact that barrier of the reaction ${}^5\text{BrUra} \cdot \text{Gua} \rightarrow {}^5\text{BrUra} \cdot \text{Gua}^*$ is substantially smaller, than analogous one for reaction $\text{Thy} \cdot \text{Gua} \rightarrow \text{Thy} \cdot \text{Gua}^*$ which induces spontaneous transition.

Keywords: 5-bromouracil, spontaneous transitions, incorporation mistakes, replication mistakes, mutagenic mechanism, intermolecular hydrogen bonds, analysis of the electron density topology, DFT.

Перелік літератури

1. Ауэрбах Ш. Проблемы мутагенеза. — Москва: Мир, 1978. — 463 с.
2. Антонов А.С., Белозерский А.Н. Влияние некоторых аналогов пуриновых и пиримидиновых оснований на процесс синтеза белка. В кн.: Нуклеиновые кислоты. Труды Второй конференции по нуклеиновым кислотам. — Москва: Медицина, 1966. — С. 78-86.
3. Тарасов В.А. Молекулярные механизмы репарации и мутагенеза. — Москва: Наука, 1982. — 228 с.
4. Дубинин Н.П. Общая генетика. — Москва: Наука, 1986. — 560 с.
5. Rudner R. Mutation as an error in base pairing. I. The mutagenicity of base analogues and their incorporation into the DNA of Salmonella typhimurium // Z. Vererb. Lehre. — 1961. — Vol. 92. — P. 336-360.
6. Chemical mutagens: principles and methods for their detection. Ed. Hollaender A. — New York, London: Plenum Press, 1973.
7. Litman R., Pardee A.B. Production of bacteriophage mutants by disturbance of deoxyribonucleic acid metabolism // Nature. — 1956. — Vol. 178. — P. 529-531.
8. Benzer S., Freese E. Induction of specific mutations with 5-bromouracil // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1958. — Vol. 44. — P. 112-119.
9. Freese E. The specific mutagenic effect of base analogues on phage T4 // J. Mol. Biol. — 1959. — Vol. 1. — P. 87-105.
10. Strelzoff E. DNA synthesis and induced mutations in the presence of 5-bromouracil. II. Induction of mutations // Z. Vererb. Lehre. — 1962. — Vol. 93. — P. 301-318.
11. Litman R., Pardee A.B. The induction of mutants of bacteriophage T2 by 5-bromouracil. III. Nutritional and structural evidence regarding mutagenic action // Biochim. Biophys. Acta. — 1960. — Vol. 42. — P. 117-130.
12. Hu X., Li H., Ding J., Han S. Mutagenic mechanism of the A-T to G-C transition induced by 5-bromouracil: an ab initio study // Biochemistry. — 2004. — Vol. 43, No. 21. — P. 6361-6369.
13. Hanus M., Kabelá M., Nachtigallová D., Hobza P. Mutagenic properties of 5-halogenuracils: correlated quantum chemical ab initio study // Biochemistry. — 2005. — Vol. 44, No. 5. — P. 1701-1707.
14. Orozco M., Hernandez B., Luque F.J. Tautomerism of 1-methyl derivatives of uracil, thymine, 5-bromouracil. Is tautomerism the basis for the mutagenicity of 5-bromouridine? // J. Phys. Chem. B. — 1998. — Vol. 102. — P. 5228-5233.
15. Kurita N., Danilov V. I., Anisimov V. M., Hovorun D., Nakatsu T., Dedachi K. Mechanisms of mutagenic action of 5BrU: quantum mechanical study // J. Mol. Struct. Dyn. — 2007. — Vol. 24. — P. 665. (Book of abstracts, Albany 2007: The Conversation 15, 19-23 June 2007).
16. Danilov V.I., van Mourik T., Kurita N., Wakabayashi H., Tsukamoto T., Hovorun D.M. On the mechanism of the mutagenic action of 5-bromouracil: a DFT study of uracil and 5-bromouracil in a water cluster // J. Phys. Chem. A. — 2009. — Vol. 113, No. 11. — P. 2233-2235.
17. Kornberg A., Baker T.A. DNA Replication (ed. 3). — New York: W.H. Freeman and company, 1991.
18. Броварець О.О., Говорун Д.М. Фізико-хімічний механізм перетворення зміщених пар основ ДНК

Gua·Thy і Ade·Cyt у пари за участі мутагенних таутомерів Gua*·Thy і Ade·Cyt* // *Ukrainica Bioorganica Acta*. — 2009. — Т. 7, № 2. — С. 12-18.

19. *Iogansen A.V.* Direct proportionality on the hydrogen bonding energy and the intensification of the stretching $\nu(\text{XH})$ vibration in infrared spectra // *Spectrochim. Acta. Part A*. — 1999. — Vol. 55. — P. 1585-1612.

20. *Espinosa E., Molins E., Lecomte C.* Hydrogen bond strengths revealed by topological analyses of experi-

mentally observed electron densities // *Chem. Phys. Lett.* — 1998. — Vol. 285. — P. 170-173.

21. *Burton K.* Sequences of nucleotides in deoxyribonucleic acid containing 5-bromouracil // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1962. — Vol. 55. — P. 412.

22. *Rudner R., Shapiro H., Chargaff E.* Distribution of 5-bromouracil among the pyrimidine clusters of the deoxyribonucleotide acid of *E.coli* // *Nature*. — 1963. — Vol. 195. — P. 143-146.