

## Новий фізико-хімічний механізм мутагенної дії 5-бромурацилу

О.О. Броварець<sup>1,2\*</sup>, Д.М. Говорун<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> 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  $\text{Thy}$ . 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  $\text{Thy}$  — 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

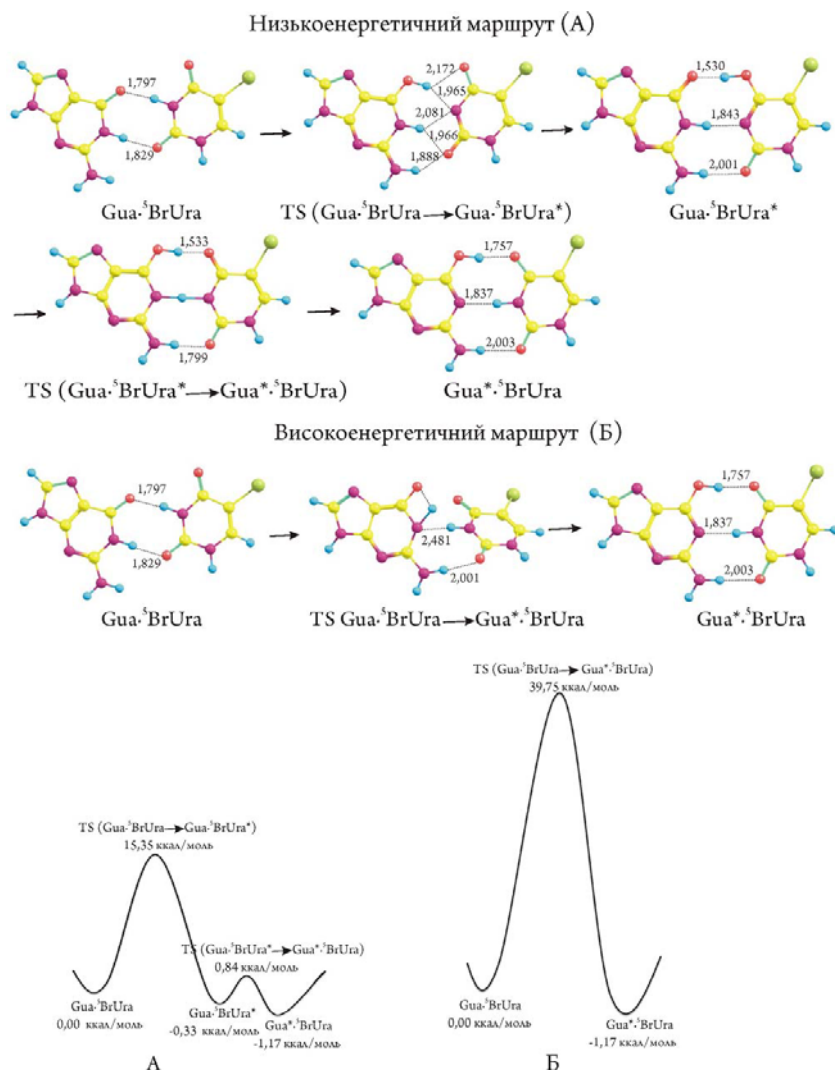


Рис. 1. Фізико-хімічний механізм перетворення зміщеної пари  $\text{Gua}^5\text{BrUra}$  у пару за участі рідкісного таутомера  $\text{Gua}^{*5}\text{BrUra}$ . Пунктиром позначено Н-зв'язки за даними електронно-топологічного аналізу. Знизу рисунка подано відповідні потенціальні криві в термінах енергії 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

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

| Комплекси   | H-зв'язок<br>AH...B | $\rho$ ,<br>ат.од | $\Delta\rho$ ,<br>ат.од | 100· $\varepsilon$ | $d_{A..B}$ ,<br>Å | $d_{H..B}$ , Å | $\angle AH..B$ ,<br>град. | $\Delta d_{AH}$ ,<br>Å | $-\Delta\nu$ ,<br>см <sup>-1</sup> | $E_{HB}$ ,<br>ккал/моль |
|---|---------------------|-------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|----------------|---------------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| Низькоенергетичний маршрут                                    |                     |                   |                         |                    |                   |                |                           |                        |                                    |                         |
| Gua- <sup>5</sup> 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<br>(Gua- <sup>5</sup> BrUra →<br>Gua* <sup>5</sup> 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* <sup>5</sup> 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<br>(Gua* <sup>5</sup> BrUra* →<br>Gua* <sup>5</sup> 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* <sup>5</sup> 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- <sup>5</sup> 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<br>(Gua- <sup>5</sup> BrUra →<br>Gua* <sup>5</sup> 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* <sup>5</sup> 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:  $\rho$  і  $\Delta\rho$  – значення електронної густини і лапласіану електронної густини в критичній точці відповідно;  $\varepsilon$  – 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];  $\Delta d_{AH}$  – 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<sup>-1</sup> і при цьому фактор Вігнера відрізняється від 1 лише на 0,02 %. Зниження бар'єру реакції логічно пов'язати із добре відомою властивістю <sup>5</sup>BrUra краще від-

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

3. Запропонований кінетичний механізм мутагенної дії <sup>5</sup>BrUra + Gua → <sup>5</sup>BrUra·Gua → <sup>5</sup>BrUra·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<sup>1,2</sup>, D.M. Hovorun<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Taras Shevchenko National University of Kyiv  
2 Glushkova Ave., Kyiv, 03187, Ukraine

<sup>2</sup> 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.