



УДК 577.3

О. О. Броварець

**Вплив модифікації урацилу на бар'єр таутомеризації
зміщеної пари $\text{Gua} \cdot {}^5\text{XUra}$ у парі з вотсон–криківською
геометрією $\text{Gua}^* \cdot {}^5\text{XUra}$: квантово-хімічне дослідження**

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Д. М. Говоруном)

Вперше на рівні квантово-хімічної теорії $\text{MP2/6-311++G(2df,pd)}/\text{B3LYP/6-311++G(d,p)}$ встановлено, що галогенізація Ura спричиняє мутагенний ефект за рахунок зниження бар'єру таутомеризації зміщених пар основ $\text{Gua} \cdot {}^5\text{XUra}$ ($\text{X} = \text{H}, \text{CH}_3, \text{Br}, \text{Cl}, \text{F}$) у парі з вотсон–криківською геометрією за участю мутагенного таутомеру $\text{Gua} - \text{Gua}^ \cdot {}^5\text{XUra}$. При цьому максимальний ефект спостерігається саме для ${}^5\text{BrUra}$, що є найсильнішим мутагеном з-поміж досліджених галогенопохідних Ura .*

Відомо, що модифікація урацилу (Ura) за п'ятим положенням, зокрема його галогенізація (${}^5\text{XUra}$, $\text{X} = \text{Hal}$), спричиняє мутагенний тиск, істотно підвищуючи частоту помилок включення при біосинтезі ДНК [1–4]. Зазвичай цей ефект пояснюють, спираючись або на іонізаційну модель (${}^5\text{HalUra}$ мають більшу здатність іонізуватися у водному середовищі, ніж Ura чи Thy [2, 3]), або ж на таутомерні уявлення [2–5], оскільки у водному розчині кето-енольна рівновага істотно зсувається в бік енольних таутомерів при галогенізації Ura [5, 6]. Уразливим місцем таких підходів є значна гідрофобність активного центру високоточної реплікативної ДНК-полімерази у складі реплісоми [7, 8], яка виключає наявність у ньому навіть поодиноких молекул води.

Раніше ми показали, що зміщена (воблівська) пара гуанін (Gua) · тимін (Thy), яка стабілізується двома Н-зв'язками $\text{N3H} \dots \text{O6}$ і $\text{N1H} \dots \text{O2}$, є таутомерною “гойдалкою”, переходячи за рахунок внутрішньопарної таутомеризації через цвітеріонний перехідний стан, що стабілізується п'ятьма міжмолекулярними Н-зв'язками — $\text{O6H}^+ \dots \text{O4}^-$, $\text{O6H}^+ \dots \text{N3}^-$, $\text{N1H}^+ \dots \text{N3}^-$, $\text{N1H}^+ \dots \text{O2}^-$ і $\text{N2H}^+ \dots \text{O2}^-$, у парі $\text{Gua}^* \cdot \text{Thy}$ з вотсон–криківською геометрією, яка підтримується трьома Н-зв'язками — $\text{O6H} \dots \text{O4}$, $\text{N3H} \dots \text{N1}$ і $\text{N2H} \dots \text{O2}$ (тут і нижче зірочкою позначено мутагенний таутомер) [9]. Зроблено припущення, що саме цей механізм відповідає за виникнення спонтанних помилок включення, коли навпроти Gua чи Thy включається Thy чи Gua відповідно при біосинтезі ДНК у клітині [9]. Зрозуміло, що

© О. О. Броварець, 2013

у рамках такої кінетичної моделі частота помилок включення істотно залежить від енергетичного бар'єру таутомеризації — чим нижча величина останнього, тим вища частота помилок біосинтезу ДНК.

Ми ставили собі за мету пояснити мутагенний ефект, зумовлений галогенізацією Ura за п'ятим положенням.

Сучасними квантово-хімічними методами на рівні теорії MP2/6-311++G(2df,pd)//V3LYP/6-311++G(d,p) нам вдалося вперше зафіксувати істотне зниження бар'єру таутомеризації зміщеної пари Gua · Thy при заміні Thy на ⁵HalUra у пару з вотсон–криківською геометрією Gua* · ⁵HalUra: при цьому найбільший ефект (1,73 ккал/моль за нормальних умов) зафіксовано саме для ⁵BrUra. Це збігається з літературними експериментальними даними [1–6], які свідчать про те, що саме ця сполука є найсильнішим мутагеном з-поміж усіх галогенопохідних Ura.

Об'єкти і методи дослідження. Об'єктами дослідження були зміщені пари основ Gua · Thy, Gua · Ura, Gua · ⁵BrUra, Gua · ⁵ClUra і Gua · ⁵FUra та пари основ за участю мутагенного таутомеру Gua з вотсон–криківською геометрією — Gua* · Thy, Gua* · Ura, Gua* · ⁵BrUra, Gua* · ⁵ClUra і Gua* · ⁵FUra, а також перехідні стани їхнього взаємного перетворення внутрішньопарним перенесенням протона. Предмет дослідження — вплив галогенізації урацилу за п'ятим положенням на енергетичні характеристики таутомеризації воблівських пар у пари з вотсон–криківською геометрією.

Квантово-хімічні розрахунки геометричної та електронної будови досліджуваних об'єктів проводили на рівні теорії DFT V3LYP/6-311++G(d,p) у вакуумному наближенні, яке для цієї задачі є адекватним [8–10]. Перехідні стани таутомеризації пар основ ідентифікували методом STQN (Synchronous Transit-guided Quasi-Newton) [11]. Усі зоптимізовані структури перевіряли на стійкість за відсутністю уявних частот у їхніх коливальних спектрах, розраховуваних у гармонійному наближенні. Енергію Гіббса досліджуваних структур визначали на рівні теорії MP2/6-311++G(2df,pd)//V3LYP/6-311++G(d,p), використовуючи обчислення в одній точці (так звані “single point calculations”). Перетворення реагенту в продукт реакції і навпаки вивчали в рамках концепції внутрішньої координати реакції IRC (Intrinsic Reaction Coordinate) [12].

Розподіл електронної густини в парах основ та перехідних станах (TS) їхнього взаємного перетворення аналізували, використовуючи теорію Бейдера “Атомів у молекулах” [13] та хвильові функції, одержані на рівні теорії V3LYP/6-311++G(d,p). Н-зв'язки ідентифікували за наявністю критичної точки (3, –1) між двома валентно незв'язаними атомами. Топологію електронної густини аналізували за допомогою програмного пакета AIM2000 [14], використовуючи стандартні опції.

Усі квантово-хімічні розрахунки проведено із використанням програмного пакета “GAUSSIAN'03” [15].

Результати та їхнє обговорення. Отримані результати наведено на рис. 1 та в табл. 1. Їхній порівняльний аналіз дозволяє зробити такі біологічно важливі висновки.

Заміщення п'ятого положення Ura на метильну групу (CH₃) чи галоген (F, Cl, Br) принципово не змінює перебігу процесу таутомеризації зміщеної пари у відповідну пару з вотсон–криківською геометрією за участю мутагенного таутомеру Gua*. У всіх без винятку випадках спостерігається одна і та ж сама структура перехідного стану таутомеризації — іонна пара, яка стабілізується п'ятьма Н-зв'язками — O6H⁺...O4⁻, O6H⁺...N3⁻, N1H⁺...N3⁻, N1H⁺...O2⁻ і N2H⁺...O2⁻. Відносна енергія Гіббса перехідних станів таутомеризації лежить у межах 15,35–17,51 ккал/моль за нормальних умов.

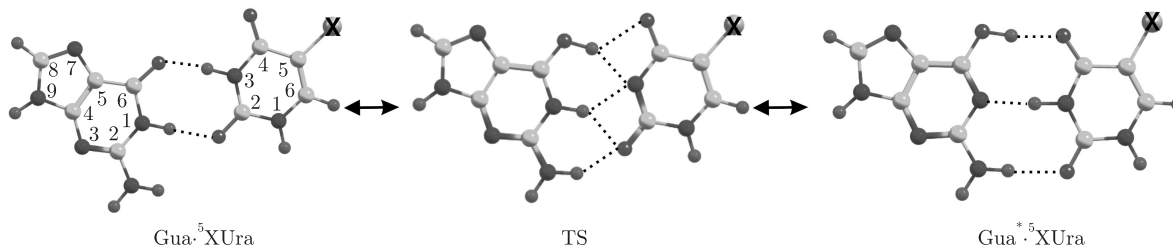


Рис. 1. Фізико-хімічний механізм таутомеризації зміщених пар основ $\text{Gua} \cdot {}^5\text{XUra}$ ($\text{X} = \text{H}, \text{CH}_3, \text{Br}, \text{Cl}, \text{F}$) у пари за участю мутагенного таутомеру $\text{Gua} - \text{Gua}^* \cdot {}^5\text{XUra}$ через перехідний стан TS. Пунктиром позначено міжмолекулярні Н-зв'язки, ідентифіковані за Бейдером [13]. Нумерація атомів стандартна

Таблиця 1. Енергетичні характеристики (відносна енергія Гіббса в ккал/моль за нормальних умов) таутомеризації зміщеної пари $\text{Gua} \cdot {}^5\text{XUra}$ у пари з вотсон-криківською геометрією $\text{Gua}^* \cdot {}^5\text{XUra}$

Комплекс	Ura	Thy	${}^5\text{FUra}$	${}^5\text{ClUra}$	${}^5\text{BrUra}$
$\text{Gua} \cdot {}^5\text{XUra}$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TS	17,08	17,51	15,49	15,39	15,35
$\text{Gua}^* \cdot {}^5\text{XUra}$	-1,65	-1,59	-0,69	-1,06	-1,17

У всіх досліджених комплексах руйніною силою таутомеризації є зниження (на 0,69–1,65 ккал/моль за нормальних умов) відносної енергії Гіббса пари з вотсон-криківською геометрією порівняно зі стартовою зміщеною парою.

Галогенізація Ura за п'ятим положенням помітно знижує енергію Гіббса активації таутомеризації (на 1,59–2,16 ккал/моль за нормальних умов), при цьому найбільший ефект спостерігається саме для ${}^5\text{BrUra}$ (2,16 ккал/моль), який з-поміж досліджених галогенопохідних Ura є найефективнішим мутагеном [1–6].

Цікаво, що заміна атома водню Ura при атомі C5 на метильну групу підвищує енергетичний бар'єр таутомеризації на 0,43 ккал/моль. Не виключено, що це є одним із аргументів, чому Природа вибрала як основу ДНК саме тимін, а не урацил.

Таким чином, сучасними методами неемпіричної квантової хімії на рівні теорії MP2/6-311++G(2df,pd)//V3LYP/6-311++G(d,p) вперше показано, що модифікація урацилу ($\text{Ura} \rightarrow {}^5\text{HalUra}$) знижує бар'єр перетворення його зміщених пар з Gua у пари за участю мутагенного таутомеру Gua, що мають вотсон-криківську геометрію, спричиняючи тим самим мутагенний тиск на ДНК. При цьому максимальний ефект спостерігається саме для ${}^5\text{BrUra}$, що є найефективнішим мутагеном з-поміж досліджених галогенопохідних.

Автор висловлює щирі вдячність чл.-кор. НАН України, проф. Д. М. Говоруну за увагу до роботи, а також Інформаційно-обчислювальному центру Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, Інституту теоретичної фізики ім. М. М. Боголюбова НАН України, НТК "Інститут монокристалів" НАН України та Інституту сцинтиляційних матеріалів НАН України за люб'язно надані обчислювальні ресурси та програмне забезпечення. Роботу виконано за підтримки гранту Президента України для обдарованої молоді на 2012 рік (договір № 30/2012) та гранту Президента України для підтримки наукових досліджень молодих учених на 2012 рік (договір № 44/400-2012, проект № GP/F44/086).

1. Rudner R., Shapiro H., Chargaff E. Distribution of 5-bromouracil among the pyrimidine clusters of the deoxyribonucleotide acid of *E. coli* // Nature. – 1962. – **195**, No 4837. – P. 143–146.
2. Orozco M., Hernandez B., Luque F. J. Tautomerism of 1-methyl derivatives of uracil, thymine, and 5-bromouracil. Is tautomerism the basis for the mutagenicity of 5-bromouridine? // J. Phys. Chem. B. – 1998. – **102**, No 26. – P. 5228–5233.

3. Yu H., Eritja R., Bloom L. B., Goodman M. F. Ionization of bromouracil and fluorouracil stimulates base mispairing frequencies with guanine // *J. Biol. Chem.* – 1993. – **268**, No 21. – P. 15935–15943.
4. 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. – **43**, No 21. – P. 6361–6369.
5. Danilov V. I., van Mourik T., Kurita N. et al. 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. – **113**, No 11. – P. 2233–2235.
6. Lukmanov T. I., Abdrakhimova G. S., Khamitov E. M., Ivanov S. P. Quantum-chemical calculations of the relative stability of the keto-enol tautomers of 5-chlorouracil // *Russ. J. Phys. Chem. A.* – 2012. – **86**, No 7. – P. 1104–1108.
7. van Oijen A. M., Loparo J. J. Single-molecule studies of the replisome // *Annu. Rev. Biophys.* – 2010. – **39**. – P. 429–448.
8. Brovarets' O. O., Yurenko Y. P., Dubey I. Ya., Hovorun D. M. Can DNA-binding proteins of replisome tautomerize nucleotide bases? *Ab initio* model study // *J. Biomol. Struct. Dynam.* – 2012. – **29**, No 6. – P. 1101–1109.
9. 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* // *Ukr. Bioorg. Acta.* – 2009. – **8**, № 2. – С. 12–18.
10. Brovarets' O. O., Kolomiets' I. M., Hovorun D. M. Elementary molecular mechanisms of the spontaneous point mutations in DNA: A novel quantum-chemical insight into the classical understanding // *Quantum chemistry – molecules for innovations* / Ed. Tomofumi Tada. – Rijeka: In Tech Open Access, 2012. – P. 59–102.
11. Peng C., Ayala P. Y., Schlegel H. B., Frisch M. J. Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states // *J. Comput. Chem.* – 1996. – **17**, No 1. – P. 49–56.
12. Hratchian H. P., Schlegel H. B. Finding minima, transition states, and following reaction pathways on *ab initio* potential energy surfaces // *Theory and applications of computational chemistry: The first 40 years* / Eds. C. E. Dykstra, G. Frenking, K. S. Kim, G. Scuseria. – Amsterdam: Elsevier, 2005. – P. 195–249.
13. Bader R. F. W. *Atoms in molecules: A quantum theory.* – Oxford: Oxford University Press, 1990. – 436 p.
14. Keith T. A. (2010). AIMAll (Version 10.07.01). Retrieved from aim. tkgristmill. com.
15. *Gaussian 03*, Revision B. 01 / Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Montgomery Jr. J. A., Vreven T., Kudin K. N., Burant J. C., Millam J. M., Iyengar S. S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G. A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Li X., Knox J. E., Hratchian H. P., Cross J. B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Ayala P. Y., Morokuma K., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Zakrzewski V. G., Dapprich S., Daniels A. D., Strain M. C., Farkas O., Malick D. K., Rabuck A. D., Raghavachari K., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cui Q., Baboul A. G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B. B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Martin R. L., Fox D. J., Keith T., Al-Laham M. A., Peng C. Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P. M. W., Johnson B., Chen W., Wong M. W., Gonzalez C., Pople J. A. – Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.

Інститут молекулярної біології
і генетики НАН України, Київ
Науково-навчальний центр “Державна
ключова лабораторія молекулярної
і клітинної біології”, Київ
Інститут високих технологій Київського
національного університету ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 26.12.2012

О. А. Броварец

Влияние модификации урацила на барьер таутомеризации смещенной пары $\text{Gua} \cdot {}^5\text{XUra}$ в пару с уотсон–криковской геометрией $\text{Gua}^* \cdot {}^5\text{XUra}$: квантово-химическое исследование

*Впервые на квантово-химическом уровне теории $\text{MP2}/6\text{-}311++\text{G}(2\text{df},\text{pd})//\text{B3LYP}/6\text{-}311++\text{G}(d,\text{p})$ установлено, что галогенизация *Ura* вызывает мутагенный эффект за счет снижения барьера таутомеризации смещенных пар оснований $\text{Gua} \cdot {}^5\text{XUra}$ ($\text{X} = \text{H}, \text{CH}_3, \text{Br}, \text{Cl}, \text{F}$) в пары с уотсон–криковской геометрией с участием мутагенного таутомера $\text{Gua} - \text{Gua}^* \cdot {}^5\text{XUra}$. При этом максимальный эффект наблюдается именно для ${}^5\text{BrUra}$, который является сильнейшим мутагеном из числа исследованных галогенпроизводных *Ura*.*

О. О. Brovarets'

Effect of a modification of uracil on the tautomerization barrier of the wobble $\text{Gua} \cdot {}^5\text{XUra}$ base pair into the $\text{Gua}^* \cdot {}^5\text{XUra}$ base pair with the Watson–Crick geometry: quantum-chemical study

*It is found for the first time at the $\text{MP2}/6\text{-}311++\text{G}(2\text{df},\text{pd})//\text{B3LYP}/6\text{-}311++\text{G}(d,\text{p})$ quantum-chemical level of theory that *Ura* halogenization causes the mutagenic effect by lowering the barrier of the tautomerization of the wobble $\text{Gua} \cdot {}^5\text{XUra}$ base pairs ($\text{X} = \text{H}, \text{CH}_3, \text{Br}, \text{Cl}, \text{F}$) into the pairs with the Watson–Crick geometry involving a mutagenic tautomer of *Gua* — $\text{Gua}^* \cdot {}^5\text{XUra}$. The maximum effect is observed exactly for ${}^5\text{BrUra}$, which is the strongest mutagen among the investigated halogen derivatives of *Ura*.*