

# Внутрішньомолекулярна таутомеризація та конформаційна мінливість деяких класичних мутагенів – похідних цитозину: квантово-хімічне дослідження

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

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

<sup>2</sup>Інститут високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка  
Просп. Академіка Глушкова, 2, корп. 5, Київ, Україна, 03127

brovarets@list.ru

**Мета.** Визначити час життя мутагенних похідних цитозину, дослідивши фізико-хімічні механізми їхньої внутрішньомолекулярної таутомеризації. **Методи.** Неемпірична квантова хімія, аналіз топології електронної густини за Бейдером, методи фізико-хімічної кінетики. **Результати.** Показано, що в усіх вивчених сполуках, окрім DCyt, модифікація заважає спарюванню як у мутагенній, так і в канонічній таутомерній формах з основою – партнером по взаємодії. Цей ефект може інгібувати їхній мутагенний потенціал. Встановлено також, що на досліджені молекули формально поширюється таутомерна гіпотеза Вотсона-Крика, оскільки час життя їхніх мутагенних таутомерів набагато перевищує характерний час, який витрачає машинерія біосинтезу ДНК на інкорпорацію однієї пари нуклеотидів. Можна очікувати, що в рамках саме цієї гіпотези вдасться адекватно пояснити механізми мутагенної дії N4-аміноцитозину, N4-метоксицитозину, N4-гідроксицитозину і N4-дегідроксицитозину, адже ці мутагени мають енергетично вигіднішу імінну таутомерну форму порівняно з амінною. **Висновки.** Вперше з використанням методів неемпіричної квантової хімії на рівні теорії MP2/6-311++G(2df,pd)//V3LYP/6-311++G(d,p) проведено вичерпний конформаційний аналіз низки класичних мутагенів – похідних цитозину.

**Ключові слова:** точкові мутації ДНК, похідні цитозину, внутрішньомолекулярна таутомеризація, енергія активації Гіббса, структурна нежорсткість, аналіз топології електронної густини.

**Вступ.** Ця праця присвячена вивченню N4-аміноцитозину (<sup>4</sup>amCyt), N4-метоксицитозину (<sup>4</sup>moCyt), N4-гідроксицитозину (<sup>4</sup>hoCyt), N4-дегідроксицитозину (DCyt) і N4-метилцитозину (<sup>4</sup>meCyt) – класичних мутагенів – похідних цитозину, експериментальні дані (здебільшого феноменологічного характеру) щодо мутагенної дії котрих є доволі розлогими і вичерпними [1–12]. Аналіз літератури

[13–17] показує, що молекулярні механізми цього біологічно важливого феномену до кінця ще не з'ясовано. Останнє, зокрема, пов'язано з тим, що в літературі відсутні вичерпні фізико-хімічні дані стосовно конформаційних властивостей зазначених мутагенів та процесів їхньої внутрішньомолекулярної таутомеризації [18–21]. Представлена робота покликана заповнити цю прогалину.

**Матеріали і методи.** Як об'єкт дослідження нами обрано похідні цитозину <sup>4</sup>amCyt, <sup>4</sup>moCyt, <sup>4</sup>hoCyt,

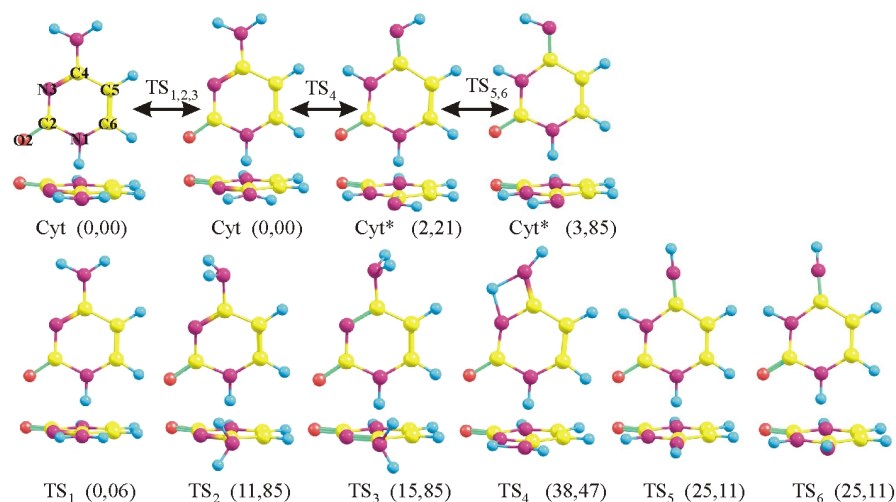


Рис. 1. Інтерконверсія та внутрішньомолекулярна таутомеризація цитозину в основній таутомерній формі та конформаційне перетворення його мутагенного таутомера (на цьому рисунку і всіх наступних біля кожної структури у дужках зазначено її відносну енергію Гіббса у ккал/моль за стандартних умов)

DCyt і <sup>4</sup>meCyt, феноменологічні ефекти мутагенної дії яких найкраще з-поміж сполук аналогічної будови представлено в літературі [6–12]. Предмет вивчення – фізико-хімічна природа процесів внутрішньомолекулярної таутомеризації зазначених мутагенів та їхні конформаційні властивості, включаючи структурну нежорсткість. Методи дослідження детально описано у роботі [22].

**Результати і обговорення.** *Cyt*. Виклад отриманих результатів розпочнемо з аналізу базової молекули – цитозину. Нами встановлено, що *Cyt* є структурно нежорсткою молекулою (рис. 1). Її інтерконверсія відбувається трьома топологічно і енергетично нееквівалентними шляхами – площинною інверсією непланарного амінного фрагмента  $\geq C4N4H_2$  через перехідний стан TS<sub>1</sub> та двома анізотропними поворотами (за і проти годинникової стрілки) аміногрупи навколо екзоциклічного зв'язку C4N4 через перехідні стани TS<sub>2</sub> та TS<sub>3</sub>. Оскільки площинній інверсії відповідає енергія активації Гіббса лише 0,06 ккал/моль (що, з одного боку, на порядок менше, ніж  $kT$  за кімнатної температури, а з іншого, – бар'єр інверсії не може перевищити жоден (бодай нульовий) з коливальних рівнів компетентного колювання ( $212,1 \text{ cm}^{-1}$ ), частота якого стає уявною ( $i154,6 \text{ cm}^{-1}$ ) у перехідному стані площинної інверсії TS<sub>1</sub>), то вона відбувається у вигляді ангармонійного надбар'єрного вялового колювання аміногрупи великої амплітуди. Плоскосиметричному бар'єрові повертання аміногрупи, коли вільна

електронна пара (ВЕП) амінного атома N4 «дивиться» у бік атома водню при атомі C5 ( $N3C4N4H_1 = 56,6^\circ$ ;  $N3C4N4H_2 = -56,5^\circ$ ;  $HN4H = 104,8^\circ$ ), відповідає помітно менша енергія активації Гіббса (11,85 ккал/моль), ніж у тому разі, коли ВЕП зорієнтована до атома N3 (15,85 ккал/моль) ( $N3C4N4H_1 = 120,6^\circ$ ;  $N3C4N4H_2 = -120,6^\circ$ ;  $HN4H = 107,4^\circ$ ). Це пов'язано із зміною притягувальних взаємодій (ВЕП з HC5 та амінних атомів водню з ВЕП N3) на відштовхувальні (ВЕП N6 і N3 та амінних атомів водню з атомом водню при атомі C5).

<sup>4</sup>*amCyt*. Серед досліджених мутагенів найширший спектр конформаційних можливостей демонструє <sup>4</sup>*amCyt* (рис. 2). У канонічній таутомерній формі цієї сполуки, яка комплементарно спарюється з гуаніном (Gua) [9, 16], нами виявлено чотири конформери плоскосиметричної будови (група симетрії C<sub>s</sub>) (рис. 2). Вони різняться розміщенням та орієнтацією аміногрупи – з боку атома N3 або зв'язку C5H, при цьому їхні атоми водню спрямовані до або від піримідинового кільця. У енергетично найвигіднішому конформері **1** (рис. 2) аміногрупа розташована біля атома N3, її атоми водню «дивляться» у бік кільця, а саме – атома N3. Конформер **4** з найвищою відносною енергією Гіббса ( $\Delta G_4 = 8,75$  ккал/моль) відрізняється від конформера **1** тим, що в ньому амінні водні «дивляться» у протилежний бік – від кільця. Виявлено три різних шляхи їхнього взаємного перетворення: два з них є низькоенергетичними (з енергією активації Гіббса

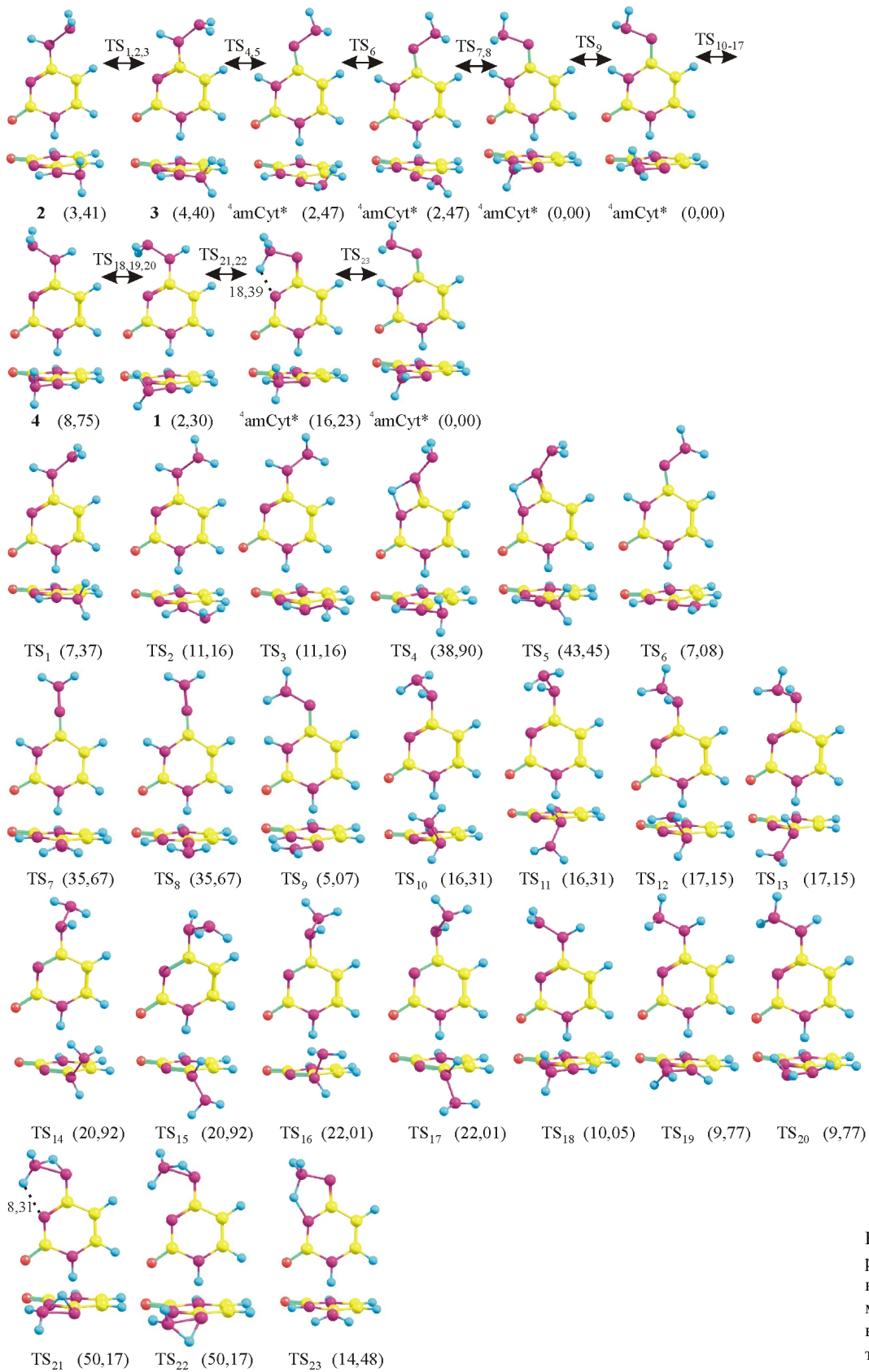


Рис. 2. Конформаційні перетворення <sup>4</sup>amCyt в основній і мутагенній таутомерній формах та його внутрішньомолекулярна таутомеризація

7,48 ккал/моль), дзеркально-симетричними та здійснюються поворотом аміногрупи  $\text{NH}_2$  навколо зв'язку  $\text{C4N4}$  за і проти годинникової стрілки через пару дзеркально-симетричних перехідних станів  $\text{TS}_{19}$  і  $\text{TS}_{20}$  з неплосинним екзоциклічним С-фрагментом  $\text{C4N4NH}_2$  ( $\text{N3C4N4N} = \pm 110,4^\circ$ ;  $\text{C4N4NH}_1 = \pm 50,0^\circ$ ;  $\text{C4N4NH}_2 = \pm 170,3^\circ$ ;  $\text{HN4N} = 117,6^\circ$ ; тут і нижче знаки « $\pm$ » при двограних кутах відповідають дзеркально-симетричним структурам – енантіомерам).

Високоенергетичніше взаємне перетворення конформерів **1** і **4**, якому відповідає енергія активації Гіббса 7,75 ккал/моль, відбувається за рахунок інверсії аміногрупи  $\text{NH}_2$  через плоскосиметричний перехідний стан  $\text{TS}_{18}$  із симетрією  $\text{C}_s$ , у якому атоми аміногрупи і атом  $\text{N4}$  лежать в одній площині, ортогональній до площини піримідинового кільця ( $\text{N3C4N4N} = 0,0^\circ$ ;  $\text{C4N4NH} = \pm 91,1^\circ$ ).

Серед решти конформерів енергетично вигіднішим є конформер **2** ( $\Delta G_2 = 2,30$  ккал/моль). Він перетворюється на свій високоенергетичний відповідник **3** ( $\Delta G_3 = 4,40$  ккал/моль) у три способи: низькоенергетичною інверсією аміногрупи через плоскосиметричний перехідний стан  $\text{TS}_1$  (симетрія  $\text{C}_s$ ), за якого атоми аміногрупи і атом  $\text{N4}$  лежать у площині, ортогональній площині піримідинового кільця ( $\text{C5C4N4N} = 0,0^\circ$ ;  $\text{C4N4NH} = \pm 88,0^\circ$ ), з енергією активації Гіббса 4,07 ккал/моль, та двома дзеркально-симетричними поворотами аміногрупи  $\text{NH}_2$  за і проти годинникової стрілки через пару дзеркально-симетричних перехідних станів  $\text{TS}_2$ ,  $\text{TS}_3$  з неплосинним екзоциклічним С-фрагментом  $\text{C4N4NH}_2$  ( $\text{C5C4N4N} = \pm 24,9^\circ$ ;  $\text{C4N4NH}_1 = \pm 49,3^\circ$ ;  $\text{C4N4NH}_2 = \pm 159,4^\circ$ ;  $\text{HN4N} = 104,1^\circ$ ), яким відповідає значно вища порівняно з інверсією аміногрупи енергія активації Гіббса 8,86 ккал/моль.

Дипольні моменти конформерів утворюють ряд:  $\mu_1$  (5,85 D) <  $\mu_2$  (6,63 D) <  $\mu_3$  (7,15 D) <  $\mu_4$  (7,65 D). Це означає, що при переході із вакууму в полярне середовище, зокрема, при інкорпорації у подвійну спіраль ДНК у такому ж порядку будуть стабілізуватися конформери  $^4\text{amCyt}$ .

Наше дослідження не підтвердило механізму внутрішньомолекулярної таутомеризації, запропонованого у роботі [17]. Енергетично найвигідніша внутрішньомолекулярна таутомеризація, якій від-

повідає енергія активації Гіббса 36,43 ккал/моль, – це міграція амінопротона при атомі  $\text{N4}$  конформера **2** через плоскосиметричні перехідні стани ( $\text{TS}_{4,5}$ ) на сусідній атом  $\text{N3}$  з утворенням пари дзеркально-симетричних мутагенних таутомерів, у яких група  $\text{NH}_2$  розміщена біля зв'язку  $\text{C5H}$  ( $\text{N1C6N6N} = \pm 179,1^\circ$ ;  $\text{C6N6NH}_1 = \pm 57,1^\circ$ ;  $\text{C6N6NH}_2 = \pm 174,1^\circ$ ;  $\text{HNH} = 107,4^\circ$ ). Варто наголосити при цьому, що мутагенний таутомер має на 0,94 ккал/моль нижчу енергію Гіббса, ніж канонічний. Взаємна перебудова згаданих енантіомерів відбувається через планарний перехідний стан  $\text{TS}_6$  з енергією активації Гіббса 5,01 ккал/моль.

Мутагенний таутомер  $^4\text{amCyt}$  (2,47 ккал/моль) може інактивізуватися, набувши конформації ( $\Delta G = 0,00$  ккал/моль), за якої аміногрупа розташована біля атома  $\text{N3}$ , перешкоджаючи спарюванню з  $\text{Ade}$ . Відповідний конформаційний перехід має енергію активації Гіббса 35,67 ккал/моль і здійснюється поворотом аміногрупи навколо подвійного зв'язку  $\text{C4=N4}$  через дзеркально-симетричні перехідні стани  $\text{TS}_7$  і  $\text{TS}_8$  ( $\text{N3C4N4N} = \pm 90,9^\circ$ ;  $\text{C4N4NH}_1 = \pm 116,0^\circ$ ;  $\text{C4N4NH}_2 = \pm 114,0^\circ$ ).

$^4\text{moCyt}$ . У канонічній (аміно) таутомерній формі ця сполука має лише два конформери, які різняться просторовим розташуванням оксиметильної групи (рис. 3). У низькоенергетичному конформері **1** ( $\Delta G_1 = 10,43$  ккал/моль) вона розміщена біля групи  $\text{C5H}$ , у високоенергетичному конформері **2** ( $\Delta G_2 = 12,69$  ккал/моль) – біля атома  $\text{N3}$ . Обидва конформери є суттєво неплосинними ( $\text{C2N3C4N4} = \pm 175,1^\circ$ ;  $\text{N3C4N4H} = \pm 25,2^\circ$ ;  $\text{N3C4N4O} = \pm 156,1^\circ$ ;  $\text{C4N4OC} = \pm 127,0^\circ$  та  $\text{C2N3C4N4} = \pm 176,3^\circ$ ;  $\text{N3C4N4H} = \pm 156,1^\circ$ ;  $\text{N3C4N4O} = \pm 23,6^\circ$ ;  $\text{C4N4OC} = \pm 94,2^\circ$  для конформерів **1** та **2** відповідно) і мають енантіомери. Вони попарно взаємно дзеркально-симетрично перетворюються через неплосинні перехідні стани  $\text{TS}_1$ ,  $\text{TS}_2$  і  $\text{TS}_{11}$ ,  $\text{TS}_{12}$ . Для конформера **1** маємо енергію активації Гіббса 5,66 ккал/моль і таку характеристику перехідного стану:  $\text{N3C4N4O} = \pm 160,4^\circ$ ;  $\text{C4N4OC} = \pm 141,4^\circ$ . Для конформера **2** подібні величини відповідно становлять 7,59 ккал/моль і  $\text{N3C4N4O} = \pm 13,5^\circ$ ;  $\text{C4N4OC} = \pm 143,8^\circ$ . У свою чергу конформери **1** і **2** взаємно дзеркально-симетрично перебудовуються (топологічно і енергетично нееквівалентно) внаслідок поворотів за і проти годин-

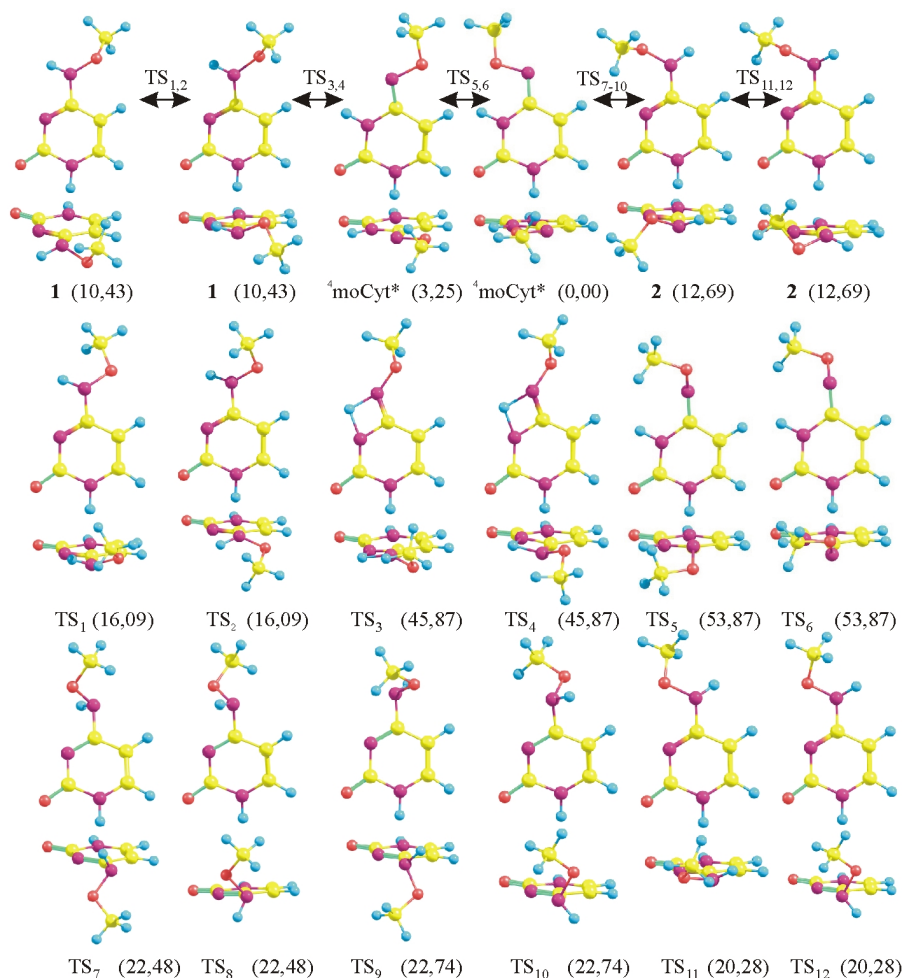


Рис. 3. Інтерконверсія <sup>4</sup>моСyt в основній і мутагенній таутомерній формах, внутрішньомолекулярна таутомеризація та конформаційні перетворення його мутагенного таутомера

никової стрілки атомного фрагмента N4HOCH<sub>3</sub> навколо екзоциклічного зв'язку C4N4 через неплосинні перехідні стани TS<sub>7,8</sub> (N3C4N4O = ±49,9°; N3C4N4H = ±61,4°; C4N4OC = ±119,3°) і TS<sub>9,10</sub> (N3C4N4O = ±115,8°; N3C4N4H = ±134,1°; C4N4OC = ±111,3°), яким відповідають енергії активації Гіббса 12,05 і 12,31 ккал/моль. Дипольні моменти конформерів близькі за абсолютною величиною: μ<sub>1</sub> (6,38 D) > μ<sub>2</sub> (6,22 D).

Внутрішньомолекулярна таутомеризація <sup>4</sup>моСyt здійснюється міграцією амінопротона при атомі N4 конформера **1** двома дзеркально-симетричними шляхами через непланарні перехідні стани TS<sub>3,4</sub> з енергією активації Гіббса 35,44 ккал/моль. При цьому мутагенний (іміно) таутомер має плоскосиметричну (симетрія C<sub>s</sub>) будову і на 7,18 ккал/моль меншу енергію Гіббса, ніж канонічний (амінний) таутомер.

Мутагенний таутомер <sup>4</sup>моСyt здатний інактивуватися, перейшовши у конформер (ΔG = 0,00 ккал/

моль), у якого амінна група розташована біля атома N3, заважаючи спарюванню з Ade. Відповідний конформаційний перехід супроводжується енергією активації Гіббса 53,87 ккал/моль і відбувається за рахунок повороту оксиметильної групи навколо подвійного зв'язку C4=N4 через два дзеркально-симетричних перехідних стани TS<sub>5,6</sub> (N3C4N4O = ±92,8°; C4N4OC = ±100,1°).

<sup>4</sup>hoСyt. У канонічній амінній таутомерній формі <sup>4</sup>hoСyt має два непланарних конформери, які відрізняються один від одного розташуванням гідроксильної групи відносно піримідинового кільця (рис. 4). Низькоенергетичний конформер **1** (ΔG<sub>1</sub> = 9,14 ккал/моль) охоплений доволі сильним (E<sub>НВ</sub> = 8,63 ккал/моль) внутрішньомолекулярним Н-зв'язком ОН...N3 за участі гідроксильної групи, яка «дивиться» у бік піримідинового кільця – атома N3. Енантіомери цього конформера взаємно перетворюються через площинний перехідний стан TS<sub>13</sub>

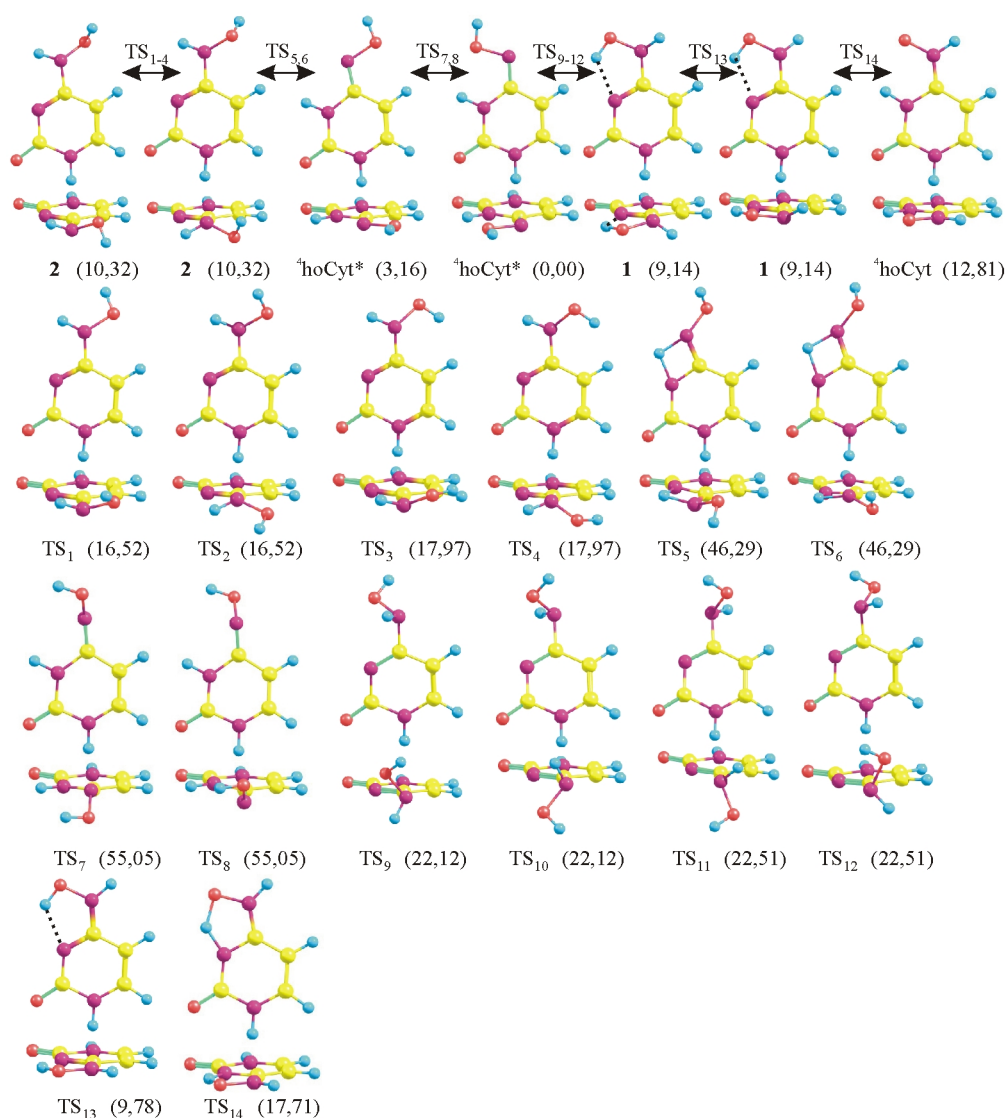


Рис. 4. Інтерконверсія <sup>4</sup>hoCyt в основній і мутагенній таутомерній формах, внутрішньомолекулярна таутомеризація та конформаційні перетворення його мутагенного таутомера

з енергією активації Гіббса 0,64 ккал/моль. Оскільки бар'єр перешкоджає навіть нульовому коливальному рівню, то конформер **1** є ефективно планарною структурою.

У високоенергетичному конформері **2** ( $\Delta G_2 = 10,32$  ккал/моль) гідроксильна група «дивиться» у протилежний від кільця бік і розташована біля зв'язку C5H; структура демонструє суттєву неплоскість за рахунок непланарності екзоциклічного фрагмента N4HOH ( $N3C4N4O = \pm 155,1^\circ$ ,  $C4N4OH = \pm 123,5^\circ$ ). Взаємне перетворення енантіомерів проходить по двох топологічно і енергетично нееквівалентних напрямках (за чи проти годинникової стрілки) – поворотом гідроксильної групи навколо одинарного зв'язку N4–O: поворотові групи OH у на-

прямку «від» C5H відповідає менша енергія активації Гіббса (6,20 ккал/моль), ніж поворотові навпаки – «до» групи C5H (7,65 ккал/моль). В обох випадках дзеркально-симетричні перехідні стани неплосинні:  $N3C4N4H = \pm 25,1^\circ$ ;  $N3C4N4O = \pm 159,5^\circ$ ;  $C4N4OH = \pm 142,9^\circ$  і  $N3C4N4H = \pm 19,7^\circ$ ;  $N3C4N4O = \pm 150,3^\circ$ ;  $C4N4OH = \pm 22,3^\circ$  для низько- (TS<sub>1,2</sub>) і високоенергетичних (TS<sub>3,4</sub>) станів відповідно.

Конформаційні переходи відповідних енантіомерів конформерів **1** і **2** (лівий у лівий, правий у правий) здійснюються внаслідок дзеркально-симетричних анізотропних повертань екзоциклічного фрагмента N4HOH навколо зв'язку C4N4 через неплосинні перехідні стани TS<sub>9,10</sub> і TS<sub>11,12</sub> з енергіями активації Гіббса 11,80 і 12,19 ккал/моль

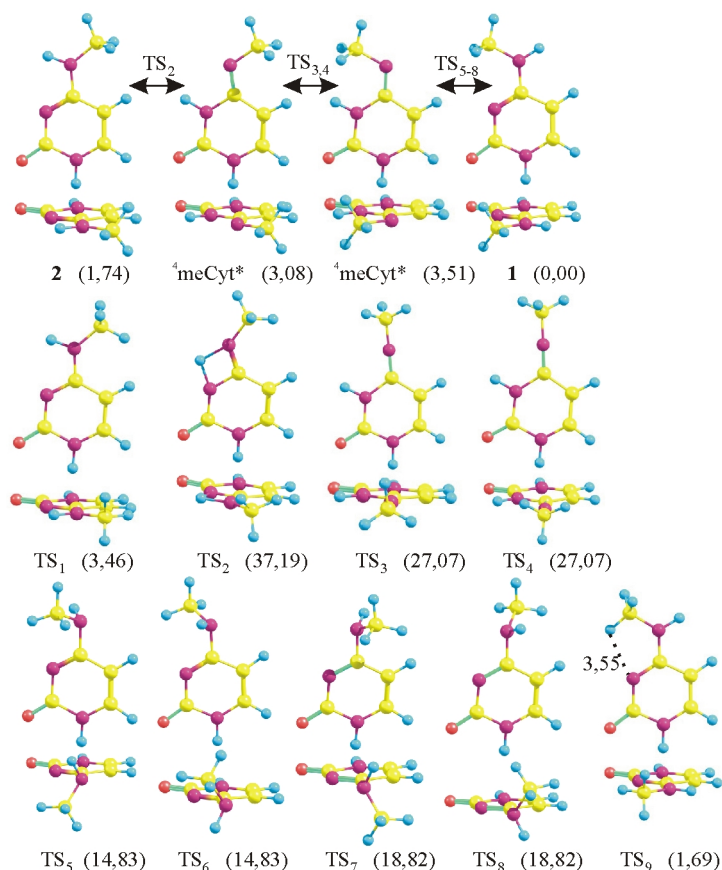


Рис. 5. Конформаційні перетворення <sup>4</sup>meCyt в основній і мутагенній таутомерній формах та внутрішньомолекулярна таутомеризація <sup>4</sup>meCyt (пунктиром позначено внутрішньомолекулярні Н-зв'язки)

(N3C4N4H = ±135,5°; N3C4N4O = ±114,0°; C4N4OH = ±112,7° і N3C4N4H = ±61,3°; N3C4N4O = ±50,1°; C4N4OH = ±121,3° відповідно).

У процесі внутрішньомолекулярної таутомеризації енантіомерів конформера **2** <sup>4</sup>hoCyt через два дзеркально-симетричних перехідних стани TS<sub>5,6</sub> з енергією активації Гіббса 35,97 ккал/моль утворюється мутагенний імінний таутомер з площинною будовою, який вигідніший, аніж стартовий, на 7,16 ккал/моль.

Мутагенний таутомер <sup>4</sup>hoCyt може інактивуватися, перейшовши у конформер ( $\Delta G = 0,00$  ккал/моль), у якого гідроксильна група розташована біля атома N3, заважаючи спарюванню з Ade. Відповідний конформаційний перехід має енергію активації Гіббса 55,05 ккал/моль і здійснюється поворотом гідроксильної групи навколо подвійного зв'язку C4=N4 через два дзеркально-симетричних перехідних стани TS<sub>7</sub> і TS<sub>8</sub> (N3C4N4O = ±92,5°; C4N4OH = ±107,1°).

<sup>4</sup>meCyt. Молекула має два – низькоенергетичний **1** ( $\Delta G_1=0$  ккал/моль) і високоенергетичний **2**

( $\Delta G_2 = 1,74$  ккал/моль) – плоскосиметричних конформери (рис. 5). У конформері **1** метильна група знаходиться біля атома азоту N3: один її СН-зв'язок лежить у тій самій площині, яка збігається з площиною симетрії молекули, що й амінозв'язок N4H. Два інших її зв'язки СН симетрично виходять із площини симетрії.

Енергія активації Гіббса повертання метильної групи на 60° навколо зв'язку N4C невелика і дорівнює 1,69 ккал/моль (перехідний стан TS<sub>9</sub>). У конформері **2** метильна група розміщена біля зв'язку C5H: знову ж таки, один її зв'язок СН є компланарним зв'язку N4H, а два інших, які «дивляться» у напрямку зв'язку C5H, виходять симетрично по обидва боки з площини симетрії молекули. Енергія активації Гіббса повертання метильної групи (на 60°) у цьому разі становить 1,72 ккал/моль (перехідний стан TS<sub>1</sub>).

Конформери **1** і **2** перебудовуються за рахунок двох анізотропних повертань екзоциклічного фрагмента N4HCH<sub>3</sub> навколо зв'язку C4N4. Менша енергія активації Гіббса (14,83 ккал/моль) відповідає дзер-

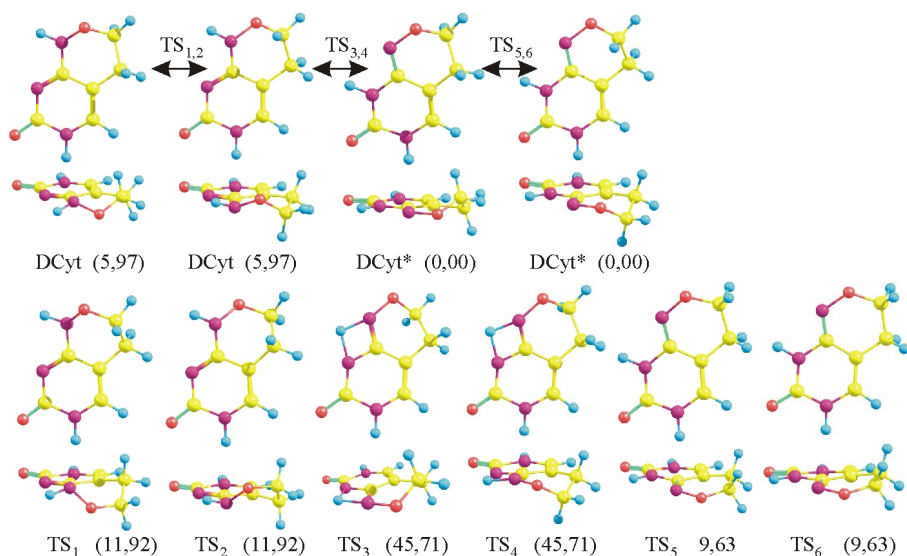


Рис. 6. Інтерконверсія DCyt в основній і мутагенній таутомерній формах, внутрішньомолекулярна таутомеризація та конформаційні перетворення його мутагенного таутомера

кально-симетричним неплосинним перехідним станом  $TS_5$  і  $TS_6$  ( $N3C4N4H = \pm 63,9^\circ$ ;  $N3C4N4C = \pm 56,1^\circ$ ), коли ВЕП амінного атома N4 направлена до групи C5H; більша енергія активації Гіббса (18,82 ккал/моль) відповідає неплосинним перехідним станом  $TS_{7,8}$  ( $N3C4N4H = \pm 113,8^\circ$ ;  $N3C4N4C = \pm 119,8^\circ$ ), коли ВЕП амінного атома N4 спрямована до групи N3.

Мутагенний імінний таутомер конформера **2**, у якого відносна енергія Гіббса вища на 1,34 ккал/моль, утворюється внутрішньомолекулярним перенесенням протона від атома N4 на атом N3 з енергією активації Гіббса 35,45 ккал/моль ( $TS_2$ ). Важливо зазначити, що стала таутомеризації  ${}^4meCyt$  (0,11) перевищує аналогічну величину для канонічної основи Cyt (2,52). Це означає, що заселеність рідкісних таутомерів  ${}^4meCyt$  щільніша порівняно з Cyt.

Мутагенний таутомер  ${}^4meCyt$  може інактивуватися, перейшовши у конформер ( $\Delta G = 3,51$  ккал/моль), у якого метильна група розташована біля зв'язку N3H, перешкоджаючи спарюванню з Ade. Відповідний конформаційний перехід має енергію активації Гіббса 23,99 ккал/моль і відбувається за рахунок повороту метильної групи навколо подвійного зв'язку C4=N4 через дзеркально-симетричні перехідні стани  $TS_{3,4}$  ( $N3C4N4H = \pm 81,5^\circ$ ).

*DCyt*. Ця молекула-мутаген демонструє «найскромніші» конформаційні можливості (рис. 6). У канонічному таутомерному стані вона має суттєво непланарну будову:  $N3C4N4H = \pm 25,7^\circ$ ;  $N3C4N4C =$

$\pm 156,6^\circ$ ;  $C4N4OC = \pm 59,6^\circ$ ;  $NOCC = \pm 68,5^\circ$ ;  $OCCC5 = \pm 47,1^\circ$ . Пара її енантіомерів дзеркально-симетрично перетворюється (лівий у лівий, правий у правий) через дзеркально-симетричні неплосинні перехідні стани  $TS_1$  і  $TS_2$  ( $N3C4N4H = \pm 17,1^\circ$ ;  $N3C4N4O = \pm 139,3^\circ$ ;  $C4N4OC = \pm 45,4^\circ$ ;  $NOCC = \pm 1,7^\circ$ ;  $OCCC5 = \pm 43,7^\circ$ ) з енергією активації Гіббса 5,95 ккал/моль. Внутрішньомолекулярна таутомеризація, яка відбувається двома дзеркально-симетричними шляхами з енергією активації Гіббса 39,74 ккал/моль, аміноформи DCyt у мутагенну таутомерну форму DCyt\* спричиняє помітне (на 5,97 ккал/моль) зниження енергії Гіббса. Мутагенний таутомер також є неплосинною структурою – його енантіомери змінюються через неплосинний перехідний стан  $TS_{5,6}$  ( $N3C4N4O = \pm 139,3^\circ$ ;  $C4N4OC = \pm 45,4^\circ$ ;  $NOCC = \pm 1,7^\circ$ ;  $OCCC5 = \pm 43,7^\circ$ ) з енергією активації Гіббса, меншою порівняно з канонічним таутомерним станом (9,63 ккал/моль).

**Висновки.** Вперше з використанням методів неемпіричної квантової хімії на рівні теорії MP2/6-311++G(2df,pd)//B3LYP/6-311++G(d,p) показано, що в усіх досліджених сполуках, окрім DCyt, модифікація заважає спарюванню як у мутагенній, так і в канонічній таутомерній формі з основою – партнером за взаємодією. Цей ефект може притлумлювати їхній мутагенний потенціал.

Встановлено також, що на вивчені молекули формально поширюється таутомерна гіпотеза Вотсона-



Основні кінетичні характеристики внутрішньомолекулярної таутомеризації досліджених мутагенів – похідних цитозину

Перехід	$\Delta\Delta G$ , ккал/моль	$k$ , с <sup>-1</sup>	$\tau$ , с	$\tau_{1/2}$ , с	$\Delta G$ , ккал/моль	$K$
<sup>4</sup> amCyt→ <sup>4</sup> amCyt*	35,49	5,74·10 <sup>-14</sup>	1,74·10 <sup>13</sup>	1,21·10 <sup>13</sup>	-0,94	4,90
<sup>4</sup> amCyt*→ <sup>4</sup> amCyt	36,43	1,17·10 <sup>-14</sup>	8,53·10 <sup>13</sup>	5,91·10 <sup>13</sup>	0,94	0,20
<sup>4</sup> meCyt→ <sup>4</sup> meCyt*	35,45	6,20·10 <sup>-14</sup>	1,61·10 <sup>13</sup>	1,12·10 <sup>13</sup>	1,34	0,11
<sup>4</sup> meCyt*→ <sup>4</sup> meCyt	34,11	5,92·10 <sup>-13</sup>	1,69·10 <sup>12</sup>	1,17·10 <sup>12</sup>	-1,34	9,55
<sup>4</sup> moCyt→ <sup>4</sup> moCyt*	35,44	6,33·10 <sup>-14</sup>	1,58·10 <sup>13</sup>	1,09·10 <sup>13</sup>	-7,18	1,85·10 <sup>5</sup>
<sup>4</sup> moCyt*→ <sup>4</sup> moCyt	42,62	3,43·10 <sup>-19</sup>	2,92·10 <sup>18</sup>	2,02·10 <sup>18</sup>	7,18	5,41·10 <sup>-6</sup>
DCyt→DCyt*	39,74	4,40·10 <sup>-17</sup>	2,27·10 <sup>16</sup>	1,57·10 <sup>16</sup>	-5,97	2,40·10 <sup>4</sup>
DCyt*→DCyt	45,71	1,83·10 <sup>-21</sup>	5,45·10 <sup>20</sup>	3,78·10 <sup>20</sup>	5,97	4,17·10 <sup>-5</sup>
<sup>4</sup> hoCyt→ <sup>4</sup> hoCyt*	35,97	2,58·10 <sup>-14</sup>	3,88·10 <sup>13</sup>	2,69·10 <sup>13</sup>	-7,16	1,79·10 <sup>5</sup>
<sup>4</sup> hoCyt*→ <sup>4</sup> hoCyt	43,13	1,44·10 <sup>-19</sup>	6,93·10 <sup>18</sup>	4,81·10 <sup>18</sup>	7,16	5,59·10 <sup>-6</sup>

Примітка.  $\Delta\Delta G$  – енергія активації Гіббса переходу;  $k$  – константа швидкості;  $\tau$  – час життя;  $\tau_{1/2}$  – час напівжиття;  $\Delta G$  – енергія таутомеризації Гіббса;  $K$  – стала таутомерної рівноваги.

Крика, оскільки час життя їхніх мутагенних таутомерів (таблиця) набагато перевищує характерний час, який витрачає машинерія біосинтезу ДНК на інкорпорацію однієї пари нуклеотидів. Можна сподіватися, що в рамках саме цієї гіпотези вдасться адекватно пояснити механізми мутагенної дії <sup>4</sup>amCyt, <sup>4</sup>moCyt, <sup>4</sup>hoCyt і DCyt, адже ці мутагени мають вигіднішу імінну таутомерну форму, ніж амінну.

O. O. Brovarets<sup>1,2</sup>, D. M. Hovorun<sup>1,2</sup>

Intramolecular tautomerization and the conformational variability of some classical mutagens – cytosine derivatives: quantum chemical study

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine  
150, Akademika Zabolotnoho St., Kyiv, Ukraine, 03680

<sup>2</sup>Institute of High Technologies, Taras Shevchenko National University of Kyiv  
2, korp.5, Pr. Akademika Hlushkova, Kyiv, Ukraine, 03127

Summary

**Aim.** To determine the lifetime of the mutagenic cytosine derivatives through the investigation of the physicochemical mechanisms of their intramolecular proton transfer. **Methods.** Non-empirical quantum chemistry, the analysis of the electron density by means of Bader's atoms in molecules (AIM) theory and physicochemical kinetics were used. **Results.** It is shown that the modification of all investigated compounds, except DCyt, prevents their pairing in both mutagenic and canonical tautomeric forms with a base which is an interacting partner. This effect can inhibit their mutagenic potential. It is also established that Watson-Crick tautomeric hypothesis can be formally ex-

panded for the investigated molecules so far as a lifetime of the mutagenic tautomers much more exceeds characteristic time for the incorporation of one nucleotides pair by DNA biosynthesis machinery. It seems that just within the frame of this hypothesis it will be possible to give an adequate explanation of the mechanisms of mutagenic action of N4-aminocytosine, N4-methoxycytosine, N4-hydroxycytosine and N4-dehydrocytosine, which have much more energy advantageous imino form in comparison with amino form. **Conclusions.** For the first time the comprehensive conformational analysis of a number of classical mutagens, namely cytosine derivatives, has been performed using the methods of non-empirical quantum chemistry at the MP2/6-311++G(2df,pd)//B3LYP/6-311++G(d,p) level of theory.

**Keywords:** point mutations of DNA, derivatives of cytosine, intramolecular tautomerization, Gibbs energy of activation, structural non-rigidity, analysis of the electron density topology.

O. A. Броварец, Д. Н. Говорун

Внутримолекулярная таутомеризация и конформационная изменчивость некоторых классических мутагенов – производных цитозина: квантово-химическое исследование

Резюме

**Цель.** Определить время жизни мутагенных производных цитозина, исследуя физико-химические механизмы их внутримолекулярной таутомеризации. **Методы.** Неэмпирическая квантовая химия, анализ топологии электронной плотности по Бейдэру, физико-химическая кинетика. **Результаты.** Показано, что у всех исследованных соединений, кроме DCyt, модификация препятствует спариванию как в мутагенной, так и в канонической таутомерной формах с основанием – партнером по взаимодействию. Этот эффект может ингибировать их мутагенный потенциал. Установлено также, что на изученные молекулы формально распространяется таутомерная гипотеза Уотсона-Крика, поскольку время жизни их мутагенных таутомеров намного превышает характерное время, используемое машинерией биосин-

теза ДНК на инкорпорацию одной пары нуклеотидов. Можно ожидать, что в рамках именно этой гипотезы удастся адекватно объяснить механизмы мутагенного действия N4-аминоцитозина, N4-метоксицитозина, N4-гидроксицитозина и N4-дегидроцитозина, так как эти мутагены имеют более энергетически выгодную иминную форму по сравнению с аминной. **Выводы.** Впервые с применением методов неэмпирической квантовой химии на уровне теории MP2/6-311++G(2df,pd)//B3LYP/6-311++G(d,p) проведен исчерпывающий конформационный анализ ряда классических мутагенов – производных цитозина.

**Ключевые слова:** точечные мутации ДНК, производные цитозина, внутримолекулярная таутомеризация, энергия активации Гиббса, структурная нежесткость, анализ топологии электронной плотности.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Janion C. The efficiency and extent of mutagenic activity of some new mutagens of base-analogue type // *Mutat. Res.*–1978.–**56**, N 3.–P. 225–234.
2. Janion C. Some problems of mutagenesis induced by base analogues // *Acta Biochim. Pol.*–1984.–**31**, N 1.–P. 183–192.
3. Negishi K., Harada C., Ohara Y., Oohara K., Nitta N., Hayatsu H. N4-aminocytidine, a nucleoside analog that has an exceptionally high mutagenic activity // *Nucl. Acids Res.*–1983.–**11**, N 15.–P. 5223–5233.
4. Nomura A., Negishi K., Hayatsu H., Kuroda Y. Mutagenicity of N4-aminocytidine and its derivatives in Chinese hamster lung V79 cells. Incorporation of N4-aminocytosine into cellular DNA // *Mutat. Res.*–1987.–**177**, N 2.–P. 283–287.
5. Negishi K., Bessho T., Hayatsu H. Nucleoside and nucleobase analog mutagens // *Mutat. Res.*–1994.–**318**, N 3.–P. 227–238.
6. Suzuki T., Moriyama K., Otsuka C., Loakes D., Negishi K. Template properties of mutagenic cytosine analogues in reverse transcription // *Nucl. Acids Res.*–2006.–**34**, N 22.–P. 6438–6449.
7. Reeves S. T., Beattie K. L. Base-pairing properties of N4-methoxydeoxycytidine 5'-triphosphate during DNA synthesis on natural templates, catalyzed by DNA polymerase I of *Escherichia coli* // *Biochemistry.*–1985.–**24**, N 9.–P. 2262–2268.
8. Takahashi M., Nishizawa M., Negishi K., Hanaoka F., Yamada M. A., Hayatsu H. Induction of mutation in mouse FM3A cells by N4-aminocytidine-mediated replicational errors // *Mol. Cell. Biol.*–1988.–**8**, N 1.–P. 347–352.
9. Hossain M. T., Chatake T., Hikima T., Tsunoda M., Sunami T., Ueno Y., Matsuda A., Takenaka A. Crystallographic studies on damaged DNAs: III. N4-methoxycytosine can form both Watson-Crick type and wobbled base pairs in a B-form duplex // *J. Biochem.*–2001.–**130**, N 1.–P. 9–12.
10. Moriyama K., Otsuka C., Loakes D., Negishi K. Highly efficient random mutagenesis in transcription-reverse-transcription cycles by a hydrogen bond ambivalent nucleoside 5'-triphosphate analogue: potential candidates for a selective anti-retroviral therapy // *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids.*–2001.–**20**, N 8.–P. 1473–1483.
11. Meervelt L. V., Lin P. K. T., Brown D. M. 6-(3,5-Di-O-acetyl-β-D-2-deoxyribofuranosyl)-3,4-dihydro-8H-pyrimido[4, 5-c][1, 2]-oxazin-7(6H)-one // *Acta. Crystallogr., Sect. C.*–1995.–**51**, N 7.–P. 1347–1350.
12. Popowska E., Janion C. The metabolism of N4-hydroxycytidine – a mutagen for *Salmonella typhimurium* // *Nucl. Acids Res.*–1975.–**2**, N 7.–P. 1143–1151.
13. Negishi K., Takahashi M., Yamashita Y., Nishizawa M., Hayatsu H. Mutagenesis by N4-aminocytidine: induction of AT to GC transition and its molecular mechanism // *Biochemistry.*–1985.–**24**, N 25.–P. 7273–7278.
14. Janion C., Glickman B. W. 4-hydroxycytidine: a mutagen specific for AT to GC transitions // *Mutat. Res.*–1980.–**72**, N 1.–P. 43–47.
15. Singer B., Spengler S. Ambiguity and transcriptional errors as a result of modification of exocyclic amino groups of cytidine, guanosine, and adenosine // *Biochemistry.*–1981.–**20**, N 5.–P. 1127–1132.
16. Takahashi M., Negishi K., Hayatsu H. Proofreading of a mutagenic nucleotide, N4-aminodeoxycytidylic acid, by *Escherichia coli* DNA polymerase I // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*–1987.–**143**, N 1.–P. 104–109.
17. Aida M., Negishi K., Hayatsu H., Maeda M. *Ab initio* molecular orbital study of the mispairing ability of a nucleotide base analogue, N4-aminocytosine // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*–1988.–**153**, N 2.–P. 552–557.
18. Les A., Adamowicz L., Rode W. Structure and conformation of N4-hydroxycytosine and N4-hydroxy-5-fluorocytosine. A theoretical *ab initio* study // *Biochim. Biophys. Acta.*–1993.–**1173**, N 1.–P. 39–48.
19. Brown D., Hewlins M., Schell P. The tautomeric state of N(4)-hydroxy- and N(4)-amino-cytosine derivatives // *J. Chem. Soc. Perkin 1.*–1968.–**15**–P. 1925–1929.
20. Fazakerley G. V., Gdaniec Z., Sowers L. C. Base-pair induced shifts in the tautomeric equilibrium of a modified DNA base // *J. Mol. Biol.*–1993.–**230**, N 1.–P. 6–10.
21. Singer B., Fraenkel-Conrat H., Abbott L. G., Spengler S. J. N4-Methoxydeoxycytidine triphosphate is in the imino tautomeric form and substitutes for deoxythymidine triphosphate in primed poly d[A-T] synthesis with *E. coli* DNA polymerase I // *Nucl. Acids Res.*–1984.–**12**, N 11.–P. 4609–4619.
22. Brovarets O. O., Hovorun D. M. How stable are the mutagenic tautomers of DNA bases? // *Biopolym. Cell.*–2010.–**26**, N 1.–P. 72–76.

UDC 577.3

Received 26.10.10