



УДК 577.2:577.3

Е. А. Гребнева

Три источника немишенных мутаций замены оснований, образующихся после облучения молекулы ДНК ультрафиолетовым светом

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины В. Н. Варюхиным)

В рамках полимеразной модели мутагенеза немишенными мутациями замены оснований образуются на неповрежденных участках ДНК, а единственной причиной их формирования являются спорадические ошибки ДНК-полимераз. Разработана полимеразно-таутомерная модель УФ-мутагенеза. Показано, что причиной образования немишенными мутаций замены оснований являются основания ДНК, находящиеся в определенных редких таутомерных формах. Во-первых, к немишенным мутациям может приводить пара оснований гуанин-цитозин, изменивших свое таутомерное состояние путем одновременного перехода протонов, участвующих в образовании первой и второй водородных связей. Такие редкие таутомерные состояния являются стабильными. Если участок ДНК, содержащий основания в таких редких таутомерных формах, будет синтезироваться с помощью модифицированных или специализированных ДНК-полимераз, то могут сформироваться транзиции G-C → A-T или гомологичные трансверсии G-C → C-G. Во-вторых, немишенными мутациями замены оснований могут образовываться, когда в обеих нитях ДНК находятся близко расположенные мутагенные цис-син циклобутановые пиримидиновые димеры. В этом случае к немишенным мутациям замены оснований будут приводить молекулы аденина и гуанина в редких таутомерных формах, находящиеся напротив мутагенных димеров. Они могут давать все виды транзиций и трансверсий. И, в-третьих, к различным немишенным мутациям замены оснований могут приводить основания ДНК в редких таутомерных формах, расположенных в небольшой окрестности от любых, в том числе канонических, циклобутановых пиримидиновых димеров.

Нестабильность генома, главная причина образования онкологических заболеваний, характеризуется аномально высоким уровнем образования немишенными и задерживающихся мутаций [1]. Немишенным мутагенезом называется ветвь SOS мутагенеза, когда мутации появляются, как предполагается, на неповрежденных участках ДНК [2]. Другими словами, под действием SOS-обстоятельств индуцируется мутаторная активность, что приводит к появ-

© Е. А. Гребнева, 2013

лению мутаций в “очевидном отсутствии повреждений ДНК”. К немишенному мутагенезу приводит работа ряда ДНК-полимераз. ДНК-полимераза IV способна вести безошибочный и ошибочный синтез через повреждение, она активно вызывает и немишенный, и мишенный SOS-мутагенез. Репликация “неповрежденной” молекулы ДНК с помощью ДНК-полимеразы pol V, UmuD', RecA и белка, связывающего одностороннюю ДНК, приводит к немишенному SOS-мутагенезу. При немишенном мутагенезе преобладают преимущественно мутации замены оснований. Кроме того, эти процессы характеризуются мутационной специфичностью, а именно высокой частотой образования трансверсий. Немишенные мутации появляются исключительно как ошибочное спаривание или как неспаренные основания [2]. Как правило, мутации образуются на местах димеров. Такой мутагенез называется мишенным [3]. Иногда мутации образуются в небольшой окрестности от димера, это — немишенный мутагенез [3]. Известно, что мутации возникают при склонной к ошибкам и SOS-репликации или репарации, когда ДНК-полимераза становится способной вести синтез на матрице, содержащей димеры [2–4].

Общепринятая в настоящее время парадигма связывает причину образования мутаций исключительно со спорадическими ошибками ДНК-полимераз [3]. Ряд исследователей на основании того факта, что существуют ДНК-полимеразы с низкой точностью синтеза, такие как ДНК-полимеразы IV и V *Escherichia coli*, объясняют причины появления мутаций, опираясь на так называемое “A-rule” [4]. Экспериментально было обнаружено, что полимеразы чаще всего встраивают аденин напротив сайтов, лишенных оснований, и напротив тиминных циклобутановых димеров. А напротив циклобутановых пиримидиновых димеров и (6–4) фотопродуктов, содержащих тимин и цитозин, ДНК-полимеразы чаще всего встраивают гуанин. Эти закономерности получили название “A-rule” [4]. Предполагается, что напротив димеров полимеразы встраивают некомплементарные основания, т. е. такие основания, которые не способны образовывать водородные связи с матричными основаниями. Однако подход, опирающийся исключительно на полимеразную парадигму, является ограниченным, противоречит ряду экспериментальных фактов и не дает возможности объяснить многие явления мутагенеза [5].

Поэтому была предпринята попытка разработать такую модель УФ-мутагенеза, которая бы учитывала все существующие в настоящее время структурные, квантово-механические и биологические данные и согласовывалась с ними [5–12]. Как известно, при облучении молекулы ДНК УФ-светом может изменяться таутомерное состояние входящих в нее оснований. Разработан механизм изменений таутомерных состояний оснований при облучении двухцепочечной ДНК УФ-светом [5–7]. Показано, что может образовываться пять редких таутомерных форм тимина и аденина [5, 7] и семь редких таутомерных форм цитозина и гуанина [6]. Изучены условия, при которых данные редкие таутомерные формы оснований ДНК будут устойчивыми [5]. Показано, что если пиримидиновые основания ДНК входят в состав *cis-cis* циклобутановых пиримидиновых димеров, то пиримидины в некоторых редких таутомерных формах могут приводить к мишенным мутациям замены оснований [8, 9].

В рамках полимеразно-таутомерной модели УФ-мутагенеза были изучены механизмы образования немишенных мутаций. Показано, что если основания ДНК в редких таутомерных формах находятся в небольшой окрестности от димера, то при склонном к ошибкам синтезе ДНК млекопитающих или SOS-синтезе бактерий они могут приводить к немишенным мутациям замены оснований. Разработано три механизма образования немишенных мутаций замены оснований.

1. Молекулярные механизмы образования немишеных УФ-мутаций замены оснований при репликации двухцепочечной ДНК, источником которых являются пары $G_1^*-C_1^*$. Как показывают квантово-механические расчеты [13], если образовалась пара оснований $G_1^*-C_1^*$, изменивших свое таутомерное состояние путем одновременного перехода протонов, участвующих в образовании первой и второй Н-связей (рис. 1, б), то такое редкое таутомерное состояние будет устойчивым.

Мутации возникают, когда синтез ДНК идет с помощью специализированных ДНК-полимераз, таких как ДНК-полимераза IV или ДНК-полимераза V *E. coli*, или с помощью конститутивных ДНК-полимераз, например ДНК-полимеразы III *E. coli*, когда работает механизм “скользящей скрепки”. Как было показано, при этом, так же как и при безошибочном синтезе, напротив матричных оснований встраиваются такие канонические основания, которые могут образовывать водородные связи с основаниями матрицы [5].

Если синтез молекулы ДНК, содержащей пары $G_1^*-C_1^*$, будет осуществляться с помощью модифицированных или специализированных ДНК-полимераз, то могут возникать транзиции $G-C \rightarrow A-T$ или гомологичные трансверсии $G-C \rightarrow C-G$. Такие повреждения (пары $G_1^*-C_1^*$) могут приводить к немишенным мутациям замены оснований. Этот вывод согласуется с известными экспериментальными данными. Пары $C_1^*-G_1^*$ и $G_1^*-C_1^*$ являются стабильными не только, когда они находятся в небольшой окрестности от димера, а на любом участке ДНК [13]. Этот факт имеет большие биологические следствия. Во всех случаях, когда синтез ДНК идет с помощью специализированных ДНК-полимераз, способных вести синтез через повреждение, эти пары будут давать транзиции или гомологичные трансверсии. Эти мутации будут более или менее равномерно распределены по молекуле ДНК [10].

2. Возможные молекулярные механизмы образования немишеных мутаций замены оснований, когда в обеих цепях ДНК образуются близко расположенные *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры. Было показано [6, 7], что при образовании *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров может изменяться таутомерное состояние входящих в них оснований (рис. 1, 2). Как показывает эксперимент, часто бывает, что *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры образуются в обеих нитях ДНК недалеко друг от друга [14]. Пусть, кроме того, у них произошло изменение таутомерных состояний входящих в них оснований. Тогда изменения таутомерных состояний произойдут не только у оснований, образовавших *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры, но и у спаренных с ними оснований [6, 7]. Редкие таутомерные формы аденинов или гуанинов будут стабильными из-за того, что они находятся в небольшой окрестности от циклобутановых пиримидиновых димеров. Это происходит потому, что нить ДНК в небольшой окрестности от циклобутановых пиримидиновых димеров искривляется и водородные связи между основаниями, входящими в циклобутановые пиримидиновые димеры и спаренные с ними основания, рвутся [15].

Когда мутагенные тиминные димеры имеются в обеих цепях ДНК недалеко друг от друга, то источником немишеных мутаций замены оснований являются молекулы аденина, находящиеся в редких таутомерных формах. Учтем, что при синтезе молекулы ДНК с помощью модифицированных или специализированных ДНК-полимераз напротив матричных оснований встраиваются такие канонические основания, которые могут образовывать водородные связи с основаниями матрицы [5]. Тогда, как показывает структурный анализ встраивания оснований, напротив аденина A_1^* можно встроить канонические молекулы только или цитозина, или аденина. Следовательно, аденин A_1^* может вызвать немишеные транзиции $A-T \rightarrow G-C$ или гомологичные трансверсии $A-T \rightarrow T-A$ [11].

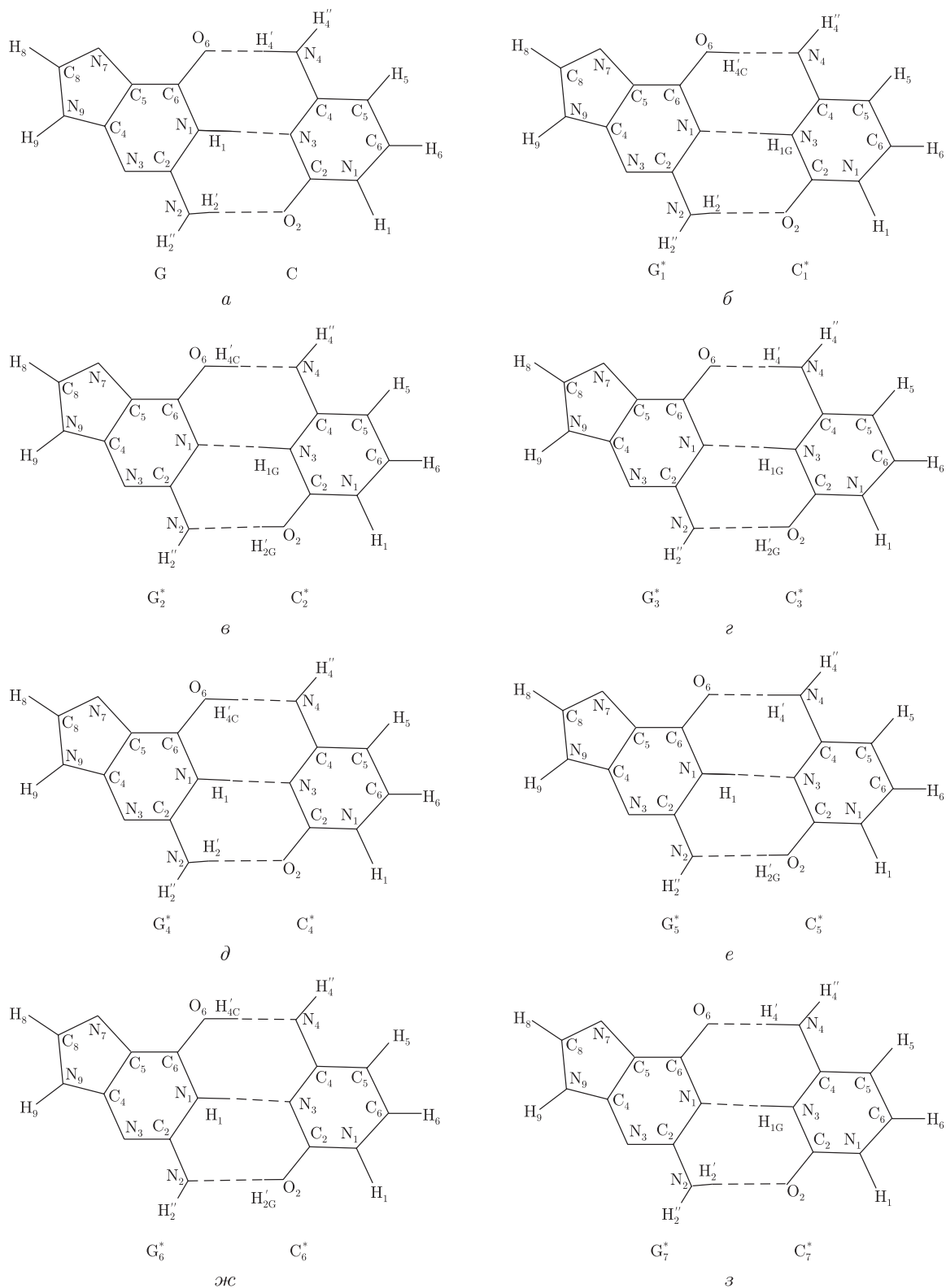


Рис. 1. Уотсон-криковская пара гуанин-цитозин (а) и возможные новые таутомерные состояния гуанина и цитозина, появляющиеся после облучения молекулы ДНК УФ-светом (б-з)

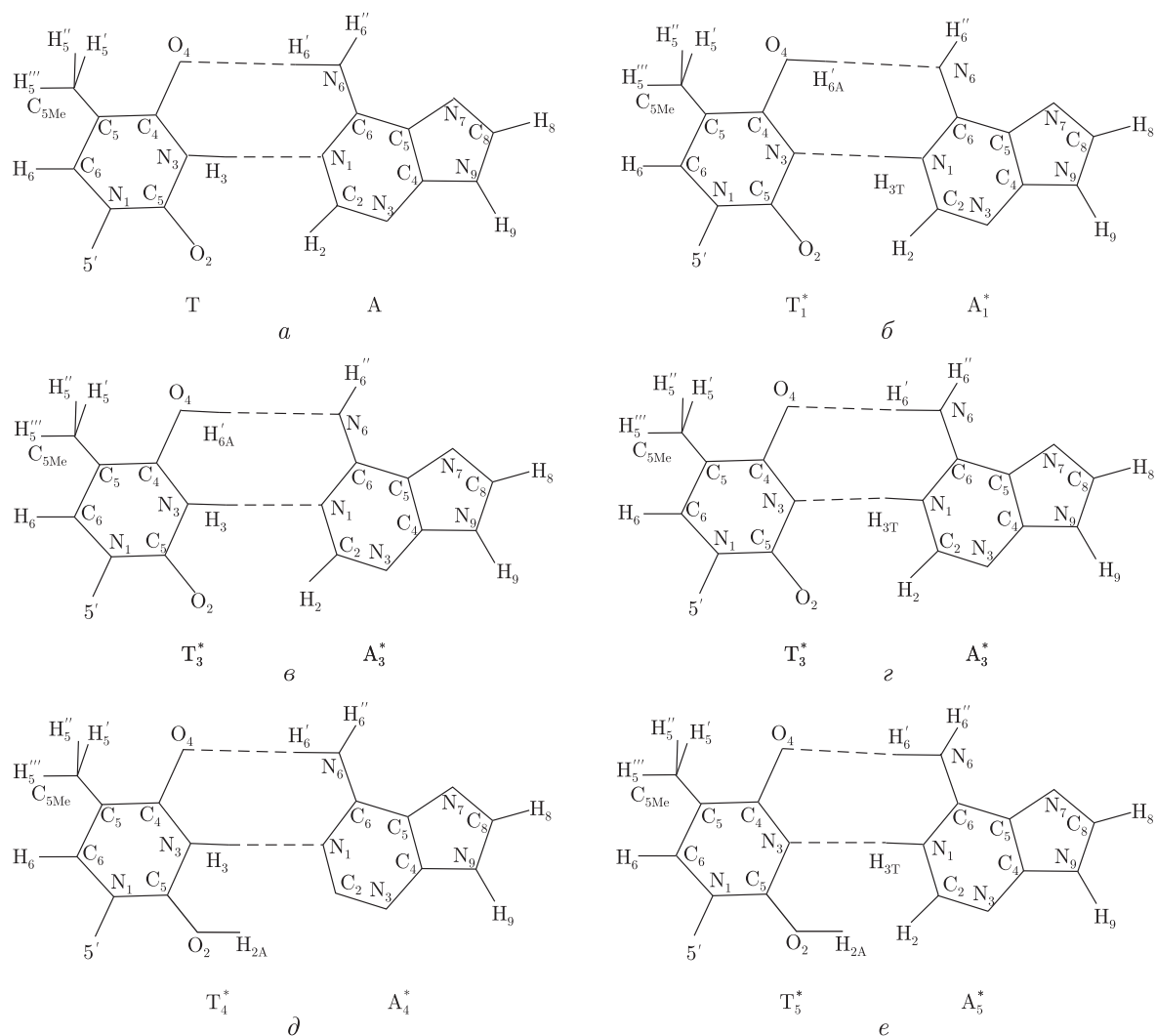


Рис. 2. Уотсон-криковская пара тимин–аденин (а) и возможные новые редкие таутомерные состояния тимина и аденина, появляющиеся после облучения молекулы ДНК УФ-светом (б–е)

Молекула гуанина G_1^* (см. рис. 1, б) может образовать водородные связи только с тиминном (рис. 3, а). Следовательно, возникнет немишенная транзигция $G-C \rightarrow A-T$. Молекула гуанина G_2^* (см. рис. 2, в) может образовать водородные связи или с тиминном (см. рис. 3, б), или с гуанином (см. рис. 3, в). Следовательно, это может привести к образованию немишенной транзигции $G-C \rightarrow A-T$ или немишенной гомологичной трансверсии $G-C \rightarrow C-G$ [12].

3. Природа и возможные механизмы образования УФ немишенных мутаций замены оснований, источником которых являются основания ДНК, находящиеся в редких таутомерных формах и не входящие в состав димеров. Как было показано, в результате склонной к ошибкам репликации млекопитающих или SOS-репликации бактерий *цис-син* циклобутановые цитозинные димеры CC_1^* , CC_2^* , $CC_2'^*$, CC_5^* и CC_6^* , в которых одно или оба основания находятся в редких таутомерных формах, могут возникать мишенные мутации замены оснований [8]. *Цис-син* циклобутановые цитозинные димеры CC_1^* и CC_2^* могут привести к транзигции $G-C \rightarrow A-T$ или к гомологичной трансверсии

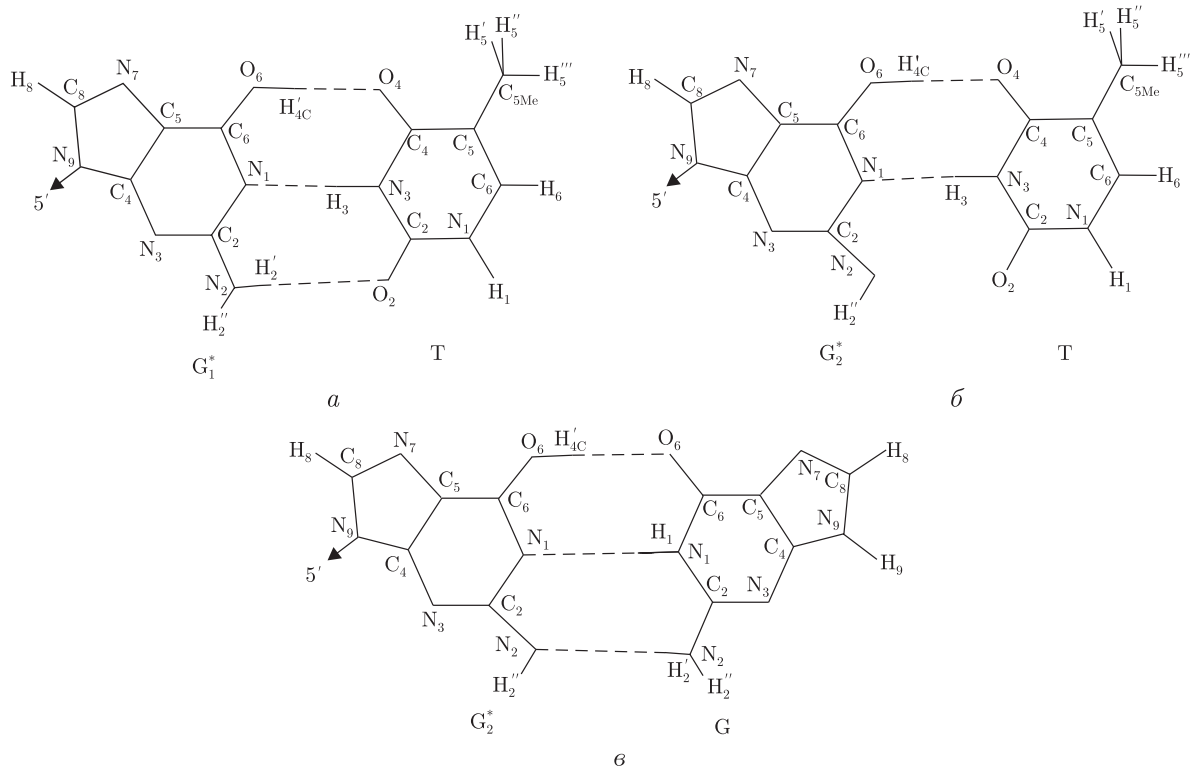


Рис. 3. Возможные пары оснований ДНК, образующиеся между основаниями в редких и канонических таутомерных конфигурациях. а – G_1^* и Т; б – G_2^* и Т; в – G_2^* и G

$G-C \rightarrow C-G$. *Цис-син* циклобутановый цитозиновый димер CC_5^* может вызвать трансверсию $G-C \rightarrow T-A$. А *цис-син* циклобутановый цитозиновый димер CC_6^* может привести к транзиции $G-C \rightarrow A-T$, гомологичной трансверсии $G-C \rightarrow C-G$, или к трансверсии $G-C \rightarrow T-A$ [8]. Также склонность к ошибкам или SOS-синтезу молекулы ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые тиминные димеры TT_1^* и TT_5^* , может привести к мишенным мутациям замены оснований [5, 9]. Так, *цис-син* циклобутановый тиминный димер TT_1^* может вызвать транзицию $A-T \rightarrow G-C$ или гомологичную трансверсию $A-T \rightarrow T-A$, а *цис-син* циклобутановый тиминный димер TT_5^* – трансверсию $A-T \rightarrow C-G$ или гомологичную трансверсию $A-T \rightarrow T-A$ [5, 9].

Если в небольшой окрестности от циклобутанового димера основания ДНК изменят свое таутомерное состояние, то все образовавшиеся редкие таутомерные формы оснований ДНК будут стабильными. Редкие таутомерные состояния оснований ДНК будут сохраняться, потому что из-за искривления нити ДНК водородные связи между спаренными основаниями, находящимися в противоположных нитях ДНК, могут разрываться [15]. Они будут сохраняться и во время синтеза молекулы ДНК [5]. Следовательно, если в небольшой окрестности от димера будут находиться цитозины C_1^* , C_2^* , C_5^* и C_6^* , гуанины G_1^* и G_2^* , тимины T_1^* и T_5^* или аденины A_1^* , то могут образоваться немишенные мутации замены оснований.

1. Niwa O. Radiation induced dynamic mutations and transgenerational effects // J. Radiat. Res. – 2006. – 47. – P. B25–B30.
2. Maor-Shoshani A., Rewen N. B., Tomer G., Livneh Z. Highly mutagenic replication by DNA polymerase V (UmuC) provides a mechanistic basis for SOS untargeted mutagenesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2000. – 97. – P. 565–570.

3. Tang M., Pham P., Shen X. et al. Roles of *Escherichia coli* DNA polymerase IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis // Nature. – 2000. – **404**. – P. 1014–1018.
4. Taylor J.-S. New structural and mechanistic insight into the A-rule and the instructional and non-instructional behavior of DNA photoproducts and other lesions // Mutat. Res. – 2002. – **510**, No 1. – P. 55–70.
5. Grebneva H. A. One of mechanisms of targeted substitution mutations formation at SOS-replication of double-stranded DNA containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers // Environ. Mol. Mutagen. – 2006. – **47**. – P. 733–745.
6. Гребнева Е. А. Механізми утворення потенціальних мутацій при формуванні цитозинових димерів в результаті облучення двохцепочечної ДНК ультрафіолетовим світлом // Доп. НАН України – 2001. – № 7. – С. 165–169.
7. Grebneva H. A. Nature and possible mechanisms formation of potential mutations arising at emerging of thymine dimers after irradiation of double-stranded DNA by ultraviolet light // J. Mol. Struct. – 2003. – **645**. – P. 133–143.
8. Гребнева Е. А. Мишенний мутагенез, викликаний цитозиновими димерами і механізм утворення мутацій основаній при SOS-реплікації після облучення двохцепочечної ДНК ультрафіолетовим світлом // Доп. НАН України. – 2001. – № 8. – С. 183–189.
9. Гребнева Е. А. Молекулярні механізми утворення мутацій заміни основаній при постреплікативній SOS-репарації двохцепочечної ДНК, що містить тимінові димери // Біополімери і клітина – 2001. – **17**, № 6. – С. 487–500.
10. Гребнева Е. А., Иванов М. О. Возможные молекулярные механизмы немишенного типа при SOS-репликации двухцепочечной ДНК // Там само. – 2001. – **17**, № 5. – С. 388–395.
11. Гребнева Е. А. Возможные молекулярные механизмы немишенного мутагенеза при постреплікативній SOS-репарації двохцепочечної ДНК, що містить в обох ланках тимінові димери // Там само. – 2002. – **18**, № 5. – С. 394–400.
12. Гребнева Е. А. Механізм утворення немишених мутацій заміни основаній при схлопнутому до помилок і SOS-синтезі двохцепочечної ДНК, що містить в обох ланках *cis-syn* циклобутанові цитозинові димери // Вісн. Донецьк. ун-ту. – 2011. – № 2. – С. 132–138.
13. Gorb L., Podolyan Y., Dziekonski P. et al. Double-proton transfer in adenine-thymine and guanine-cytosine base pairs. A post-Hartree-Fock *ab initio* study // J. Amer. Chem. Soc. – 2004. – **126**. – P. 10119–10129.
14. Canella K. A., Seidman M. M. Mutation spectra in supF: approaches to elucidating sequence context effects // Mutat. Res. – 2000. – **450**. – P. 61–73.
15. Raghunathan G., Kieber-Emmons T., Rein R., Alderfer J. L. Conformation features of DNA containing a *cis-syn* photodimer // J. Biomol. Struct. Dyn. – 1990. – **7**, No 4. – P. 899–913.

Донецкий физико-технический
институт НАН Украины

Поступило в редакцию 07.05.2012

О. А. Гребнева

Три джерела немішених мутацій зміни основ, що формуються після опромінювання молекули ДНК ультрафіолетовим світлом

В рамках полімеразної моделі мутагенезу передбачається, що немішенні мутації зміни основ формуються на непошкоджених ділянках ДНК, а єдиною причиною їх формування є спорадичні помилки ДНК-полімераз. Розроблено полімеразно-таутомерну модель УФ-мутагенезу. Показано, що причиною формування немішених мутацій зміни баз є основи ДНК, що знаходяться у певних рідких таутомерних формах. По-перше, до немішених мутацій може привести пара основ гуанін-цитозин, що змінила свій таутомерний стан за допомогою одночасного переходу протонів, які беруть участь у формуванні першого і другого водневого зв'язка. Такі рідкі таутомерні стани є стабільними. Якщо ділянка ДНК, що має основи у таких рідких таутомерних станах, буде синтезована за допомогою модифікованих або спеціалізованих ДНК-полімераз, то можуть сформуватися транзиції G–C → A–T або

гомологічні трансверсії $G-C \rightarrow C-G$. По-друге, немішенні мутації можуть виникати, коли в обох нитках ДНК знаходяться близько розташовані мутагенні *цис-син* циклобутанові піримідинові димери. В цьому випадку до немішенних мутацій зміни баз будуть приводити молекули аденіну або гуаніну в рідких таутомерних станах, що знаходяться навпроти мутагенних димерів. Вони можуть давати усі види транзицій і трансверсій. І, по-третє, до різних немішенних мутацій зміни баз можуть приводити основи ДНК у рідких таутомерних станах, що розташовані у невеликій віддалі від будь-яких, у тому числі канонічних, циклобутанових піримідинових димерів.

H. A. Grebneva

Three sources of untargeted substitution mutations arising under irradiation of a DNA molecule by ultraviolet light

*It is assumed now that untargeted substitution mutations are formed on undamaged DNA sites. In the polymerase paradigm, it is assumed that the only cause of untargeted substitution mutations is sporadic mistakes of DNA polymerases. In this paper, the polymerase – tautomer model of ultraviolet mutagenesis is developed. It is shown that the cause of the formation of untargeted substitution mutations is DNA bases in some rare tautomeric forms. The rare tautomeric state of the guanine – cytosine (G–C) pair, in which atoms of hydrogen of the first and second hydrogen bonds were simultaneously sent to the partners on hydrogen bonds, will be stable. It is shown that if the DNA with such damages is synthesized with the help of modified or specialize DNA polymerases, the G–C \rightarrow A–T transitions and G–C \rightarrow C–G homologous transversions can be formed. This guanine – cytosine pair in the rare tautomeric state is the first source of untargeted substitution mutations. Second, untargeted substitution mutations can be formed if the *cis-syn* cyclobutane pyrimidine dimers are closely located in both strands of DNA. In this case, adenines or guanines that are in some rare tautomeric forms and located opposite of the dimers can be a source of untargeted substitution mutations. They may give all types of substitution mutations. Third, DNA bases in rare tautomeric forms located in a close vicinity of any cyclobutane pyrimidine dimers can induce any untargeted substitution mutations.*