



УДК 577.2:577.3

Е. А. Гребнева

Механизмы образования мишенных сложных инсерций при синтезе молекулы ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые тиминовые димеры

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

*В настоящее время не ясен механизм образования сложных мутаций — таких мутаций, когда участок ДНК определенной длины и определенного нуклеотидного состава заменяется участком другой длины и другого состава. В рамках развиваемой полимеразно-таутомерной модели ультрафиолетового мутагенеза предложена модель механизма образования мишенных сложных инсерций, вызванных *цис-син* циклобутановыми тиминовыми димерами. Рассмотрен склонный к ошибкам или SOS-синтез двунитовой ДНК, содержащей в одной из своих нитей *цис-син* циклобутановые тиминовые димеры TT_1^* , TT_2^* и TT_5^* . *Цис-син* циклобутановый тиминовый димер TT_2^* приводит к появлению мутации сдвига рамки считывания, т. е. к вставке одного или нескольких нуклеотидов. А *цис-син* циклобутановые тиминовые димеры TT_1^* и TT_5^* приводят к появлению мутаций замены оснований. Таким образом, вследствие образования инсерции участок ДНК удлиняется, а вследствие образования нескольких мутаций замены оснований изменяется его нуклеотидный состав. В результате участок ДНК определенной длины и определенного нуклеотидного состава заменяется участком другой длины и другого нуклеотидного состава. Появляется мишенная сложная мутация.*

Ключевые слова: ультрафиолетовый мутагенез, полимеразно-таутомерная модель, мишенные сложные мутации, мишенные сложные инсерции, склонная к ошибкам репликация, SOS-репликация, редкие таутомерные формы оснований ДНК, *цис-син* циклобутановые тиминовые димеры.

Облучение молекулы ДНК ультрафиолетовым светом приводит к появлению фотопродуктов, чаще всего образуются *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры, в которых ориентация оснований относительно сахарофосфатного остова не изменяется. Они вызывают мутации замены оснований [1], сдвига рамки чтения [1, 2] и сложные мутации [3]. Когда мутации образуются напротив циклобутановых пиримидиновых димеров, такой мутагенез называется мишенным [4, 5]. Сложными мутациями называются такие мутации, когда участок ДНК определенной длины и определенного нуклеотидного состава заменяется

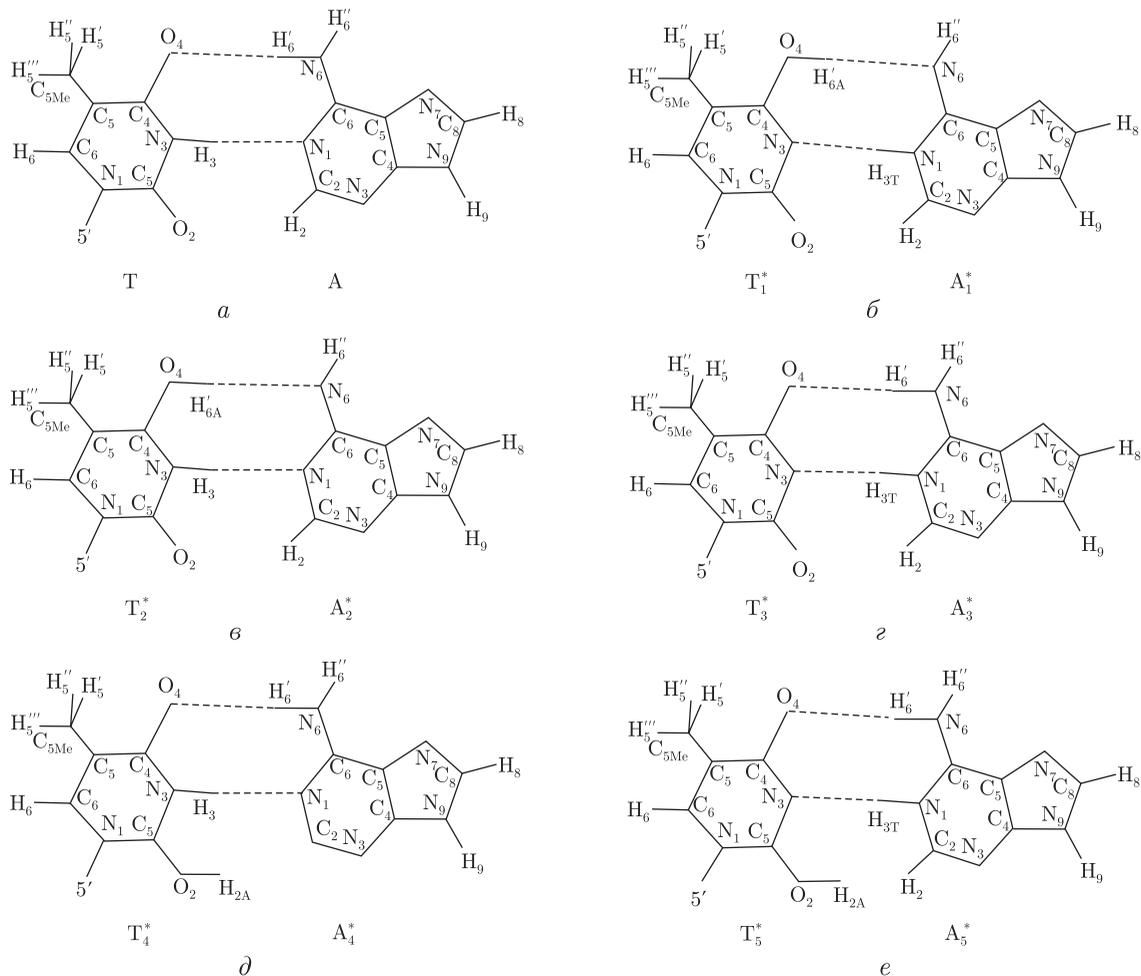


Рис. 1. Редкие таутомерные состояния тимина и аденина: а — уотсон-криковская пара аденин–тимин; б–е — возможные редкие таутомерные состояния тимина и аденина, появляющиеся после облучения молекулы ДНК ультрафиолетовым светом

участком другой длины и другого состава [3]. Новый участок может быть большей длины, чем первоначальный, тогда образовалась сложная инсерция. Если появился участок меньшей длины, то это — сложная делеция.

Автором была предложена и разрабатывается полимеразно-таутомерная модель ультрафиолетового мутагенеза [6–13]. Было показано, что при образовании *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров может изменяться таутомерное состояние входящих в них оснований [6, 7]. Возможно образование пяти новых редких таутомерных состояний тимина и аденина [7] и семи — гуанина и цитозина [6]. Они устойчивы, когда основания в редких таутомерных формах входят в состав *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров [7, 9]. Это происходит потому, что нить ДНК, содержащая циклобутановые димеры, искривляется и водородные связи между основаниями рвутся [14]. Кроме того, редкие таутомерные состояния будут стабильными во время синтеза ДНК, когда нить ДНК некоторое время находится в одонитевой форме и некоторое время контактирует с молекулами воды [7, 9]. На рис. 1 изображены возможные редкие таутомерные формы тимина и аденина. Оказалось,

Тиминовый димер TT_2^* может вызывать мишенную инсерцию [10, 11], другими словами, приводить к вставке одного или нескольких нуклеотидов. Напротив *цис-син* циклобутанового димера TT_2^* появится брешь в один нуклеотид. Брешь образуется напротив тимина T_2^* (см. рис. 2, б). Конец нити ДНК может сползти, тем более что недалеко от *цис-син* циклобутанового тиминового димера TT_2^* есть еще циклобутановые димеры, поскольку напротив таких димеров цепь искривляется [14] и водородные связи между основаниями, находящимися в противоположных нитях ДНК, рвутся (см. рис. 2, в). Так как события происходят на однородном участке ДНК, то конец нити может соединиться водородными связями с соседним участком так, что появится большая петля (см. рис. 2, г). Появившаяся новая большая брешь обычно застраивается с помощью конститутивных ДНК-полимераз (см. рис. 2, д), что и приведет к вставке нескольких нуклеотидов, образуется мишенная инсерция. При застройке этой бреши будет встроено четыре нуклеотида. Один из них встраивается напротив тимина T_2^* , который входит в *цис-син* циклобутановый тиминовый димер TT_2^* и напротив которого была брешь в один нуклеотид. Следовательно, дополнительно встроено три нуклеотида, образовалась инсерция в три нуклеотида. Таким образом, участок ДНК, состоящий из 18 нуклеотидов $ATTGTTTTTTTTTATTGT$, заменяется участками ДНК, состоящими из 21 нуклеотида $ATA(G)GTTTTTTTTTTC(A)TATG(A)GT$.

При образовании мишенных мутаций замены оснований один и тот же *цис-син* циклобутановый тиминовый димер может приводить к нескольким различным мутациям, транзициям или трансверсиям [9]. По этой причине на одном и том же участке ДНК, при увеличении длины участка ДНК на три нуклеотида, могут появиться различные мишенные сложные мутации. Участок ДНК, состоящий из 18 нуклеотидов $ATTGTTTTTTTTTATTGT$, может превратиться в восемь различных участков ДНК, длиной в 21 нуклеотид, а именно: или $ATAGTTTTTTTTTCTATGGT$, или $ATAGTTTTTTTTTTATATGGT$, или $ATAGTTTTTTTTTCTATAGT$, или $ATAGTTTTTTTTTTATATAGT$, или $ATGGTTTTTTTTTCTATGGT$, или $ATGGTTTTTTTTTTATATGGT$, или $ATGGTTTTTTTTTCTATAGT$, или $ATGGTTTTTTTTTTATATAGT$.

Образование сложных мутаций при склонном к ошибкам или SOS-синтезе молекулы ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые тиминовые димеры, когда длина участка ДНК увеличивается на один нуклеотид. Чаще всего появляются инсерции в один нуклеотид. Поэтому посмотрим, как могут появляться сложные мутации при увеличении длины участка ДНК на один нуклеотид (рис. 3). Для этого рассмотрим участок ДНК следующего нуклеотидного состава $ATTGTTTTTATTC$, состоящий из 13 нуклеотидов. Пусть в результате облучения молекулы ДНК образовались *цис-син* циклобутановые тиминовые димеры TT_1^* , TT_2^* и TT_5^* , расположенные так, как показано на рис. 3, а. Тогда в противоположной нити ДНК напротив T_1^* будет находиться A_1^* , напротив T_2^* — A_2^* , напротив T_5^* — A_5^* (см. рис. 3, а). Поскольку эта нить ДНК не содержит циклобутановых димеров, то она будет синтезироваться безошибочным образом и, следовательно, к мутациям не приведет. Поэтому в дальнейшем она не рассматривается. Так как кодирующая нить молекулы ДНК, изображенной на рис. 3, а, содержит несколько *цис-син* циклобутановых тиминовых димеров, то, если эти димеры не будут удалены в результате репарации, данный участок ДНК будет синтезироваться с помощью модифицированных или специализированных ДНК-полимераз.

Как было показано при изучении механизмов образования мишенных мутаций замены оснований [9], напротив тимина в редкой таутомерной форме T_1^* невозможно встроить канонический аденин так, чтобы между тимином T_1^* и каноническим аденином образова-

Напротив *цис-син* циклобутанового димера TT_2^* появится брешь в один нуклеотид (см. рис. 2, б). Конец нити ДНК может сползти, тем более что недалеко от *цис-син* циклобутанового тиминового димера TT_2^* есть еще циклобутановые димеры, так как напротив таких димеров цепь искривляется [14] и водородные связи между основаниями, находящимися в противоположных нитях ДНК, рвутся (см. рис. 2, в). Поскольку описываемые события происходят на участке с однородным нуклеотидным составом, то при соединении нить ДНК может образовать небольшую петлю (см. рис. 2, г). Если эта нить ДНК соединится со следующим основанием ДНК в противоположной нити, то брешь расширится до двух нуклеотидов (см. рис. 2, з). При застройке этой бреши с помощью конститутивных ДНК-полимераз образуется вставка из одного нуклеотида — мишенная инсерция в один нуклеотид (см. рис. 2, д). При репликации нити ДНК, не содержащей циклобутановых димеров, появится участок ДНК, состоящий из 14 нуклеотидов АТС(А)ГТТТТТТАГ(А)ТС. Таким образом, участок ДНК АТТГТТТТТАТТС, состоящий из 13 нуклеотидов, превратится в участок АТС(А)ГТТТТТТАГ(А)ТС, состоящий из 14 нуклеотидов.

При образовании мишенных мутаций замены оснований один и тот же *цис-син* циклобутановый тиминового димер может приводить к нескольким различным мутациям, транзициям или трансверсиям [9]. По этой причине, на одном и том же участке ДНК, при увеличении длины участка ДНК на один нуклеотид, могут появиться различные мишенные сложные мутации. Участок АТТГТТТТТАТТС длиной в 13 нуклеотидов может превратиться в четыре различных участка ДНК длиной в 14 нуклеотидов, а именно: или АТСГТТТТТТАГТС, или АТСГТТТТТТААТС, или АТАГТТТТТТТАГТС, или АТАГТТТТТТТААТС.

Таким образом, в рамках развиваемой автором полимеразно-таутомерной модели ультрафиолетового мутагенеза предлагается модель механизма образования мишенных сложных инсерций, вызванных *цис-син* циклобутановыми тиминовыми димерами. Рассмотрен склонный к ошибкам или SOS-синтез двунитевой ДНК, содержащей в одной из своих нитей *цис-син* циклобутановые тиминового димеры TT_1^* , TT_2^* и TT_5^* .

Мишенные сложные мутации, вызванные *цис-син* циклобутановыми тиминовыми димерами, появляются, когда на данном участке ДНК имеется участок с однородным нуклеотидным составом и, кроме того, образуется несколько *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров. Причем обязательно образуется хотя бы один *цис-син* циклобутановый тиминового димер TT_2^* и обязательно появляются один или несколько *цис-син* циклобутановых тиминового димеров TT_1^* или TT_5^* .

Цис-син циклобутановый тиминового димер TT_2^* приводит к появлению мутации сдвига рамки считывания, т. е. к вставке одного или нескольких нуклеотидов. А *цис-син* циклобутановые тиминового димеры TT_1^* и TT_5^* приводят к появлению мутаций замены оснований. Таким образом, вследствие образования инсерции участок ДНК удлиняется, а вследствие образования нескольких мутаций замены оснований изменяется его нуклеотидный состав. В результате участок ДНК определенной длины и определенного нуклеотидного состава заменяется участком другой длины и другого нуклеотидного состава. Появляется сложная мутация. А поскольку и инсерция и мутации замены оснований появились напротив *цис-син* циклобутановых тиминового димеров, то все они относятся к мишенному типу. Следовательно, и сложная мутация относится к мишенным мутациям.

В английском языке сложная мутация называется complex mutation, что в буквальном переводе означает комплексная мутация. Это название, по мнению автора, точно отражает

суть явления. Действительно, как показано в данной работе, комплексная мутация образуется тогда и только тогда, когда на данном участке ДНК появляется несколько мутаций, причем одна из них — обязательно мутация сдвига рамки считывания, а остальные — обязательно мутации замены оснований. Поэтому автор предлагает называть сложные мутации комплексными мутациями.

Таким образом, полимеразно-таутомерная модель ультрафиолетового мутагенеза способна объяснить механизмы образования потенциальных мутаций, мишенных мутаций замены оснований, мишенных мутаций сдвига рамки считывания, мишенных сложных мутаций, немисшенных мутаций замены оснований и механизмы возникновения горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза.

Цитируемая литература

1. Wang C.-I., Taylor J.-S. In vitro evidence that UV-induced frameshift and substitution mutations at T tracts are the result of misalignment-mediated replication past a specific thymine dimer // *Biochemistry*. – 1992. – **31**. – P. 3671–3681.
2. Abdulovic A. L., Jinks-Robertson S. The *in vivo* characterization of translesion synthesis across UV-induced lesions in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into Pol ζ - and Pol η -dependent frameshift mutagenesis // *Genetics*. – 2006. – **172**. – P. 1487–1498.
3. Levine J. G., Schaaper R. M., DeMarini D. M. Complex frameshift mutations mediated by plasmid pKM101: mutational mechanisms deduced from 4-aminobiphenyl-induced mutation spectra in *Salmonella* // *Genetics*. – 1994. – **136**. – P. 731–746.
4. Horsfall M. J., Borden A., Lawrence C. W. Mutagenic properties of the T-C cyclobutane dimer // *J. Bacteriol.* – 1997. – **179**. – P. 2835–2839.
5. Kunz B. A., Glickman B. W. The role of pyrimidine dimers as premutagenic lesions: a study of targeted vs. untargeted mutagenesis in the *lacI* gene of *Escherichia coli* // *Genetics*. – 1984. – **106**. – P. 347–364.
6. Гребнева Е. А. Механизмы образования потенциальных мутаций при формировании цитозинового димера в результате облучения двухцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом // *Доп. НАН України*. – 2001. – № 7. – С. 165–169.
7. Grebneva H. A. Nature and possible mechanisms of 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. Мишенный мутагенез, вызванный цитозиновыми димерами и механизм образования мутаций замены оснований при SOS-репликации после облучения двухцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом // *Доп. НАН України*. – 2001. – № 8. – С. 183–189.
9. 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.
10. Гребнева Е. А. Механизмы мишенных мутаций сдвига рамки считывания – появление инсерций при склонном к ошибкам или SOS синтезе молекулы ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые тиминные димеры // *Молекуляр. биология*. – 2014. – **48**. – С. 531–542.
11. Гребнева Е. А. Механизм образования мишенных инсерций при синтезе молекулы ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые цитозинового димеры // *Доп. НАН України*. – 2014. – № 11. – С. 156–164.
12. Гребнева Е. А. Три источника немисшенных мутаций замены оснований, образующихся после облучения молекулы ДНК ультрафиолетовым светом // *Доп. НАН України*. – 2013. – № 1. – С. 143–150.
13. Гребнева Е. А. Природа и механизмы образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза // *Доп. НАН України*. – 2012. – № 10. – С. 181–187.
14. Raghunathan G., Kieber-Emmons T., Rein R., Alderfer J. L. Conformation features of DNA containing a *cis-syn* photodimer // *J. Biomol. Struct. Dynam.* – 1990. – **7**. – P. 899–913.
15. Shibutani S., Takeshita M., Grollman A. P. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxoG // *Nature*. – 1991. – **349**. – P. 431–434.

References

1. Wang C.-I., Taylor J.-S. Biochemistry, 1992, **31**: 3671–3681.
2. Abdulovic A. L., Jinks-Robertson S. Genetics, 2006, **172**: 1487–1498.
3. Levine J. G., Schaaper R. M., DeMarini D. M. Genetics, 1994, **136**: 731–746.
4. Horsfall M. J., Borden A., Lawrence C. W. J. Bacteriol., 1997, **179**: 2835–2839.
5. Kunz B. A., Glickman B. W. Genetics, 1984, **106**: 347–364.
6. Grebneva H. A. Dopov. NAN Ukraine, 2001, No 7: 165–169 (in Russian).
7. Grebneva H. A. J. Mol. Struct., 2003, **645**: 133–143.
8. Grebneva H. A. Dopov. NAN Ukraine, 2001, No 8: 183–189 (in Russian).
9. Grebneva H. A. Environ. Mol. Mutagen, 2006, **47**: 733–745.
10. Grebneva H. A. Molecular. Biology (Mosk.), 2014, **48**: 457–467.
11. Grebneva H. A. Dopov. NAN Ukraine, 2014, No 11: 156–164 (in Russian).
12. Grebneva H. A. Dopov. NAN Ukraine, 2013, No 1: 143–150 (in Russian).
13. Grebneva H. A. Dopov. NAN Ukraine, 2012, No 10: 181–187 (in Russian).
14. Raghunathan G., Kieber-Emmons T., Rein R., Alderfer J. L. J. Biomol. Struct. Dynam., 1990, **7**: 899–913.
15. Shibutani S., Takeshita M., Grollman A. P. Nature, 1991, **349**: 431–434.

Донецкий физико-технический институт
и.м. А. А. Галкина НАН Украины

Поступило в редакцию 24.12.2014

О. А. Гребнева

Механізми формування мішенних складних інсерцій при синтезі молекули ДНК, що містить *цис-син* циклобутанові тимінові димери

Донецкий физико-технический институт им. О. О. Галкина НАН Украины

У даний час не зрозумілий механізм формування складних мутацій — таких мутацій, коли ділянка ДНК певної довжини і певного нуклеотидного складу замінюється ділянкою іншої довжини та іншого складу. У рамках розробленої полімеразно-таутомерної моделі ультрафіолетового мутагенезу запропоновано модель механізму утворення мішенних складних інсерцій, викликаних *цис-син* циклобутановими тиміновими димерами. Розглянуто схильний до помилок або SOS-синтез двочиткової ДНК, що містить в одній зі своїх ниток *цис-син* циклобутанові тимінові димери TT_1^* , TT_2^* та TT_5^* . *Цис-син* циклобутановий тиміновий димер TT_2^* призводить до появи мутації зсуву рамки зчитування, тобто до вставки одного або декількох нуклеотидів. А *цис-син* циклобутанові тимінові димери TT_1^* і TT_5^* призводять до появи мутацій заміни основ. Таким чином, внаслідок утворення інсерції ділянка ДНК подовжується, а внаслідок утворення кількох мутацій заміни основ змінюється його нуклеотидний склад. У результаті ділянка ДНК певної довжини і певного нуклеотидного складу замінюється ділянкою іншої довжини та іншого нуклеотидного складу. З'являється мішенна складна мутація.

Ключові слова: ультрафіолетовий мутагенез, полімеразно-таутомерна модель, мішенні складні мутації, мішенні складні інсерції, схильна до помилок реплікація, SOS-реплікація, основи ДНК у рідких таутомерних формах, *цис-син* циклобутанові тимінові димери.

H. A. Grebneva

Mechanisms of formation of targeted complex insertions under the synthesis of a DNA molecule containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers

O. O. Galkin Donetsk Institute of Physics and Engineering of the NAS of Ukraine

The mechanism of formation of complex mutations has not been yet explained. Mutations are called complex if a DNA site with certain length and certain nucleotide composition is replaced by that with different length and different nucleotide composition. The author has proposed and developed a polymerase-tautomeric model of ultraviolet mutagenesis. The mechanism of formation of targeted complex insertions that are caused by cis-syn cyclobutane thymine dimers is proposed. The error-prone or SOS-synthesis of double-stranded DNA containing cis-syn cyclobutane thymine dimers TT_1^ , TT_2 , and TT_5^* in one of its strands is considered. Cis-syn cyclobutane thymine dimers TT_2^* lead to frameshift mutations, i. e., to the insertions of one or more nucleotides. Cis-syn cyclobutane thymine dimers TT_1^* and TT_5^* cause the formation of substitution mutations. Thus, due to the formation of a DNA insertion, its portion is extended, and its nucleotide composition varies due to the formation of several base substitution mutations. As a result, a DNA portion with certain length and nucleotide composition is replaced by that with different length and different nucleotide composition. A targeted complex mutation appears.*

Keywords: ultraviolet mutagenesis, polymerase-tautomeric model, targeted complex mutations, targeted complex insertions, error-prone replication, SOS replication, rare tautomeric forms of DNA bases, *cis-syn* thymine cyclobutane dimers.