

Е. А. Гребнева

Механизмы образования мишеных инсерций при синтезе молекулы ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые цитозиновые димеры

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

*В рамках развиваемой полимеразно-таутомерной модели ультрафиолетового мутагеназа предлагается модель механизма образования мишеных инсерций, вызванных *цис-син* циклобутановыми цитозиновыми димерами. Инсерции — это мутации сдвига рамки чтения, когда встраивается одно или несколько оснований ДНК. Структурный анализ встраивания оснований показал, что напротив двух редких таутомерных форм цитозина невозможно встроить ни одно из канонических оснований так, чтобы между ними и матричными основаниями образовались водородные связи. Поэтому при синтезе молекулы ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые цитозиновые димеры, содержащие молекулы цитозина в таких редких таутомерных формах, специализированные или модифицированные ДНК-полимеразы напротив этих *цис-син* циклобутановых цитозиновых димеров будут оставлять бреши в один нуклеотид. На участках ДНК с однородным нуклеотидным составом, в соответствии с моделью Стрейзингера, конец нити ДНК может сползти, соединиться с помощью водородных связей так, что образуется петля. В результате дочерняя нить удлиняется, появляется мишенная мутация сдвига рамки чтения — мишенная инсерция.*

В результате облучения молекулы ДНК ультрафиолетовым светом образуются циклобутановые пиримидиновые димеры или (6–4)-аддукты. Чаще всего образуются *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры, в которых ориентация оснований относительно сахаро-фосфатного остова не изменяется. Они вызывают мутации замены оснований, сдвига рамки чтения и сложные мутации [1]. Мутации сдвига рамки часто составляют около половины всех мутаций. Как хорошо известно, молекула ДНК представляет собой текст, в котором роль букв играют основания ДНК четырех типов (аденин, гуанин, цитозин, тимин), слова всегда состоят из трех букв и записаны сплошным текстом без пробелов и практически без знаков препинания. Каждое слово кодирует одну аминокислоту, которая, в свою очередь, является кирпичиком для построения белков. Если на некотором участке ДНК будет встроено или удалено одно или несколько оснований (не кратное трем), то весь огромный участок ДНК от места повреждения до терминирующего кодона (играющего роль точки) изменит свой смысл. Если такие повреждения произойдут на участке ДНК, кодирующем белки, то в результате будут синтезированы неправильные белки, как правило, биологически неактивные, в большинстве случаев это приведет к гибели клетки. Если встроено одно или несколько оснований, то такие мутации сдвига рамки называются инсерциями, а если удалено одно или несколько оснований, то это — делеции [2]. Было показано, что ошибка проскальзывания ДНК-поли-

меразы III приводит к мутации сдвига рамки чтения, а именно вставке одного основания [3].

Рассматриваются несколько механизмов *RecA*-независимых перегруппировок последовательностей оснований: простое проскальзывание при репликации, обмен сестринских хромосом, ассоциированных с проскальзыванием и др. [4]. В настоящее время наиболее обоснованной моделью, объясняющей механизм образования мутаций сдвига рамки, считается модель Стрейзингера [5, 6], которая предполагает, что причина образования мутаций сдвига рамки лежит в появлении брешей и проскальзывании нити ДНК во время синтеза [7]. Однако в рамках общепринятой в настоящее время модели мутагенеза (полимеразной парадигмы) абсолютно не ясно, как *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры могут приводить к мутациям сдвига рамки и почему в одних случаях они вызывают мутации замены оснований, а в других — мутации сдвига рамки.

Общепринятая в настоящее время полимеразная парадигма связывает причину образования мутаций исключительно со спорадическими ошибками ДНК-полимераз [8]. В ряде работ автором была разработана альтернативная, полимеразно-таутомерная модель ультрафиолетового мутагенеза [9–13]. Было показано, что при образовании *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров может изменяться таутомерное состояние входящих в них оснований [9, 11]. Возможно образование пяти редких таутомерных состояний тимина и аденина [11] и семи — гуанина и цитозина [9]. Они устойчивы, когда основания в редких таутомерных формах входят в состав *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров и во время синтеза ДНК [11, 12]. Часть таких повреждений может приводить к мутациям замены оснований [10, 12]. Разработана модель механизма образования мишен инсерций, вызванных *цис-син* циклобутановыми тиминовыми димерами [13]. Исследуем, к каким биологическим последствиям могут привести *цис-син* циклобутановые цитозиновые димеры с основаниями, находящимися в других редких таутомерных формах.

Склонный к ошибкам или SOS синтез молекулы ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые цитозиновые димеры. Повреждения ДНК могут устраняться в процессах репарации. Если они не будут устранены, то они могут приводить к мутациям. Обычно мутации возникают напротив циклобутановых пиримидиновых димеров при склонной к ошибкам или SOS-репликации, репарации или транскрипции. Мутации образуются, как правило, в двух случаях. Во-первых, если конститутивные ДНК-полимеразы, такие как Pol δ и Pol ϵ клеток эукариотов или Pol III *Escherichia coli*, прижимаются к ДНК скользящей скрепкой, что препятствует работе 3' \rightarrow 5'-экзонуклеаз. И, во-вторых, когда в синтез вовлекаются специализированные ДНК-полимеразы, такие как ДНК-полимеразы Pol η и Pol ζ дрожжей или ДНК-полимеразы Pol IV и Pol V *E. coli*, с ослабленными корректорскими функциями [14]. Как показал анализ работы различных ДНК-полимераз, специализированные и модифицированные ДНК-полимеразы встраивают напротив циклобутановых пиримидиновых димеров такие основания, которые могут образовывать с ними водородные связи [12]. В этом смысле специализированные и модифицированные ДНК-полимеразы, которые могут приводить к мутациям, ведут себя точно так же, как конститутивные ДНК-полимеразы, способные синтезировать ДНК безошибочно.

Мутации сдвига рамки образуются на участках ДНК с однородным нуклеотидным составом, это могут быть участки с монотонной последовательностью G-C или A-T пар, или последовательным чередованием G-C и C-G пар. Как показано в [9], для цитозина возможно образование семи редких таутомерных форм (рис. 1). Они будут стабильными, если соответствующие основания входят в состав циклобутановых цитозиновых димеров. Это проис-

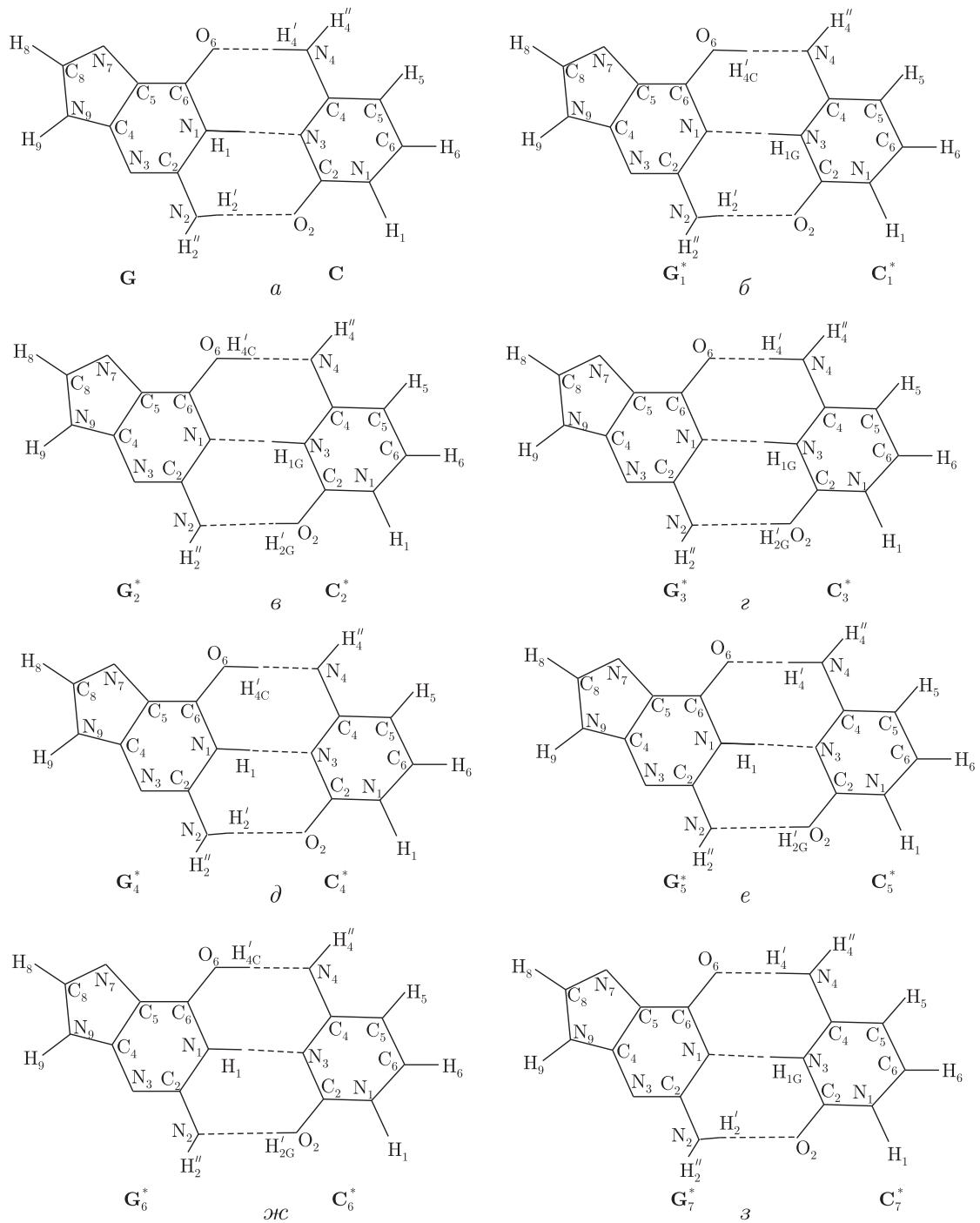


Рис. 1. Редкие таутомерные состояния гуанина и цитозина. *a* — уотсон-криковская пара гуанин-цитозин; *b–z* — возможные новые редкие таутомерные состояния гуанина и цитозина, появляющиеся после облучения молекулы ДНК ультрафиолетовым светом

ходит потому, что напротив циклобутановых пиримидиновых димеров нить ДНК искривляется и водородные связи между основаниями, находящимися в противоположных нитях ДНК, рвутся [12]. Когда образуются инсерции, то чаще всего появляются вставки в один

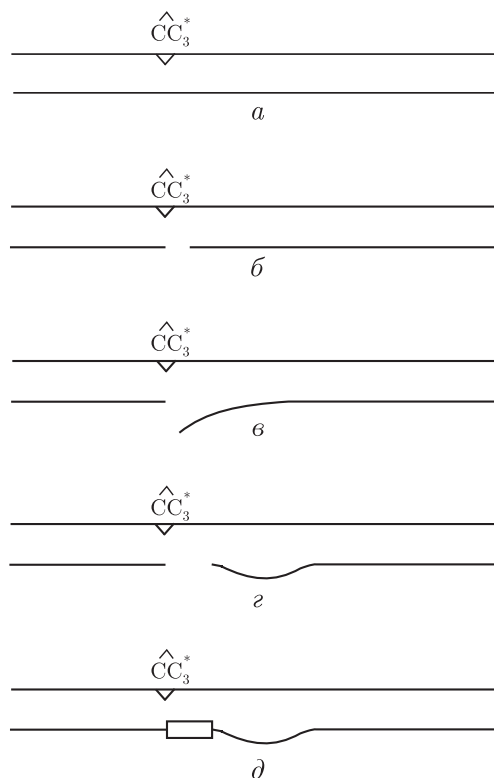


Рис. 2. Образование инсерций в один нуклеотид. *a* — участок ДНК, содержащий циклобутановый цитозиновый димер CC_3^* ; *б* — участок ДНК застраивается с помощью модифицированной или специализированной ДНК-полимеразы, напротив циклобутанового димера CC_3^* появляется брешь в один нуклеотид; *в* — конец нити ДНК сползает; *г* — конец нити ДНК соединяется на один нуклеотид дальше, образуется петля; *д* — брешь застраивается, образуется вставка из одного нуклеотида

нуклеотид [2, 3]. Рассмотрим участок ДНК с однородным нуклеотидным составом, одна нить которого содержит *цис-син* циклобутановый цитозиновый димер CC_3^* , одно основание в котором это канонический цитозин, а второе — цитозин C_3^* (см. рис. 1, *г*) в редкой таутомерной форме (рис. 2, *a*). Пусть этот участок ДНК синтезируется с помощью специализированных или модифицированных ДНК-полимераз.

Сделаем структурную проверку встраивания оснований ДНК напротив цитозина C_3^* (рис. 3, *б*), т.е. посмотрим, какие канонические основания можно встроить напротив цитозина C_3^* так, чтобы между ними образовались водородные связи. Напротив цитозина C_3^* ДНК-полимераза не сможет встроить тимин из-за отталкивания атома водорода H_3 тимина и H_{1G} цитозина C_3^* (см. рис. 3, *в*). Она не сможет встроить аденин из-за отталкивания H'_6 аденина и H'_4 цитозина C_3^* (см. рис. 3, *г*). Она не сможет встроить цитозин из-за отталкивания H'_4 канонического цитозина и H'_4 цитозина C_3^* (см. рис. 3, *д*). Она не сможет встроить гуанин из-за отталкивания H'_1 гуанина и H_{1G} цитозина C_3^* , а также отталкивания H'_2 гуанина и H'_{2G} цитозина C_3^* (см. рис. 3, *е*). Другими словами, напротив цитозина C_3^* невозможно встроить ни одно каноническое основание так, чтобы между ним и каноническими основаниями образовались водородные связи.

При синтезе через повреждение с помощью модифицированных (ДНК-полимеразы III *E. coli*, ДНК-полимеразы δ , ДНК-полимеразы ϵ млекопитающих) или специализи-

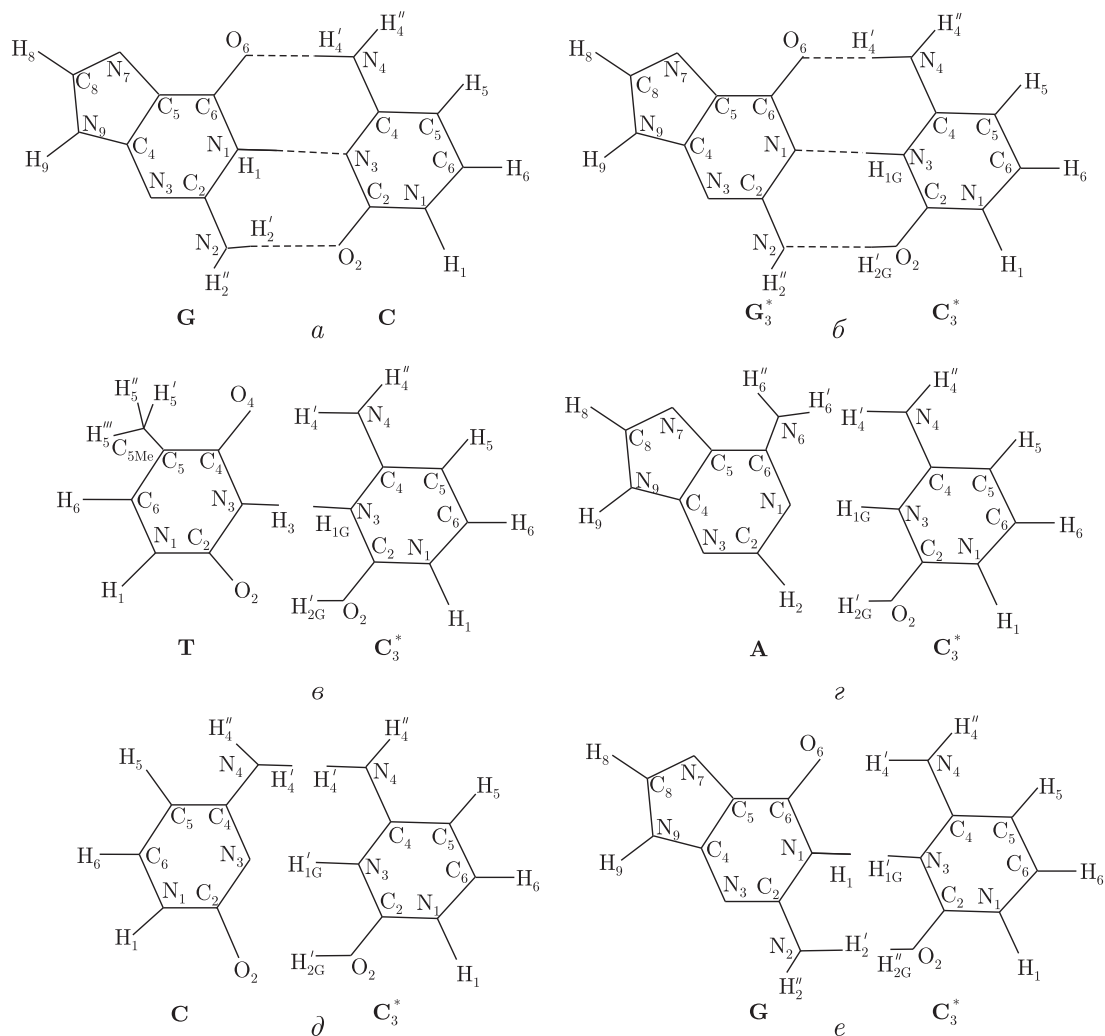


Рис. 3. Структурный анализ возможности спаривания цитозина C_3^* с каноническими основаниями ДНК. *a* — каноническая пара гуанин-цитозин; *б* — пара оснований гуанин-цитозин $G_3^*-C_3^*$, находящихся в редкой таутомерной форме; *в-е* — структурный анализ возможности спаривания цитозина C_3^* с каноническими основаниями ДНК: *в* — с тиминном; *г* — с аденином; *д* — с цитозином; *е* — с гуанином

рованных (ДНК-полимеразы Pol η , Pol ζ млекопитающих или ДНК-полимераз IV или V *E. coli*) ДНК-полимераз напротив *цис-син* циклобутанового димера CC_3^* появится брешь в один нуклеотид. Брешь образуется напротив цитозина C_3^* (см. рис. 2, б). Нить ДНК может сползти (см. рис. 2, в). Это может быть вызвано тем, что при образовании циклобутановых пиримидиновых димеров нить ДНК искривляется и водородные связи рвутся [15]. 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, г). При застройке этой бреши с помощью конститутивных ДНК-полимераз образуется вставка из одного нуклеотида — мишенная инсерция в один нуклеотид (см. рис. 2, д).

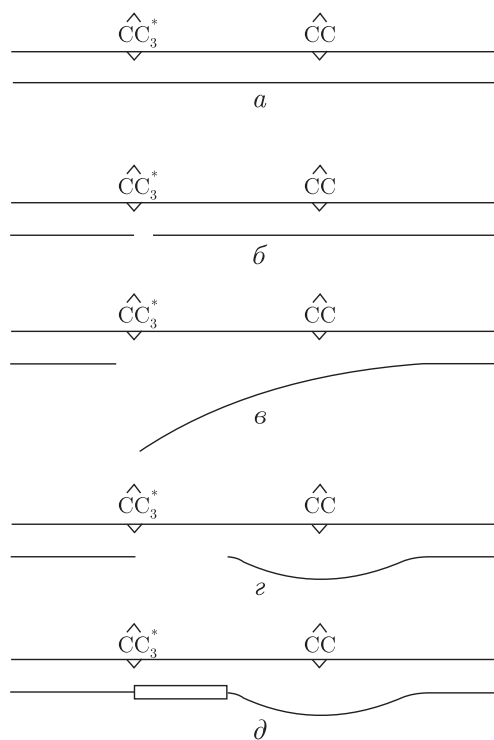


Рис. 4. Образование мишенных инсерций из нескольких нуклеотидов. *a* — участок ДНК, содержащий циклобутановые цитозиновые димеры CC_3^* и CC ; *б* — напротив циклобутанового димера CC_3^* появляется брешь в один нуклеотид; *в* — конец нити ДНК сползает; *г* — образуется петля; *д* — большая брешь застраивается, образуется вставка из нескольких нуклеотидов — мишенная инсерция

Посмотрим, как могут образовываться более протяженные инсерции. Рассмотрим участок ДНК с однородным нуклеотидным составом, одна нить которого содержит два *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димера. Это *цис-син* циклобутановый цитозиновый димер CC_3^* , одно основание в котором — канонический цитозин, а второе — цитозин C_3^* (см. рис. 1) в редкой таутомерной форме, и циклобутановый пиримидиновый димер с основаниями в канонических таутомерных формах (см. рис. 2, *a*). Пусть синтез осуществляется с помощью специализированных или модифицированных ДНК-полимераз. Тогда напротив *цис-син* циклобутанового димера CC_3^* появится брешь в один нуклеотид. Брешь образуется напротив цитозина C_3^* (рис. 4, *б*).

Конец нити ДНК может сползти, особенно если рядом с димером CC_3^* есть еще любой циклобутановый димер, поскольку напротив таких димеров цепь искривляется и водородные связи рвутся (см. рис. 4, *г*). Так как события происходят на однородном участке, то конец нити может соединиться водородными связями с соседним участком так, что появится большая петля (см. рис. 4, *д*). Появившаяся новая большая брешь обычно застраивается с помощью конститутивных ДНК-полимераз (см. рис. 4, *е*), что и приводит к вставке нескольких нуклеотидов, образуется мишенная инсерция. Предложенные механизмы образования инсерций соответствуют модели Стрейзингера [7].

Можно показать, что напротив цитозина в редкой таутомерной форме C_7^* (см. рис. 1, *з*) невозможно встроить ни одно из оснований ДНК так, чтобы между ними образовались водородные связи. Следовательно, при синтезе ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановый

димер CC_7^* , может образоваться брешь в один нуклеотид. Точно так же можно показать, что при склонной к ошибкам или SOS-репликации ДНК цитозиновые димеры CC_7^* , содержащие цитозин C_7^* , могут приводить к вставкам нескольких нуклеотидов (мишенным инсерциям).

Из вышесказанного следует, что источником мутаций сдвига рамки чтения являются, в частности, *цис-син* циклобутановые цитозиновые димеры, одно или оба основания которых находятся в таких редких таутомерных формах, которые не могут образовывать водородные связи с каноническими основаниями ДНК.

Таким образом, в рамках развиваемой автором полимеразно-таутомерной модели ультрафиолетового мутагенеза предлагается модель механизма образования мишенных инсерций, мутаций сдвига рамки чтения, вызванных *цис-син* циклобутановыми цитозиновыми димерами. Структурный анализ встраивания канонических оснований ДНК напротив *цис-син* циклобутановых цитозиновых димеров CC_3^* и CC_7^* показал, что напротив них невозможно встроить ни одно каноническое основание так, чтобы образовались водородные связи между основаниями C_3^* или C_7^* и каноническими основаниями ДНК. При этом мы опирались на тот факт, что при синтезе ДНК специализированные или модифицированные ДНК-полимеразы встраивают напротив циклобутановых димеров такие канонические основания, которые способны образовывать водородные связи с основаниями матричной ДНК.

Рассмотрен синтез двухцепочечной ДНК, содержащей в одной из своих цепей *цис-син* циклобутановые цитозиновые димеры, одно или оба основания в которых находятся в редких таутомерных формах C_3^* или C_7^* . Если синтез ДНК происходит с помощью модифицированных или специализированных ДНК-полимераз, то напротив *цис-син* циклобутановых цитозиновых димеров, содержащих молекулы цитозина C_3^* или C_7^* , могут появиться бреши в один нуклеотид. На участках ДНК с однородным нуклеотидным составом, в соответствии с моделью Стрейзингера, концы растущей нити ДНК могут сползать, соединяться в новом месте и образовывать петли, в результате дочерняя нить удлиняется, появляется мишенная мутация сдвига рамки чтения — мишенная инсерция (вставка из нескольких нуклеотидов).

В предыдущих работах было показано, что *цис-син* циклобутановые цитозиновые димеры, содержащие молекулы цитозина в редких таутомерных формах C_1^* , C_2^* , C_5^* и C_6^* , могут приводить только к мутациям замены оснований [11]. В настоящей работе показано, что *цис-син* циклобутановые цитозиновые димеры, содержащие молекулы цитозина в редких таутомерных формах C_3^* и C_7^* , могут приводить только к мутациям сдвига рамки чтения. Таким образом, разрабатываемая полимеразно-таутомерная модель ультрафиолетового мутагенеза способна объяснить образование как мишенных мутаций замены оснований, так и появление мишенных мутаций сдвига рамки.

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. 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.
3. Seki M., Akiyama M., Sugaya Y. et al. Strand asymmetry of +1 frameshift mutagenesis at a homopolymeric run by DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* – 1999. – **274**. – P. 33313–33319.
4. Bzymek M., Lovett S. T. Instability of repetitive DNA sequences: The role of replication in multiple mechanisms // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2001. – **98**. – P. 8319–8325.
5. Strand M., Prolla T. A., Liskay R. M., Petes T. D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair // *Nature*. – 1993. – **365**. – P. 274–276.

6. Baase W. A., Jose D., Ponedel B. C. et al. DNA models of trinucleotide frameshift deletions: the formation of loops and bulges at the primer-template junction // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – **37**. – P. 1682–1689.
7. Streisinger G., Okada J., Emerich J. et al. Frameshift mutations and the genetic code // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* – 1966. – **31**. – P. 77–84.
8. Tang M., Shen X., Frank E. G. et al. UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase *Escherichia coli* pol V // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – **96**. – P. 8919–8924.
9. Гребнева Е. А. Механізми образования потенциальных мутаций при формировании цитозинового димера в результате облучения двухцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом // *Доп. НАН України.* – 2001. – № 7. – С. 165–169.
10. Гребнева Е. А. Мишенний 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.
11. 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.
12. 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.
13. Гребнева Е. А. Механізми мишенних 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**, № 3. – С. 1–12.
14. Furukohri A., Goodman M. F., Maki H. A. Dynamic polymerase exchange with *Escherichia coli* DNA polymerase IV replacing DNA polymerase III on the sliding clamp // *J. Biol. Chem.* – 2008. – **283**. – P. 11260–11269.
15. Yamaguchi H., van Aalten D. M., Pinak M. et al. Essential dynamics of DNA containing a *cis. syn* cyclobutane thymine dimer lesion // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – **26**. – P. 1939. – 1946.

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

Поступило в редакцию 16.06.2014

О. А. Гребнева

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

У рамках розробленої полімеразно-таутомерної моделі ультрафіолетового мутагенезу, запропоновано модель механізму формування мішенних інсерцій, що викликані *цис-син* циклобутановими цитозиноними димерами. Інсерції – це мутації зсуву рамки читання, коли вбудовується одна або декілька основ ДНК. Структурний аналіз вбудовування основ показав, що навпроти двох рідких таутомерних станів цитозину неможливо вбудувати жодну з канонічних основ так, щоб між ними та матричними основами сформувались водневі зв'язки. Тому при синтезі молекули ДНК, що містить *цис-син* циклобутанові цитозинові димери, що мають молекули цитозину в таких рідких таутомерних формах, спеціалізовані або модифіковані ДНК-полімерази навпроти цих *цис-син* циклобутанових цитозинових димерів будуть залишати проломи в один нуклеотид. На ділянках ДНК з однорідним нуклеотидним складом, відповідно до моделі Стрейзінгера, кінець нитки ДНК може сповзти, з'єднатися за допомогою водневих зв'язків так, що утвориться петля. У результаті продовжується дочірня нитка, з'являється мішенна мутація зсуву рамки читання – мішенна інсерція.

H. A. Grebneva

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

A polymerase – tautomer model of ultraviolet mutagenesis is developed. The mechanism of formation of targeted insertions that is caused by cis-syn cyclobutane cytosine dimers is proposed. Insertions are frameshift mutations, when one or several DNA bases are inserted. Structural analysis has shown that, opposite two rare tautomeric forms of cytosine, it is impossible to insert any canonical DNA bases with template bases with the formation of hydrogen bonds. Therefore, under the synthesis of DNA containing cis-syn cyclobutane cytosine dimers with cytosine molecules in such rare tautomeric forms, specialized or modified DNA polymerases will leave one nucleotide gaps opposite these cis-syn cyclobutane cytosine dimers. On DNA sites with homogeneous nucleotide composition, the end of a DNA strand may slip and join with hydrogen bonds so that a loop is formed by the Streisinger model. As a result, the daughter strand is elongated, and the targeted insertion is formed.