



УДК 577.2:577.3

Е. А. Гребнева

Механизмы образования мишеных делеций при синтезе молекулы ДНК, содержащей *cis-syn* циклобутановые тиминовые димеры

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

В рамках развиваемой автором полимеразно-таутомерной модели ультрафиолетового мутагенеза предлагается модель механизма образования мишеных делеций, вызванных *cis-syn* циклобутановыми тиминовыми димерами. Делеции — это мутации сдвига рамки чтения, когда из нити ДНК выпадает один или несколько нуклеотидов. Ультрафиолетовое облучение может приводить к изменению таутомерных состояний оснований ДНК. Для молекулы тимина возможно образование пяти редких таутомерных форм, которые будут стабильными, если соответствующие основания входят в состав циклобутановых димеров. Структурный анализ встраивания оснований показал, что напротив редкой таутомерной формы тимина T_2^* невозможно встроить ни одно из канонических оснований так, чтобы между ними и матричными основаниями образовались водородные связи. Поэтому предполагается, что при синтезе молекулы ДНК, содержащей *cis-syn* циклобутановые тиминовые димеры TT_2^* , специализированные или модифицированные ДНК-полимеразы напротив этих *cis-syn* циклобутановых тиминовых димеров будут оставлять бреши в один нуклеотид. Участок дочерней ДНК напротив *cis-syn* циклобутановых димеров TT_2^* может выпасть. Если в противоположной нити ДНК образуется петля, то при застройке образовавшейся бреши дочерняя нить станет короче. В результате выпадет несколько оснований ДНК, т. е. образуется мишенная мутация сдвига рамки чтения — мишенная делеция.

Облучение молекулы ДНК ультрафиолетовым светом приводит к появлению фотопродуктов, чаще всего образуются *cis-syn* циклобутановые пиримидиновые димеры, в которых ориентация оснований относительно сахарофосфатного остова не изменяется. Они вызывают мутации замены оснований, сдвига рамки чтения и сложные мутации [1]. Мутации сдвига рамки делятся на инсерции, вставки дополнительных нуклеотидов, и делеции, выпадения нуклеотидов. Очень часто выпадает только один нуклеотид, что приводит к де-

© Е. А. Гребнева, 2015

леции в один нуклеотид [2]. Мутации сдвига рамки образуются как напротив циклобутановых пиримидиновых димеров, так и на так называемых не поврежденных участках ДНК [3].

В настоящее время наиболее обоснованной моделью, объясняющей механизм образования мутаций сдвига рамки, считается модель Стрейзингера [4–6], которая предполагает, что причина образования мутаций сдвига рамки лежит в появлении брешей и проскальзывании нити ДНК во время синтеза [7]. Было показано, что образование делеций связано с появлением петель или выпуклостей в молекуле ДНК [6]. Однако в рамках общепринятой полимеразной модели [8] не ясно, как *cis-syn* циклобутановые пиримидиновые димеры могут приводить к мутациям сдвига рамки чтения, почему в одних случаях они вызывают мутации замены оснований, а в других — мутации сдвига рамки.

Ранее автором была разработана альтернативная, полимеразно-таутомерная модель ультрафиолетового мутагенеза [9–13]. Было показано, что при образовании *cis-syn* циклобутановых пиримидиновых димеров может изменяться таутомерное состояние входящих в них оснований. Возможно образование пяти новых редких таутомерных состояний тимина и аденина [9] и семи — гуанина и цитозина. Показано, что они устойчивы, когда основания в редких таутомерных формах входят в состав *cis-syn* циклобутановых пиримидиновых димеров и во время синтеза ДНК [10]. Оказалось, что часть таких *cis-syn* циклобутановых пиримидиновых димеров с основаниями в определенных редких таутомерных формах может приводить к мутациям замены оснований [10]. Были разработаны механизмы образования инсерций, вызванных *cis-syn* циклобутановыми тиминовыми [11] и цитозиновыми [12] димерами. Их источником являются *cis-syn* циклобутановые пиримидиновые димеры, содержащие основания в определенных редких таутомерных формах. Причем напротив этих оснований невозможно построить ни одно из канонических оснований ДНК так, чтобы между ними образовались водородные связи. В данной работе рассматриваются механизмы образования других мутаций сдвига рамки чтения, делеций, источником которых являются *cis-syn* циклобутановые тиминовые димеры.

Склонный к ошибкам или SOS синтез молекулы ДНК, содержащей *cis-syn* циклобутановые тиминовые димеры. Если циклобутановые пиримидиновые димеры не будут устранены в процессах репарации, то они могут приводить к мишенным мутациям при склонной к ошибкам или SOS-репликации, репарации или транскрипции. Мутации образуются, если в синтез ДНК вовлекаются модифицированные или специализированные ДНК-полимеразы [12]. Как показал анализ работы различных ДНК-полимераз, специализированные и модифицированные ДНК-полимеразы встраивают напротив циклобутановых пиримидиновых димеров такие канонические основания, которые могут образовывать с ними водородные связи [14]. То есть ошибочный синтез ДНК идет точно так же, как и безошибочный синтез. Если напротив циклобутановых пиримидиновых димеров невозможно построить ни одно из канонических оснований так, чтобы между ними образовались водородные связи, то специализированные и модифицированные ДНК-полимеразы будут оставлять брешы в один нуклеотид. Так происходит, например, при синтезе молекулы ДНК, лишенной основания. В работе [2] показано, что ДНК-полимераза IV напротив повреждения, состоящего в том, что потеряно основание, оставляет брешь в один нуклеотид. Это приводит к делеции в один нуклеотид.

Мутации сдвига рамки чаще всего образуются на участках ДНК с однородным нуклеотидным составом, это могут быть участки с монотонной последовательностью G–C или A–T пар либо последовательным чередованием A–T и T–A пар. Как показано в [9], для

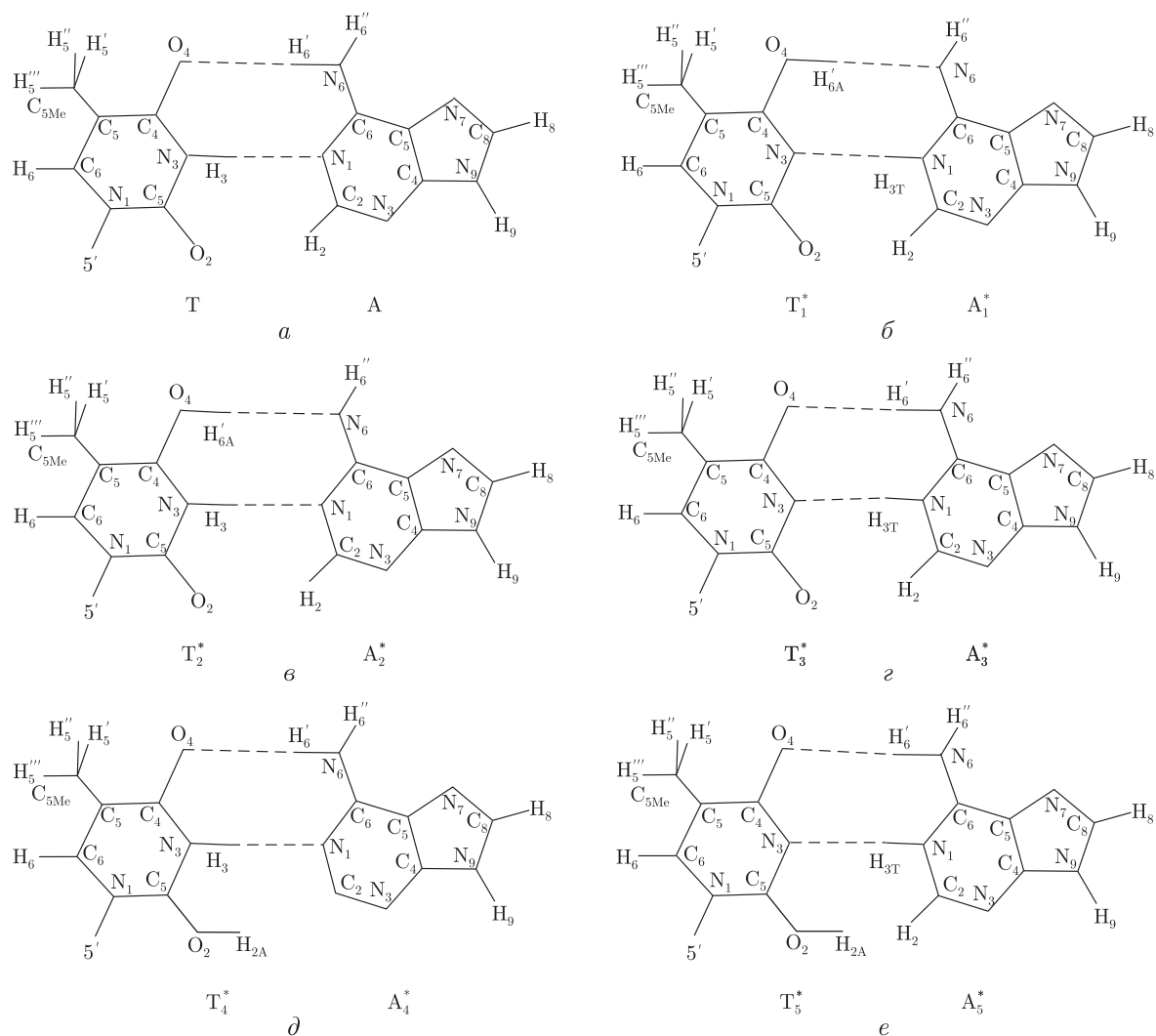


Рис. 1. Редкие таутомерные состояния тимина и аденина: *a* — уотсон-криковская пара аденин–тимин; *б–е* — возможные редкие таутомерные состояния тимина и аденина, появляющиеся после облучения молекулы ДНК ультрафиолетовым светом

тимина возможно образование пяти редких таутомерных форм (рис. 1). Они будут стабильными, если соответствующие основания входят в состав циклобутановых тимининовых димеров [10]. Рассмотрим такой участок ДНК с однородным нуклеотидным составом, одна нить которого содержит *cis-syn* циклобутановые димеры TT_2^* , одно основание в котором — это канонический тимин, а второе — тимин T_2^* (см. рис. 1) в редкой таутомерной форме (рис. 2, *a*). Посмотрим, как могут образовываться делеции — выпадения одного или нескольких нуклеотидов.

Пусть этот участок ДНК синтезируется обычной ДНК-полимеразой. В результате напротив циклобутановых димеров может появиться пострепликативная брешь (см. рис. 2, *б*). Пусть пострепликативная брешь застраивается с помощью специализированных или модифицированных ДНК-полимераз в результате склонного к ошибкам синтеза млекопитающих или SOS-синтеза бактерий.

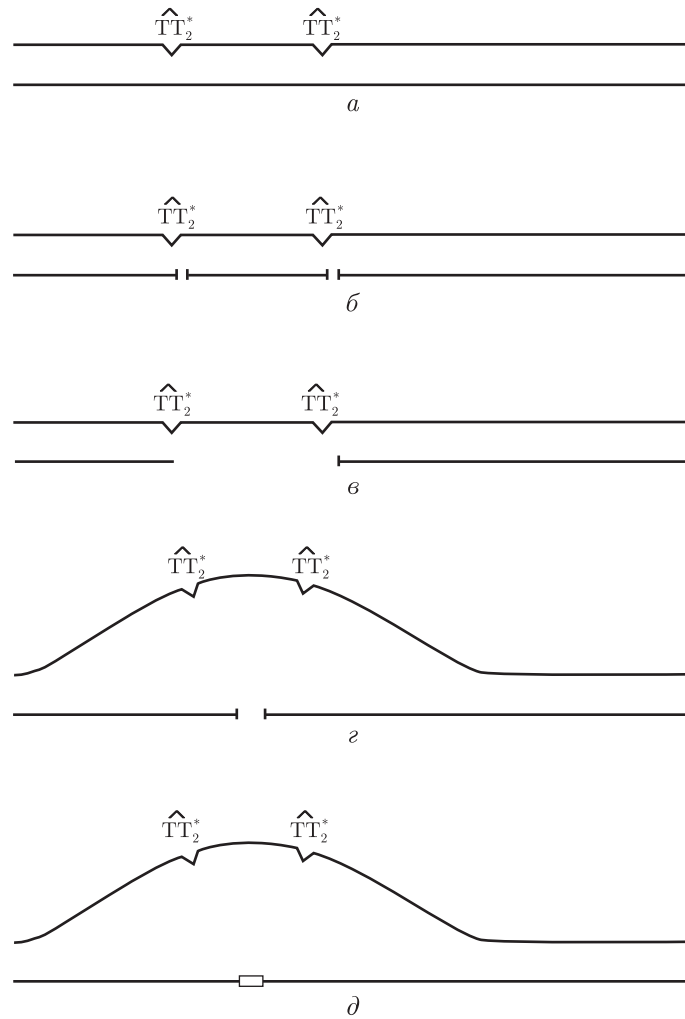


Рис. 2. Образование протяженных делеций: *a* — участок ДНК, содержащий *cis-syn* циклобутановые тиминные димеры \widehat{TT}_2^* ; *b* — напротив этих димеров образуется пострепликативная брешь; *в* — пострепликативная брешь застраивается модифицированной или специализированной ДНК-полимеразой, напротив *cis-syn* циклобутанового тиминного димера \widehat{TT}_2^* появляется брешь в один нуклеотид; *г* — участок нити ДНК выпадает; образуется петля; *д* — брешь застраивается, образовалась вставка из нескольких нуклеотидов, но меньшего размера, чем выпавший участок ДНК

Сделаем структурный анализ встраивания оснований ДНК напротив тимина T_2^* (см. рис. 3, *б*), т. е. посмотрим, какие канонические основания можно встроить напротив тимина T_2^* так, чтобы между ними образовались водородные связи. Напротив тимина T_2^* ДНК-полимераза не сможет встроить канонический тимин из-за отталкивания атома водорода H_3 канонического тимина и H_3 тимина T_2^* (см. рис. 3, *в*). Она не сможет встроить аденин из-за отталкивания H'_6 аденина и H'_{6A} тимина T_2^* (см. рис. 3, *г*). Она не сможет встроить цитозин из-за отталкивания H'_4 канонического цитозина и H'_{6A} тимина T_2^* (см. рис. 3, *д*). Она не сможет встроить гуанин из-за отталкивания H'_1 гуанина и H_3 тимина T_2^* (см. рис. 3, *е*). Другими словами, напротив тимина T_2^* невозможно встроить ни одно каноническое основание.

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

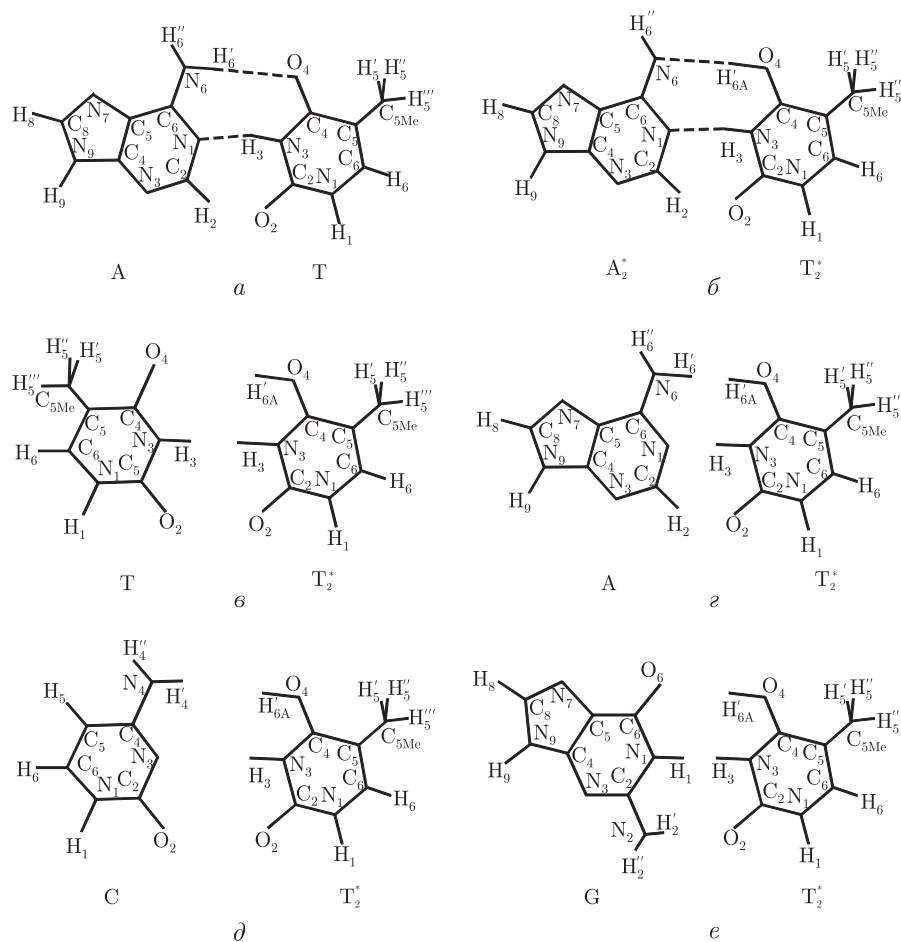


Рис. 3. Структурный анализ возможности спаривания тимина в редкой таутомерной форме T_2^* с каноническими основаниями ДНК: *a* — каноническая пара аденин–тимин; *b* — пара оснований аденин–тимин $A_2^*-T_2^*$, находящихся в редкой таутомерной форме; *в-е* — структурный анализ возможности спаривания тимина в редкой таутомерной форме T_2^* с каноническими основаниями ДНК: *в* — с тиминном, *г* — с аденином, *д* — с цитозином, *е* — с гуанином

ных (ДНК-полимеразы Pol η , Pol ζ млекопитающих или ДНК-полимераз IV или V *E. coli*) ДНК-полимераз напротив *cis-syn* циклобутановых димеров TT_2^* появятся брешы в один нуклеотид, как это изображено на рис. 2, в. Участок ДНК может выпасть, поскольку напротив циклобутановых димеров цепь искривляется и водородные связи рвутся (см. рис. 2, г) [15]. Участок ДНК, содержащий *cis-syn* циклобутановые димеры TT_2^* , может образовать петлю, как это показано на рис. 2, д. Брешь меньшего размера обычно застраивается с помощью конститутивных ДНК-полимераз (см. рис. 2, е), что и приведет к выпадению нескольких оснований (образованию делеции) в соответствии с моделью Стрейзингера.

Чаще всего появляются делеции в один нуклеотид, т.е. выпадает одно основание. Таковую делецию может вызвать один *cis-syn* циклобутановый димер TT_2^* . При синтезе ДНК, содержащей такой димер, напротив T_2^* образуется брешь в один нуклеотид. В нити ДНК, содержащей TT_2^* , образуется маленькая петля. В этом случае на участке ДНК, на котором образовалась брешь в один нуклеотид, нить ДНК сдвигается на один нуклеотид, соединяется в новом месте и зашивается лигазой (рис. 4). Это возможно, так как мутации сдвига

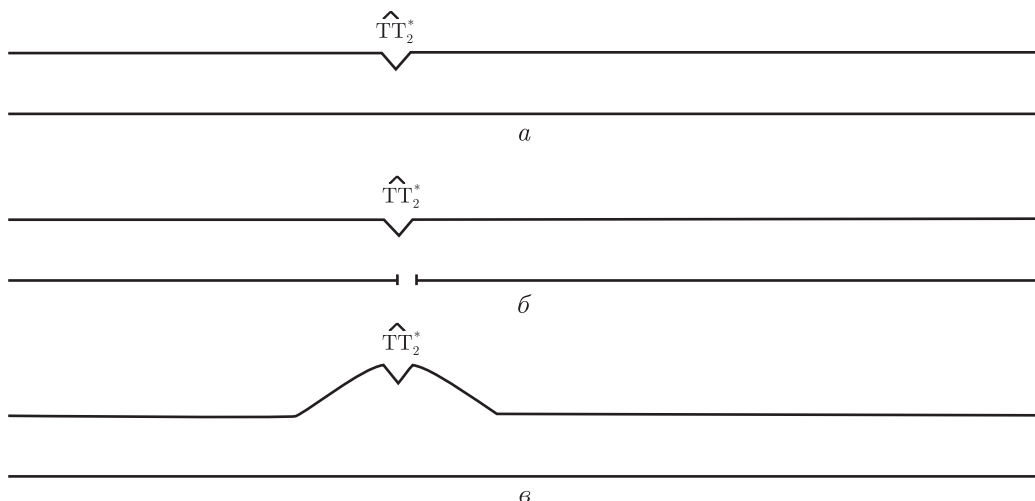


Рис. 4. Образование делеций в один нуклеотид: *a* — участок ДНК, содержащий *cis-syn* циклобутановый тиминный димер \widehat{TT}_2^* ; *б* — напротив *cis-syn* циклобутанового тиминного димера \widehat{TT}_2^* появляется брешь в один нуклеотид; *в* — в нити ДНК, содержащей *cis-syn* циклобутановый тиминный димер \widehat{TT}_2^* , образуется петля, противоположная нить ДНК сшивается лигазой. В результате дочерняя нить ДНК стала короче на один нуклеотид, образовалась делеция в один нуклеотид

рамки чтения образуются на однородных участках ДНК, в данном случае состоящем только из молекул тимина.

Таким образом, мы видим, что источником мутаций сдвига рамки чтения, делеций, являются, в частности, такие *cis-syn* циклобутановые тиминные димеры, одно или оба основания которых находятся в редких таутомерных формах, которые не могут образовывать водородные связи с каноническими основаниями ДНК.

Подытожим результаты исследования. В рамках развиваемой автором полимеразно-таутомерной модели ультрафиолетового мутагенеза предлагается модель механизма образования мишеней делеций, мутаций сдвига рамки чтения, вызванных *cis-syn* циклобутановыми тиминными димерами. Структурный анализ встраивания канонических оснований ДНК напротив *cis-syn* циклобутановых тиминных димеров \widehat{TT}_2^* показал, что напротив них невозможно встроить ни одно каноническое основание так, чтобы образовались водородные связи между основаниями T_2^* и каноническими основаниями ДНК. При этом учитывался 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 [10].

Рассмотрен синтез молекулы ДНК, содержащей *cis-syn* циклобутановые тиминные димеры \widehat{TT}_2^* , который осуществляется с помощью специализированных или модифицированных ДНК-полимераз. Тогда напротив *cis-syn* циклобутановых тиминных димеров, содержащих молекулы тимина T_2^* , могут появиться бреши в один нуклеотид. Участок ДНК, содержащий циклобутановые димеры, искривляется и водородные связи между основаниями рвутся. Поэтому участок ДНК напротив *cis-syn* циклобутановых димеров \widehat{TT}_2^* может выпасть. Если в противоположной нити ДНК образуется петля, то при застройке образовавшейся бреши дочерняя нить станет короче. В результате выпадет несколько оснований ДНК, т.е. образуется делеция, мутация сдвига рамки чтения. Если образовался один *cis-syn* циклобутановый тиминный димер \widehat{TT}_2^* , то напротив него может образова-

ться брешь в один нуклеотид. Нить ДНК, содержащая один *cis-syn* циклобутановый тиминный димер TT_2^* , может образовать небольшую петлю. Тогда противоположная нить немного сдвинется. А поскольку это однородный участок ДНК, то она может соединиться в новом месте. В результате выпадет одно основание, т. е. образуется делеция в один нуклеотид.

В предыдущих работах автора показано, что *cis-syn* циклобутановые тиминные димеры, содержащие молекулы тимина в редких таутомерных формах T_1^* , T_4^* и T_5^* , могут приводить только к мутациям замены оснований [12]. Были разработаны механизмы образования инсерций при склонном к ошибкам или SOS-синтезе молекулы ДНК, содержащей *cis-syn* циклобутановые тиминные [11] и цитозинные [12] димеры на однородных участках ДНК. Следовательно, *cis-syn* циклобутановые тиминные димеры, содержащие молекулы тимина в редкой таутомерной форме T_2^* , могут приводить только к мутациям сдвига рамки чтения, делециям или инсерциям. Таким образом, разрабатываемая автором полимеразно-таутомерная модель ультрафиолетового мутагенеза способна с единых позиций разрешить ряд проблем ультрафиолетового мутагенеза. Она способна объяснить как природу и механизмы образования потенциальных мутаций [9], механизмы образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза, механизмы образования немишеных мутаций замены оснований [13], механизмы образования мишеных мутаций замены оснований [10], так и появление мишеных мутаций сдвига рамки (инсерций [11, 12] и делеций).

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. Kobayashi S., Valentine M. R., Pham P., O'Donnell M., Goodman M. F. Fidelity of *Escherichia coli* DNA polymerase IV. Preferential generation of small deletion mutations by dNTP-stabilized misalignment // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**. – P. 34198–34207.
3. Kim S. R., Matsui K., Yamada M., Gruz P., Nohmi T. Roles of chromosomal and episomal *dinB* genes encoding DNA pol IV in targeted and untargeted mutagenesis in *Escherichia coli* // *Mol. Genet. Genomics*. – 2001. – **266**. – P. 207–215.
4. 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.
5. Bzymek M., Saveson C. J., Feschenko V. V., Lovett S. T. Slipped misalignment mechanisms of deletion formation: *in vivo* susceptibility to nucleases // *J. Bacteriol.* – 1999. – **181**. – P. 477–482.
6. Baase W. A., Jose D., Ponedel B. C., von Hippel P. H., Johnson N. P. 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., Newrich J., Tsugita A., Terraghi E., Inouye M. 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., O'Donnell M., Woodgate R., Goodman M. F. UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase *Escherichia coli* pol V // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1999. – **96**. – P. 8919–8924.
9. 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.
10. 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.
11. Grebneva E. A. Механізми мішенних мутацій сдвига рамки считывания – появлення інсерцій при склонном к ошибкам или SOS синтезе молекулы ДНК, содержащей *cis-syn* циклобутановые тиминные димеры // *Молекуляр. биология*. – 2014. – **48**, № 4. – С. 531–542. Grebneva H. A. Mechanisms of targeted frameshift mutations: insertions arising during error-prone or SOS synthesis of DNA containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers // *Molecular. biology*. – 2014. – **48**, № 4. – P. 457–467.

12. 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.
13. 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.
14. Гребнева Е. А. Механизм образования мишеных инсерций при синтезе молекулы ДНК, содержащей *cis-syn* циклобутановые цитозиновые димеры // Доп. НАН України. – 2014. – № 11. – С. 156–164.
15. Гребнева Е. А. Три источника немисненых мутаций замены оснований, образующихся после облучения молекулы ДНК ультрафиолетовым светом // Доп. НАН України. – 2013. – № 1. – С. 143–150.

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

Поступило в редакцию 22.12.2014

О. А. Гребнева

Механізми формування мішенних делецій при синтезі молекули ДНК, що містить *cis-syn* циклобутанові тимінові димери

*У рамках розробленої автором полімеразно-таутомерної моделі ультрафіолетового мутагенезу запропоновано модель механізму утворення мішенних делецій, що викликані *cis-syn* циклобутановими тиміновими димерами. Делеції – це мутації зсуву рамки читання, коли з нитки ДНК випадає один або декілька нуклеотидів. Ультрафіолетове опромінювання може приводити до зміни таутомерних станів основ ДНК. Для молекули тиміну можливе формування п'яти рідких таутомерних форм, які будуть стабільними, якщо відповідні основи входять до складу циклобутанових димерів. Структурний аналіз вбудовування основ показав, що навпроти рідкого таутомерного стану тиміну T_2^* неможливо вбудувати жодну з канонічних основ так, щоб між ними та матричними основами сформувались водневі зв'язки. Тому передбачається, що при синтезі молекули ДНК, що містить *cis-syn* циклобутанові тимінові димери TT_2^* , спеціалізовані або модифіковані ДНК-полімерази навпроти цих *cis-syn* циклобутанових тимінових димерів будуть залишати проломи в один нуклеотид. Ділянка дочірньої нитки ДНК навпроти *cis-syn* циклобутанових димерів TT_2^* може випасти. Якщо у протилежній нитці ДНК сформується петля, то при забудовуванні цього пролому дочірня нитка стане коротшою. В результаті випаде декілька основ ДНК, тобто сформується мішенна мутація зсуву рамки читання – мішенна делеція.*

H. A. Grebneva

Mechanisms of formation of targeted deletions in the synthesis of DNA molecule containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers

*In the frame of author's polymerase-tautomer model of ultraviolet mutagenesis, a mechanism of formation of targeted deletions formation that are caused by *cis-syn* cyclobutane thymine dimers is proposed. Deletions are frameshift mutations, when one or several nucleotides are dropped out from a DNA strand. Ultraviolet irradiation can result in changes of the tautomer states of DNA bases. A thymine molecule can form 5 rare tautomeric forms. They are stable if these bases are parts of cyclobutane dimers. Structural analysis shows that, opposite the rare tautomeric form of thymine T_2^* , it is impossible to insert any of the canonical DNA bases with the formation of*

hydrogen bonds. It is proposed that, under the synthesis of DNA containing cis-syn cyclobutane thymine dimers TT_2^* , the specialized or modified DNA polymerases will leave one-nucleotide gaps opposite these cis-syn cyclobutane thymine dimers. The daughter DNA strand opposite cis-syn cyclobutane thymine dimers TT_2^* may fall out. If the loop is formed, the daughter strand in the opposite DNA strand will be shortened under the insertion of nucleotides opposite the loop. As a result, some DNA bases are dropped out. The targeted frameshift mutation deletion is formed.