

Возможные молекулярные механизмы немишенного мутагенеза при пострепликативной SOS-репарации после облучения двухцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом

Е. А. Гребнева

Донецкий физико-технический институт НАН Украины
Ул. Розы Люксембург, 72, Донецк, 83114, Украина

E-mail: greb@host.dipt.donetsk.ua

На качественном уровне анализируются возможные молекулярные механизмы немишенного мутагенеза при пострепликативной SOS-репарации после облучения ДНК УФ светом, когда в обеих цепях образуются близкорасположенные тиминовые димеры. Предполагается, что мутагенами являются только те димеры, основания в которых находятся в редких таутомерных формах, а при синтезе такой ДНК в результате SOS-индукции ослабляется контроль за таутомерными состояниями оснований матрицы. Предполагается, что потенциальными мутациями в этом случае могут быть адениновые остатки, находящиеся в редких таутомерных формах и локализующиеся в небольшой окрестности от димеров, а именно — напротив тиминов, образовавших другие димеры и изменивших свое таутомерное состояние. Они могут приводить к транзициям, трансверсиям и мутациям сдвига рамки считывания.

Введение. Несмотря на то, что ультрафиолетовый (УФ) мутагенез является наиболее изученным, имеется ряд явлений, которые либо не объяснены достаточно хорошо, либо не поняты вовсе (см. обзор [1]). К ним относится немишеный мутагенез. Известно, что основными фотоповреждениями после облучения молекулы ДНК УФ-светом является образование цикlobутановых пиримидиновых димеров или (6—4)-аддуктов, которые мы будем называть «димерами» [1, 2].

Мутации возникают после SOS-репарации или SOS-репликации. Они вызывают транзиции, трансверсии, мутации сдвига рамки считывания, сложные мутации [1, 2]. Обычно мутации появляются напротив димеров, такой мутагенез называется мишенным [2], однако иногда они возникают в небольшой окрестности от димера и тогда он называется немишенным [3—7]. Общепринятая [8, 9] теория УФ-мутагенеза опирается на гипотезу Брес-

лера [10]. Она предполагает, что единственной причиной являются ошибки ДНК-полимеразы, которая иногда ошибается, встраивая напротив димеров произвольные основания. В [1] показано, что общепринятая теория противоречит ряду хорошо установленных фактов и не может объяснить некоторых особенностей УФ-мутагенеза. В частности, нет объяснения немишенного мутагенеза, когда мутации возникают не напротив димеров.

В [1, 2] предложена альтернативная модель, опирающаяся на две гипотезы. Первая — это немного модифицированная гипотеза Уотсона и Крика [11], примененная к УФ-мутагенезу. Предполагается, что причиной мутаций является способность оснований переходить в неканонические таутомерные формы таким образом, что это влияет на характер спаривания оснований.

Кроме того, предполагено, что при индукции SOS-системы происходит ослабление контроля за таутомерным состоянием оснований матрицы. В остальном репликация ДНК идет, как при обычном безошибочном синтезе, то есть встраиваются толь-

ко основания, находящиеся в канонических таутомерных формах.

Предполагается [1, 2], что потенциальными мутациями, являющимися причиной мишенного мутагенеза после УФ-облучения ДНК, являются димеры, одно или оба оснований в которых изменили свое таутомерное состояние так, что это может влиять на характер спаривания оснований [1]. Проанализирован репарационный мутагенез на примере пострепликативной SOS-репарации и показано, что тиминные димеры могут вызывать транзиции, трансверсии и бреши в один нуклеотид [2], которые являются первым необходимым этапом образования мутаций сдвига рамки считывания [12, 13].

Предложен также механизм немишенного мутагенеза, когда на участке ДНК имеются только немутационные димеры [7]. Показано, что его источник — это потенциальные мутации, являющиеся парами оснований, находящихся в редких таутомерных формах, таких, что атомы водорода первой и второй водородной связей, отвечающих за спаривание оснований, одновременно перешли к своим партнерам по Н-связям. Согласно [14], такие таутомерные состояния будут устойчивыми. Оказалось, что если подобные потенциально мутагенные повреждения ДНК находятся в небольшой окрестности от димера, то в результате SOS-репликации они дают или транзиции, или гомологичные трансверсии. Роль димеров при этом сводится к индукции SOS-системы.

Данная работа посвящена анализу возможных молекулярных механизмов появления немишенного мутагенеза, когда димеры играют несколько более активную роль. В качестве примера рассматривается пострепликативная SOS-репарация.

Контроль, осуществляемый ДНК-полимеразами и ассоциированными с ними ферментами за правильностью встраивания оснований. Пусть после облучения молекулы ДНК УФ в ней образовались димеры $\hat{T}\hat{T}_1^*$, $\hat{T}\hat{T}_2^*$, $\hat{T}\hat{T}_3^*$, $\hat{T}\hat{T}_4^*$, $\hat{T}\hat{T}_5^*$ и $\hat{T}\hat{T}$, где Т — каноническая (рис. 1, а), а $T_1^*—T_5^*$ — редкие таутомерные формы тимина (рис. 1, б—е соответственно).

В [1] показано, что при формировании тиминных димеров после облучения ДНК ультрафиолетом таутомерная форма тимина, образовавшего димер, может измениться так, как изображено на рис. 1, причем все эти таутомерные состояния будут устойчивыми из-за разрывов водородных связей между спаренными основаниями [15].

Как показано в работе [1], в процессе образования димеров и изменения таутомерного состояния входящих в них оснований происходит измене-

ние таутомерного состояния спаренных с ними оснований. Пусть вышеописанные димеры появились в обеих цепях ДНК недалеко друг от друга так, как это изображено на рис. 2, а. Тогда в обеих цепях ДНК напротив тиминных димеров (рис. 2, а) будут находиться молекулы аденина A_1^* , A_2^* , A_3^* , A_4^* , A_5^* в редких таутомерных формах, соответствующих изображенным на рис. 1, б—е соответственно.

Рассмотрим путь пострепликативной репарации, в котором пострепликативные бреши застраиваются в результате синтеза *de novo*, который, как известно, может приводить к появлению мутаций [2].

При безошибочном синтезе ДНК-полимераза, совершив ошибку, диссоциирует от праймера, в результате 3'→5'-эксонуклеаза отщепляет ошибочный нуклеотид [16]. SOS-индуцированный холофермент формирует структуру «скользящей скрепки», которая удерживает ДНК-полимеразу на праймере, обеспечивая высокопроцессивный синтез и не позволяя 3'→5'-эксонуклеазе удалять ошибочные нуклеотиды [17]. Поскольку ДНК-полимераза встраивает канонические нуклеотиды, стабилизируемые водородными связями, между основаниями и сахаро-фосфатным остовом [18], то ошибки полимераз, проанализированные в [9] для спонтанного мутагенеза, в данном случае невозможны.

Посмотрим, что получится, если пострепликативные бреши, изображенные на рис. 2, б, будут застраиваться модифицированной ДНК-полимеразой таким образом. Наличие димеров обусловит появление мишенного мутагенеза [2]. Однако из-за того, что димеры имеются в обеих цепях ДНК, что они расположены недалеко друг от друга и что входящие в них тимины изменили свое таутомерное состояние, в противоположных цепях появляются новые повреждения структуры ДНК. Это аденины, находящиеся в редких таутомерных формах (рис. 2, б). Выясним, какие нуклеотиды, находящиеся в канонических таутомерных формах, можно встроить напротив аденинов, находящихся в таутомерных формах, соответствующих изображенным на рис. 1, б—е. Будем считать, что обе пострепликативные бреши застраиваются модифицированной ДНК-полимеразой.

Пусть пострепликативные бреши, изображенные на рис. 2, б, застраиваются в результате синтеза *de novo* при пострепликативной SOS-репарации. Контроль активных групп означает, что пострепликативные бреши будут застроены только нуклеотидами в канонических таутомерных формах. Поскольку основание A_1^* (рис. 1, б) находится в небольшой окрестности от димера $\hat{T}\hat{T}_4^*$, нуклео-

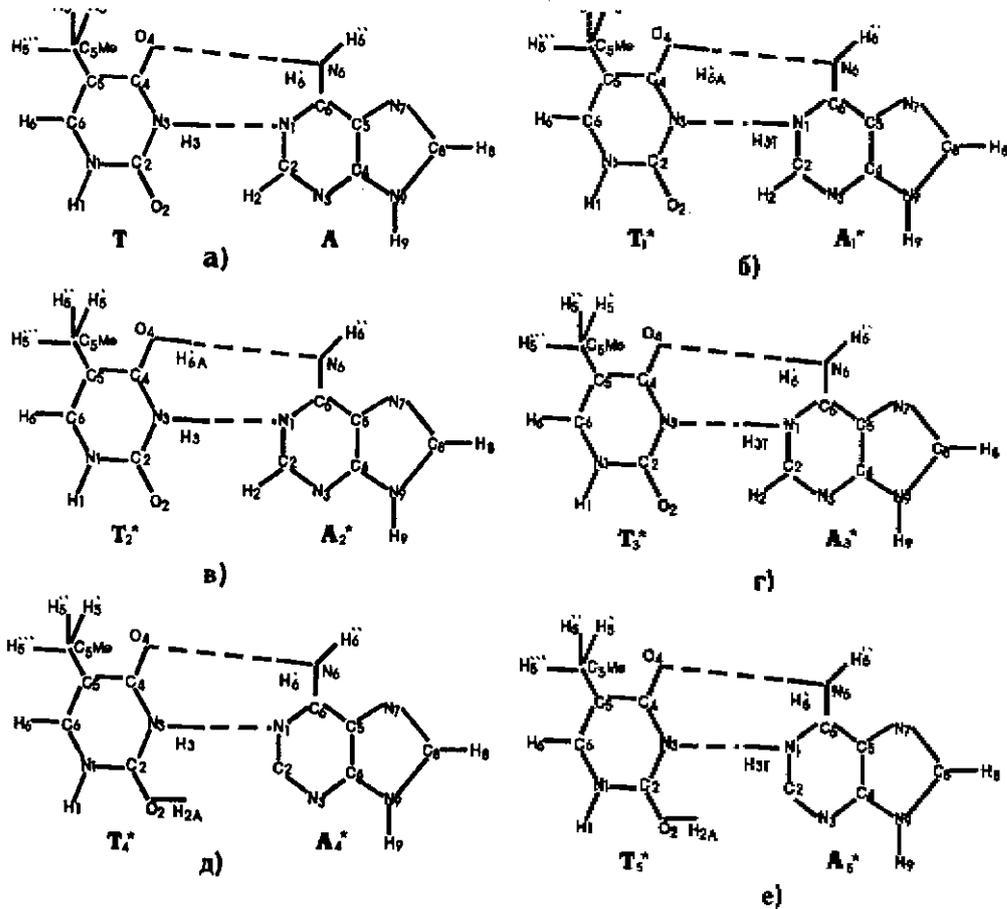


Рис. 1. Возможные таутомерные формы молекул тимина и аденина, появившихся при образовании тиминовых димеров: а — аденин (А) и тимин (Т) в канонической таутомерной форме; б—е — аденин A_i^* и тимин T_i^* , находящиеся в редкой таутомерной форме, $i = 1-5$

тид напротив него будет встроен модифицированной ДНК-полимеразой. ДНК-полимераза «проверит», может ли встраиваемый нуклеотид образовывать водородные связи с основанием матрицы A_1^* , но в случае появления неканонической пары оснований ошибочный нуклеотид не будет удален [16, 17].

Как видно из рис. 3, молекула аденина A_1^* (рис. 1, б) может образовывать водородные связи с цитозином (рис. 3, а) или аденином (рис. 3, б).

Известно, что при работе ферментов в процессе формирования фермент-субстратного комплекса происходит стереохимическая и электростатическая проверка соответствия субстрата активному центру фермента [19, 9]. По мнению автора, при работе ДНК-полимеразы и ассоциированных с ней ферментов такая проверка происходит дважды. Первый раз — когда образуется комплекс ДНК-полимераза—встраиваемый нуклеотид и второй —

когда проверяется, является ли встраиваемый нуклеотид комплементарным основанию матрицы.

С этой точки зрения пары $A_1^* \cdot C$ и $A_1^* \cdot A$, хотя и могут образовывать по две Н-связи каждая, все же различаются. Они различаются и с точки зрения стереохимии, и с точки зрения электростатики. Следовательно, чтобы образовалась пара $A_1^* \cdot A$, необходимо дальнейшее ослабление контроля и за электростатическим, и за стереохимическим соответствием каноническим парам оснований.

Возможен и другой вариант развития событий. Атом водорода H_6'' молекулы A_1^* займет то положение, которое занимает H_6' молекулы аденина, находящегося в канонической таутомерной форме. И контроль за возможностью образовывать водородные связи будет происходить с учетом нового положения. В этом случае водородные связи ни с одним из оснований, находящихся в канонических таутомерных формах, образоваться не могут.

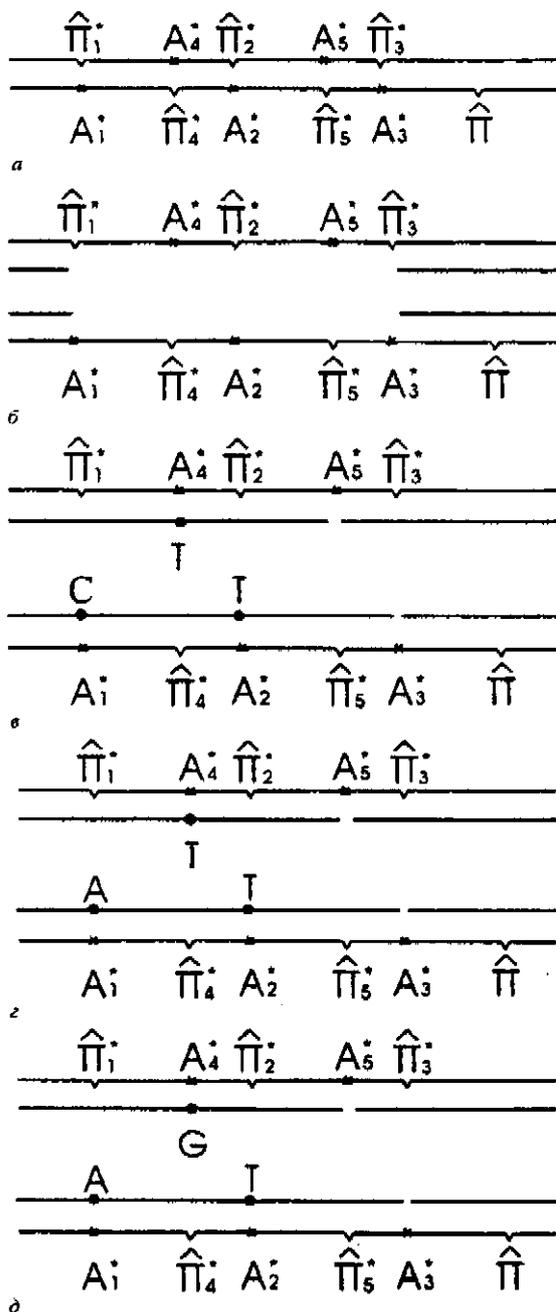


Рис. 2. Синтез молекулы ДНК, содержащий димеры в обеих цепях, в результате пострепликативной SOS-репарации: *a* — участок ДНК, содержащий димеры; *b* — синтез молекулы ДНК, напротив димеров возникли пострепликативные бреши; *c* — пострепликативные бреши застроены модифицированной ДНК-полимеразой; *d* — пострепликативные бреши так застроены модифицированной ДНК-полимеразой, что дополнительно ослаблен контроль за тем, чтобы образовывались только пары пурин-пиримидин; *e* — пострепликативные бреши так застроены модифицированной ДНК-полимеразой, что дополнительно ослаблен контроль за тем, чтобы образовывались только пары пурин-пиримидин и, кроме того, имеется «голодание» по тимину

Пусть молекула аденина A_2^* , находящаяся в редкой таутомерной форме, соответствующей рис. 1, *a*, расположена в небольшой окрестности от димеров (рис. 2, *b*). Тогда окажется, что при застройке пострепликативной бреши с помощью модифицированной ДНК-полимеразы молекула аденина A_2^* может образовывать водородные связи с тимином (рис. 3, *e*), с цитозином (рис. 3, *z*), с гуанином (рис. 3, *d*) и две Н-связи с аденином (рис. 3, *e*).

Нельзя исключить варианта, когда атом водорода H_6'' молекулы A_2^* изменит свое положение и расположится, как атом H_6' в молекуле аденина. Тогда контроль за возможностью образовывать водородные связи покажет, что Н-связи не могут возникать между A_2^* и цитозином и A_2^* и аденином. Однако могут сформироваться две водородные связи между A_2^* и тимином (рис. 3, *ж*). Могут образоваться три водородные связи между A_2^* и гуанином (рис. 3, *з*).

Молекула аденина A_3^* , находящаяся в редкой таутомерной форме, соответствующей изображенной на рис. 1, *z*, не может образовывать Н-связи с каноническими нуклеотидами.

Молекула аденина A_4^* , находящаяся в редкой таутомерной форме, соответствующей изображенной на рис. 1, *d*, может образовать водородные связи с молекулой тимина (рис. 3, *и*) или гуанина (рис. 3, *к*). Аденин A_5^* не может образовывать водородные связи ни с одним из нуклеотидов, находящихся в канонической таутомерной форме.

Возможные немишенные мутации, возникающие при пострепликативной SOS-репарации, когда в обеих цепях ДНК имеются близкорасположенные мутагенные димеры. Проанализируем процесс застраивания пострепликативных брешей, изображенных на рис. 2, *b*, модифицированной ДНК-полимеразой. Как выяснено (рис. 3, *a*), напротив A_1^* ДНК-полимераза может встроить цитозин. Следовательно, в этом случае появится транзиция $T \rightarrow C$. Но напротив A_1^* может быть встроены и аденин. Канонические пары — это всегда пары пурин-пиримидин. Пара A_1^*-C в этом смысле не отличается от канонической. Пара A_1^*-A является принципиально иной, это пара пурин-пурин и с точки зрения стереохимии не является подобной канонической паре оснований. Ошибки спаривания, приводящие к трансверсиям, исправляются более эффективно, чем ошибки, приводящие к транзициям [20]. Степень модификации холофермента может быть различной. В одном режиме ДНК-полимеразная активность будет сменяться на «корректорскую» при появлении пар пурин-пурин или пиримидин-пиримидин, а при усилении поли-

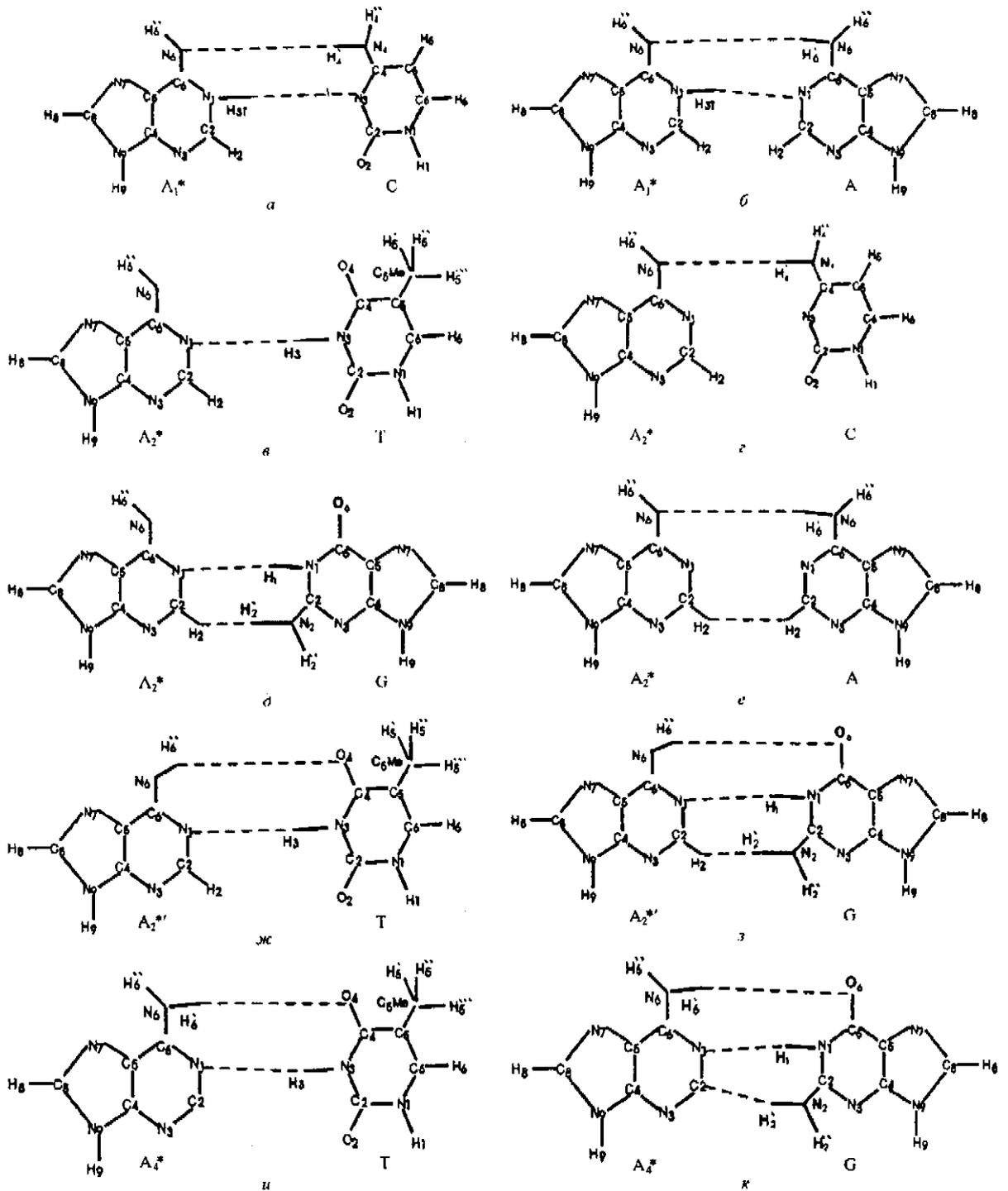


Рис. 3. Возможные варианты образования пар оснований: а — A_1^* с C; б — A_1^* с A; в — A_2^* с T; г — A_2^* с C; д — A_2^* с G; е — A_2^* с A; ж — A_2^* с T; з — A_2^* с G; и — A_4^* с T; к — A_4^* с G

меразной активности — нет [16, 17]. Во втором случае могут появляться и трансверсии. Если напротив A_1^* будет встроены аденин, то это означает образование гомологической трансверсии $T \rightarrow A$.

Если в аденине A_1^* атомы водорода займут то положение, которое занимает H_1' в аденине, находящемся в канонической таутомерной форме, то аденин A_1^* не сможет образовывать водородные связи ни с одним из оснований. Допустим, в результате может образоваться брешь в один нуклеотид. Этот одноцепочечный разрыв может быть ликвидирован одной из безошибочных систем репарации, а может привести к мутации сдвига рамки считывания [12, 13].

Молекула A_2^* (рис. 1, в) может образовывать водородные связи с любым каноническим основанием (рис. 3, в—е). Если напротив A_2^* будет встроены тимин, то мутации не произойдет; если цитозин — то возникнет транзиция $T \rightarrow C$; если гуанин — то образуется трансверсия $T \rightarrow G$; если же будет встроены аденин, то образуется гомологическая трансверсия $T \rightarrow A$. С наибольшей вероятностью ДНК-полимераза напротив A_2^* встроит тимин, так как такая пара в наименьшей степени отличается от канонической. Но при определенных условиях могут возникнуть и мутации замены оснований. Если в молекуле A_2^* атом водорода H_6^* повернется так, что займет положение, которое занимает атом H_6' в аденине, находящемся в канонической таутомерной форме, то напротив A_2^* может быть встроены тимин (рис. 3, ж) или гуанин (рис. 3, з). Следовательно, или мутации не произойдет, или возникнет трансверсия $T \rightarrow G$.

Напротив аденина A_3^* (рис. 1, г) ДНК-полимераза не может встроить ни одного из оснований так, чтобы между молекулой A_3^* и встраиваемыми основаниями, находящимися в канонической таутомерной форме, образовывались водородные связи.

Напротив аденина A_4^* (рис. 1, д) ДНК-полимераза может встроить тимин (рис. 3, и) или гуанин (рис. 3, к). Следовательно, мутации или не произойдет вообще, или возникнет трансверсия $T \rightarrow G$. Последнее событие возможно, если, во-первых, ДНК-полимераза модифицирована так, что дополнительно ослаблен контроль за тем, чтобы образовывались только пары пурип-пиримидин, и, во-вторых, если имеется «голодание» по тимину.

Напротив аденина A_5^* (рис. 1, е) ДНК-полимераза не может встроить ни одного основания, находящегося в канонической таутомерной форме, так, чтобы между A_5^* и встроеными основаниями могли образоваться водородные связи.

На рис. 2, в, изображен результат застраива-

ния пострепликативных брешей (рис. 2, б) так модифицированной ДНК-полимеразой, что в результате SOS-индукции ослабляется контроль за таутомерным состоянием оснований матрицы, но сохраняется контроль за тем, чтобы образовывались только пары пурип-пиримидин. Вопрос о том, какие основания будут встроены напротив тиминных димеров, обсуждался в [2].

На рис. 2, з, изображен результат застройки пострепликативных брешей, изображенных на рис. 2, б, так модифицированной ДНК-полимеразой, что ослаблен или подавлен контроль за тем, чтобы образовывались только пары пурип-пиримидин. А на рис. 2, д, показано, что произойдет, если дополнительно имеется голодание по тимину.

Выводы. В настоящей работе на качественном уровне проанализирован случай, когда мутагенные тиминные димеры имеются в обеих цепях ДНК недалеко друг от друга. Рассмотрен такой вариант, когда в результате синтеза ДНК напротив димеров возникли пострепликативные брешы. Пострепликативная SOS-репарация может осуществиться только в том случае, если эти брешы застраиваются в результате синтеза *de novo*. Потенциально мутагенными изменениями структуры ДНК в данном случае являются молекулы аденина, находящегося в редких таутомерных формах. Изменение таутомерного состояния аденинов произошло при изменении таутомерных состояний комплементарных тиминных, образовавших димеры в результате безызлучательного деэвозбуждения УФ-кванта [1].

Установлено, что такие потенциальные мутации могут приводить к транзициям, трансверсиям и брешам в один нуклеотид. То есть могут вызывать и мутации сдвига рамки считывания. Одна и та же потенциальная мутация может не вызвать мутации, приводить к транзиции или трансверсии. Какая именно мутация появится, зависит от вида модификации ДНК-полимеразы и ассоциированных с ней ферментов. Трансверсии могут возникать, если дополнительно ослаблен контроль за тем, чтобы образовывались только пурип-пиримидиновые пары.

H. A. Grebneva

Possible molecular mechanisms of untargeted mutagenesis upon a post-replication SOS-repair after irradiating two-stranded DNA by ultra-violet light

Summary

Possible molecular mechanisms of an untargeted mutagenesis after post-replication SOS-repair, resulting in formation of adjacent thymine dimers in both DNA chains are analyzed on the qualitative level. It is suggested that a dimer is mutagenic only if one or two bases are in rare tautomeric forms and the control over tautomeric

states of the template bases at DNA synthesis is diminished due to the SOS-induction. The potential mutations in this case are assumed to be the adenine residues in rare tautomeric forms located in the vicinity of dimers — exactly, opposite to the thymines forming other dimers with changes in their tautomeric state. They can result in transitions, transversions and frameshift mutations.

О. А. Гребнева

Можливі молекулярні механізми немішеного мутагенезу при постреплікативній SOS-репарації після опромінення дволанцюгової ДНК ультрафіолетовим світлом

Резюме

На якісному рівні аналізуються можливі молекулярні механізми немішеного мутагенезу при постреплікативній SOS-репарації після опромінення ДНК УФ-промінням, коли в обох її ланцюгах формуються близькорозташовані тимінові димери. Передбачається, що мутагенними є лише ті димери, основи в яких знаходяться в рідкісних таутомерних формах, а в результаті SOS-індукції послаблюється контроль за таутомерним станом основ матриці. Встановлено, що причиною потенційних мутацій в цьому випадку можуть бути аденінові залишки, що перебувають у рідкісних таутомерних станах та локалізуються поблизу димерів, а саме — навпроти тимінів, що сформували інші димери та змінили свій таутомерний стан. Вони можуть спричинювати транзиції, трансверсії та мутації зсуву рамки читування.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гребнева Е. А. Природа и возможные механизмы образования потенциальных мутаций, возникающих при появлении тиминовых димеров после облучения двухцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом // Биополимеры і клітина.—2002.—18, № 3.—С. 205—218.
2. Гребнева Е. А. Молекулярные механизмы образования мутаций замены оснований при пострепликативной SOS-репарации двухцепочечной ДНК, содержащей тиминовые димеры // Биополимеры і клітина.—2001.—17, № 6.—С. 487—500.
3. Hutchinson F. Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation // Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.—1985.—32.—Р. 115—154.
4. Lawrence C. W., Christensen R. B. The mechanism of untargeted mutagenesis in UV-irradiated yeast // Mol. and Gen. Genet.—1982.—186.—Р. 1—9.
5. Lawrence C. W., Le Clerc J. E., Christensen J. R., Christensen R. B., Tata P. V., Benerjee S. K. LacI sequence changes and the mechanisms of UV mutagenesis in *E. coli* // Radiat. Res.—1987.—2.—Р. 538—543.
6. Hagen U. Biochemical aspects of radiation biology // Experientia.—1989.—45.—Р. 7—12.
7. Гребнева Е. А., Иванов М. О. Возможные молекулярные

механизмы образования мутаций немишеного типа при SOS-репликации двухцепочечной ДНК // Биополимеры і клітина.—2001.—17, № 5.—С. 388—395.

8. Lawrence C. W., Benerjee S. K., Borden A., Le Clerc J. E. T-T cyclobutane dimers are misinstructive, rather than non-instructive, mutagenic lesions // Mol. and Gen. Genet.—1990.—222, N 1.—Р. 166—168.
9. Полтев В. И., Шулюшина Н. В., Брусков В. И. Молекулярные механизмы правильности биосинтеза нуклеиновых кислот. Сравнение результатов компьютерного моделирования с экспериментальными данными // Молекуляр. биология.—1998.—32, № 2.—С. 268—276.
10. Бреслер С. Е. О решенных и нерешенных проблемах мутагенеза и репарации // Повреждение и репарация ДНК.—Пушино, 1980.—С. 16—26.
11. Watson J. D., Crick F. H. C. The structure of DNA // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.—1953.—18.—Р. 123—131.
12. Streisinger G., Okada J., Emerich J., Newton J., Tsugida A., Terragi E., Inouye M. Frameshift mutations and the genetic code // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.—1966.—31.—Р. 77—89.
13. 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.—265, N 6443.—Р. 274—276.
14. Clementi E., Corongiu G., Detrich J., Chin S., Domingo J. Parallelism in study in DNA pairs as an example // Int. J. Quant. Chem.: Quantum Chem. Symp.—1984.—18.—Р. 601—618.
15. Raghunathan G., Kieber-Emmons T., Rein R., Alderfer I. L. Conformation features of DNA containing a *cis-syn* photodimer // J. Biomol. Struct. and Dyn.—1990.—7, N 4.—Р. 899—913.
16. Крутяков В. М. Рациональная регуляция ДНК-полимеразного мутагенеза и автономные-экзонуклеазы // Молекуляр. биология.—1998.—32, № 2.—С. 229—232.
17. Михайлов В. С. ДНК-полимеразы эукариот // Молекуляр. биология.—1999.—33, № 4.—С. 567—580.
18. Чехлов А. Н. Внутримолекулярные С-Н...О взаимодействия в главных нуклеозидах по кристаллографическим данным. Уточнение кристаллической структуры тимидина // Журн. структур. химии.—1995.—36, № 1.—С. 178—184.
19. Волькенштейн М. В., Голованов И. Б., Соболев В. М. Молекулярные орбитали в экзимологии.—М.: Наука, 1982.—239 с.
20. Yang Y., Kunz B. A. Naturally-occurring single nucleotide loops are corrected more efficiently than base mismatches in yeast // Environ. and Mol. Mutagenes.—1994.—23, Suppl., N 23.—Р. 75.

УДК 575.24; 576.851.48
Надійшла до редакції 19.12.2000