

PACS: 87.53.-j, 87.14.Gg

Е.А. Гребнева

ПОЛИМЕРАЗНО-ТАУТОМЕРНАЯ МОДЕЛЬ
РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ
ГЕНОМА: МИШЕННЫЕ ЗАДЕРЖИВАЮЩИЕСЯ МУТАЦИИ ЗАМЕНЫ
ОСНОВАНИЙ ПРИ СИНТЕЗЕ, СКЛОННОМ К ОШИБКАМ,
И SOS-СИНТЕЗЕ ДВУНИТЕВОЙ ДНК, СОДЕРЖАЩЕЙ
ЦИС-СИН ЦИКЛОБУТАНОВЫЕ ТИМИНОВЫЕ ДИМЕРЫ

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

Статья поступила в редакцию 17 мая 2017 года

В рамках полимеразно-таутомерной модели предлагаются механизмы образования мишенных задерживающихся мутаций замены оснований, вызванных цис-син циклобутановыми тиминовыми димерами. Как было установлено ранее, тимин может образовывать пять редких таутомерных форм, которые будут стабильными, если соответствующие нуклеотиды входят в состав циклобутановых димеров. Структурный анализ встраивания оснований показал, что напротив редкой таутомерной формы тимина T_3^ можно встроить любое каноническое основание так, чтобы между ними образовались водородные связи. А напротив канонического тимина можно встроить только цитозин. Если синтез ДНК, содержащей цис-син циклобутановые димеры, идет с помощью ДНК-полимераз со сравнительно высокой точностью синтеза, мутации не появятся. Но, если в дальнейшем в синтезе ДНК будут участвовать ДНК-полимеразы, обладающие низкой точностью синтеза, могут появиться мутации замены оснований. Причем, они могут образоваться через много циклов репликации после повреждения ДНК. Показано, что цис-син циклобутановые тиминовые димеры TT могут приводить только к мишенным задерживающимся трансверсиям $T-A \rightarrow G-C$, а димеры TT_3^* – к $T-A \rightarrow C-G$ и к трансверсиям $T-A \rightarrow G-C$ или $T-A \rightarrow A-T$.*

Ключевые слова: радиационно-индуцированная нестабильность генома, редкие таутомерные формы оснований ДНК, цис-син циклобутановые тиминовые димеры, мишенные задерживающиеся мутации замены оснований, склонная к ошибкам репликация, SOS-репликация

Введение

Радиационно-индуцированной нестабильностью генома называются биологические эффекты, которые возникают в потомстве облученных клеток через многие поколения клеточного деления [1]. Следовательно, согласно этому определению такая нестабильность генома включает только задерживающиеся мутации. К ним относятся как мишенные, так и немишенные

задерживающиеся мутации. Нестабильность генома, приводящая к раковым заболеваниям, характеризуется резким возрастанием количества немишен-ных и задерживающихся мутаций [2]. Для того чтобы понять механизм образования мишенных задерживающихся мутаций замены оснований, изучим, какие мутации могут появляться напротив *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров. Такие димеры – это повреждения молекулы ДНК, чаще всего возникающие при ее облучении ультрафиолетовым (УФ) светом [3]. Ультрафиолетовый мутагенез довольно хорошо изучен, УФ-свет приводит к небольшому количеству фотоповреждений, кроме того, он вызывает рак кожи. Следовательно, он является прекрасной моделью для изучения природы и механизмов образования любых типов мутаций.

В результате облучения молекулы ДНК УФ-светом образуются циклобутановые пиримидиновые димеры или (6–4)-аддукты. Чаще всего появляются *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры, в которых ориентация оснований относительно сахаро-фосфатного остова не изменяется. Мутации всегда образуются при синтезе ДНК в процессах склонной к ошибкам или SOS-репликации, репарации или транскрипции. Эти процессы вызывают мишенные мутации замены оснований, мишенные инсерции, мишенные делеции, мишенные сложные мутации и мишенные задерживающиеся мутации. Только 5–12% циклобутановых димеров и (6–4)-аддуктов приводят к ошибкам репликации, большая часть фотодимеров не вызывает мутации. Когда мутации образуются напротив фотопродуктов, циклобутановых пиримидиновых димеров или (6–4)-аддуктов, такой мутагенез называется мишенным. Когда же мутации появляются в небольшой окрестности от димеров, имеет место немишенный мутагенез. Иногда образуются задерживающиеся мутации [1] (см. обзор в [4]).

Однократное воздействие УФ-света UVA может оказывать влияние в течение нескольких дней после облучения, усиливая, таким образом, вредные эффекты воздействия. Задерживающиеся мутации обычно точечные, больше половины из которых составляют мутации замены оснований [5]. Как показывает эксперимент, повреждения ДНК, приводящие к задерживающимся мутациям, обычно не удаляются. Такие мутации могут вносить значительный вклад в генетические заболевания.

В настоящее время не известны молекулярные механизмы, лежащие в основе индуцированной геномной нестабильности [1]. Классическая парадигма радиобиологии основана на концепции, что на живой материи все эффекты радиации обусловлены ее прямым действием. Считается, что нестабильность генома, включающая мишенные и немишенные задерживающиеся мутации, просто не может быть объяснена на основе прямого повреждения ДНК. Поэтому предлагается сменить парадигмы радиационной биологии для низких доз радиации. Задерживающиеся эффекты могут играть важную роль в процессе радиационного канцерогенеза [2]. Была высказана идея, что последний не прямо связан с мутациями, а излучение вызывает рак вслед-

ствие повреждения белка. Исследуется гипотеза, что сигнальные механизмы играют важную роль в геномной нестабильности (см. обзор в [6]). Сразу в определение радиационно-индуцированной нестабильности генома включается утверждение, что она образовалась в клетках, которые не были облучены [1]. Это утверждение может быть ошибочным. По крайней мере, оно требует детальной проверки. Таким образом, в настоящее время не ясен механизм образования задерживающихся мутаций [1].

Общепринятая полимеразная парадигма связывает причину образования мутаций исключительно со спорадическими ошибками ДНК-полимераз (см. обзор в [7,8]). Таутомерные модели мутагенеза опираются на идею Уотсона и Крика [9] о том, что в его основе может лежать способность оснований ДНК находиться в различных таутомерных формах. Выполнено большое количество работ, посвященных изучению редких таутомерных форм как в основаниях ДНК, так и в других модельных молекулах. Показано, что после того как цитозин облучали УФ-светом (цитозин был изолирован в низкотемпературной аргоновой матрице), он переходил из основной в редкие таутомерные формы, их соотношение зависело от интенсивности облучения (см. обзор в [6–8]). В [10,11] природа дефектных состояний в кристаллах оснований нуклеиновых кислот, облученных УФ-светом, изучена методом термостимулированной люминесценции. Авторами сделан вывод о наличии редких таутомерных форм цитозина в исследованных кристаллах. Однако все существующие в настоящее время модели мутагенеза не могут объяснить большинство его явлений (см. анализ в обзорах [6–8]).

В ряде работ автор данной статьи предложила и разрабатывает полимеразно-таутомерные модели УФ-мутагенеза [4,6–8,12–36], радиационно-индуцированной нестабильности генома [35] и байстендер-эффектов [6,19,22,27,29,36]. Результаты, полученные по УФ-мутагенезу, просуммированы в работе [8]. Предложен механизм образования редких таутомерных форм оснований ДНК [8,12–14]. Показано, что при появлении *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров может изменяться таутомерное состояние входящих в них оснований [8,21,23]. Возможно образование пяти новых редких таутомерных состояний тимина и аденина [8,21,23] и семи – гуанина и цитозина [4,17,25]; они устойчивы, когда входят в состав циклобутановых димеров или находятся в ближайших окрестностях от них, а также во время синтеза ДНК [8,24]. Разработаны механизмы образования мишеных мутаций замены оснований [8,20,24], инсерций [9,30,31], делеций [8,32,34] и сложных инсерций [8,33] при склонном к ошибкам или SOS-синтезу молекулы ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые тиминовые димеры, а также формирования мишеных мутаций замены оснований [4,18,26] и сдвига рамки считывания (инсерций) [30] при склонном к ошибкам или SOS-синтезу молекулы ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые цитозиновые димеры. Кроме того, предложен механизм образования горячих и холодных пятен УФ-мутагенеза [16,28].

Возможно формирование пяти *цис-син* циклобутановых тиминовых димеров TT_1^* , TT_2^* , TT_3^* , TT_4^* и TT_5^* , содержащих молекулы тимина в редких таутомерных формах. Димеры TT_1^* , TT_4^* и TT_5^* могут вызывать только мишенные мутации замены оснований [8,20,24]; димеры TT_2^* – мишенные мутации сдвига рамки чтения, инсерции [8,30,31] и делеции [8,32,34]; димеры TT_3^* – только задерживающиеся мишенные мутации замены оснований [35]. Участок ДНК, содержащий *цис-син* циклобутановые тиминовые димеры с молекулами тимина в различных редких таутомерных формах, может приводить к мишенным сложным мутациям, например к сложным инсерциям [8,33]. В рамках полимеразно-таутомерной модели радиационно-индуцированных байстендер-эффектов, подробно обоснованной в [6], были разработаны механизмы образования немишенных мутаций замены оснований [6,19,22,27,29] и сдвига рамки считывания [36]. Источником этих мутаций являются основания ДНК в определенных редких таутомерных формах, находящиеся в небольших окрестностях от циклобутановых димеров [6,19,22,27, 29].

Механизм образования задерживающихся мишенных мутаций замены оснований разработан в рамках полимеразно-таутомерной модели радиационно-индуцированной нестабильности генома [35]. В данной работе исследуем, к каким биологическим последствиям могут привести канонические *цис-син* циклобутановые тиминовые димеры TT и димеры TT_3^* с основаниями, находящимися в редкой таутомерной форме T_3^* . Для того чтобы понять механизм образования задерживающихся мутаций, надо хорошо понимать, как происходит синтез ДНК и как работают различные ДНК-полимеразы.

1. Особенности синтеза ДНК

Основной функцией ДНК, как известно, является сохранение наследственной информации путем полуконсервативной репликации. Репликация – процесс удвоения ДНК (синтез ДНК на ее матрице). Матричный синтез, происходящий при репликации и транскрипции, следует правилам комплементарности азотистых оснований (A–T и G–C), основанным на их особой химической структуре, позволяющей ферментам этого синтеза (ДНК- и РНК-полимеразам) точно копировать последовательность нуклеотидов. Большинство данных ферментов строго различают нормальные звенья в матричных молекулах, поэтому химические модификации нуклеотидов в ДНК приводят, как правило, к блокированию нормальной транскрипции и репликации, т.е. являются некодирующими повреждениями.

Обычно ДНК-полимеразы ведут синтез с очень высокой точностью – от 10^{-9} до 10^{-11} ошибочных оснований на пару оснований при репликации делящейся клетки [37]. Повреждения в ДНК устраняются с помощью ряда репарационных механизмов. К ним относятся фоторепарация, эксцизионная и пострепликативная репарация, коррекция неправильно спаренных основа-

ний и др. [38]. Если не все повреждения будут удалены, то возможно индуцирование склонной к ошибкам или SOS-системы. В этом случае может происходить и синтез на ДНК, содержащей повреждения, который называется синтезом через повреждение. Он может вызывать мутации [37], появляющиеся в результате ошибок ДНК-полимераз. SOS-репликация и SOS-репарация бактерий или склонные к ошибкам репликация и репарация млекопитающих могут приводить к мутациям в результате действия механизма скользящей скрепки [39] или при работе специализированных ДНК-полимераз, характеризующихся низкой точностью синтеза [40]. Эти процессы действуют совместно и согласованно, так что синтезируется наиболее подходящая полимеразы, соответствующая данному повреждению ДНК [40].

1.1. ДНК-полимеразы

ДНК-полимеразы – это ферменты, участвующие в репликации ДНК. Они осуществляют синтез дочерних нитей ДНК при репликации, застраивают поврежденные участки ДНК в ходе репарации и потому играют ключевую роль в процессах репродукции генома и сохранения его первичной структуры. В бактерии *E. coli* было найдено три конститутивные ДНК-полимеразы. Главной является ДНК-полимераза III, осуществляющая репликацию ДНК. ДНК-полимеразы человека δ и ϵ являются ключевыми ферментами в репликации хромосом. Указанные полимеразы обладают 3'→5'-экзонуклеазной активностью, выполняющей корректорскую функцию в ходе синтеза ДНК [37,41]. Ферменты и белки, участвующие в репликации (их больше 40), объединены в единый комплекс – реплисому. Известно, что ДНК-полимераза обычно действует в комплексе с другими ферментами и белками. Холофермент ДНК-полимеразы может включать саму ДНК-полимеразу, белки, регулирующие скорость синтеза, 3'→5'-экзонуклеазу и т.д. [37].

1.2. Механизм скользящей скрепки

Изучение механизма смены полимеразной активности на корректорскую показало, что, например, ДНК-полимераза III диссоциирует от ДНК, после чего с ней ассоциирует экзонуклеазный центр той же или другой молекулы. Аналогичный механизм наблюдается у ДНК-полимеразы δ эукариот. Если в процессе репликации было встроено ошибочное основание, то оно обычно удаляется с помощью 3'→5'-экзонуклеазы. После совершения ошибки 3'-ОН-конец праймера выходит из двойной спирали ДНК и вероятность диссоциации ДНК-полимеразы от праймера возрастает. Она диссоциирует от ДНК, после чего с ней ассоциирует экзонуклеазный центр той же или другой молекулы [41]. Скорость удлинения праймера уменьшается в 10^3 – 10^6 раз в зависимости от конкретного сочетания неспаренных нуклеотидов. Во время этой паузы ошибочные нуклеотиды могут быть удалены 3'→5'-экзонуклеазами данной или других ДНК-полимераз либо автономными 3'→5'-экзонуклеазами. Даже бактериальная 3'→5'-экзонуклеаза (субъе-

диница ϵ из холофермента ДНК-полимеразы III *E. coli*) эффективно исправляет ошибки, допущенные ДНК-полимеразами млекопитающих, несмотря на отсутствие комплекса между этими ферментами. Удалив неспаренный нуклеотид, 3'→5'-экзонуклеаза вскоре отделяется от ДНК, и полимеразный синтез возобновляется [41].

Решающую роль в регуляции соотношения полимеразной и корректорской активности ДНК-полимеразы III *E. coli* играет фактор процессивности – субъединица β . Его молекулы образуют кольцевую перемещающуюся по ДНК подвижную платформу или «скользящую скрепку» с отверстием для двунитевой ДНК в центральной части, которая удерживает ДНК-полимеразу III на матрице и обеспечивает высокопроцессивный синтез ДНК (синтез с высокой скоростью) [41]. Аналогичный механизм имеется и у млекопитающих.

Следовательно, при склонном к ошибкам или SOS-синтезу ДНК, содержащей димеры, во-первых, ослабляется контроль над основаниями матричной ДНК. Это, в частности, выражается в том, что нуклеотидные основания встраиваются напротив димеров. Во-вторых, если образовалась ошибочная пара, механизм «скользящей скрепки» прижимает ДНК-полимеразу к матрице и не дает 3'→5'-экзонуклеазе удалить «неправильное основание».

1.3. Специализированные ДНК-полимеразы

Для обеспечения эффективной и своевременной репликации молекулы ДНК организмы обладают специализированными ДНК-полимеразами, способными вести синтез через различные типы повреждений ДНК. Синтез через повреждение – это процесс, в котором специализированные ДНК-полимеразы реплицируют напротив повреждений ДНК. Известно несколько специализированных ДНК-полимераз эукариот: зета (Pol ζ), каппа (Pol κ), эта (Pol η), тета (Pol θ), йота (Pol ι) [37,42].

В *E. coli* известны две специализированные ДНК-полимеразы – IV и V [40]. Оба фермента – это индуцибельные компоненты SOS-системы. Они являются частью индуцированного стрессом процесса, который позволяет им функционировать только тогда, когда высокая скорость образования мутаций выгодна для организма [37,40]. ДНК-полимераза V находится под жестким контролем и обычно синтезируется только при индукции SOS-системы. ДНК-полимераза IV появляется гораздо чаще, чем Pol III – приблизительно 250 молекул Pol IV приходится на 30 молекул Pol III. ДНК-полимераза Pol IV приводит к немишенному мутагенезу, кроме того, она участвует в мутагенезе неделяющихся клеток. Когда ДНК-полимераза III останавливается, происходит замена Pol III на ДНК-полимеразу IV, способную обходить специфические повреждения.

ДНК-полимераза V способствует застройке брешей в образующейся (дочерней, растущей) нити ДНК и ответственна за значительную часть

УФ-мутагенеза. Кроме того, она вносит вклад в немишенный мутагенез [40] эффективно обходит *цис-син* циклобутановые тиминовые димеры *in vitro* и *in vivo* [40]. Но в отсутствие ДНК-полимеразы V почти не происходит репликация участка ДНК, содержащего *цис-син* циклобутановые тиминовые димеры [40].

Замены конститутивных ДНК-полимераз на специализированные, способные вести синтез на матрице, содержащей повреждения, дают возможность обходить повреждения и предотвращают гибель клеток. Тонкая регуляция, позволяющая вовлекать самую подходящую в каждый данный момент ДНК-полимеразу, обеспечивает максимально возможную в данной ситуации точность синтеза (см. обзор в [4]). Например, больные ксеродермой пигментозой (*xeroderma pigmentosum*) имеют нормальную эксцизионную репарацию, тем не менее они предрасположены к раку, вызываемому светом. У них в 25 раз чаще, чем у здоровых людей образуются мутации, индуцированные УФ-светом, причем очень необычного спектра – главным образом трансверсии. Первичным дефектом в клетках ксеродермы пигментозы является недостаток функциональной ДНК-полимеразы Pol η. При ее отсутствии работает полимеразы Pol ι, которая аномально склонна к ошибкам. Было показано, что в клетках, недостаточных по Pol η, ДНК-полимераза Pol ι ответственна за высокую частоту и аномальный спектр УФ-индуцированных мутаций и в конечном счете за их злокачественное перерождение [43]. Однако УФ-индуцированные опухоли на коже у мышей, клетки которых имели недостаточность по Pol η, проявлялись на 4 недели раньше, если, кроме того, добавлялась недостаточность по Pol ι. Таким образом, ДНК-полимераза Pol ι способна не только обходить УФ-фотопродукты, но и задерживать индуцированный светом рак кожи [44].

Скользящая β-скрепка функционирует со всеми ДНК-полимеразами *E. coli* [40]. При повреждении ДНК поврежденное основание на лидирующей нити останавливает синтез ДНК, происходящий с помощью Pol III. Синтез этого участка ДНК продолжается полимеразы с низкой точностью синтеза, такими как Pol IV и Pol V, они обходят повреждение, после чего Pol III может возобновить синтез [40]. Смена полимераз происходит с помощью скользящей β-скрепки. Она одновременно связывает две различные ДНК-полимеразы: одной из них является Pol III, обладающая высокой точностью синтеза, а другой – специализированная полимеразы Pol IV или Pol II.

Таким образом, когда индуцируется склонная к ошибкам или SOS-система, ослабляется контроль за основаниями, и даже конститутивные ДНК-полимеразы Pol III *E. coli* и ДНК-полимеразы млекопитающих δ и ε могут встраивать основания напротив циклобутановых димеров. Даже когда формируется ошибочная пара оснований, механизм «скользящей скрепки» прижимает ДНК-полимеразу к матрице, что предотвращает удаление 3'→5'-экзонуклеазой «неправильного» основания. Кроме того, синтез ДНК могут вести ДНК-полимеразы, вообще не имеющие экзонуклеаз (напри-

мер, ДНК-полимеразы *E. coli* IV или V либо млекопитающих Pol ζ, Pol ι или Pol κ). Кроме того, специализированные ДНК-полимеразы могут прижиматься «скользящей скрепкой», что понижает точность, но повышает скорость синтеза и в случае большого количества повреждений позволяет предотвратить гибель клетки.

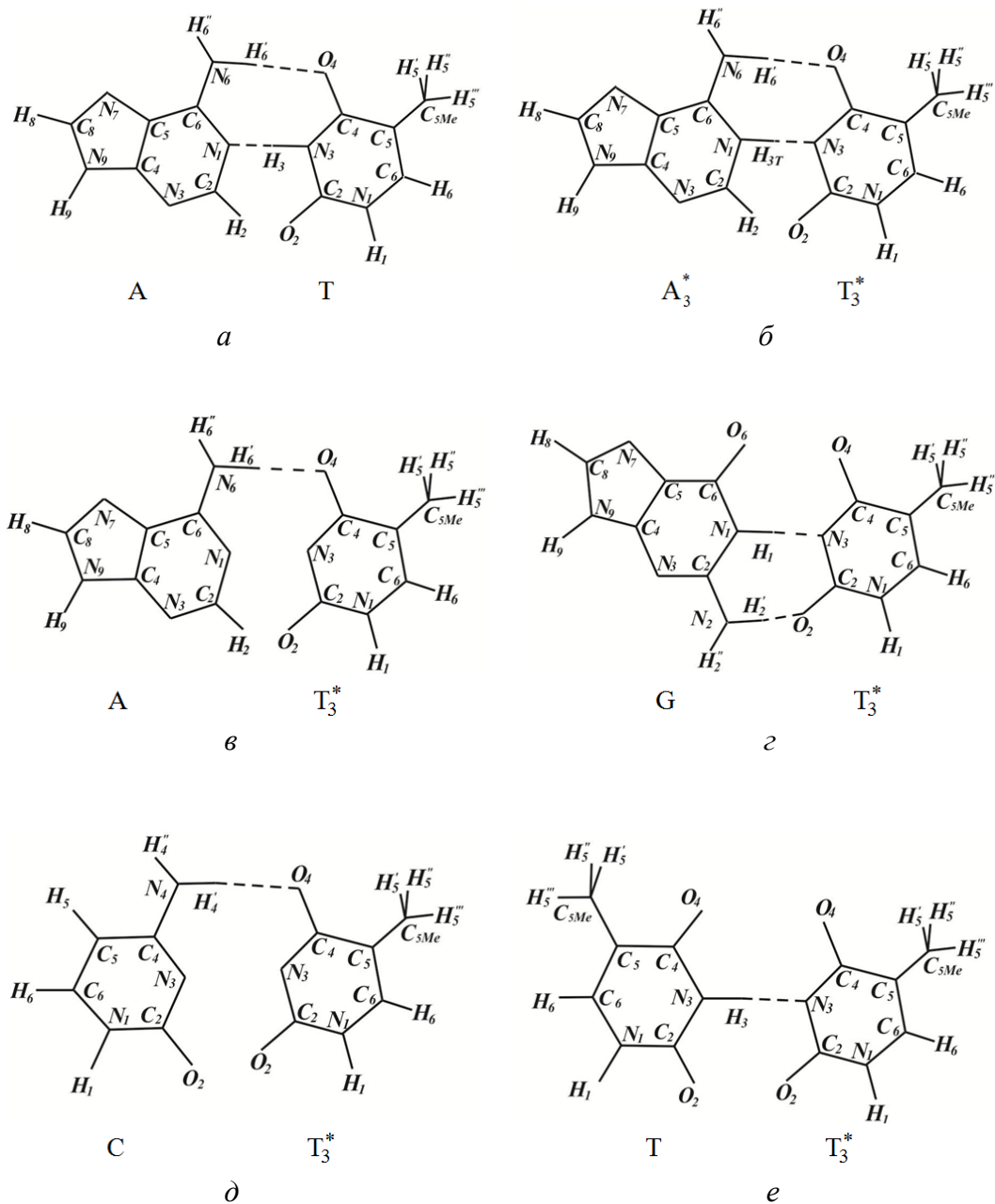


Рис. 1. Редкое таутомерное состояние тимина T₃^{*} (б) и структурный анализ спаривания тимина T₃^{*} с каноническими основаниями ДНК: аденином (в), гуанином (г), цитозином (д), тимин (е). Для примера приведены тимин (Т) и аденин (А) в канонических таутомерных формах (а)

2. Образование мишеных задерживающихся мутаций замены оснований при склонном к ошибкам или SOS-синтезе молекулы ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые димеры \widehat{TT}_3^*

Если циклобутановые пиримидиновые димеры не устранены в процессах репарации, то они могут приводить к мишенным мутациям при склонной к ошибкам или SOS-репликации, репарации или транскрипции [8]. Мутации образуются, если в синтез ДНК вовлекаются модифицированные или специализированные ДНК-полимеразы [40]. 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 [24]. То есть ошибочный синтез ДНК идет точно так же, как и безошибочный.

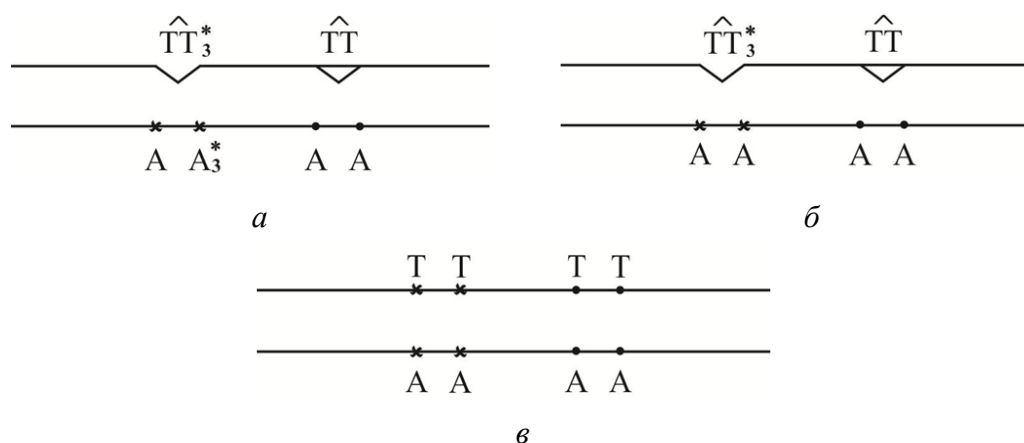


Рис. 2. Склонный к ошибкам и SOS-синтез участка ДНК, содержащего *цис-син* циклобутановые тиминовые димеры \widehat{TT} и \widehat{TT}_3^* , когда они не приводят к появлению мутаций: *a* – участок ДНК, содержащий димеры \widehat{TT} и \widehat{TT}_3^* ; *б* – напротив тимина в редкой таутомерной форме T_3^* и канонического тимина T встраиваются молекулы аденина; *в* – напротив молекул аденина встраиваются молекулы тимина, мутации не образуются

Проведем структурный анализ встраивания канонических оснований напротив тимина в редкой таутомерной форме T_3^* (рис. 1,*б*). Как видно из рис. 1,*в*, тимин T_3^* может сформировать одну водородную связь с аденином. Кроме того, он может образовать две водородные связи с гуанином (рис. 1,*г*), одну – с цитозином (рис. 1,*д*) и одну – с тиминем (рис. 1,*е*).

Рассмотрим участок ДНК (рис. 2,*а*), одна нить которого содержит один *цис-син* циклобутановый тиминовый димер \widehat{TT}_3^* , одно основание в котором – это канонический тимин, а второе – это тимин T_3^* в редкой таутомерной форме (см. рис. 1,*б*). Пусть другие *цис-син* циклобутановые тиминовые ди-

меры находятся довольно далеко от него. Поскольку повреждение всего одно, синтез через повреждение будет идти довольно быстро и с высокой точностью, например, с помощью ДНК-полимеразы Pol III бактерий *E. coli* или ДНК-полимеразы δ эукариот. Если случайно напротив димера \widehat{TT}_3^* будет встроен «неправильный» нуклеотид, то ошибочные нуклеотиды могут быть удалены 3'→5'-экзонуклеазами. Следовательно, с высокой вероятностью напротив тимина T_3^* будет встроен аденин (рис. 2,б). В этом случае мутация не образуется (рис. 2,в). И так может продолжаться много циклов репликации ДНК. Мутации не будут появляться до тех пор, пока ситуация не изменится.

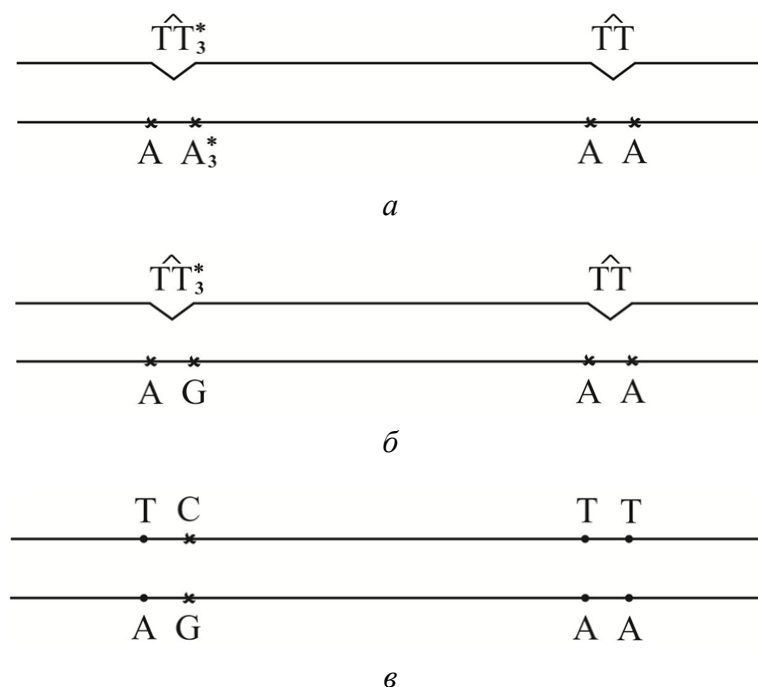


Рис. 3. Склонный к ошибкам и SOS-синтез участка ДНК, содержащего *цис-син* циклобутановые тиминовые димеры \widehat{TT} и \widehat{TT}_3^* , когда димер \widehat{TT}_3^* приводит к появлению транзиции $T-A \rightarrow C-G$, а димер \widehat{TT} не приводит к мутации: *а* – участок ДНК, содержащий димеры \widehat{TT}_3^* и \widehat{TT} ; *б* – напротив тимина T_3^* встраивается гуанин, а напротив канонических молекул тимина T встраивается аденин; *в* – напротив гуанина встраивается цитозин, появилась транзиция $T-A \rightarrow C-G$

Пусть через некоторое, возможно, продолжительное время недалеко от *цис-син* циклобутанового димера \widehat{TT}_3^* образовался другой, например, канонический циклобутановый димер (рис. 3,а). В этом случае синтез через повреждение с помощью модифицированных или специализированных ДНК-полимераз будет идти с меньшей точностью. Например, синтез по-прежнему будет идти с помощью ДНК-полимеразы Pol III *E. coli* или ДНК-полимеразы δ эукариот, но в присутствии скользящей скрепки. Тогда, если появится «неправильная» пара оснований, скользящая скрепка будет

прижимать ДНК-полимеразу к нити ДНК и не позволит 3'→5'-экзонуклеазам удалить ошибочное основание. Допустим, что в этом случае понизится точность контроля над количеством водородных связей, образующихся между основаниями ДНК. Но сохранится контроль над тем, чтобы формировались только пары оснований пиримидин-пурин. Следовательно, напротив тимина T_3^* с некоторой вероятностью может быть встроены гуанин (рис. 3,б). В этом случае появится задерживающаяся мишенная транзигия $T-A \rightarrow C-G$ (рис. 3,в).

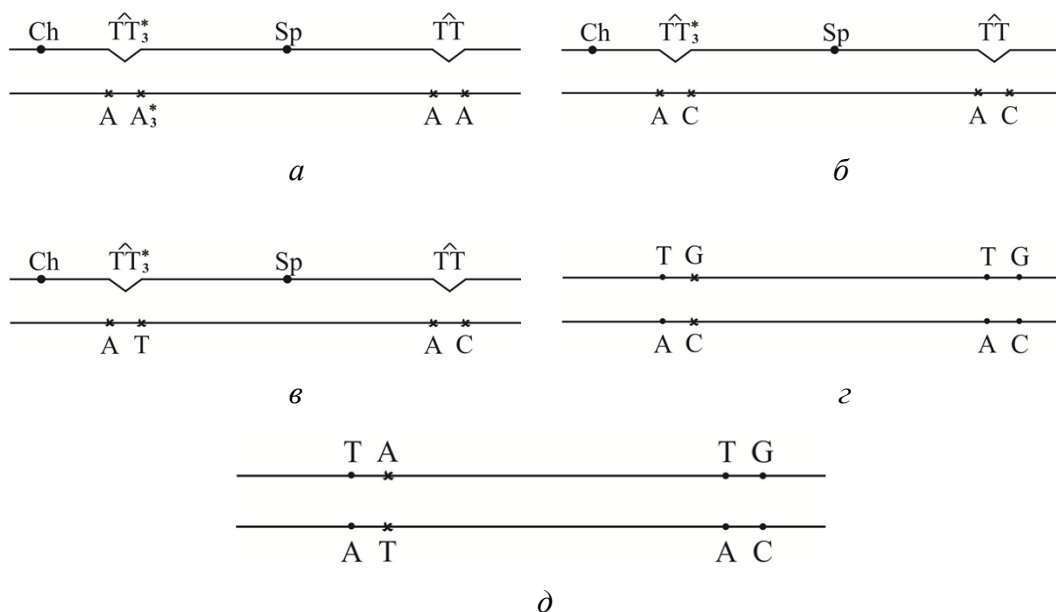


Рис. 4. Склонный к ошибкам и SOS-синтез участка ДНК, содержащего *цис-син* циклобутановые тиминные димеры TT и TT_3^* , когда димер TT_3^* приводит к появлению трансверсии $T-A \rightarrow G-C$ или гомологичной трансверсии $T-A \rightarrow A-T$, а канонический димер TT приводит к появлению трансверсии $T-A \rightarrow G-C$: *a* – участок ДНК, содержащий димеры TT_3^* и TT , а также повреждения Ch и Sp , способные останавливать синтез ДНК; *б* – напротив тимина T_3^* и канонического тимина, входящих в состав димеров TT_3^* и TT встраивается цитозин; *в* – напротив тимина T_3^* встраивается тимин, а напротив тимина T , входящего в состав димера TT , встраивается цитозин; *г* – напротив цитозина встраивается гуанин, образуется трансверсия $T-A \rightarrow G-C$; *д* – напротив тимина встраивается аденин, образуется гомологичная трансверсия $T-A \rightarrow A-T$

Пусть через некоторое время после облучения ДНК УФ-светом недалеко от *цис-син* циклобутанового димера TT_3^* появится много других повреждений, способных останавливать синтез ДНК. Часть из них может быть вызвана, например, свободными радикалами – основной причиной спонтанного мутагенеза. На рис. 4 они обозначены как Sp . Другие повреждения ДНК могут быть обусловлены действием каких-то других химических веществ. Хо-

рошо известно, у больных сердечно-сосудистыми и раковыми заболеваниями обнаружено большое количество тяжелых металлов и других химических веществ [45]. На рис. 4 они обозначены как Ch. Как показывает эксперимент, если имеется большое количество повреждений ДНК, в синтез через повреждение вовлекаются ДНК-полимеразы с более низкой скоростью и точностью синтеза. Например, синтез будет вестись с помощью ДНК-полимераз IV или V *E. coli*, или каких-то специализированных ДНК-полимераз эукариот. Да еще, возможно, они будут прижиматься скользящей скрепкой. В этом случае с большой вероятностью могут образовываться не только транзиции, но и трансверсии. Напротив тимина T_3^* может быть встроен цитозин (рис. 4,б), в этом случае появится трансверсия $T-A \rightarrow G-C$. Кроме того, напротив тимина T_3^* может быть встроен тимин (рис. 4,б), в этом случае появится гомологичная трансверсия $T-A \rightarrow A-T$ [35].

3. Образование мишеных задерживающихся мутаций замены оснований при склонном к ошибкам или SOS-синтезе молекулы ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые тиминовые димеры ТТ

Изучим, могут ли при определенных условиях канонические *цис-син* циклобутановые тиминовые димеры приводить к каким-либо мишенным мутациям (это очень важный вопрос, поскольку, как правило, 88–95% таких димеров не вызывают мутаций [46]). Выполним структурный анализ и выясним, какие канонические основания могут образовывать водородные связи с молекулами тимина. Разумеется, тимин способен спариваться с аденином (рис. 5,а), не может спариваться с каноническими гуанином (рис. 5,в) и тиминном (рис. 5,г), однако он может образовывать водородные связи с каноническим цитозином (рис. 5,б). (Впрочем, этот факт давно известен.)

Необходимо установить, при каких условиях канонические *цис-син* циклобутановые тиминовые димеры могут приводить к мутациям и к каким именно. При наличии одного или двух димеров (см. рис. 2,а, 3,а) синтез через повреждение идет довольно быстро и с высокой точностью. Следовательно, с высокой вероятностью напротив тимина Т будет встроен аденин (см. рис. 2,б, 3,б). В этом случае мутация не образуется (см. рис. 2,в, 3,в). И так может продолжаться много циклов репликации ДНК.

Пусть через некоторое, возможно, продолжительное время недалеко от *цис-син* циклобутанового димера ТТ сформировались несколько других циклобутановых пиримидиновых димеров (см. рис. 3,а). Синтез через повреждение с помощью модифицированных или специализированных ДНК-полимераз будет идти с меньшей точностью. Допустим, что при этом понизится точность контроля над количеством водородных связей, образующихся между основаниями ДНК, но сохранится контроль над тем, чтобы спаривались основания пиримидин–пурин. И в этом случае напротив канонического тимина будет встроен аденин (рис. 3,б) и мутации не появятся (рис. 3,в).

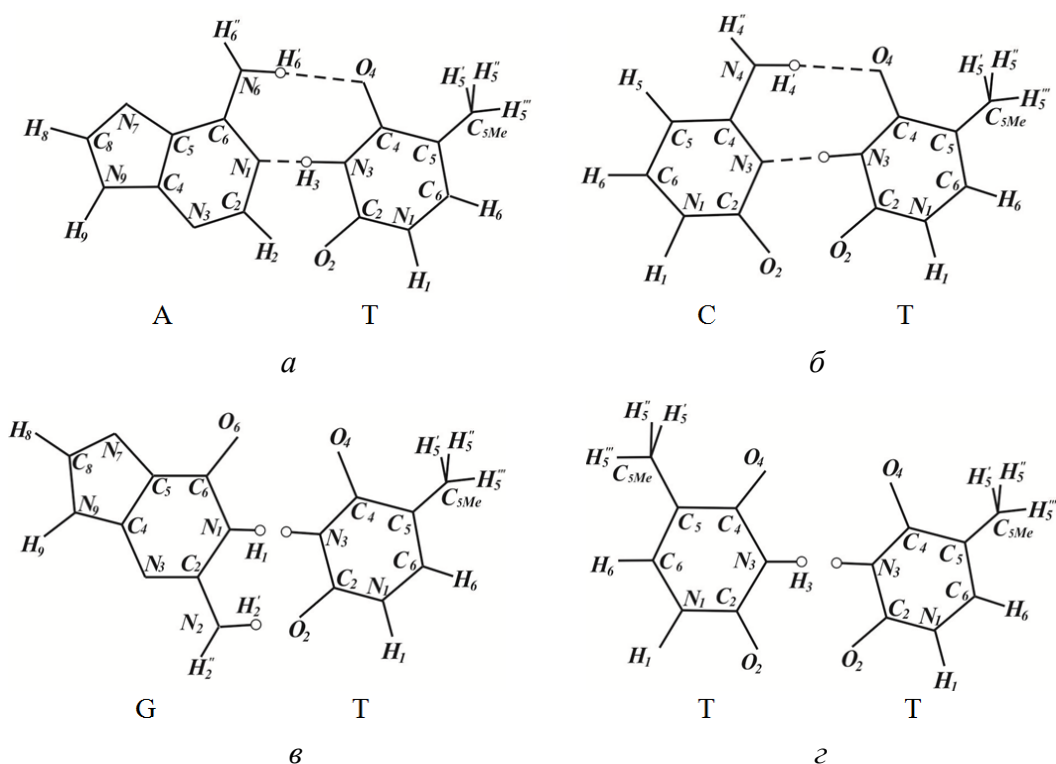


Рис. 5. Структурный анализ возможности спаривания канонического тимина Т с каноническими основаниями ДНК: аденином (а), цитозином (б), гуанином (в), тиминном (г)

Допустим, через некоторое время после облучения ДНК УФ-светом недалеко от димера ТТ появится много других повреждений, способных останавливать синтез ДНК. Часть из них может быть вызвана, например, свободными радикалами. На рис. 4 они обозначены как Sp. Другие повреждения ДНК могут быть обусловлены действием каких-то других химических веществ. Как хорошо известно, у больных сердечно-сосудистыми и раковыми заболеваниями обнаружено большое количество тяжелых металлов и других химических веществ, способных повреждать молекулу ДНК [45]. На рис. 4 они обозначены как Sh. Эксперимент показывает, что если имеется большое количество повреждений ДНК, в синтез через повреждение вовлекаются ДНК-полимеразы с более низкими скоростью и точностью синтеза. Например, синтез будет вестись с помощью ДНК-полимераз IV, или V *E. coli*, или каких-то специализированных ДНК-полимераз эукариот. Скорее всего, они будут прижиматься скользящей скрепкой. Только в этом случае могут образовываться трансверсии. Напротив тимина Т может быть встроено цитозин (рис. 4,б), и появится трансверсия Т–А → G–C (рис. 4,в).

Тот факт, что при этих условиях мутации могут появляться напротив канонических *цис-син* циклобутановых тиминных димеров, меняет ситуацию кардинальным образом. Оценим, во сколько раз повышается в этом случае вероятность появления задерживающихся мутаций замены оснований по

сравнению с тем случаем, когда источником таких мутаций являются только димеры TT_3^* . Только 5–10% димеров, как правило, приводят к мутациям [46]. Как показано в полимеразно-таутомерной модели УФ-мутагенеза, это димеры с основаниями в редких таутомерных формах [4,7,8]. Следовательно, если к мутациям будут приводить все димеры, то вероятность образования мутаций (по этой причине) возрастет в 10–20 раз. Возможно образование 5 редких таутомерных форм тимина [8,23]. Только одна из них может приводить к задерживающимся мутациям замены оснований [35]. Следовательно, по этой причине вероятность образования рассматриваемых мутаций увеличится в 50–100 раз. Кроме того, как известно, основная часть мутаций появляется напротив цитозиновых димеров или димеров, состоящих из цитозина и тимина [47]. Согласно полимеразно-таутомерной модели это связано с тем, что цитозин чаще образует редкие таутомерные формы, чем тимин [8,23]. По этой причине вероятность появления задерживающихся мутаций замены оснований, вызванных каноническими *цис-син* циклобутановыми тиминовыми димерами, будет в 500–1000 раз больше, чем, если бы они образовывались только напротив димеров TT_3^* . Эту оценку легко проверить экспериментально. При очень большом количестве повреждений ДНК мишенные задерживающиеся мутации замены оснований, вызванные *цис-син* циклобутановыми цитозиновыми и тиминовыми димерами, будут встречаться с близкими вероятностями.

Можно сделать вывод, что, источником мишенных задерживающихся мутаций замены оснований могут быть *цис-син* циклобутановые тиминовые димеры TT_3^* , одно или оба основания которых находятся в таких редких таутомерных формах, которые могут образовывать водородные связи и с аденином, и с другими каноническими основаниями ДНК. Кроме того, к мишенным задерживающимся мутациям могут приводить и канонические *цис-син* циклобутановые тиминовые димеры ТТ. Появится или нет задерживающаяся мутация, полностью зависит от соседнего окружения. Если рядом нет других повреждений ДНК или их очень мало, то синтез через повреждение будет идти довольно точно и мутация не образуется. Если рядом с димером TT_3^* находятся другие повреждения, способные останавливать синтез ДНК, то синтез будет идти с помощью других специализированных ДНК-полимераз с более низкой точностью синтеза. В результате могут появиться транзиции $T-A \rightarrow C-G$. Наконец, если рядом с димером TT_3^* или ТТ находятся много повреждений, способных останавливать синтез ДНК, то в синтез через повреждение будут вовлечены специализированные ДНК-полимеразы с очень низкой точностью синтеза, которая может понижаться еще и работой скользящей скрепки. В этом случае димер TT_3^* может привести к трансверсии $T-A \rightarrow G-C$ или гомологичной трансверсии $T-A \rightarrow A-T$. Но канонический *цис-син* циклобутановый тиминовый димер ТТ может вызвать только трансверсию $T-A \rightarrow G-C$.

Заключение

Автором настоящей статьи предложены и развиты полимеразно-таутомерные модели УФ-мутагенеза, радиационно-индуцированных нестабильности генома и байстендер-эффектов. Предложен механизм образования мишенных задерживающихся мутаций замены оснований, вызванных *цис-син* циклобутановыми тиминовыми димерами. Ранее был разработан механизм образования редких таутомерных форм оснований ДНК и показано, что тимин может образовывать пять редких таутомерных форм, которые стабильны, если соответствующие нуклеотиды входят в состав циклобутановых димеров. Структурный анализ встраивания оснований показал, что напротив одной редкой таутомерной формы тимина T_3^* можно встроить аденин, но также и любое другое каноническое основание так, чтобы между ними образовались водородные связи. Если синтез ДНК, содержащей димер TT_3^* , идет с помощью ДНК-полимераз со сравнительно высокой точностью синтеза, мутации не появятся. Но, если в дальнейшем в синтезе ДНК будут участвовать ДНК-полимеразы, обладающие низкой корректорской точностью, способны появиться мишенные задерживающиеся мутации замены оснований. Причем, они могут образоваться через много циклов репликации после повреждения ДНК. Кроме того, выяснилось, что даже канонические *цис-син* циклобутановые тиминового димеры способны приводить к мишенным задерживающимся мутациям замены оснований. Они могут вызывать только мишенные задерживающиеся трансверсии $T-A \rightarrow G-C$. Такие мутации способны образоваться только в том случае, когда рядом с каноническим тиминным димером имеется очень много других повреждений ДНК.

Сделан вывод, что причиной нестабильности генома является большое количество повреждений ДНК. Не все эти повреждения обязательно должны быть мутагенными. Если эти повреждения способны останавливать синтез ДНК то, следовательно, они могут приводить к синтезу через повреждение, вызывать ДНК-полимеразы с низкой точностью синтеза и, следовательно, вносить вклад в мутагенез.

Таким образом, полимеразно-таутомерная модель способна объяснить мишенные мутации замены оснований, мишенные инсерции, мишенные делеции, мишенные сложные инсерции, появляющиеся сразу после облучения ДНК, а также причины образования горячих и холодных пятен УФ-мутагенеза. Кроме того, она может объяснить такие радиационно-индуцированные байстендер-эффекты, как немиченные мутации замены оснований, сдвига рамки считывания, и такие явления радиационно-индуцированной нестабильности генома, как мишенные задерживающиеся мутации замены оснований.

Сделан вывод, что для объяснения радиационно-индуцированных байстендер-эффектов и радиационно-индуцированной нестабильности генома нет необходимости в смене парадигмы радиационной биологии или генетики. Достаточно всего лишь сменить парадигму в мутагенезе.

1. *J.B. Little*, *Oncogene* **22**, 6978 (2003).
2. *O. Niwa*, *J. Radiation Research* **47**, B25 (2006).
3. *G.P. Pfeifer*, *Photochem. Photobiol.* **65**, 270 (1997).
4. *H.A. Grebneva*, *Int. J. Mol. Biol. Open Access*, **1**(1): 00002. DOI: 10.15406/ijmboa.2016.01.00002.
5. *J.B. Little, H. Nagasawa, T. Pfenning, H. Vetrovs*, *Radiat. Res.* **148**, 299 (1997).
6. *H.A. Grebneva*, *Int. J. Mol. Biol. Open Access* **2**, № 2, 1 (2017).
7. *H.A. Grebneva*, *Environ. Mol. Mutagen.* **47**, 733 (2006).
8. *H.A. Grebneva*, *Polymerase-tautomeric model for ultraviolet mutagenesis. Targeted base substitution and frameshift mutations caused by cis-syn cyclobutane thymine dimmers*, LAP LAMBERT Academic Publishing, Germany (2017), p. 134.
9. *J.D. Watson, F.H.C. Crick*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **18**, 123 (1953).
10. *Н.И. Остапенко, Ю.А. Скряшевский, А.К. Кадацук, Ю.В. Рубин*, *Биополимеры и клетка* **6**, № 3, 65 (1990).
11. *Н.И. Остапенко, Ю.А. Скряшевский, А.К. Кадацук, Ю.В. Рубин*, *Изв. АН СССР. Сер. физ.* **54**, 445 (1990).
12. *Е.А. Гребнева*, *УФЖ* **37**, 1636 (1992).
13. *Е.А. Гребнева*, *Докл. НАН Украины* № 2, 73 (1994).
14. *Е.А. Гребнева*, *Мол. Биол.* **28**, 805 (1994).
15. *Е.А. Гребнева*, *ФТВД* **6**, № 3, 141 (1996).
16. *Е.А. Гребнева*, *ФТВД* **11**, № 4, 83 (2001).
17. *Е.А. Гребнева*, *Докл. НАН Украины* № 7, 165 (2001).
18. *Е.А. Гребнева*, *Докл. НАН Украины* № 8, 183 (2001).
19. *Е.А. Гребнева, М.О. Иванов*, *Биополимеры и клетка* **17**, 388 (2001).
20. *Е.А. Гребнева*, *Биополимеры и клетка* **17**, 487 (2001).
21. *Е.А. Гребнева*, *Биополимеры и клетка* **18**, 205 (2002).
22. *Е.А. Гребнева*, *Биополимеры и клетка* **18**, 394 (2002).
23. *H.A. Grebneva*, *J. Mol. Struct.* **645**, 133 (2003).
24. *H.A. Grebneva*, *Environ. Mol. Mutagen.* **47**, 733 (2006).
25. *Е.А. Гребнева*, *Вісник донецького національного університету. Серія А: Природничі науки* № 2, 306 (2008).
26. *Е.А. Гребнева*, *Вісник донецького національного університету. Серія А: Природничі науки* № 1, 323 (2009).
27. *Е.А. Гребнева*, *Вісник донецького національного університету. Серія А: Природничі науки* № 2, 132 (2011).
28. *Е.А. Гребнева*, *Докл. НАН Украины* № 10, 181 (2012).
29. *Е.А. Гребнева*, *Докл. НАН Украины* № 1, 143 (2013).
30. *Е.А. Гребнева*, *Докл. НАН Украины* № 11, 156 (2014).
31. *Е.А. Гребнева*, *Мол. Биол.* **48**, 531 (2014).
32. *Н.А. Grebneva*, *J. Phot. Mat. Techn.* **1**, № 2, 19 (2015).
33. *Е.А. Гребнева*, *Докл. НАН Украины* № 5, 145 (2015).
34. *Е.А. Гребнева*, *Докл. НАН Украины* № 4, 124 (2015).
35. *Е.А. Гребнева*, *Докл. НАН Украины* № 5, 101 (2016).
36. *Е.А. Гребнева*, *Вестник ЛГУ* (2017) (в печати).
37. *В.С. Михайлов*, *Мол. Биол.* **33**, 567 (1999).

38. E.C. Friedberg, G.C. Walker, W. Siede, DNA Rrepair and Mutagenesis, ASM Press, Washington (2006), Part 3.
39. A. Furukohri, M.F. Goodman, H.A. Maki, J. Biol. Chem. **283**, 11260 (2008).
40. M. Tang, P. Pham, X. Shen, J.S. Taylor, M. O'Donnell, R. Woodgate, M. Goodman, Nature **404**, 1014 (2000).
41. В.М. Крутяков, Мол. Биол. **32**, 229 (1998).
42. I.Y. Yang, K. Hashimoto, N. de Wind et al., J. Biol. Chem. **284**, 191 (2009).
43. Y. Wang, R. Woodgate, T.P. McManus, S. Mead, J.J. McCormick, V.M. Maher, Cancer Res. **67**, 3018 (2007).
44. C.A. Dumstorf, A.B. Clark, Q. Lin, G.E. Kissling, T. Yuan, R. Kucherlapati, W.G. McGregor, T.A. Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**, 18083 (2006).
45. R. Khlif, A. Hamza-Chaffai, Toxicol. Appl. Pharmacol. **248**, № 2, 71 (2010).
46. C.W. Lawrence, S.K. Banerjee, A. Borden, J.E. LeCler, Mol. Gen. Genet. **222**, № 1, 166 (1990).

H.A. Grebneva

POLYMERASE-TAUTOMERIC MODEL FOR RADIATION-INDUCED GENOMIC INSTABILITY: TARGETED DELAYED SUBSTITUTION MUTATIONS UNDER ERROR-PRONE AND SOS SYNTHESIS OF DOUBLE-STRANDED DNA CONTAINING *CIS-SYN* CYCLOBUTANE THYMINE DIMERS

A mechanism of targeted delayed base substitution mutations caused by *cis-syn* cyclobutane thymine dimers is proposed within the framework of the polymerase-tautomeric model. Thymine is reported to form five rare tautomeric forms, which are stable if the related nucleotides are components of cyclobutane dimers. Structural analysis of the insertion of the bases shows that any canonical base can be incorporated opposite to rare tautomeric form of thymine T_3^* so that hydrogen bonds would be formed between them. Only cytosine can be incorporated opposite to canonical thymine. If DNA polymerases with relatively high fidelity of synthesis are involved to the synthesis of DNA containing the *cis-syn* cyclobutane dimer TT_3^* , mutations do not appear. However, if further DNA synthesis will involve DNA polymerases characterized by a low fidelity of synthesis, base substitution mutations can arise. Moreover, they can be formed through many cycles of replication after DNA has been damaged. It is shown that canonical *cis-syn* cyclobutane thymine dimers TT can result only in targeted delayed transversions T–A → G–C, but *cis-syn* cyclobutane thymine dimers TT_3^* can generate targeted delayed transitions T–A → C–G, targeted delayed transversions T–A → G–C and T–A → A–T.

Keywords: UV-mutagenesis, rare tautomeric forms of DNA bases, *cis-syn* cyclobutane thymine dimers, delayed substitution mutations, error-prone replication, SOS replication

Fig. 1. Rare tautomeric state of T_3^* (δ) thymine and structural analysis of pairing of thymine T_3^* with canonical DNA bases: adenine (ϵ); guanine (ζ); cytosine (δ); As an example, thymine (T) and adenine (A) are presented in canonical tautomeric forms (a)

Fig. 2. Error-prone and SOS-replication of the DNA containing TT and TT_3^* *cis-syn* cyclobutane thymine dimers when mutation are not generated: *a* – a DNA site containing *cis-sin* cyclobutane thymine dimers TT and TT_3^* ; *b* – adenine molecules are inserted opposite to thymine in the rare tautomeric form of T_3^* and canonical thymine T; *c* – molecules of thymine are inserted opposite to the molecules of adenine, mutations are not formed

Fig. 3. Error-prone and SOS-replication of the DNA containing TT and TT_3^* *cis-syn* cyclobutane thymine dimers when dimer TT_3^* results in T–A → C–G transition, and dimer TT does not: *a* – a DNA site containing *cis-sin* cyclobutane thymine dimers TT and TT_3^* ; *b* – guanine is inserted opposite to thymine TT_3^* , and molecules of adenine are inserted opposite to molecules of canonical thymine T; *c* – cytosine is inserted against guanine, transition T–A → C–G is appeared

Fig. 4. Error-prone and SOS-replication of the DNA containing TT and TT_3^* *cis-syn* cyclobutane thymine dimers when dimer TT_3^* results in T–A → G–C transversion or homologous T–A → A–T transversion, and canonical dimer TT generates T–A → G–C transversion: *a* – a DNA site containing dimers TT and TT_3^* , as well as damages Ch and Sp that are capable of stopping the synthesis of DNA; *b* – cytosine is inserted opposite to thymine T_3^* and canonical thymine, which are parts of dimers TT_3^* and TT; *c* – thymine is inserted opposite to thymine T_3^* , cytosine is inserted opposite canonical thymine T, which is a part of dimer TT; *d* – guanine is inserted opposite cytosine, T–A → G–C transversion is formed; *e* – adenine is inserted opposite to thymine, homologous transversion T–A → A–T is formed

Fig. 5. Structural analysis of possible pairing of canonical thymine T with canonical DNA bases: adenine (*a*), cytosine (*b*), guanine (*c*), thymine (*d*)