



УДК 577.2:577.3

© 2012

Е. А. Гребнева

Природа и механизмы образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза

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

В настоящее время не ясна природа и механизмы образования горячих и холодных пятен мишеных мутаций, которые образуются после облучения молекулы ДНК ультрафиолетовым светом. Разрабатывается полимеразно-таутомерная модель ультрафиолетового мутагенеза. Предлагается модель образования таких горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза, которые образуются напротив цис-син циклобутановых пиримидиновых димеров. Показано, что горячими пятнами ультрафиолетового мутагенеза являются такие цис-син циклобутановые цитозин-тиминовые, тимин-цитозиновые и цитозин-цитозиновые димеры, на которые переходит больше энергии, чем на такие же циклобутановые цитозин-тиминовые, тимин-цитозиновые и цитозин-цитозиновые димеры, являющиеся холодными пятнами ультрафиолетового мутагенеза. Причины образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза — это соотношение между синглетными и триплетными уровнями оснований ДНК и процессы распространения энергии по молекуле ДНК. Добавочная энергия может приводить к изменению таутомерных состояний оснований ДНК, таких, которые входят в состав цис-син циклобутановых пиримидиновых димеров. Это может вызвать мишеные мутации.

После облучения молекулы ДНК ультрафиолетовым светом в ней образуются циклобутановые пиримидиновые димеры и (6–4) аддукты. В процессах репликации или репарации они могут приводить к мутациям. Мутации, вызванные УФ-светом, распределены по молекуле ДНК неравномерно. Большая их часть сосредоточена в так называемых горячих пятнах. На некоторых участках их никогда не бывает — это холодные пятна ультрафиолетового мутагенеза [1, 2]. Цитозиновые циклобутановые димеры чаще приводят к мутациям, чем тиминовые. А горячие пятна ультрафиолетового мутагенеза, чаще всего, совпадают с циклобутановыми димерами, состоящими из молекул цитозина и тимина (СТ). Как показывает эксперимент, на цитозин-тиминовых сайтах фотопродукты образуются довольно часто [1, 2]. Общепринятая теория ультрафиолетового мутагенеза опирается на гипотезу о том, что мутации обусловлены исключительно случайными ошибками ДНК-полимераз, а циклобутановые пиримидиновые димеры, приводящие к мутациям, и немутационные циклобутановые

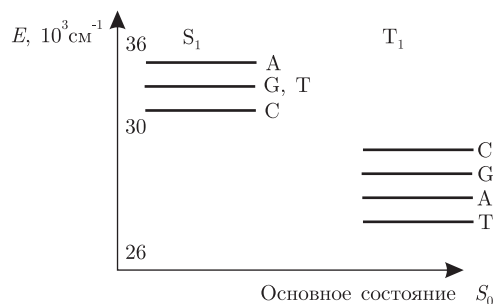


Рис. 1. Диаграмма энергетических уровней различных оснований ДНК [12]: S_1 — нижний синглетный уровень; T_1 — нижний триплетный уровень; S_0 — основное состояние

пиримидиновые димеры, состоящие из таких же оснований ДНК, ничем между собой не различаются [3, 4]. В рамках этой парадигмы и даются современные объяснения природы горячих и холодных точек мутагенеза. Предполагается, что участки с определенным нуклеотидным составом лучше (или хуже) репарируются, чем другие и т. д. Однако общепризнанно, что в настоящее время нет удовлетворительного объяснения этого явления [2].

При облучении молекулы ДНК ультрафиолетовым светом может изменяться таутомерное состояние входящих в молекулу ДНК оснований. Автором была разработана полимеразно-таутомерная модель ультрафиолетового мутагенеза [5–10]. Было показано, что такие изменения таутомерных состояний могут происходить при образовании *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров [5–10]. Оказалось, что возможно образование семи новых редких таутомерных состояний для гуанина и цитозина и пяти — для тимина и аденина [5–10]. Они устойчивы, если соответствующие основания входят в состав димеров или находятся в небольшой окрестности от димера. *Цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры, основания которых находятся в канонических таутомерных формах, не могут приводить к мутациям. Следовательно, холодные пятна ультрафиолетового мутагенеза — это циклобутановые пиримидиновые димеры, основания которых находятся в канонических таутомерных формах. А горячие пятна ультрафиолетового мутагенеза — это циклобутановые пиримидиновые димеры, основания которых находятся в редких таутомерных формах. Значит, нам необходимо понять, почему при образовании одних димеров происходит изменение таутомерных состояний входящих в них оснований ДНК, а при образовании других, точно таких же, таутомерные состояния входящих в них оснований не изменяются.

Особенности тепловой релаксации энергии возбуждения. Попробуем с позиций нашей полимеразно-таутомерной модели ультрафиолетового мутагенеза объяснить некоторые особенности образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза. Для этого рассмотрим, что происходит при поглощении молекулой ДНК ультрафиолетового кванта энергии. Энергия возбуждения, как правило, локализуется на одном из оснований, что приводит к возбуждению электронно-колебательных состояний [11]. Эта энергия может перейти в тепло или излучиться на данном основании, а может перейти на соседние основания с синглетного уровня на синглетный или с триплетного уровня на триплетный, высветив разность энергии [11]. Для того чтобы изучить судьбу этого возбужденного состояния, нам необходимо знать соотношение между энергиями синглетного и триплетного уровней энергии различных оснований ДНК. Они приведены на рис. 1 [12].

Синглетный (разрешенный) уровень энергии имеет время жизни порядка 10^{-12} с. Для него наиболее вероятным процессом является излучение энергии. Ясно, что никаких изме-

нений структуры ДНК при этом произойти не может. Время жизни триплетного (запрещенного) уровня энергии порядка 10^{-6} с. Для него наиболее вероятным процессом будет превращение энергии возбуждения в энергию колебаний соседних атомов [13]. Происходящие при этом сильные вынужденные колебания являются первым этапом образования пиримидиновых циклобутановых димеров и изменения таутомерного состояния входящих в них оснований. Тепловая релаксация возбуждения с триплетного уровня энергии является основной причиной повреждений молекулы ДНК при облучении ее ультрафиолетовым светом [5–10]. Была высказана идея, что причиной образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза являются особенности процессов распространения энергии возбуждения по молекуле ДНК [14]. Посмотрим, почему некоторые циклобутановые пиримидиновые димеры часто приводят к мутациям, а другие, точно такие же, очень редко или никогда.

Почему циклобутановый димер C₁₅₀T₁₅₁ в *supF* [1] является холодным пятном ультрафиолетового мутагенеза? Рассмотрим нить участка ДНК, кодирующей супрессорную транспортную РНК *supF* [1]. На нем было обнаружено сильное горячее пятно — циклобутановый димер C₁₅₆T₁₅₇, который генерировал 11% всех мутаций на изучавшемся участке ДНК (№№ 100–180) и вызвал 14 транзиций G-C → A-T. В то же время точно такой же циклобутановый димер C₁₅₀T₁₅₁ не дал ни одной мутации. Этот сайт был назван холодным пятном ультрафиолетового мутагенеза [1].

Предмутагенные изменения структуры ДНК происходят в процессе тепловой релаксации возбуждения с синглетного или триплетного уровня энергии одного из оснований [5, 7]. Поэтому рассмотрим уровни энергии данного основания и соседних оснований. Возбуждение после поглощения энергии ультрафиолетового кванта всегда находится на синглетном уровне энергии. С некоторой, отличной от нуля вероятностью, энергия возбуждения с синглетного уровня может перейти на триплетный, высветив разность энергии (запрещенный переход). Это основной механизм заселения триплетного уровня. Кроме того, возможна передача энергии с синглетного (триплетного) уровня данного основания на синглетные (триплетные) уровни соседних оснований, если они имеют более низкий уровень энергии. При этом излучается разность энергии. Такие переходы являются разрешенными, а переходы с синглетного уровня на триплетные являются запрещенными переходами, поэтому в данном расчете мы должны ими пренебречь.

Цитозин C₁₅₀ и тимин T₁₅₁ образуют *цис-син* циклобутановый пиримидиновый димер, который на участке ДНК, представленном на рис. 2, является холодным пятном ультрафиолетового мутагенеза. Посмотрим, какая энергия возбуждения может передаваться на синглетный уровень цитозина C₁₅₀. Обозначим через E_C^C энергию нижнего синглетного уровня цитозина. Пусть цитозин C₁₅₀ поглотил энергию ультрафиолетового кванта. Тогда энергия его нижнего синглетного уровня составит E_C^C . Пусть гуанин G₁₄₉ поглотил энергию ультрафиолетового кванта. Если эта энергия возбуждения не излучится, то она передастся на синглетный уровень цитозина C₁₅₀, высветив разность энергии.

Пусть аденин A₁₄₈ поглотил энергию ультрафиолетового кванта. Эта энергия возбуждения может передаваться на синглетный уровень цитозина C₁₅₀ с вероятностью 1/2, высветив разность энергии. И с вероятностью 1/2 она передастся на синглетный уровень тимина T₁₄₇, высветив разность энергии. Пусть тимин T₁₅₁ поглотил энергию ультрафиолетового кванта. Эта энергия возбуждения может передаваться на синглетный уровень цитозина C₁₅₀, высветив разность энергии. Пусть гуанин G₁₅₂ поглотил энергию ультрафиолетового кванта. Эта энергия возбуждения может передаваться на синглетный уровень гуанина C₁₅₀, высветив разность энергии.

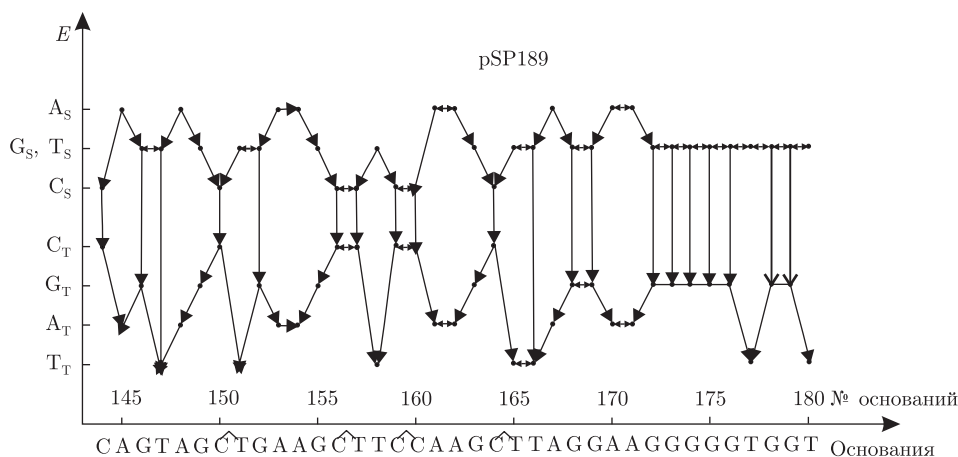


Рис. 2. Диаграмма, описывающая распространение энергии возбуждения по участку ДНК *supF* гена. По оси абсцисс отложены основания и их номера, а по оси ординат — их триплетные и синглетные уровни энергии

Пусть аденин A_{153} поглотил энергию ультрафиолетового кванта. Эта энергия возбуждения может передаться на синглетный уровень цитозина C_{150} с вероятностью $1/2$. И с вероятностью $1/2$ она передастся на синглетный уровень гуанина G_{155} . Пусть аденин A_{154} поглотил энергию ультрафиолетового кванта. Эта энергия возбуждения может передаться на синглетный уровень цитозина C_{150} с вероятностью $1/2$. И с вероятностью $1/2$ она передастся на синглетный уровень гуанина G_{155} .

Обозначим через $W(C_{150}^C)$ количество энергии, которое может передаться на синглетный уровень цитозина C_{150} , тогда

$$W(C_{150}^C) = E_C^C \left[1(C_{150}) + 1(G_{149}) + \frac{1}{2}(A_{148}) + 1(T_{151}) + 1(G_{152}) + \frac{1}{2}(A_{153}) + \frac{1}{2}(A_{154}) \right] = 5,5E_C^C.$$

В скобках указаны основания ДНК, с которых передается соответствующая энергия возбуждения. Таким образом, на синглетный уровень цитозина C_{150} может передаться, энергия, равная $5,5E_C^C$. Эта энергия может передаться на триплетный уровень цитозина C_{150} (обозначим его энергию как E_T^C) и передаться на триплетный уровень тимина T_{151} с вероятностью $1/2$. На триплетный уровень тимина T_{151} передастся энергия, равная $2,75E_T^T$. В результате образования эксимера и тепловой релаксации энергии возбуждения может образоваться циклобутановый димер $C_{150}T_{151}$. Этот димер является холодным пятном ультрафиолетового мутагеноза.

Для того чтобы оценить значение полученных чисел, мы должны сравнить их с теми же показателями, полученными по той же методике для горячего пятна точно такого же *цис-син* циклобутанового димера СТ.

Почему циклобутановый димер $C_{156}T_{157}$ на участке ДНК, кодирующем *supF* [1], является горячим пятном ультрафиолетового мутагеноза? Попробуем понять, почему циклобутановый димер $C_{156}T_{157}$ мог привести к образованию 14-ти трансверсий. Чем он отличается от немутагенного циклобутанового димера $C_{150}T_{151}$? Посмотрим, какая возможная энергия возбуждения может передаться на синглетный уровень цитозина C_{156} . Используя предыдущую методику, получим, что на синглетный уровень цитозина C_{156}

может передаваться энергия, равная $4E_C^C$. Эта энергия может передаваться на триплетный уровень цитозина C_{156} , выветив разность энергии. Энергия, равная энергии триплетного уровня цитозина, может передаваться на триплетный уровень тимина T_{157} с вероятностью $1/2$, выветив разность энергии. На триплетный уровень тимина T_{157} может передаваться энергия, равная $2E_T^T$, где через E_T^T обозначена энергия триплетного уровня тимина.

Горячим пятном ультрафиолетового мутагенеза является димер $C_{156}T_{157}$. Поэтому важно узнать, какая энергия может передаваться на основания C_{156} и T_{157} . Посмотрим, какая возможная энергия возбуждения может передаваться на триплетный уровень тимина T_{157} кроме той энергии, которая может передаваться на него с цитозина C_{156} . Можно показать, что энергию, которая может передаваться на триплетный уровень тимина T_{157} , надо дополнить величиной, равной $2E_T^T$.

В результате образования эксимера и тепловой релаксации энергии возбуждения может образоваться циклобутановый димер $C_{156}T_{157}$. На него, как показывает наша оценка, может передаваться энергия возбуждения, равная $4,0 E_T^T$. А на холодное пятно димер $C_{150}T_{151}$ может передаваться энергия возбуждения, равная $2,75 E_T^T$. Как видим, на участок ДНК $C_{156}T_{157}$ может передаваться больше энергии, чем на участок ДНК $C_{150}T_{151}$. Часть энергии пойдет на образование циклобутанового димера, а добавочная энергия может привести к изменениям таутомерных состояний цитозина C_{156} , что может привести к мутациям. Поэтому участок ДНК $C_{156}T_{157}$ и является горячим пятном ультрафиолетового мутагенеза.

Поскольку это вероятностные процессы, посмотрим, какая максимальная суммарная энергия может передаваться на основания C_{150} и T_{151} . Видно, что на цитозин C_{150} и тимин T_{151} может передаваться энергия с семи оснований, а на цитозин C_{156} и тимин T_{157} — с десяти оснований. Мы видим, что хотя и холодное, и горячее пятна — это участки ДНК цитозин и тимин (СТ), но при образовании циклобутанового димера $C_{156}T_{157}$ на входящие в него основания может передаваться гораздо больше энергии, чем на основания, входящие в состав циклобутанового димера $C_{150}T_{151}$. А поскольку остальные, описанные выше, свойства у них одинаковые, то именно это обстоятельство и объясняет “эффект соседа”, т. е. влияние соседних оснований на вероятность мутирования данного основания. Точно так же можно показать, почему циклобутановые пиримидиновые димеры $C_{164}T_{165}$, и $C_{159}C_{160}$ являются горячими пятнами ультрафиолетового мутагенеза. Результаты приведены в табл. 1.

Чаще всего ошибочные основания встраиваются напротив цитозина, а не тимина, хотя горячие пятна УФ-мутагенеза обычно совпадают с циклобутановыми димерами, содержащими и тимин, и цитозин [1, 2]. Было показано, что основной причиной предмутагенных изменений в ДНК является способность оснований ДНК изменять свое таутомерное состоя-

Таблица 1. Горячие и холодные пятна ультрафиолетового мутагенеза, образующиеся на нити участка ДНК, кодирующей супрессорную транспортную РНК *supF* [1] (энергия дается в величинах энергии триплетного уровня тимина E_T^T или в величинах энергии синглетного уровня цитозина E_C^C)

Участок ДНК (циклобутановый димер)	Пятно	Энергия, которая может передаваться на данный сайт ДНК	Количество оснований, с которых энергия может передаваться на данный сайт ДНК	Количество мутаций, образующихся на данном сайте
$C_{150}T_{151}$	холодное	$2,75 E_T^T$	7	0
$C_{156}T_{157}$	горячее	$4,0 E_T^T$	10	14
$C_{164}T_{165}$	горячее	$3,625 E_T^T$	6	8
$C_{159}C_{160}$	горячее	$4 E_C^C$	9	8

ние [5–10]. Известно, что в парах G-C гораздо легче происходит изменение таутомерного состояния, чем в парах A-T [15]. Кроме того, анализ различных предмутагенных таутомерных состояний для пар A-T и G-C показывает, что в парах G-C существенно больший процент возможных новых таутомерных состояний приводит к мутациям замены оснований, чем в парах A-T [6, 8, 10].

Таким образом, анализ горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза показал, что горячими пятнами ультрафиолетового мутагенеза являются те *цис-син* циклобутановые цитозин-тимин, тимин-цитозин или цитозин-цитозиновые димеры, на которые передается больше энергии, чем на такие же *цис-син* циклобутановые димеры цитозин-тимин, тимин-цитозин или цитозин-цитозин. Причиной этого являются соотношение синглетных и триплетных уровней различных оснований и процессы распространения энергии по молекуле ДНК. Добавочная энергия может вызывать изменения таутомерных состояний в основаниях ДНК, входящих в *цис-син* циклобутановые димеры, что, в свою очередь, может быть источником мутаций.

1. Parris C. N., Levy D. D., Jessee J., Seidman M. M. Proximal and distal effects of sequence context on ultraviolet mutational hotspots in a shuttle vector replicated in xeroderma cells // J. Mol. Biol. – 1994. – **236**. – P. 491–502.
2. Canella K. A., Seidman M. M. Mutation spectra in supF: approaches to elucidating sequence context effects // Mutat. Res. – 2000. – **450**. – P. 61–73.
3. 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.
4. Tang M., Pham P., Shen X., Taylor J.-S., O'Donnell M., Woodgate R., Goodman M. Roles of *Escherichia coli* DNA polymerase IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis // Nature. – 2000. – **404**. – P. 1014–1018.
5. Гребнева Е. А. Механизмы образования потенциальных мутаций при формировании цитозинового димера в результате облучения двухцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом // Доп. НАН України. – 2001. – № 7. – С. 165–169.
6. Гребнева Е. А. Мишеный мутагенез, вызванный цитозиновыми димерами и механизм образования мутаций замены оснований при SOS-репликации после облучения двухцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом // Докл. НАН Украины. – 2001. – № 8. – С. 183–189.
7. Гребнева Е. А. Природа и возможные механизмы образования потенциальных мутаций, возникающих при появлении тиминового димера после облучения двухцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом // Биополимеры и клетка. – 2002. – **18**, № 1. – С. 205–218.
8. Гребнева Е. А. Молекулярные механизмы образования мутаций замены оснований при пострепликативной SOS-репарации двухцепочечной ДНК, содержащей тиминового димеры // Там же. – 2001. – **17**, № 6. – С. 487–500.
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. Векшин Н. Л. Перенос возбуждения в макромолекулах: критическое рассмотрение вопроса. – Москва: ВИНТИ, 2007. – 174 с.
12. Lamola A. A., Gamane T. Sensitized photodimerization of thymine in DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1967. – **58**, No 2. – P. 443–446.
13. Бартлорп Дж., Койл Дж. Возбужденные состояния в органической химии. – Москва: Мир, 1978. – 446 с.
14. Гребнева Е. А. Модель механизма образования горячих и холодных пятен ультрафиолетовых мишеных мутаций: Материалы V Междунар. науч. конф. “Физико-химические основы формирования и модификации микро- и наноструктур”, 12–14 окт. 2011 г. – Харьков: Науч. физ.-технол. центр МОНМС та НАН України, 2011. – С. 333–337.

15. Novak M. J., Lapinski L., Kwiatkowski J. S., Leszczynski J. Molecular structure and infrared spectra of the DNA bases and their derivatives: theory and experiment // Computational chemistry: reviews of current trends / J. Leszczynski (Ed). – River Edge, NJ: World Scientific, 1997. – 2. – P. 140–182.

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

Поступило в редакцию 26.03.2012

О. А. Гребнева

Природа і механізми формування гарячих і холодних плям ультрафіолетового мутагенезу

На сьогодні немає пояснення природи та механізмів утворення гарячих і холодних плям мішенних мутацій, що утворюються після опромінювання молекули ДНК ультрафіолетовим промінням. Розроблюється полімеразно-таутомерна модель ультрафіолетового мутагенезу. Запропоновано модель механізму утворення таких гарячих і холодних плям ультрафіолетового мутагенезу, що утворюються навпроти цис-син циклобутанових пиримидинових димерів. Показано, що гарячими плямами ультрафіолетового мутагенезу є такі цис-син циклобутанові цитозин-тимин, тимин-цитозинові і цитозин-цитозинові димери, на які переходить більше енергії, ніж на такі цис-син циклобутанові цитозин-тимин, тимин-цитозинові і цитозин-цитозинові димери, які є холодними плямами ультрафіолетового мутагенезу. Причиною утворення гарячих і холодних плям ультрафіолетового мутагенезу є співвідношення між синглетними і триплетними рівнями основ ДНК та процеси поширення енергії в молекулі ДНК. Додаткова енергія може призвести до зміни таутомерних станів в основі ДНК, таких, які є частиною цис-син циклобутанових пиримидинових димерів. Це може викликати мішенні мутації.

H. A. Grebneva

Nature and mechanisms of formation of hot and cold spots of ultraviolet mutagenesis

The nature of hot and cold spots of ultraviolet mutagenesis has not been yet explained satisfactorily. A polymerase – tautomer model of ultraviolet mutagenesis is developed, and a model of formation of hot and cold spots of ultraviolet mutagenesis is proposed. It is shown that the hot spots of ultraviolet mutagenesis are those cis-syn cyclobutane cytosine-thymine and thymine-cytosine dimers, on which a more energy is transferred than that on such cis-syn cyclobutane cytosine-thymine and thymine-cytosine dimers that are cold spots of ultraviolet mutagenesis. The causes for the formation of hot and cold spots of ultraviolet mutagenesis are the correlation between singlet and triplet energy levels of the DNA bases and the energy transfer in DNA molecules. The extra energy can result in the tautomer change of DNA bases that are a part of the cis-syn cyclobutane pyrimidine dimers. This can be a source of targeted mutations.