

МАТЕРІАЛИ СЕМІНАРУ «ФУНДАМЕНТАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ МУТАГЕНЕЗУ»

Современная картина спонтанного мутагенеза и возможное место в ней природной таутомерии оснований ДНК

Е. И. Черепенко, Д. Н. Говорун

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина
o.j.cherepenko@imbg.org.ua

Суммированы данные по изучению всевозможных источников спонтанного мутагенеза, определяемого внутриклеточными процессами жизнедеятельности клетки в различных условиях ее функционирования. Охарактеризованы механизмы возникновения подавляющего числа классов мутаций, а также возможные механизмы регуляции скорости спонтанного мутагенеза. Анализ данных значительного повышения пула дНТФ в клетках в условиях генотоксического стресса и соответствующего повышения уровня мутаций в таких клетках позволяет объяснить наблюдаемый результат эффектами таутомерии оснований ДНК, происходящими при столпотворении этих молекул в тесном молекулярном пространстве. Предполагается, что контроль над скоростью спонтанного мутагенеза может быть связан с контролем над концентрацией дНТФ в клетке.

Ключевые слова: спонтанный мутагенез, таутомерия оснований ДНК, уровни внутриклеточного пула дНТФ.

Когда бессменный в течение долгих лет главный редактор журнала *Genetics* Джон Дрэйк (J. Drake) вышел на пенсию, был организован специальный выпуск этого журнала, посвященный ему. Здесь были суммированы многочисленные, накопленные к 1998 г. результаты исследований по теме: «Мутации и репарации» [1]. Еще и в такой форме генетики выразили признательность и чествовали известного ученого, внесшего весомый вклад в изучение мутаций и развитие генетики в мире. В своем обзоре в 1994 г. Дрэйк систематизировал результаты изучения мутаций за первые 75 лет развития генетики и предсказал ход их исследований к началу XXI века

[2]. основополагающие результаты, полученные в работах Дрэйка, касаются проведенных измерений скорости спонтанного мутагенеза различных биологических видов, начиная с простых и заканчивая сложными организмами. Оказалось, что ДНК-содержащие микробы организованы так, что скорость спонтанного мутагенеза у них составляет $\sim 0,003$ мутаций геном^{-1} раунд репликации $^{-1}$ [3, 4]. У РНК-вирусов эта величина стремится к 1 [5, 6], что также показано в работе [7]. Для высших эукариотов она составляет 10^{-6} на ген за одну репликацию. [8].

Таким образом, спонтанные мутации являются неотъемлемой чертой организации жизни, стабильность и прочность которой должны быть неразрыв-

но связаны с приспособляемостью к окружающему, а отсюда и с процессами видообразования и эволюции. Эти же процессы могут происходить лишь на основе генетической изменчивости, важным фактором которой является мутация. Более того, накопление множественных мутаций обуславливает значительные расхождения в генетических текстах и может способствовать возникновению барьеров для межвидовых скрещиваний [9].

Мутации – фундаментальное свойство живого, это понятие требует своего строгого определения в отличие от существующего молчаливо признаваемого толкования как случайное изменение последовательности или генетические ошибки в молекуле ДНК [10]. Действительно, если при реципрокной рекомбинации обмен участками генетических последовательностей между разными молекулами происходит, но это никак не отражается на кодировании информации, то формально молчаливое определение мутации нарушается. Обсуждение того, что же такое мутация, проведено Хаулем и Кондрашовым, из которого следует, что наиболее четкое определение мутации становится возможным тогда, когда можно сравнить последовательности родительской и дочерней информации. При этом в последнем случае выявляются изменения, остающиеся либо нейтральными, либо ухудшающие какую-либо функцию. Ясно, что это не всегда возможно. На современном этапе развития генетики авторы предлагают: «ignore biophysical and biochemical aspects... and adopt a simple transmission genetic approach, concerned with inputs, outputs and rates» («абстрагироваться от биофизических и биохимических аспектов ... и принять простой, основанный на наследовании генетический подход, связанный с приобретением и реализацией генетической информации, а также со скоростями генетических процессов» [11]).

Как же возникают спонтанные мутации, от чего зависит скорость их появления и можно ли научиться управлять этой скоростью? Ответ на этот вопрос имеет не только большое эвристическое, но и важное практическое значение. Действительно, первоначальное применение чуда-лекарства Gleevec, ингибирующего активность гибридной киназы, возникающей при хронической лейкемии, дало

сенсационные клинические результаты. Однако быстрое возникновение мутаций устойчивости к этому лекарству нивелировало его терапевтическое действие [12]. Возможные источники появления спонтанных мутаций и механизмы, способные либо замедлять, либо ускорять скорости их образования, охарактеризованы в издании *Genetics*, посвященном Дрэйку [1].

В настоящей работе мы преследовали цель показать, как спустя 10 лет выглядит нарисованная в то время картина спонтанного мутагенеза и может ли в ней быть место такому потенциальному источнику спонтанных точечных мутаций, как возможность включения в цепь ДНК редких неканонических пар типа А:С и G:T. Образование таких пар обусловлено имманентной способностью протона при определенных условиях мигрировать от одного атома к другому в молекуле основания [13]. Это приводит к образованию редких таутомерных форм оснований и отсюда к возможным ошибкам репликативного фермента в выборе правильного нуклеотида, что искажает картину каноничности спариваний нуклеотидов и чревато образованием мутации, если неправильно включенному нуклеотиду удастся избежать редактирования и репарации нуклеотидных несоответствий (mismatch). Если правильность спаривания не определяется H-связью [14], то возникает вопрос о возможности таутомерных переходов как-то изменять саму геометрию молекулы основания.

Об источниках спонтанных мутаций. Прежде всего, эти источники делятся на экзогенные и эндогенные (рис. 1).

Контроль над внешней средой функционирования клетки позволяет контролировать экзогенные источники возникновения мутаций. Как контролировать эндогенные источники?

Суммированные на рис. 1 данные обзора [15] показывают, что при неизменности факторов внешнего воздействия на организм целый ряд внутриклеточных метаболических процессов сопровождается возникновением мутаций. Это связано с молекулярными условиями, сложившимися в клетке на данный момент, а также с молекулярными характеристиками клеточной машинерии, выполняющей эти процессы.

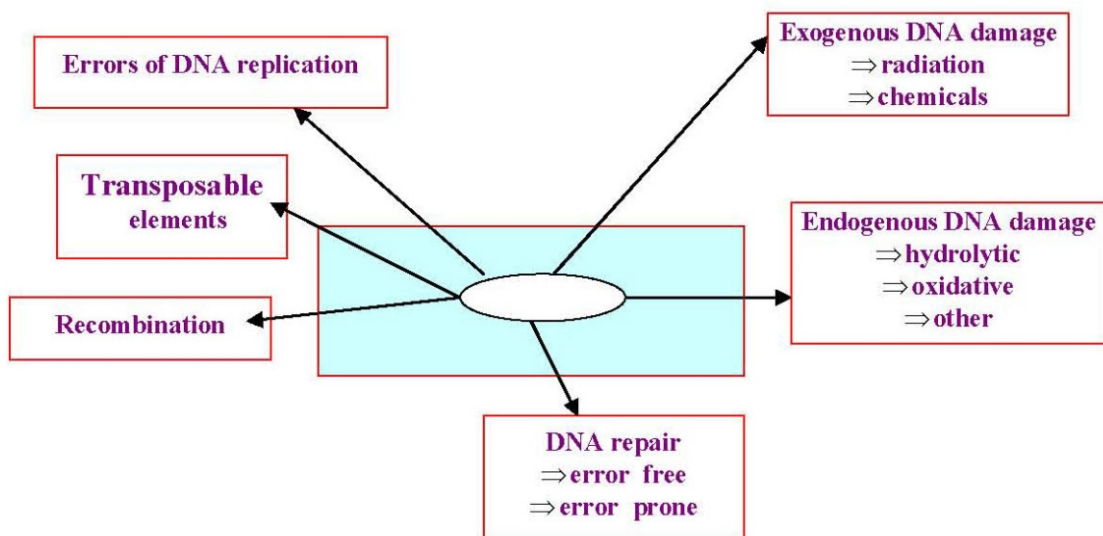


Рис. 1. Возможные источники спонтанного мутагенеза [15]

Спонтанные мутации могут возникать как ошибки репликации, при которых репликативная ДНК-полимераза, осуществляющая репликацию генома, допускает с какой-то вероятностью неточное копирование матрицы. На участках, содержащих различные гомополимерные тракты, а также короткие и более сложные повторы, становится возможным нарушение того, как синтезируемая нить выстраивается относительно матричной нити. При таком нарушении вероятно включение, прежде всего, одного лишнего нуклеотида, что приведет к образованию мутации со сдвигом рамки. Однако количество таких нуклеотидов может оказаться значительно большим (до 26), так что в основе возникающей мутации лежит инсерция. Более того, на участках матрицы, способных приобретать очертания структур высшего порядка, возможен «проскок» (slip) репликационной машины, в результате чего возникнут делеции в целом незначительной протяженности, однако отражающиеся на фенотипическом уровне. Универсальным свойством репликативных полимераз оказалась их врожденная способность к ошибкам в узнавании оснований, образующих Уотсон-Криковские пары, так что существует вероятность включения неправильного основания как потенциальной основы мутации. Но если обеспечение устойчивости жизни обязательно связано с возможностью появления мутаций, то

производство мутаций с помощью репликативного аппарата находится под двойным контролем, определяющим процессы репараций генетических повреждений. Репликативная полимераза может редактировать свою работу либо с помощью собственного домена, обладающего экзонуклеазной активностью, либо с помощью сопровождающего ее полипептида, обеспечивающего эту активность. Поскольку репликативный аппарат, особенно у эукариотов, включает набор полимераз, представленных набором *pol*, *pol* и *pol*, с различными свойствами и, очевидно, функционирующих на разных нитях, то спектр спонтанных мутаций, возникающих в том или ином гене, может зависеть от ориентации гена и его удаленности от ближайшей области *ori*.

Второй тип контроля связан с активностью генов, составляющих системы репарации несоответствий текстов между матрицей и вновь синтезированной нитью ДНК – mismatch repair – MMR. Эти гены способны исправлять разночтения в цепях ДНК, унифицируя текст, как на уровне отдельного нуклеотида, так и в случае делеций/инсерций. Такие гены вездесущи: для прокариотов они обозначены, как *mutH*, *mutL*, *mutM*, *mutS*, *mutT*, *mutY*; для дрожжей – *PMS1*, *MSH2* (известны также *MSH3* и *MSH6*), а также *MLH1*. (В случае человека к этим обозначениям добавляется буква *h*.) Деление этих

генов на группы происходит не только на основе их локализации в геноме, физико-химических свойств их продуктов, но и характера мутаций, сохраняющихся в геноме при утрате функции того или иного гена системы MMR. Так, в случае дрожжей показано, что в клетках с мутациями *pms1*, *msh2* и *mlh1* не устраняются не только неправильные включения нуклеотидов, но и делеции/инсерции [16]. (При дефекте гена *MSH2* в геноме клеток дрожжей сохраняется инсерция протяженностью 26 пар нуклеотидов [15].) Для генов этой системы характерно «разделение труда»: в частности, *MSH6* активнее удаляет трансверсии, нежели транзиции. По такому признаку можно находить отличия во многих генах этой системы. Более того, ряд генов MMR значительно активнее в отношении делеций/инсерций, менее чувствую замены оснований, хотя при этом данные гены прокариотов и эукариотов могут вести себя различно.

Помимо системы редактирования и пострепликативной коррекции генетического текста существует система репарации генов с вырезанием поврежденных участков, содержащих отличающиеся от нормы нуклеотиды. Это система NER – nucleotide excision repair [17, 18]. С помощью мутантов, обладающих повышенной чувствительностью к ультрафиолету (*rad* мутанты), идентифицированы гены *RAD1* и *RAD10*, комплекс продуктов которых разрезает остов ДНК с 5'-стороны повреждения. За этим следует устранение поврежденного участка и замена его вновь синтезированной нитью. В этом процессе необходимо участие ДНК-полимеразы, которая относится к классу транслизионных полимераз, функционирующих с пониженной точностью, что приводит к возникновению мутаций, не репарируемых системой MMR [19].

Среди генов, от которых зависит характер возникновения спонтанных мутаций, выявлен ген *RAD6*. Он кодирует фермент, осуществляющий *in vitro* конъюгацию убихинона с гистонами H2A, H2B и H3. Оказалось, что при инактивации этого гена возникновение спонтанных мутаций повышается в 5 раз. Более того, от его активности зависит не только скорость спонтанного мутагенеза, но и специфичность сайтов транспозиции мобильного элемента *Tu* дрожжей [16].

Широко известна репарация сайт-специфических двуничатых разрывов (DSB) за счет рекомбинации между различными молекулами ДНК [20, 21]. Этот вид репарации может быть также как точным (*error-free*), так и сопровождаться возникновением ошибок (*error-prone*). Так, например, когда сайт-специфическая эндонуклеаза *HO* дрожжей единожды разрезает геном и выживание клетки зависит от рекомбинационной репарации, связанной с активацией транслизионных полимераз, выход мутаций в таких клетках повышается в 100 раз [19]. Однако при наличии в G2 периоде клеточного цикла интактной сестринской хроматиды ликвидация DSB может произойти на основе гомологичной рекомбинации, при которой текстовые ошибки не возникают. Если же DSB происходит в гаплоидной клетке на стадии G1, то чтобы выжить, клетке остается одно: соединить негомологичные концы. В клетках млекопитающих механизм такого соединения получил название non-homologous end joining (NHEJ) и он характеризуется образованием ошибок в генетических текстах (*error-prone*). Недавно показано [21], что в клетках дрожжей для такого соединения концов нужен специальный ген *Xif1*, важный на пути репарации, зависимой от антигена Ku, который как гетеродимер с молекулярной массой 70/80 кДа связывается с концами ДНК независимо от контекста последовательности [23, 24]. Активность этого гена необходима для образования специального лигазного комплекса, соединяющего разорванные концы [22].

Поскольку различные воздействия на ДНК (реактивные радикалы кислорода, алкилирование и др.) могут повреждать основания так, что в тех или иных местах цепи возникнут сайты, лишённые пуринов или пиримидинов (так называемые AP сайты) и несущие лишь фрагменты дезоксирибозы разрывы цепи, то необходима особая репарация подобных дефектов. Более того, поврежденное основание может узнаваться и вырезаться из нити ДНК под действием специальных ферментов – ДНК-гликозилаз. Исправление таких дефектов получило название base excision repair – BER. Оказалось, что их репарация связана с активностью специального фермента, так называемой AP-эндонуклеазы/3'-репарационной диэстеразы, кодируемой геном *APN1*.

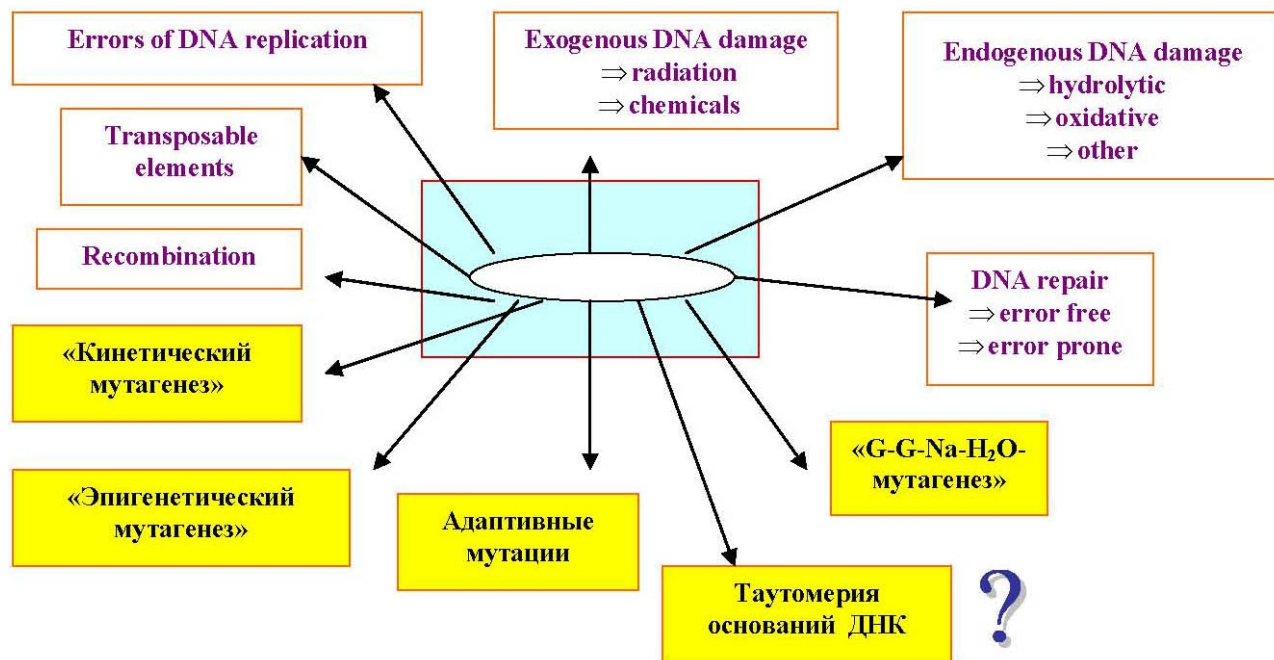


Рис. 2. Возможные источники спонтанных мутаций (с дополнениями к [15])

В бесклеточных экстрактах фермент проявлял 97 % активности и как AP-эндонуклеаза, и как ДНК-3'-репарационная диэстераза. Утрата функции этого гена производит *in vivo* мутаторный эффект, усиливая его в 59 раз в клетках дрожжей, например, количество трансверсий типа А:Т С:G [16]. Утрата же функции *UNG1* гена системы BER, кодирующего урацил-ДНК-гликозилазу, также сопровождается ростом мутаций, при этом 93 % наблюдаемого мутаторного эффекта составляют транзиции G:C А:Т [16].

Последнее десятилетие исследований в генетике обозначилось большими успехами в изучении организации геномов самых различных организмов. Этим успехам посвящена всеобъемлющая монография [25]. Установление полной первичной последовательности (как буквы генома [26]) ознаменовало наступление в биологии геномной эры и следующей за ней постгеномной эры с новыми возможностями расшифровки принципов организации и функционирования генома. Описание в книге геномных структурных элементов, а также способов и особенностей их активации сопровождается анализом событий, приводящих к образованию мутаций как запрограммированного, так и незапрограм-

мированного явления. Последнее важно при изучении проявляемых организмами в норме и при патологии уровней спонтанного мутагенеза. Книга раскрывает, что темп мутаций с возможным различием по длине генома до 1000 раз определяется положением мутационной мишени в геноме и ее функциональной предназначенностью, контекстом хромосомы, характером первичной последовательности, выборочным привлечением к тем или иным сайтам (*цис*-элементам) функциональных специальных факторов (*транс*-элементов), временем репликации такой мишени в клеточном цикле. Также темп мутаций определяется, с какой скоростью в сложившихся условиях функционирования клетки проходят те или иные генетические процессы (здесь условно – «кинетический» мутагенез, рис. 2) и какова картина химических модификаций участников этих процессов (условно – «эпигенетический» мутагенез, рис. 2). Что касается «кинетического мутагенеза», то в настоящее время известно, что усиление процессов транскрипции сопровождается появлением мутаций (ТАМ – transcription activated mutagenesis). При поломках в каком-либо промоторе исчезает близлежащая «горячая точка» мутирования, так же как и при нарушении сайтов связыва-

ния соответствующих транскрипционных факторов. При изучении скорости фиксации замен оснований оказалось, что эта скорость в нетранслируемой части мРНК для консервативных белков ниже, но она выше в случае менее консервативных белков.

Что касается «эпигенетического» мутагенеза, то установлено, что гипометилирование ДНК является фактором повышения скорости мутагенеза, дезаминирование цитозина, метилированного по пятому положению, обуславливает появление большого количества мутаций. В последнее время внимание исследователей привлекает мнение, согласно которому причиной возникновения рака является нарушение в стандарте эпигенетической маркировки генов в стволовых и родоначальных клетках, сопровождающееся повреждениями в клеточной ДНК [27].

О механизмах образования спонтанных мутаций в геноме. Эта область интенсивно исследуется в течение длительного времени и основные изученные механизмы охарактеризованы в издаваемой Левином серии учебников *Genes*, включая последнюю, восьмую версию [28]. Здесь мы кратко рассмотрим механизмы спонтанного мутагенеза с участием специальных ферментов типа AID и Arobes, получивших в литературе название «мутагеназ», и охарактеризуем специальные ферменты типа транслизионных полимераз, участвующих в репарации как разрывов в молекуле ДНК, так и других повреждений. И, наконец, рассмотрим механизм образования аддукта 8-охо-G, возникающего при определенных условиях в клетке за счет атаки молекулой H₂O двух соседствующих G в цепи ДНК. Известно, что этот аддукт является причиной возникновения мутаций за счет трансверсии оснований.

Мутагеназы, представленные белками AID (activation induced cytidine deaminase) и группой белков (1, 3C, 3G) Arobes (apolipoprotein B mRNA editing catalytic subunit), охарактеризованы в целом ряде обзоров. Остановимся на двух из них [25, 27]. Удивительной чертой этих ферментов оказалась их способность к дезаминированию цитозина. В результате цитозин превращается в урацил, вызывая состояние неспаренности оснований в молекуле

ДНК. Возможен двоякий выход из этой ситуации: либо ДНК-гликозилаза вырежет урацил и восстановит текст по неповрежденной матрице, либо в раунде репликации напротив урацила включится аденин и в этой области генетического текста произойдет транзигия G:C A:T. Существование мутагеназ оправдано в связи с установленными принципами биологической организации, отвечающей задаче создания генетического разнообразия на основе исходного стандарта. Ярким примером такой организации является иммунный ответ клетки, характеризующийся таким размахом разнообразия, какой присущ антителам, призванным распознавать и нейтрализовать астрономическое число антигенов [29, 30]. Ясно, что активность AID и Arobes должна быть чрезвычайно локально-специфичной и строго контролироваться в процессе жизнедеятельности клетки. При нарушении же системы контроля над активностью мутагеназ уровень спонтанных мутаций должен резко возрасти, и в настоящее время еще не ясно, узнаются ли эти мутации системами репараций клетки.

Активное изучение вслед за работами Корнберга ДНК-полимеразной реакции позволило установить, что в экстрактах клеток эукариотов имеются четыре типа различных ДНК-полимераз: , , и [31]. В экстрактах митохондрий крысы обнаружен еще один вид фермента этого класса – -полимераза. Из полученных данных следовало, что клетка снабжена целым набором ДНК-полимераз. Для чего это нужно? Вариант ответа на этот вопрос предоставили данные, полученные на бактериях. При облучении клеток бактерий ультрафиолетом возникновение мутаций обусловлено появлением фотопродуктов в цепи ДНК. Это неизбежно ослабляло точность синтеза на основе матрицы, и такой синтез получил название транслизионного – TLS [32]. Однако изучение SOS-ответа (репарации) в клетках *Escherichia coli* [33] показало, что при возникающих под действием ультрафиолета разрывах в ДНК активируется протеолитическая активность основного белка рекомбинации RecA. В результате этой активности деградирует специальный белок LexA, являющийся репрессором экспрессии генов, необходимых для SOS-ответа. Среди этих генов имеется такой ген, как *umuC* (*umuD*), который кодирует са-

мостоятельную полимеразу с новыми свойствами – транслизионную полимеразу, характеризующуюся пониженной точностью репликации [34, 35].

В этой же системе репарации обнаружена еще одна новая транслизионная полимераза DinB, или polV [36]. Ее задача состоит в исправлении различных дефектов G основания так, что при любом дефекте G она инкорпорирует C в соответствующий участок при синтезе ДНК. Оказалось, что DinB значительно активнее работает в случае поврежденного, а не интактного G основания. Важность наличия такого фермента демонстрируют данные по выявлению регуляторной роли специального CarG бокса генома эукариотов [37], а также по возникновению 8-охо-G аддукта [38], что будет рассмотрено ниже.

Идентификация в клетках бактерий полимераз, осуществляющих еггог-ргоне транслизионный синтез, поставила вопрос об их присутствии в клетках эукариотов. При этом обнаружены 14 белков, обладающих гомологией с белками UmuC и DinB. Изучение свойств этих эукариотных белков позволило разделить их на отдельные семейства, как указано в таблице [31].

Несмотря на невысокую точность копирования генетической информации, эти ферменты (кратко характеризуемые как «беззаботные») играют важную роль в жизни клетки. Ярким примером тому служит *pol*. Эмбрионы мышей, нокаутированных по этому гену, оказались полностью нежизнеспособными. Даже в культуре клеток таких эмбрионов, невзирая на инактивацию в них апоптического пути, не наблюдалось роста, хотя значительно позже рост возобновлялся. Необходима ли в этом случае какая-то конкретная перестройка в геноме? Поскольку при утрате гена *pol* резко возрастает нестабильность хромосом, высказано предположение об участии этого гена в регуляции двунитчатых разрывов (DSB), так что ген может функционировать как онкосупрессор [39].

Если существует целый ряд транслизионных полимераз, способных вносить те или иные ошибки в генетические тексты, то чрезвычайно важен вопрос об их регуляции и возможности ее нарушения. Этому вопросу посвящена работа [40]. Здесь показано, что лишь только нужная полимераз включается в работу в строго соответствующее время, и

ДНК-полимеразы прокариотов, низших эукариотов и млекопитающих [31]

<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Homo sapiens</i>	Семейство
Pol I	–	–	A
Pol II	–	–	B
Pol III	–	–	C
Pol V	–	–	Y
Pol IV	–	Polk	Y
–	–	Polb	X
–	Pola	Pola	B
–	Pold	Pold	B
–	Pole	Pole	B
–	Polg	Polg	A
–	PolIV	Poll	X
–	RevI	RevI	Y
–	Polh	Polh	Y
–	Polx	Polx	A
–	–	Poli	Y
–	–	Polm	X
–	–	Polq	A

это все определяется активностью двух белков – p53 и p21.

Эти белки способны контролировать ситуацию в репликативной вилке таким образом, что при встрече репликативного фермента с повреждением матрицы к зажиму, удерживающему фермент на ДНК, присоединяется молекула убихинона. Это – якорь, необходимый при замене репликативной полимеразы на транслизионную. Ситуация контролируется p53, активность которого индуцирует синтез p21. Этот белок облегчает взаимодействие убихинона с зажимом и замену полимераз в вилке репликации. Таким способом и поддерживается минимальный уровень возникающих мутаций. При поломке же этих белков «беззаботные» полимеразы склонны к проявлению хаотичности

Недавно раскрыт [38] механизм образования поломок ДНК, вызываемых действием в клетке кислорода (реактивные радикалы (ROS) [41], перекиси, гидроксил, супероксиды, генерируемые ио-

низирующей радиацией, химическими мутагенами, различными внутриклеточными процессами). Известно, что в результате действия этих факторов в клетке возникает аддукт 8-охо-G. Теоретически он может образовывать пару с любым дНТФ, но чаще всего используется либо дАТФ, либо дЦТФ. Отношение дА/дЦ зависит от вида полимеразы. Если повреждению удастся избежать контроля со стороны MMR, то спаривание с дА приведет к трансверсии G:T.

Как же возникает это опасное повреждение в ДНК? Появляющиеся в клетке ROS, содержащие неспаренный электрон, способны окислить ДНК, захватывая недостающий им электрон. Образующаяся в результате такого захвата ионизационная дыра может двигаться по лестнице ДНК на расстояние до 20 нм. Удивительно, но на участках, содержащих два соседствующих G, эта дыра задерживается дольше, что позволяет проявиться свойствам, которыми наделена молекула воды. В создавшихся условиях H_2O реагирует с C_8 положением гуанина, превращая его в 8-охо-G. Считалось, что для этой реакции нужно много энергии. Однако выяснилось, что реакция может протекать благодаря следующему. В большую бороздку двойной спирали ДНК в гидратационном окружении может попадать противоион Na^+ . Когда он подходит к ионизационной дыре, его положительный заряд обуславливает возможность связи C_8 положения гуанина с атомами O и H молекулы воды. В это же время другой ее протон подсоединяет атом кислорода, связавшийся с C_8 , к соседней молекуле воды. H-связь удлиняется, объединяя сразу две молекулы воды. Такая структура рвется с переносом одного из протонов воды на соседнюю молекулу H_2O так, что образуется положительный ион гидрониума – H_3O^+ . При этом гуанин со всеми остатками от первой молекулы воды продолжает быть нейтральным и начиная с этого момента становятся возможными все известные дальнейшие этапы образования 8-охо-G. Что касается H_3O^+ , то он связывается с ближайшим PO_4^- остова ДНК таким образом, что без больших энергетических затрат обрабатываются сразу два продукта реакции: H_3O^+ и гуанин с прикрепленным к C_8 гидроксилем. Итак, одним из условий конверсии GG в 8-охо-G является взаимодействие на основе

двух молекул воды в гидратационном окружении ДНК. Другим условием является наличие противоиона Na^+ , привлекаемого отрицательно заряженной группой PO_4^- . При замене этой группы на нейтральную фосфоновую группу (PO_3CH_3), не способную взаимодействовать с Na^+ , аддукт 8-охо-G не образуется. Полученные данные еще раз свидетельствуют о важности терапии с помощью антиоксидантов как соединений, обладающих потенциальной способностью к снижению уровня спонтанного мутагенеза.

О скорости спонтанного мутагенеза. Итак, измерение скорости спонтанного мутагенеза у самых различных организмов [6] показало, что эта величина варьирует в пределах нескольких порядков величины. Таким образом, организмы делятся на группы по сходству и различиям для этого показателя, что дает возможность изучения как процессов эволюции на механизменном уровне, так и генетических заболеваний, связанных с мутациями.

На этом пути важной оказалась концепция о таком устройстве клетки, при котором она снабжена и аппаратом для производства мутаций, и аппаратом для их предотвращения. Ясно, что от конкретного состояния клетки зависит конечный уровень возникаемых мутаций. Обоснованием для подобной концепции явились данные о возможности обнаружения штаммов, обладающих либо мутаторным, либо антимутаторным фенотипом. История открытия свойств таких штаммов и их характеристика описаны в работе [1]. Здесь мы кратко отметим следующее.

В случае прокариотов при изучении уровня спонтанных мутаций в геноме одного из бактериофагов обнаружены мутации по гену ДНК-полимеразы этого фага как резко увеличивающие, так и снижающие этот уровень. Дальнейшее исследование показало, что точность процесса репликации определяется двумя условиями: точностью выбора правильного нуклеотида для осуществления реакции полимеризации и соотношением полимеразной и 3'-5'-экзонуклеазной (редактирующей) активностей. Одни мутации, возникающие чаще, ослабляют точность репликации, другие же (возникающие либо реже, либо более трудно выявляемые) – эту точность увеличивают. Оказалось, что последнее

возможно тогда, если в результате мутации время обнаружения экзосайтом неправильно включенного нуклеотида значительно увеличивается. Вероятно, это происходит из-за дефекта полимеразы, отражающегося на способности ее перемещения по матрице. Показано, что в случае антимуляторной полимеразы увеличивается время пребывания на матрице экзонуклеазного сайта, в то время как для полимеразного сайта оно уменьшается [42]. Мутаторы и антимуляторы могут возникать на основе разных генов. Так, при плотном высеве на голодную среду клеток, несущих мутацию *ochre* и нуждающихся в экзогенном тирозине, рост будет наблюдаться только тогда, когда произойдет реверсия по данной мутации. Оказалось, что такое событие зависит от активности специального гена *tas* [43]. По оценкам Дрэйка с соавт. [6], геном прокариотов содержит ~10 генов, способных определять мутаторный и антимуляторный фенотипы.

Чрезвычайно высокие уровни спонтанных мутаций, наблюдающиеся в злокачественных клетках, находят объяснение с позиций возникновения в них мутаторов [44]. Большой интерес вызывает идея о том, что в таких клетках необязательно в роли мутатора выступает постоянная генетическая структура, может быть и временный мутатор, в частности, та или иная молекула, возникающая в данной клетке в результате ошибки транскрипции либо трансляции. И вот такой временный мутатор и введет в геном наследуемые мутации [45].

При изучении факторов, определяющих скорость спонтанного мутагенеза, после публикации [46] внимание привлекли мутации, возникающие в клетках в условиях стресса в отсутствие репликации ДНК и деления клетки. Эти мутации, названные адаптивными, описаны в [1]. Здесь лишь кратко отметим, что в условиях стресса, ставящего под угрозу, с одной стороны, выживание клетки с присутствующим ей генотипом, а с другой, – стимулирующего клетку к реализации возможности подгонки своего генотипа к создавшимся условиям, скорость спонтанного мутагенеза резко увеличивается. Это необходимо для создания большого разнообразия генотипов, из которых может быть выбран подходящий вариант. Полученные экспериментальные данные показали, что увеличение скорости спон-

танного мутагенеза достигается за счет активации всех имеющихся в геноме сайтов, определяющих возможность синтеза ДНК и процессов рекомбинации [47].

Об уровнях пула дНТФ *in vivo*, таутомерных переходах в основаниях ДНК и мутациях. Если механизм стабильности гена связан с такими возможностями клетки, как обеспечение точности его копирования и исправления ошибок, то возникает вопрос о роли качественного и количественного содержания *in vivo* пула дНТФ. Это состояние может быть достаточно разным в зависимости от состояния генов, отвечающих за метаболизм таких соединений, а также от действия на клетку различных внешних факторов, например, ингибиторов метаболических реакций. Так, известно, что антифолаты (используемый в онкологии метотрексат) ингибируют ферменты, необходимые для синтеза дНТФ [48, 49]. Как же точность репликации зависит от концентрации дНТФ? Это можно проверить в системе синтеза ДНК даже *in vitro* в условиях, когда напротив Т включается не только А, но и его аналог 2-аминопурин. Оказалось, что при высокой концентрации дНТФ мутаторная полимеразы значительно чаще, а антимуляторная полимеразы значительно реже включают неправильный нуклеотид по сравнению с ферментом дикого типа [14]. При низких же концентрациях дНТФ такого эффекта не наблюдалось, т. е. даже мутаторная полимеразы располагает при определенных условиях возможностью «подумать» [14]. Следовательно, уровень пула дНТФ для клетки не безразличен и подавление редакторской активности полимеразы при высокой концентрации дНТФ дало основание для формулировки правила «эффекта следующего нуклеотида» [50, 51], специальное изучение которого проведено в работе [52].

При исследовании влияния концентрационных эффектов дНТФ на уровень возникающих мутаций был получен еще такой результат. Инактивация гена дезоксицитидилат-деаминазы приводит к увеличению соотношения дЦНФ/дТТФ в клетке, а также количества возникающих мутаций, представленных исключительно заменами. Предполагалось, что если в диком типе замены С составляют ~37 %, то при повышенном содержании дЦТФ их должно

быть ~80 %, т. е. должно быть увеличение А:Т G:С транзаций. На самом же деле этого не происходило, росло лишь число трансверсий G:С C:G и А:Т C:G. Но такой результат можно объяснить эффектом репарации изучаемого мутатора и инактивации гена *APNI* системы BER [16].

Относительно концентрационных влияний дНТФ в клетке обнаружено также следующее. При поиске антимутаторов в клетках *E. coli* получены мутанты, которые не могли расти при непермиссивной температуре 42 °С. При добавлении же в среду аденина рост клеток возобновлялся. Уровни мутабельности в таких штаммах, названных *tud* (mutation defective), были пониженными. Их отличительной чертой оказалось то, что баланс в пуле дНТФ нарушался: уровни дАТФ, дГТФ и дТТФ снижались, а уровень дЦТФ повышался [15]. Несмотря на предпринятые попытки изучения мутантов этого типа, вопрос о механизмах индукции мутаций при дисбалансе в клетке дНТФ и действии на них аденина остался открытым [53].

Связь между возникновением мутантного фенотипа клетки и изменениями в уровне пулов дНТФ обнаружена также в клетках млекопитающих [54, 55].

На пути изучения процессов спонтанного мутагенеза, зависящего от уровней пула дНТФ в клетке, внимание привлекают результаты, полученные в работе [56], где впервые показано, что в клетках дрожжей при действии факторов, вызывающих поломки в ДНК, резко увеличивается содержание дНТФ. Это содержание почти в четыре раза превосходит уровни нуклеотидов, характерных для S-периода нормальных клеток. Оказалось, что такой уровень определяется активностью рибонуклеотидредуктазы – RNR. Регуляция активности этого фермента осуществляется тремя различными способами: первый связан с уровнем экспрессии гена данного фермента, второй – с регуляцией на уровне трансляции мРНК (при поломках в ДНК деградирует специальная молекула Sm11 – белковый ингибитор RNR) и третий определяется аллостерическим ингибированием фермента с помощью дАТФ по механизму обратной связи. Действительно, при удалении части молекулы RNR, отвечающей за аллостерическое связывание, уровень в клетке дНТФ

поднимался почти в два раза. Если же в ДНК возникали поломки, происходило дальнейшее увеличение этого уровня – до 11 раз. Как же вели себя клетки в отношении возникновения мутаций?

Оказалось, что по сравнению с клетками дикого типа в штаммах с нарушенной регуляцией по гену *RNR* количество мутаций возрастает в два раза в том случае, если в клеточной ДНК есть поломки, и в три раза – если поломок нет. Увеличение по сравнению с клетками дикого типа количества мутаций в клетках с повышенным содержанием дНТФ и поломками в ДНК находит свое объяснение в рамках необходимости привлечения транслиционных полимераз. Но почему в отсутствие поломок ДНК уровень мутабельности становится еще выше?

Мы предлагаем объяснение этого результата с привлечением понятия о прототропной таутомерии, возможной в случае оснований ДНК. Если квантово-химические расчеты ([12] и библиография в ней) допускают возможность миграции протона от одного атома к другому в канонической молекуле основания так, что образующиеся таутомеры способны нарушать правило спаривания, то возникает вопрос об условиях, вызывающих такие переходы. Могут ли подобные условия появляться при сбоях в правильности обеспечения клетки дНТФ? Как поведут себя такие сложные и реакционноспособные молекулы при своем столпотворении в замкнутом молекулярном пространстве, очевидно, также каким-то образом контролируемом? В настоящее время таутомерия оснований ДНК как источник спонтанных мутаций типа замен оснований может рассматриваться лишь в качестве версии при поиске объяснений наблюдаемого. Возможность же идентификации таутомеров при их физическом разделении и биохимическом получении позволило бы экспериментирование в данной области. В этой связи большое внимание привлекает прогресс в развитии нанотехнологий и технологий флуоресцентных меток.

Заключение. Изучение процессов спонтанного мутагенеза на самых различных уровнях биологической организации показало, что эти процессы являются неотъемлемой характеристикой живого. Являясь фактором генетического разнообразия и отсюда – движущей силой эволюции, обеспечиваю-

щей запас жизни на прочность, мутация может выступать в качестве следствия действия двух различных по своей природе причин: либо упорядоченных, запрограммированных, либо случайных событий. В связи с необходимостью контроля над этими событиями, что особенно важно в случае различных генетических заболеваний, приведенные здесь данные по изучению механизмов и источников возникновения мутаций, среди которых при определенных условиях в клетке заметную роль может играть явление таутомерии оснований ДНК, указывают на возможность замедления процесса мутагенеза. На сегодня в связи с вышеизложенным перспективна терапия с помощью антиоксидантов, контроль за уровнем пула дНТФ в клетке и применение средств, корректирующих картину метилирования ДНК в клетке.

E. I. Cherepenko, D. M. Hovorun

The updated picture of spontaneous mutagenesis could involve DNA bases tautomerism

Summary

Based on the data on activation of many molecular processes during cell functioning under different conditions the multitudinous sources of spontaneous mutations are briefly summarized. The mechanisms of different class mutation emergence as well as possible mechanisms regulating mutation rates are characterized. As the level of dNTP pool is significantly elevated in genotoxically stressed cells, leading to an increased number of mutations appearing, it is proposed that this effect could be accounted for DNA bases tautomerism occurring in tight molecular space overcrowded with dNTP. The mutation rate could be controlled by regulating the dNTP concentration.

Keywords: spontaneous mutagenesis, DNA bases tautomerism, level of intracellular of dNTP.

О. Й. Черепенко, Д. М. Говорун

Сучасна картина спонтанного мутагенезу та можливе місце в ній природної таутомерії основ ДНК

Резюме

В обзорі сумовано загальноприйняті у сучасній генетиці дані з вивчення різноманітних джерел спонтанного мутагенезу, який визначається внутрішньоклітинними процесами життєдіяльності клітини за будь-яких умов її функціонування. Охарактеризовано механізми виникнення переважного числа класів мутаций, а також можливі механізми регуляції швидкості спонтанного мутагенезу. Аналіз даних значного підвищення пулу дНТФ за умов генотоксичного стресу і відповідного зростання рівня мутаций у таких клітинах дозволяє пояснити цей результат ефектами таутомерії основ ДНК, які виникають при скупченні цих молекул у тісному молекулярному просторі. Припускається, що контроль над швидкістю спонтанного му-

тагенезу може бути пов'язаним з контролем над концентрацією дНТФ у клітині.

Ключові слова: спонтанний мутагенез, таутомерія основ ДНК, рівні внутрішньоклітинного пулу дНТФ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Mutation and Repair // A special issue of Genetics.*—1998.—**148**.—P. 1403–1687.
2. *Drake J. W. Looking backward on a century of mutation research // Environ. Mol. Mutagen.*—1994.—**23** (Suppl).—P. 11–14.
3. *Drake J. W. A constant rate of spontaneous mutations in DNA-based microbes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1991.—**88**.—P. 7160–7164.
4. *Drake J. W. Spontaneous mutations // Annu. Rev. Genet.*—1991.—**25**.—P. 125–146.
5. *Drake J. W. Rates of spontaneous mutations among RNA viruses // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1993.—**90**.—P. 4171–4175.
6. *Drake J., Charlesworth B. J., Charlesworth J. C. Rates of spontaneous mutations // Genetics.*—1998.—**148**.—P. 1667–1686.
7. *Eigen M. Viral quasispecies // Sci. Amer.*—1993.—**269**.—P. 42–49.
8. *Drake J. W. The distribution of rates of spontaneous mutation over viruses, prokaryotes and eukaryotes // Ann. N. Y. Acad. Sci.*—1999.—**870**.—P. 100–107.
9. *Gary T., Colowick N., Mosig G. A species barrier between bacteriophages T2 and T4: Exclusion, join-copy and join-cut-copy recombination and mutagenesis in the dCNPase genes // Genetics.*—1998.—**148**.—P. 1461–1473.
10. *DeBoer, Glickman B. The lacI gene as a target for mutation in transgenic rodents and Escherichia coli // Genetics.*—1998.—**148**.—P. 1441–1451.
11. *Houle D., Kondrashov A. Mutation // Evolutionary Genetics.*—Oxford: Univ. press, 2006.—P. 32–48.
12. *Azam M., Latek R., Daley G. Mechanisms of autoinhibition of STI/Imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL // Cell.*—2003.—**112**.—P. 831–843.
13. *Danilov V. I., Hovorun D. N., Kurita N. The molecular mechanism of the spontaneous mutations caused by tautomerism of bases: Post Hartree-Fock study of the DNA rare base pairs // Biopolimery i Kletka (Kyiv).*—2005.—**21**.—P. 70–79.
14. *Goodman M., Fyrgerson K. DNA-polymerase fidelity: From genetics toward a biochemical understanding // Genetics.*—1998.—**148**.—P. 1475–1482.
15. *Schaaper R. Antimutator mutants in bacteriophage and Escherichia coli // Genetics.*—1998.—**148**.—P. 1579–1585.
16. *Kunz B., Ramachandran K., Vonarx E. DNA sequence analysis of spontaneous mutagenesis in Saccharomyces cerevisiae // Genetics.*—1998.—**148**.—P. 1491–1505.
17. *Friedberg E. C. Deoxyribonucleic acid repair in Saccharomyces cerevisiae // Microbiol. Rev.*—1988.—**52**.—P. 70–102.
18. *Nelson J. R., Lawrence C. W., Hinkle D. C. Thymine-dimer bypass by yeast DNA-polymerase pol // Science.*—1996.—**272**.—P. 1646–1649.
19. *Resnick M. A. The repair of double-stranded breaks in DNA: a model involving recombination // J. Theor. Biol.*—1976.—**59**.—P. 97–106.
20. *Szostack J., Orr-Weaver R., Rothstein J., Stahl F. W. The double-strand break repair model for recombination // Cell.*—1983.—**33**.—P. 25–35.
21. *McGill C., Holbeck S., Strathern J. The chromosome bias of misincorporation during double-strand break repair model for recombination // Genetics.*—1998.—**148**.—P. 1525–1533.

22. *Cavero S., Chanwan C., Russel P.* Xlf1 is required for DNA repair by nonhomologous end joining in *Schizosaccharomyces pombe* // *Genetics*.—2007.—**175**.—P. 963–967.
23. *Knuth M. W., Gunderson S. I., Thompson N. E., Straheim L. A., Burgess R.* Purification and characterization of proximal sequence element-binding protein1, a transcription activating protein related to Ku and TREF that binds the proximal sequence element of the human U1 promoter // *J. Biol. Chem.*—1990.—**265**.—P. 17911–17920.
24. *Messier H., Fuller T., Brickner H., Isagashi S.* p70 lupus autoantigen binds the enhancer of the T-cell receptor α -chain gene // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1993.—**90**.—P. 2685–2689.
25. *Колотова Т. Ю., Стегний Б. Т., Кучма И. Ю., Дубинина Н. В., Головки А. Н., Чайковский Ю. Б., Волянський Ю. Л.* Механізми і контроль перестроек генома еукариот.—Харьков: Коллегиум, 2004.—263 с.
26. *Черепенко Е. И., Говорун Д. Н.* Геном еукариотів: на пути прочтения от альфы до омеги // *Біополімери і клітина*.—2007.—**23**.—С. 7–10.
27. *Feinberg A., Olsson R., Henikoff S.* The epigenetic progenitor origin of human cancer // *Nat. Rev.*—2006.—**7**.—P. 21–33.
28. *Lewin B.* *Genes VIII*.—Oxford: Univ. press, 2006.—p.
29. *Nussenzweig M., Alt F. W.* Antibody diversity: one enzyme to rule them all // *Nat. Med.*—2004.—**10**.—P. 1304–1305.
30. *Peterson-Mahrt S.* DNA deamination in immunity // *Immunol. Res.*—2005.—**203**.—P. 80–97.
31. *Friedberg E.* The eureka enzyme: the discovery of DNA polymerase // *Nat. Rev.*—2006.—**7**.—P. 143–147.
32. *Echols H., Goodman M.* Fidelity mechanisms in DNA replication // *Ann. Rev. Biochem.*—1991.—**60**.—P. 477–551.
33. *Smith B., Walker G.* Mutagenesis and more: *umu DC* and *E. coli* SOS-response // *Genetics*.—1998.—**148**.—P. 1599–1610.
34. *Fang M.* Umu D'2C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1999.—**96**.—P. 8919–8924.
35. *Reuven N. B., Arad G., Maor-Shohani A., Livneh Z.* The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by Umu D'C, RecA and SSP and specialized by translesion synthesis // *J. Biol. Chem.*—1999.—**274**.—P. 31763–31766.
36. *Jarosz D. F., Godoy V. G., Delaney J. C., Essiqmann J. M., Walker G. C.* A single amino acid governs enhanced activity of Din B DNA polymerase on damaged template // *Nature*.—2006.—**439**.—P. 225–228.
37. *Sun Q., Chen G., Streb J., Long X., Yang Y., Stoekert C., Miano J.* Defining the mammalian CarGome // *Genome Res.*—2006.—doi:10.1101/gr.4108706
38. *Barnett R., Bongiorno A., Cleveland C., Joy A., Landman U., Schuster G.* Oxidative damage to: Counterion-assisted addition of water to ionized DNA // *J. Am. Chem. Soc.*—2006.—**128**.—P. 10795–10800.
39. *Wittschieben J., Reshmi S. C., Gollin S. M., Wood R. D.* Loss of DNA polymerase zeta causes chromosome instability in mammalian cells // *Cancer Res.*—2006.—**66**.—P. 134–142.
40. *Avkin S., Sevilya Z., Noubé L., Geacintov N., Chaney S. G., Oren M., Livneh Z.* p53 and p21 regulate error-prone DNA repair to yield a lower mutation load // *Mol. Cell.*—2006.—**22**.—P. 407–413.
41. *Бурлака А. П., Сидорук Є. П.* Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі.—Київ: Наук. думка, 2006.—227 с.
42. *Nossal N.* A new look at old mutants of T4 DNA polymerase // *Genetics*.—1998.—**148**.—P. 1535–1538.
43. *Timms A., Bridges B.* Reversion of the tyrosine ochre strain of *Escherichia coli* WV3610 under starvation conditions depends on a new gene *tas* // *Genetics*.—1998.—**148**.—P. 1627–1635.
44. *Jackson A., Loeb L.* The mutation rate and cancer // *Genetics*.—1998.—**148**.—P. 1483–1490.
45. *Ninio J.* Transient mutators: a semiquantitative analysis of the influence of translation and transcription errors on mutation rates // *Genetics*.—1991.—**129**.—P. 957–962.
46. *Cairns J., Overbaugh J., Miller S.* The origin of mutations // *Nature*.—1988.—**335**.—P. 142–145.
47. *Foster P.* Adaptive mutations: Has the unicorn landed? // *Genetics*.—1998.—**148**.—P. 1453–1459.
48. *MacPhee D., Haynes R., Kunz B. A., Anderson D.* Genetic aspects of deoxyribonucleotide metabolism // *Mutat. Res.*—1988.—**200**.—P. 1–256.
49. *Kunz B. A., Kohlami S. E., Kunkel T. A., Matthews C. K., McIntosh E. M.* Deoxyribinucleoside triphosphate levels, a critical factor in the maintenance of genetic stability // *Mutat. Res.*—1994.—**318**.—P. 1–64.
50. *Clayton L. K., Goodman M., Branscomb E. W., Gallas D. I.* Error induction and correction by mutant and wild type T4 DNA polymerase: kinetic error discrimination mechanisms // *J. Biol. Chem.*—1979.—**254**.—P. 1902–1912.
51. *Fersht A.* Fidelity of replication of phage ϕ 174 DNA by DNA polymerase III holoenzyme and spontaneous mutation by misincorporation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1979.—**76**.—P. 4946–4950.
52. *Kunkel T. A., Schaaper R., Beckman R. A., Loeb L. A.* On the fidelity of DNA replication: effect of the next nucleotide of proofreading // *J. Biol. Chem.*—1981.—**256**.—P. 9883–9889.
53. *Lyons S. M., Speyer J. F., Schendel F.* Interaction of an antimutator gene with DNA repair pathway in *Escherichia coli* // *Mol. and Gen. Genet.*—1985.—**198**.—P. 336–347.
54. *Weinberg G., Ullman B., Martin D. W., Jr.* Mutator phenotypes in mammalian cells mutants with distinct biochemical defects and abnormal deoxyribonucleoside triphosphate pools // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1981.—**78**.—P. 2447–24521.
55. *Zhao X., Muller E. G., Rothsten R. A.* A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools // *Mol. Cell.*—1998.—**2**.—P. 329–340.
56. *Chabes A., Georgieva B., Domkin V., Zhao X., Rjthstein R. A., Thelander L.* Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase // *Cell*.—2003.—**112**.—P. 391–401.

УДК 577.21+575.857

Надійшла до редакції 22.02.07