

Двадцать первая Летняя Многопредметная Школа Кировской области
Вишкиль. 2-27.VII.2005 г.

Сохранение и модификация ДНК: **РЕПАРАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ**



Часть 1

Мутации и мутагены

Основные термины

- **Мутации** – это явления скачкообразного, прерывистого изменения наследственного признака. (*определение Г. Де Фриза*)
- **Мутации** – это наследуемые изменения структуры генома, т.е. изменение структуры геномных нуклеиновых кислот.
- **Мутагенез** – это процесс возникновения мутаций, основанный на различных механизмах.

Мутационная теория

Основные положения мутационной теории Г. Де Фриза сводятся к следующему:

1. Мутации возникают внезапно, как дискретные изменения признаков.
2. Новые формы устойчивы.
3. В отличие от не наследстве иных изменений мутации не образуют непрерывных рядов, не группируются вокруг какого-либо среднего признака. Они представляют собой качественные изменения
4. Мутации проявляются по-разному и могут быть как полезными, так и вредными.
5. Вероятность обнаружения мутаций зависит от числа исследованных особей.
6. Сходные мутации могут возникать неоднократно.

Классификация мутаций

- I. В зависимости от факторов, вызывающих мутации, их разделяют на спонтанные и индуцированные.
 1. **Спонтанные мутации** возникают самопроизвольно на протяжении всей жизни организма в *нормальных* для него условиях окружающей среды (спонтанные мутации в эукариотических клетках возникают с частотой 10^{-9} – 10^{-12} на нуклеотид за клеточную генерацию).
 2. **Индуцированные мутации** – это наследуемые изменения генома, возникающие в результате тех или иных *мутагенных воздействий* в искусственных (экспериментальных) условиях или при неблагоприятных воздействиях окружающей среды.

Классификация мутаций

II. В зависимости от размеров сегментов генома, подвергающихся преобразованиям, мутации разделяют на геномные, хромосомные и генные.

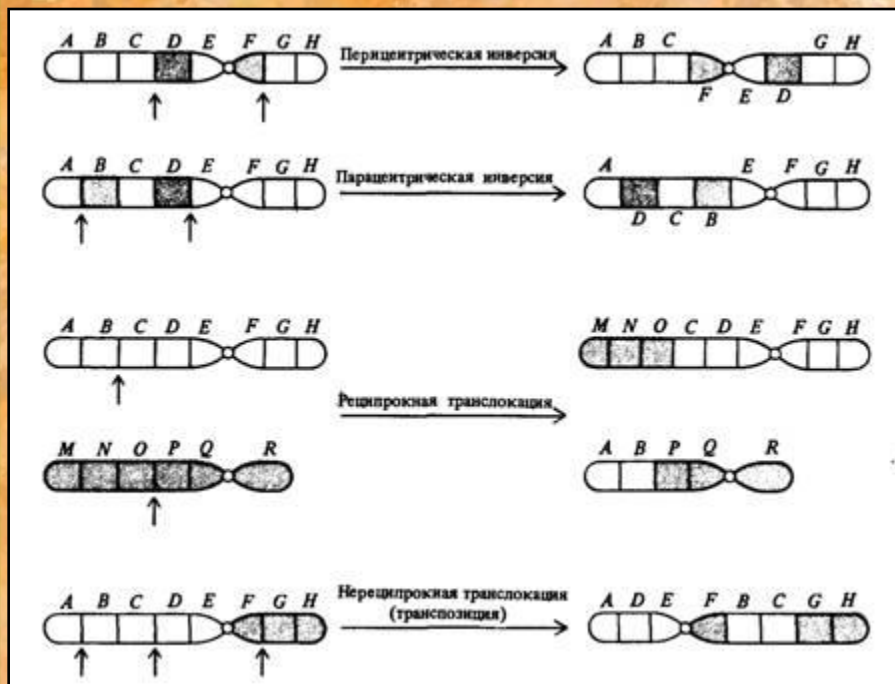
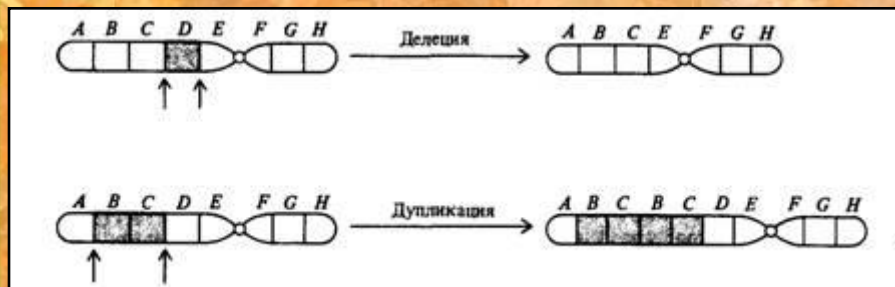
1. При геномных мутациях происходит внезапное изменение числа хромосом, кратное целому геному.

- а) Полиплоидизация – умножение наборов хромосом, при котором происходит образование полиплоидных организмов, геном которых представлен $4n$, $6n$ и т.д. В зависимости от происхождения хромосом в полиплоидах различают
- Аллополиплоидию в результате которой происходит объединение при гибридизации *целых неродственных геномов*.
 - Аутополиплоидию для которой характерно адекватное увеличение числа хромосом *собственного генома*, кратное $2n$.

Классификация мутаций

2. При хромосомных мутациях

происходят как изменение числа отдельных хромосом в геноме (анеуплоидия), так и крупные перестройки структуры отдельных хромосом (хромосомные aberrации):

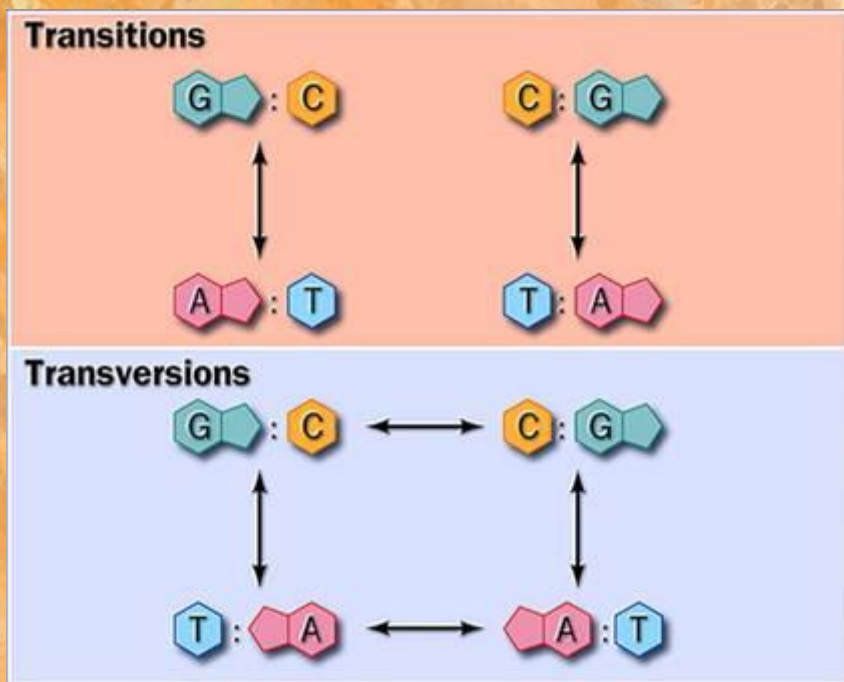


- Делция - потеря части генетического материала.
- Дупликация - удвоение части генетического материала.
- Инверсия - изменение ориентации сегментов хромосом в отдельных хромосомах.
- Транслокация - перенос части генетического материала с одной хромосомы на другую.

Классификация мутаций

3. **Генные мутации** - изменения первичной структуры ДНК генов под действием мутагенных факторов (встречаются более часто, чем предыдущие два типа мутаций).

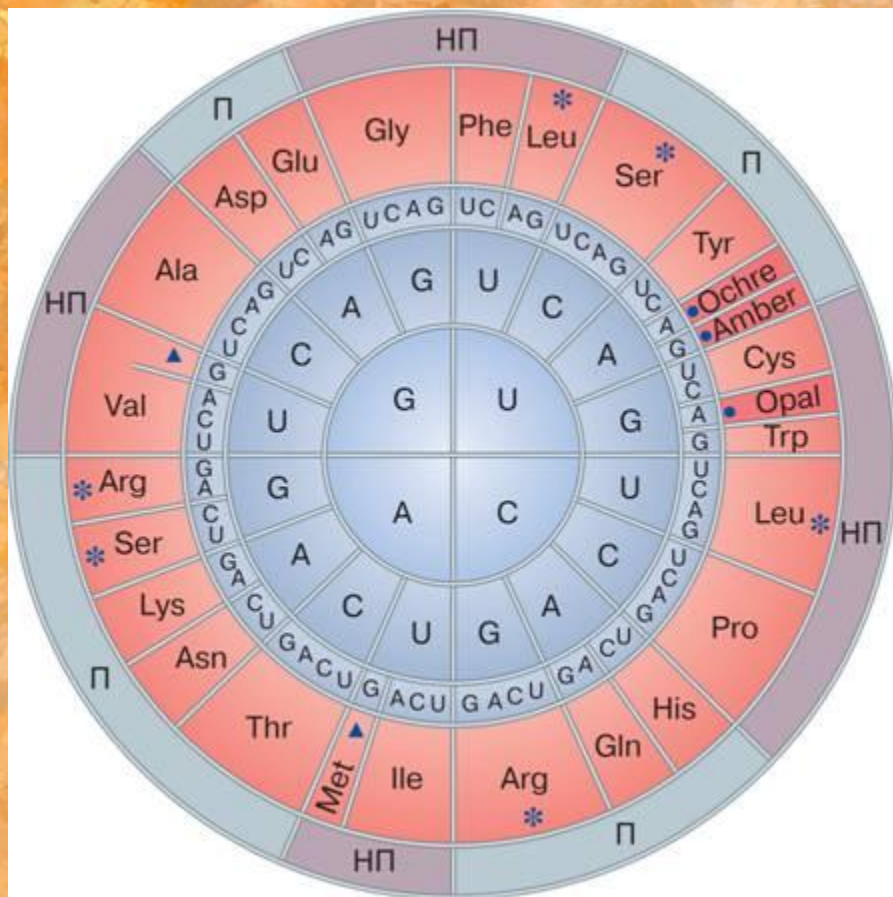
а) В результате генных мутаций происходят замены, делеции и вставки одного или нескольких нуклеотидов, транслокации, дупликации и инверсии различных частей гена.



б) Если изменяется лишь один нуклеотид, говорят о точковых мутациях. Точковые мутации с заменой оснований разделяют на два класса:

- транзиции (замена пурина на пурин или пириимидина на пириимидин)
- трансверсии (замена пурина на пириимидин или наоборот).

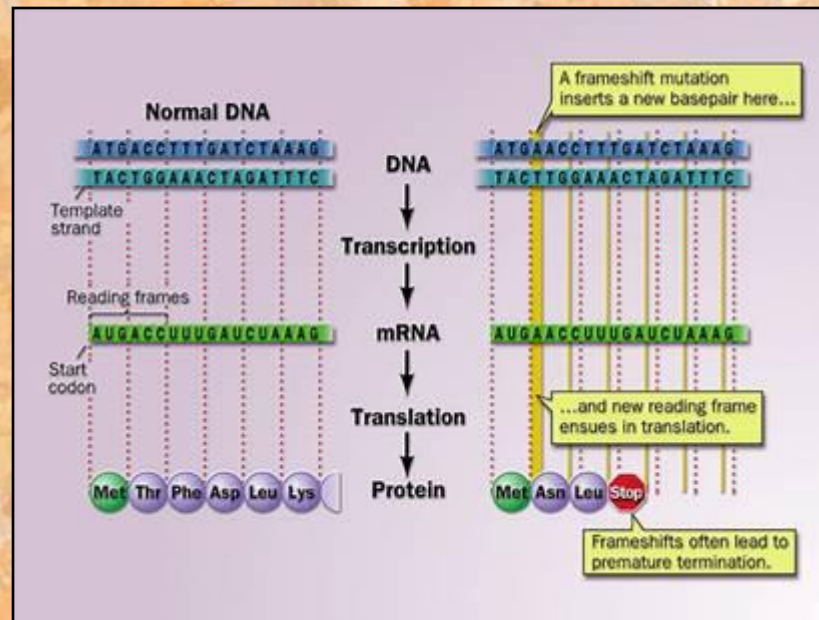
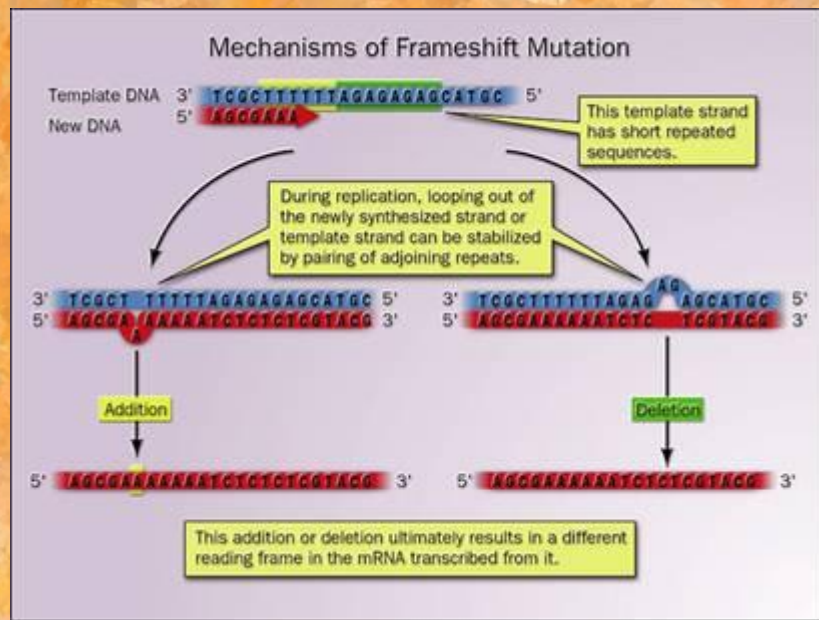
Классификация мутаций



Из-за вырожденности генетического кода могут быть три генетических последствия точковых мутаций:

- Синонимическая замена нуклеотида с сохранением смысла кодона.
- Миссенс-мутация - изменение смысла кодона, приводящее к замене аминокислоты в соответствующем месте полипептидной цепи.
- Нонсенс-мутация - образование бессмысленного кодона с преждевременной терминацией трансляции.

Классификация мутаций



IV. По влиянию на экспрессию генов мутации разделяют на две категории:

1. Мутации замен пар оснований
2. Мутации сдвига рамки считывания (frameshift), т.е. делеции или вставки нуклеотидов, число которых не кратно трем, что связано с триплетностью генетического кода.

Классификация мутаций

V. Первичную мутацию называют прямой мутацией, а мутацию, восстанавливающую исходную структуру гена – обратной мутацией или реверсией.

□ Супрессорная мутация – когда возврат к исходному фенотипу у мутантного организма вследствие восстановления функции мутантного гена происходит не за счет истинной реверсии, а вследствие мутации в другой части того же самого гена или даже другого неаллельного гена. Генетические механизмы такой супрессии мутантного фенотипа, весьма разнообразны.

Основные источники мутаций

- В основе мутаций на молекулярном уровне лежат две основные причины:
 - Ошибки репликации
 - Мутагенные воздействия различной природы.

Ошибки репликации

Точность процесса репликации определяется:

1. Различиями в свободной энергии у канонических или ошибочных пар азотистых оснований ДНК, образующихся по правилам Уотсона–Крика в водных растворах (различия порядка ~1–3 ккал/моль и обеспечивают точность 1 ошибка на каждые 100 нуклеотидов).
 2. Наличием свойственной многим бактериальным и эукариотическим ДНК-полимеразам 3'→5'-экзонуклеазной корректирующей активности (ошибочно включенные нуклеотиды, некомплементарные матрице, удаляются с 3'-конца растущей цепи ДНК перед включением следующего нуклеотида в строящуюся цепь ДНК).
- Таким образом точность функционирования ДНК-полимераз не является абсолютной, а зависит от взаимодействия белков и ферментов системы репликации и матричной ДНК. Изменение свойств этих белков или матрицы как спонтанно, так и под действием различных модифицирующих агентов приводит к ошибкам в репликации ДНК и мутациям.

Мутагенные воздействия

- Усилий систем репликации становится недостаточно в стрессовых ситуациях, когда организм подвергается массивному мутагенному воздействию.
- Процесс накопления мутаций, избежавших коррекции системами репарации, является *кумулятивным* – к ранее существовавшим мутациям неуклонно добавляются новые, и суммарное количество мутаций в геноме (*генетический груз*) возрастает.
- Процесс накопления мутаций – статистический, поэтому в настоящее время можно предсказывать лишь вероятность возникновения конкретной мутации в генетическом локусе или геноме организма.

Ионизирующее излучение

Ярко выраженным мутагенным действием обладают:

1. Коротковолновое электромагнитное излучение (УФ-свет, рентгеновские лучи)
2. Элементарные частицы, образующиеся в процессе радиоактивного распада вещества.

Механизм воздействия:

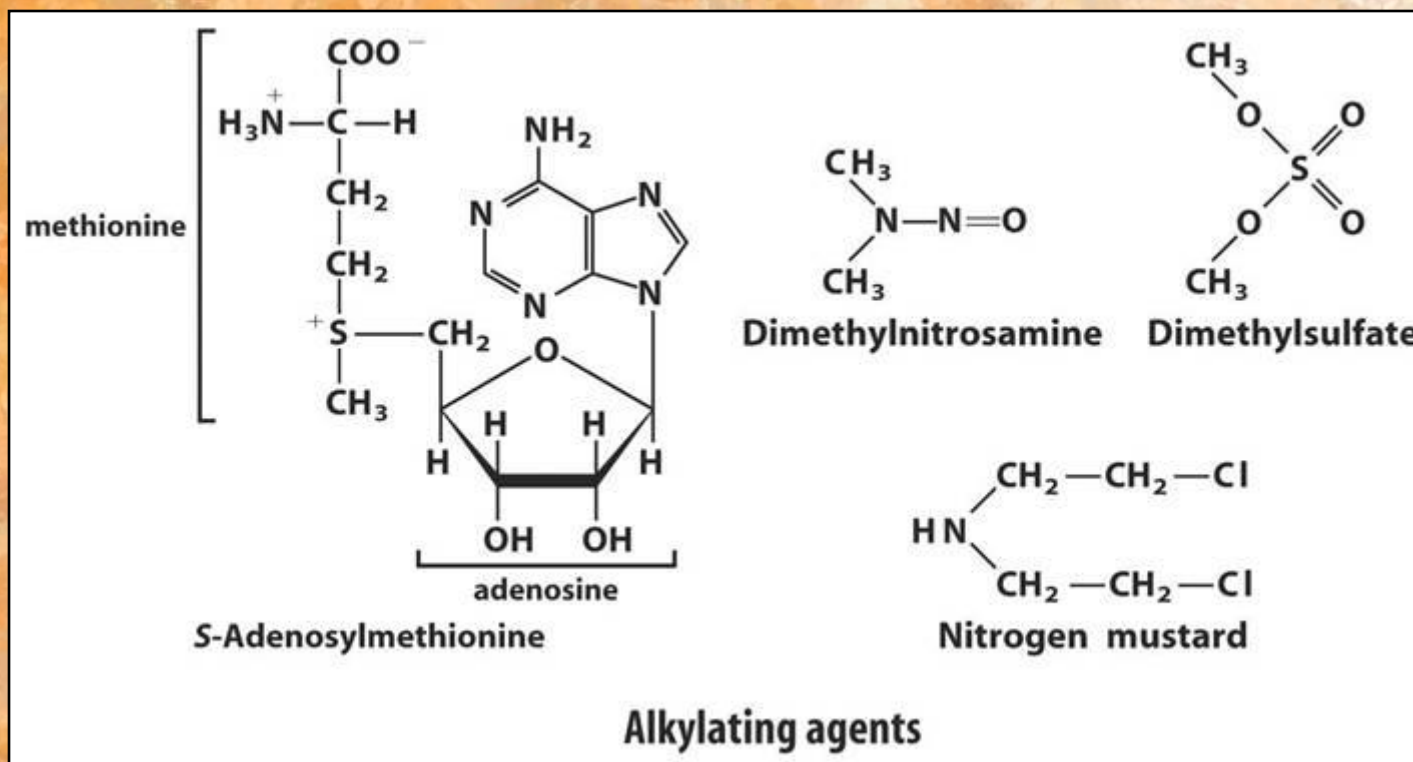
1. Электромагнитное излучение или элементарные частицы, проходя через вещество передают свою энергию атомам в процессе первичного столкновения.
2. В результате первичного столкновения из атома вещества выбиваются электроны, превращая его в положительно заряженный ион.
3. Вторично освобожденные электроны вызывают образование ионов на своем пути до тех пор, пока их энергия не понизится и они не утратят свою ионизирующую способность.

Химические мутагены

- Многие химические соединения обладают способностью взаимодействовать с ДНК или с ее низкомолекулярными предшественниками и вызывать мутации. Химические мутагены можно разделить на две большие группы
 1. “Явные мутагены” - химические соединения изначально являются реакционноспособными мутагенами, способными непосредственно взаимодействовать с ДНК и изменять ее химическую структуру.
 2. “Скрытые мутагены” или промутагены – исходные химические соединения для превращения в мутагены сначала претерпевают *метаболическую активацию* под действием ферментативных систем организма.

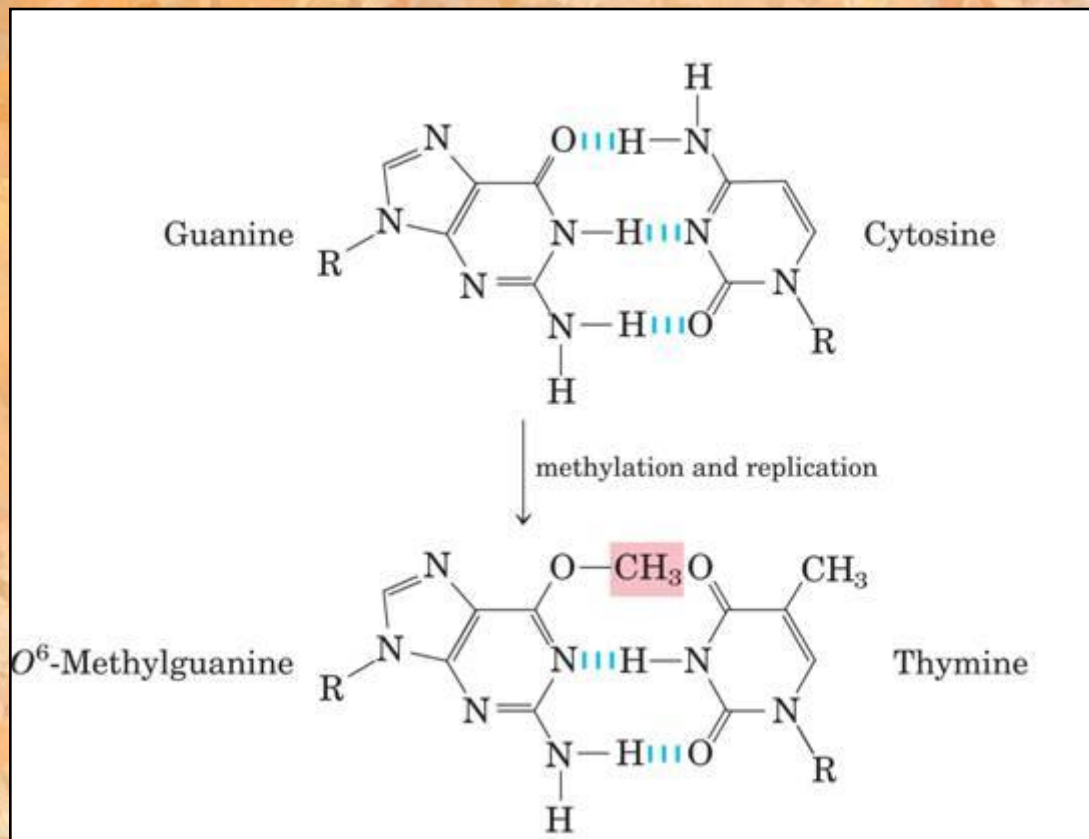
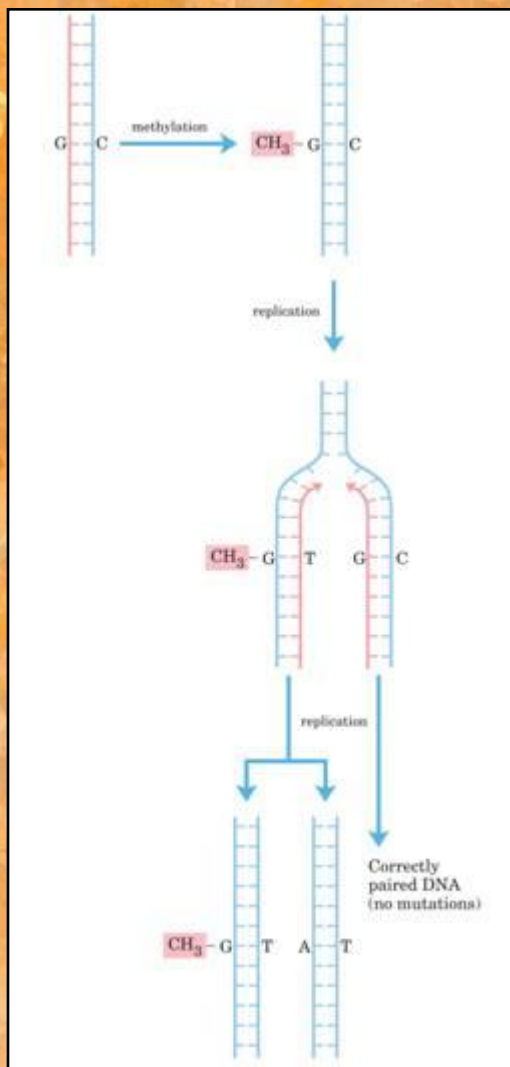
Алкилирующие агенты

- Наиболее обширным классом химических мутагенов экзогенного происхождения являются **алкилирующие агенты**.
- Механизм повреждающего воздействия заключается в спонтанном (без участия ферментативных систем организма) переносе алкильных групп этих химических соединений на биологические макромолекулы, в том числе и ДНК.

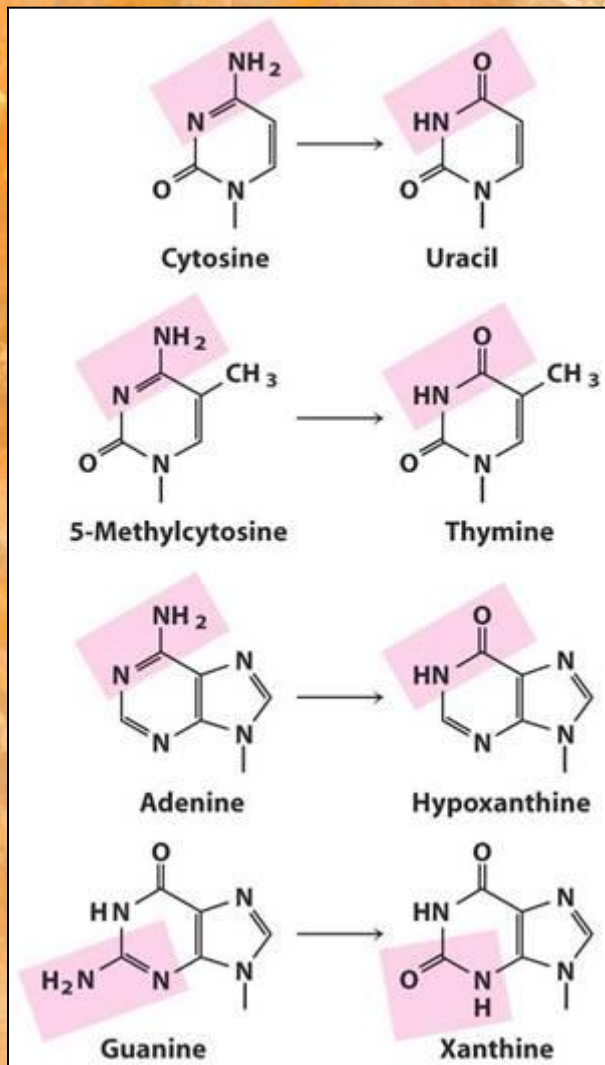


Алкилирующие агенты

- Главным источником мутаций, возникающих под действием алкилирующих агентов, является алкилирование O-6 в гуанине и O-4 в тимине ДНК.



Азотистая кислота как мутаген



Азотистая кислота образуется из нитритов (NaNO_2 и KNO_2) в водных растворах при низких значениях pH.

- Механизм повреждающего действия заключается в дезаминировании азотистых оснований нуклеиновых кислот.

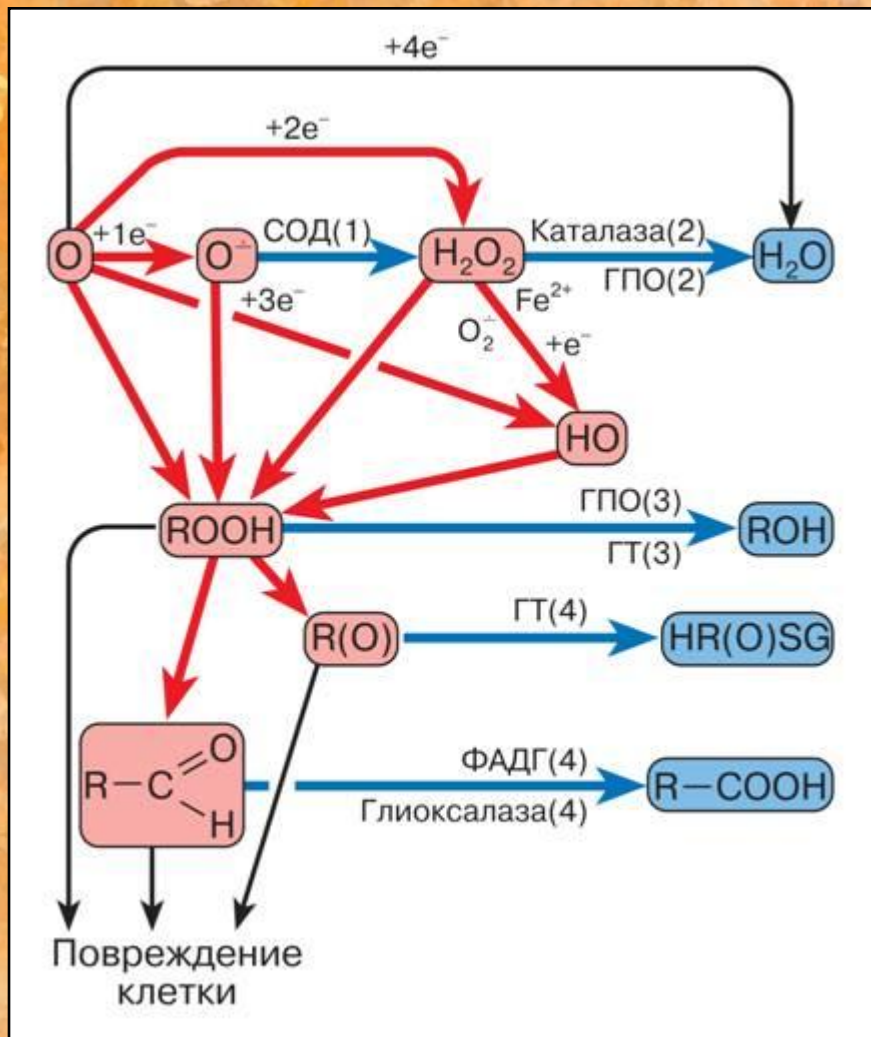
В результате:

1. Спаривание урацила с аденином приводит к транзициям GC→AT.
2. Гипоксантин вызывает обратную транзицию AT→GC.
3. Ксантин не спаривается ни с одним из пиримидинов и его включение оказывается летальным для клетки.

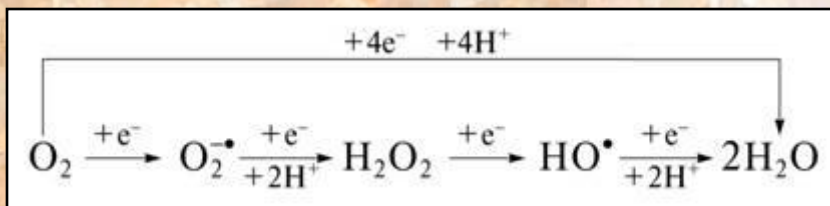
Органические перекиси как мутагены

- Мутагенным действием обладают различные органические перекиси.
- Азид натрия – мощный ингибитор дыхания, также обладает мутагенным действием, что связывают с накоплением при этом ингибировании мутагенных перекисей.
- Механизм повреждающего действия перекисей заключается в индукции образования различных реакционноспособных радикалов – активных форм кислорода (имитируют мутагенное действие рентгеновских лучей) в результате образуются мутации и разрывы хромосом.

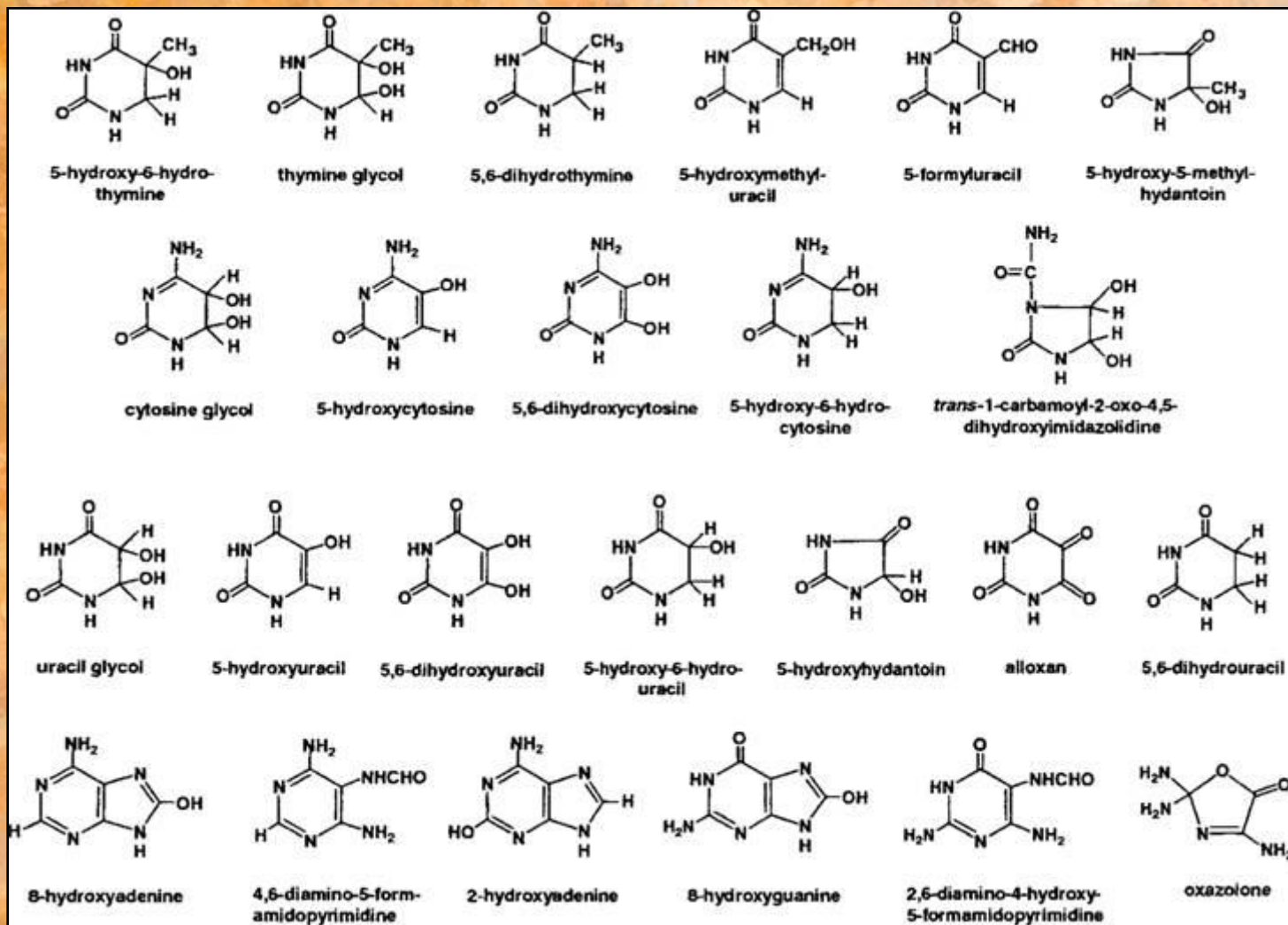
Активные формы кислорода



- В клетках активные формы кислорода (АФК) возникают в реакциях восстановления, в результате которых появляются чрезвычайно реакционноспособные промежуточные соединения.
- Наибольшую опасность для ДНК представляют радикалы гидроксила, супероксид и синглетный кислород, которые образуются в процессе дыхания, фагоцитоза и при повреждении клеток.
- Ежедневно в каждой клетке человека возникает ~10000 таких модифицированных АФК нуклеотидов.



Активные формы кислорода



Аналоги нуклеозидов и оснований

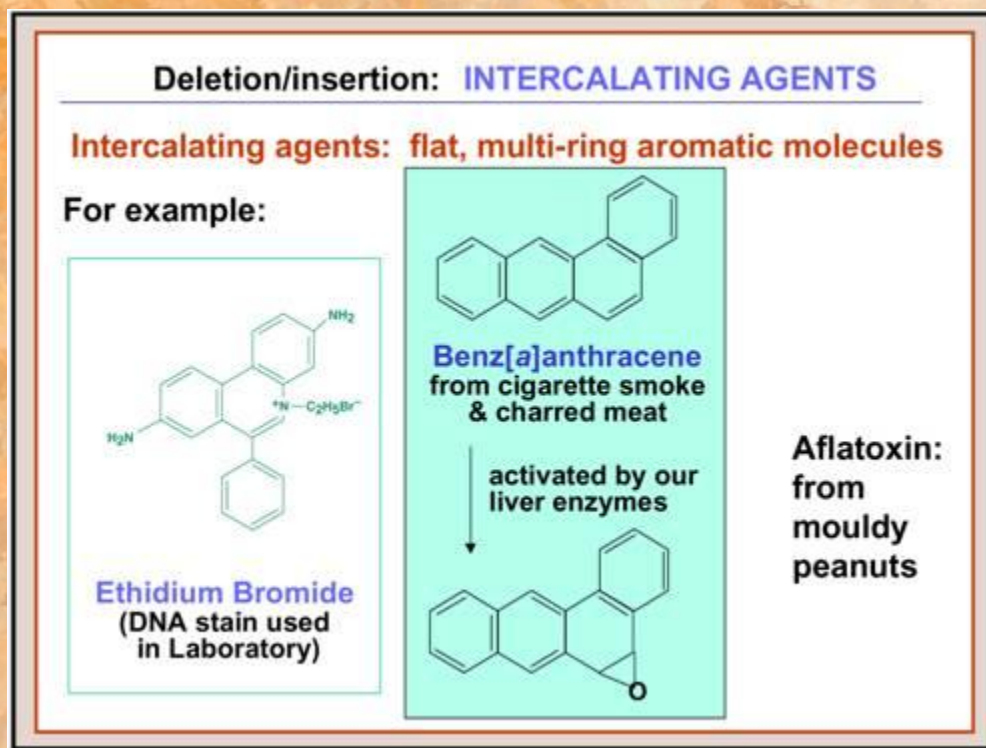
Аналоги нуклеозидов и оснований: **5-бромдезоксисуридин** и **2-аминопури**, так же являются сильными мутагенами.

- **5-бромдезоксисуридин** обычно включается в ДНК вместо цитозина и спаривается с аденином, что приводит к образованию транзиций GC→AT.
- **2-аминопури** включается вместо аденина и спаривается с цитозином, в результате чего возникают обратные транзиции AT→GC.

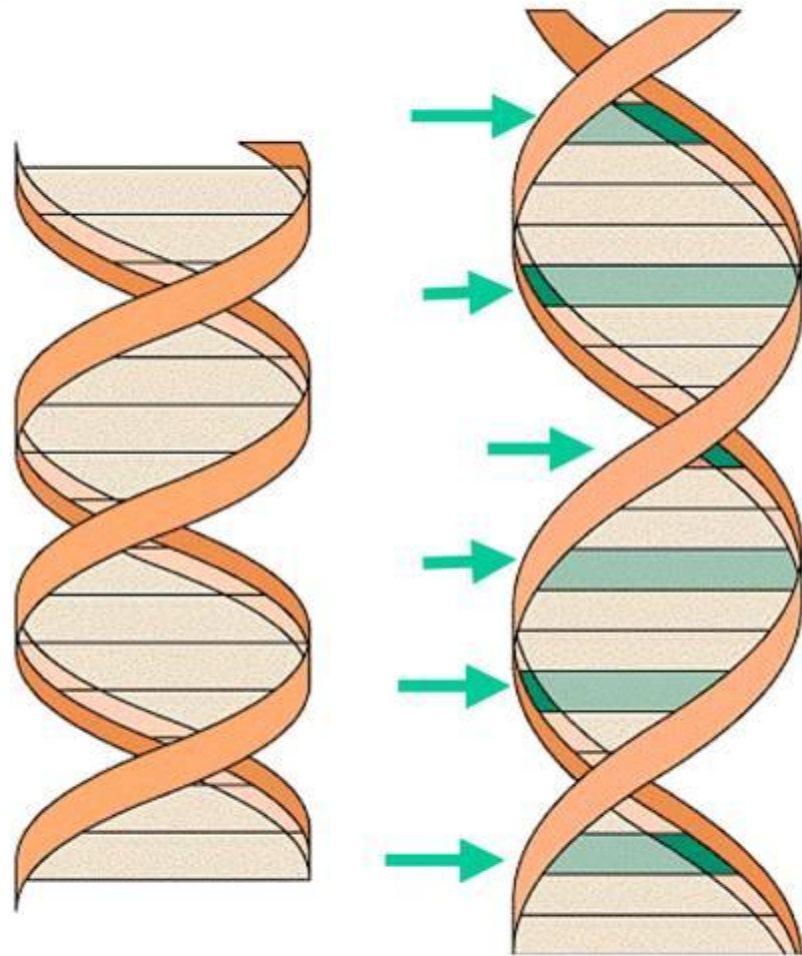


Интеркалирующие соединения

- Красители нуклеиновых кислот, обладающие способностью интеркалировать между основаниями ДНК, вызывают мутации со сдвигом рамки считывания.
- Примерами таким красителей являются широко используемые в лабораторной практике бромистый этидий и производные акридина.



Deletion/insertion: **INTERCALATING AGENTS**



**Original
DNA**

**DNA stretched by
intercalated ligands**

Stretching changes the frame needed by DNA Polymerase during replication.

Extra nucleotides are added during replication

The **DNA reading frame** for RNA synthesis is changed:
amino acid changes
altered protein

Метаболическая активация проканцерогенов

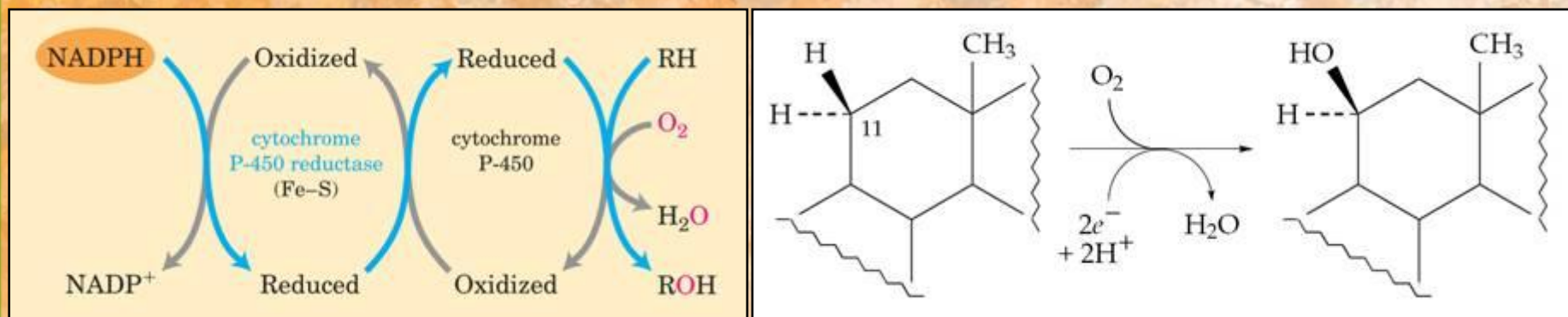
- Для защиты от накопления экзогенных чужеродных химических соединений (**ксенобиотиков**) у каждого живого организма имеются эффективные ферментативные механизмы.
- Многие опасные для здоровья ксенобиотики гидрофобны и могут накапливаться в липидах клеточных мембран. Для того, чтобы их вывести из организма необходимо повысить их растворимость в воде, т.е. сделать гидрофильными.
- Процесс метаболической инактивации ксенобиотиков и повышения их гидрофильности проходят в два этапа:
 1. Ферментативное введение в их молекулы небольших полярных групп (например гидроксильных).
 2. Конъюгация преобразованных молекул ксенобиотиков с еще более полярными химическими группировками, в частности с остатками глюкуроновой кислоты, сульфатов или глицина.

Цитохромы P-450

В первой фазе метаболизма ксенобиотиков принимают участие **цитохромы группы P-450**. Эти ферменты в организме представлены большим числом (>20) изоформ, каждая из которых, как правило, обладает широкой субстратной специфичностью.

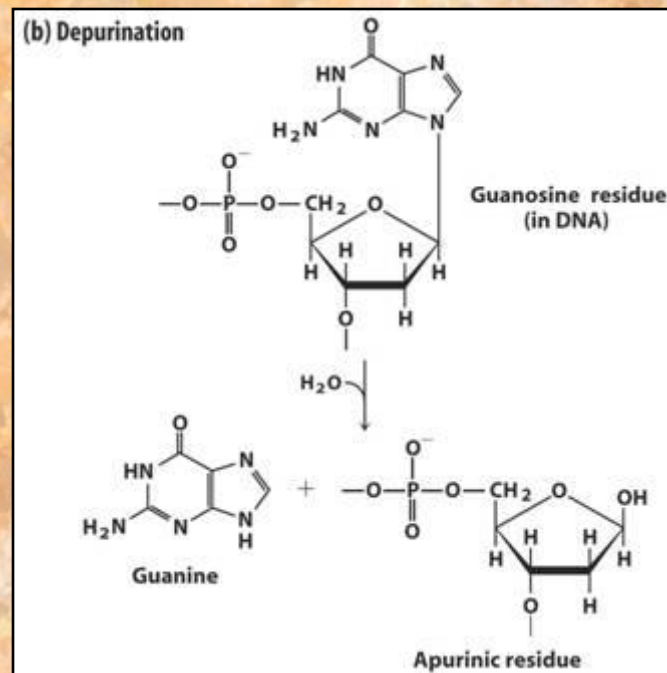
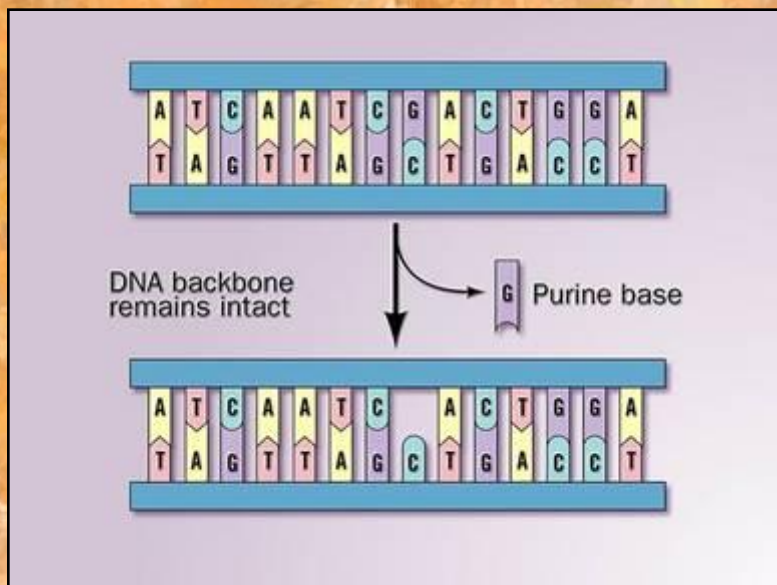
- Обобщенное уравнение химической реакции, осуществляемой цитохромами P-450:

$$S + \text{NAD(P)H} + \text{O}_2 \rightarrow \text{SO} + \text{NAD(P)}^+ + \text{H}_2\text{O}$$
 (S – молекула субстрата, а SO – ее окисленная форма)
- Молекулы цитохрома P-450 интегрированы в мембраны гладкого ЭР, которые так же содержат небольшую электронтранспортную цепь.



Эндогенные мутагены

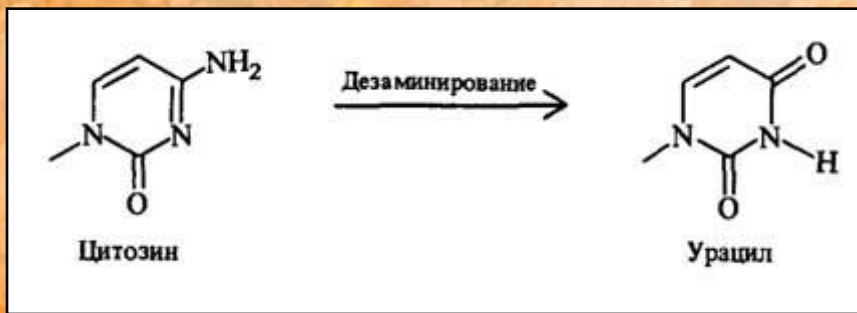
1. Молекулы ДНК часто претерпевают *in vivo* тепловую депуринизацию, которая может быть спонтанным внутренним источником измененных нуклеотидов.



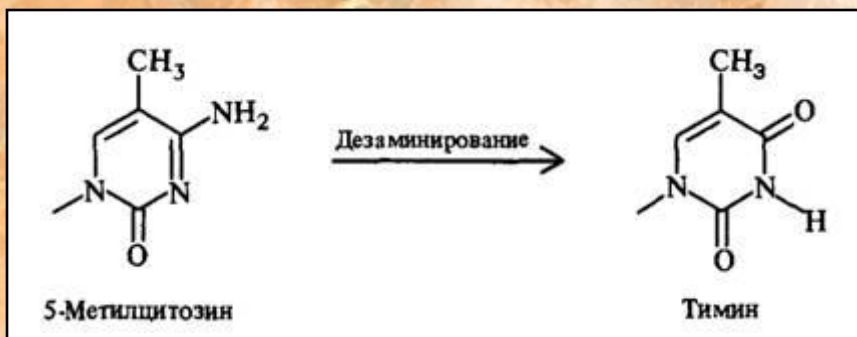
При тепловой депуризации происходит разрыв лабильной β-N-гликозидной связи (между основанием и рибозой). Наиболее легко это происходит для пуриновых нуклеотидов, для пиримидинов более трудно. В результате в молекуле ДНК на месте этих оснований образуется брешь, названная АП-сайтом (разрыв фосфодиэфирного остова не происходит).

Эндогенные мутагены

2. Источником эндогенных мутаций служит **самопроизвольное дезаминирование цитозина** в составе ДНК с образованием урацила.



5-Метилцитозин – одно из модифицированных оснований ДНК, представляет собой "**горячую точку**" возникновения мутаций путем спонтанного дезаминирования, так как в результате удаления его аминогруппы образуется нормальное основание Т, не распознаваемое системами репарации как мутантное.



Эндогенные мутагены

Соединение	Метаболит	акт
Метионин	Этионин	К
Тирозин	Фенол p-Крезол 4-Этилфенол	П П П
Триптофан	Индол Индолилуксусная кислота 3-Гидроксикинуренин 3-Гидроксиантраниловая к-та 8-Гидроксихинальдиновая к-та Хинальдиновая кислота Ксантуреновая кислота	П П П, М П, М П П П
Желчные к-ты	Дезоксихолиевая кислота Литохолиевая кислота бис-Нор-5-холеновая кислота Апохолиевая кислота	М, П П К К
Холестерин	Эпоксиды метаболитов: 5β-холестерин-3β-ола, 5β-холестерин-3-она, 4-холестерин-3-она и др.	М, К
Примечание. К – канцероген, П – промотор, М – мутаген.		

Источником эндогенных мутагенов в организме является **метаболизм нормальной микрофлоры**. Некоторые промежуточные соединения, возникающие при метаболизме аминокислот, желчных кислот и холестерина под действием бактерий организма человека обладают мутагенной и канцерогенной активностью.

В результате метаболизма в бактериальных клетках происходит **активация нитратов** с образованием мутагенных и канцерогенных N-нитрозаминов в кишечнике, желудке и ротовой полости человека.



Часть 2

Механизмы репарации

Определение

Репарация генетических повреждений – это свойство живых организмов восстанавливать повреждения, возникшие в ДНК в результате ошибок репликации, а так же воздействия разнообразных мутагенных факторов радиационной и химической природы.

Общие сведения

- В настоящее время описано множество различных систем репарации, часто принципиально отличных друг от друга.
- Простые реакции репарации происходят немедленно после мутагенного воздействия, более сложные системы требуют индукции синтеза новых ферментов и следовательно растянуты во времени.
- Многие реакции идут до того, как клетки вступят в новую фазу деления, а другие могут осуществляться только после того, как клетка закончила деление.
- Существуют также реакции, когда клетки "стараются" спасти свою жизнь путем введения новых мутации.

Основной принцип репарации

- Основан на двуспиральном строении ДНК.
- В большинстве случаев поврежденной оказывается только одна цепь ДНК, вторая же цепь сохраняется в нативном состоянии и служит матрицей, по которой осуществляется коррекция повреждения. Таким образом задача сводится к детекции повреждения и дальнейшей его коррекции либо напрямую, либо путем удаления поврежденного участка и застройкой по матрице неповрежденной цепи.
- Существует опасность повреждения обеих цепей дуплекса, для репарации в этом случае необходимы особые ферментные системы.

Повреждения ДНК

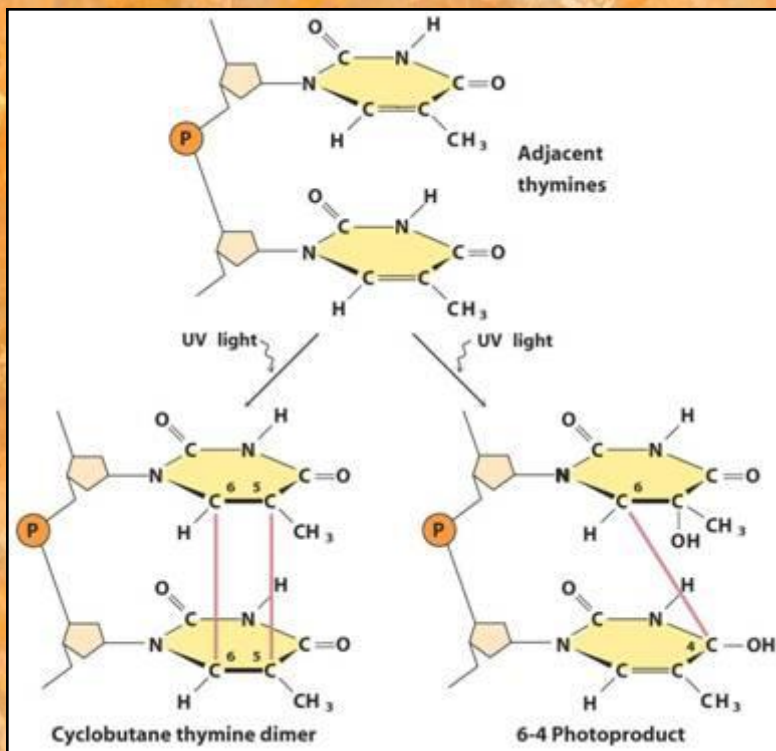
- **Появление различно модифицированных оснований:**
 - ❖ Пиримидиновые димеры.
 - ❖ Алкилированные производные.
 - ❖ Дезаминированные основания.
 - ❖ Различные таутомерные формы.
- **Появление неспаренных оснований (Mismatch) в результате рекомбинации дуплексов или ошибок в процессе репликации.**
- **Повреждения структуры дуплекса:**
 - ❖ Разрывы фосфодиэфирных связей сахарофосфатного остова молекулы ДНК.
 - ❖ Разрывы β -гликозидных связей между основанием и дезоксирибозой.



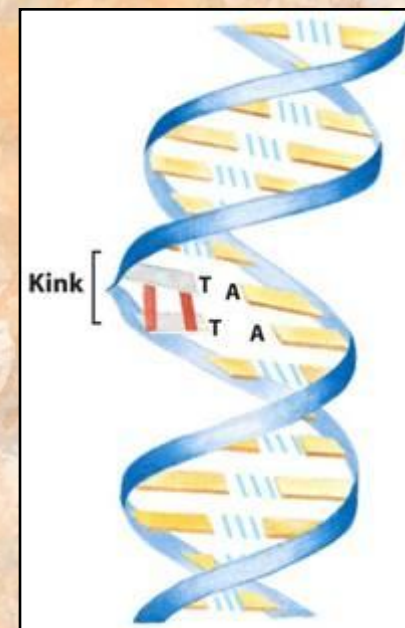
Основные повреждающие факторы

- Ионизирующие агенты:
 - ❖ Ультрафиолетовый свет.
 - ❖ Радиоактивные вещества.
 - ❖ Активные формы кислорода.
- Химические мутагены (например алкилирующие агенты).
- Эндогенные мутагены.
- Ошибки ферментов репликации.
- Мутации в генах ферментов общего метаболизма ДНК и как следствие увеличение частоты ошибок при репликации.

Пиримидиновые димеры



Двойная связь между пятым и шестым атомами углерода в составе пиримидиновых оснований под действием УФ-света может рваться. Атомы остаются связанными одиночной связью, а в результате разрыва другой связи образуются две свободные валентности.

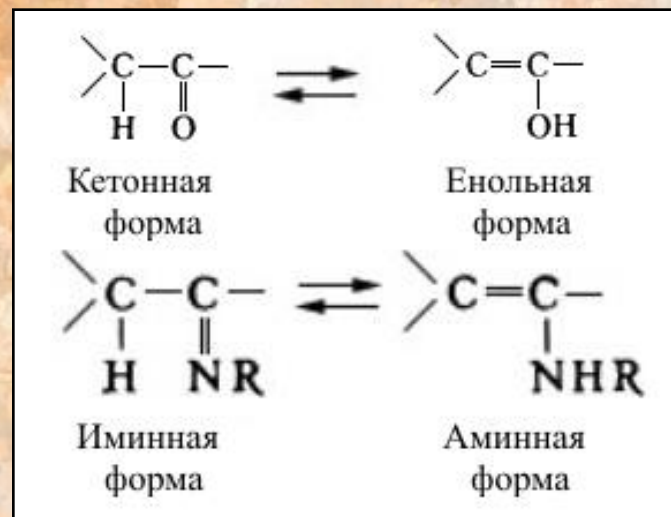
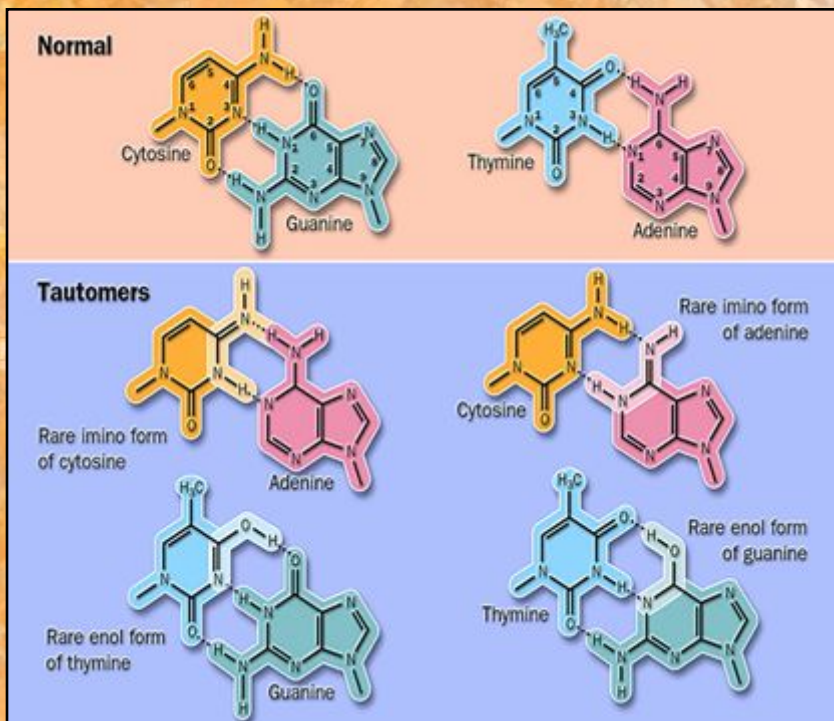


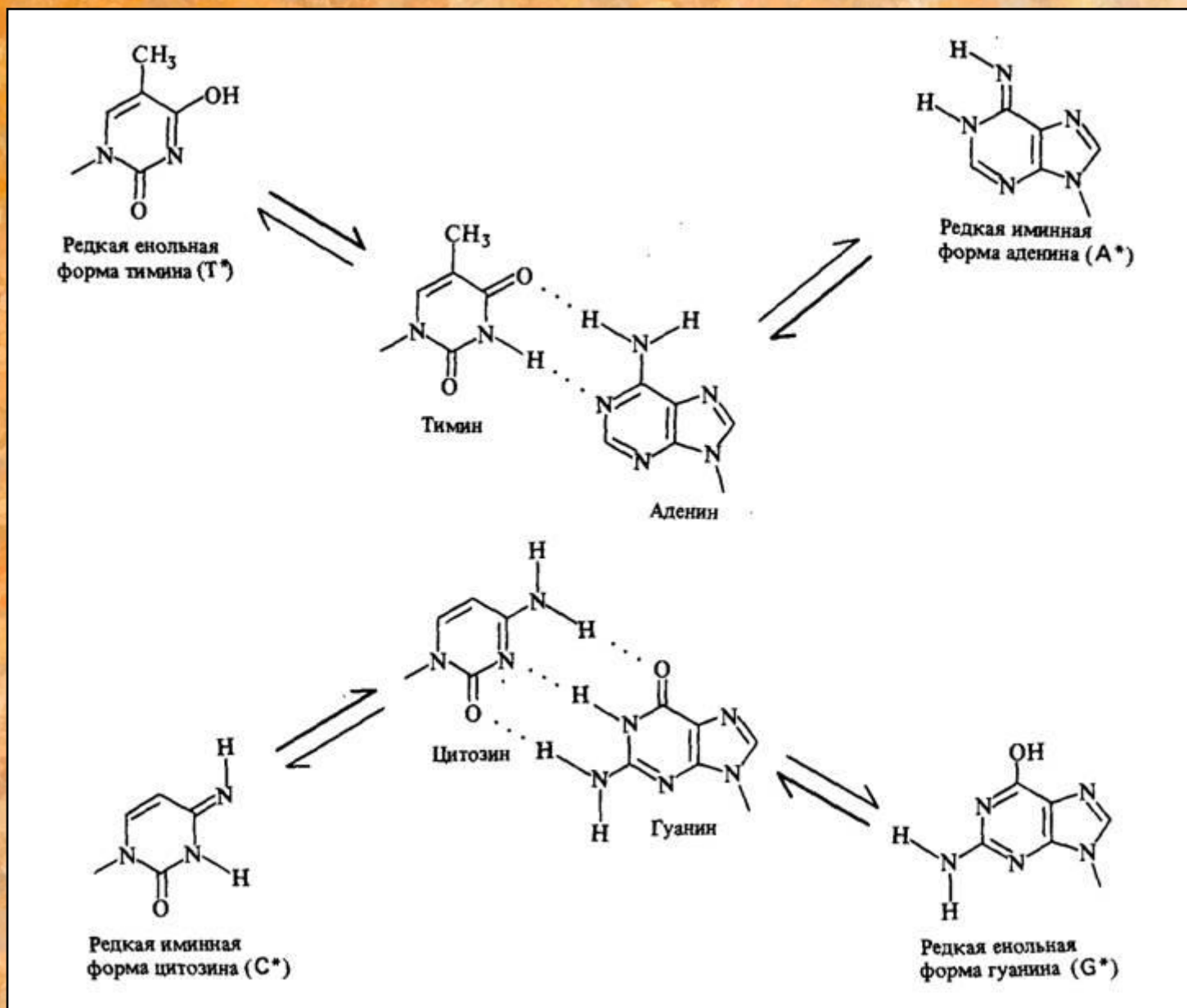
Расстояние между параллельными плоскостями оснований в В-форме оказывается как раз таким, чтобы освободившиеся при УФ-облучении валентности между С5-С6 атомами пиримидиновых оснований, расположенных рядом в цепи ДНК, могли замкнуться друг на друга и сформировать циклобутановое кольцо.

Таутомерные переходы

- **Таутомерия** (от греч. *tautós* — тот же самый и *méros* — доля, часть), быстрая обратимая структурная изомеризация; способные к таутомерии вещества при установившемся равновесии представляют собой смеси двух (или нескольких) взаимопревращающихся изомеров — **таутомеров**.
- Цитозин и аденин имеют при ароматическом гетероцикле аминную группу, а тимин и гуанин кетонную, следовательно есть возможность аминно-иминной кето-енольной таутомерии.

- Образующиеся в момент репликации редкие иминные и енольные формы оснований влекут за собой их ошибочное спаривание, а следовательно понижают точность работы ДНК-полимераз.





Разнообразие систем репарации

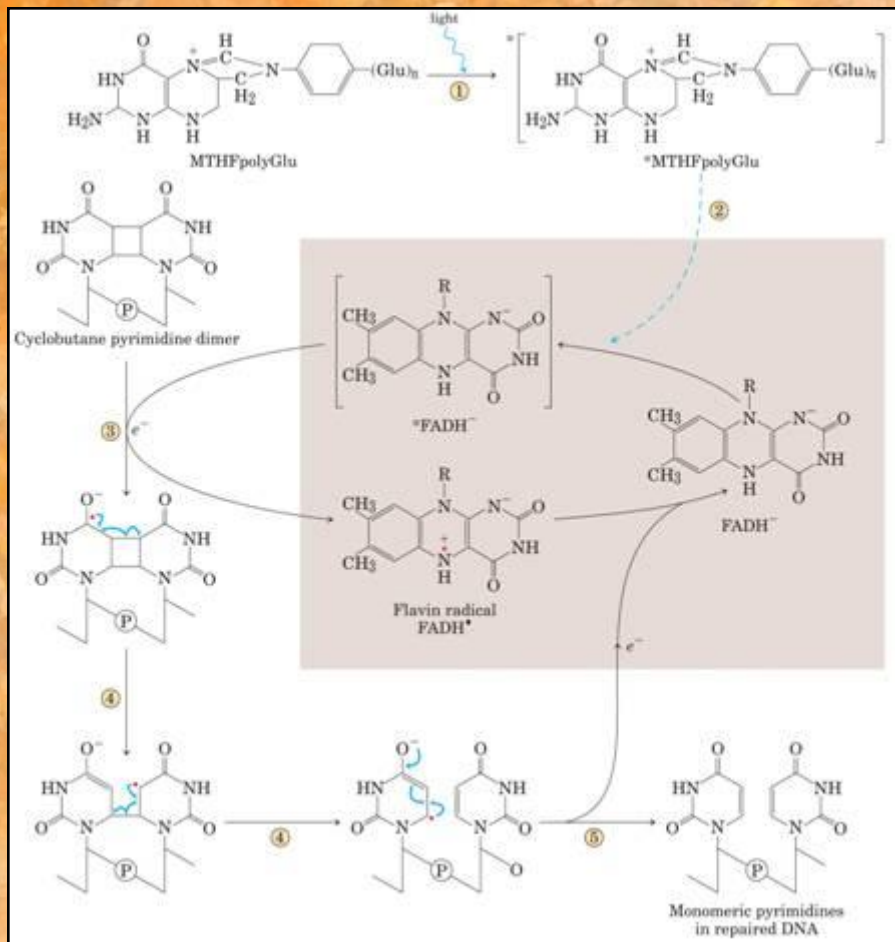
- Существует огромное количество самых различных систем репарации. Все эти системы появлялись в эволюции независимо, в различные её периоды.
- Один тип повреждений, как правило, репарируют несколько различных ферментативных систем, взаимно дополняя друг друга.
- К **прямой репарации** относят процессы в которых происходит узнавание и непосредственное восстановление какого-либо типа повреждений.
- К **непрямой репарации** (опосредованной) относят процессы более универсального характера, позволяющие исправлять широкий набор повреждений с помощью мультиферментных систем.

Разнообразие систем репарации

- **Прямая репарация:**
 - Фотореактивация.
 - Дезалкилирование модифицированных нуклеотидов.
 - Сшивание однонитевых разрывов.
 - Прямая вставка оснований в АП-сайт.
- **Непрямая репарация:**
 - Эксцизионная репарация ДНК путем удаления поврежденных азотистых оснований (BER).
 - Эксцизионная репарация ДНК путем удаления нуклеотидов (NER).
 - Репарация ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR).
 - Пострепликативная (рекомбинационная) репарация.
 - SOS-репарация.

Фотореактивация

- В фотолиазе есть участок, служащий светочувствительным центром, который способен адсорбировать фотоны.

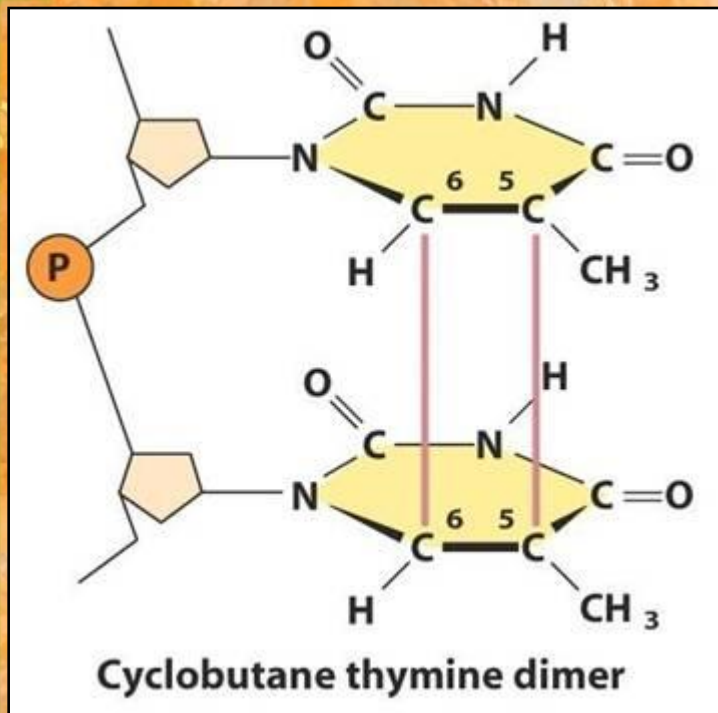


Метенилтетрагидрофолатное производное выполняет роль светоулавливающей антенны для квантов синего света ($\lambda=300-500$ нм).

Энергия возбужденного квантом света фолата передается на FADH⁻ в активный центр фермента.

Возбужденный флавин отдает электрон пиридиновому димеру, который в результате этого превращается в нестабильный свободный радикал, распадающийся с образованием двух свободных пиридиновых оснований.

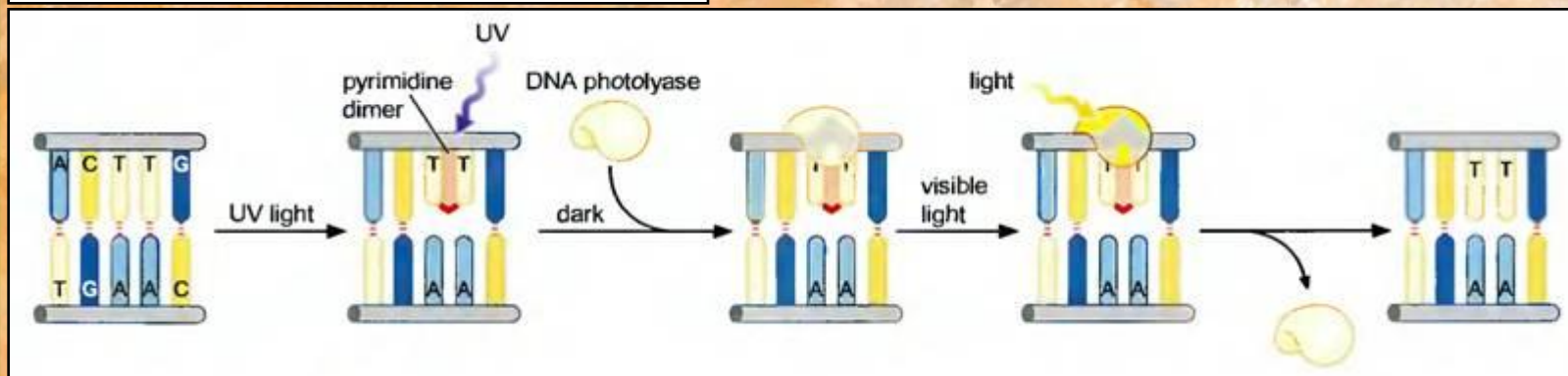
Фотореактивация



Система ферментативной фотореактивации ДНК (photoreactivation – PHR), основным компонентом которой является ДНК-фотолиаза, разделяет пиримидиновые димеры, превращая их в нормальные пиримидиновые основания.

Фотолиаза непосредственно взаимодействует с поврежденным участком ДНК.

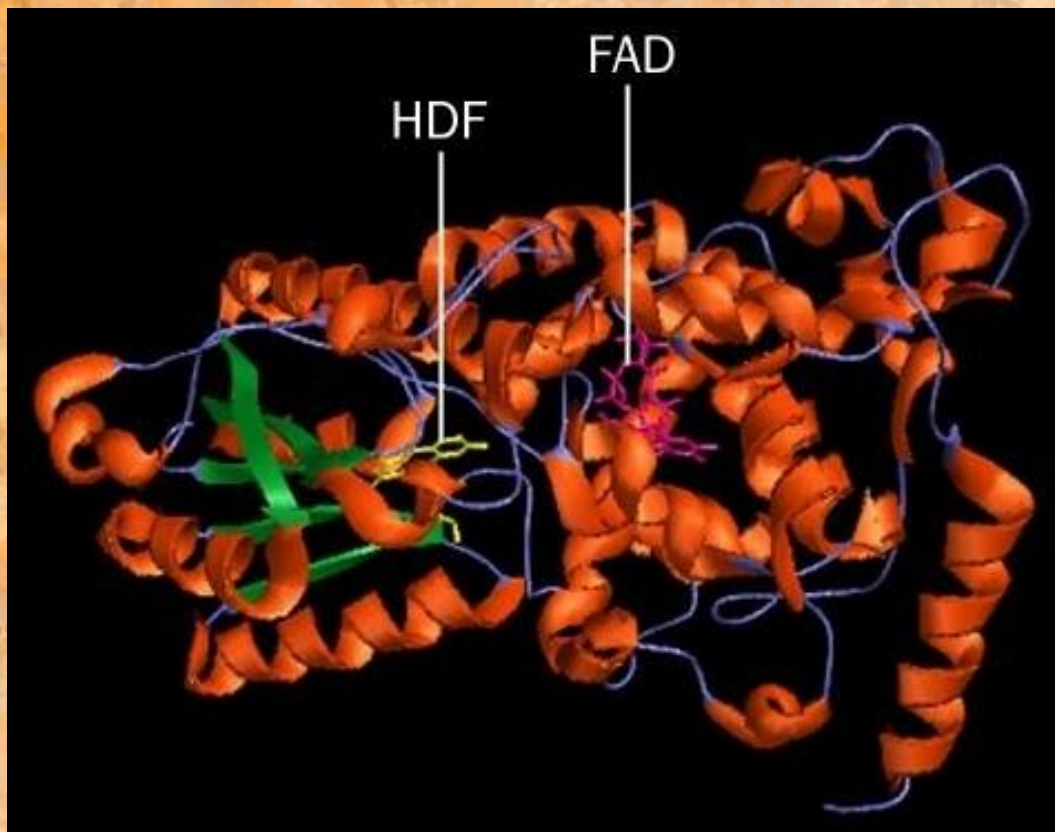
Видимый свет абсолютно необходим для работы фотолиазы.



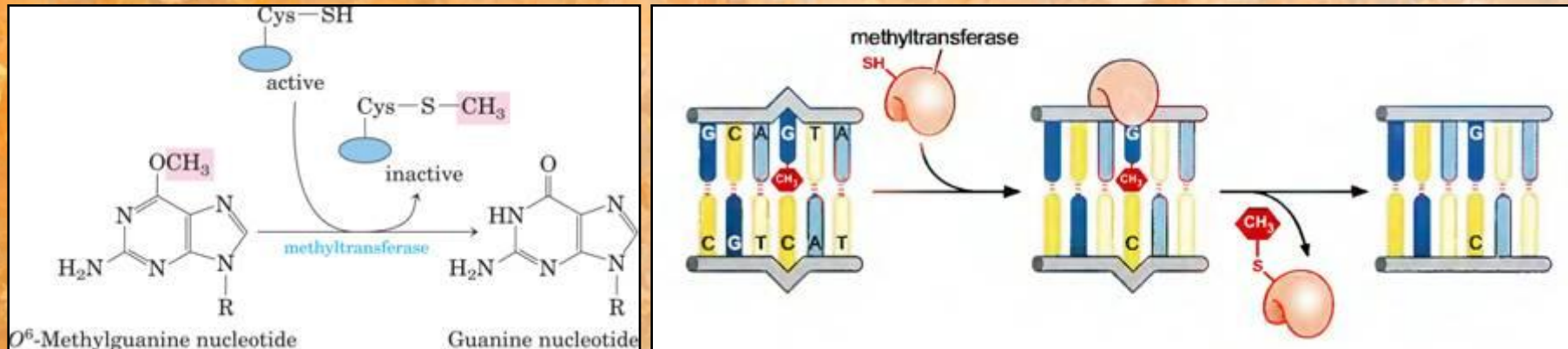
Структура фотолиазы

Фотолиаза содержит два кофактора: светоулавливающий метенилтетрагидрофолат (HDF) и генерирующий свободные радикалы FADH⁻.

Оба они надежно заключены внутрь белковой глобулы, которая выполняет функции поддержания свободных радикалов и селективного отбора субстратов.

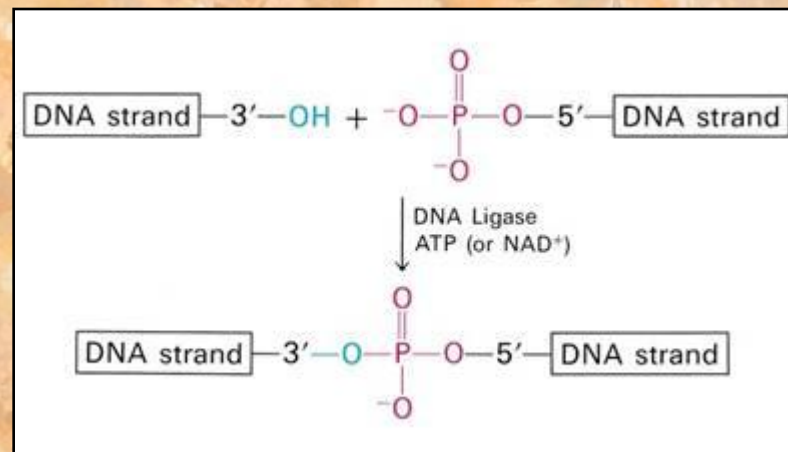
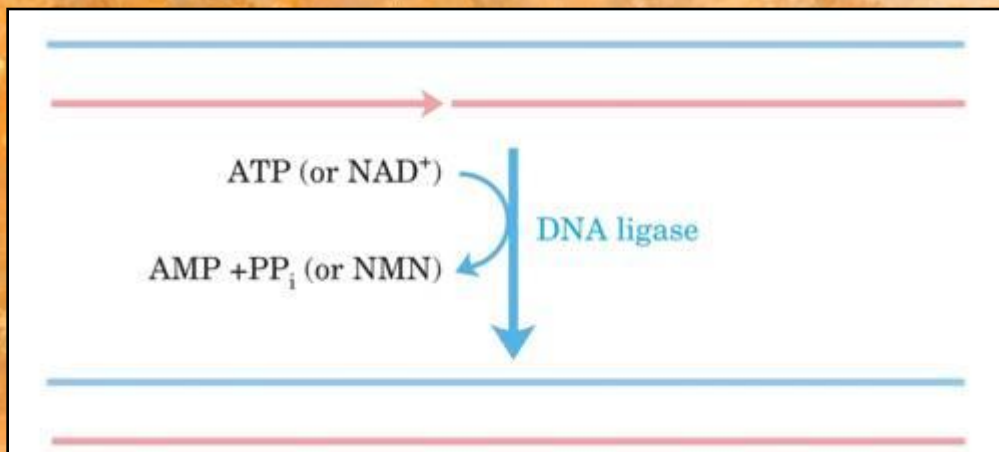


Репарация алкилированных оснований



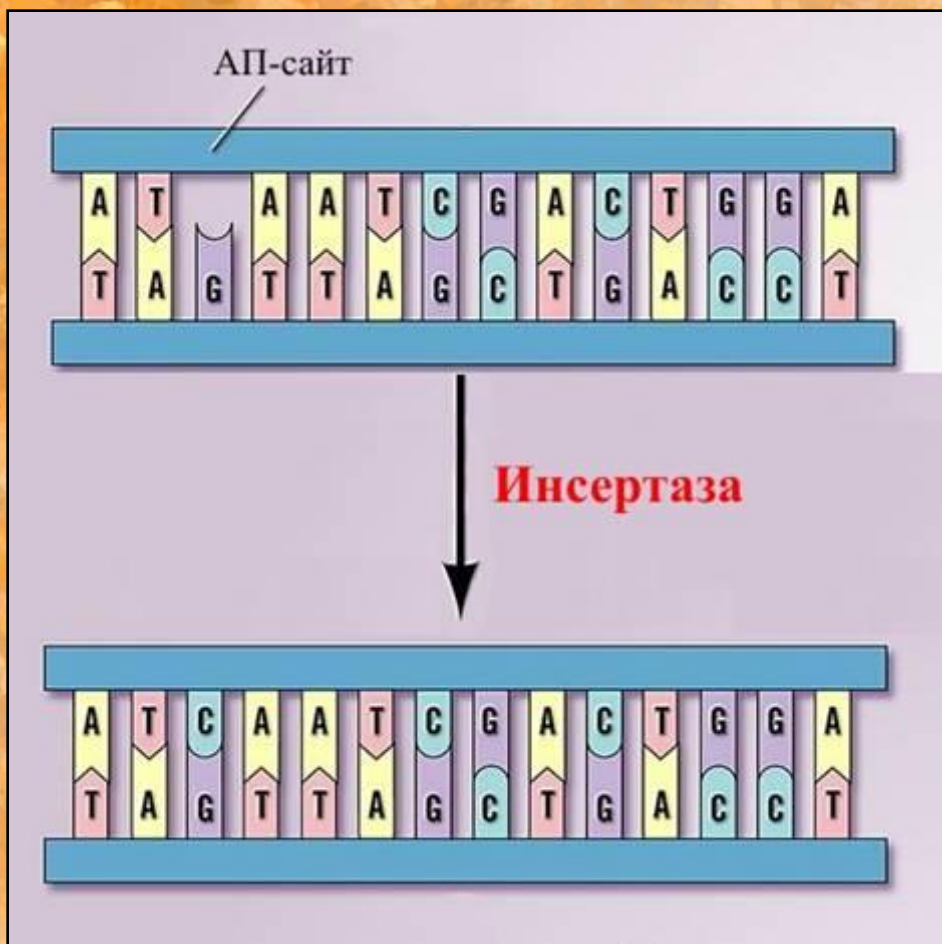
- В клетках синтезируются белки метилтрансферазы, которые могут захватывать метильные группы от модифицированного основания и благодаря этому восстанавливать исходную структуру ДНК.
- Важно отметить, что метилтрансфераза, захватив метильную группу, не может от нее освободиться. Тем самым в прямом смысле эти белки не ферменты, так как последние не изменяются в ходе реакций.
- Внутри клетки метилтрансфераз накапливается несколько тысяч, чтобы обеспечить нужды репарации: по одной молекуле уходит на одно повреждение.

Сшивание однонитевых разрывов:



- Этот тип реакций прямой репарации был обнаружен для однонитевых разрывов ДНК, индуцируемых ионизирующим излучением.
- При этом с помощью фермента ДНК - полинуклеотидлигазы (от англ. *ligase* - соединять, связывать) происходит прямое воссоединение разорванных концов в молекуле ДНК.

Вставка оснований в АП-сайт



Ковалентная связь между основанием и сахаром (β -гликозидная связь) может рваться. Тогда в молекуле ДНК на месте этих оснований образуется брешь, названная АП-сайтом.

Описаны ферменты, названные инсеразами (от англ, insert - вставлять), которые могут вставлять в брешь такое же основание, какое было до поражения, и соединять его с дезоксирибозой.

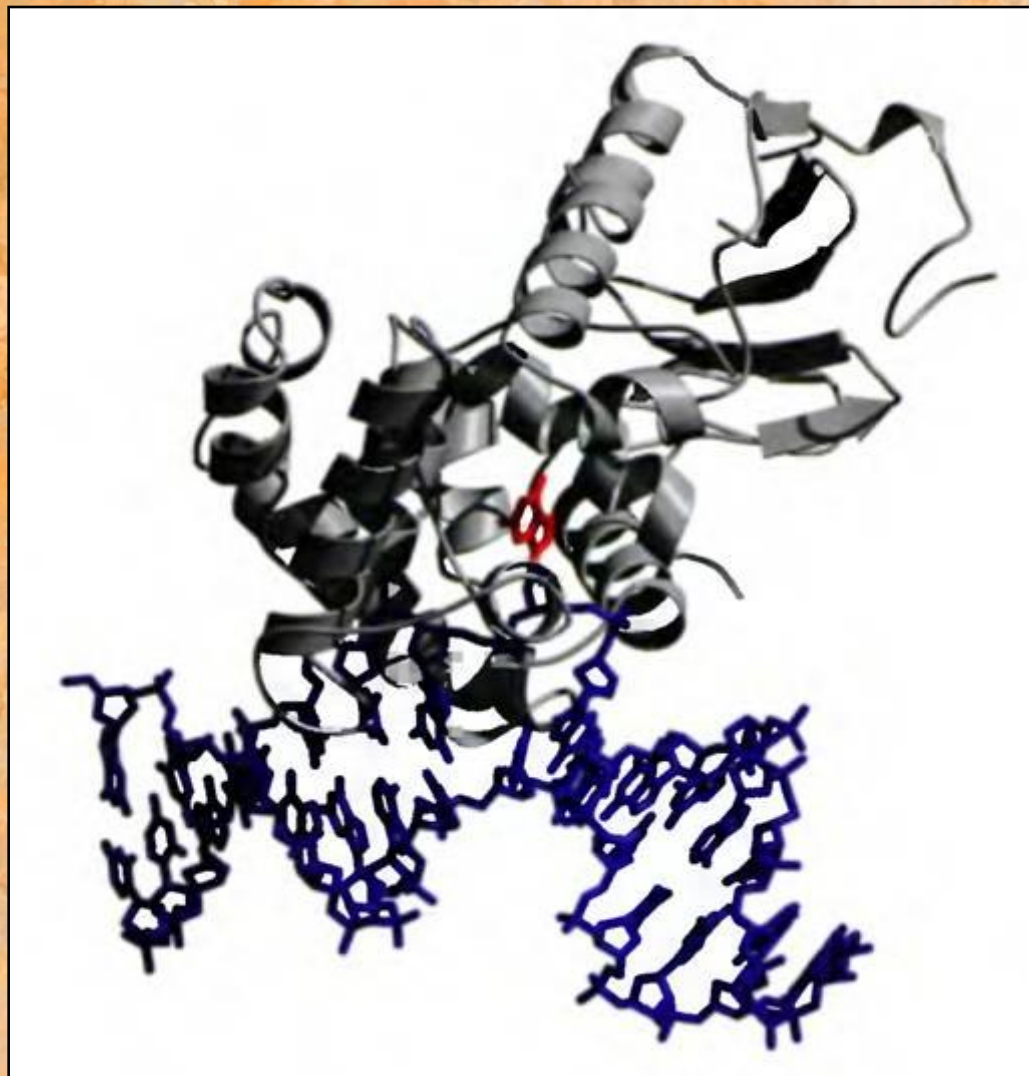
Структура ДНК приобретает исходный неповрежденный вид.

**Эксцизионная репарация ДНК
путем удаления
поврежденных азотистых
оснований (BER)**

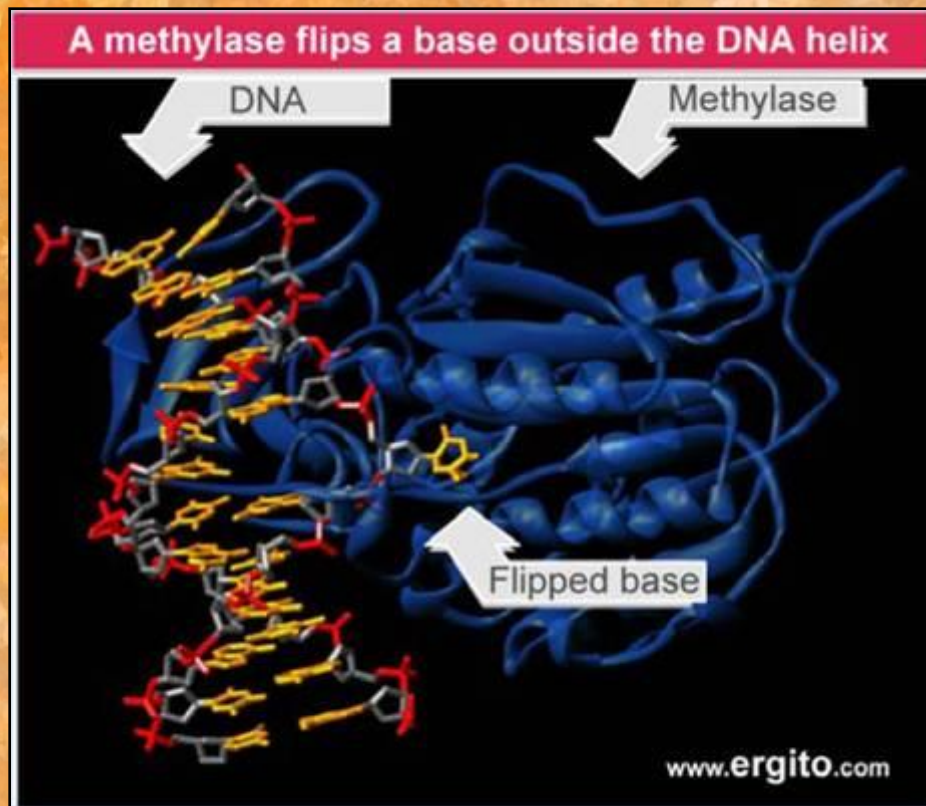
Разнообразие гликозилаз

Фермент	Субстрат	Продукт реакции
Ura-ДНК гликозилаза	ДНК, содержащая урацил	Урацил + АП-сайт
Hmu-ДНК гликозилаза	ДНК, содержащая оксиметилурацил	Оксиметилурацил + АП-сайт
5-mC-ДНК гликозилаза	ДНК, содержащая 5-метилцитозин	5-метилурацил + АП-сайт
Hx-ДНК гликозилаза	ДНК, содержащая гипоксантин	Гипоксантин + АП-сайт
ДНК гликозилаза тиминового мисмэтча	ДНК, содержащая ошибочную пару оснований Г-Т (Г-Т-мисмэтч)	Тимин + АП-сайт
MutY-ДНК гликозилаза	ДНК, содержащая ошибочную пару оснований Г-А (Г-А-мисмэтч)	Аденин + АП-сайт
3-mA-ДНК гликозилаза I	ДНК, содержащая 3-метиладенин	3-метиладенин + АП-сайт
3-mA-ДНК гликозилаза II	ДНК, содержащая 3-метиладенин, 7-метилгуанин или 3-метилгуанин	3-метиладенин, 7-метилгуанин или 3-метилгуанин + АП-сайт
FaPy-ДНК гликозилаза	ДНК, содержащая остатки формаимидо-пиримидинов или 8-оксигуанин	2,6-диамино-4-окси-5-N-метилформаимидо-пиримидин или 8-оксигуанин + АП-сайт
5,6-НТ-ДНК гликозилаза (эндонуклеаза III)	ДНК, содержащая 5,6-гидратированные остатки тимина	5,6-дигидроксигидротимин или 5,6-дигидротимин
PD-ДНК гликозилаза	ДНК, содержащая димеры пиримидинов	Пиримидиновые димеры с гидролизованными 5'-гликозидными связями + АП-сайты

Структура гликозилаз



Механизм работы гликозилаз

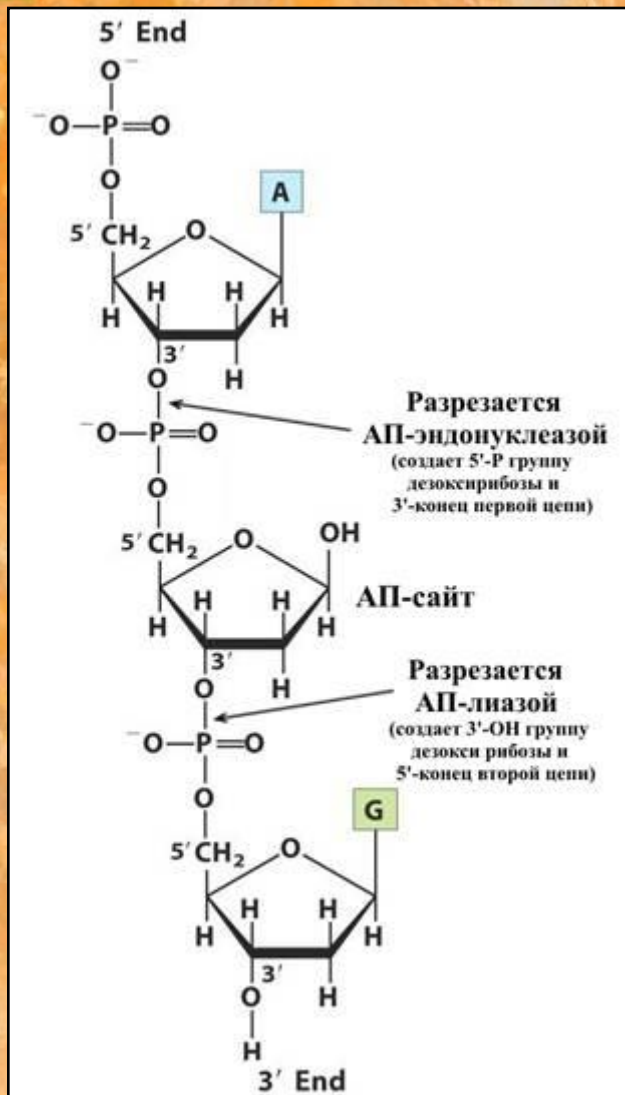


Механизм связывания поврежденного основания гликозилазой имеет много сходных моментов с механизмом захвата метилазами своих субстратов.

Метилаза выворачивает модифицируемое основание из цепи наружу от фосфодиэфирного остова молекулы. Это вывернутое основание входит в особую щель фермента, где расположен его активный центр, в котором на него переносится метильная группа.

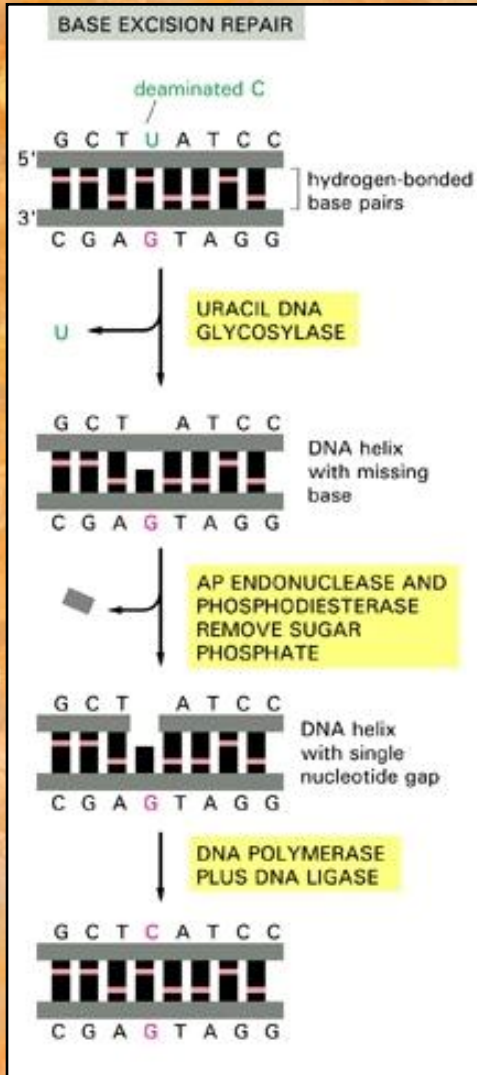
Затем модифицированное основание возвращается обратно в цепь. Все описанные выше реакции не требуют дополнительного притока энергии.

Base excision repair – BER



- Гликозилазы присоединяются модифицированным основаниям и гидролизуют β -N- гликозидные связи между основанием и сахаром дезоксирибозой, за счет чего образуется AP-сайт.
- Образовавшаяся AP-дезоксирибоза далее вырезается с помощью AP-лиазы, которая освобождает ее 3'-конец, и AP-эндонуклеазы, гидролизующей ее 5'-концевую фосфодиэфирную связь в AP-сайте.

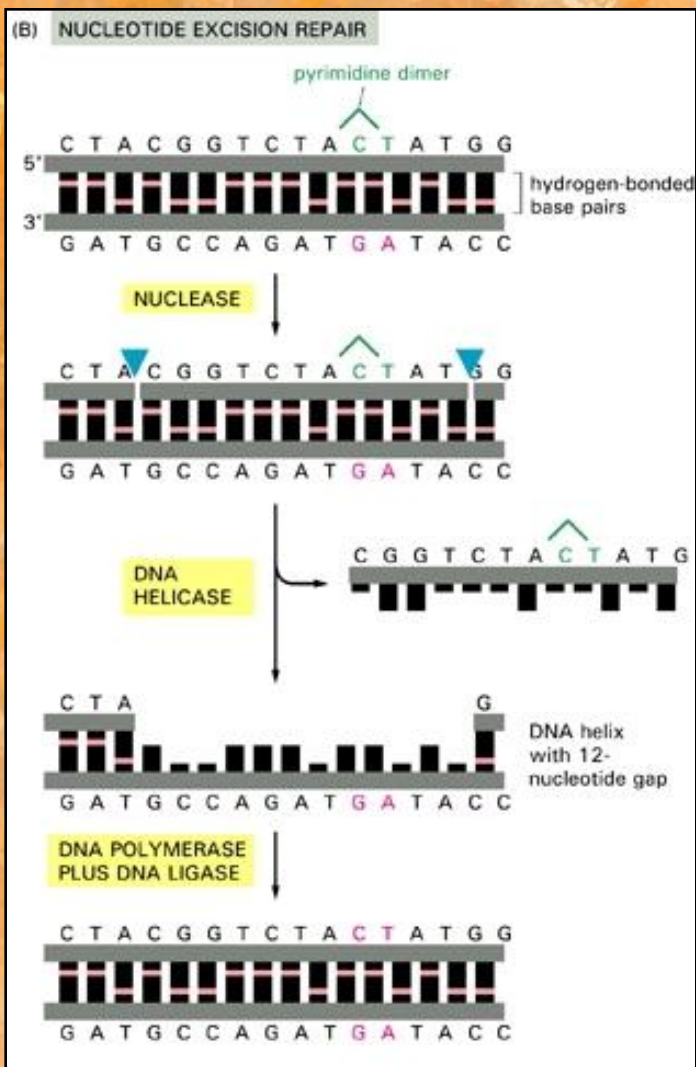
Base excision repair – BER



- Появившаяся брешь в одной цепи ДНК размером в один нуклеотид застраивается с участием фермента ДНК - полимеразы I. Она вставляет в брешь комплементарный ему нуклеотид, присоединяя его к свободному 3 'ОН-концу.
- Для соединения одноцепочечного разрыва в фосфодиэфирном остове вступает в действие еще один фермент — ДНК-лигаза.

**Экцизионная репарация ДНК
путем удаления нуклеотидов
(NER)**

Nucleotide excision repair – NER



Если в системе BER происходит удаление отдельных поврежденных азотистых оснований ДНК путем разрыва соответствующих N-гликозид-ных связей между азотистыми основаниями и остатками дезоксирибозы, то в системе NER поврежденные азотистые основания вырезаются в составе олигонуклеотидов.

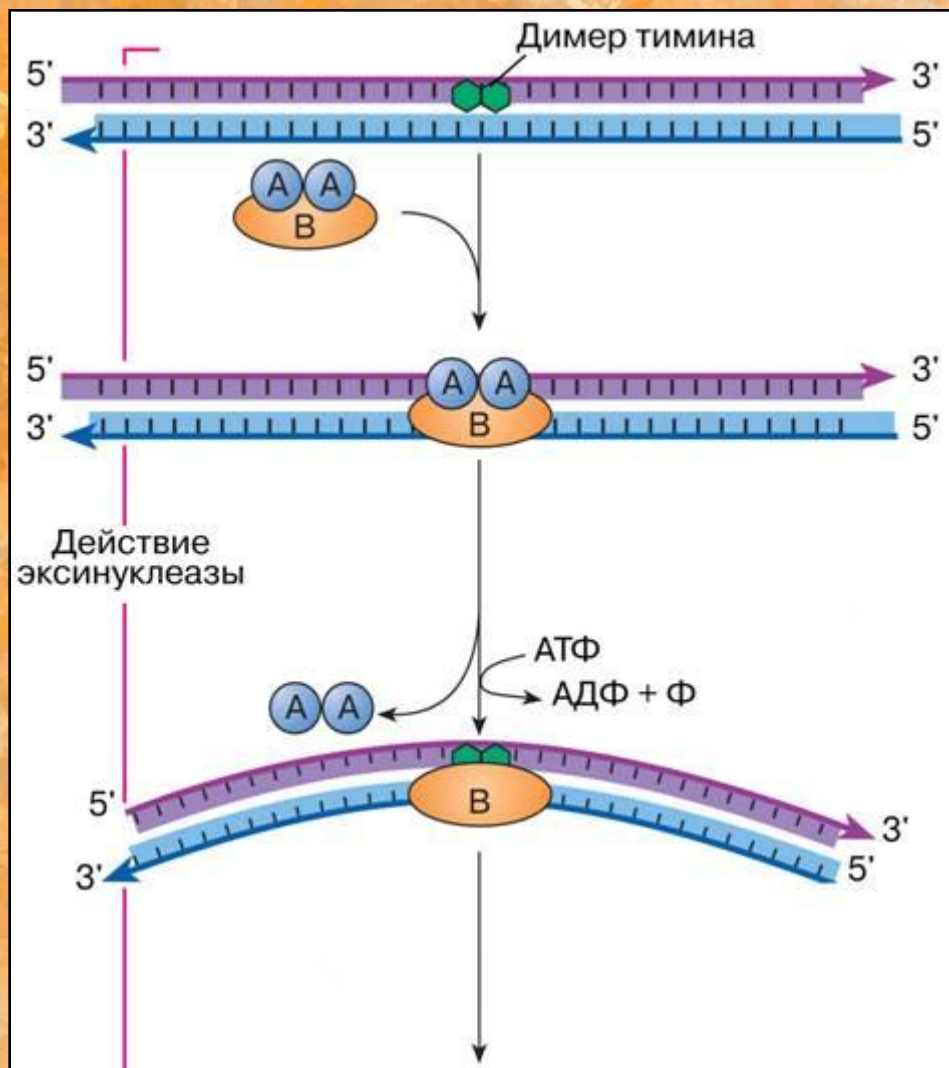
Процесс NER условно можно разделить на четыре этапа:

1. Распознавание поврежденного участка ДНК;
2. Двойное надрезание (инцизия) цепи ДНК по обеим сторонам поврежденного участка и его удаление (эксцизия);
3. Заполнение бреши в процессе репаративного синтеза;
4. Лигирование оставшегося одноцепочечного разрыва ДНК.

Nucleotide excision repair – NER

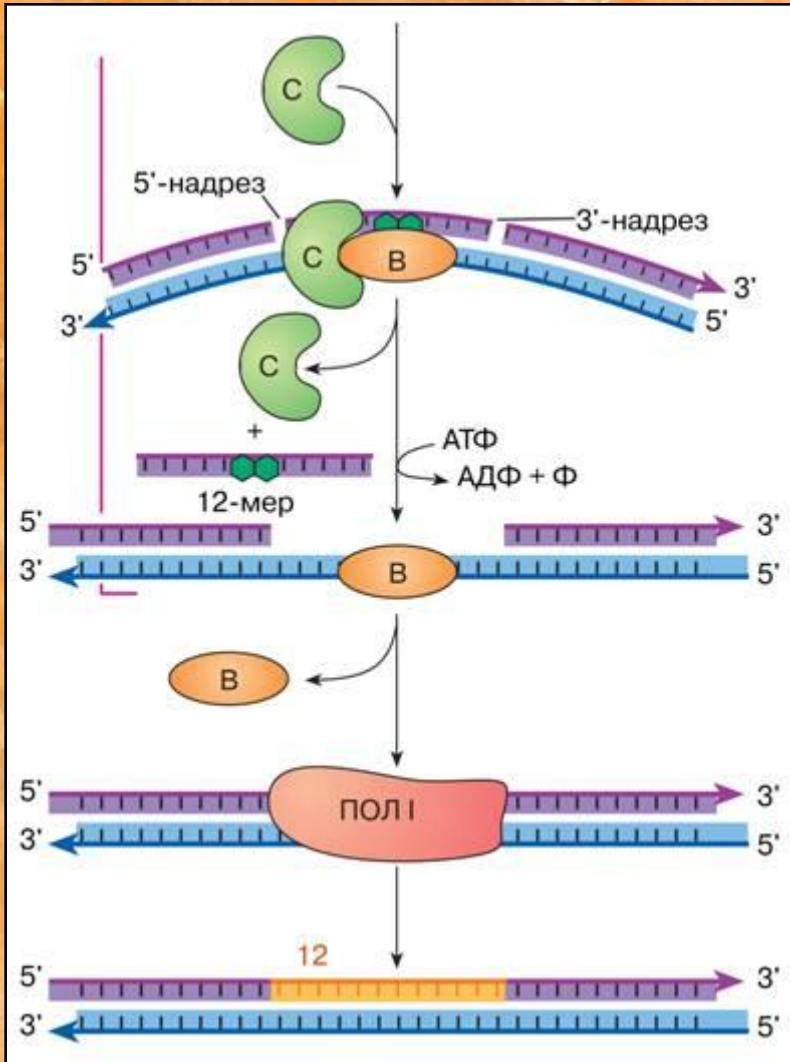
- В отличие от **BER**, субстратами системы **NER** являются не только поврежденные (модифицированные) основания, но и одиночные ошибочно спаренные нуклеотиды, а также петли длиной в 1–3 нуклеотида.
- Но в отличие от системы **MMR**, удаляющей неправильно спаренные основания, **NER** не может идентифицировать, нуклеотид какой цепи ДНК оказывается правильным. В результате происходит вырезание неспаренных нуклеотидов из любой цепи случайным образом.
- Главными участниками **NER** в клетках *E. coli* (но не у человека) является мультиферментный комплекс, содержащий эндонуклеазы, кодируемые тремя генами: **uvrA**, **uvrB** и **uvrC** (названия генов даны по первым буквам слов *ultra violet repair*).
- Комплекс получил название "эксинуклеаза".

Механизм работы



- Белковые ножницы, содержащие две копии белка UvrA и одну копию UvrB, узнают поврежденный участок и присоединяются к нему.
- Энергия АТФ используется, чтобы изогнуть молекулу ДНК и изменить конформацию белка UvrB; димер UvrA отсоединяется.

Механизм работы



- Белок UvrC присоединяется к комплексу UvrB – ДНК; белок UvrB делает 3'-надрез, а UvrC вносит 5'-надрез вблизи повреждения.
- UvrD хеликаза отсоединяет вырезанный олигомер.
- ДНК-полимераза I замещает UvrB белок и застраивает образовавшуюся брешь, комплементарно противоположной нити.
- ДНК лигаза соединяет свободные концы, оставленные полимеразой.

Различия NER у про- и эукариот

1. Гены **NER** у *E. coli* **uvrA**, **uvrB** и **uvrC** не обнаруживают гомологии с соответствующими генами млекопитающих и дрожжей.
2. В универсальном механизме эксцизионной репарации как прокариоты, так и эукариоты гидролизуют 3–5-ю фосфодиэфирную связь с 3'-конца от повреждения. При этом прокариоты гидролизуют также 8-ю связь от 5'-конца измененного нуклеотида, тогда как у эукариотических организмов происходит одноцепочечный разрыв на расстоянии 21–25 нуклеотидов от повреждения со стороны его 5'-конца. Таким образом, прокариоты удаляют измененный нуклеотид в составе 12–13-членных олигомеров, тогда как эукариоты – в составе одноцепочечных фрагментов ДНК длиной в 27–29 нуклеотидов.
3. Млекопитающим требуется в среднем в четыре раза больше ферментов репарации, чем бактериям (эксинуклеаза состоит по крайней мере из 17 белков).

Подавление **NER** ведет к резкому увеличению числа мутаций хромосом, замедлению роста и развития организмов, и к другим нежелательным последствиям.

Репарация ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR)

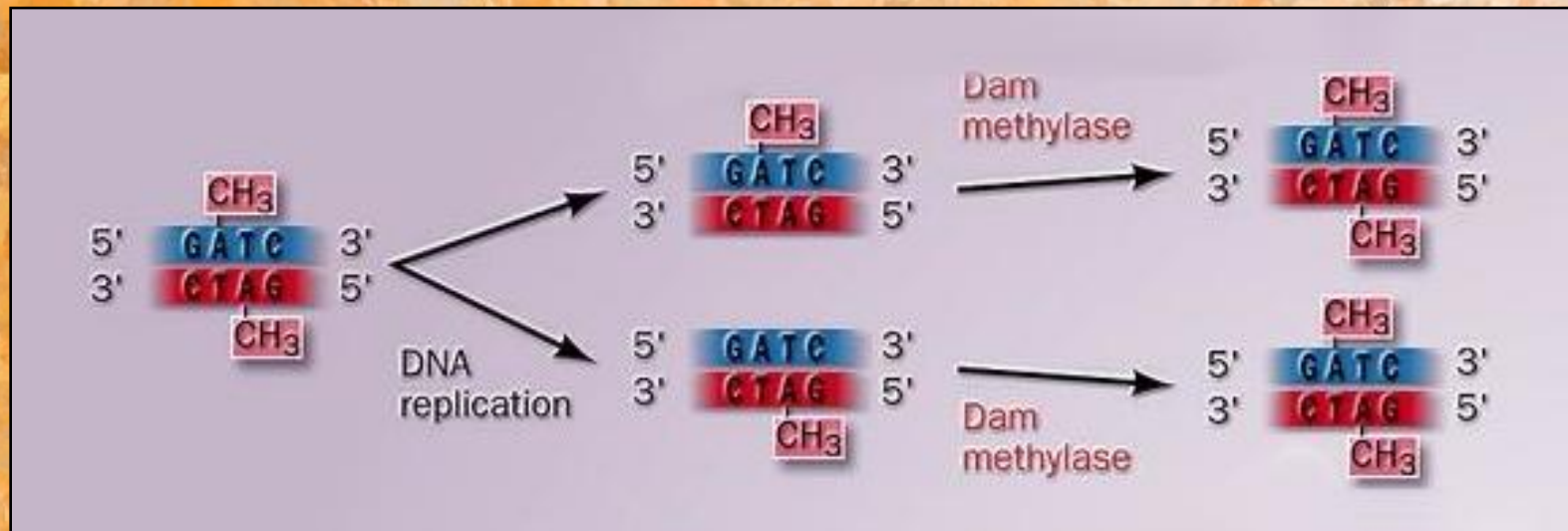
Mismatch repair - MMR

- В отличие от **NER**, так же удаляющей неправильно спаренные основания, **MMR** может идентифицировать нуклеотид какой цепи ДНК является правильным (способна обнаруживать матрицу для репарации).
- Субстратами системы **MMR** у *E. coli*, использующей белки MutHLS являются все некоплементарные пары оснований за исключением C–C, а также небольшие вставки в одну из цепей ДНК, длина которых не превышает четырех нуклеотидов.

Система MMR выполняет в клетке несколько важных функций:

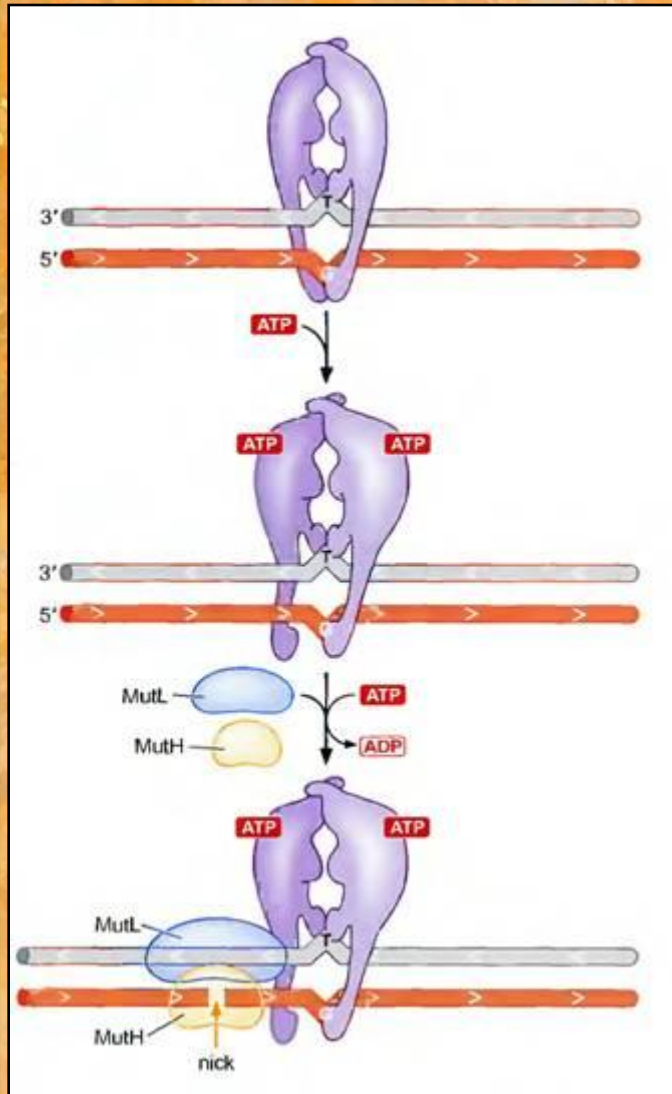
1. Исправляет ошибки репликации ДНК, меняя ошибочно включенные нуклеотиды.
2. Обеспечивает гомологичную рекомбинацию между дивергировавшими последовательностями ДНК, посредством процессинга промежуточных продуктов рекомбинации.
3. Обеспечивает задержку клеточного цикла в ответ на повреждения ДНК.

Метилирование матричных цепей



- Обычно у *E. coli* ДНК метилирована Dam-метилазой по сайтам GATC. После завершения репликации вновь синтезированная дочерняя цепь ДНК некоторое время остается неметилированной. Система MutHLS избирательно репарирует дочернюю цепь ДНК, тем самым значительно повышая точность репликации.
- Если сайты **GATC** полностью метилированы, MutHLS-система репарации *E. coli* изменяет ошибочно спаренные нуклеотиды в обеих цепях ДНК с одинаковой эффективностью.
- Использование Dam-метилазы для распознавания дочерней цепи реплицировавшейся ДНК является уникальным свойством грамотрицательных бактерий. У грамположительных бактерий не происходит метилирование цепей ДНК в целях маркировки.

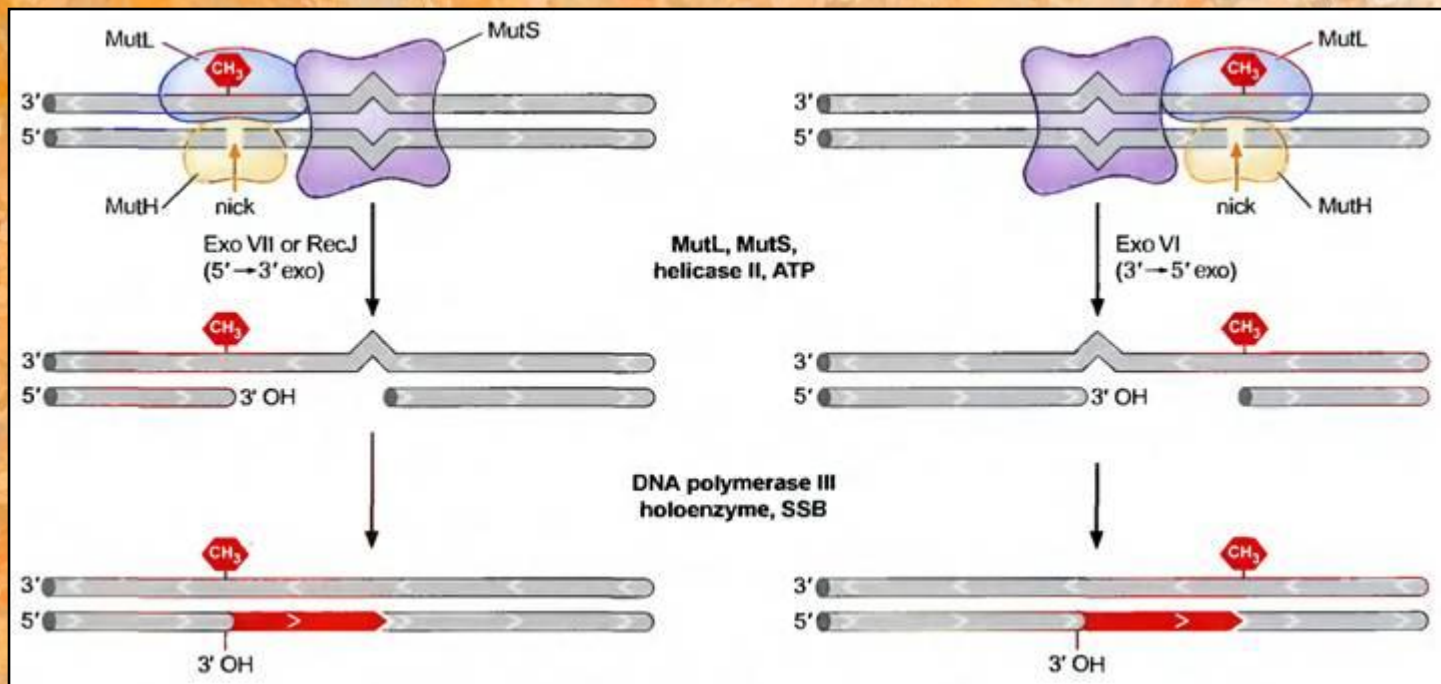
Механизм работы



На начальных этапах система MMR задействует белковые продукты четырех генов: **mutH**, **mutL**, **mutS** и **uvrD** (**mutU**):

1. **Белок MutS** распознает повреждение и связывается с ошибочно спаренными нуклеотидами в виде гомодимера.
2. С каждым мономером MutS связывается **белок MutL**, не обнаруживающий ферментативной активности, но абсолютно необходимый для присоединения и **активации** другого белка – MutH.
3. **Белок MutH** – эндонуклеаза, способная находить участок **GATC** и предпочтительно вносить одноцепочечный разрыв в неметилованную цепь вблизи аденина последовательности GATC.

Механизм работы



- После полной сборки комплекса MutHLS, активации эндонуклеазной активности MutH и внесения разрывов в GATC-сайты дочерней цепи, происходит **экзонуклеазное выщепление** участка поврежденной цепи от первичного разрыва до мисмэтча.
 - Надрезы могут быть внесены как с 5'-, так и с 3'-стороны относительно неправильно включенного в дочернюю цепь нуклеотида.
- Затем в обоих случаях бреши должны быть застроены **ДНК-полимеразой**, а концы воссоединены с помощью **ДНК-лигазы**.

Другие системы

У *E. coli* существуют два других специфических пути репарации ошибочно спаренных нуклеотидов:

- **Система VSP** (very short patch repair pathway) репарирует некомплементарные пары G–T, заменяя их на G–C. Считается, что такие пары образуются в результате дезаминирования 5-метилцитозина в сайтах, где остатки C метилированы Dcm-метиلاзой.
- **MutY-система** репарации специфически ликвидирует последствия окислительных повреждений гуанина. Если dGTP окисляется с образованием 8-оксо-dGTP и остается в составе ДНК неотрепарированным, в следующем раунде репликации он спаривается с А, и в итоге может произойти трансверсия G–C→T–A. В этом случае белок MutY действует как ДНК-гликозилаза, удаляющая остаток А из некорректной пары, и как AP-лиаза, вносящая одноцепочечный разрыв по соседству с AP-сайтом.

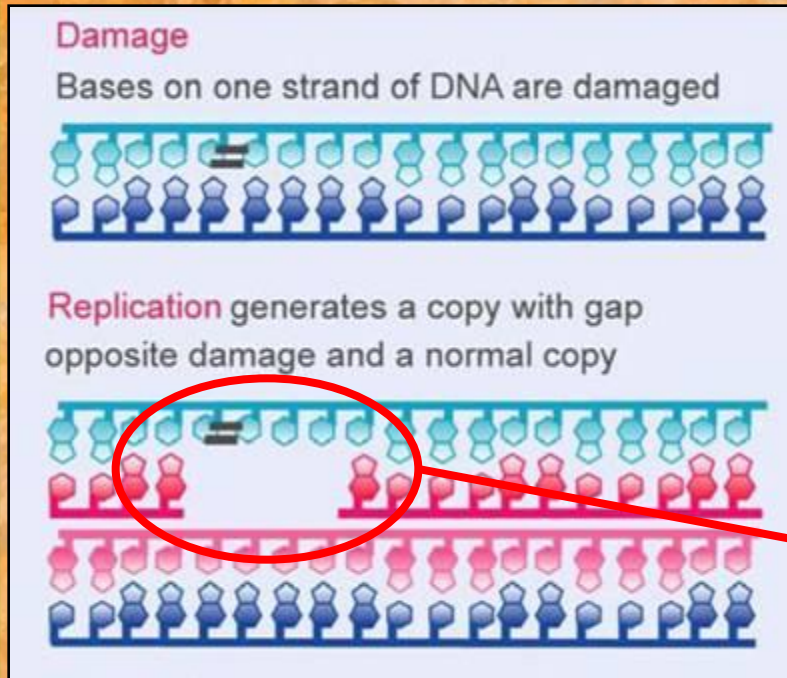
Пострепликативная (рекомбинационная) репарация

Рекомбинационная репарация

- Быстро делящиеся бактериальные клетки, содержащие несколько репликонов, образованных недореплицированными хромосомами, более устойчивы к действию ионизирующей радиации, которая индуцирует двухцепочечные разрывы ДНК, чем клетки с небольшим числом репликонов, находящиеся в стационарной фазе.
- Это может объясняться тем, что для эффективного исправления повреждений, вызываемых ионизирующей радиацией, необходимо одновременное присутствие в клетке двух гомологичных молекул ДНК.

Рекомбинационная репарация

Рекомбинационная репарация необходима в случае, когда повреждены обе цепи ДНК, что может быть результатом:



1. Наличия повреждений в ДНК, которые не были устранены до начала раунда репликации. Работа ДНК – полимеразы в таких участках будет затруднена. Полимераза может перепрыгивать через различно поврежденные основания в матричной цепи и возобновлять репликацию, оставляя за собой незаполненные нуклеотидами бреши. В результате образуется дуплекс с поврежденным основанием и протяженной одноцепочечной брешью в комплементарной цепи.
2. Действия сильной ионизирующей радиации, индуцирующей двухцепочечные разрывы ДНК.

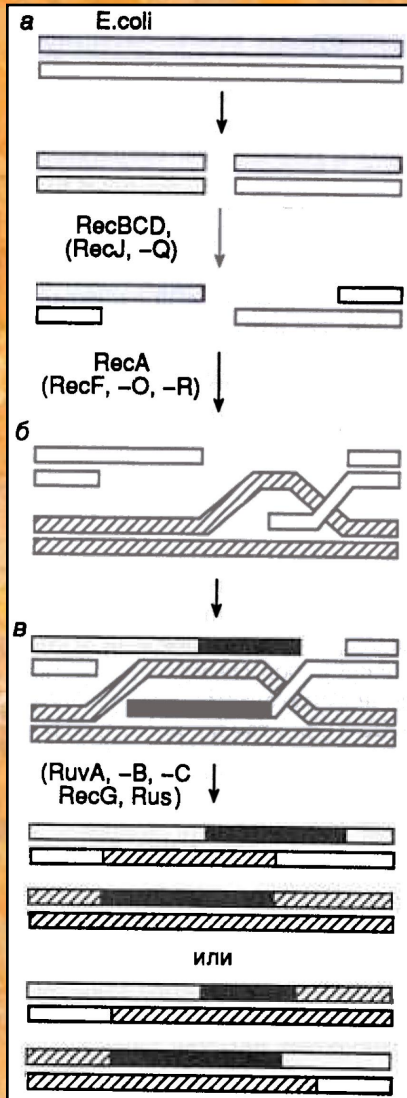
Рекомбинационная репарация



Второй дуплекс ДНК, полученный в результате репликации, не содержит в себе разрывов или модифицированных оснований.

Поврежденный дуплекс является **гомологичным** к ДНК второго дуплекса, не содержащего повреждений. Таким образом для репарации необходимо осуществить **одноцепочечный обмен** между неповрежденным донорным дуплексом и разорванным акцепторным. В результате брешь в поврежденном дуплексе будет заполнена последовательностью из донорного дуплекса, а поврежденное основание будет репарировано.

Механизм процесса

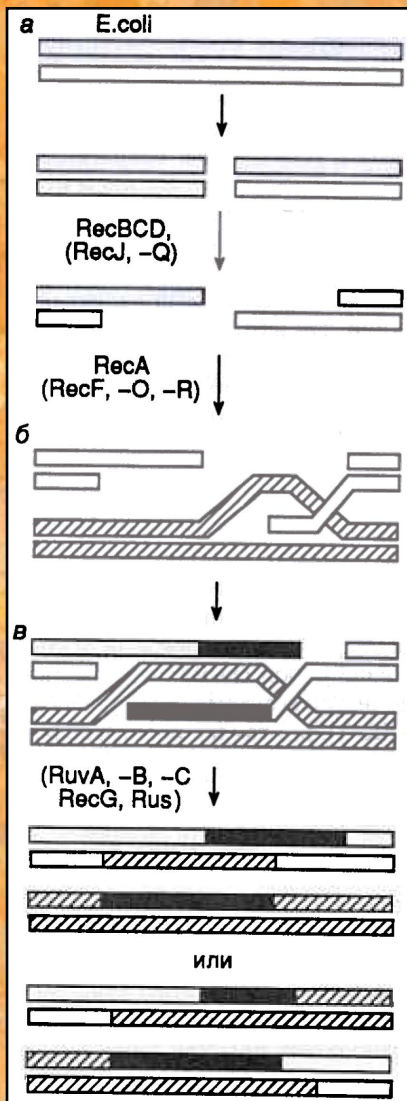


Главный этап рекомбинационной репарации заключается в **активации генов rec**, участвующих так же и в процессе гомологичной рекомбинации.

Процесс репарации условно разделяют на три фазы:

1. В **пресинаптической фазе** репарации происходит внесение двухцепочечного разрыва в ДНК и осуществляется нуклеазное расщепление концов разрыва. В создании одноцепочечных 3'-ОН-выступающих концов ДНК в месте разрыва принимает участие белок **RecBCD**, который обладает как хеликазной, так и экзонуклеазной активностями. **RecBCD** расплетает двухцепочечную молекулу ДНК в месте разрыва и гидролизует одну из цепей в направлении 5'→3', оставляя выступающий одноцепочечный участок.

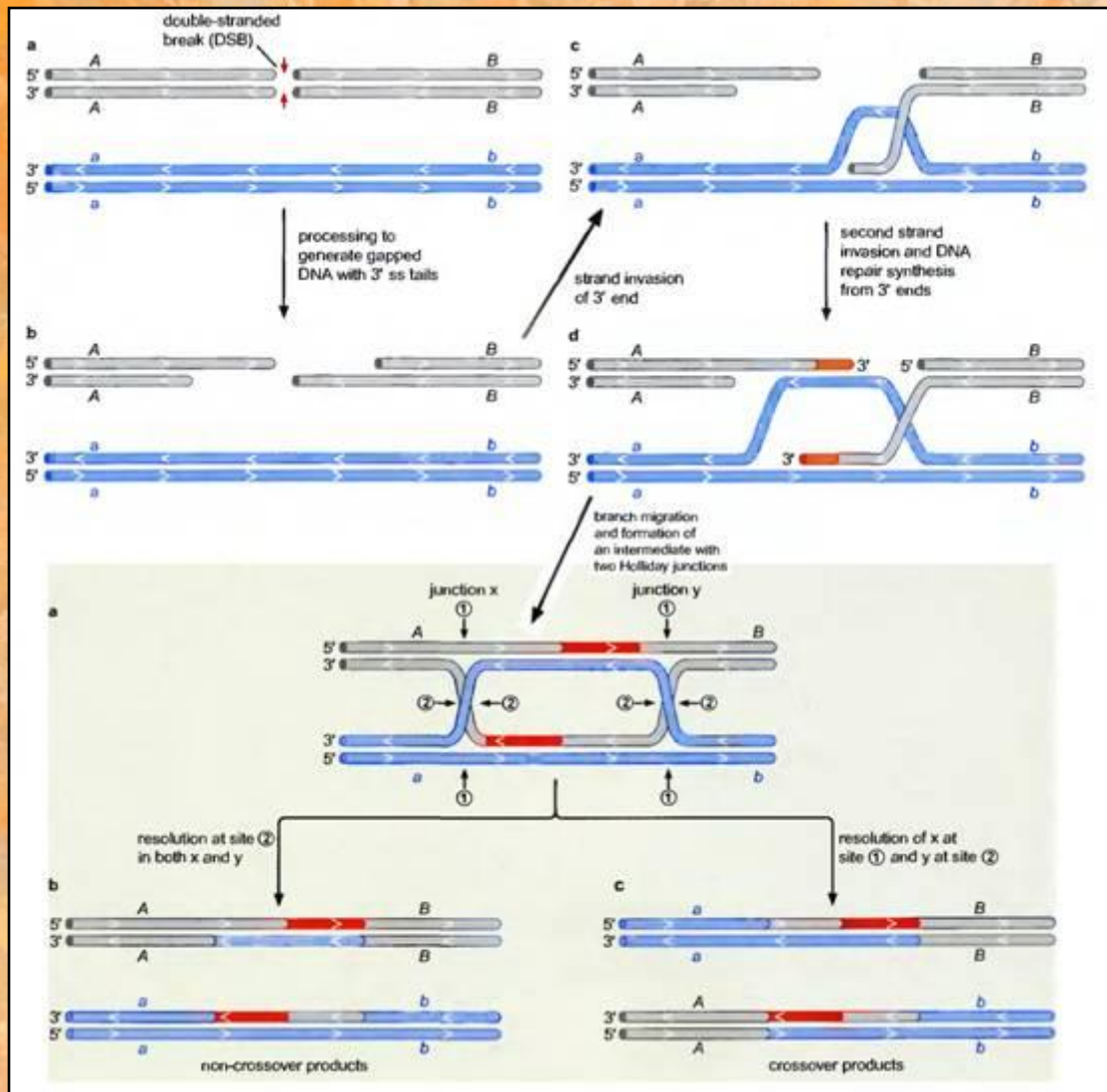
Механизм процесса



2. В **синаптической фазе** наблюдается синапсис гомологичных участков двух молекул ДНК с вхождением комплементарного одноцепочечного участка в ДНК-дуплекс и последующим репаративным синтезом ДНК. Поиск гомологичных участков и обмен цепями, необходимые для рекомбинации, происходят с участием белка **RecA**.
3. В **постсинаптической фазе** репарации образовавшиеся структуры Холидея разделяются с помощью белков **RuvA, -B и -C, RecG**, а также белков SOS-системы репарации (**RecN, UvrD, RecF и RecJ**).

Многие продукты генов *E. coli* и дрожжей, участвующие в рекомбинационной репарации повреждений ДНК, имеют гомологи у животных и человека.

Рекомбинационная репарация



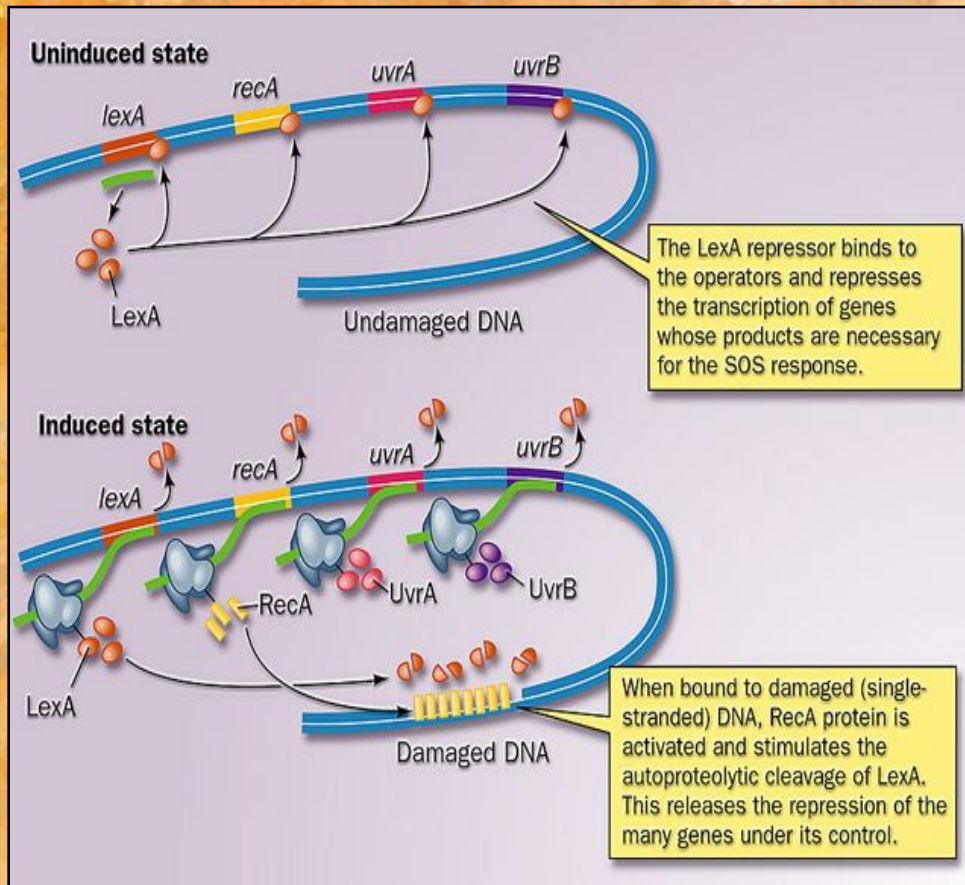
Часть 3

SOS-репарация и SOS-мутагенез

SOS-репарация

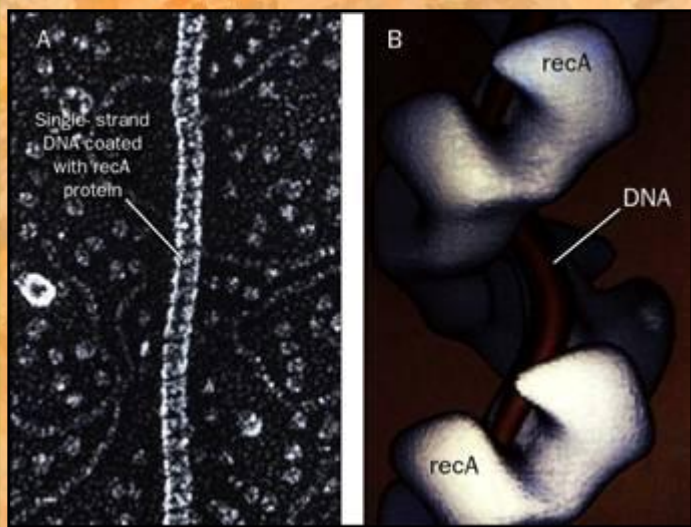
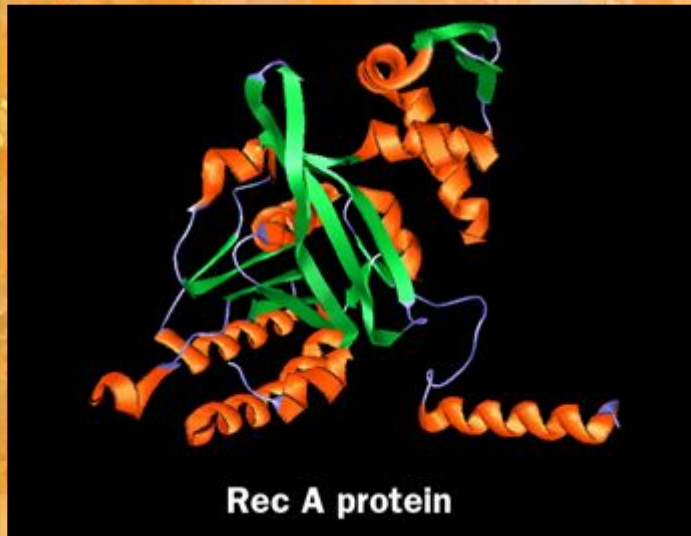
- В клетках организма, подвергнутого сильному мутагенному воздействию, образование мутаций происходит в основном по механизму **SOS-мутагенеза**.
- **SOS-мутагенез** дает возможность микроорганизмам преодолевать летальное действие повреждений ДНК, которые блокируют репликацию ДНК и с которыми не справляется обычная репаративная система (например одноцепочечные бреши, в которых сохранившаяся цепь не содержит азотистых оснований).
- Основной принцип **SOS-репарации** заключается в преднамеренном введении ошибок ДНК-полимеразами в процессе репликации на последовательностях, содержащих различные повреждения.
- В индукции SOS-репарации у *E. coli* определяющую роль играют два гена: **lexA** и **recA**.

Индукция SOS-репарации



- Белок LexA является репрессором гена *recA* и более 20 других генов и оперонов, составляющих **SOS-регулон**.
1. В ответ на повреждение ДНК или ингибирование репликации, при остановке ДНК-полимеразы на поврежденном участке ДНК, вырабатывается внутриклеточный **SOS-сигнал**.
 2. В результате индукции SOS-сигнала белок **recA** связывается с одноцепочечными участками ДНК содержащими повреждения и в ходе конформационного перехода обратимо превращается в активированную форму RecA*.

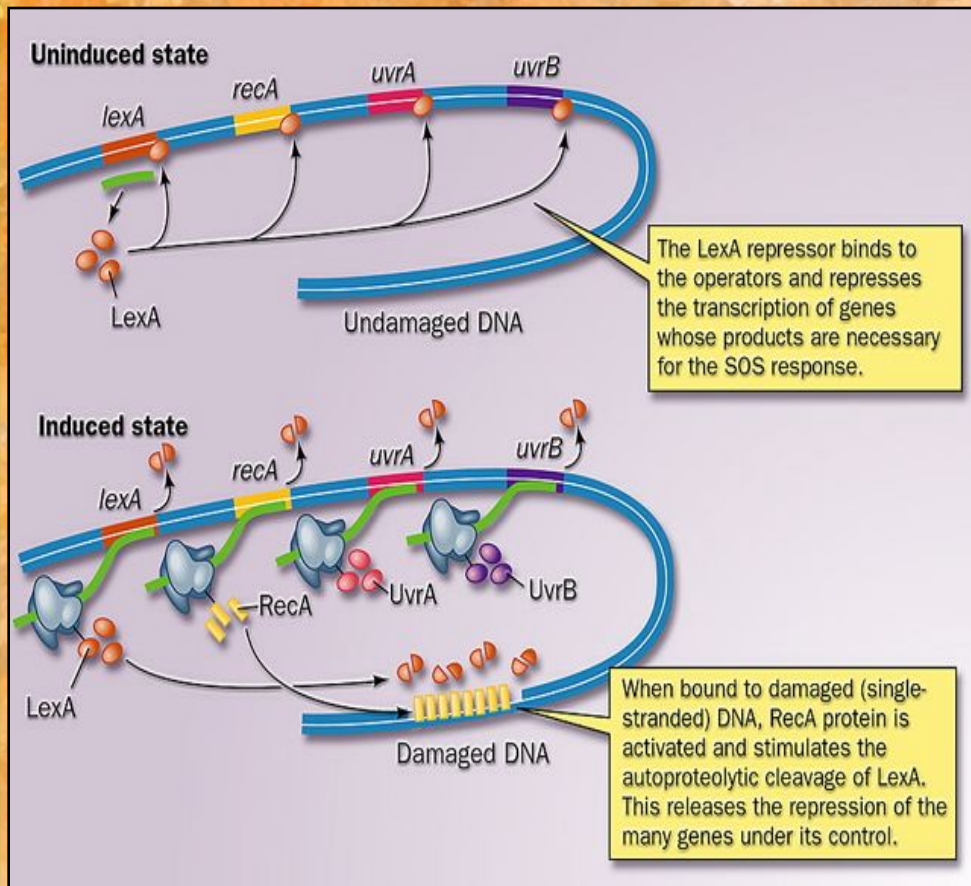
Активация белка RecA



Точно еще не выяснено как индукции SOS-сигнала, как и его природа, влияет на связывание белка **recA** с одноцепочечными участками ДНК содержащими повреждения. Это обусловлено огромным разнообразием повреждений, которые индуцируют SOS-ответ. Возможны различные предположения:

- RecA может активироваться некоторыми общими интермедиатами метаболизма ДНК.
- Сигналом к активации может служить некоторая малая молекула, высвобождающаяся из ДНК при повреждении, или некоторая структура, которую формирует ДНК.

Индукция SOS-репарации



3. Молекулы белка LexA взаимодействуют с RecA* в результате чего активируется скрытая до этого аутопротеолитическая активность белка LexA.
4. Полипептидной цепь LexA расщепляется вблизи середины, что инактивирует его как репрессор.
5. В результате происходит индукция LexA-зависимых генов SOS-регулона.

Основные термины

- **SOS-репарация (мутагенез)** – это согласованная индукция множества ферментов, включая ферменты репарации, в ответ на радиационные и другие повреждения ДНК.
- **SOS-бокс** – это последовательность ДНК длиной приблизительно 20 п.н. узнаваемая белком-репрессором LexA.
- Продукты экспрессии многих генов системы SOS-ответа участвуют в различных репарационных процессах.
- SOS-ответ заключается в резком возрастании способности клетки репарировать свой геном, за счет усиления синтеза различных компонентов систем рекомбинационной и эксцизионной репарации.

Индукция SOS-репарации

- Ключевыми белками, задействованными в процессе введения ошибок ДНК-полимеразой, являются продукты двух генов – umuD и umuC.
6. Они составляют единый umuCD-оперон, находящийся под контролем репрессора LexA, а следовательно входящий в состав SOS-регулона, активирующегося при наличии непреодолимых препятствии для репликации клеточной ДНК.
 7. Во время индукции SOS-ответа белок UmuD, подобно белку LexA, расщепляется по аутокаталитическому механизму, запускаемому при взаимодействии с RecA*.
 8. В результате образуется полипептид **UmuD'**, включающий С-концевые остатки UmuD. В клетке UmuD' существуют в виде гомодимеров, которые способны объединяться с белком UmuC, образуя комплекс $(UmuD')_2-UmuC$.

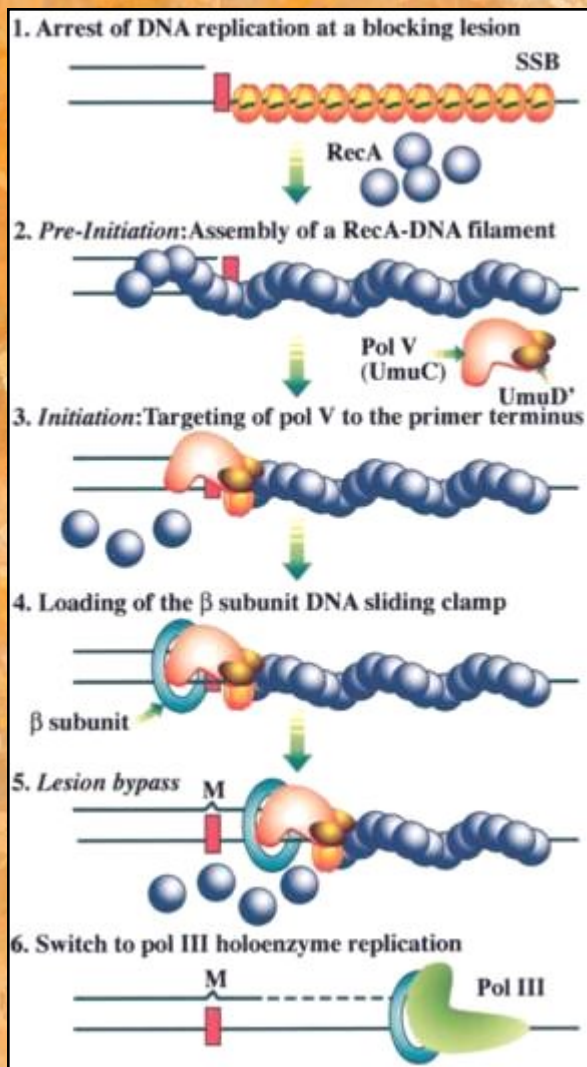
ДНК-полимераза 5

DNA polymerases in *E. coli*

I	<i>polA</i>	major repair enzyme
II	<i>polB</i>	minor repair enzyme
III	<i>polC</i>	replicase
IV	<i>dinB</i>	SOS repair
V	<i>umuD'₂C</i>	SOS repair

- Настоящая роль белкового комплекса $(UmuD')_2-UmuC$ в процессе SOS-репарации неизвестна. Существует две основных концепции:
1. Комплекс может изменять процессивность ДНК-полимеразы, подавлять ее корректирующую 3' → 5'-экзонуклеазную активность или изменять конформацию фермента на такую, при которой она начинает неадекватно оценивать пространственную структуру комплекса, образуемого с участием Уотсон-Криковских водородных связей между нуклеотидом матрицы и очередным входящим нуклеотидом.
 2. Установлено, что тример $(UmuD')_2-UmuC$ сам по себе обладает слабой ДНК-полимеразной активностью и, возможно, именно этот комплекс осуществляет синтез ДНК непосредственно в поврежденном участке в присутствии всех вышеупомянутых компонентов. В этой связи тример получил название ДНК-полимеразы V *E. coli*.

Индукция SOS-репарации



9. Когда репликаза (ДНК-полимераза 3) доходит до некоторого повреждения, например тиминового димера, она останавливается. Белок RecA участвует в формировании так называемых нуклеиново-белковых филаментов в местах одноцепочечных брешей на поврежденной ДНК.
10. С этими филаментами могут соединяться белки UmuD' и UmuC в составе активного комплекса. Предполагают, что в результате такого взаимодействия комплекс $(UmuD')_2-UmuC$ осуществляет переключение репаративного синтеза ДНК с нужд гомологичной рекомбинации на SOS-мутагенез.
11. После привлечения комплекса $(UmuD')_2-UmuC$ к месту повреждения, он вытесняет кор-фермент ДНК-полимеразы 3 и занимает его место, начиная полимеризацию случайных нуклеотидов на поврежденной матрице.
12. Фактически такая ДНК-полимераза 5 использует большинство вспомогательных субъединиц ДНК-полимеразы 3.

Функции белка RecA

Таким образом белок RecA играет ключевую роль в индукции SOS-репарации, выполняя следующие важные функции:

1. Взаимодействует с белком LexA, в результате чего он расщепляется и теряет свои репрессорные свойства, тем самым запуская SOS-ответ
2. Взаимодействует с белком UmuD, в результате чего он расщепляется и приобретает способность взаимодействовать с белком UmuC с образованием активного комплекса $(UmuD')_2-UmuC$.
3. Участвует в формировании нуклеиново-белковых филаментов в местах одноцепочечных брешей на поврежденной ДНК, привлекая на них активный $(UmuD')_2-UmuC$, который осуществляет неточный синтез ДНК, в виде ДНК-полимеразы 5.

ДНК-полимераза 4

DNA polymerases in *E. coli*

I	<i>polA</i>	major repair enzyme
II	<i>polB</i>	minor repair enzyme
III	<i>polC</i>	replicase
IV	<i>dinB</i>	SOS repair
V	<i>umuD₂C</i>	SOS repair

ДНК-полимераза IV *E. coli*, кодируемая геном *dinB*, также участвует в SOS-ответе бактерий:

- Она не обладает 3'→5'-экзонуклеазной активностью и способна включать нуклеотиды в строящуюся цепь ДНК по высокодистрибутивному механизму. При каждом контакте фермента с субстратом и гибридом праймер–матрица к праймеру присоединяется единственный нуклеотид.
- Если во время репликации участков ДНК с простыми повторяющимися последовательностями в результате их повреждения происходит включение неправильно спаренного нуклеотида с последующим проскальзыванием 3'-конца строящейся цепи ДНК и образованием мутации со сдвигом рамки считывания, то происходит задержка репликативного комплекса и его диссоциация. В этих условиях синтез ДНК может быть продолжен ДНК-полимеразой IV, которая путем внесения дополнительных мутаций может исправить первоначальный сдвиг рамки.
- ДНК-полимеразы IV и V являются членами большого семейства, включающего в себя эукариотические ДНК-полимеразы, которые так или иначе причастны к репарации повреждений ДНК.

Окончание SOS-репарации

- После того, как весь геном был успешно реплицирован, путем введения мутации в последовательности, которые блокировали продвижение репликативной вилки, клетка имеет возможность быстро вернуться из состояния SOS-ответа к нормальному функционированию.
- При исчезновении индуцирующего SOS-ответ сигнала, белок RecA резко теряет способность дестабилизировать LexA.
- В результате LexA будет экспрессироваться на высоком уровне, быстро накапливаться в нерасщепленной форме и связываться с SOS-боксом, ингибируя SOS-репарацию.

Вырезание профагов

Активация RecA так же может являться причиной расщепления и других репрессорных белков, например репрессоров лизогенных профагов (фаг λ):

- Это объясняет почему вырезание фага λ из бактериального генома может быть индуцировано ультрафиолетовым светом.
- Лизогенный репрессор расщепляется и тем самым позволяет фагу встать на литический путь.
- Выживание вируса несомненно выше при литическом пути, когда происходит вырезание профага из бактериального генома и образование дочерних фагов, которые могут заражать не поврежденные клетки.
- Профаги, не участвующие в реакциях SOS-ответа, тем не менее могут реагировать на повышение концентрации активного RecA в клетке, используя это как сигнал к вырезанию из бактериального генома.

Рекомендуемая литература

- **Л.И. Патрушев** Экспрессия генов, 2000.
- **М.Сингер, П.Берг** Гены и геномы, 1998.
- **В. Н. Сойфер** Репарация генетических повреждений, СОЖ №8, 1997.
- **Ф.Айала, Дж.Кайгер** Современная генетика, в 3-х томах, 1987.
- **Watson et al.** Molecular biology of the gen, 5th edition, 2004.
- **Alberts et al.** Molecular biology of the cell, from <http://www.dnathink.org>
- **Lewin** Genes 8th edition, update 2002.
- **Leninger** Principles of Biochemistry, 4th edition, 2004.
- **Z. Livneh** DNA Damage Control by Novel DNA Polymerases: Translesion Replication and Mutagenesis JBC Vol. 276, pp. 25639–25642, 2001.