

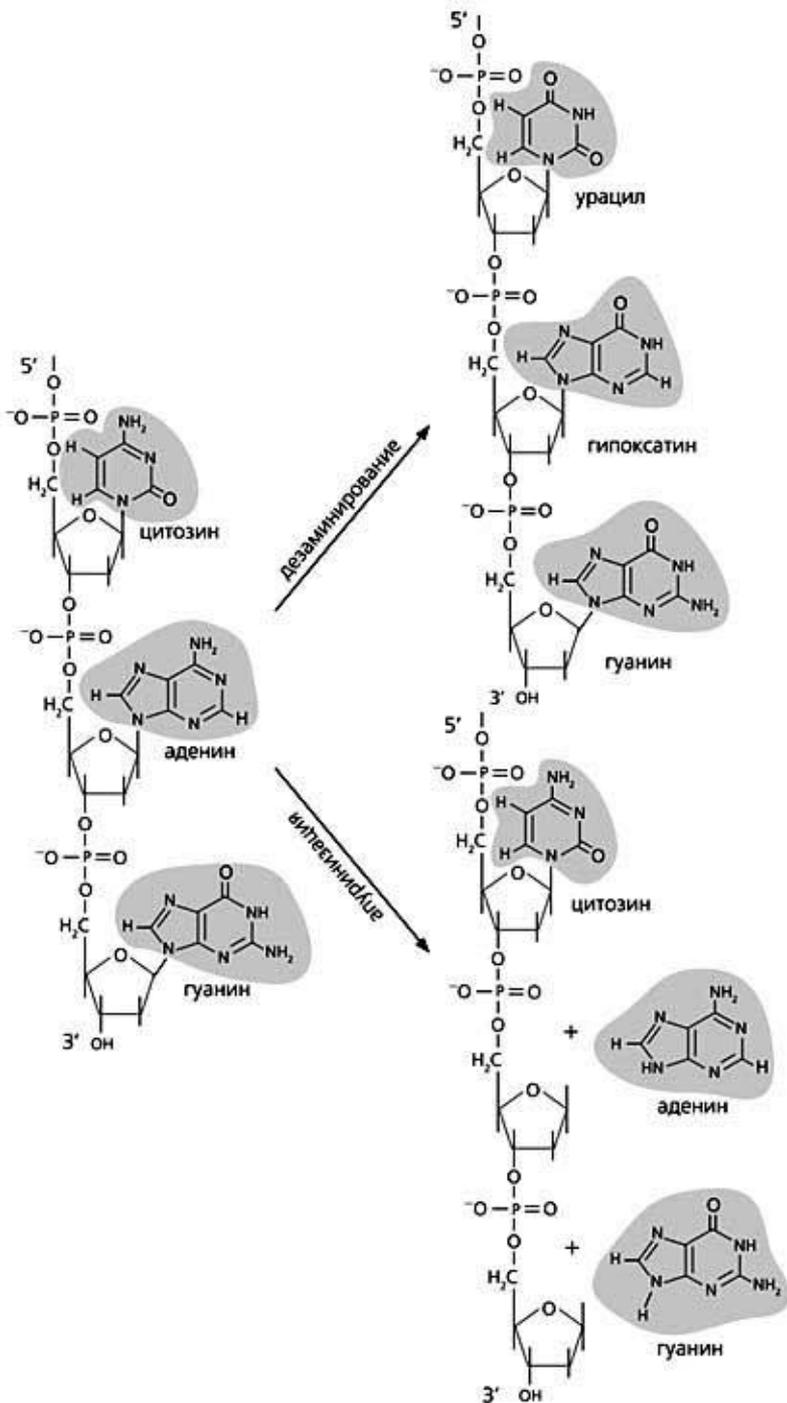
# РЕПАРАЦИЯ ДНК

# Агенты повреждающие ДНК

- Излучение
  - ионизирующая радиация (гамма лучи, рентгеновские лучи)*
  - ультрафиолетовое излучение (особенно ~260 нм, именно в этой области происходит максимальное поглощение ДНК)*
- Активные радикалы кислорода, образуемые во время нормального клеточного дыхания в различных биохимических путях
- Химические вещества окружающей среды
- Многие углеводороды
- Химикаты используемые в противоопухолевой химиотерапии.

# Типы повреждения ДНК

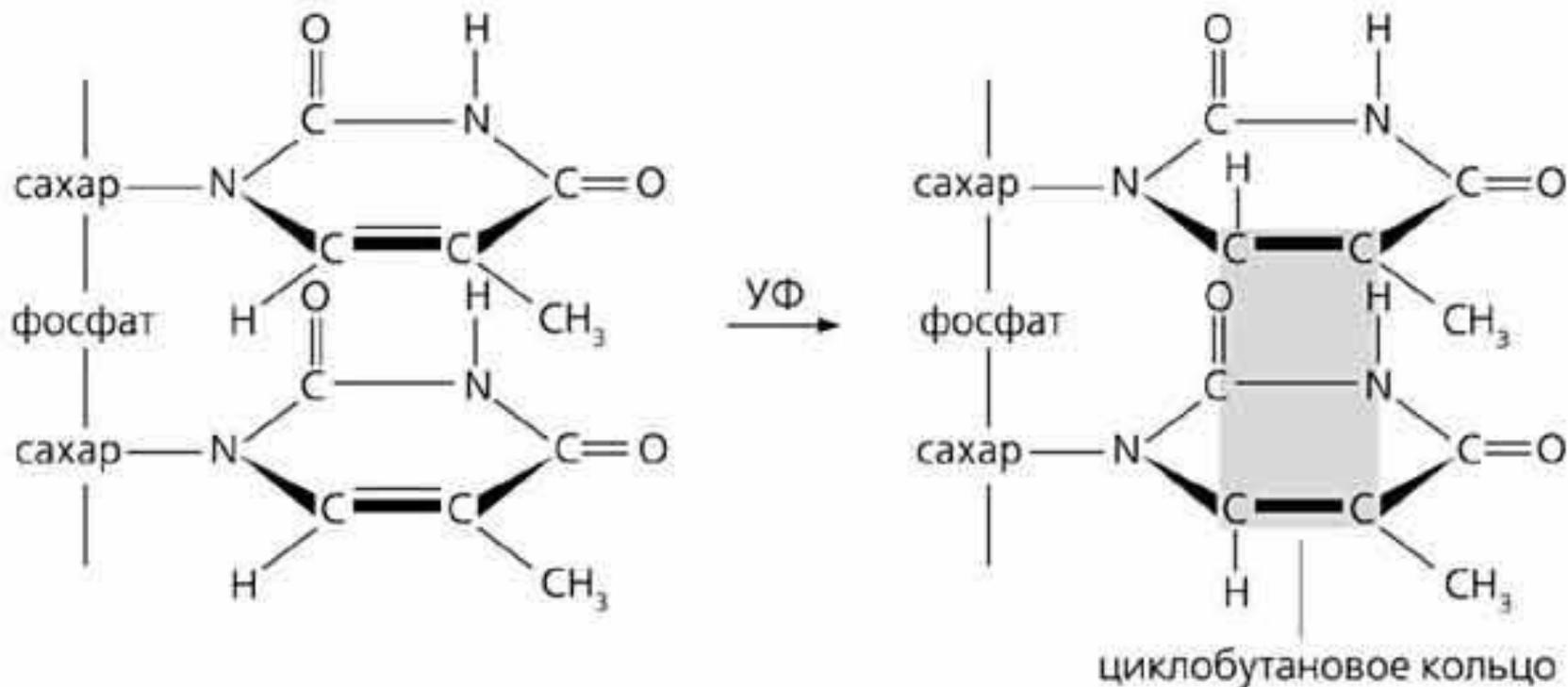
1. Изменение одного основания
2. Апуринизация
3. Замена С на У
4. Замена А на гипоксантин
5. Алкилирование основания
6. Вставка или делеция нуклеотида
7. Встраивание аналогичного основания
8. Изменение двух оснований
9. Образование тиминовых димеров
10. Поперечная связь с бифункциональным алкилирующим агентом
11. Разрушение цепи
12. Радиоактивное разрушение элементов остова
13. Поперечные связи между основаниями одной нити или двух параллельных нитей, между ДНК и белковыми молекулами, например гистонами



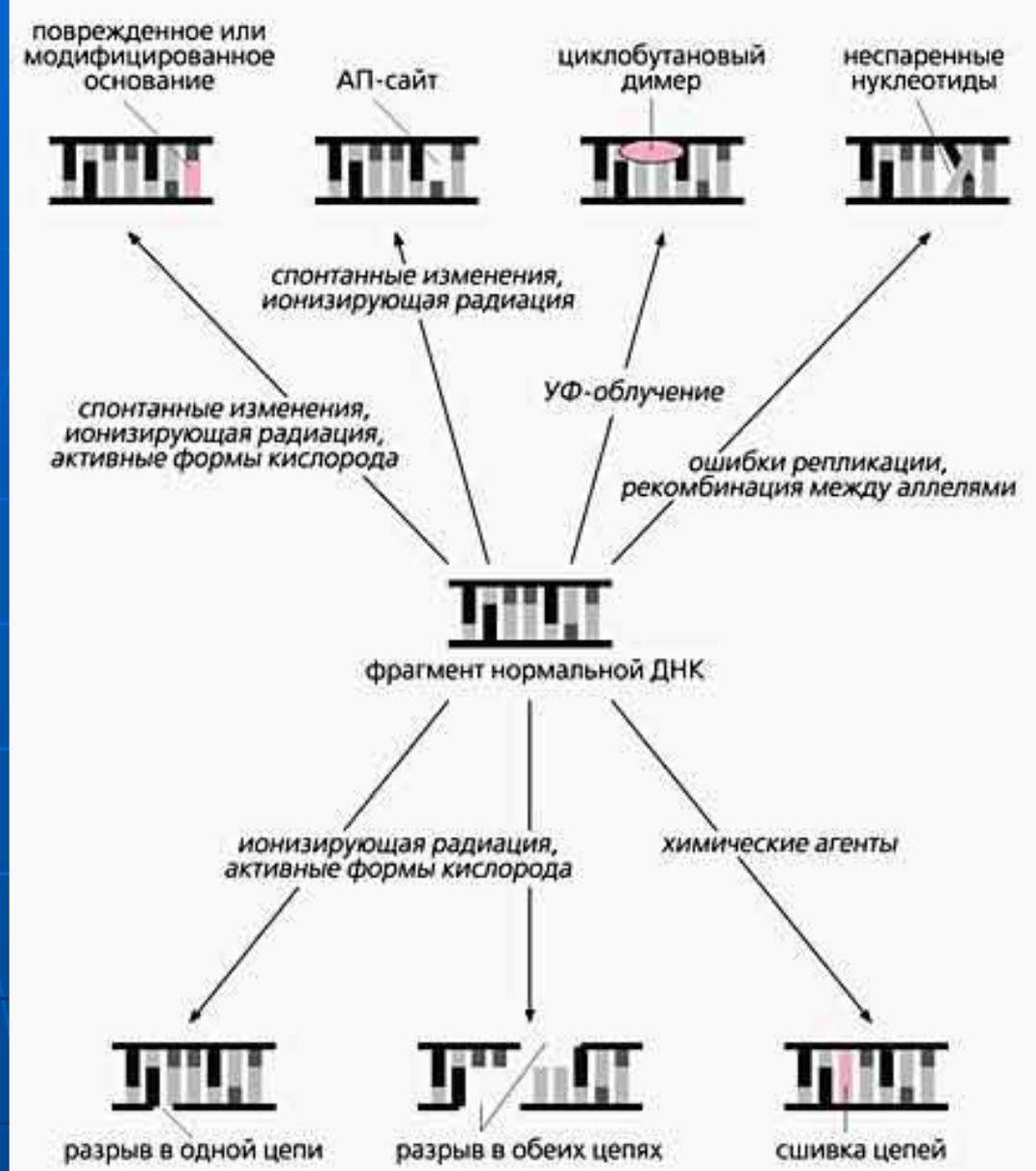
**Слева - Нормальная молекула ДНК (фрагмент) и схемы образования наиболее частых повреждений – дезаминирования и апуризации.**

**При дезаминировании цитозин превращается в урацил, а аденин - в гипоксантин.**

**Если разрывается связь между остатком дезоксирибозы и пуриновым основанием (здесь аденин и гуанин), в этом месте остается только сахарофосфатный остов, т.е. возникает апуриновый сайт.**



**Под действием ультрафиолета в ДНК может образоваться циклобутановый димер из двух соседних пиримидинов (тиминов), находящихся в одной цепи.**



**Повреждения, которые могут возникать в ДНК спонтанно или под действием разных агентов.**

# Репарация поврежденных оснований

Поврежденные основания могут быть исправлены различными путями:

- *Прямое химическое исправление повреждений*
- *Эксцизионная репарация (ER)*, при которой поврежденное основание удаляется и заменяется новым
  1. Эксцизионная репарация оснований (BER- *Base Excision Repair*)
  2. Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER - *Nucleotide Excision Repair*).
  3. Мисмэтч репарация (MMR).

## Прямое исправление повреждений

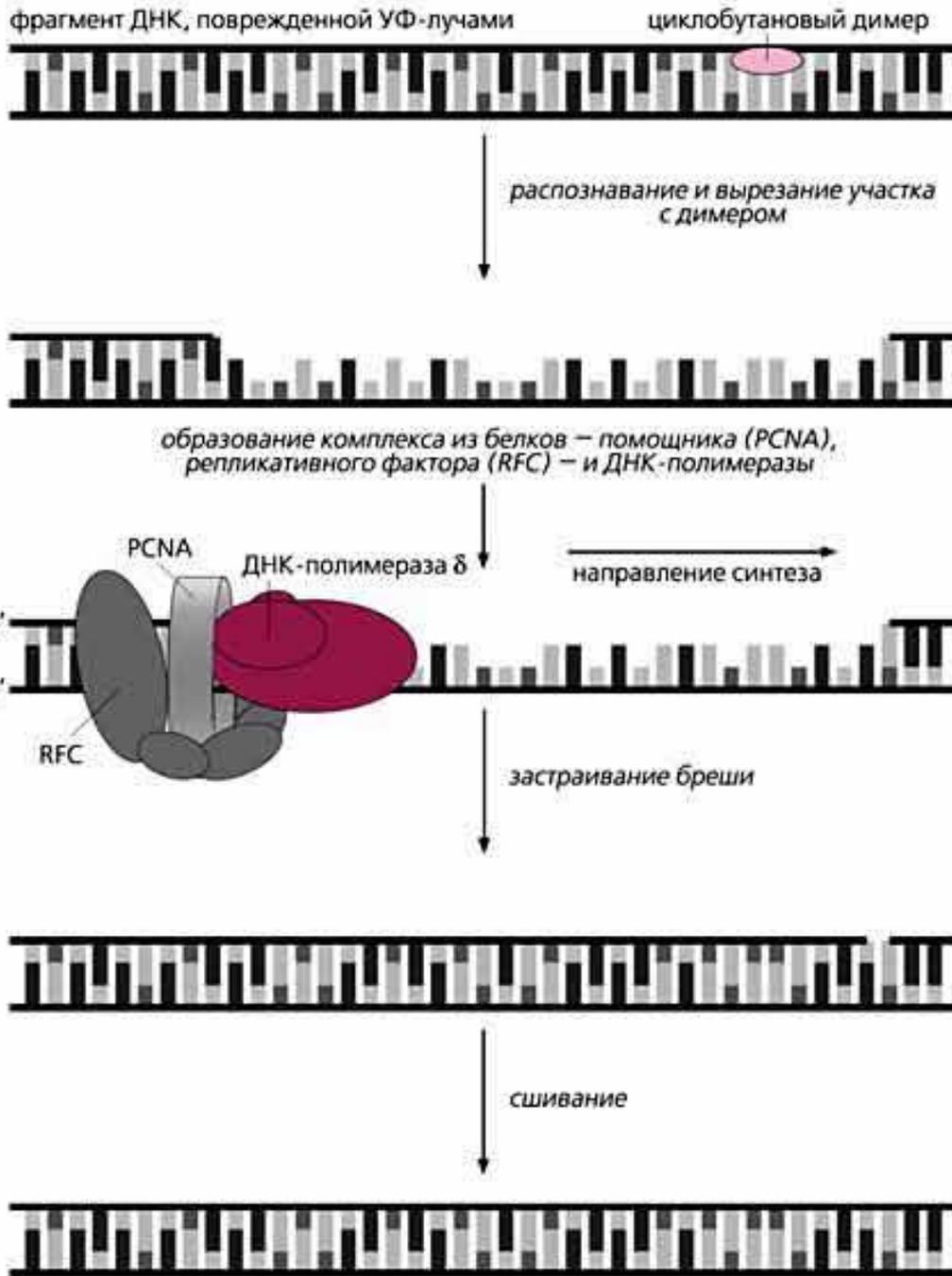
- Наиболее частая причина точечных мутаций у человека - это спонтанное добавление метильной группы - один из типов алкилирования. Такие модификации исправляются ферментами называемыми гликозилазами, исправляющими ошибку без разрушения цепи ДНК.
- 
- Некоторые препараты используемые в химиотерапии также повреждают ДНК путем алкилирования. Проблема репарации состоит в том, что ограниченным набором ферментов и механизмов клетка должна справиться со многими повреждениями, вызванными самыми различными химическими и физическими агентами.

# Обобщенная схема восстановления нормальной структуры ДНК



- Дефектным может быть одиночное основание, и тогда вырезается только нуклеотид;
- в случае более объемного повреждения из цепи удаляются и соседние с ним нуклеотиды, а образовавшуюся брешь застраивают полимеразы - или самостоятельно, или в присутствии белка PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) .

- ДНК-полимеразы  $\beta$  и  $\lambda$  присоединяют всего один нуклеотид (*short patch* путь BER).
- ДНК-полимеразы -  $\delta$  и  $\epsilon$  способны создать большую вставку (*long patch* путь BER), но для этого им нужен специальный белок PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*).
- Особенно зависима от PCNA ДНК-полимераза  $\delta$ , без PCNA фермент "отваливается" от ДНК, встроив лишь один нуклеотид, а если PCNA удерживает на ней полимеразу  $\delta$ , то синтез идет до тех пор, пока фрагмент не достигнет нужной длины.
- Если в клетке не хватает той или иной ДНК-полимеразы, репарация может переключиться с одного пути на другой - *long patch* путь BER.



- Стадии восстановления ДНК, в которой образовался циклобутановый димер. Участок с этой структурой, мешающей копированию ДНК, распознают и вырезают эндонуклеазы семейства ХР (ксеродермы), а заstraивает образовавшуюся брешь в 29 нуклеотидов полимеразы  $\delta$  (или  $\epsilon$ ) при наличии фактора репликации (RFC) и белка-PCNA.**

# Эксцизионная репарация оснований (BER)

## ■ Основные ключевые события:

■ 1. Удаления поврежденного основания (происходит ~ 20,000 раз в день в каждой клетке человеческого тела) ДНК гликозилазами. У человека имеется, по крайней мере, 8 генов, кодирующих различные ДНК гликозилазы, каждая из которых распознают свой набор поврежденных оснований.

■ 2. Удаление дезоксирибофосфата приводит к образованию пустоты в ДНК.

■ 3. Замена правильным нуклеотидом. Это функция у человека выполняется ДНК полимеразой  $\beta$ .

■ 4. Лигирование разрыва цепи. Имеется два фермента, оба нуждаются в АТФ

# Экцизионная репарация нуклеотидов (NER)

■ Основные ключевые события NER:

■ 1. Повреждение распознается одним или несколькими факторами, связывающимися с местом повреждения.

■ 2. ДНК раскручивается в месте повреждения. В этом процессе участвуют различные транскрипционные факторы ИИ, ТFIИ, (которые так же работают при нормальной транскрипции).

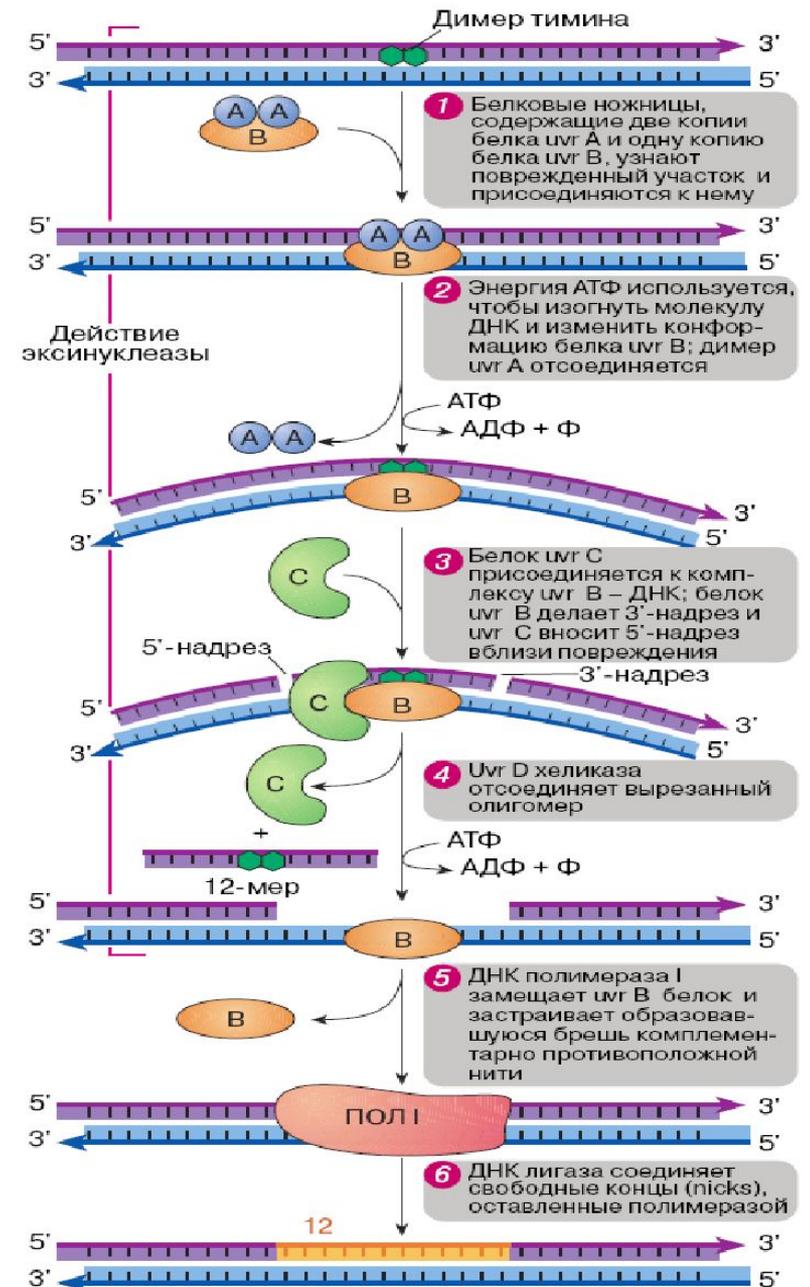
■ 3. Разрез ДНК происходит с 3' и 5'-конца от повреждения, в результате чего удаляется фрагмент ДНК, содержащий поврежденный нуклеотид.

■ 4. Новая цепь ДНК достраивается по матрице неповрежденной цепи ДНК полимеразами  $\delta$  или  $\epsilon$ .

■ 5. Лигаза сшивают вновь синтезированный конец цепи.

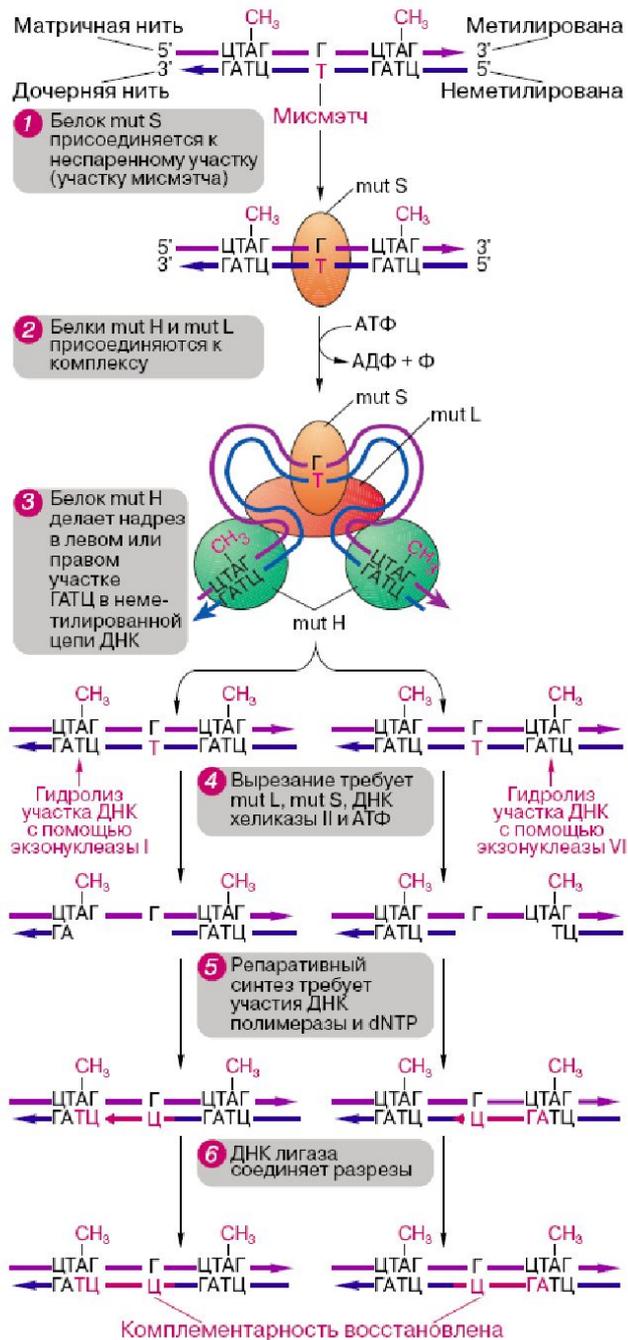
## NER

1. Распознавание повреждений белками, кодируемыми генами UvrA и UvrB
2. Изгиб ДНК и изменение конформации uvrB
3. Внесение двух однонитевых надрезов ДНК с обеих сторон от повреждения с помощью белков uvrC и uvrB
4. Расплетение ДНК в участке между надрезами белком uvrD (хеликазой), отсоединение содержащего дефект фрагмента длиной 12 нуклеотидов (12-мер) с образованием брешы, при этом расходуется энергия еще одной молекулы АТФ
5. Застройка образованной брешы ДНК-полимеразой
6. Соединение свободных концов (nicks), оставленные полимеразой с помощью ДНК-лигазы



# Мисмэтч репарация(MMR)

- Мисмэтч репарация исправляет ошибочно встроенные неповрежденные основания, которые не образуют нормальное Уотсон-Криковское спаривание (A•T, C•G).
- Такие ошибки происходят во время работы ДНК полимеразы при репликации.
- В мисмэтч репарации участвуют ферменты, вовлеченные в BER, NER репарацию и специализированные ферменты.
- Синтез ДНК при мисмэтч репарации осуществляется ДНК полимеразами  $\delta$  или  $\epsilon$ .
- Система мисмэтч репарации участвует в увеличении точности рекомбинации при мейозе.



Репарация неправильно спаренного участка (мисмэтча) у *E. coli*. Двойная спираль была только что отреплецирована. Матричная цепь несет метилированные остатки, дочерняя еще неметилирована. Белки mutH разрезают только неметилированные сайты. Матричная цепь ДНК остается целостной и служит матрицей для восстановления правильной последовательности в образовавшихся брешах.

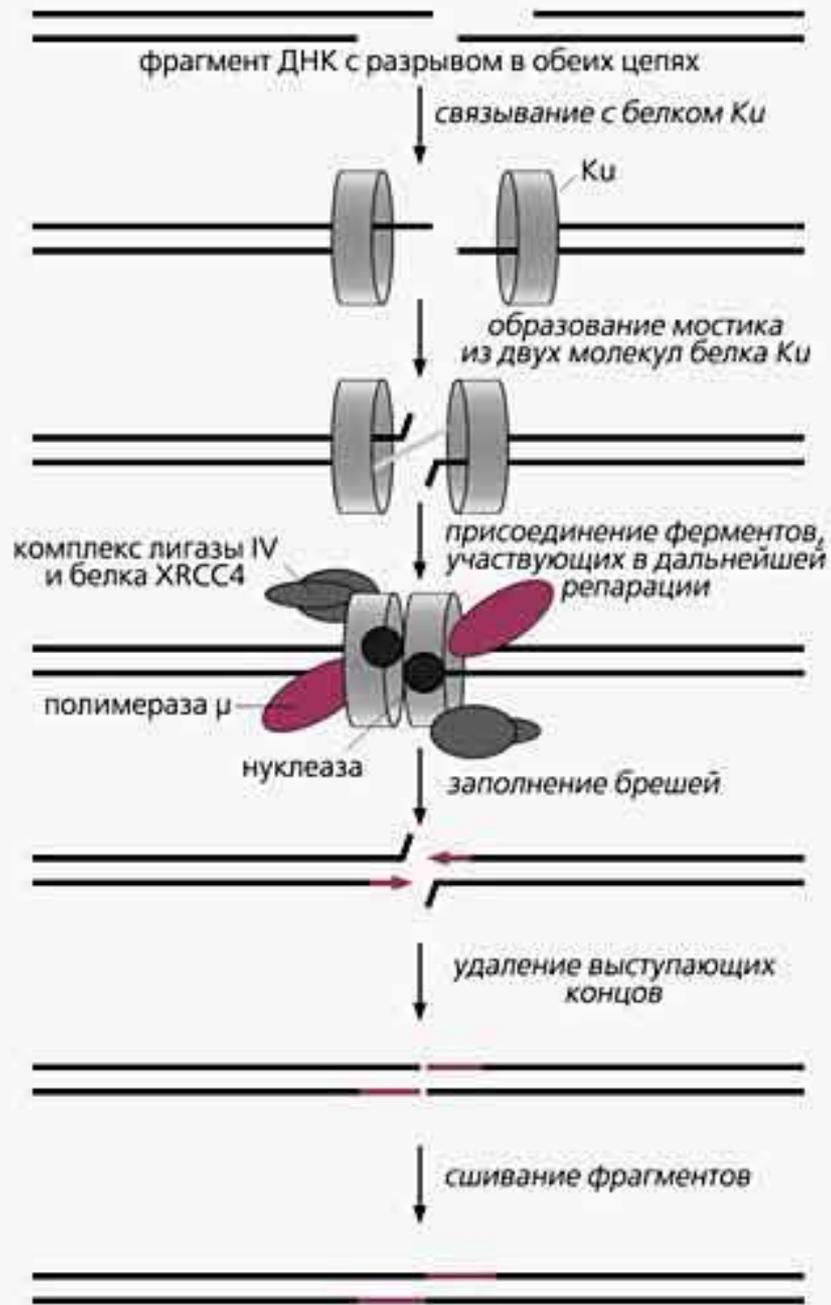
1. Белок mutS распознает неспаренный участок и присоединяется к нему.
  2. Образование репарационного комплекса за счет присоединения белков mutH и mutL к белку mutS. На эту реакцию тратится АТР.
  3. Разрезание ДНК в участке ГАТЦ, расположенных перед и позади сайта мисмэтча.
  4. Длинный участок ДНК, расположенный между двумя надрезами и несущий мисмэтч, должен быть отсоединен от ДНК, в результате чего возникает длинная однонитевая брешь. В расплетении однонитевой ДНК принимают участие хеликазы и затрачивается несколько АТР.
  5. Застройка длинной брешы ДНК полимеразой мс использованием dNTP.
  6. Соединение оставшихся после завершения репликации однонитевых разрывов с помощью ДНК-лигазы.
- В результате всей цепи реакций участок мисмэтча заменяется правильной комплементарной парой.

# Репарация разрывов ДНК

- Ионизирующая радиация и некоторые химические вещества способны разорвать одну или две цепи ДНК.
- **Одноцепочечные разрывы (SSB).** Разрывы одной из цепей ДНК часто исправляются ферментами, участвующими в BER репарации.
- **Двухцепочечные разрывы (DSB).** Имеется два механизма, которые способны устранить двухцепочечных разрывов ДНК:
  1. **Прямое соединение сломанных концов.** Этот процесс требует специальных ферментов, которые узнают и связывают разорванные концы с последующим их сшиванием.
  2. Если разорванная ДНК имеет тупые концы и соединение двух фрагментов ДНК происходит случайно, то такая репарация называется *NHEJ (Nonhomologous End-Joining)*.
- Для NHEJ необходим белок Ku. Ku - гетеродимерная субъединица, состоящая из двух белков Ku70 и Ku80.
- Ошибки, возникающие при прямом присоединении могут являться причиной транслокаций.



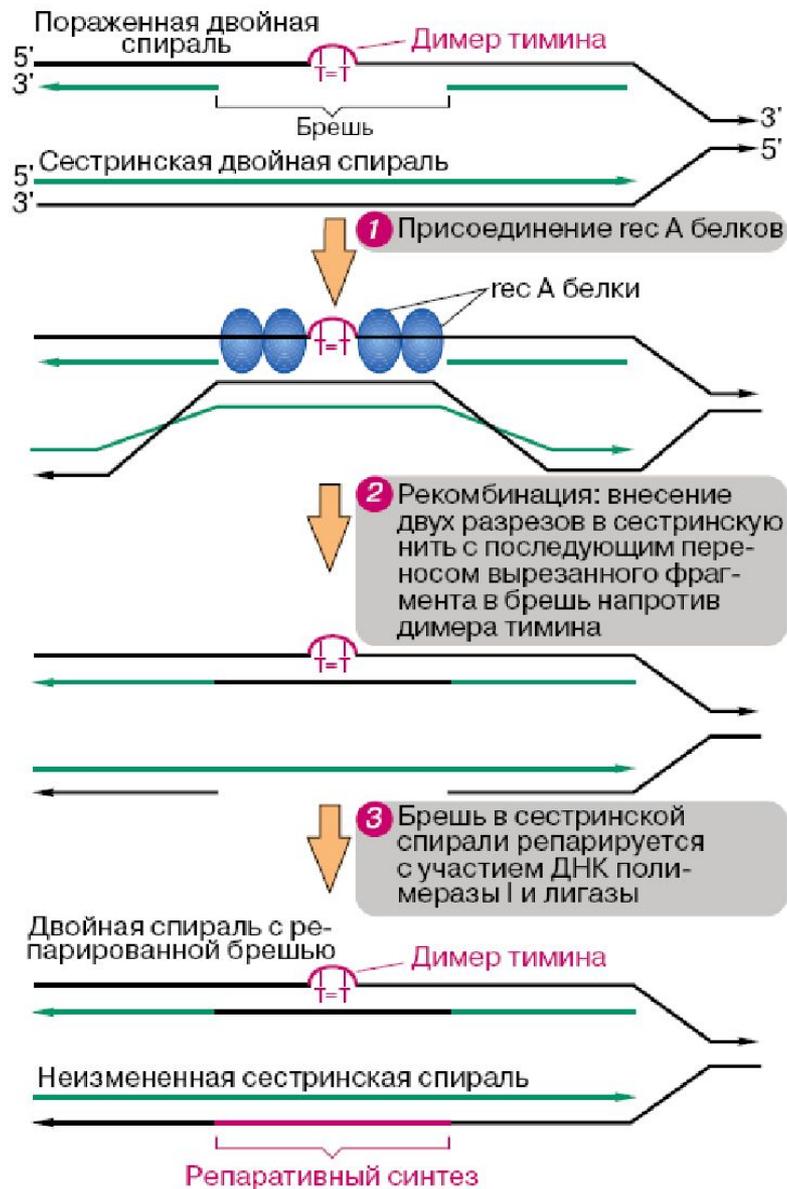
- Восстановление последовательности ДНК, в которой разорваны обе цепи, способом
- **гомологичной рекомбинации.** Характерен для дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*)



- **Последовательность реконструкции ДНК, в которой разорваны обе цепи, соединением негомологичных концов.**

- **Характерен для млекопитающих, в том числе для человека.**

# Пострепликативная репарация ДНК



- Если до начала репликации из нее не были устранены все дефекты, то одна из нитей материнской молекулы будет нести повреждение (красным цветом выделен димер тимина), а комплементарная ей нить будет свободна от повреждений (нити материнской молекулы показаны черным цветом). На поврежденной нити репликация завершится тем, что напротив димера тимина заново синтезированной нити (зеленого цвета) окажется брешь, в то время как сестринская двойная спираль не будет нести повреждения. После этого может пойти пострепликативная репарация поврежденного участка.

1. Молекулы белка гесА (синие) присоединяются к зоне бреши
2. Под контролем белка гесА произойдет рекомбинация – участок комплементарной цепи сестринской нити (черная) переносится в район бреши
3. Бреши в сестринской ДНК застраивается в ходе репликативного синтеза (застроенный участок показан красным цветом). Концы новой и старой нитей соединяются лигазой.

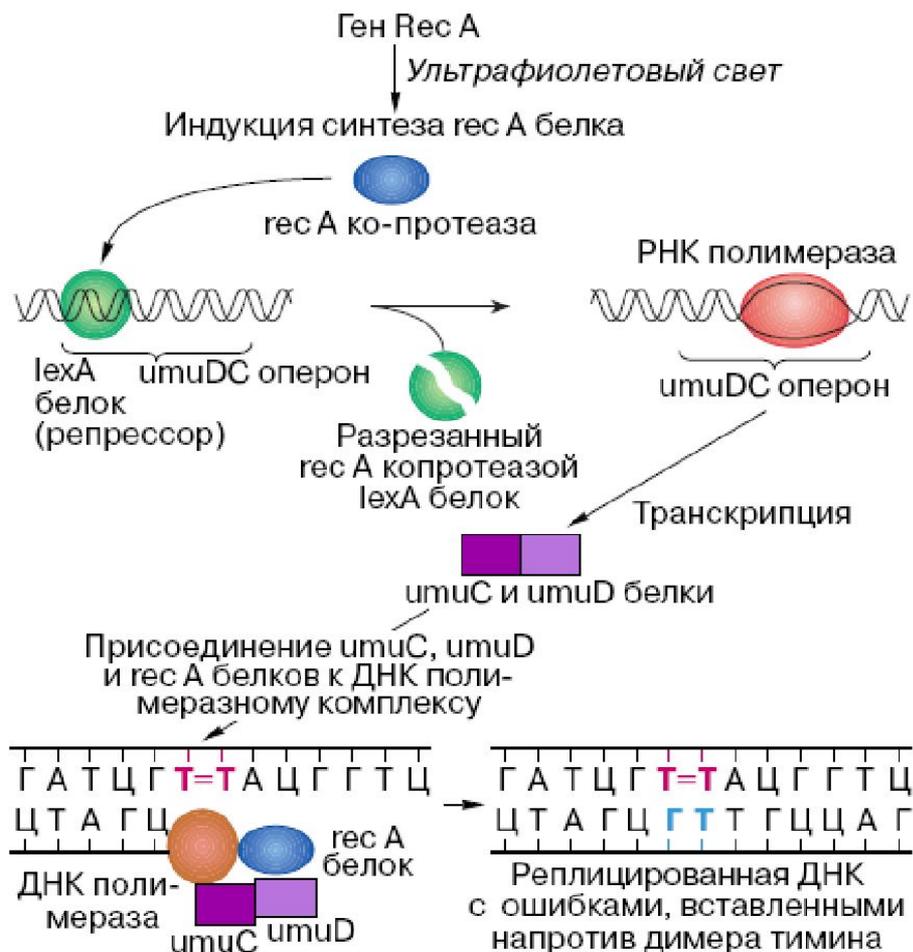
Таблица 2. Репарирующие ферменты среди представителей живого мира

Тип репарации	Бактерии	Растения	Насекомые	Животные	Человек
Фотореактивация	+	+	+	+	+
Репарация O <sup>6</sup> -гуанинов	+	+	+	+	?
Эксцизионная репарация оснований	+	?	?	+	+
Эксцизионная репарация нуклеотидов	+	+	+	+	+
Мисмэтч-репарация	+	?	?	+	+
Пострепликативная репарация	+	+	?	+	+
SOS-репарация	+	?	?	+	+

*Примечание.* Довольно удивительным фактом стало отсутствие в митохондриях эукариотов ферментов репарации, хотя были найдены ферменты, осуществляющие гомологическую рекомбинацию. В одной из работ 1992 года была описана митохондриальная репарация внутри- и межнитевых сшивок ДНК, индуцируемых 4-нитрохинолиноксидом.

# Индукцируемая УФ светом SOS-репарация

Большие дозы УФ приводят к возникновению большого числа повреждений ДНК, часть которых остается unrepaired к моменту начала репликации. В этих условиях активируется синтез ко-протеазы *recA*-белка, которая участвует в протеолизе многих белков. В частности, *recA* ко-протеаза может узнать и разрезать другой белок – кодируемый геном *LexA* и являющийся репрессором почти 20 генов., в том числе оперона *umuDC*. Разрушение *lexA*-белков открывает возможность начать транскрипцию многих оперонов: РНК-полимераза связывается с их промотрами, и, в частности, с промотором оперона *umuDC* и начинает транскрипцию *umuD* и *umuC*.





- **Гипотетическая схема устранения межцепочечных сшивок ДНК.**

# Гомологичная рекомбинация

- Гомологичная рекомбинация способна восстанавливать поломанные концы хромосом, используя ДНК не поврежденной сестринской хроматиды, доступной после удвоения хромосом.
- Гены, необходимые для гомологичной рекомбинации - BRCA-1 and BRCA-2.