

Спивак Ирина Михайловна

ЭКОЛОГИЯ
ПОВРЕЖДЕНИЕ И РЕПАРАЦИЯ ДНК

Учебное пособие

Редактор *Е.А. Пряникова*

Технический редактор *А.И. Колодяжная*

Оригинал-макет подготовлен автором

Директор Издательства Политехнического университета *А.В. Иванов*
Свод. темплан 2005 г.

Лицензия ЛР № 020593 от 07.08.97

Налоговая льгота – Общероссийский классификатор продукции
ОК 005-93, т.2; 95 3005 – учебная литература

Подписано в печать 2006. Формат 60Х84/16.

Усл. печ. л. 11,5. Уч.-изд. л. 11,5. Тираж 200. Заказ . .

Санкт-Петербургский государственный политехнический университет.
Издательство Политехнического университета,
член Издательско-полиграфической ассоциации университетов России.
Адрес университета и издательства:
195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29.

УДК 577.346:591.169 (075.8)

ББК 28.05:28.070я73

С 72

Р е ц е н з е н т ы:

Доктор биологический наук, профессор СПбГУ *А.Д. Харазова*

Доктор биологический наук, профессор, заведующий лабораторией
радиационной цитологии Института цитологии РАН *В.М. Михельсон*

*Стивак И.М. Экология. Повреждение и репарация ДНК: Учеб. пособие. СПб.:
Изд-во Политехн. ун-та, 2006. 184 с.*

Пособие соответствует государственному образовательному стандарту дисциплин «Экология» и «Физико-химические основы цитологии» подготовки бакалавров по направлению 140400 «Техническая физика».

В пособии описываются проблемы повреждения и репарации ДНК. Излагаются современные представления о развитии глобального ответа клетки на повреждения ДНК и рассматриваются механизмы, отвечающие за сохранение генетической стабильности организмов.

Главное внимание уделено анализу взаимосвязи и взаимозависимости трех Р ДНК-метаболизма: репликации, рекомбинации и репарации, включая биохимию, генетику и эволюцию этих процессов.

Предназначено для студентов дневной, очно-заочной, заочной форм обучения и экстернов, изучающих дисциплины «Экология» и «Физико-химические основы цитологии» в рамках подготовки бакалавров по направлению 140400 «Техническая физика».

Табл. 7. Ил. 43. Библиогр.: 14 назв.

Печатается по решению редакционно-издательского совета Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

ISBN

© Санкт-Петербургский государственный
политехнический университет, 2006

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие.	6
Введение.	7
1.Изучение ДНК-метаболизма.	9
1.1.Начало исследования репарации.	11
1.2.Репликация ДНК.	13
1.2.1.Репарация за счет проверки ДНК-полимеразой.	15
1.2.2.Участие корректирующих автономных экзонуклеаз в репликации и репарации ДНК.	18
2.Типы повреждений ДНК.	19
3.Многообразие систем репарации ДНК.	21
4.Прямая репарация ДНК.	22
4.1.Фотореактивация.	22
4.2. Репарация O ⁶ -алкилированного гуанина.	26
4.3. Репарация односторонних разрывов ДНК.	30
4.4.Репарация АП-сайтов за счет прямой вставки пуринов.	31
5.Эксцизионная репарация.	31
5.1.Эксцизионная репарация оснований (base excision repair, BER).	32
5.1.1.Многочисленные возможности репарации 8-оксигуанина.	40
5.1.2.Роль PCNA в эксцизионной репарации оснований.	41
5.1.3.BER, спаренная с репликацией.	43
5.2.Эксцизионная репарация неспаренных оснований (mismatch repair, MMR).	46
5.1.1.Функциональные гены-гомологи системы MMR у про- и эукариот.	51
5.3.Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER, nucleotide excision repair).	55
5.3.1.Эксцизионная репарация нуклеотидов у эукариот.	58
5.3.2.NER, спаренная с транскрипцией - TCR (transcription coupled repair)	63
5.3.3.Болезни, связанные с нарушением системы NER.	67
5.3.3.1.Пигментная ксеродерма.	67
5.3.3.2.Тиотриходистрофия. Транскрипционная гипотеза.	72

76

5.3.3.4. Синдромы повышенной чувствительности к УФ-облучению.	81
6. Репарация, связанная с рекомбинацией.	82
7. Рекомбинация.	82
7.1. Сайт-специфическая рекомбинация.	83
7.2. Случайная рекомбинация.	84
7.3. Гомологичная рекомбинация.	85
7.3.1. Генная конверсия.	91
8.1. SOS-ответ у <i>E. coli</i> .	93
8.1.1. Низкопроцессивны ДНК-полимеразы эукариот.	98
9. Репарация двунитевых разрывов.	101
9.1. Репарация двунитевых разрывов ДНК путем негомологического воссоединения концов (NHEJ).	104
9.2. Однонитевой отжиг (SSA) по прямым повторам.	110
9.3. Репарация путем гомологической рекомбинации (HRR).	112
9.3.1. Роль гистона H2AX в репарации двунитевых разрывов.	116
9.3.2. Механизмы, обеспечивающие стабильность хромосом при наличии повторов и системы гомологической рекомбинации.	117
9.3.3. Болезни, связанные с дефектами генов, вовлеченных в репарацию двунитевых разрывов.	122
9.3.3.1. Атаксия-телеангиэктазия. Белок ATM.	123
9.3.3.2. Белки BRCA1 и BRCA2.	126
9.3.3.3. Геликазы семейства RecQ.	130
9.3.3.4. Синдром Блюма.	132
9.3.3.5. Синдром Вернера.	134
9.3.3.6. Анемия Фанкони.	136
10.1. Защитники генома. Белок P53.	140
10.2. Защитники генома. Роль PARP в репарации.	144
10.3. Белки, комплементирующие чувствительность клеток грызунов к ионизирующей радиации.	147
11. V(D)J рекомбинация.	149
12. Перемещение мобильного элемента Sleeping Beauty.	150

13. Пострепликативная	репарация.
151	
13.1. Пострепликативная, или рекомбинационная, репарация.	151
13.2. Убиквитин и убиквитин-связывающие белки.	153
13.3. Rad6-зависимая пострепликативная репарация.	156
14. Репарации поврежденных вилок репликации и ресинтез.	159
14.1. Модель прохода повреждения с переключением матрицы.	160
14.2. Остановка репликации и ресинтез. Привлечение белков репарации.	162
15. Современные представления и знания о механизмах активации чекпойнтов и белках, вовлеченных в разные стадии этого процесса.	161
15.1. Генеральные концепции и основные игроки.	165
15.2. Молекулярные механизмы G1-чекпойнта.	169
15.2. Молекулярные механизмы S-чекпойнта.	171
15.3. Молекулярные механизмы G2-чекпойнта.	172
15.4. Чекпойнты и репарация двунитевых разрывов.	176
Заключение.	177
Приложение 1. Гены репарации, связанные с различными наследственными болезнями человека	179
Приложение 2. Универсальный генетический код	180
Список литературы	181

Предисловие

Эта книга — специализированное учебное пособие, посвященное одной из особенностей ДНК-метаболизма — ее репарации.

Настоящее пособие написано по материалам курса лекций по физико-химической биологии, часть которого автор на протяжении последних 4 лет читает в СПбПУ, являясь одним из его создателей.

Молекулярная биология и особенно та ее область, которая занимается изучением ДНК-метаболизма — одна из наиболее бурно развивающихся дисциплин в современном естествознании. В нее постоянно привносится множество новых фактов, и почти каждый год совершаются открытия. Объем настоящего учебного пособия слишком мал, чтобы вместить в себя огромный накопленный материал. Поэтому в каждой главе книги даны обобщенные и устоявшиеся представления о той или иной проблеме, проиллюстрированные примерами из современной литературы. Автор не мог не воспользоваться также и тем обстоятельством, что в последнее десятилетие в нашей стране было издано несколько ценных (отечественных и переводных) учебных пособий по молекулярной биологии и смежным дисциплинам. Это позволило ему в весьма кратком виде изложить в данном учебном пособии целый ряд вопросов и порекомендовать читателю ознакомиться с контекстом, внутри которого существуют все представленные в пособии данные по репарации ДНК.

Одновременно нужно отметить, что это учебное пособие не могло бы появиться в печати без активной поддержки сотрудников кафедры физико-химической биологии клетки факультета медицинской физики и биоинженерии СПбПУ и уважаемых рецензентов, с которыми автор обсуждал состояние современной парадигмы молекулярной биологии.

Автор с признательностью примет от читателей критические замечания и советы по совершенствованию данного пособия.

Введение

Описание ДНК-метаболизма является неотъемлемой составной частью молекулярной и физико-химической биологии. Молекулярная биология как самостоятельная наука, изучающая молекулярные основы жизнедеятельности клетки, возникла на рубеже 1940—1950 гг., когда была установлена генетическая роль дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК), а расшифровка структуры ДНК позволила описать в простых физико-химических терминах принцип передачи наследуемых признаков от родительской клетки к дочерним.

К этому времени история изучения нуклеиновых кислот насчитывала уже около восьмидесяти лет. Честь их открытия принадлежит выдающемуся швейцарскому биохимику Фридриху Мишеру, который в 1868—1872 гг. выделил из ядер спермы лосося новое фосфорсодержащее вещество, названное им нуклеином (от греч. *nucleus*— ядро). Впервые нуклеиновую кислоту, свободную от белков, получил Р. Альтман в 1889 г., который и ввел этот термин в биохимию. В результате дальнейшего изучения химического состава нуклеиновых кислот удалось установить, что в природе их существует два типа, причем долгое время существовала уверенность в том, что ядра клеток животных содержат только ДНК, а ядра клеток растений—только РНК. И лишь к середине 1930-х годов было доказано, что ДНК и РНК содержатся в каждой живой клетке. Первостепенная роль в утверждении этого фундаментального положения принадлежит А. Н. Белозерскому, впервые выделившему ДНК из растений. С развитием методов цитохимии и гистохимии к концу 1940-х годов было установлено, что ДНК локализуется преимущественно в ядре, а РНК - в цитоплазме клеток,

К началу 1950-х годов работы по изучению химического строения нуклеиновых кислот были завершены. Было выяснено строение их мономеров - нуклеозидов и нуклеотидов, и доказано, что и в ДНК, и в РНК нуклеотидные остатки связаны между собой в полимер только 3'-О-фосфодиэфирной связью. Выдающейся вехой в изучении нуклеиновых кислот стало открытие О. Эйвери с сотрудниками, которые показали, что с помощью чистой ДНК наследуемый признак может быть перенесен из одной клетки в другую. Так было доказано, что ДНК является носителем генетической информации. В 1953 г. Дж. Уотсон и Ф. Крик сумели

правильно интерпретировать данные рентгеноструктурного анализа ДНК, накопленные в лабораториях Р. Франклин и М. Уилкинса, и на их основе построить модель пространственной структуры ДНК. Они показали, что макромолекула ДНК — это регулярная двойная спираль, в которой две полинуклеотидные цепи строго комплементарны друг другу. Из

анализа модели следовало, что после расплетания двойной спирали на каждой из полинуклеотидных нитей может быть построена комплементарная ей новая, в результате чего образуются две дочерние молекулы, неотличимые от материнской ДНК. Через пять лет М. Мезельсон и Ф. Сталь экспериментально подтвердили этот механизм, а несколько раньше (1956) А. Корнберг открыл фермент ДНК-полимеразу, который на расплетенных нитях, как на матрицах, синтезирует новые, комплементарные им цепи ДНК.

Открытие генетической роли ДНК потребовало решения другой фундаментальной задачи — поддержания стабильности молекулы ДНК и ее постоянства при передаче в ряду поколений.

Как ни странно это прозвучит, но созданию современных представлений о метаболизме ДНК и гармоничном взаимодействии процессов репликации, рекомбинации и репарации во время клеточного цикла препятствовала утвердившаяся к середине 50-х годов прошлого века парадигма о безупречности и совершенстве — а, следовательно, и неизменности — двунитевой молекулы ДНК. Вторая половина XX века прошла под знаком изменения этой парадигмы и осознания динамического равновесия между постоянно возникающими повреждениями ДНК и восстановлением этих повреждений. В силу этого противоречия, во всех существующих учебниках при описании ДНК-метаболизма проблема репарации традиционно занимает место Золушки рядом со своими более удачливыми сестрами — репликацией и рекомбинацией. Репарации ДНК обычно посвящается несколько страниц с самыми общими представлениями о той сложной совокупности многообразных процессов, которые входят в это понятие. Таким образом, становится очевидным необходимость и востребованность специального учебного пособия,

фокусирующегося именно на проблемах репарации и глобального клеточного ответа на повреждения ДНК.

В современную эпоху, когда на первый план в науках о земле и человеке выходит экология, знание механизмов, противостоящих накоплению мутационного груза и степени их надежности, представляется крайне актуальной. При получении образования по направлению «Техническая физика» необходимо создать у студентов, обучающихся на факультете медицинской физики и биоинженерии современные представления о ДНК-метаболизме, которые будут способствовать у них выработке строгого методического подхода к будущим научно-техническим исследованиям в области прикладной биологии и медицины.

1. Изучение ДНК-метаболизма.

Заинтересовавшись историей изучения трех Р ДНК-метаболизма – репликации (копирование ДНК-предшественницы при каждом клеточном делении), рекомбинации (обмен между различными молекулами ДНК в клетке) и репарации (возвращение измененной ДНК к ее нормальному, «правильному» состоянию), с удивлением обнаруживаешь, что исследования репарации и мутагенеза (появления наследуемых изменений ДНК) резко, почти на 20 лет, отставали от изучения репликации и рекомбинации. Это в первую очередь связано с тем, что серьезные теоретические взгляды на мутационные повреждения ДНК и их репарацию идеологически противоречили изначально сложившейся в науке парадигме о физико-химическом, структурном и, если можно так выразиться, эстетическом совершенстве двойной спирали ДНК. Такое восторженное отношение к главной молекуле наследственности препятствовало развитию системы новых взглядов на динамическое состояние ДНК, которые в большинстве случаев даже не воспринимались всерьез. Фрэнк Сталь однажды заявил, что «возможность того, что гены являются субъектами суматохи, возникающей при одновременном действии оскорбления и неуклюжих усилий эти оскорбления загладить, неправдоподобна».

Только через два десятилетия после того, как он и Джеймс Уотсон представили структуру ДНК, Френсис Крик признался в своем письме в

«Nature» от 26 апреля 1974 года: «Мы совершенно ошиблись в возможной роли ДНК-репарации, хотя позднее я пришел к пониманию того, что ДНК столь точна потому, что существует множество различных механизмов репарации». Это ретроспективное размышление одного из создателей модели двойной спирали ДНК дает намек на раннее понимание ДНК как крайне стабильного макромолекулярного образования. Именно это преобладающее в то время мнение задержало изучение таких биохимических процессов как мутагенез и репарация.

Здесь, впрочем, нужно сказать, что через короткий промежуток времени, после того как Уотсон и Крик сообщили о двойной спиральной структуре ДНК, они же приложили правила спаривания оснований к мутагенезу, формулируя его так: «Спонтанная мутация может быть результатом того, что основание случайно окажется в одной из его редких, но вероятных таутомерных форм».

Таутомеризация – это свойство вещества, позволяющее ему находиться в одном из взаимопереходящих химических состояний; в случае ДНК оснований – это кето- и энол-формы. Уотсон и Крик вначале внимательно изучили все возможности и сложности таутомеризации и неудачно попробовали сконструировать свою ДНК-модель из редких энольных форм оснований. Проблема стабильного спаривания оснований была разрешена ими только после того, как Джерри Донахью, бывший аспирант Лайнуса Полинга, указал Уотсону на более разумное использование обычной кето-формы.

При этом Уотсоном и Криком не было дано никакого объяснения тому факту, что химическая лабильность ДНК, проявляющая себя в виде той самой таутомеризации, может иметь широкое приложение к изучению проблемы стабильности генов. Действительно, эта область наблюдения указывает прямой подход к уточнению природы повреждения ДНК и его возможных биологических последствий. В науке создалась парадоксальная ситуация. Для исследования таких реальных проблем, как расшифровка генетического кода или понимание основных признаков репликации и рекомбинации ДНК, активно разрабатывались и создавались многочисленные системы *in vitro*. При их разработке как инструмент для определения функций генов и их полипептидных продуктов и уточнения

10

генетического кода широко применялся мутагенез, который сам еще долго не являлся предметом независимых серьезных исследований. И все это несмотря на тот факт, что существование репарационного феномена фотореактивации было известно за несколько лет до описания самой структуры ДНК.

Так было до того момента, когда стало понятно, что ДНК все-таки постоянно подвергается повреждениям и что у клетки есть целый арсенал путей, чтобы реагировать на эти повреждения. При этом нарушение или врожденная недостаточность процессов репарации и возникающие в результате этого мутации могут иметь катастрофические последствия, приводя к целому ряду заболеваний человека. Одновременно с этим укреплялось понимание, что мутации тем не менее необходимы, так как являются основой жизни и эволюции.

Последующие работы подтвердили идею о динамическом состоянии ДНК, то есть серьезно изменили существующую парадигму. Это сделало почти в один миг очевидным, что ДНК всех живых организмов постоянно подвергаются мириадам типов повреждений, и что клетки изобрели остроумные механизмы, позволяющие им быть устойчивыми к этим повреждениям и/или репарировать их. Нарушение данных механизмов может привести к серьезным болезненным последствиям, что хорошо проиллюстрировано человеческим наследственным заболеванием пигментной ксеродермой (*xeroderma pigmentosum*, XP), наследственным неполипозным раком кишечника (*human nonpoliposys colon cancer*, HNPCC) и семейными формами рака груди. XP характеризуется более чем в 10 000 раз повышенным риском рака кожи, связанным с мутагенным воздействием солнечного света, люди с HNPCC демонстрируют повышенную наследственную предрасположенность к раку прямой кишки и другим онкологическим заболеваниям.

1.1. Начало исследования репарации

Самые ранние работы, посвященные мутациям и репарации ДНК были начаты еще в 1930-х годах по инициативе небольшой, но выдающейся группы ученых-физиков. Из воспоминаний генетика Гвидо Понтекорво нам известно, что «в годы, непосредственно предшествовавшие второй

мировой войне, случилось нечто новое: введение идей (не технологий) из царства физики в царство генетики, в частности касающихся проблем размера, мутабельности и саморепликации генов». Достижением этого содружества физики и генетики в предвоенной Германии стало сотрудничество между немецкими физиками Карлом Циммером и Максом Дельбрюком и русским генетиком Николаем Владимировичем Тимофеевым-Ресовским. Это сотрудничество возникло после того, как Герман Меллер, генетик, работавший на плодовой мушке *Drosophila*, первым продемонстрировал, что внешние агенты, такие как ионизирующая радиация, могут являться причиной мутаций живых организмов.

Сначала Тимофеев-Ресовский и Циммер заинтересовались, каким образом столь небольшие количества энергии в форме ионизирующей радиации (формально эквивалентные тепловой энергии, получаемой не более чем при выпивании одной чашки чая) могут иметь столь глубокие биологические эффекты. С другой стороны, Дельбрюку и Меллеру было важно понять, каким именно образом каждая мутация может влиять на физическую природу гена, и - как следствие - помочь ученым в понимании этой природы (нужно помнить, что речь идет о 30-х годах XX века).

Ретроспективно представляется неизбежным, что использование физических (а позже - химических) инструментов, таких как ионизирующее или ультрафиолетовое излучение (УФ) и химические мутагены для изучения генов, привело к вопросу, каким образом эти агенты повреждают ДНК. И, однажды поняв, что эти вмешательства вызывают нарушение как структуры, так и функций генов, иногда прямо приводящие к утере организмом каких-либо из них, ученые поставили вопрос о том, как именно клетки способны существовать с этой поврежденной ДНК. Циммер писал: «Никто не может использовать излучения без понимания механизмов их действия, и также никто не может обнаружить какие-либо вызванные излучениями изменения, не заинтересовавшись нормальным состоянием исследуемого материала».

К сожалению, начало Второй мировой войны сказалось и на развитии фундаментальной науки в Германии, многие ученые вынуждены были

эмигрировать, замечательное научное братство физиков и генетиков распалось.

1.2. Репликация ДНК

Для того чтобы начать серьезный разговор о репарации, необходимо вспомнить основные детали репликации ДНК. Важно понимать, что все процессы ДНК-метаболизма тесно связаны между собой и белки, вовлеченные в репликацию и рекомбинацию ДНК, способны принимать участие в различных процессах репарации. Для наглядности рассмотрим схему процесса репликации у прокариот, представленную на рис. 1.

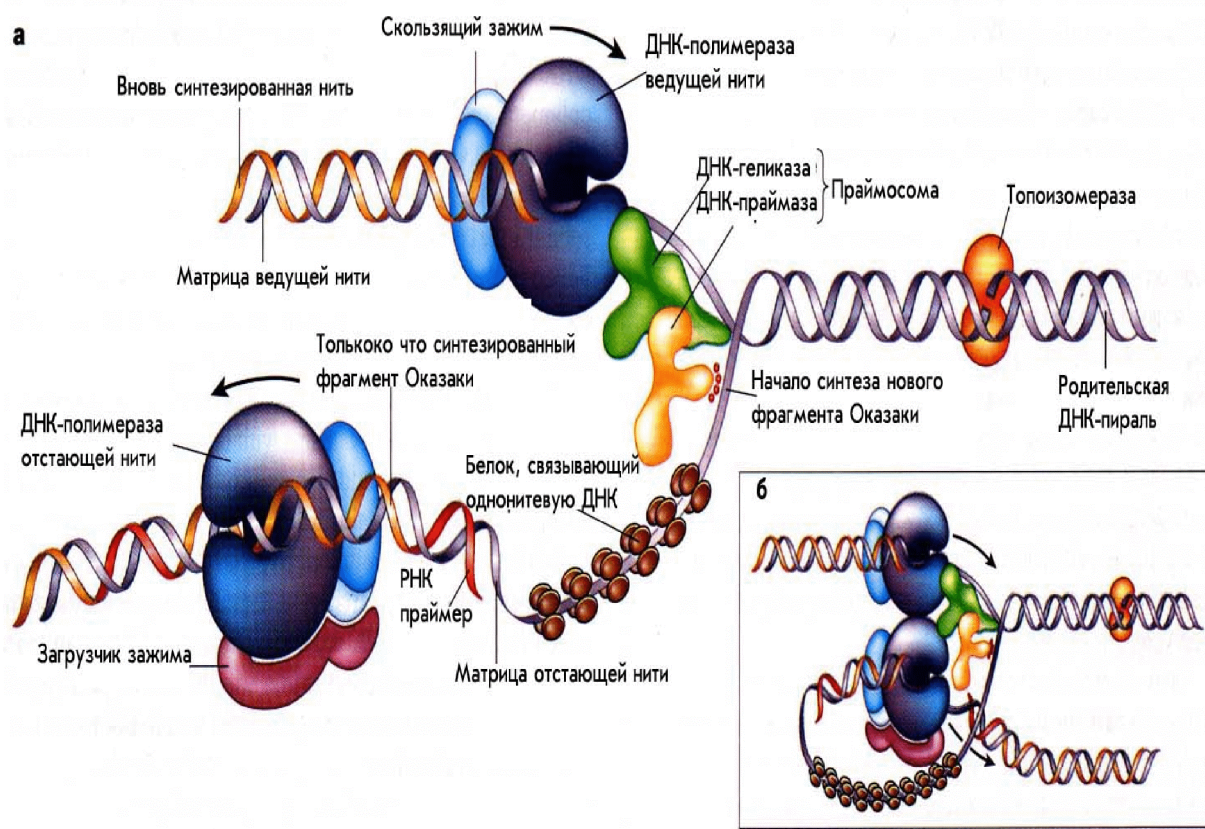


Рисунок 1. Схема репликации ДНК у *E. coli*. На панели **а** схематически показаны белки в Y- раскрученной вилке репликации ДНК, но в реальности вилка репликации свернута в трех измерениях и образует структуру, подобную той, что изображена на вставке **б**.

Сфокусируемся на схематическом изображении **а**. В репликативной вилке одновременно активны две молекулы ДНК-полимеразы. Одна движется постоянно, производя новую дочернюю молекулу ДНК на ведущей нити, тогда как другая производит длинную серию коротких фрагментов Оказаки на отстающей нити. Обе полимеразы «заякорены» на их матрице с помощью ассоциированных с ними белков в виде «скользящего зажима» (sliding clump) и «загрузчика зажима» (clump loader).

ДНК-геликаза, активированная энергией АТФ-гидролиза, быстро движется вдоль одной из матричных нитей (на рис. 1 – ведущая нить), раскрывая ДНК-спираль прямо перед репликативной вилкой. ДНК-геликаза предоставляет основания ДНК-спирали ДНК-полимеразе ведущей нити, чтобы та могла их копировать. Ферменты ДНК-топоизомеразы облегчают раскручивание спирали ДНК.

В дополнение к матрице, ДНК-полимераза нуждается в праймере, «затравке», существующей до начала собственно самого основного процесса синтеза ДНК, небольшой цепи ДНК или РНК с концом, к которому и присоединяется следующий нуклеотид. По этой причине ДНК-полимераза отстающей нити нуждается в действии фермента ДНК-праймазы перед тем, как она начнет синтез каждого нового фрагмента Оказаки. Праймаза производит очень короткую молекулу РНК (как РНК-праймер) в качестве 5'-конца каждого фрагмента Оказаки, к которому ДНК-полимераза и будет достраивать нуклеотиды. Наконец, одностранные участки ДНК внутри вилки покрыты множеством копий SSB белка (связывающего одностранную ДНК, single strand binding), занимая открытую область ДНК на нитях-матрицах с их подготовленными для копирования основаниями.

В представленной на вставке **б** схеме репликационной вилки показано, что ДНК-полимераза отстающей нити остается связанной с ДНК-полимеразой ведущей нити. Это позволяет ДНК-полимеразе отстающей нити оставаться внутри вилки после того, как завершён синтез очередного фрагмента Оказаки. В результате, одна и та же полимераза снова и снова участвует в синтезе большого числа фрагментов Оказаки, необходимых для образования новой цепи ДНК на отстающей нити.

В дополнение к перечисленной группе коровых (основных) белков, для репликации ДНК необходимы и другие белки, не представленные на рис. 1. Среди них можно описать группу белков – инициаторов репликации, необходимых для организации каждой новой репликативной вилки на ориджине репликации, белок РНКазу, удаляющий РНК-затравки фрагментов Оказаки, и ДНК-лигазу, сшивающую близлежащие фрагменты Оказаки друг с другом при формировании непрерывной нити ДНК.

РесQ-подобные геликазы вместе с топоизомеразой III также играют важную роль в репликации, а не только в других клеточных процессах, таких как гомологическая рекомбинация и контроль клеточного цикла.

Таким образом, мы видим, что процесс репликации очень сложен и может приводить к ошибкам в генетическом тексте, например, за счет подстановки неправильно спаренного или измененного основания. Одновременно процесс репликации является постоянным источником разрывов ДНК в клетке. Во-первых, всегда есть еще не соединившиеся фрагменты Оказаки. Во-вторых, при остановке движения репликативной вилки, чем бы она ни была вызвана, начинается процесс деградации ДНК и появляются ее свободные концы. В-третьих, топоизомераза I (TopI) катализирует две основные реакции – разрезание и воссоединение одностранных, нормально спаренной ДНК для релаксации ее суперскрученности при репликации или транскрипции. Множество эндогенных факторов действуют на эти две реакции разобщающее и приводят к образованию и накоплению TopI-разрешающего комплекса, который является переходным к образованию двустранных разрывов ДНК со всеми вытекающими последствиями. Таким образом, в течение процесса репликации структура ДНК может повреждаться и изменяться, а это уже само по себе является материалом для репарации.

1.2.1. Репарация за счет проверки ДНК-полимеразой.

Частота ошибочных встроек нуклеотидов в ходе репликации у бактерий составляет приблизительно 10^{-7} - 10^{-11} . При этом известно, что ДНК-полимераза, синтезируя новую цепь, делает ошибки примерно в 100 раз чаще. Подобное увеличение точности репликации связано с тем, что

одновременно ДНК-полимераза способна производить проверку встраивания. Большинство прокариотических, а также и эукариотических, полимераз в дополнение к полимеризующей активности в направлении $5' \rightarrow 3'$ имеет экзонуклеазную активность в направлении $3' \rightarrow 5'$. При встраивании «неправильного» нуклеотида ошибка обычно (хотя и не всегда) распознается самой полимеразой, вероятно, из-за того, что в этом месте в двойной спирали образуется пузырь или впячивание, наличие которых не позволят полимеразе добавить следующий нуклеотид к растущему $3'$ -ОН-концу. Процесс репликации не пойдет дальше до тех пор, пока «неправильный» нуклеотид не будет удален, а нужный не встанет на его место. У ДНК-полимеразы III *E.coli* эндонуклеазной активностью обладает субъединица ϵ (эпсилон), которая кодируется геном *mutD*, при инактивации которого возникают клетки с мутаторным фенотипом. Именно эта субъединица повышает точность ДНК-полимеразы III на 2-3 порядка. При мутациях гена *mutD* возникает дефект в системе проверки правильности встраивания нуклеотидов в направлении $3' \rightarrow 5'$. В результате многие из неправильно встроенных нуклеотидов остаются во вновь синтезированной нити ДНК и с той или иной вероятностью приводят к возникновению мутаций.

Корректирующая $3'$ - $5'$ -экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы сама по себе является достаточно сложным и энергоемким процессом. При расчистке участка ДНК с неправильно спаренным основанием происходит следующая цепь событий. Связывание dNTP с комплексом «ДНК-полимераза-матрица- $3'$ -конец синтезируемой нити» протекает, как минимум, через два конформационных изменения ДНК-полимеразы. При попадании неправильного dNTP в реакцию оба эти конформационные изменения замедляются, что способствует перемещению неправильного конца в активный центр $3'$ - $5'$ -экзонуклеазы (субъединицы ϵ) для расчистки участка ДНК вокруг неспаренного основания и его последующего ресинтеза. Так как биохимические реакции обладают некоторой инерционностью, в ходе расчистки удаляются не только неправильные, но и расположенные по соседству правильные нуклеотиды. Таким образом корректирующая активность ДНК-полимеразы не может превышать оптимальный предел, ведь в противном случае «сверхкорректная»

16

полимеризация потребовала бы огромных затрат энергии, одновременно приводя к резкому снижению скорости синтеза ДНК. Этот предел и ограничивает повышение точности репликации примерной величиной 10^2 .

Здесь нужно остановиться еще на двух моментах. Во-первых, на разных нитях ДНК корректирующая активность полимеразы проявляется в разной степени. Частота ошибок в отстающей нити всегда в 10-20 раз выше, чем в ведущей. Например, в клетке человека за раунд репликации образуется 2×10^6 фрагментов Оказаки. В начале синтеза каждого из них ДНК-полимераза α (ошибочность которой 10^{-4}) присоединяет 30-40 dNMP к РНК-праймеру. В процессе объединения фрагментов Оказаки большая часть этих dNMP выщепляется. Если предположить, что в каждом фрагменте Оказаки остается хотя бы один dNMP, присоединенный с помощью ДНК-полимеразы α , то, учитывая, что лишь 3 % ДНК млекопитающих транскрибируется, в транскрибируемой ДНК за раунд репликации образуется примерно 60 ошибок, подлежащих коррекции. Это является логическим объяснением того, что у эукариот ошибочность отстающей нити на порядок превышает таковую величину для лидирующей нити, где ДНК-полимераза α участвует только в инициации синтеза на ориджине репликации; один раз на весь репликон.

Во-вторых, PolIII способна корректировать преимущественно трансверсии из-за того, что пара пурин-пурин и пиримидин-пиримидин легче распознаются корректирующей активностью ДНК-полимераз, чем некомплементарные пары пурин-пиримидин. В то же время транзиции и сдвиги рамки считывания преимущественно исправляются уже после завершения репликации системой репарации неспаренных оснований (MMR, mismatch repair).

Вследствие этого транзиции происходят чаще, чем трансверсии, хотя теоретически должно быть наоборот - ведь каждый пурин может быть заменен на один пурин или на три пиримидина, а каждый пиримидин - на один пиримидин или два пурина.

Что же играет главную роль в распознавании корректирующей активностью ДНК-полимеразы неправильно подставленного нуклеотида? Каким образом отделить в эксперименте фактор энергетический

(необходимость образования водородных связей между двумя спаривающимися нуклеотидами) и фактор геометрический (необходимость правильной стереометрической формы образовавшейся пары)? Это в 1997 году удалось сделать Кулу с соавторами. Они использовали в качестве аналога тимина неполярный дифтортолуол (F) и соответствующий ему dFTP, который в полимеразной реакции подобен dTTP, но только стерически, так как совершенно не способен образовывать водородные связи. Удивительно, но частота ошибочного включения дифтортолуола напротив аденина оказалась на три порядка выше, чем частота такого же неправильного (вместо тимина) включения цитозина. То есть ДНК-полимераза предпочитает встраивать неспособный к образованию водородных связей, но более близкий к тимину стерически, фтортолуол, а не цитозин, способный к образованию водородных связей, но не столь идентичный тимину стерически. Таким образом, хотя это и выглядит почти фантастически, ДНК-полимеразы способны включать в синтезируемую нить любую органическую молекулу (представленную, естественно, в форме дезокситрифосфата), лишь бы она соответствовала структурным требованиям активного центра самого фермента и В-формы ДНК.

1.2.2. Участие корректирующих автономных экзонуклеаз в репликации и репарации ДНК.

Корректирующая экзонуклеазная активность не обязательно является частью процессивной ДНК-полимеразы. Достаточно часто в клетке для коррекции новосинтезированной ДНК привлекаются многочисленные автономные экзонуклеазы. Эти экзонуклеазы способны отщеплять неправильный нуклеотид, образуя (или не образуя) комплекс с ДНК-полимеразами.

При синтезе ведущей нити основную роль играют ДНК-полимераза III *E.coli*, ошибочность которой составляет 10^{-6} , а у эукариот ДНК-полимеразы ϵ и δ (ошибочность 10^{-5}). Различные автономные экзонуклеазы способны повышать точность этих процессивных полимераз в 5-10 раз.

При синтезе отстающей нити у *E.coli* в объединении фрагментов Оказаки участвует ДНК-полимераза I. Точность этой умеренно

процессивной полимеразы резко увеличивается в присутствии автономных экзонуклеаз.

Большинство систем репарации ДНК нуждаются в синтезе ДНК при исправлении ошибок. У *E. coli* в репарации ДНК существенное участие принимает ДНК-полимераза I, точность работы которой явно увеличивается в присутствии автономных экзонуклеаз. В клетке человека за сутки образуется в среднем 10^5 спонтанных повреждений ДНК в результате ее дезаминирования, депуринизации, окисления и неправильного метилирования. Большинство этих повреждений репарируются при участии ДНК-полимеразы β (ошибочность 10^{-3}). В результате этого в транскрибируемой ДНК каждый раунд репликации появляются приблизительно 3 ошибки, подлежащие коррекции. При работе другой системы репарации непроцессивные безнуклеазные сверхошибочные (ошибочность 10^{-2}) ДНК-полимеразы ведут синтез ДНК в обход повреждений в ДНК-матрице. После завершения синтеза на поврежденной матрице они должны быть заменены, по-видимому, с помощью репликативного фактора C, на основную элонгирующую ДНК-полимеразу δ (ошибочность 10^{-5}). Но в силу той же инерционности биохимических реакций замена не происходит мгновенно, что требует исправления ошибок (совершенных непроцессивными полимеразми напротив неповрежденной матрицы), в том числе с участием автономных экзонуклеаз. В экстрактах клеток человека недавно показана экзонуклеазная коррекция ошибок, допущенных сверхошибочной ДНК-полимеразой η (эта). Наконец, автономные экзонуклеазы участвуют в коррекции гетеродуплексов.

Все виды экзонуклеазной коррекции должны закончиться за время данной репликации. По-видимому, коррекция ДНК-полимеразных ошибок - весьма эффективный процесс, поскольку анализ генома человека показал, что дивергенция последовательностей в транскрибируемой ДНК составляет примерно 0,1% при исследовании ДНК от 24 человек различных этнических групп.

2. Типы повреждений ДНК

Большинство повреждений ДНК не являются результатом только ошибок репликации. Множество повреждений возникает в любое время клеточного цикла под действием как экзогенных, так и эндогенных факторов. В табл. 1. схематично изображены основные типы повреждений ДНК, которые опознаются и устраняются различными системами репарации.

Ультрафиолетовые лучи вызывают образование пиримидиновых димеров, 6,4-фотопродуктов, аддуктов, разрывов и прочие повреждения ДНК. Под действием химических агентов происходят разного рода модификации нуклеотидов, возникают межнитевые сшивки, конформационные дефекты. Двунитевые разрывы могут приводить к перестройкам хромосом, что и является главной причиной летального действия ионизирующей радиации.

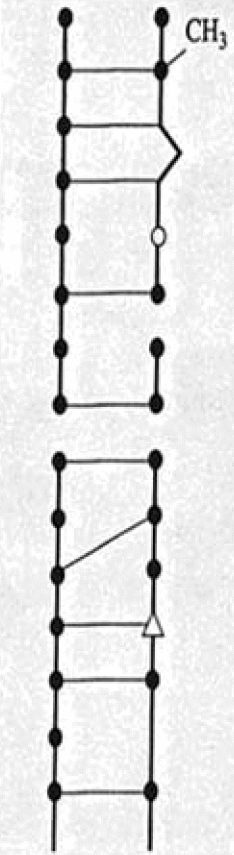
ДНК	Повреждение	Воздействие
	Алкилирование	Химические агенты (мутагены)
	Пиримидиновый димер	УФ-облучение
	Аддукт	Радиация, химические агенты
	Однонитевой разрыв	Радиация, химические агенты
	Двунитевой разрыв	Ионизирующая радиация
	Межнитевая сшивка	Химические агенты
	8-оксигуанин	Токсичные радикалы
	Апуриновая брешь (апиримидиновая)	Спонтанные (t° , pH), химические агенты

Таблица 1. Основные типы повреждений ДНК.

В результате внутриклеточных процессов в ДНК образуются многочисленные АР-сайты из-за спонтанной утраты пуринов/пиримидинов, окисленные участки (например, 8-оксигуанин), возникающие под действием токсических радикалов, постоянно генерируемых в процессах метаболизма.

Следует заметить, что все повреждения показаны только схематически, так как любое из них вызывает локальное изменение структуры ДНК вокруг, а разрывы ДНК почти всегда сопровождаются и модификацией прилежащих к ним оснований. Кроме обычно упоминаемых пиримидиновых димеров, под действием УФ облучения образуются и другие повреждения, например, 6,4-фотопродукты. В дальнейшем, описывая различные системы репарации ДНК, мы будем подробно останавливаться на тех типах повреждений, которые они способны исправлять.

3. Многообразие систем репарации ДНК

Системы репарации ДНК крайне разнообразны - от простых одноэтапных (фотореактивация, деалкилирование) до сложнейших, многоэтапных механизмов, контролируемых большим числом генов и, включающих соответственно, большое число белков. Этим репарация принципиально отличается от процессов репликации и рекомбинации, обходящихся существенно более ограниченным набором биохимических реакций. Множественность частично перекрывающихся и дополняющих друг друга систем репарации, даже некоторая их избыточность, повышает надежность защиты генома и расширяет возможности обеспечения его работы в онтогенезе и при различных физиологических условиях. Классификация процессов репарации ДНК строится на тех реакциях, которые являются их основой. Выделяются реакции прямой репарации, системы эксцизионной репарации ДНК, репарация с привлечением рекомбинации, пострепликативная репарация, репарация двунитевых разрывов, репаративный обход повреждения, причем иногда один и тот же тип репарации может иметь несколько разных названий. В результате

исследований последних лет эта классификация менялась и уточнялась, что мы в дальнейшем будем учитывать.

4. Прямая репарация ДНК

Самый простой и эффективный путь восстановления поврежденных нуклеотидов в составе ДНК – это прямое обращение тех химических реакций, индуцированных химическими или физическими агентами, результатом которых стало данное повреждение. Такой способ устранения повреждений принято называть прямой репарацией. К сожалению, с помощью реакций этого типа может быть исправлено только ограниченное число повреждений. Реакциями прямой репарации являются фотореактивация, репарация с помощью метилтрансфераз (репарация алкилированного гуанина), прямая вставка пуринов инсертазой и прямое зашивание одонитевых разрывов полинуклеотидлигазой.

4.1. Фотореактивация.

Фотореактивация – первый из описанных (еще до появления модели ДНК Уотсона и Крика) процессов репарации, поэтому на истории его открытия мы подробно остановимся. Намек на то, что живые клетки способны выживать после действия летальной дозы УФ облучения появляются в научном сообществе чуть раньше середины 1930-годов. Разразившаяся Вторая мировая война задержала открытия этого механизма ДНК-репарации повреждений, возникающих в результате УФ облучения до конца 1940-х, до независимых одновременных наблюдений Альберта Кельнера (эмигранта из Германии), работавшего в группе Мицислава Демерека в лаборатории Колд-Спринг-Харбора, и Ренато Дальбекко из лаборатории Сальватора Лурии в университете Индианы. В 1949 году немецкий генетик Альберт Кельнер, бежавший из гитлеровской Германии в США, обнаружил, что в клетках бактерий и грибов, таких, как стрептомицеты и пенициллы, облученных ультрафиолетовым (УФ) светом, а затем перенесенных на видимый свет, частота мутаций падает, а выживаемость резко возрастает по сравнению с клетками, оставленными после облучения в темноте. Кельнер пришел к выводу, что на свету проходят реакции восстановления и какие-то поврежденные молекулы или

части их возвращаются к норме. Нужно подчеркнуть, что в 1949 году большинство генетиков еще не понимали ведущей роли ДНК в наследственности, имели весьма смутные представления о структуре хромосом и даже не знали, что дрожжи и другие грибы являются эукариотами. Поэтому объяснение, данное Кельнером восстановлению повреждений на свету, было по-настоящему пионерским. Макс Дельбрюк, другой эмигрант из Германии, будущий Нобелевский лауреат, подсказал Кельнеру название для описанного им явления — фотореактивация. В том же 1949 году сходный процесс был найден независимо Р. Дальбекко у бактериофагов. Ни Кельнер, ни Дальбекко не занимались изучением повреждений ДНК или их репарацией. Они оба использовали УФ-облучение как экспериментальный инструмент и заметили неожиданно высокие уровни выживаемости, когда клетки или бактериофаги (вирусы бактерий) после УФ-облучения в результате лабораторной ошибки во время их исследований в соответствующих лабораториях оказались на свету. Их старания объяснить эти поразительные наблюдения привели к открытию феномена фотореактивации, когда полученные при облучении УФ-светом ДНК-повреждения репарируются в реакции со светозависимым ферментом.

Кельнер считается первооткрывателем фотореактивации потому, что именно он пришел к выводу, что за процесс исправления ответственна простая реакция в наследственном аппарате. Этот вывод был сделан еще до постулирования существования ДНК в виде двойных спиралей и признания за ДНК функции наследственных молекул.

В этой истории есть еще одно забавное совпадение. Как раз в то самое время, когда Дальбекко наткнулся на фотореактивацию, Уотсон был аспирантом в той же самой лаборатории Лурии и сам в своем диссертационном исследовании занимался эффектами ионизирующей радиации. Удивительно, что всего через 4 года при открытии Уотсоном и Криком структуры ДНК, ни Дальбекко, ни сам Уотсон даже не подумали о репарации ДНК.

Процесс фотореактивации состоит в том, что тиминовые димеры, возникшие в результате УФ-облучения, разрушаются, и тимины возвращаются к своей исходной форме под действием видимого света. Что

же такое представляет собой пиримидиновый димер? В 1960 году голландские ученые Р. Бьюкерс и У. Верендс изучили химию процесса повреждения нуклеиновых кислот УФ-светом и выделили продукт, специфический для данного повреждающего агента. Оказалось, что двойная связь между пятым и шестым атомами углерода в составе пиримидиновых оснований (тимине и цитозине в ДНК и цитозине и урациле в РНК) под действием УФ-света может рваться. Атомы остаются связанными одиночной связью, а в результате разрыва другой связи образуются две свободные валентности.

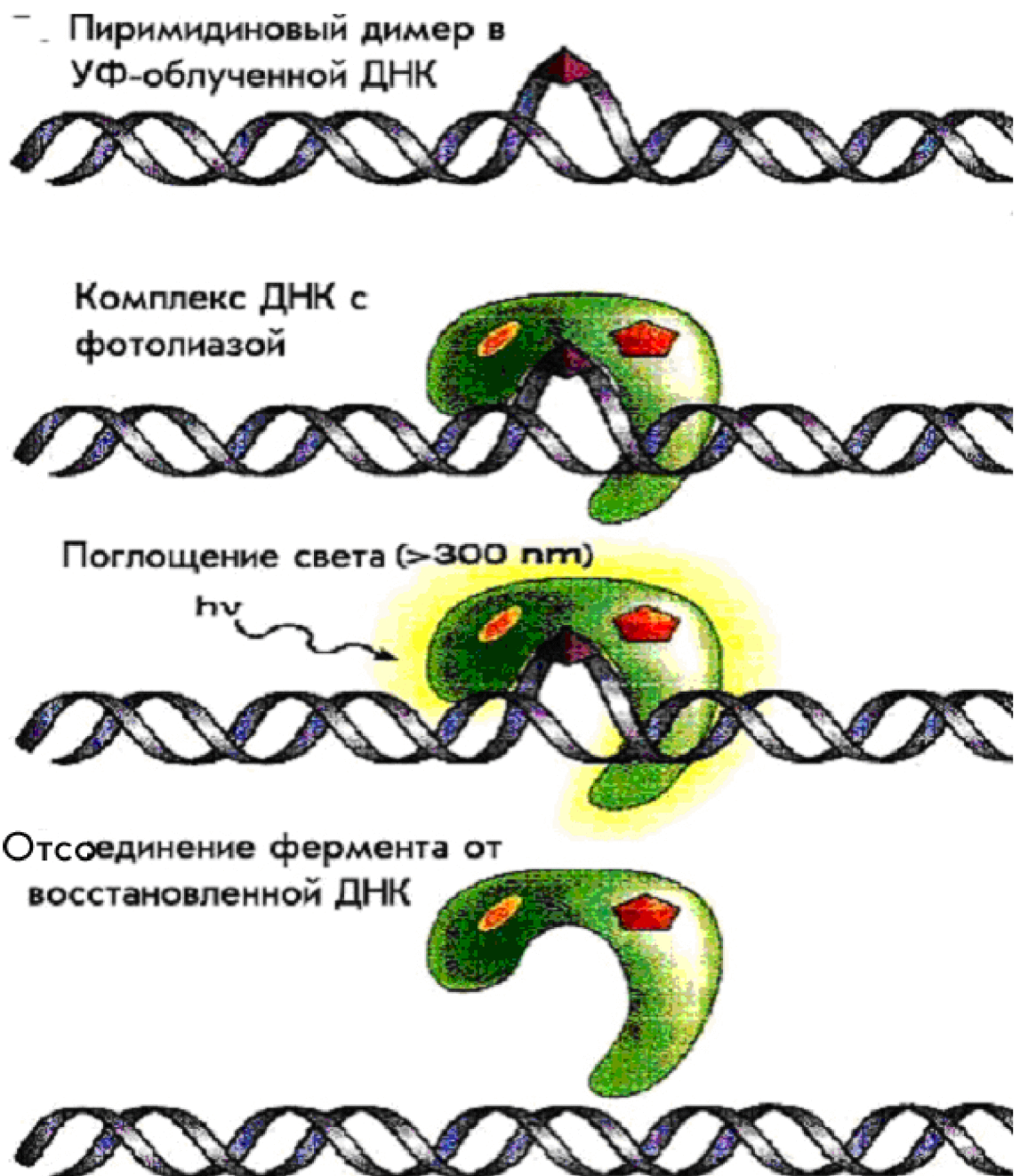


Рисунок 2. Схема фотореактивации

Обычно ДНК в клетках находятся в так называемой В-форме, когда плоскости оснований параллельны друг другу и расстояние между плоскостями равно примерно 3,4 А. Это расстояние оказывается как раз таким, чтобы освободившиеся при УФ-облучении валентности между $C_5=C_6$ атомами пиримидиновых оснований, расположенных рядом в цепи ДНК, могли замкнуться друг на друга и сформировать более сложное, так называемое цикlobутановое кольцо. Если димеризация произошла в РНК,

то могут возникнуть димеры урацила и любого другого пиримидинового основания. Довольно часто употребляют и другой термин для их обозначения — пиримидиновые димеры. В зависимости от того, какие основания соединены в димер, их называют димерами тимина, димерами цитозина или тимин-цитозиновыми димерами.

Сущность процесса фотореактивации, изображенного на рис. 2, заключается в том, что фермент фотолиаза расщепляет вновь образовавшиеся связи между соседними основаниями и восстанавливает нативную структуру ДНК. В 1963 году фотолиаза *E. coli* была выделена и очищена. Этот белок кодируется геном *phr*, а линии с мутациями гена *phr* имеют дефекты световой репарации.

Все описанные к настоящему времени участвующие в фотореактивации белки относятся к семейству фотолиаз\криптохромов. Фотолиазы были найдены у бактерий, дрожжей, дрозофилы, ксенопуса, иглокожих, но не у высших млекопитающих, включая человека. Эти белки являются мономерами с молекулярным весом 55-70 кД, имеющими два нековалентно связанных хромофора: первый хромофор это флаavin, а второй – фолат (или дезафлавин). Фотолиаза светонезависимым образом (то есть в темноте) связывается с вызванным УФ-облучением повреждением ДНК. Сама же реакция репарации является светозависимой. Фотолиаза может восстанавливать как пиримидиновые димеры, так и (6-4)фотопродукты – другой тип повреждения ДНК, обычно возникающий под действием УФ-облучения. При образовании этого фотопродукта новые связи возникают между 6 и 4 атомами углерода соседних оснований, оно менее устойчиво, чем пиримидиновые димеры, и поэтому не является такой удобной экспериментальной моделью и несколько хуже изучено.

После расщепления связей в поврежденных основаниях и восстановления их формы фотолиаза отходит от ДНК. Прямое восстановление структуры ДНК на этом завершено.

Это единственная пока найденная ферментная реакция, в которой фактором активации служит не химическая энергия, а энергия видимого света. Все остальные типы репарации не требуют активации светом и потому первое время носили собирательное название "темновая репарация". Сейчас этот термин практически не встречается.

У человека белки – гомологи фотолиаз участвуют не в процессах репарации, а в регуляции циркадного ритма. Были клонированы гены hCry1, hCry2, mCry1, mCry2 (human/mouse circadian rythm). Эти гены экспрессируются в самых разных тканях – мозгу, печени, яйчиках, сетчатке и действуют, как циркадные проторецепторы. Вероятно, они являются антагонистами, так как у мышей дефектных по mCry1 циркадные периоды укорачиваются, а у дефектных по mCry2 – напротив, удлиняются. Гены Cry представляют собой очень интересный пример эволюционного изменения функции репарационных генов.

4.2. Репарация O⁶-алкилированного гуанина.

В 1944—1948 годах выдающийся советский генетик И.А. Рапопорт нашел новый класс химических мутагенов, способных добавлять к взаимодействующим с ними молекулам алкильные (метилловые, этиловые, пропиловые, бутиловые) боковые группы, и назвал их алкилирующими агентами. В конце 60-х годов стало ясно, что обработка клеток алкилирующими агентами вызывает, в зависимости от агента N- или O-алкилирование пуринов и пиримидинов, а также трифосфатов. Один из наиболее мощных алкилирующих мутагенов, метил-нитро-нитрозогуанидин, может алкилировать гуанин, присоединяя метальную группу к кислороду, связанному с шестым атомом кольца. Полученный продукт был назван O⁶-метил-гуанином. В 1978-1979 годах генетики и биохимики обнаружили, что метильная группа может отщепляться от гуанина и тогда происходит прямое восстановление структуры ДНК в этой точке. В 1982—1988 годах было установлено, что такой же механизм функционирует при репарации O⁴-алкилтимина.

Последующие исследования показали, что в клетках млекопитающих есть целый класс белков метилтрансфераз, которые могут захватывать метальные группы от модифицированного гуанина, переносить их с поврежденного основания на цистеин метилтрансферазы и благодаря этому восстанавливать исходную структуру ДНК. При этом сами метилтрансферазы инактивируются. Например, фермент, кодируемый геном ada (O⁶-метил-гуанин-трансфераза), распознает O⁶-метилгуанин в ДНК и удаляет метильную группу, возвращая основание в исходную

форму. Репарацией O^4 -алкилтимина ведает O^4 -метил-тимин-ДНК-метилтрансфераза. Важно понять, что метилтрансфераза, захватив метильную группу, не может от нее освободиться. Тем самым в прямом смысле метилтрансферазы не являются ферментами, так как настоящие ферменты по определению не изменяются в ходе реакций. Если для каждого акта прямой репарации O^6 -метилгуанина или O^4 -алкилтимина нужна новая молекула белка, клетка вынуждена запускать синтез новых его порций. Обычно для обеспечения репарации внутри клетки их накапливается несколько тысяч, по одной молекуле уходит на каждое повреждение. Если процесс возникновения новых повреждений в ДНК идет медленнее, чем синтез новых порций метилтрансфераз, то последних хватает на захват всех метильных групп в гуанинах, и мутации не возникают. Если же скорость внесения новых повреждений превышает скорость синтеза метилтрансфераз, последние перестают справляться со всеми повреждениями, и в клетках накапливаются метилированные основания и предшественники.

В минуту в клетке *E. coli* может синтезироваться порядка 100 молекул метилтрансфераз. Следовательно, мутации не возникнут, если скорость возникновения повреждений будет меньше 100 в минуту. Для сравнения: кишечные палочки делятся каждые 30 минут и, таким образом, клетка за один клеточный цикл может накопить не более 3000 метилтрансфераз. У *E. coli* устойчивость к алкилирующим агентам связана с 4 генами, *ada*, *alkA*, *alkB*, *aidB*, но только ген *ada* вовлечен в репарацию O^6 -метилгуанина.

Необходимо отметить, что O^6 -алкилгуанины являются одними из самых значимых повреждений, несмотря на то, что их общее количество среди всех повреждений ДНК, вызванных алкилированием меньше 8%. В основном это O^6 -метилгуанин и O^6 -этилгуанин, основания, способные к неправильному спариванию и являющиеся основной причиной возникновения транзиций GC-AT. К тому же именно эти повреждения не удаляются другими системами репарации, например, эксцизионной репарацией оснований (base excision repair, BER), а при действии другой эксцизионной системы репарации - репарации неспаренных оснований (mismatch repair, MMR), приводят к возникновению двунитевых разрывов. Другим столь же серьезным предмутационным алкилированным

28

основанием является появляющийся крайне редко O^4 -метилтимин,— всего менее 0.4% среди всех вызванных алкилированием повреждений. То есть в случае двух данных повреждений при инактивации или подавлении их прямого восстановления с участием метилтрансфераз, другие системы репарации окажутся бессильны.

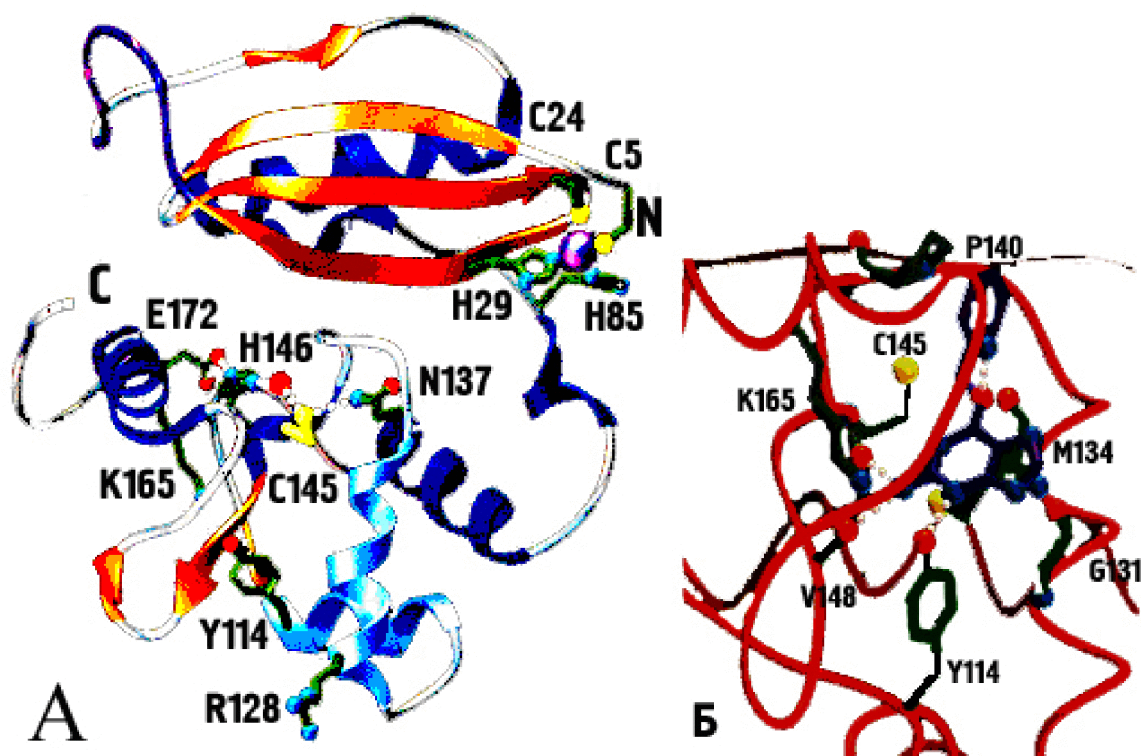


Рисунок 3. AGT человека (А - схема всего белка, Б - схема его активного центра)

В человеческих клетках O^6 -алкилированные повреждения могут быть восстановлены в прямой реакции O^6 -метилгуанин-ДНК-метилтрансферазой (MGMT, ATase, AGT, AGAT), которая является гомологом продукта гена *ada* (ADA) *E.coli*, структура которой изображена на рис. 3.

С-концевой домен (остатки 86-207) содержит консервативный активный сайт с цистеиновым мотивом (IPCHRV), канал для связывания

O⁶-алкилгуанина и ДНК-распознающий мотив спираль-поворот-спираль (H6), работающий благодаря его внедрению в глубокую бороздку ДНК.

Гуанин «втаскивается» внутрь активного канала вдоль распознающей спирали. Гуанин-специфические водородные связи устанавливаются между белком и ДНК.

Человеческий MGMT ген картирован на 10q26 и кодирует белок с молекулярным весом в 24 кД, состоящий из 207 аминокислотных остатков. Этот белок переносит метил или хлорэтил из поврежденного гуанина на остаток цистенина в своем активном центре. Активность MGMT была измерена в различных тканях человека, как нормальных, так и опухолевых и было показано, что его экспрессия, особенно в опухолевых тканях, может быть различной. Клетки, дефектные по этому гену, не способны к репарации O⁶-алкилгуанина, в них резко повышен уровень мутаций, вызываемых алкилирующими агентами, сестринских хроматидных обменов и хромосомных aberrаций. Мыши, нокаутные по MGMT жизнеспособны, но у них резко повышено количество спонтанно возникающих опухолей и они чувствительны к действию алкилирующих агентов. Напротив, у мышей с оверэкспрессией MGMT спонтанные опухоли развиваются значительно реже, чем у контрольных. MGMT был первым геном млекопитающих, у которого была показана экспрессия, индуцированная действием генотоксического стресса и глюкокортикоидов, приводящая к адаптивному ответу клетки на мутагенное и токсическое действие простых алкилирующих агентов.

Экспрессия MGMT регулируется метилированием как самого гена, так и его промотора, причем метилирование промотора приводит к ее ингибированию, а метилирование самого гена к повышению экспрессии MGMT. С метилированием MGMT также связана повышенная устойчивость клеток меланомы к действию хлорэтиловых антиопухолевых препаратов.

4.3. Репарация одонитевых разрывов ДНК.

Еще один тип реакций прямой репарации был обнаружен для одонитевых разрывов ДНК, индуцируемых, например, ионизирующим

излучением. При этом с помощью фермента ДНК полинуклеотидлигазы (от англ. *ligase* — соединять, связывать) происходит прямое воссоединение разорванных концов в молекуле ДНК. Здесь у нас есть возможность немного подробнее остановиться на роли лигаз в клетке. ДНК лигазы являются важными ферментами метаболизма ДНК. Они катализируют реакцию объединения концов ДНК, необходимую для репликации ДНК и для тех путей репарации, при которых есть репаративный синтез. У большинства организмов лигазы используют энергию АТФ, и лишь у эубактерий – энергию НАД(+). Интересно, что несмотря на различия в аминокислотных последовательностях и биохимических реакциях между этими двумя классами лигаз, структура аденилирующего домена у них совершенно одинакова.

Полинуклеотидлигаза является основным ферментом у *E.coli*, а высшие организмы производят несколько различных лигаз, имеющих специфические мишени и функции. Лигаза I необходима для сшивания фрагментов Оказаки и некоторых репарационных реакций, лигаза II не является отдельным самостоятельным ферментом, а появляется как продукт деградации лигазы III, ДНК лигаза III имеет несколько изоформ, вовлеченных в процессы репарации и рекомбинации, а ДНК лигаза IV необходима для V(D)J рекомбинации и негомологичного соединения концов ДНК при воссоединении двунитевых разрывов. Изучение аминокислотной последовательности и структурный анализ показали, что все лигазы построены вокруг общего каталитического кора, подобного таковому у лигазы бактериофага T-7, структура которого до сих пор недостаточно ясна.

4.4. Репарация AP-сайтов за счет прямой вставки пуринов.

Голландский ученый Т. Линдал в 1979 году нашел, что при некоторых типах повреждений пуриновых оснований ковалентная связь между основанием и сахаром (гликозидная связь) может рваться. Тогда в молекуле ДНК на месте этих оснований образуется брешь, названная AP-сайтом. Термин приложим также к случаям, когда из ДНК выпадают пиримидиновые основания (термин AP-сайт, таким образом, объединяет все случаи выщепления оснований с образованием и апуриновых и

апирииминовых сайтов). Описаны ферменты, названные инсертазами (insert — вставлять), которые могут вставлять в брешь такое же основание, какое было до повреждения, и соединять его с сахаром. Например, ДНК-пурин-инсертаза, которая катализирует образование N-гликозидной связи между 1-атомом дезоксирибозы апуринов/апирииминового сайта (AP-сайта), образовавшегося напротив пиримидина, и комплементарным ему основанием. Структура ДНК приобретает исходный неповрежденный вид. Однако только ограниченное число AP-сайтов может быть исправлено с помощью этого типа реакции.

5. Эксцизионная репарация.

Существуют более сложные реакции восстановления, напоминающие хирургические вмешательства в структуру ДНК, когда поврежденные участки вырезаются из цепи ДНК (отсюда происходит и термин "эксцизионная репарация", от excision — вырезание), а затем образовавшиеся бреши заполняются неповрежденным материалом. Все типы эксцизионной репарации имеют общие этапы:

1. Распознавание повреждения.
2. Надрезание нити ДНК (сахарофосфатного остова).
3. Эксцизия участка, содержащего повреждение.
4. Репаративный синтез на неповрежденной матрице и лигирование.

Три основных типа эксцизионной репарации получили свои названия в зависимости от того, какие именно повреждения будут исправляться. Эти типы репарации, несмотря на лежащий в их основе общий процесс вырезания участка ДНК с повреждением, принципиально различаются между собой.

5.1. Эксцизионная репарация оснований (base excision repair, BER)

Объектом BER служат неправильно спаренные, алкилированные, окисленные и тому подобное, основания. Как мы уже упоминали ранее, за сутки в каждой клетке человека происходит не менее 10^5 нуждающихся в коррекции модификаций оснований. Этот тип повреждений не вызывает серьезных изменений в структуре двойной спирали ДНК, приводящих к нарушению репликации ДНК и остановке клеточного цикла, но служит

источником мутаций. Механизм BER, возможно, является наиболее древним и важным. Первый этап распознавания поврежденных оснований в этой системе репарации осуществляют специальные белки – гоикозилазы. Это высокоспецифические ферменты, гидролизующие N-гликозидную связь между сахарофосфатным остовом и поврежденным основанием.

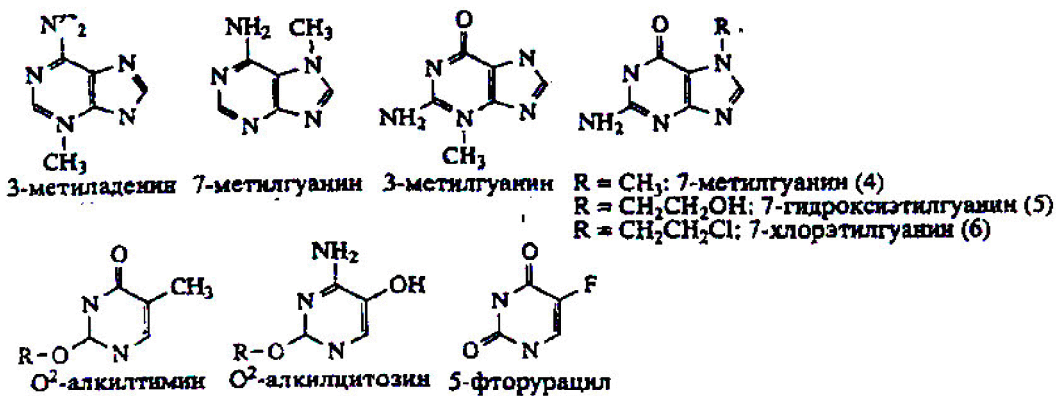
ДНК-гликозилазы различаются по своей субстратной специфичности, то есть они способны распознавать только определенные поврежденные основания, а не все подряд. У некоторых из них спектр распознаваемых повреждений достаточно широк, а у некоторых – крайне узок. На рис. 4 приведены различные типы повреждений оснований, которые могут распознаваться и репарироваться системой BER. Обычно определенные повреждения репарируются определенными гликозилазами.

У *E.coli* к настоящему времени выделено и описано 8, а у человека - 11 различных гликозилаз. В табл. 2 приведены названия 11 описанных к настоящему времени гликозилаз человека и указана специфичность распознавания ими модифицированных или неправильно спаренных оснований. Обратите внимание, что ни одна из гликозилаз не распознает O^6 -MeG.

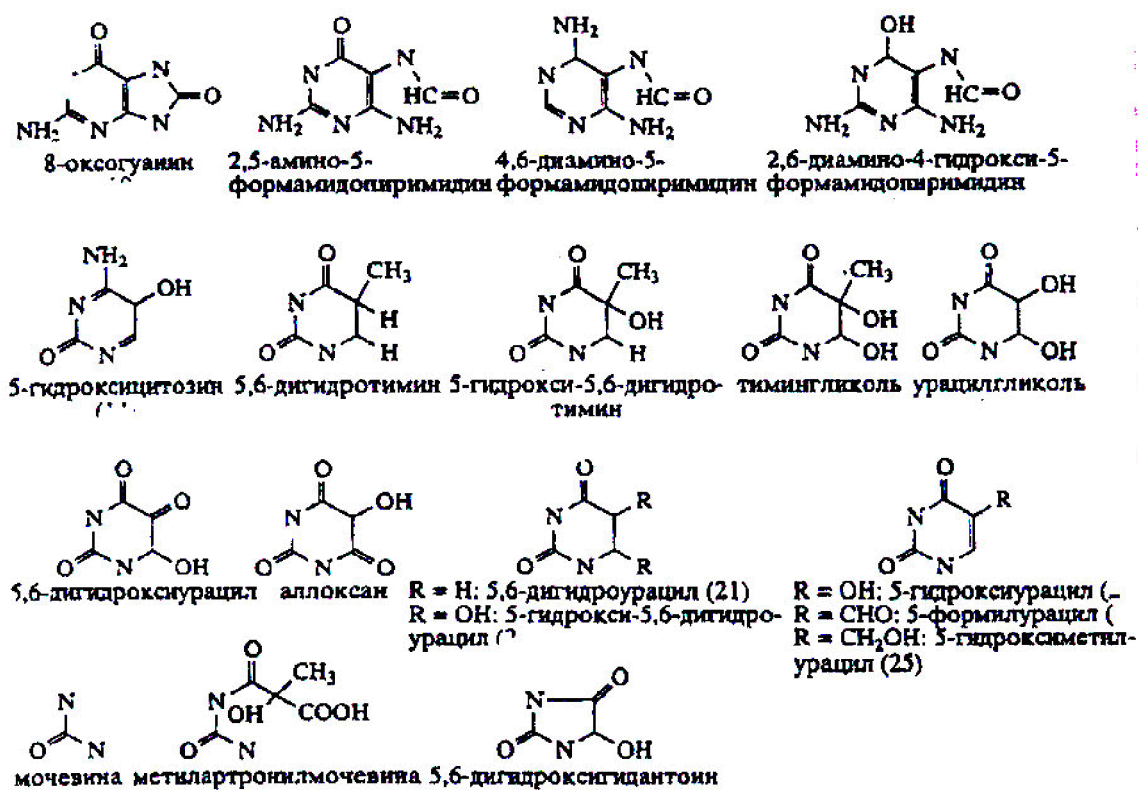
Гликозилазы бывают двух типов – 1 типа убирают измененное основание, оставляя в цепи AP-сайт, а 2 типа сразу же надрезают после удаления основания AP-сайт с помощью эндогенной 3'-эндонуклеазы, оставляя после себя одонитевой разрыв. В таком случае принято указывать, что ДНК-гликозилазы 2 типа обладают не только гликозилазной, но и AP-лиазной активностью.

К ферментам 2 типа относится, например, OGG1 (8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза эукариот) удаляющая 8-охоG, к тому же эта гликозилаза обладает и дезоксирибофосфатазной активностью.

Алкилированные или галогенированные основания



Окисленные и с нарушенной целостностью кольца основания



Дезаминированные основания

Другие

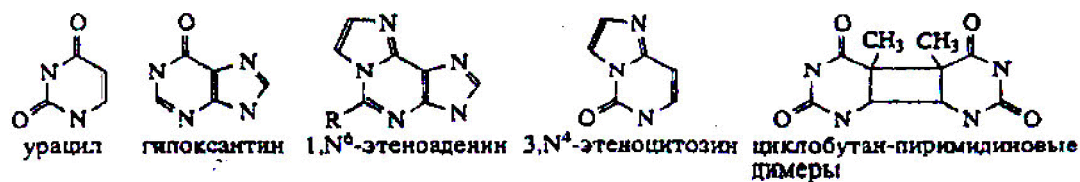


Рисунок 4. Типы повреждений оснований, репарируемые системой BER.

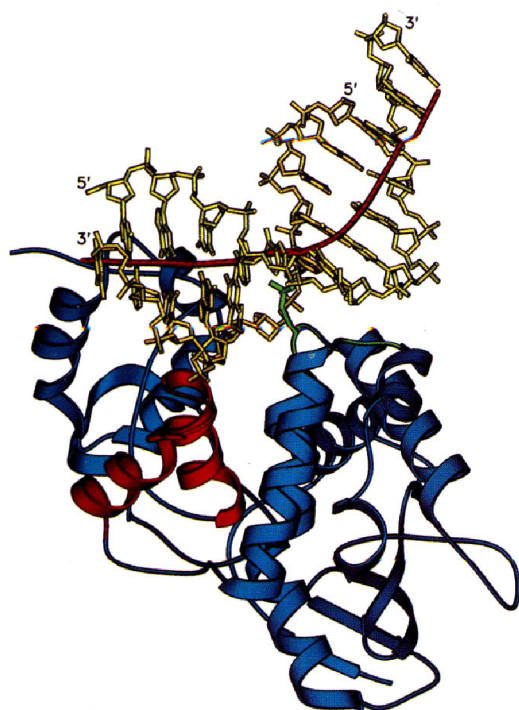
Здесь можно остановиться на систематике особых белков - нуклеаз. Они найдены у всех живых организмов - у бактерий, растений, животных, включая человека. Нуклеазами называют ферменты, способные расщеплять сахарофосфатную цепь. Они могут рвать эту цепь внутри полимерной молекулы ДНК или РНК, и тогда их называют эндонуклеазами, или же с концов полимеров, и тогда их называют экзонуклеазами. AP-эндонуклеазы принято делить на два класса: AP-лиазы (AP-эндонуклеазы первого типа) расщепляют связь между 3'-О-атомом дезоксирибозы и атомом фосфора. AP-эндонуклеазы второго типа осуществляют гидролиз связи между 5'-О-атомом дезоксирибозы и атомом фосфора, при этом образуется 5'-дезоксирибоза-5-фосфат и нуклеотид с 3'-гидроксильной группой. Эндонуклеазы второго типа ответственны за репарацию как спонтанно возникающих, так и AP-сайтов, образующихся в ходе гидролиза N-гликозидной связи простыми гликозилазами 1 типа без лиазной активности. Это специальные AP-эндонуклеазы APE1, APEX, Ref-1 или HAP1. APE1 (AP endonuclease-1) активируется взаимодействием с белком XRCC1 и действует с ним в комплексе. О белках, называемых XRCC (X-ray-induced damage repair cross complementing) и их роли в различных репаративных реакциях мы поговорим позже. К настоящему времени *in vitro* проведена эффективная репарация неспаренных оснований U-G с возвращением к паре C:G. Реакция требовала присутствия урацил-ДНК-гликозилазы (UNG), AP-эндонуклеазы (APE1), ДНК-полимеразы β ($\text{pol}\beta$) и лигазной активности, обеспечиваемой гетеродимером лигаза III/белок XRCC1. На первом этапе реакции белковая глобула UNG при связывании «покрывает» 10 пар оснований ДНК, причем каждая из этих пар взаимодействует со своим подцентром UNG, а распознаваемый урацил (то есть, собственно, связывающийся с активным центром гликозилазы) расположен на расстоянии одного-двух звеньев от 5'-конца декануклеотида, «покрытого» ферментом.

MBD4	U и T напротив C
MPG	5-MeA, 7-MeG, 3-MeG, этеноА, гипоксантин
MYH	A напротив 8-оксигуанина
NEIL1	Формаидопиримидины, тиминовые гликоли
NEIL2	5-гидроксиурацил, 5-гидроксицитозин
NEIL3	Фрагментированные и окисленные пиримидины
NTH1	Окисленные, фрагментированные пиримидины, пиримидины с разомкнутым кольцом
OGG1	8-оксигуанин, спаренный с C, T и G
SMUG1	Урацил
TDG	U и этеноС напротив G; T напротив G, C и T
UNG (UDG)	Урацил

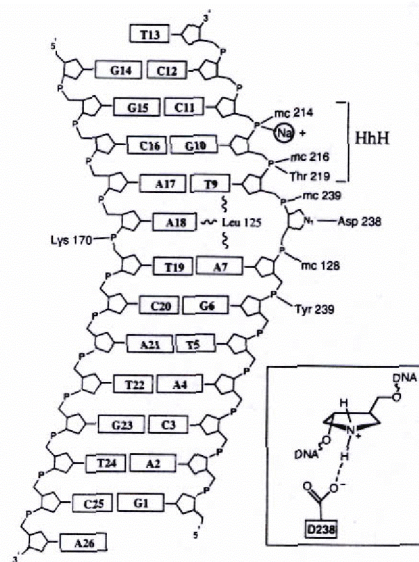
Таблица 2. Гликозилазы в клетках человека

Сравнение данных структурного анализа и аминокислотных последовательностей выявляет общие черты для многих ДНК-гликозилаз. У большинства ферментов в активном центре обнаружен один и тот же повторяющийся мотив «спираль-шпилька-спираль» (Helix-hairpin-Helix, HhH). Помимо HhH-мотива в ДНК-связывающих центрах многих ферментов репарации обнаружен остаток консервативного Asp и Pro/Gly богатый район. Механизм узнавания ДНК для всех гликозилаз сходен, и активные центры этих ферментов могут связываться только с «вывернутыми» из спирали ДНК основаниями. Строение одной из гликозилаз (ALKA-1) и способ ее взаимодействия с поврежденным основанием показаны на рис. 5.

На рисунке 5а показано, как ДНК изгибается под углом 66 градусов под влиянием внедрения лейцина-125 и белковых петель α D- α E и α G- α H (показаны более светлым). Белок заякоревается на ДНК с помощью мотива спираль-шпилька-спираль (HhH), показанного густо-серым. Локальная ось ДНК показана черным.



а



б

Рисунок 5. Схема действия ALKA-1.

а - ALKA-1-индуцированное расщепление ДНК, **б** - Схематическая диаграмма контакта ALKA-1 с ДНК.

На рисунке 5б видно, что AP-сайт характеризуется вывернутой позицией сахарного остатка, взаимодействующего с аспаргином 238. Лейцин-170 взаимодействует с другой нитью ДНК. HhH работает якоре ДНК на белке.

Несмотря на столь высокое функциональное сходство гликозилаз и их присутствие практически у всех организмов, поиск среди них генов-гомологов пока нельзя признать успешным. Четкая эволюционная линия гомологов найдена только для урацил-ДНК-гликозилазы - гены *ung*, *UNG* и *hUDG* в клетках *E. coli*, *S. cerevisiae* и человека соответственно. Индуцибельная полифункциональная гликозилаза AlkA из *E. coli* (схема строения которой приведена на рис. 5), репарирующая различные продукты метилирования оснований, оказалась гомологична N-гликозилазе

MAG из *S. cerevisiae* и аналогична гликозилазе MPG из клеток человека. А в клетках *S. cerevisiae* недавно обнаружен гомолог формамидопиридин-ДНК-гликозилазы Fpg из *E. coli*.

Схема процесса BER представлена на рис. 6. После распознавания повреждения гликозилазами и внесения разрыва в сахарофосфатный остов у *E. coli* в работу вступает еще один фермент — фосфодиэстераза, который отщепляет от ДНК ту сахарофосфатную группу, к которой теперь не присоединено основание. Появляется брешь в одной цепи ДНК размером в один нуклеотид. Напротив бреши в противоположной нити ДНК расположен неповрежденный нуклеотид, и следующий фермент — ДНК полимеразы I вставляет в брешь комплементарный ему нуклеотид, присоединяя его к свободному 3'ОН-концу. Чтобы соединить два свободных конца (3'ОН-конец вставленного нуклеотида и 5'-конец, ранее образовавшийся при разрыве нити ДНК АР-эндонуклеазой), вступает в действие еще один фермент - полинуклеотидлигаза. У человека это соответственно ДНК-полимераза β и лигирующий комплекс лигазы III/белок XRCC1. N-концевой участок этого белка взаимодействует с ДНК-полимеразой β , а С-концевой участок – с ДНК-лигазой III, выполняя структурную функцию. Это один из двух путей BER, при котором брешь в ДНК не превышает 1 нуклеотида. Этот путь носит названия репарации короткими фрагментами (short path repair). Но есть и другой путь, при котором выщепляется 2-13 нуклеотидов и он носит название репарации длинными фрагментами (long path repair). В этом случае репаративный синтез ДНК (начиная со второго нуклеотида) осуществляется полимеразой δ или ϵ , функционирование которых зависит от факторов пролиферации PCNA (proliferating cell nuclear antigen) и репликации RFC (replication factor C). Образовавшийся 3'-конец служит мишенью для привлечения RFC, который в свою очередь помогает PCNA связаться с ДНК.

Во время этого синтеза участок цепи ДНК, ранее спаренный с тем, который служит матрицей для синтеза, вытесняется, образуя свободно свешивающийся фрагмент ДНК – flap. Затем его удаляет специальная эндонуклеаза - ДНКаза IV у прокариот или FEN1 (flap endonuclease I) у

эукариот. В настоящее время показано, что FEN1, как и процессивные полимеразы, связана с PCNA, который ее активирует.

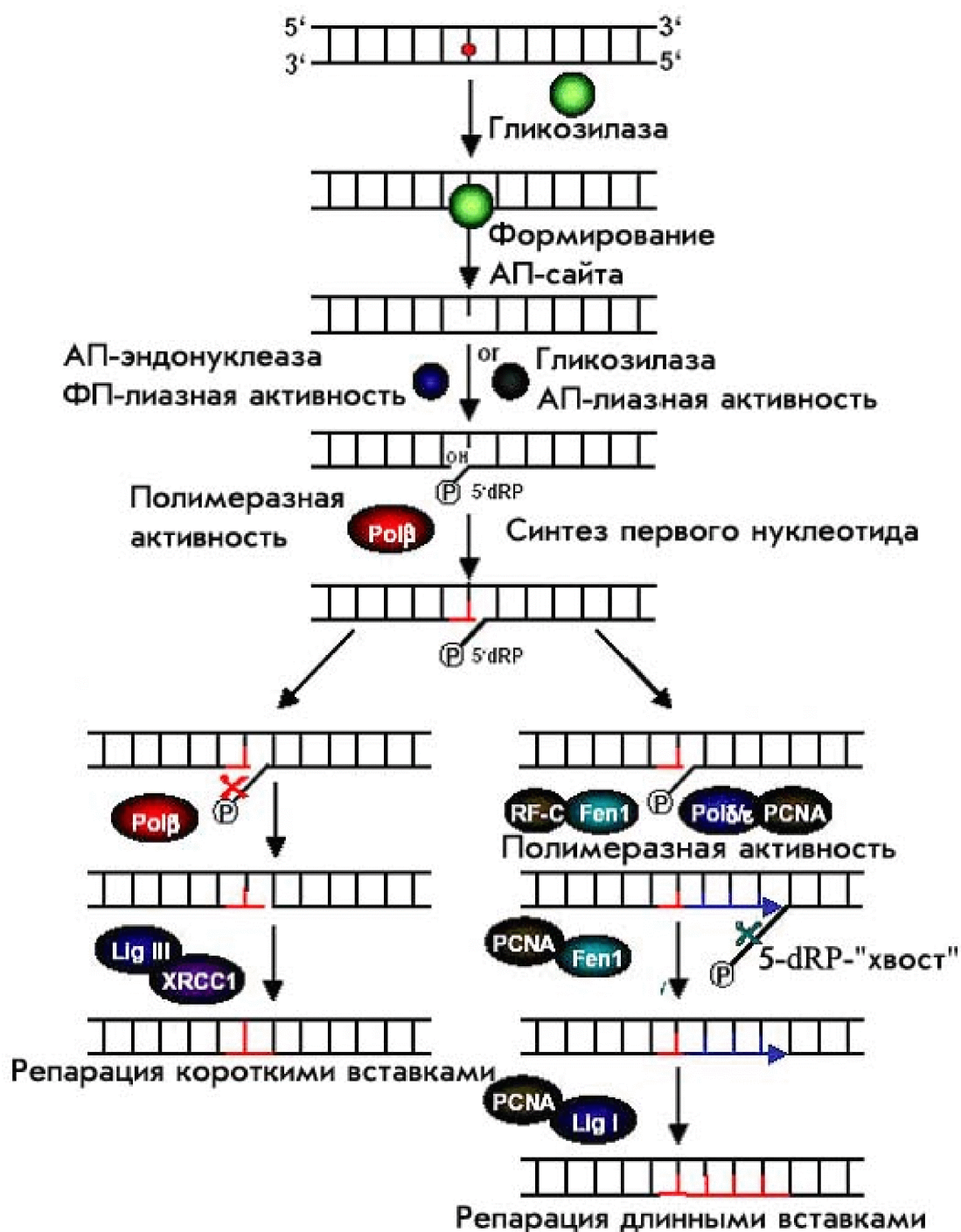


Рисунок 6. Схема процесса BER.

Лигирование, то есть восстановление фосфодиэфирной связи осуществляется ДНК-лигазами I и III, причем ДНК-лигаза I взаимодействует с PCNA и pol δ и принимает участие преимущественно в репарации «длинными фрагментами». ДНК-лигаза III взаимодействует с XRCC1, pol β и PARP1 (polyadenosylribose polymerase I) и участвует в репарации «короткими фрагментами».

Теперь вся структура ДНК полностью восстановлена: неправильное основание удалено, сахарофосфат, к которому это основание было прикреплено, вырезан из нити ДНК, брешь заполнена правильным(и) нуклеотидом(ами), и все однонитевые разрывы залечены. Поскольку последовательность реакций запущена в действие путем расщепления гликозильной связи, этот вид репарации получил название еще одно название - "вырезание оснований с помощью гликозилаз".

До сих пор дискутируется вопрос о том, от чего зависит, по какому пути репарации - «короткими или длинными фрагментами» пойдет BER. Долгое время считалось, что «нормальные» AP-сайты репарируются по первому пути, а модифицированные (окисленные или восстановленные) - по второму. Современный взгляд несколько изменился. Было показано, что вставка первого нуклеотида не зависит от типа AP-сайта, причем в этой реакции главную роль играет ДНК-полимераза- β . Во время репарации «короткими фрагментами» именно она вставляет один нуклеотид вместо вырезанного. Эта же полимераза вставляет первый нуклеотид в процессе репарации «длинными фрагментами».

Выбор между репарацией длинными или короткими фрагментами зависит от того, способна ли в данном конкретном случае ДНК-полимераза- β проявить свою лиазную активность. А это как раз зависит от того, каким является AP-сайт. Если он окислен или расщеплен химически, то оказывается устойчивым к β -элиминации с помощью ДНК-полимеразы- β . В этом случае она после вставки первого нуклеотида диссоциирует от ДНК, и дальше сценарий идет по модели репарации «длинными фрагментами» с вовлечением PCNA-зависимых полимераз. Таким путем репарируется около 25% повреждений. Но, к примеру,

удаление 8-оксигуанина происходит преимущественно путем репарации «короткими фрагментами».

К настоящему времени у человека генетические заболевания, сопряженные с нарушением системы BER, не найдены. Но было обнаружена зависимость активности этой системы репарации от белка P53. Этот антионкоген стимулирует BER путем прямого взаимодействия с APE1 и ДНК-полимеразой- β , стабилизируя связывание последней с AP-сайтом. Данные об активации при этом транскрипции самого P53 противоречивы, хотя показано, что после воздействия на мышей алкилирующим агентом нитропропаном наблюдалась активация транскрипции P53 и $\rho\text{I}\beta$, при одновременном повышении эффективности эксцизионной репарации оснований.

5.1.1. Многочисленные возможности репарации 8-оксигуанина

В целом, BER - чрезвычайно действенный барьер мутациям оснований. Ярким примером этого является тройная система защиты ДНК от окисления гуанинов, выявленная как у *E. coli*, так и у высших эукариот, включая человека.

Известно, что окислению может подвергаться не только уже встроенные в цепь ДНК нуклеотиды, но и их предшественники. Окисление dGTP приводит к образованию 8-окси-dCTP, но клетка содержит специализированную dGTPазу - белок MutT, обладающий повышенным сродством к 8-окси-dGTP. Этот белок гидролизует 8-окси-dGTP до 8-окси-dGMP, удаляя его из пула нуклеотидов и предотвращая его встраивание во вновь синтезируемую ДНК. Таким образом MutT *E.coli* и MTH1 (Mut T homologue 1) человека являются крайне интересными белками, не вовлеченных напрямую в эксцизионную репарацию оснований, но существенно снижающими уровень оксипуринов в ДНК.

Если же модифицированный предшественник 8-оксиG все же внедряется в ДНК напротив C, то такая неправильная пара опознается гликозилазой MutM *E.coli* (Fpg, OGG1 соответственно у дрожжей и человека), которая может удалить 8-оксиG, встроившийся напротив C, из ДНК.

Если и этого до начала репликации ДНК не произошло, то в ходе нее 8-оксиG может попытаться спариться с A. Такая пара распознается

гликозилазой MutY *E.coli* (гомолог эндонуклеазы III, выщепляющей из ДНК тиминовые гликоли, цитозиновые гидраты и другие повреждения). Эта гликозилаза обладает лиазной активностью, удаляет А из ДНК и вносит разрыв в сахарофосфатный остов. Также она распознает пары G-C и A-G. У человека эту функцию выполняет специализированная гликозилаза МУН (Mut Y homologue).

Говоря о взаимосвязи между собой в процессе защиты ДНК от встраивания 8-оксоG нескольких параллельных путей эксцизионной репарации оснований, необходимо добавить, что механизмы репарации, участвующие в удалении из поврежденной ДНК 8-оксо-G были исследованы *in vitro*, то есть на бесклеточных экстрактах очищенных белков. Было обнаружено, что из транскрибируемой части ДНК 8-окси-G удаляется быстрее, чем из нетранскрибируемой. Гликозилазой, необходимой для инцизии 8-окси-G и использованной в этих опытах, была Ogg1. Таким образом, по крайней мере для одной из гликозилаз, четко показано, что при BER наблюдается преимущественное выщепление поврежденного основания из транскрибируемой ДНК, то есть тот путь BER, который начинает специализированная гликозилаза Ogg1 может быть описан как эксцизионная репарация оснований, спаренная с транскрипцией.

5.1.2. Роль PCNA в эксцизионной репарации оснований.

Хотелось бы отдельно остановиться на роли PCNA в процессах репарации.

Как уже говорилось, у высших эукариот эксцизионная репарация оснований протекает двумя альтернативными путями – с коротким и длинным ресинтезируемыми фрагментами. Их еще иногда называют ДНК-полимераза- β -зависимый и PCNA-зависимый пути.

PCNA-зависимый путь репарации AP-сайтов был совсем недавно реконструирован *in vitro* с участием AP-эндонуклеазы (APE1), RFC, PCNA, FEN1, ДНК-полимеразы- δ и ДНК-лигазы I. При репарационной реакции в этой реконструированной системе преимущественно замещаются два нуклеотида. PCNA является обязательным участником этой системы и подавление его активности специфическими антителами

приводит к ингибированию репарации AP-сайтов в клеточных экстрактах млекопитающих.

У дрожжей показано, что некоторые мутации в гене PCNA приводят к резкому снижению репарации после действия MMS (метил-метансульфоната, очень сильного мутагена), не затрагивая при этом их ростовой активности. К настоящему времени сложилось представление, что у дрожжей все пути BER PCNA-зависимые.

Таким образом, pol β в процессе BER принимает участие и в PCNA-зависимом и в PCNA-независимом (pol β -зависимом) путях. PCNA-зависимых путей тоже 2 – в первом из них вставляется 2 нуклеотида, а в другом – около 10-12 нуклеотидов. Может быть, это связано с тем, какая из полимераз – δ или ϵ будут использованы при этом, но прямых данных об этом нет, так как в системе *in vitro* замена одной на другую на уровень репарации не влияла.

Установлено, что PCNA может напрямую взаимодействовать с большой субъединицей RFC (состоящего из 5 субъединиц), экзонуклеазой FEN1, ДНК-полимеразой- δ (третья субъединица) и ДНК-лигазой I. Это взаимодействие происходит благодаря наличию во всех этих белках консервативного мотива QXX(I/L/M)XX(F/N)(F/Y), содержащего 8 аминокислотных остатков. Наличие этого мотива в различных белках представлено на рис. 7. PCNA служит молекулярным адаптером для привлечения всех этих белков в зону репаративной реакции. Данный мотив был обнаружен и у достаточно большого числа других белков – MSH2, MLH1 (белков, участвующих в эксцизионной репарации неспаренных оснований, MMR), p21, GADD45, циклина D, ДНК-цитозин-5-метил-трансферазы (MCMT), эндонуклеазы XPG. Для p21 опубликовано очень подробное описание его взаимодействия с PCNA, включающее вовлечение в этот процесс вторичной структуры белков.

На той же модели было показано, что эффективность репарации резко падает при использовании в экспериментальной системе *in vitro* мутантных форм FEN1 и лигазы I, у которых не нарушена ферментативная активность, а только поврежден сайт их связывания с PCNA.

p21	141-KRRQTSMTDFYHSKRRLIFSKRKP-C
FEN1	334-GSTQGRLEDDEFFKVTGSLSSAKRKE-X23-C
ДНК лигаза 1	1-MQRSIMSEFFHPKKEGKAKKPEK-X897-C
XPG	987-QQTQLRIDSFRLAQKEKEDAKRI-X176-C
MCMT	40-STRQTTITSHFAKGPARKRPQEEES-X1432-
RFC p140	1-MDIRKFFGVIPSGKKLVSET-X1128-
Pol δ субъединица 3	453-ANRQVSITGFFQRK-C
MSH6	1-MSRQSTLYSFFPKSPALSDANKAS-X1336-
UNG2	1-MIGQKTLYSFFSPSPARKRHAPSP-X279-C
MYH	509-RMGQQVLDNFFRSHISTDAHSLNSAAQ-C

Рисунок 7. Белки, имеющие сайт QXX(I/L/M)XX(F/N)(F/Y) для связывания с PCNA

Остается неясным, как все эти молекулы с PCNA-связывающим мотивом умудряются связаться с PCNA одновременно – ведь PCNA является гомотримером и может быть одновременно связан по данному мотиву не более, чем с тремя белками, а таких белков описано уже как минимум 15. Можно предположить, что в системе BER PCNA преимущественно связан с ДНК-полимеразой-δ(ε), FEN1 и лигазой I. Связывание же со всеми остальными белками, вероятнее всего, зависит от места и времени протекания реакции, в которую вовлечен PCNA и данные белки.

5.1.3. BER, спаренная с репликацией.

Тот же самый PCNA-связывающий мотив найден и в двух недавно описанных человеческих гликозилазах UNG2 и MYH1. Главными субстратами для этих гликозилаз служат некорректно встраивающиеся в процессе репликации урацил напротив аденина и аденин напротив 8-оксигуанина соответственно. UNG2 содержит PCNA-связывающий мотив в своей N-концевой части и является основной ДНК-урацил-гликозилазой

человека. Напротив, N-конец UNG1, митохондриальной формы урацил-гликозилазы, содержит сигнал, указывающий на ее митохондриальную локализацию, но не PCNA-связывающий мотив. МҮН является гомологом MutY E.coli, все ее формы несут PCNA-связывающий мотив в своем С-конце, вне зависимости от наличия у них сигнала митохондриальной локализации.

Предложено два объяснения возможного механизма, при котором эти две гликозилазы связываются с PCNA. Первое – обе эти гликозилазы могут преимущественно привлекать PCNA в район AP-сайта после выщепления неправильного основания, и таким образом направлять реакцию репарации по ее PCNA-зависимой ветви. Вторая возможность состоит в том, что UNG2 и МҮН благодаря связыванию с PCNA могут ассоциироваться с «машиной репликации». Недавние исследования показали, что UNG2 может связываться с «машиной репликации» и через PCNA и через RPA (replication protein A, эукариотический гомолог белка SSB прокариот, состоящий из 3 субъединиц). Это больше подходит ко второму объяснению, но не отбрасывает и первого.

Урацил, являющийся субстратом UNG2, может попадать в ДНК двумя путями – при встраивании урацил-трифосфата во время репликации и дезаминировании уже встроенного цитозина. В первом случае, вновь встроенный урацил спаривается с аденином, и частота этого встраивания зависит от размера пула предшественника. Впрочем, надо помнить, что предшественник урацила совершенно «легально» постоянно присутствует в клетке и его уровень регулируется физиологическими механизмами. Во втором случае урацил оказывается спаренным с гуанином, причем 100-500 таких пар образуется в человеческой клетке ежедневно. UNG2 способна удалять урацил из обоих положений, две другие гликозилазы TDG и MED1 (MBD4) – только во втором случае (U/G). То есть урацил, встроившийся в процессе репликации может быть удален только UNG2, а урацил, появившийся в результате дезаминирования цитозина может быть убран тремя независимыми гликозилазами.

Похожая картина и с МҮН1. Основной ее мишенью является аденин напротив 8-оксигуанина. Эта неправильная пара также образуется именно в процессе репликации ДНК. Здесь нужно отметить, что полимеразы ϵ и δ

обычно вставляют именно аденин напротив 8-оксигуанина, а полимеразы β – цитозин. Связывание MYH1 с PCNA может облегчать репарацию неправильного спаривания, возникшую в процессе репликации. Другая гликозилаза - OGG1 (FPG E.coli) способствует выщеплению 8-оксоG, который возникает при прямом окислении двунитевой ДНК, напротив цитозина, но не напротив аденина. OGG1 не несет PCNA-связывающего мотива и не нуждается в его помощи для выщепления 8-оксоG. Хотя пока нет точных экспериментальных подтверждений того, что MYH1 связывается с PCNA или с «машиной репликации», но аналогия с UNG2 напрашивается сама собой. Гликозилазы, несущие PCNA-связывающий мотив участвуют в репарации повреждений, возникающих именно в процессе репликации, в отличие от тех гликозилаз, которые подобные повреждения репарировать не способны.

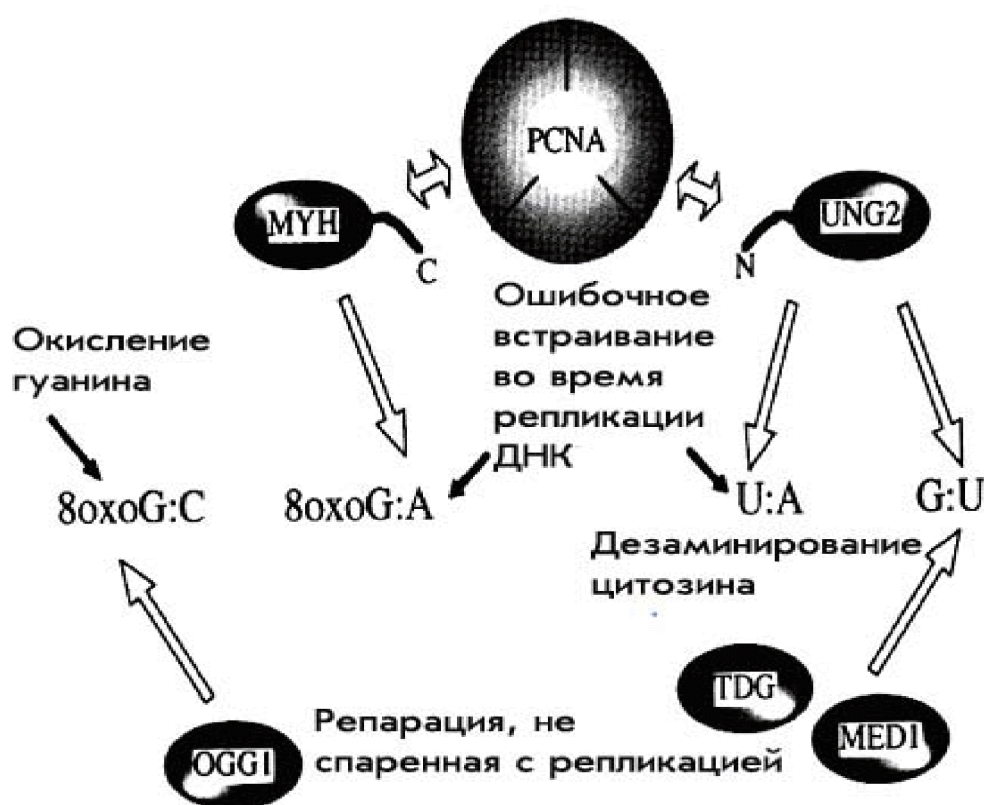


Рисунок 8. Схема репарации, спаренной с репликацией.

Таким образом две эти гликозилазы служат для специфической репарации, спаренной с репликацией, путем прямого связывания с репликационной машиной через PCNA. Схема этого процесса оитображена на рис. 8.

Остается нерешенным еще один вопрос – как эти две гликозилазы участвуют в репарации AP-сайтов. После действия UNG2 может включаться как PCNA-зависимый так и $\text{pol}\beta$ зависимый процесс, так что тут все более-менее ясно. А вот МҮН отличается тем, что не может использовать PCNA-зависимый путь, при котором синтез ведет $\text{pol}\delta$, так как $\text{pol}\delta$ обязательно снова вставит аденин напротив 8-оксоG, и нарушение ДНК будет самовоспроизводиться в процессе репарации. Для репаративного синтеза может быть использован только $\text{pol}\beta$ -зависимый путь, так как только $\text{pol}\beta$ вставит напротив 8-оксоG цитозин

5.2. Эксцизионная репарация неспаренных оснований (mismatch repair, MMR)

Продолжая изучать эксцизионную репарацию ДНК, остановимся на репарации неспаренных оснований (mismatch repair, MMR. На русский название этого типа репарации часто переводят как коррекция неспаренных оснований, сокращенно КНО. Основная роль MMR состоит в поддержании стабильности генома и снижении количества потенциально возникающих мутаций.

Довольно часто (у *E. coli* один раз на 10^4 пар нуклеотидов, у эукариот еще чаще) во время репликации ДНК происходят ошибки спаривания, в результате которых вместо комплементарной пары нуклеотидов А + Т или G + С в дочернюю цепь ДНК оказываются включенными нуклеотиды, некомплементарные нуклеотидам в материнской нити и образующие с ними неправильные пары. Такие пары называют мисмэтчами — mismatch. Как уже говорилось ранее, исправление подобных ошибок самими полимеразам или автономными экзонуклеазами не может убрать их все, и в ДНК по окончании репликации остаются мисмэтчи. Но неспаренные основания в ДНК могут возникать и в результате других событий. Например, при модификации оснований ДНК или их предшественников продуктами клеточного метаболизма или экзогенными повреждающими

агентами, если эти поврежденные основания не были отрепарированы системой BER. Особенности процесса рекомбинации мы будем обсуждать позже, но неспаренные основания могут возникать и при рекомбинационной интеграции однонитевого участка ДНК в неабсолютно идентичную ДНК партнера по рекомбинации. Все эти события приведут к образованию гетеродуплексной ДНК - субстрата для ферментов, исправляющих мисмэтчи.

Хотя процесс MMR получил свое название от неспаренных оснований, но его основными мишенями являются не только такие пары, как G/T, G/G, A/C и C/C, но и O⁶-меG, спаренный с C или T, межнитевая сшивка CpG, вызванная действием цисплатина, индуцированные УФ-светом фотопродукты, пуриновые аддукты бензопирена, производные аминифлуорена и 8-оксигуанин. К настоящему времени стало понятно, что система MMR способна распознавать и корректировать не только неправильно спаренные основания, но и протяженные вставки и делеции (по крайней мере, у эукариот).

У E.coli принято различать 2 системы MMR: с длинным ресинтезируемым участком (LPMR, long patch mismatch repair) и очень коротким участком репаративного синтеза (VSPMR, very short patch mismatch repair). У высших эукариот и человека есть только LPMR, и именно этот процесс обычно называют эксцизионной репарацией неспаренных оснований. Процесс LPMR у E. coli был реконструирован *in vitro*.

Ясно, что неправильное спаривание (ошибка репликации) может затронуть только дочернюю нить ДНК, матричная в процессе репликации остается неизменной. Если в матричной нити появилось повреждение, которое не было исправлено с помощью репарации и привело к замене основания, то это и есть мутация, и она будет воспроизводиться при репликации во всех последующих поколениях. Следовательно, система репарации мисмэтчей должна оперировать на дочерней нити и производить замену некомплементарных оснований только в ней. То есть одним из основных моментов, важных для данной системы репарации, является необходимость различения матричной и вновь синтезированной нитей. Клетки прокариот при этом используют важное различие в

48

структуре матричной и дочерней нитей, найденное в 70-х годах. Вскоре после окончания репликации специальные ферменты - метилазы присоединяют метильные группы к аденинам в последовательностях GATC. Поэтому во время следующего раунда репликации нити ДНК оказываются различными: материнская нить ДНК несет метилированные аденины, а в дочерней нити до окончания репликации аденины еще не метилированы. Их метилирование начнется только по окончании репликации. Таким образом, существует определенный временной промежуток, в течение которого вновь синтезированная нить в отличие от матричной остается неометилированной. Именно на этом явлении и основана система дискриминации матричной и дочерней нитей у *E. coli*. Пока это различие в метилировании сохраняется, клетки должны успеть отрепарировать мисмэтчи. Эта особенность MMR у *E. coli* подчеркивает главную биологическую функцию системы - точность воспроизведения ДНК при репликации. С меньшей вероятностью MMR у *E. coli* способна узнавать и неметилированные или, наоборот, метилированные в обеих нитях последовательности GATC, производя ненаправленную коррекцию гетеродуплексной ДНК.

Процесс MMR схематично отображен на рис. 9 и включает в себя следующую цепь реакций. Двойная спираль ДНК была только что отреплицирована; матричная цепь несет уже метилированные основания, в то время как дочерняя нить еще неметилирована. Район мисмэтча, то есть гетеродуплексная ДНК, распознается гомодимерным белком MutS, который присоединяется к нему. Это соединение белка MutS с ДНК стабилизируется за счет присоединения белков MutH и MutL с образованием репаративного комплекса, на осуществление этой реакции тратится одна молекула АТФ.

В свободном состоянии белок MutH является слабой эндонуклеазой, но при соединении с белками MutS и MutL его эндонуклеазная активность возрастает на 2 порядка. Данный репарационный комплекс способен изгибать молекулу ДНК и как бы «протягивать» ее сквозь себя до того момента, когда белок MutH распознает ближайший, локализованный с любой стороны от мисмэтча полуметилированный GATC и осуществит его эндонуклеазную атаку. Белки MutH разрезают в ходе описываемого

процесса репарации только неметилированные сайты GATC, чем и достигается направленность коррекции. Таким образом, вновь синтезированная ДНК будет надрезана двумя белками MutH с двух сторон от мисмэтча. Длинный участок ДНК, расположенный между этими двумя надрезами и несущий «неправильное» основание, должен быть отсоединен от молекулы ДНК, в результате чего возникает длинная одонитевая брешь. Матричная цепь ДНК остается целостной и служит матрицей для восстановления правильной последовательности в образовавшейся брешу. Эксцизия сегмента онДНК в месте разрыва требует участия белка MutU - ДНК-геликазы II (продукта гена *mutU/uvrD/uvrE/recL* – часто один и тот же ген бывает описан различными группами исследователей под разными названиями) и одной из ДНК-эксонуклеаз: ExoI (3'-экзо), ExoVIII (3'- или 5'-экзо) или Rec J (5'-экзо). Выбор экзонуклеазы зависит от направления деградации в сторону неспаренного основания.

При расплетании двунитевой ДНК геликазой MutU также расходуются несколько молекул АТФ. Репаративный синтез удаленного участка ДНК длиной до нескольких тысяч оснований, осуществляется PolIII с использованием дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP) при обязательном участии белка SSB, защищающего онДНК от эндонуклеазной атаки и препятствующего возникновению в ней вторичных структур. Соединение оставшихся после завершения репликации одонитевых разрывов производит ДНК лигаза. В результате всей цепи реакций участок мисмэтча заменяется правильной (комплементарной) парой.

Такова коррекционная система MutHLSU у грамотрицательных бактерий *E. coli*. Подобная, хотя и неидентичная, система HexAB описана у грамположительных бактерий *Streptococcus pneumonia*. Их гены *hexA* и *hexB* являются гомологами генов *mutS* и *mutL* соответственно. Однако ни аналога гена *mutH*, ни дискриминации нити, определяемой метилированием ДНК, в системе HexAB не выявлено. Остается предположить, что эта система способна отличать вновь синтезированную нить ДНК от матричной каким-либо иным образом, например по «недолигированным» разрывам и концам ДНК, на которых и иницируется эксцизия сегмента с неправильным основанием. Ресинтезируемый участок в этом случае также очень велик и включает до 5 т.н.

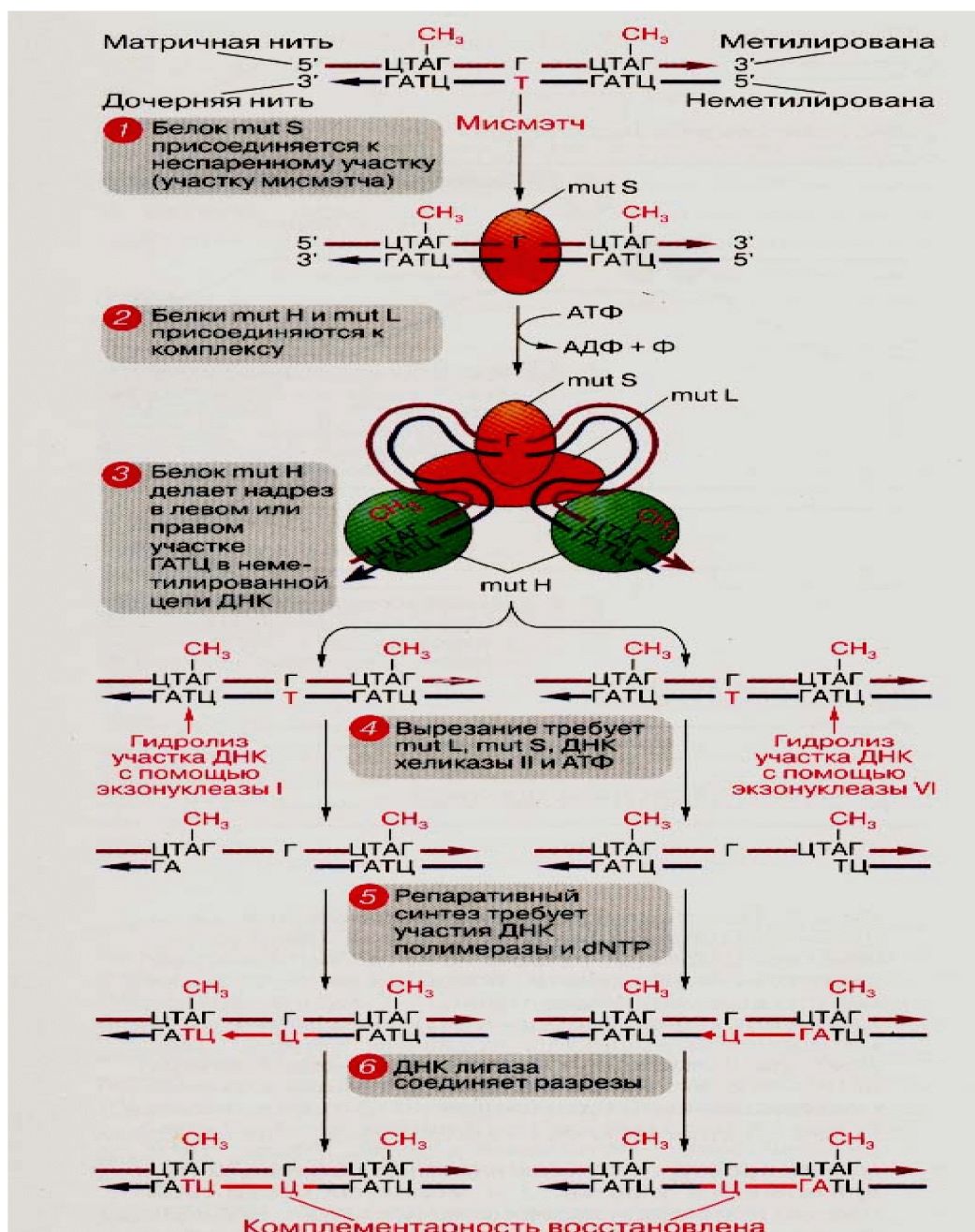


Рисунок 9. Процесс MMR у *Escherichia coli*.

Система LPMR у *E. coli* не обладает строгой специфичностью. Она опознает и корректирует все неспаренные основания (хотя транзиции репарируются более эффективно, чем трансверсии) за исключением одного - C-C. В отличие от LPMR система VSPMR у *E. coli* строго специфична.

Она репарирует только неправильные пары G-T, появление T в которых обусловлено дезаминированием 5-меС, продукта модификации цитозинов с помощью метилазы Dmc. Как и в системе LPMR, неправильные основания узнают белки MutS и MutL, которые стимулируют расщепление ДНК с 5'-конца от T специфической эндонуклеазой Vsr. Эксцизия и последующий синтез ДНК требуют присутствия PolI и ДНК-лигазы.

Основными биологическими функциями системы MMR у прокариот являются антимутационная, которая способствует точному воспроизведению генома при репликации и поддержанию его исходной структуры и антирекомбинационная, способствующая репродуктивной изоляции вида. Рекомбинация у бактерий во всех случаях сопряжена с образованием гетеродуплексов, и если система MMR ведет коррекцию пострекомбинационных гетеродуплексов по обеим нитям ДНК одновременно, то она разрушает продукты рекомбинации на стадии эксцизии однострессового фрагмента ДНК и делает невозможной гомологичную рекомбинацию даже между таксономически близкими видами бактерий. Отдельно можно выделить и гипорекомбинационную функцию, так как коррекция длинных гетеродуплексов снижает частоту рекомбинационных обменов на единицу длины ДНК, приводя гибридную по составу ДНК к составу ДНК одного из партнеров.

У эукариот генетические и биохимические данные свидетельствуют о наличии системы, гомологичной LPMR, а системы VSPMR как таковой нет, ее замещают соответствующие гликозилазы. Но система MMR у эукариот работает несколько иначе, чем мы описывали у *E.coli*.

5.1.1. Функциональные гены-гомологи у про- и эукариот.

Поиск гомологичных генов привел к выявлению по меньшей мере двойного набора гомологов генов *mutS* и *mutL* у *S. cerevisiae* и человека, что легло в основу предположения о гетеродимерной структуре гомологов белков MutS и MutL у эукариот. Эти гомологи представлены в табл. 3. Распознавание мисмэтчей или модифицированных оснований у эукариот осуществляется комплексом MutSa, который связывается с повреждением. Он состоит из белков-гомологов MutS *E.coli* MSH2 и MSH6 (также

описанный под названием GT-связывающий белок – GTBP). Для эффективного связывания необходимо фосфорилирование комплекса MutS α . Особенностью комплекса MutS α у *S. cerevisiae* (MSH2 + MSH6) является его асимметрия - наличие главной и дополнительной составляющих. Действительно, мутации *msh6* в отличие от *msh2* показывают как слабый мутаторный фенотип, так и слабое подавление репарации инсерционно-делеционного типа. Это не исключает возможности существования комплексов белка MSH2 с другими составляющими. Именно такая ситуация имеет место в клетках человека, которые содержат два MutS-подобных комплекса, hMutS α (hMSH2 + hMSH6) и hMutS β (hMSH2 + hMSH3), причем с разным спектром опознаваемых повреждений. Разные комплексы имеют разные мишени для связывания - MutS α способен связаться как с неправильно спаренными основаниями, так и с инсерциями/делециями, приводящими к неправильному спариванию и выпетливанию ДНК. MutS β же способен связаться только с инсерционно-делеционными мисмэтчами и особо эффективен в случае петель, включающих 2-3 основания.

Несколько другая схема MMR у эукариот показана на рис. 10. До сих пор недостаточно ясно, как именно MMR у эукариот различает матричную и дочернюю нити. Предполагается, что в дочерней нити остаются недолигированные одонитевые разрывы (бреши), образовавшиеся во время репликации. На рис. 10А показано, что дискриминация нити происходит именно с использованием этих недолигированных брешей; всегда в течение какого-то времени сохраняющихся в новосинтезированной нити. Проблема в том, что такой разрыв и мисмэтч могут отстоять друг от друга на большое расстояние. Как же тогда MutS α может одновременно их распознать?

Тут нужно остановиться на роли АТФ в процессе MMR. Оба белка (MSH2 и MSH6) содержат АТФ\АДФ-связывающие сайты. Мутации в этих сайтах приводят к нарушению процесса MMR, но не влияют на GT-связывание. Пространственная модель этого связывания представлена на рис. 10Б. В настоящее время существуют две модели, объясняющие роль АТФ\АДФ в MMR. В модели «молекулярного переключения» (molecular switch model), которая базируется на реакциях АТФ\АДФ связывании и

гидролиза АТФ, предполагается, что MutS α /АДФ комплекс отвечает за распознавание и связывание с мисмэтчем («активное состояние»). Связывание с мисмэтчем запускает реакцию АДФ→АТФ и стимулирует собственную АТФ-азную активность MutS α , приводящую к его конформационным изменениям, с образованием независимого от гидролиза АТФ «скользящего зажима». Этот «скользящий зажим» пассивно диффундирует от мисмэтча и подает сигнал на диссоциацию белков MMR от ДНК («неактивное состояние»). В этой модели гидролиз АТФ на MutS α вызывает конформационные изменения и таким образом способствует связыванию MutL α . К тому же диссоциация MutS α от ДНК зависит от связывания АТФ, но не от его гидролиза.

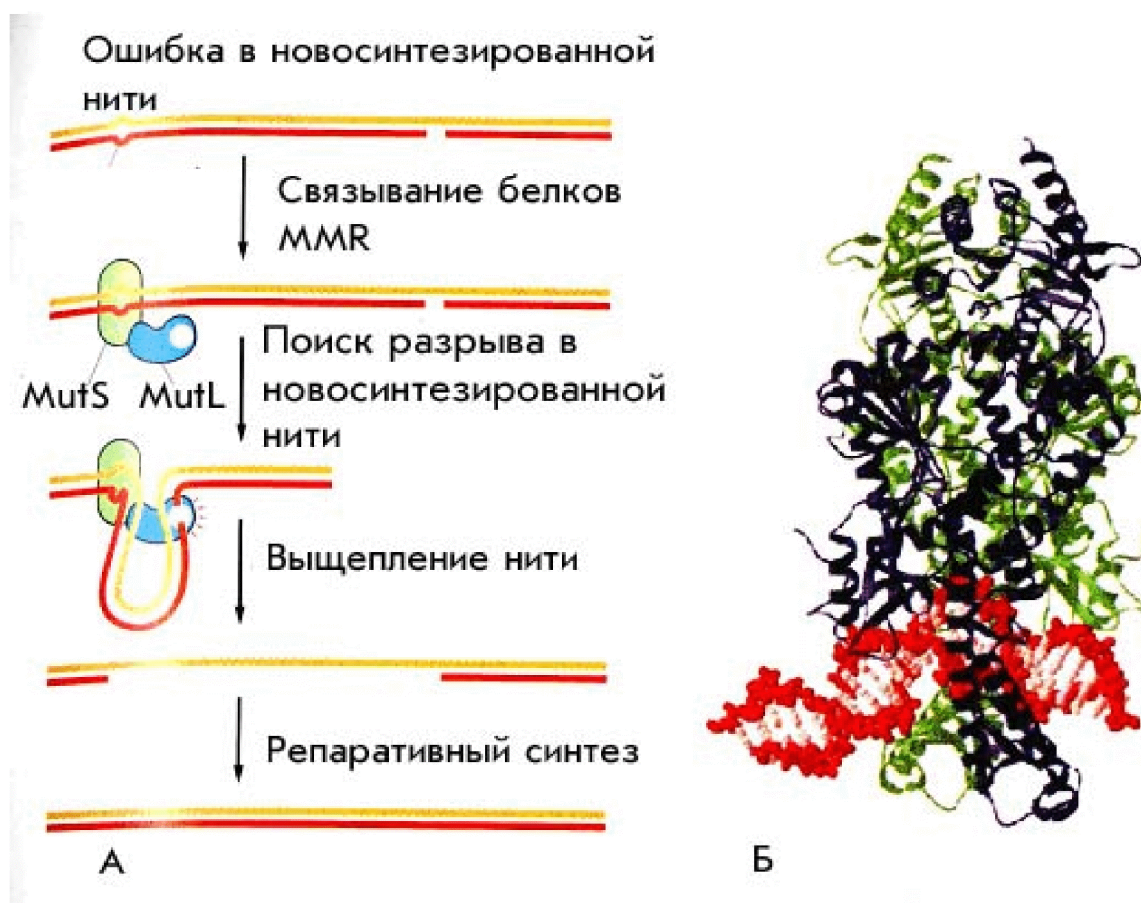


Рисунок 10. Процесс MMR у эукариот. А - схема последовательности реакций, Б – связывание гетеродимера MutS α с ДНК.

В другой модели, называемой «гидролиз-зависимой моделью перемещения» (hydrolysis-driven translocation model) MutS α использует энергию гидролиза АТФ для того, чтобы перемещаться вдоль ДНК от сайта распознавания мисмэтча к сайту, ответственному за сигнал о нитеспецифичности (чаще всего, однонитевому разрыву). Соединение с MutL α -комплексом происходит именно в этом сигнальном сайте.

Гетеродимер образуется и в структуре MutL-подобных комплексов эукариот: MLH1 + PMS1 - у дрожжей и MLH1 + PMS2 - у человека. У человека выявлен еще и третий гомолог- ген hPMS1. Таким образом после связывания с мисмэтчем MutS α ассоциируется с комплексом MutL α , состоящим из гомологов гена E.coli MutL - MLH1 и PMS2. Эксцизию ДНК, содержащей неправильно спарившееся основание осуществляет экзонуклеаза I, а новый синтез – ДНК-полимераза- δ . Вероятно, у высших эукариот в этой системе репарации принимает участие и белок PCNA, так как у MSH2 и MLH1 есть специфические сайты, связывания с ним.

Является ли процесс MMR индуцибельным, до сих пор не ясно. Промотор гена, кодирующего MSH2, имеет сайт связывания с белком P53 и его индукция была показана при котрансфекции P53 и онкогенов fos/jun. Обработка клеток алкилирующими агентами, например метил-нитро-нитроз-гуанидином (MNNG) приводит к повышению мисмэтч связывающей активности комплекса MSH2/MSH6 и его перемещению внутри ядра. Вероятно, регуляция активности MMR происходит как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях.

Таким образом мы видим, что картина репарационных событий в системе MMR у эукариот подобна той, которая была выявлена у прокариот. При этом функции MutS- и MutL-подобных гетеродимерных комплексов аналогичны описанным для системы MutHSLU бактерий. Но по количеству структурных и регуляторных элементов она, безусловно, является более сложной. Биологические функции системы MMR у эукариот, безусловно, шире, чем у прокариот. Эта система является барьером для внутрихромосомных рекомбинационных перестроек, возможных из-за существования в геноме высших эукариот множественных повторов (в клетках млекопитающих внутрихромосомная

рекомбинация значительно более чувствительна к совершенству гомологии взаимодействующих участков ДНК, чем межхромосомная).

E.coli	S.pneumoniae	S. cerevisiae	Человек
MutS	hexA	MSH2 MSH6	hMSH2 (45%) hMSH6 (GTBP)
MutL	hexB	MLH1 PMSI	hMSH3 hMLHI (49%) hPMS2 (6%) hPMS1
MutH			

Таблица 3. Функциональные гены-гомологи системы MMR у про- и эукариот

К тому же существует множество данных о том, что белки MSH2, MSH6 и MLH1 принимают непосредственное участие в других репарационных процессах - эксцизионной репарации нуклеотидов, спаренной с транскрипцией, репарации двунитевых разрывов и генерации и передаче сигнала о повреждении ДНК (об этом мы будем подробнее говорить при изучении репарации двунитевых разрывов).

Как видно из табл. 3, гомологов белка MutH у эукариот не обнаружено. Это связано с принципиально иным типом различения родительской и вновь синтезированной нитей ДНК.

Сравнительное изучение системы MMR у человека имеет большое медико-биологическое значение. Это подтверждается наличием таких наследственных заболеваний человека, как семейная форма неполипозного рака прямой кишки (HNPCC).

Неполипозный рак толстого кишечника (HNPTK, HNPCC – human non polyposis colon cancer), который составляет, по разным оценкам, от 5% до 15% всех регистрируемых случаев колоректального рака, сопряжены, главным образом, с повреждениями трех генов — hMLH1 (49%), hMSH2

(45%) и hPMS2 (6%). К настоящему времени выявлено до 40 мутаций в каждом из первых двух генов и небольшое число мутаций в других генах, включая hPMS2 и hPMS1. Складывается также и генетическая картина перехода от предрасположенности к развитию заболевания в результате инактивации обоих аллелей одного из этих генов системы MMR.

В то же время среди спорадических раковых опухолей различной локализации от 10% до 30% имеют нестабильную структуру микросателлитной ДНК, так называемый фенотип RER⁺ (replication error). Эта нестабильность возникает в результате неисправленной ошибки репликации, что автоматически подразумевает существование дефекта в системе MMR. Результаты исследований клеточных линий, происходящих из раковых клеток с фенотипом RER⁺, показывают, что они несут мутации в генах hMSH2, hMLH1, hPMS2 и GTPB.

Что касается VSPMR, то у эукариот тоже выявлена система специализированного исправления G-T на G:C, но она не сопряжена с MutS- или MutL-подобными белками. Вероятно, в этом случае используется специализированная гликозилаза, удаляющей T из пары G-T (то есть функции этого пути MMR E.coli. у высших эукариот берет на себя BER).

5.3. Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER, nucleotide excision repair)

В 1968 году в лаборатории Р.Сетлоу у E.coli был описан процесс эксцизионной репарации УФ-повреждений, при котором вырезается не просто отдельное основание, а значительный участок нити ДНК, содержащий пиримидиновый димер. Очень скоро эта система репарации ДНК была обнаружена у эукариот, и стало понятно, что она способна восстанавливать так же различные аддукты и межнитевые сшивки. Низкая специфичность NER к типу повреждения достигается за счет того, что из ДНК выщепляется не сам модифицированный нуклеотид, а содержащий ДНК-повреждения олигонуклеотид, длина которого составляет 12-13 (у прокариот) или 27-29 (у эукариот) нуклеотидных звеньев. Таким образом

система NER способна удалить из ДНК почти все возможные повреждения.

В клетках *E.coli* этот процесс осуществляется тремя белками – UvrA, UvrB и UvrC (их название происходит от английского ultra-violet resistant).

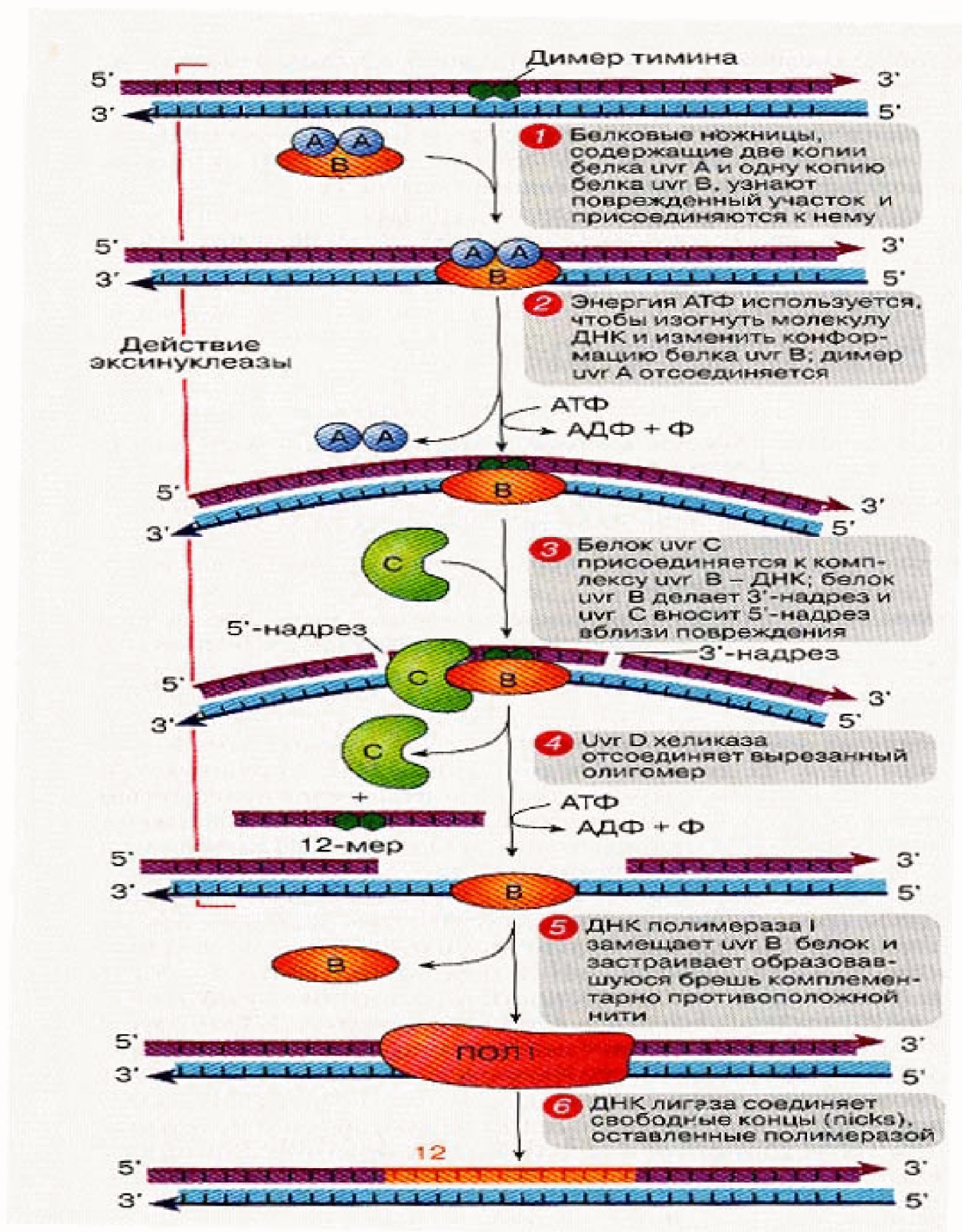


Рисунок 11. Схема эксцизионной репарации нуклеотидов у бактерий.

Сам процесс представлен на рис. 11 и происходит в несколько этапов: распознавание повреждений белками UvrA и UvrB; изгибание молекулы ДНК и изменение конформации белка UvrB; внесение двух односторонних надрезов ДНК с обеих сторон от повреждения с помощью белков UvrB и UvrC; расплетание ДНК в участке между двумя надрезами с помощью белка UvrD (MutU, геликаза); отсоединение содержащего дефект фрагмента длиной 12 нуклеотидов (12-мер) с образованием брешы; при этом расходуется энергия еще одной молекулы АТФ; застройка образовавшейся брешы с помощью ДНК полимеразы; соединение свободных концов сахарофосфатного остова ДНК с помощью ДНК лигазы.

Известно, что этот процесс у бактерий – индуцибельный, гены *uvrA* и *uvrB* входят в состав SOS-регулона и их экспрессия возрастает после повреждения ДНК.

5.3.1. Эксцизионная репарация нуклеотидов у эукариот.

Эукариоты, включая дрожжи и человека, не имеют прямых гомологов системы UvrABC, но сам механизм NER у них чрезвычайно сходен с таковым у прокариот.

Системой NER у эукариот удаляются крупные ДНК-аддукты, такие как 4-6-фотопродукты, пиримидиновые димеры, индуцированные УФ-светом и другие повреждения, возникающие под действием различных генотоксических агентов, например, бензопирена или афлатоксина. В нее вовлечено не менее 30 белков. Белки, участвующие в этом процессе были изолированы из почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, из делящихся дрожжей *Shizosaccharomyces pombe* и из клеток млекопитающих (преимущественно грызунов и человека). Главное открытие, связанное с этим - высокое структурное и функциональное постоянство этих генов у столь разных организмов, которое можно распространить на всех эукариот. Вывод о том, что механизм NER сходен, если не идентичен у всех видов эукариот, означает, что данные полученные на одних организмах, можно смело приложить к другим. Дефекты NER у человека приводят к появлению различных наследственных синдромов (XP, CS, TTD, UVSS), о которых мы поговорим ниже.

Прежде чем углубляться в подробности, неизбежно придется остановиться на вопросах номенклатуры. Хорошо известен тот печальный и неизбежный опыт, что мутанты и соответствующие им гены приходится обозначать до того, как становятся понятны их структура и функции, к тому же в разных областях при использовании различных экспериментальных моделей складываются свои системы номенклатуры. Это часто приводит к путанице, и гены репарации ДНК не являются в этом смысле исключением. У дрожжей соответствующие гены обозначаются и у *S. cerevisiae* и у *S. pombe* как Rad и rad (от radiation), но их порядковые номера не совпадают. (Например, ген Rad3 *S. cerevisiae* и ген rad3 *S. pombe* - совершенно разные, а гомологом гена Rad3 является ген rad15). У млекопитающих обозначение репарационных мутантов и генов имеют разное происхождение. В экспериментах на клетках грызунов были выделены мутанты, относящиеся к 11 группам комплементации и имеющие различные дефекты ЭР, а человеческие гены, комплементирующие эти мутанты обозначили ERCC (Excision Repair Cross Complementing) 1-11. У человека же соответствующие мутанты были получены от больных с различными наследственными нарушениями репарации - пигментной ксеродермой (XP), синдромом Коккейна (CS) и трихотриодистрофией (TTD). Различные группы комплементации этих штаммов были обозначены в соответствии с источником их получения: XP-A (B,C,D,E,F,G), CS-A, CS-B, TTD-A, а их гены - XPA, XPB и т.д. Когда все эти гены были клонированы и анализированы, стало очевидно, что некоторые ERCC, XP, CS и TTD гены идентичны. Например, ERCC2 и XPD. В таких случаях было принято, что обозначение ERCC следует, когда это возможно, заменять на обозначение гена болезни. К тому же другими способами были изолированы еще некоторые гены, вовлеченные в процесс NER, соответственно с независимыми названиями. Для того, чтобы мы могли легко ориентироваться в этом многообразии, приведем табл. 4 со всеми сводными данными по названиям генов, вовлеченных в NER

Эта таблица облегчит нам дальнейшее изложение материала. Почти во всех случаях гены обоих видов дрожжей были клонированы по их способности комплементировать УФ-чувствительность соответствующих мутантов.

Гены ERCC были клонированы подобным же образом при использовании геномной ДНК человека для обработки мутантных клеточных линий грызунов с последующим восстановлением нормальной УФ-чувствительности и клонированием корректирующей ДНК. Клонированные ERCC гены были затем введены путем трансфекции или микроинъекций в клетки, принадлежащие больным с различными синдромами. Так было установлено соответствие между генами ERCC и генами, отвечающими за некоторые человеческие болезни. Общая схема этого процесса у эукариот представлена на рис. 12.

В действительности эта схема несколько упрощена, так как NER может осуществляться двумя путями – общей репарацией генома (global genomic repair, GGR) и репарацией, спаренной с транскрипцией (transcription-coupled repair, TCR), а данная схема описывает собственно только процесс GGR, который очень хорошо изучен. Разберем этот процесс подробнее.

1(а). Распознавание повреждения. Комплексы ХРС-НР23А и RPA-ХРА (именно эти белки изображены на схеме) находят повреждения ДНК. ХРС-НР23А высокоспецифично распознает 6-4-фотопродукты, но не пиримидиновые димеры, 8-оксигуанин или O⁶-метилгуанин. RPA-ХРА напротив, узнают и 6-4РР и ДНК-сшивки. Неясно, какой из комплексов начинает процесс, мнения ученых противоречивы.

Вероятнее, что это RPA-ХРА, так как ХРА может двигаться по ДНК, как бы отыскивая повреждение, пока на него не наткнется. Оба эти комплекса могут быть задействованы и в GGR, и в TCR

Другой белковый комплекс, распознающий пиримидиновые димеры, состоит из двух «белков, связывающихся с поврежденной ДНК» (damaged DNA binding protein, DDB1 (h127) и DDB2 (p48), он же ХРЕ). Этот комплекс участвует только в GGR, но не в TCR. При этом его сродство к поврежденной ДНК крайне высоко - в 500 000 раз выше, чем к интактной, вероятно, поэтому он может первым связаться с повреждением, обнаруженным комплексом ХРС-НР23А на нетранскрибируемой нити, а также привлечь к месту повреждения комплекс RPA-ХРА. Очень важным наблюдением является то, что дефектные по Р53 клетки человека имеют сниженную активность GGR и нарушение репарации пиримидиновых димеров.

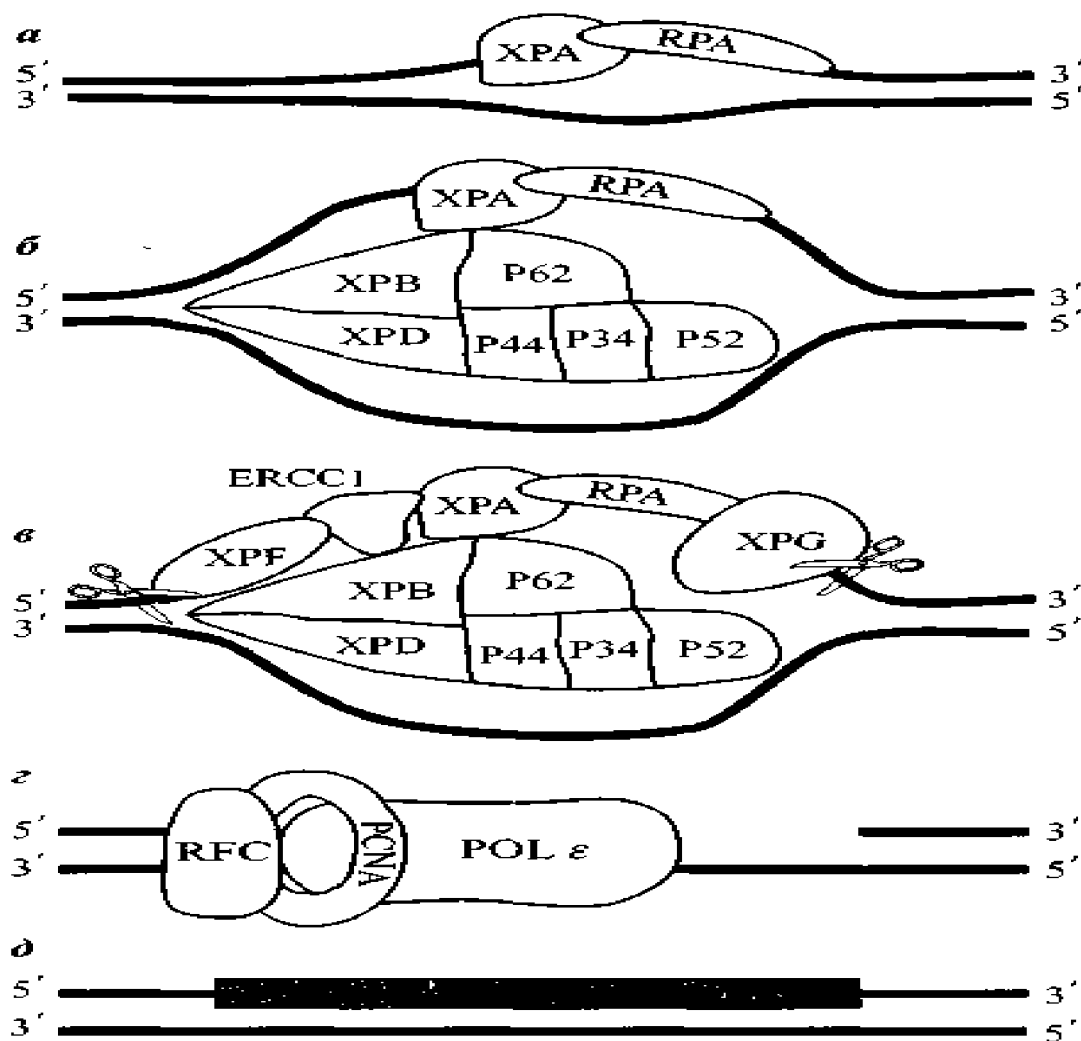


Рисунок 12. Схема процесса NER у эукариот.

Это связано с тем, что транскрипция генов XPC и DDB2 (XPE) зависит от P53 и индуцируется УФ-облучением. Клетки больных синдромом Ли-Фромени (мутантные по гену p53) таким образом являются дефектными по репарации пиримидиновых димеров, так как в них отсутствует P53-зависимая индукция DDB2. У человека XPC индуцируется не только УФ-светом, но и алкилирующими агентами и бензопиреном. При этом у мышей нет индукции DDB2 под действием УФ-облучения. Недавно получены крайне интересные данные о том, что при дефекте P53 XPC и XPE могут быть индуцированы гиперэкспрессией BRCA1 (белок, связанный

с развитием семейных форм рака молочной железы и яичников, breast cancer 1).

2 (б). Раскручивание ДНК. После распознавания повреждения к нему подходит фактор транскрипции РНК-полимеразы II - TFIIH, состоящий из 7 субъединиц (XPB, XPD, GTF2H1, GTF2H2, GTF2H3, GTF2H4, CDK7, CSNH, MNAT1). В большинстве случаев это привлечение осуществляется комплексом XPC-HR23A. TFIIH обладает геликазной активностью благодаря геликазам XPB и XPD, раскручивающим ДНК около повреждения в разные стороны.

3 (в). Эксицизия повреждения ДНК. После распознавания ДНК и образования открытого комплекса, ДНК надрезается с двух сторон от повреждения. 3'-инцизия осуществляется эндонуклеазой XPG, а 5'-эндонуклеазным комплексом XPF-ERCC1.

4 (г-д). Репаративный синтез и лигирование. Образовавшаяся брешь заполняется ДНК-полимеразами δ и ϵ и сшивается ДНК-лигазой I при участии сопутствующих факторов.

5.3.1. NER, спаренная с транскрипцией: TCR (transcription coupled repair)

В начале 80-х годов Филипп Ханавалт сформулировал представление о преимущественной репарации ДНК. Это явление заключается в более быстром удалении циклобутановых пиримидиновых димеров и некоторых других типов повреждений оснований из транскрипционно активных генов по сравнению с транскрипционно молчащими участками генома. Окончательное понятие (на сегодняшний день) преимущественной репарации таково: во многих, но не во всех, транскрипционно активных генах транскрибируемая (матричная) нить репарируется быстрее, чем нетранскрибируемая (кодирующая) нить (нить-специфическая репарация); и транскрибируемая часть генома репарируется быстрее, чем молчащая. Существование эксцизионной репарации нуклеотидов, спаренной с транскрипцией, как раз и является доказательством этой гипотезы.

У *E. coli* обнаружен мутант mdf (mutation frequency decline) с нарушением NER. Оказалось, что этот ген кодирует белок, названный TRCF (transcription repair coupling factor), который «убирает» комплекс РНК-

полимеразы вместе с транскриптом с ДНК, если тот остановиться перед повреждением, способствуя таким образом репарации данного повреждения. То есть вся система репарации, спаренной с транскрипцией, отличается от описанного нами ранее процесса NER только одним этим фактором.

Такие белки, как фактор связывания транскрипции и репарации (transcription Repair Coupling Factor, TRCF), явно вовлеченные в объединение транскрипции и эксцизионной репарации в то же время не являются белками, абсолютно необходимыми для транскрипции самой по себе.

TCR убирает различные повреждения, останавливающие продвижение РНК-полимеразы на транскрибируемой нити транскрибируемого гена. Дефект этого пути репарации приводит к Синдрому Коккейна (CS), при этом при данном заболевании вообще резко снижен уровень транскрипции и его относят к так называемым «транскрипционным синдромам», а не только к «репарационным синдромам». Именно с этим связано то, что уровень опухолеобразования у больных синдромом Коккейна не повышен, по сравнению с контролем – клеткам просто не хватает транскрипционной активности для поддержания опухолевых, активно пролиферирующих клеток. Хотя есть предположение, связывающее это явление с повышенным уровнем апоптоза. Для TCR основными необходимыми белками являются CSA, CSB, XPB, XPD (члены TFIIH) и XPG. CSB, но не CSA непосредственно связывается с РНК-полимеразой II (хотя не совсем понятно, как именно) и таким образом активирует соответствующую ветвь NER, что приводит к отсоединению остановившегося комплекса RNAPolII от поврежденной ДНК. TCR и GGR могут быть объединены белком CSB, вероятно, он работает как «фактор, разделяющий транскрипцию и репарацию». CSB использует свою способность к транслокации ДНК для того, чтобы отделить комплекс RNAPolII от остановленной вилки транскрипции. После обработки клеток таким агентом, как цисплатин или после УФ-облучения наблюдается CSA и CSB-зависимая убиквитинирование RNAPolII комплекса, облегчающая его перемещение и последующий протеолиз.

У дрожжей описаны дополнительный фактор Def1, взаимодействующий с Rad26 (гомолог CSB), ответственный за убиквитинирование и протеолиз RNAPII в тех случаях, когда повреждение не может быть отрепарировано. Есть ли гомолог этого фактора у человека – неясно. Для восстановления транскрипции RNAPII должна снова оказаться в гипофосфорелированной форме (только так она связывается с ДНК), количество которой резко падает после УФ-облучения. Может быть, при участии комплекса TFIIIS, RNAPII комплекс не отходит от ДНК, а лишь перемещается назад на 20-35 нуклеотидов от повреждения, что позволяет ему вернуться к прерванной работе после завершения процесса репарации. Вероятно, в TCR принимают участие еще два фактора – человеческий гомолог фактора 2 (HuF2, TTF2) и АТФ-зависимый фактор терминации RNAPII, которые также помогают убирать остановившиеся перед повреждениями РНК-полимеразы I и II. Возможно, в этот процесс вовлечен и один из белков MMR - MSH2.

Современные представления о различных системах эксцизионной репарации и их взаимосвязи могут быть хорошо отражены на рис. 13, где представлена схема, предложенная Г.Спивак, которая даже выделяет TCR в отдельный тип эксцизионной репарации нуклеотидов, а GGR считает синонимом NER.

На схеме показано, что при NER (GGR) повреждения распознаются комплексом XPC-HHR23 и, в некоторых случаях ДНК-связывающей активностью, контролируемой белком XPE. Субъединицы комплекса TFIIH XPB/XPD геликазы вместе с белком XPA и PCNA открывают ДНК вокруг повреждения. Инцизия эндонуклеазами XPG и XPF-ERCC1 предшествует эксцизии олигонуклеотида, содержащего повреждение. Брешь заполняется ДНК полимеразой δ или ϵ , причем реакция требует присутствия RFC, PCNA и RPA. ДНК лигаза I завершает реакцию восстановления непрерывности ДНК. При BER гликозилаза, которая может быть стимулирована XPG, распознает повреждение и удаляет основание. Получившийся AP-сайт распознается AP-эндонуклеазой (APE) или AP-лиазой (в некоторых случаях APE и AP-лиазная активности совмещены в одном и том же белке.) Продукт действия APE или AP-лиазы содержит 5' или 3' терминальный остаток, к которому и прилагается ДНК-

полимеразная активность полимеразы β или, соответственно, еще одна APE-активность.

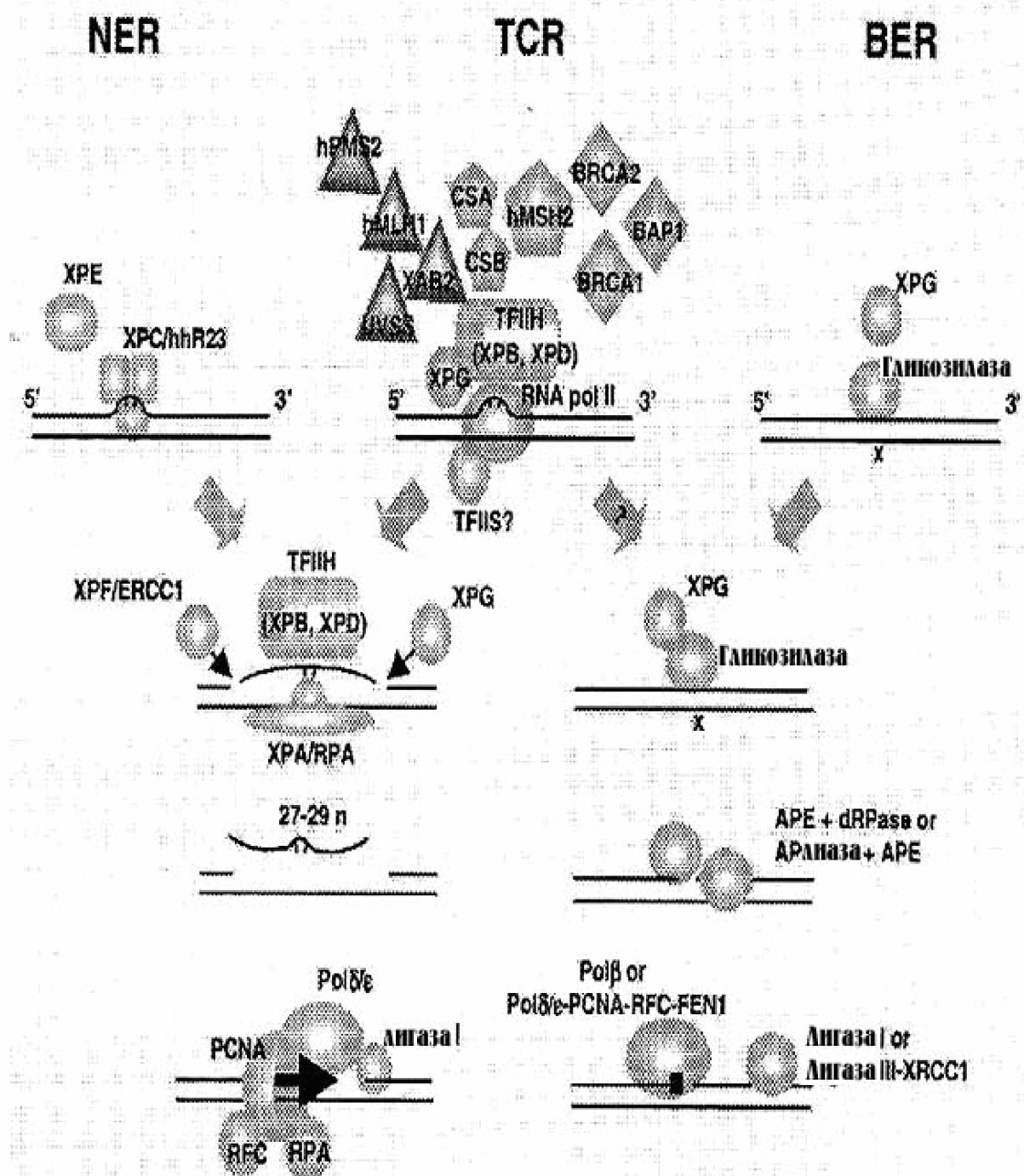


Рисунок 13. Схематическая модель путей эксцизионной репарации ДНК у эукариот. Объяснение в тексте.

Однонуклеотидная брешь заполняется ДНК-полимеразой β , а синтез длинного участка (6-14 нуклеотидов) обычно проводят полимеразы ϵ/δ , PCNA, RFC и FEN1. Лигаза I или комплекс лигазаIII/XRCC1 завершают репарационную реакцию.

Распознавание повреждения при TCR является очень сложным, оно инициируется в момент остановки РНК-полимеразы II перед повреждением, затем TFIIH и XPG призываются в то же место, возможно, в зависимости от природы препятствия. Дополнительные факторы, необходимые для всех типов повреждений, обозначены пятиугольниками, для массивных аддуктов – треугольниками, для поврежденных оснований – ромбами. В случае, если транскрипционный комплекс убирается или переносится, репарация протекает по пути NER, BER или другому специальному пути. Обратите внимание, что в распознавании повреждений при TCR принимают участие белки системы MMR – hMSH2, hPMS2, hMLH1.

5.3.3. Болезни, связанные с нарушением системы NER.

Система эксцизионной репарации нуклеотидов, как мы уже отмечали, была подробно изучена благодаря обнаружению у человека связанных с ней генетических заболеваний. Клинические и клеточные дефекты XP, CS и TTD были многократно описаны в различных обзорах и мы позволим себе остановиться на них достаточно коротко.

5.3.3.1. Пигментная ксеродерма (XP).

Само название - ксеродерма - было введено в медицинский обиход Гебра и Капоши в 1870 году на основе их клинических наблюдений. Определение "пигментная" было добавлено позже, в 1883 году тем же Капоши. Больные XP имеют крайне выраженную чувствительность кожи к солнечному свету и большую частоту различных кожных изменений, таких как веснушки, изменения пигментации, сухость, кожные рубцы и множественные кожные раки, включая меланомы и карциномы. Причем средний возраст появления первой опухоли у больных XP) - 8 лет (исследовано 186 случаев в США), в отличие от больных с подобными же опухольями, но без XP, у которых первая опухоль появляется

приблизительно в 50 лет (данные по 29 757 описанным случаям). В том же 1883 году Альберт Нейсер описал у части пациентов неврологические нарушения, которые могли быть объяснены как результат ранней гибели нейронов. В частности, один из возможных синдромов, при котором сочетаются клинические признаки пигментной ксеродермы с неврологическими нарушениями, был описан де Сантисом и Каччионе и получил соответствующее название в медицинской литературе. Таким образом, надо отметить, что неврологические нарушения достаточно часто сопровождают ХР (примерно 20 процентов всех описанных больных). Ткани глаза, такие как роговица, хрусталик и сетчатка особенно часто бывают повреждены, поскольку они постоянно подвергаются воздействию УФ-лучей. Из 337 описанных больных только у 9 не оказалось офтальмологической патологии. Также резко повышена вероятность появления карцином слизистой оболочки рта - в 20 000 раз по сравнению со средними значениями в популяции. Есть сообщения о нарушениях иммунной системы. Это подтверждается и случаями, когда ХР сопровождается нарушениями в костном мозге, что может отражать повышенную чувствительность клеток гемопоэтического ряда к эндогенным ДНК-повреждающим агентам. ХР распространена во всем мире, но ее частота различна в разных странах - например, в Европе и США эта цифра приблизительно составляет 1 случай на 250 000, а в Японии - 1 на 40 000. В охватывающем 830 описанных клинически с 1874 по 1982 год случаев обзоре у большей части пациентов болезнь была диагностирована в 12 лет, приблизительно равное число случаев у мужчин и женщин. Причем кожные проявления, такие как веснушки чувствительность к солнечному свету, отмечались уже с 1-2 лет. Родственные браки родителей отмечены приблизительно у 30 процентов больных. Во всех известных случаях болезнь передается как наследственной рецессивное ауточомное заболевание.

Клинические и клеточные нарушения могут быть самой различной силы тяжести. Клеточные исследования показывают, что культивируемые фибробласты, лимфоциты и кератиноциты ХР больных являются гиперчувствительными по критериям выживаемости и мутагенеза к воздействию УФ-лучей и химических мутагенов и канцерогенов,

образующих с ДНК прочные соединения. Они обычно сохраняют нормальную чувствительность к ионизирующей радиации, алкилирующим агентам и химическим веществам, вызывающим повреждения, которые могут быть отрепарированы системой BER.

Методом слияния с различными мутантными клеточными линиями были описаны 7 групп комплементации, то есть 7 различных типов этого заболевания. Эти формы имеют большие различия как по клиническим проявлениям, так и по репарационной способности на клеточном уровне. Кроме этого, были описаны больные (приблизительно 20 %) у которых не удалось обнаружить дефекта NER на клеточном уровне. Эта форма заболевания была названа XP-вариант, XPV. Остановимся подробнее на молекулярных дефектах, описанных у различных групп комплементации XP. Различные группы комплементации также встречаются в разных странах с различной частотой.

Группа ХРА. Эта группа чаще всего встречается в Японии. Клетки в культуре показывают крайнюю чувствительность к ультрафиолетовым лучам, внеплановый синтез ДНК составляет 2-5 процентов от нормы. Продукт гена ХРА имеет два цинковых пальца и является ДНК-связывающимся белком, причем эта способность к связыванию резко - в 1000 раз! - повышается в клетках, облученных ультрафиолетом. Этот белок локализован в ядре; с помощью сайт-направленного мутагенеза было показано, что для эксцизионной репарации необходим С-конец и один из цинковых пальцев, тогда как N-конец такой роли не играет. Также было показано, что белок ХРА взаимодействует с продуктом гена ERCC1. Это подтверждает, что ХРА белок может направлять комплекс ERCC1/XPF к поврежденному участку ДНК. В Японии 80 % больных имеют одну и ту же мутацию, находящуюся в акцепторном сайте сплайсинга третьего интрона. Это приводит к изменению рамки считывания и полностью инактивирует белок. Люди, гомозиготные по данной мутации имеют очень тяжелые симптомы заболевания.

Группа ХРВ. Это очень немногочисленная группа больных, совмещающая в себе признаки пигментной ксеродермы и синдрома Коккейна. Характеризуется крайне тяжелым течением заболевания и ярко выраженными дефектами на клеточном уровне. Внеплановый синтез ДНК

составляет 3-7 % от нормы. Продуктом гена XPB (ERCC3) является субъединица TFIIH - фактора транскрипции РНК-полимеразы II - размером 89 КД, имеющая несколько различных активностей, в том числе АТФ-зависимую геликазную активность. Для этого белка найдены и описаны гомологи у дрожжей. Мутации в этом гене могут быть различными. У первого описанного больного, имевшего очень тяжелые признаки одновременно XP и CS, выявлен дефект сплайсинга последнего интрона, из-за чего весь С-конец выпадает из рамки считывания. Два брата из второй семьи, у которых признаки обоих заболеваний были более сглажены, имели простую миссенс мутацию Т-С, с заменой Phe на Ser в положении 99.

Группа XPC. Это одна из самых распространенных групп комплиментации пигментной ксеродермы. Болезнь протекает по классическому типу с разной степенью выраженности симптомов. На клеточном уровне показана чувствительность к УФ-облучению, но несколько меньшая, чем в группах А и В. Уровень внепланового синтеза ДНК составляет 5-20 % от нормы. Белок XPC участвует в распознавании повреждений.

Группа XPD. Эта группа характеризуется тем, что пациенты имеют тяжелые неврологические симптомы, а у двух больных есть одновременно признаки XP и CS. К тому же в последнее время было установлено, что ряд больных TTD (тиотриходистрофией) имеют мутации в том же гене - XPD. Как и ген XPB, он кодирует одну из субъединиц фактора транскрипции TFIIH, размером приблизительно 87 КД. Белок RAD3/rad15/XPD имеет семь доменов, что типично для ДНК-геликаз. RAD3 и XPD белки имеют АТФ-зависимую ДНК-ДНК и ДНК-РНК геликазную активность и действуют в направлении 5' к 3' той нити, вдоль которой они перемещаются, то есть в направлении противоположном действию RAD25/XPB. Естественно было поставить вопрос о том, могут ли быть связаны столь различные симптомы, как при XP, XP/CS и TTD с различной локализацией мутаций в гене XPD. К сожалению, почти все определенные мутации в клетках больных были локализованы в С-конце белка, вне зависимости от внешних признаков заболевания. Было невозможно ясно разделить "XP-область" и "TTD-область". При этом идентичные мутации

72

не были найдены одновременно у больных с ХР и TTD симптомами. ХР всегда считалась результатом нарушений эксцизионной репарации. Столь отличные признаки триотриходистрофии (ломкость волос, связанная с недостаточностью обмена серы, задержка умственного и физического развития, чешуйчатая кожа и необычное лицо) были просто удивительны. Недавнее открытие, что продукты всех трех генов, дефекты в которых приводят к этому заболеванию - XPB, XPD и TTDA - являются субъединицами транскрипционного фактора TFIIH, приводят нас к выводу, что симптомы TTD являются не результатом дефекта эксцизионной репарации ДНК, но небольшим дефектом транскрипции, который и оказывает столь специфическое действие на развитие организма. К сожалению, остается непонятным, почему у больных TTD не развиваются дополнительно клинические признаки ХР. До сих пор ни один подобный больной не описан.

ХРЕ группа. Это группа больных с классическими признаками ксеродермы, достаточно мягко выраженной симптоматики. На клеточном уровне их чувствительность ниже, чем у других групп, а уровень внепланового синтеза ДНК достигает 40-50 % от нормы. Белок ХРЕ участвует в распознавании повреждений.

Группа XPG. Это достаточно редко встречающаяся группа комплементации, с тяжелым протеканием болезни и неврологическими дефектами. На клеточном уровне показана промежуточная чувствительность между группами А и Е, уровень внепланового синтеза ДНК не превышает 2 процентов. XPG белок имеет размер приблизительно в 134 кД, его дрожжевой гомолог - Rad2. Оба эти белка являются эндонуклеазами, вовлеченными в специфическую инцизию поврежденного участка во время эксцизионной репарации. Нуклеаза XPG надрезает нить, содержащую свободный 3'-конец от вилки. Недавно были описаны два неродственных случая с типичными тяжелыми симптомами синдрома Коккейна, при которых биохимический дефект соответствовал XPG группе, ранее не ассоциировавшейся с CS. Это расширяет наши представления о возможном пересечении дефектов ХР и CS. Таким образом, сейчас уже 3 из 7 групп комплементации ХР могут иметь внешние признаки CS.

Группа XPF. Это немногочисленная группа, описанная преимущественно в Японии (сейчас появились сообщения о выявлении подобных больных в Израиле). Пациенты имеют классическое проявление болезни, обычные дефекты на клеточном уровне и сохраняют примерно 20 процентов от нормального внепланового синтеза. Это также как и XPG эндонуклеаза, но работающая в прочном комплексе с другим белком - ERCC1 (у дрожжей соответственно комплекс Rad1/Rad10). Этот нуклеазный комплекс действует в направлении противоположном XPG-эндонуклеазе. То есть эти две нитееспецифические нуклеазы способны надрезать ДНК с разных сторон от поврежденного основания, ERCC1/ERCC4(XPF) или Rad1/Rad10 надрезает ДНК со стороны 5', а XPG или Rad2 - со стороны 3'.

ХР-вариант. Как уже отмечалось, среди пациентов, имеющих характерные признаки пигментной ксеродермы, примерно 20 процентов не отличаются от нормы на клеточном уровне по признаку выживаемости клеток после ультрафиолетового облучения и сохраняют нормальный уровень внепланового синтеза ДНК. Пиримидиновые димеры в этих клетках удаляются с той же скоростью и эффективностью, как и в клетках здоровых доноров, это подтверждается нормальным уровнем исчезновения участков, чувствительных к эндонуклеазе, специфичной к пиримидиновым димерам. Сам термин ХР-вариант и был предложен специально для таких случаев, когда при внешних признаках болезни невозможно обнаружить дефектов в эксцизионной репарации ДНК. При этом клетки ХР-вариант показывают явную недостаточность репликации поврежденных участков ДНК. О молекулярном дефекте при этой группе комплементации мы поговорим позже.

5.3.3.2. Тиотриходистрофия (TTD). Транскрипционная гипотеза.

Прежде чем перейти к синдрому Коккейна, остановимся кратко на тиотриходистрофии. Это заболевание передается как аутосомное рецессивное. Для него в первую очередь характерна специфическая ломкость волос, связанная с уменьшением содержания в них низкомолекулярных богатых серой белков. Под микроскопом такие волосы выглядят как "тигриный хвост", составленный светлыми и темными

поперечными полосами. С таким названием TTD была описана впервые в 1968 году. При этом белки с низким содержанием серы, выделенные из волос индивидуумов с TTD, сохраняют свой молекулярный вес и остальные биохимические свойства. Белков же с высоким содержанием серы не только меньше по количеству по отношению к контролю, но и они содержат меньше цистеина и имеют сильно измененный аминокислотный состав. Тогда же были описаны синдромы, связанные с TTD, включающие одновременно еще и такие признаки как ихтиозис, повреждение интеллектуальных функций, пониженную плодовитость и маленький рост. Названы они были по первым буквам английских обозначений IBIDS. У некоторых больных также наблюдалась и повышенная фоточувствительность, из-за чего в название была добавлена еще одна буква - PIBIDS. В тоже время надо всегда помнить, что этих больных очень немного, поэтому нет полного согласия при описании клинических проявлений синдрома. Таким образом, существует представление, что эти и, возможно, некоторые другие синдромы, включая синдром Коккейна, представляют спектр заболеваний с перекрывающимися клиническими признаками, связанных сходным патогенетическим механизмом - дефектом транскрипции особой группы генов. Необходимо отметить, что больные TTD в отличие от XP не имеют повышенной предрасположенности к раку кожи.

Фоточувствительность проявляется примерно в половине случаев TTD, в которых одновременно показан дефект эксцизионной репарации нуклеотидов после УФ-облучения. Причем в большинстве этих случаев дефект репарации соответствует дефекту XPD и XPB. С этим выводом согласуется и то, что пациенты с TTD, не сопровождающейся фоточувствительностью, не демонстрируют дефекта эксцизионной репарации. Некоторые же из описанных больных TTD с фоточувствительностью дефекта генов группы XP не имеют.

В последнее время активно изучался ген XPD от различных групп пациентов, как с пигментной ксеродермой, так и с тиотриходистрофией. На основе этого изучения была выдвинута гипотеза "транскрипционного синдрома". Сам ген XPD, как и его крайне консервативный дрожжевой гомолог Rad3, является мультифункциональным, с определенной ролью как

в эксцизионной репарации так и в РНК-полимераза-II- зависимой транскрипции. Таким образом, можно предположить, что TTD (а также и некоторые другие болезни, связанные с повреждениями эксцизионной репарации ДНК) могут иметь своей причиной дефектную транскрипцию. Основной идеей данной модели является то, что некоторые мутации в гене XPD (и, возможно, в других генах с двойным участием в репарации и транскрипции), при которых не полностью подавляется их основная транскрипционная функция, могут тем не менее изменять эффективность транскрипции какой-то части генов и, в некоторых случаях, - способность гена XPD поддерживать нормальную эксцизионную репарацию. Эта часть генов может быть специфически определена как гены особенно нуждающиеся в высоком уровне экспрессии или высоко чувствительные к ее очередности во времени. Вероятно, этим могут быть объяснены дефекты развития у пациентов TTD, CS и некоторых XP. Возможная схема этого процесса, изображенная на рис. 14, предложена Брайтоном с соавт.

На рис. 14 показаны различные возможности проявления мутаций в одном из белков, входящих в человеческий основной транскрипционный комплекс TFIIH, содержащий несколько субъединиц, в том числе белок XPD, который показан на 14А между двумя стрелками. 14В - Некоторые мутации инактивируют только ту функцию белка, которая связана с эксцизионной репарацией, и приводят к типичной XP, сопровождающейся повышенным риском рака кожи. 14С - Другие мутации могут подавлять репарационную функцию и/или менять уровень транскрипции одного или нескольких специфических генов, приводя к клиническим и клеточным симптомам TTD, включая и уменьшение предрасположенности к раку кожи.

Клиническое разнообразие TTD может быть объяснено зависимостью от генов, затронутых в каждом конкретном случае.

Дальнейшие исследования этого транскрипционного комплекса показали, что при его введении в клетки от различных больных только в трех группах наблюдается коррекция дефекта эксцизионной репарации. Таким образом стало ясно, что кроме XPB и XPD белков еще один, пока окончательно не определенный компонент TFIIH, может лежать в основе заболевания TTD. Эта группа больных была определена как TTDA.

Из этих экспериментов видно, что существуют по меньшей мере три группы комплементации фоточувствительной формы TTD. Первая - это TTDA, связанная с дефектом одной из субъединиц TFIIH, но не XPB и XPD. Вторая - определена как форма TTD, ассоциированная с дефектом в XPB гене, а третья - с мутацией в гене XPD. Нефоточувствительная форма TTD, не имеющая дефекта в эксцизионной репарации, показывает нам вероятное наличие еще одной, четвертой группы комплементации у этого заболевания. Хотя существует и некоторая вероятность, что у больных этой группы мутации в генах XPB, XPD и TTDA могут не затрагивать репарационную функцию, а только изменять транскрипцию.

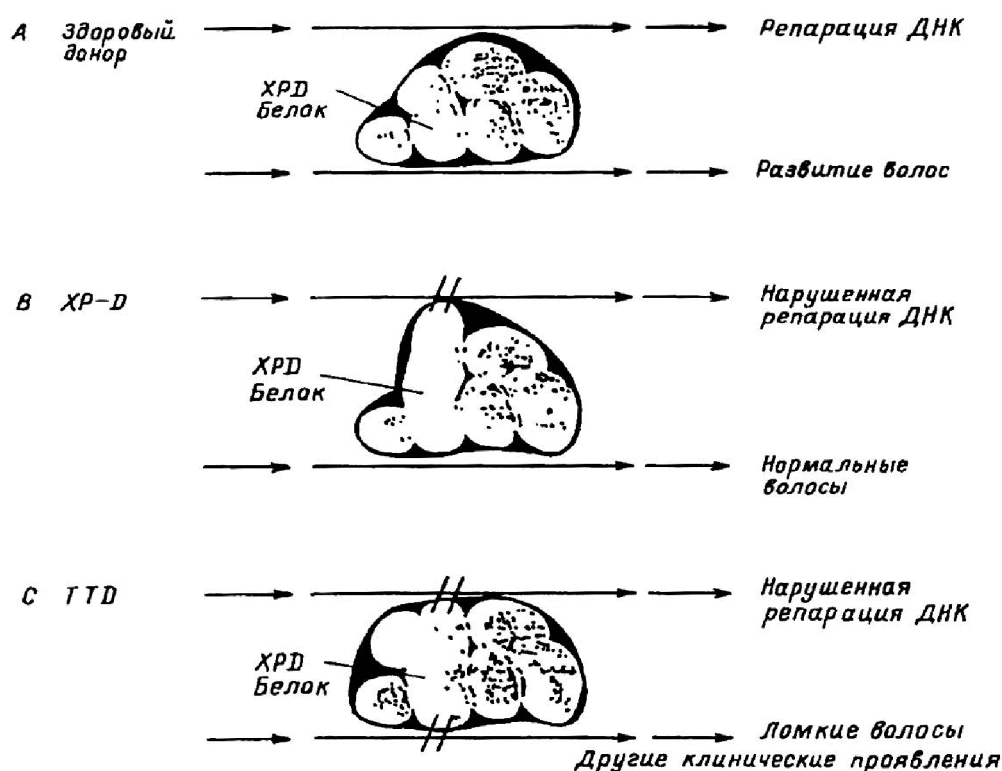


Рисунок 14. Транскрипционная гипотеза. Объяснения в тексте.

После обсуждения транскрипционной гипотезы, хотелось бы кратко остановиться на связи TTD с раковыми заболеваниями. Хорошо известно, что все больные XP, включая XPB и XPD группы имеют выраженную предрасположенность к раку кожи (а также и, вероятно, другим формам рака). С другой стороны большинство, если не все,

больные фоточувствительной формой TTD имеют клеточный дефект эксцизионной репарации и повышенную частоту мутаций и при этом не предрасположены к раку кожи. Этот парадокс существенно поколебал основную идею о том, что дефект эксцизионной репарации нуклеотидов, повышенная мутабельность и предрасположенность к опухолям являются патогенетически связанными событиями. Транскрипционная гипотеза позволяет нам высказать еще одно предположение, почему у больных с дефектом эксцизионной репарации, таких как TTD, мы не наблюдаем рака кожи. Вероятно, что среди генов, чья транскрипция нарушена из-за дефекта в TFIIH, один или несколько могут кодировать белки, определенный уровень содержания которых необходим для развития неопластической трансформации, то есть измененный уровень экспрессии этих генов может иметь противоопухолевый эффект.

5.3.3.3. Синдром Коккейна. (CS)

Мы уже несколько раз упоминали это заболевание раньше. Было показано, что по многим признакам CS можно рассматривать как один из большой группы так называемых транскрипционных синдромов, особенно когда речь шла о больных, генетически связанных с ХР. В тоже время синдром Коккейна во многих случаях не имеет никакой связи с ХР, и будет нами здесь представлен как независимое заболевание. Этот редкий синдром был описан в середине тридцатых годов Коккейном. Считается аутомным рецессивным генетическим заболеванием, описан в семьях, часто проявляется в результате родственных браков.

Больные страдают карликовостью в результате задержки роста и развития с самого раннего возраста. Среди наиболее часто встречающихся признаков - фоточувствительность, глухота, атрофия зрительного нерва, удлиненные по отношению к туловищу конечности, большие уши и нос, глубоко запавшие глаза и ускоренное старение. Пациенты умирают в возрасте около 12 лет. В тех редких случаях, когда они доживают до 18-20 лет, у них в отличие от ХР нет выраженной предрасположенности к опухолям (как и у TTD). Необычная чувствительность этих больных к солнечному свету позволила сделать предположение о наличии дефекта в

78

репарации УФ-повреждений ДНК. Фибробласты больных CS показывают резко пониженную выживаемость после УФ-облучения по сравнению с клетками здоровых доноров. Эта чувствительность к ультрафиолету коррелирует с повышенной чувствительностью к химическим агентам, считающимся УФ-миметиками. Например, к N-ацетокси-N-2-ацетил-2-аминофлюорену или 4-нитрохинолину. Некоторыми авторами описана также и чувствительность к гамма-облучению. При этом обычно клетки больных синдромом Коккейна не чувствительны к гамма-миметикам (алкилирующим агентам в том числе).

При облучении клеток нормальных доноров ультрафиолетом мы наблюдаем немедленное подавление валового синтеза ДНК в степени, зависимой от дозы, а затем полное восстановление исходного уровня в течение 5-8 часов. В клетках больных синдромом Коккейна, как и больных пигментной ксеродермой, наблюдается явный дефект этого восстановления. В растущих клетках CS также наблюдается подавление синтеза РНК УФ-облучением, но восстановление идет несколько быстрее, чем в случае ДНК синтеза. Этот феномен дефектного восстановления синтеза РНК после УФ-облучения обычно используется как диагностический критерий для дискриминации синдрома Коккейна. Этот дефект коррелирует с наличием карликовости, умственной отсталости и чувствительности к солнечному свету.

Больные синдромом Коккейна, как и пигментной ксеродермой, относятся к нескольким различным группам комплементации, основными среди которых являются две – А и В. При этом надо отметить, что те редкие случаи, когда мы наблюдаем признаки синдрома Коккейна у больных пигментной ксеродермой групп В, D и G, не относятся к этим двум группам комплементации, а рассматриваются отдельно и обозначаются как XPB/CS; XPD/CS и XPG/CS. Таким образом, к настоящему времени у синдрома Коккейна описано 5 различных групп комплементации.

Ген CSA клонирован и кодирует белок, относящийся к древней группе белков, часто называемых семейством с WD-повторами, WD-40-повторами или GH-WD-повторами. Белки этого семейства не обладают какими-либо каталитическими свойствами, но способны служить

передатчиками сигналов внутри клетки. Мне бы хотелось остановиться на них немного подробнее. Эти белки получили свое название из-за того, что внутри каждого белка имеется от 4 до 8 высококонсервативных аминокислотных последовательностей, содержащих от 23 до 41 аминокислот и фланкированных с одной стороны GH (Gly-His), а с другой - WD (Trp-Asp). Таких белков обнаружено 27 (CSA - 28-ой), причем функция 20 из них уже ясна, хотя бы приблизительно. Впервые WD-повтор был обнаружен в β -субъединице GTP-белка, или, как их теперь обычно называют, G-белка, который передает сигнал через плазматическую мембрану; и был назван β -трансдуцин-повтором. Этот белок усиливает связывание α -субъединицы G-белка с рецепторами гормонов и другими внутриклеточными сигнальными молекулами, способствуя объединению в тройной комплекс рецептора и G- α - β - γ . Эта способность G- β облегчать объединение различных белков и образование мультибелковых комплексов может служить ключом к пониманию функций и других белков, содержащих WD-повторы. Например, особая роль в объединении макромолекул во время сплайсинга мРНК (белок Prp4), модификации мРНК (белок CstF), транскрипции (TafII80; TUP1). Аналоги G- β субъединицы были описаны и у других организмов, включая дрожжи и диактиостилию, и показали очень высокую степень консерватизма между последовательностями повторов, находящихся в одинаковом положении внутри белка (у G- β -белка этих повторов 5 и они обозначаются повтор 1 G, повтор 2 G и т.п.). Таким образом, мы видим, что эти белки сохраняют свои последовательности не менее 1 миллиона 200 тысяч лет, которые отделяют эволюционно человека от диактиостилюма и дрожжей. Подобная же картина наблюдается и в других группах WD-белков.

Таким образом, все описанные до сих пор группы белков с WD-повторами показывают крайне высокую степень эволюционного консерватизма, сравнимую только с таковой у гистонов (взаимодействующих с широким кругом различных белковых и ДНК-овых последовательностей) и кальмодулинов (взаимодействующих с большим числом несвязанных энзимов, регулирующих обмен ионов Ca^{++}). Из этого можно сделать вывод, что и у белков, содержащих WD-повторы, их

80

функции были определены по меньшей мере более 1.200 миллиона лет назад. Способность же этих белков к многомерному связыванию с другими белками указывает на их значение в физиологическом объединении различных клеточных процессов.

Белок CSA содержит 396 аминокислот и имеет молекулярную массу приблизительно 44 кД. Ген, кодирующий этот белок, был картирован на 5 хромосоме - 5p14-p12. Этот белок образует комплекс с белком CSB и белком p44, входящим в состав того же самого транскрипционного комплекса TFIIN, что и белки XPB и XPD. Отвечает за это связывание N-конец белка, так как даже обрезанный CSA белок, содержащий только N-конец с 146 или 187 аминокислотными остатками был способен взаимодействовать и с CSB и с p44.

Ген, кодирующий белок CSB, был определен несколько раньше также с помощью функциональной комплементации чувствительности к ультрафиолету клеток одного из штаммов грызунов, дефектного по гену ERCC6. Он оказался способным исправлять клеточный фенотип клеток от больных CSB. Таким образом была доказана идентичность двух генов - CSB и ERCC6. У человека этот ген картирован на 10q11.2 и кодирует полипептид, содержащий 1493 аминокислоты с молекулярной массой около 169 кДа. Этот белок имеет несколько специфических областей. Например, последовательность между 356-394 аминокислотными остатками содержит 60% глутамина и аспаргина, включая 10 кислых остатков подряд. Подобные кислые районы были обнаружены во многих ядерных белках, связывающихся с хроматином или с гистонами. Наиболее интересной чертой этого полипептида является участок, содержащий около 400 аминокислот (527-950), в его середине. Этот участок охватывает согласованную группу нуклеотидов, высококонсервативную и характерную для обширного семейства белков, обозначаемых как SWI/SNF семейство. На сегодняшний день известно 29 членов этого семейства. Внутри каждого белка этого семейства тот самый участок приблизительно в 400 аминокислот состоит из очень консервативных коротких последовательностей аминокислот, прерываемых более протяженными менее консервативными последовательностями, которые варьируют по размерам у разных членов семейства. Вначале таким образом были

описаны два суперсемейства ДНК и РНК геликаз. При более подробном исследовании этой гомологии, было выдвинуто предположение о существовании по крайней мере 8 подсемейств, одно из которых включает человеческий полипептид CSB и его дрожжевой гомолог Rad26. Другое подсемейство включает дрожжевой полипептид Swi2/Snf2, который является ДНК-зависимой АТФ-азой, входящий в состоящий из по крайней мере 11 субъединиц мультибелковый комплекс, вовлеченный в активацию транскрипции у дрожжей (SWI/SNF комплекс), и его гомологи у человека и дрозофилы. Третье подсемейство включает белок дрозофилы ISWI, который тоже является частью мультибелкового комплекса, называемого NUF2, принимающего участие в транскрипции. АТФ-азная активность комплекса предположительно связана с ISWI белком. Предполагают, что оба эти комплекса могут быть "молекулярными машинами", вызывающими активацию транскрипции с помощью механизмов, вовлеченных в ремоделирование хроматина. Вероятно, в суперсемействе SWI/SNF содержатся АТФ-азные субъединицы различных хроматин-ремодулирующих комплексов (каждому соответствует свое подсемейство SWI/SNF белков), основной функцией которых является нарушение структуры хроматина для различных операций с ДНК, не обязательно именно для транскрипции. Участие подобного хроматин-ремодулирующего комплекса в репарации ДНК выглядит вполне естественным. В белке CSB присутствует также и геликазный мотив, но данные о его геликазной активности пока экспериментально не подтверждены. CSB белок также имеет общие последовательности с фактором, связывающим транскрипцию и репарацию *E.coli* (TRCF). К настоящему времени сложилось представление, что CSB белок является функциональным гомологом TRCF и что он (по-видимому, вместе с белком CSA) играет особую роль в привлечении белков эксцизионной репарации в район остановившейся транскрипции и/или их взаимодействии с РНК-полимеразным комплексом. Об этом мы подробнее будем говорить при обсуждении пострепликативной репарации.

Существует много наблюдений, подтверждающих представление о сопряженном дефекте репарации и транскрипции при синдроме Коккейна. Во всех случаях, когда это заболевание диагностировалось, на клеточном и

молекулярном уровне наблюдались мутации в генах, кодирующих белки либо прямо входящие в состав транскрипционного комплекса TFIIH, либо взаимодействующие с ним. К тому же все тяжелые симптомы этого заболевания невозможно объяснить только с точки зрения репарации ДНК, тогда как их реальной причиной могут быть сниженный уровень и нарушение последовательности транскрипции в онтогенезе.

5.3.3.4. Синдромы повышенной чувствительности к УФ-облучению (UVS-S)

К настоящему времени известны так же многочисленные, связанные с TCR, синдромы повышенной чувствительности к УФ-облучению (UVS-S), но неясно, какие именно гены и белки отвечают за них. Пациенты с синдромами чувствительности к УФ-излучению (UVS-S) являются чувствительными к солнечному свету, но не имеют никаких неврологических дефектов или дефектов развития. Сравнительные исследования показали, что UVS-S отличаются от пигментной ксеродермы (XP) и синдрома Коккейна (CS) и не комплементируются с ними. Клетки UVS-S имеют некоторые характеристики, совпадающие с CS, включая нормальную GGR репарацию УФ-фотопродуктов, низкую выживаемость клонов и дефектное восстановление синтеза РНК после УФ-облучения. Эти наблюдения позволили утверждать, что клетки UVS-S, как и клетки больных CS, являются дефектными по системе репарации циклобутановых димеров, спаренной с транскрипцией (TCR). В результате сравнения репарации разных генов в клетках здоровых доноров, CSB и UVS-S, было показано, что гены UVS-S необходимы для TCR пиримидиновых димеров и, вероятно, других массивных ДНК-повреждений. Возможным различием между CSB и UVS-S пациентами является то, что гены, ответственные за возникновение UVS-S не необходимы для TCR повреждений, возникших в результате окисления активными формами кислорода. К тому же обнаружено, что репарация пиримидиновых димеров в обеих нитях была медленнее у пациентов с дефектом системы TCR, чем в нетранскрибируемой нити здоровых доноров. Из-за отсутствия системы TCR комплексы глобальной репарации задерживаются повреждениями в геномных областях вокруг отдельных

единиц транскрипции. Это показывает, что наши представления о тонких механизмах TCR пока далеко не полны и этот процесс сложнее, чем нам представлялось ранее.

6. Репарация, связанная с рекомбинацией.

В некоторые репарационные процессы кроме репликации – синтеза новой ДНК на месте вырезанного поврежденного участка – вовлечена и рекомбинация. Прежде чем перейти к подробному описанию этих репарационных процессов, остановимся вкратце на самом втором Р ДНК-метаболизма – рекомбинации.

7. Рекомбинация.

Генетическая рекомбинация включает несколько связанных между собой процессов, в результате которых в клетках или организмах, где они происходят, создаются новые комбинации элементов — носителей генетической информации. Чаще всего мы говорим о рекомбинации при описании процесса кроссинговера, во время которого рекомбинация между гомологичными хромосомами приводит к интенсивной перетасовке отцовских и материнских генов в ходе мейоза.

Рекомбинация может происходить и в соматических клетках, где она проявляется обычно в виде обменов сестринских хроматид, которые не приводят к изменению генотипа или фенотипа клетки. Это связано с тем, что рекомбинация происходит между взаимно соответствующими парами оснований, так что ни один нуклеотид не добавляется и не удаляется из рекомбинантных хромосом. Также рекомбинация бывает часто вовлечена и в процессы репарации.

Существуют три типа рекомбинации: 1) общая, или гомологическая, 2) сайт-специфическая, 3) случайная, или негомологичная.

Рекомбинация, включающая обмены между гомологичными последовательностями ДНК, называется общей или гомологической рекомбинацией, и именно она будет главным предметом нашего интереса, так как именно гомологическая рекомбинация ДНК вовлечена в различные репаративные процессы. Подробное ее описание будет дано ниже, а пока остановимся кратко на двух других типах рекомбинации, происходящей под

контролем ферментов, опознающих специфические последовательности нуклеотидов, присутствующие на одной или двух рекомбинирующих молекулах. С помощью этого типа рекомбинации бактериальные вирусы и мобильные элементы перемещаются по геному.

7.1. Сайт-специфическая рекомбинация

Этот тип рекомбинации связан с обменом между специфическими последовательностями и характерен для прокариот и дрожжей. Сайт-специфическая рекомбинация обычно происходит при интеграции фаговых геномов в бактериальную хромосому. В результате рекомбинации обмениваются специфические последовательности фаговой и бактериальной ДНК, обнаруживающие короткие - 100-150 нуклеотидных пар - участки гомологии. Ферменты, вовлеченные в это событие, действуют только на особую пару последовательностей-мишеней. Сайт-специфическая рекомбинация была открыта в результате исследований механизма перемещения бактериофага λ по хромосоме *E.coli*. В интегрированном состоянии вирус внедрен в бактериальную хромосому и реплицируется как часть ДНК клетки-хозяина. Когда вирус проникает в клетку, на матрице вирусного гена синтезируется фермент λ -интеграза. Этот фермент и катализирует сайт-специфическую рекомбинацию. Процесс начинается с того, что молекулы интегразы плотно связываются со специфическими последовательностями на кольцевой хромосоме фага. Затем получившийся ДНК-белковый комплекс связывается со сходными, но не идентичными последовательностями на бактериальной хромосоме, сближая таким образом бактериальную и фаговую хромосомы. Затем интеграза делает надрезы в молекулах ДНК, формируя маленький участок сочленения гетеродуплекса. Интеграза напоминает ДНК-топоизомеразу в том отношении, что она формирует ковалентную связь с ДНК в тех же местах, где и разрывает ДНК. У бактерий топоизомераза I и гиразы являются ключевыми ферментами, определяющими степень суперскрученности ДНК при ее ответе на стрессовые внешние воздействия – такие как повышение температуры, изменении рН и оксидативный стресс. Топоизомераза I катализирует две основные реакции – разрезание и воссоединение одностранных нормально спаренной ДНК для релаксации ее суперскрученности при репликации или

транскрипции. Множество эндогенных факторов действуют на эти две реакции разобщающее и приводят к образованию и накоплению TopI-разрешающего комплекса, который является переходным к образованию двунитевых разрывов ДНК со всеми вытекающими последствиями.

Тот же самый механизм сайт-специфической рекомбинации приходит в действие, только в обратном направлении, когда фаг λ вырезается из сайта интеграции.

7.2. Случайная рекомбинация

Рекомбинация между негомологичными последовательностями нуклеотидов происходит в клетках прокариот и дрожжей достаточно редко, а в клетках млекопитающих — довольно часто. К негомологичной рекомбинации можно отнести процесс случайного встраивания вирусной или плазмидной ДНК в ДНК клеток животных.

Многие мобильные последовательности ДНК, включая вирусы и транспозоны, кодируют интегразы (другое название - транспозазы), которые позволяют их ДНК встраиваться в хромосомы с помощью механизма, отличающегося от сайт-специфической рекомбинации, которую использует бактериофаг λ . Так же, как и λ -интеграза, эти ферменты опознают специфические последовательности ДНК в соответствующем мобильном элементе, встраивание или вырезание которого они катализируют. В отличие от интегразы фага λ , эти интегразы/транспозазы не требуют специфических последовательностей ДНК в хромосоме-мишени и не формируют сочленения гетеродуплекса. Вместо этого они образуют надрезы с обоих концов линейной последовательности мобильного элемента, а затем катализируют взаимодействие этих концов ДНК с ДНК-мишенью, разрывая в ней фосфодиэфирные связи. Так как это разрезание происходит в разных нитях не прямо друг напротив друга, а с «зазором» в несколько нуклеотидов, то в результате в рекомбинантной молекуле ДНК образуются две короткие одонитчатые бреши, по одной на каждом конце мобильного элемента. На завершающем этапе процесса рекомбинации эти бреши застраиваются ДНК-полимеразой. Таким образом в ДНК клетки-хозяина образуются короткие дублированные прямые повторы, прилежащее к месту инсерции мобильного элемента. Такие фланкирующие

86

прямые повторы являются отличительной чертой случайной, или транспозиционной рекомбинации. Мы еще вернемся к процессу негомологической рекомбинации при описании негомологического воссоединения двунитевых разрывов ДНК. Там же будет и приведен соответствующий рисунок.

7.3. Гомологичная рекомбинация

Основным способом рекомбинации, безусловно, является гомологическая или общая рекомбинация. Она происходит между двумя дуплексными молекулами ДНК и является необходимым элементом не только процесса мейоза, но и репарации и репликации. Следует подчеркнуть, что ферменты, участвующие в этом процессе, могут использовать в качестве субстрата любую пару гомологичных последовательностей.

Рекомбинация между хромосомами в мейозе подразумевает физический обмен частями, происходящий по принципу «разрыв и воссоединение», в ходе которых две несестринские хроматиды рвутся и затем воссоединяются. Когда хромосомы начинают расходиться, их контакты между собой остаются в виде так называемых хиазм. Традиционно считается, что хиазмы представляют собой отражение существования кроссинговера, хотя формальных доказательств этой связи до сих пор не получено.

У прокариот известны ферменты, вовлеченные в каждый этап рекомбинации, и кодирующие их гены, имеющие название *rec* (recombination). Мутации этих генов фенотипически проявляются в неспособности к рекомбинации. Идентифицировано около 20 таких генов. У *E. coli* описаны два механизма гомологичной рекомбинации. Один - *RecA*-зависимый, то есть основанный на уникальных свойствах АТР-зависимой синаптазы - белка *RecA*, другой - *recA*-независимый, ключевым ферментом которого является АТР-независимая аннилаза - белок *RecT*. Белок *RecT* отжигает комплементарные участки ДНК взаимодействующих молекул так, что становится возможной репарация двунитевых разрывов ДНК. Но мы остановимся подробно на *RecA*-зависимой рекомбинации, так как именно этот тип рекомбинации оказался тем механизмом, эволюция которого привела к появлению особой системы репарации двунитевых разрывов у эукариот. У *E. coli* в рекомбинацию, проводимую белком *RecA*, вовлечено

более 20 белков. Рекомбинация инициируется переходом белка RecA в активную форму RecA*, представляющую собой тройной комплекс RecA::АТР::онДНК, образующийся при полимеризации отдельных молекул RecA на онДНК в присутствии АТР. То есть онДНК выступает в качестве "затравки" процесса. Гомологическая рекомбинация может быть инициирована как двунитевыми разрывами ДНК так и одонитевыми брешами. Существует много доказательств того, что даже единственной брешы только в одной цепи молекулы ДНК достаточно для инициации общей рекомбинации. Химические препараты или облучение, приводящие к образованию одонитевых разрывов, будут стимулировать рекомбинацию. В принципе, инициировать рекомбинацию в клетке может любая онДНК. Однако в нормальной клетке баланс ферментов таков, что образующиеся в ходе репликации одонитевые пробелы (между фрагментами Оказаки) не являются рекомбиногенными.

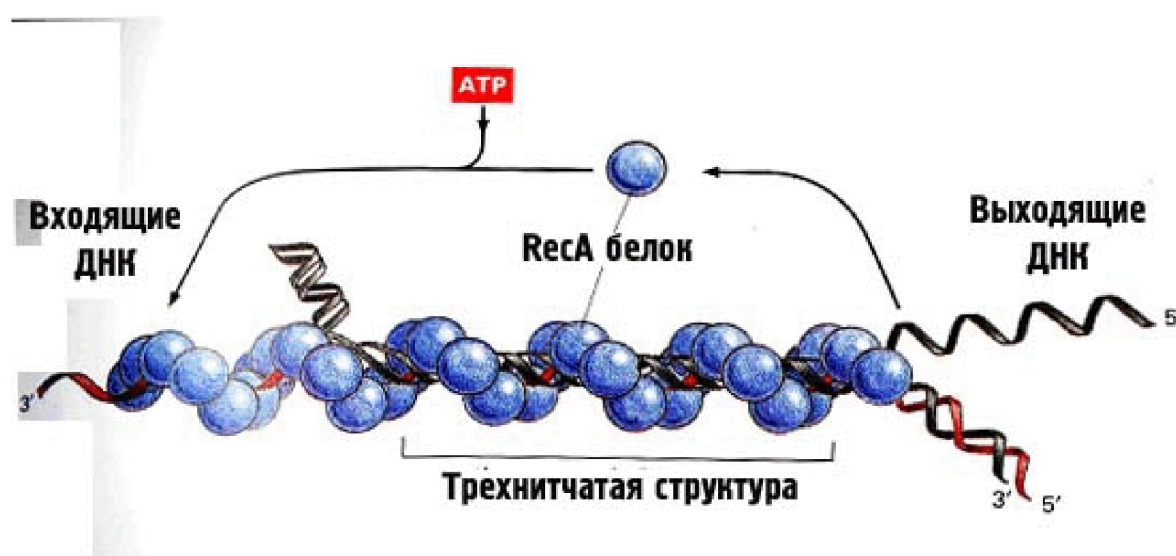


Рисунок 15. Белок RecA организует трехнитчатую структуру ДНК.

Дальнейшее развитие процесса гомологической рекомбинации у *E.coli* протекает следующим образом. Нить ДНК, покрытая белком RecA, растягивается, филамент RecA::АТР::онДНК имеет спиральную структуру и способен втягивать внутрь своей спирали молекулы днДНК партнера с образованием трехнитевой структуры, в которой и разыгрывается

основной акт рекомбинации - переключение комплементарного спаривания, приводящее к "переносу" одной из нитей вошедшей ДНК на онДНК, находящуюся внутри филамента. Как видно, небольшой по размеру белок RecA (у бактерий его молекулярная масса составляет 38 кДа) полифункционален: он взаимодействует с АТР, образует филамент на онДНК, взаимодействует с днДНК, осуществляет гомологичный синапс молекул ДНК и перенос нити, как это показано на рис. 15. В ходе взаимодействия с АТР и онДНК белок претерпевает конформационные изменения, а в реакции переноса нити он использует свою ДНК-зависимую АТРазную активность, которая особенно необходима при взаимодействии областей ДНК с несовершенной гомологией.

Рекомбинационный процесс условно может быть разбит на три стадии: предсинаптическую, синаптическую и постсинаптическую. Первая включает подготовку ДНК-субстрата, инициирующего реакцию рекомбинации, то есть онДНК. Рассмотрим реакцию гомологической рекомбинации, инициированную наличием двунитевого разрыва, то есть конца двунитевой ДНК. Как правило, конец днДНК атакует нуклеаза RecBCD, которая за счет своей сильной геликазной активности (скорость расплетания ДНК до 1 т.п. нуклеотидов в секунду, процессивность до 30 т.п.н.) раскручивает ДНК вплоть до специфического рекомбинационного сайта "chi" (crossover hot spot instigation), находящегося в строго определенной ориентации (5'-GCTGGTGG). При этом фермент RecBCD действует как частощепящая с 3'-конца и как редкощепящая с 5'-конца экзонуклеаза. Связываясь с участком chi, нуклеаза RecBCD модифицирует субъединицу RecD, теряя при этом 3'- и, наоборот, активируя 5'-экзонуклеазную активность, под действием которой и образуется онДНК с 3'-концом. Эта онДНК покрывается белком RecA, что создает рекомбинационно активный филамент RecA::АТР::онДНК с атакующим 3'-концом, как это показано на рис 16 (Ланцов, 2001). RecBCD обладает несколькими важными для рекомбинации активностями, которые, однако, проявляются лишь при взаимодействии с участком chi, что превращает "ДНК-деградазу" RecBCD в "рекомбиназу". В случае инактивации этого фермента его заменяют 5'-3'-экзонуклеазы RecE или RecJ, которые совместно с геликазой RecQ способны создавать онДНК с 3'-концом.

Однонитевые участки ДНК, покрытые белком SSB, могут стать субстратом рекомбинационной реакции только при условии, что белок SSB будет вытеснен белком RecA. Однако такого рода события являются, скорее, исключением, так как сродство к онДНК у белка SSB выше, чем у RecA. Предполагается, что в клетке белок RecA пассивен и "складирован" в пачки, образуемые путем бокового взаимодействия его филаментов, и что он "рекрутируется" при рекомбинационной репарации путем взаимодействия с молекулой ATP и последующей полимеризации на онДНК для создания тройного активного комплекса RecA::ATP::онДНК. Вероятно, белок RecB способен заранее привлекать белок RecA к месту возможного образования свободного 3'-конца и способствовать его преимущественной загрузке на однонитевую ДНК до того, как с ней успеет связаться белок SSB. В случае, когда этого не происходит, для связывания с онДНК белок RecA использует специализированные комплексы белков модуляторов RecF, RecO и RecR. Только так RecA может вытеснить уже связанный с однонитевой ДНК белок SSB и полимеризоваться на онДНК. В норме у клеток дикого типа в ходе репликации такие замещения репликационного белка SSB рекомбинационным RecA возможны лишь в редких случаях; при этом модуляторный комплекс RecOR, обладая сродством к онДНК, помогает связыванию RecA с этой ДНК, а другой комплекс RecFR со сродством к днДНК ограничивает полимеризацию белка RecA участком онДНК.

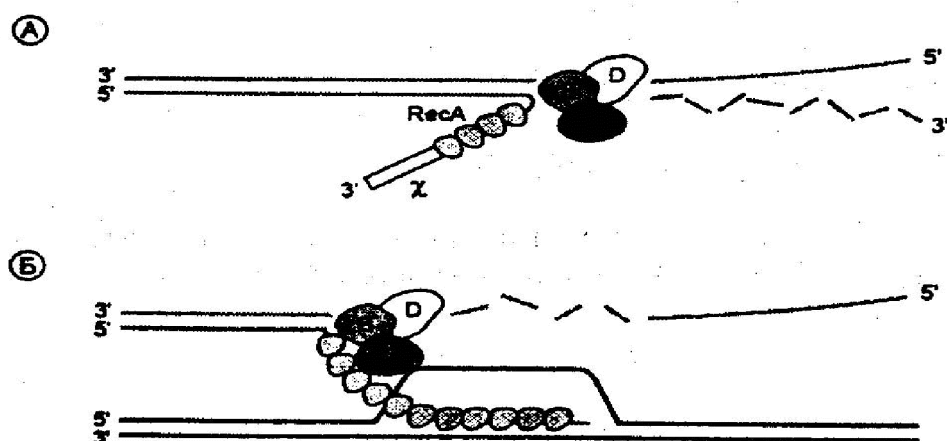


Рисунок 16. Взаимодействие белка RecA с белками RecBCD

В белке RecA имеется несколько сайтов связывания с ДНК, поэтому он может удерживать одионитевую и двунитевую цепи ДНК вместе. Эти сайты позволяют белку RecA катализировать многоступенчатую реакцию (называемую синапсисом) между двунитевой молекулой ДНК и гомологичными районами одонитевой, как показано на рис. 17 (Ланцов, 2001).

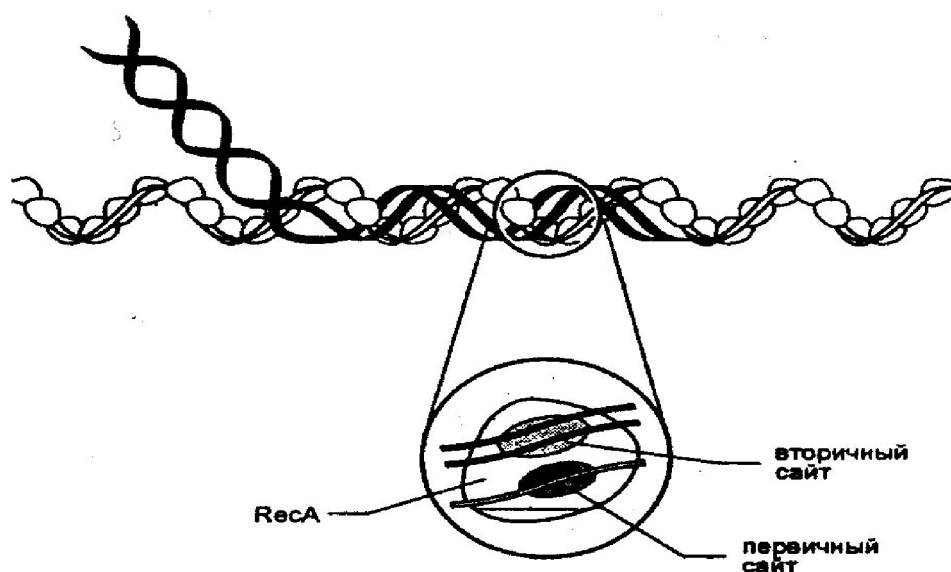


Рисунок 17. Связывание белка RecA с одонитевой и двунитевой ДНК.

Первым шагом в синапсисе является спаривание комплементарных последовательностей нуклеотидов. В результате образуется особая трехнитевая структура ДНК. Затем короткий гетеродуплексный участок, в котором нити из двух различных молекул начали спариваться, увеличивается из-за «миграции ветви» с образованием D-петли (displacement loop). «Миграция ветви» может происходить в любой точке, где две одиночные цепи ДНК, имеющие одинаковые последовательности, конкурируют за возможность спариваться с одной и той же комплементарной нитью. Неспаренный участок одной из одиночных нитей заменяется спаренным районом другой, двигая точку ветвления. Спонтанное движение

ветви равновероятно в любом направлении. Поскольку белок RecA катализирует однонаправленное движение ветви, это создает район гетеродуплекса длиной в несколько тысяч пар оснований. Такое расширение спаренного участка за счет миграции ветви ДНК осуществляется геликазами RuvAB и/или RecG. «Миграция ветви» приводит к вытеснению лишней нити ДНК, которая, в свою очередь, спаривается с комплементарной нитью партнера по рекомбинации, что приводит к образованию структуры Холлидея - четырехнитевой структуры ДНК, у которой две нити одной полярности находятся в перекресте. В этой структуре две гомологичные молекулы ДНК, которые раньше были спарены, теперь удерживаются вместе за счет сформировавшихся обменов между двумя из четырех цепей: по одной из каждой молекулы ДНК. Структура Холлидея имеет две особенности: 1) точка обмена между цепями может быстро мигрировать вперед и назад; 2) она состоит из двух пар цепей — одна пара пересекающихся и одна пара непересекающихся.

Третья стадия - "разрешение структуры Холлидея". Эту стадию осуществляет топоизомеразный комплекс RuvABC. Вначале эндонуклеаза RuvC (субъединица этого топоизомеразного комплекса) вносит координированные разрывы в нити ДНК одной полярности, затем разрывы зашиваются, молекулы ДНК расходятся и процесс перетасовки генетического материала завершен.

Таким схематически представляется процесс RecA-зависимой рекомбинации у бактерий. Подобным же образом его пытаются представить и у *S. cerevisiae*, отыскивая функциональные аналоги или даже гомологи. Главная роль гомологической рекомбинации у эукариот (кроме мейоза) – это воссоединение двунитевых разрывов ДНК и участие в пострепликативной репарации. Двунитевые разрывы ДНК являются самыми опасными для развития тяжелых генотоксических эффектов – разрывов хромосом, их перестроек и клеточной гибели. У высших эукариот один нерепарированный двунитевой разрыв в важном гене может привести к гибели клетки путем апоптоза.

Рекомбинационную репарацию (это словосочетание является по сути синонимом гомологической рекомбинации у эукариот) этих разрывов контролирует ряд генов, принадлежащих к эпистатической группе RAD52,

среди которых особое место принадлежит гену RAD51, так как его продукт структурно и функционально гомологичен бактериальному белку RecA. Другие гены, принадлежащие к этой группе, также кодируют белки структурно сходные с белком RecA. К их числу относятся гены Dmc1, Rad55 и Rad57 (последний, правда, кодирует белок более сходный с белком Rad51, чем с RecA). Но только Rad51 обладает способностью катализировать АТФ-зависимое гомологичное спаривание и обмен нитей ДНК в реакции переноса нити *in vitro* подобно тому, как это делает RecA. Так же, как RecA требует присутствия в реакции белка SSB, Rad51 требует присутствия его эукариотического аналога - фактора репликации RPA. Вероятно, подобно RecA, RAD51 функционирует в комплексе с другими белками, облегчающими его взаимодействие с однонитевой и двунитевой ДНК. Такой комплекс с Rad51 могут, например, образовывать белки Rad52, Rad54, Rad55 и Rad57. В кроссоверном разрешении холидеевских структур в клетках высших организмов могут принимать участие различные эндонуклеазы, в том числе XPF. При некроссоверном разрешении, при котором также нужны топологические изменения ДНК, их могут проводить RecQ-подобные геликазы вместе с топоизомеразой III. Подробно процесс гомологической рекомбинации у высших эукариот мы рассмотрим при описании процессов репарации двунитевых разрывов.

Белки, подобные Rad51 дрожжей, выявлены у грибов, у растений, птиц и млекопитающих, включая человека. У млекопитающих они найдены в мейотическом хроматине и в составе синаптонемального комплекса.

7.3.1. Генная конверсия

Иногда в результате мейоза получают три копии материнского аллеля и только одна копия отцовского, что свидетельствует об изменении одной копии отцовского аллеля, конвертации ее в материнский. Это явление называется генной конверсией. Оно часто происходит в связи с событиями общей рекомбинации и репарации ДНК.

Мы уже упоминали, что в ходе мейоза между гомологичными материнской и отцовской хромосомами образуется сочленение гетеродуплекса в участках кроссинговера. Если эти участки хромосом несколько различаются, в районе сочленения могут произойти нарушения

спаривания нуклеотидов (mismatch). Эти нарушения будут исправляться системой репарации неспаренных оснований - MMR. В результате мы будем наблюдать явление генной конверсии. Генная конверсия может также произойти по ряду других механизмов, но все они требуют осуществления какого-то варианта общей рекомбинации, по которому две гомологичные молекулы ДНК располагаются вместе. Так как в процессе конверсии производятся дополнительные копии фрагментов ДНК, то при этом необходим ограниченный синтез ДНК. Опыт показывает, что обычно только малые участки ДНК испытывают генную конверсию и в большинстве случаев изменяется лишь часть гена.

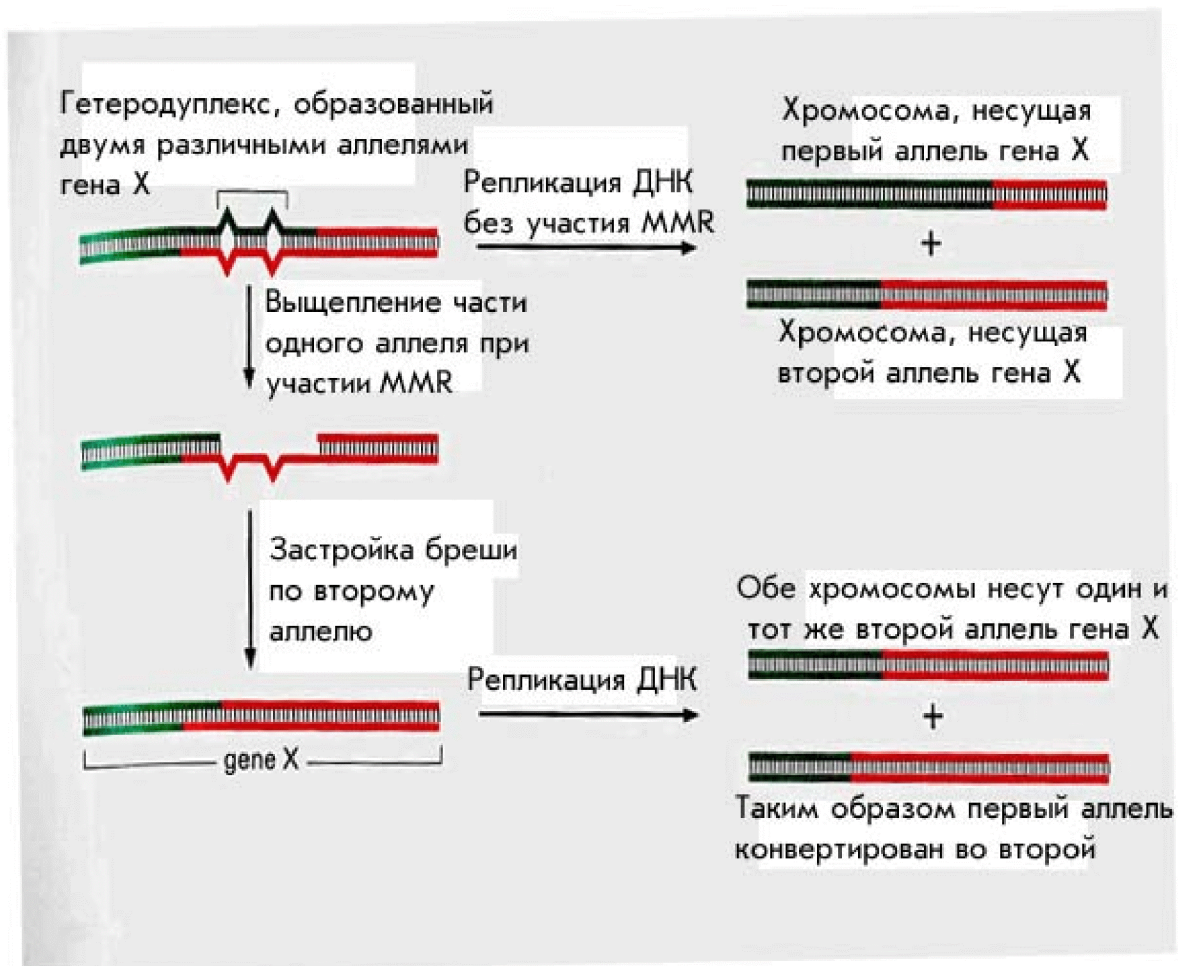


Рисунок 18. Генная конверсия.

Генная конверсия может происходить и в митотических клетках, но значительно реже. Один из весьма вероятных механизмов генной конверсии как в мейотических, так и в митотических клетках показан на рисунке.

8. SOS-ответ у E.coli.

Ошибки в ДНК возникают в результате неточной работы всех трех различных систем: подбора оснований полимеразой (base selection), редакторской 3'-5'-экзонуклеазы (proofreading) и репарации неправильно спаренных оснований (mismatch correction). Все это называется "спонтанный мутагенез", так как ошибки ДНК-полимеразы присущи самому организму, а не индуцируются извне. Однако, как известно, частоту мутаций можно значительно повысить, если организм обработать каким-либо ДНК-тропным агентом, например химическим веществом, ионизирующим или ультрафиолетовым излучением. Этот эффект называется индуцированным мутагенезом, а его механизм зависит от природы повреждения азотистого основания в ДНК. Все дефекты в ДНК удобно разбить на два класса: модифицированные азотистые основания, не блокирующие работу ДНК-полимеразы; и летальные дефекты, блокирующие работу ДНК-полимеразы. В первом случае ДНК-полимераза узнает дефектное основание и ставит напротив него комплементарное звено (например, при окислении аминокислотной группы цитозина, комплементарного гуанину, образуется азотистое основание с кетогруппой в четвертом положении, комплементарное аденину, в результате возникает транзигия $G \rightarrow A$). Подобного типа дефекты носят исключительно мутагенный характер, а мутагены, индуцирующие в ДНК такие дефекты, широко используются на практике (например, производные алкилирующих соединений типа М-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина, метилметансульфоната, бисульфита и многих других).

Более сложная ситуация возникает, если в ДНК индуцируются летальные дефекты, блокирующие ДНК-полимеразу, например апуриновые/апиридиновые сайты (abasic site или AP-сайты), циклобутановые пиримидиновые димеры (Пуг-Пуг) и др. В этом случае в клетке возникает особое состояние, получившее название SOS. Ключевыми элементами SOS-системы являются белки RecA и LexA. RecA

уже известен нам по процессу рекомбинации (вспомним, что RecA - ключевой белок процесса гомологичной рекомбинации, способствующий формированию особого R-триплекса с гомологичным участком ДНК и переносу нити ДНК с одной молекулы ДНК на другую). LexA - репрессор группы генов (их количество около 30-40), входящих в состав SOS-регулона. LexA связывается со специфическим десятичленным палиндромом в регуляторных областях генов SOS-регулона и таким образом препятствует их транскрипции. Чем выше совершенство каждого данного палиндрома, тем крепче связан с ним репрессор LexA.

Белок RecA выполняет несколько функций. Во-первых, он имеет высокое сродство к одонитевой ДНК, поэтому при взаимодействии с онДНК образуется растянутый филамент RecA : ДНК (один мономер RecA на каждые 4 н. ДНК). Во-вторых, RecA в этом комплексе активируется (активированный RecA обозначают обычно RecA*) и приобретает свойства весьма специфической протеазы, деградирующей белок-репрессор LexA (точнее, ускоряющей авторасщепление белка LexA, то есть он может быть назван его копротеазой). В результате разрушения LexA открываются гены SOS-регулона, из которых два гена, umuD и umuC, имеют прямое отношение к индуцированному мутагенезу.

Здесь же отметим специфическую активность RecA* по отношению к белку UmuD. При взаимодействии RecA* с UmuD с N-конца UmuD отщепляются первые 24 аминокислотных остатка и образуется белок UmuD', который принимает непосредственное участие в SOS-мутагенезе.

Итак, в SOS-индуцированных клетках *E. coli* в области повреждения формируется особая структура ДНК: вплоть до дефектного нуклеотида расположена двунитевая ДНК, с 3'-ОН-концом последнего правильного нуклеотида которой связана ДНК-полимераза III, затем идут дефектный нуклеотид в матричной нити и одонитевая ДНК в виде филамента (RecA* : ДНК). Есть еще два уже упомянутых белка - UmuD' и UmuC, которые образуют комплекс (UmuD')₂UmuC. Основная задача этого комплекса - "проскочить" сложный дефект и, желательно, без потерь, то есть без формирования бреши напротив дефекта. Подобный вариант синтеза и носит наименование TLS (translesion synthesis). Как правило, TLS сопровождается включением во вновь синтезируемую нить нуклеотида,

некомплементарного исходному основанию в матрице. В результате возрастает выживаемость клетки (SOS-репарация) и возникает мутация (SOS-мутагенез). Этот процесс схематически показан на рис. 19 (Сойфер, 1997).

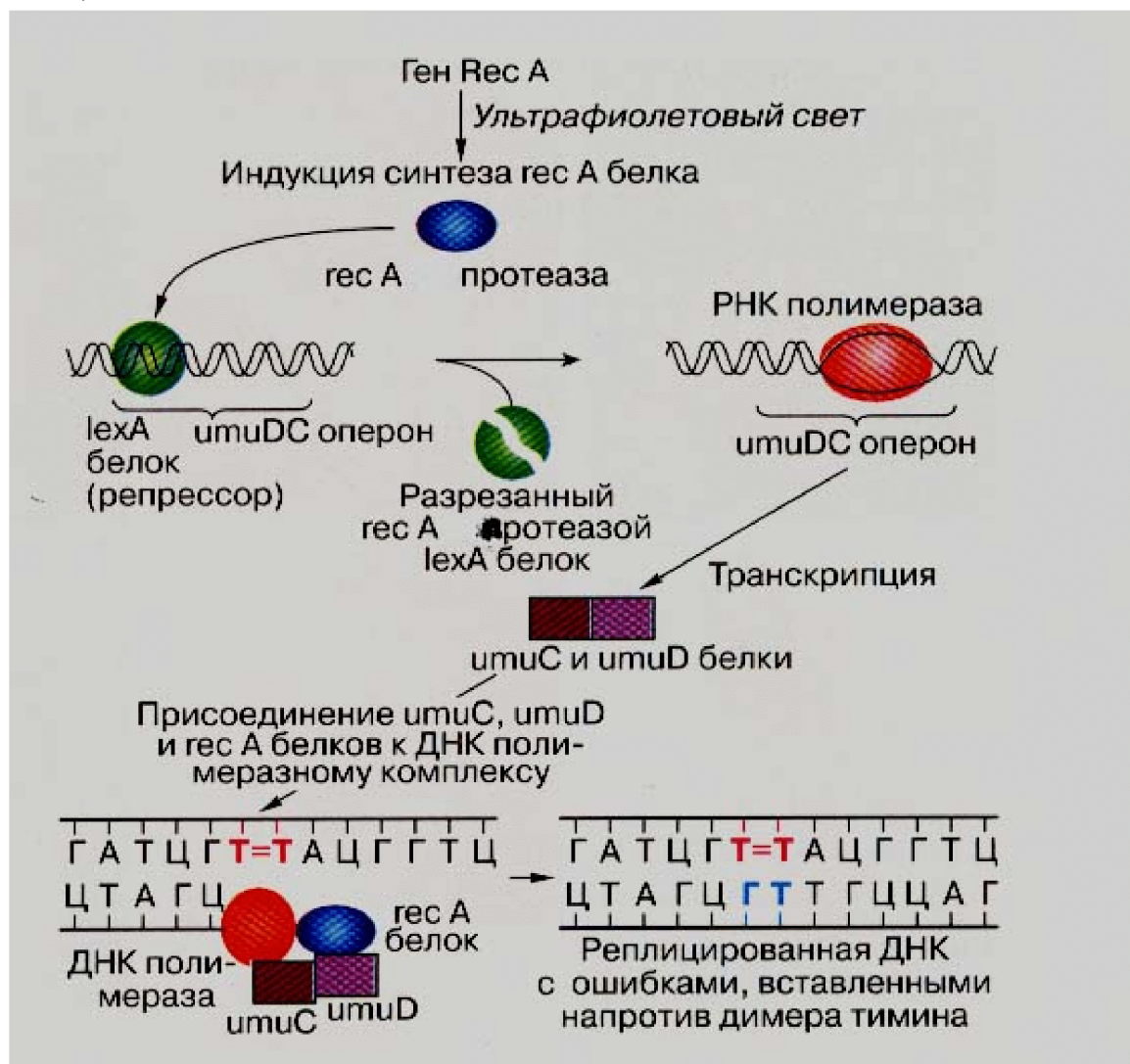


Рисунок 19. SOS-ответ у *Escherichia coli*.

При реконструкции этого процесса в системе *in vitro* было показано, что очищенный комплекс $(UmuD')_2UmuC$ в присутствии белков RecA, АТФ и всех четырех dNTP самостоятельно ведет синтез ДНК, причем напротив G (перед дефектом) ставит C (dCTP, комплементарный синтез), а напротив

Х ставит случайный нуклеотид, то есть что этот комплекс является самостоятельной ДНК-полимеразой типа "error-prone", названной ДНК-полимераза V. Эффективность TLS (но не комплементарного синтеза) принципиально зависит от белка RecA и значительно усиливается при добавлении в смесь белка, связывающего однонитевую ДНК (SSB), и вспомогательных субъединиц ДНК-полимеразы III. В комплексе (UmuD')₂UmuC собственно полимеразной активностью обладает UmuC, а субъединица (UmuD')₂ является ее активатором. Показано, что механизмом SOS-мутагенеза позволяет клетке заменить мутацию со сдвигом рамки (инсерция или делеция нуклеотида), как правило, инактивирующую ген, на более "мягкую" по последствиям мутацию замещения (транзицию или трансверсию).

В 1999 г. получены новые данные и по механизму мутагенеза на неповрежденной матрице ("non-targeted"-мутагенез). Известно, что "non-targeted"-мутагенез наблюдается при введении в SOS-индуцированные клетки неповрежденной матрицы. Показано, что белок DinB (ген dinB относится к группе SOS-генов) отвечает за "non-targeted"-мутагенез на ДНК бактериофага λ, а сверхпродукция этого белка приводит к появлению у клетки мутаторного фенотипа. Белок DinB также обладает полимеразной активностью. Он получил наименование ДНК-полимераза IV: эта полимераз не содержит редакторской экзонуклеазной активности и обладает гомологией с белками семейства UmuC. Таким образом, в клетках *E. coli* к настоящему времени обнаружены пять ДНК-полимераз: ДНК-полимераза I (репарирующая) обнаружена А. Корнбергом в 1956-1958 годах, ДНК-полимеразы II и III (реплицирующая) выявлены в 1970-1971 годах, а ДНК-полимеразы IV и V- в 1999 году. Долгое время оставалась непонятной роль ДНК-полимеразы II (кодирующий ее ген *polB/dinA* также относится к группе SOS-генов). Недавно было показано, что ДНК-полимераза II играет ключевую роль в ресинтезе ДНК. Известно, что при УФ-облучении бактерий репликация хромосомы блокируется, а затем через определенное время восстанавливается. Процесс восстановления репликации и называется ресинтезом, или "replication restart". Блокирование репликации определяется двумя факторами: SOS-индуцией *umuDC* (именно UmuD, но не UmuD'), которые на первой стадии

98

а Слабый SOS-сигнал

$$\begin{array}{l}
 \text{UmuD (мономер)} \xrightarrow{+ \text{Lon}} \text{Деградация (протеаза)} \\
 \text{UmuD} \rightleftharpoons \text{UmuD}_2 \text{ (димер)} \\
 \text{UmuD} \xrightarrow{+ \text{RecA}^*} \text{UmuD}' \rightleftharpoons \text{UmuD}_2' \\
 \text{UmuDD}' \text{ (димер)} \xrightarrow{+ \text{ClpXP}} \text{Деградация} \\
 \text{RecA}^* \text{ (комплекс RecA::ATP::онДНК)}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{l}
 \text{UmuC} \xrightarrow{+ \text{Lon}} \text{Деградация} \\
 \text{UmuC} \xrightarrow{+ \text{GroEL} + \text{GroES}} \text{GroEL::UmuC::GroES} \xrightarrow{+ \text{Lon}} \text{Ослабленная деградация}
 \end{array}$$

б Сильный SOS-сигнал

$$\begin{array}{l}
 \text{UmuD} \xrightarrow{+ \text{RecA}^*} \text{UmuD}' \rightleftharpoons \text{UmuD}_2' \\
 \text{UmuC} \xrightarrow{\quad\quad\quad} \text{UmuD}_2' \text{C} \\
 \text{UmuD}' \rightleftharpoons \text{UmuD}_2' \\
 \text{UmuD}' \text{C} \xrightarrow{\quad\quad\quad} \text{UmuD}'\text{C}::\text{RecA}^*::\text{PolIII ("мутасома")} \\
 \text{UmuD}_2' \text{C} \xrightarrow{\quad\quad\quad} \text{UmuD}'\text{C}::\text{RecA}^*::\text{PolIII ("мутасома")}
 \end{array}$$

Помимо установления основных принципов действия SOS-системы *in vitro*, в последнее время получен ряд новых, принципиально важных результатов по регуляции SOS-системы *in vivo*. Оказалось, например, что белок UmuD расщепляется сериновой АТФ-зависимой Lon-протеазой, а процессированный белок UmuD', у которого удалены с N-конца 24 аминокислотных остатка, в том числе фрагмент 15-FPLF, являющийся

мишенью для Lon-протеазы, расщепляется (в комплексе с геликазой UvrD) другой клеточной сериновой АТФ-зависимой протеазой ClpXP. К тому же белки RecA и LexA также являются членами SOS-регулона. В результате после SOS-индукции в бактериальной клетке довольно быстро восстанавливается уровень белков SOS-регулона, характерный для необработанных клеток.

Интенсивность SOS-ответа клетки зависит от степени повреждения ДНК, так как только большое количество одностандартной ДНК позволяет активироваться RecA белку в количестве, достаточном для открытия SOS-регулона. Эта зависимость представлена на рис. 20 (Ланцов, 1999). Так как белок RecA связывается с LexA в том же сайте, в котором происходит его связывание с двунитевой ДНК, то при запуске SOS-ответа белок RecA не активирует процесс гомологической рекомбинации. В норме при гомологичной рекомбинации SOS-ответ также выражен слабо.

Каким же образом RecA* делает выбор между запуском SOS-ответа и инициацией гомологичной рекомбинации? Вероятно, все зависит от ситуации в клетке: быстрая диссоциация белка SSB от онДНК, то есть быстрое формирование комплекса белка RecA с онДНК приведет к SOS-ответу, который индуцирует также и синтез ряда рекомбинационных ферментов. Медленное формирование тройного комплекса завершается только гомологичной рекомбинацией со слабой SOS-индукцией. Скорость сборки комплекса зависит и от рекомбиногенной активности самого белка RecA.

На рис. 20 ясно видно, каким образом выраженность SOS-ответа зависит от количества повреждений ДНК.

8.1. Низкопроцессивные ДНК-полимеразы эукариот

У эукариот также обнаружены полимеразы, способные вести синтез на поврежденной матрице. Некоторые из них принимают самое активное участие в пострепликативной репарации, о которой мы будем говорить ниже. Номенклатура этих ДНК-полимераз была крайне не упорядочена до последнего времени. Только в 2001 году был достигнут некоторый консенсус, результаты которого представлены в табл. 5.

Например, полимераза эта (Pol η) была описана разными авторами как pol η , polH, hRad30, XPV. Эта полимераза не является малоточной, хотя и не обладает корректорской активностью. Точность ее репликации 10^{-2} - 10^{-3} . Полимераза каппа (Pol κ) является гомологом PolIV E.coli. Это высокоошибочная ДНК-полимераза, но в отличие от других подобных полимераз она может модулировать свою процессивность и встраивать больше, чем 25 нуклеотидов во время синтеза на поврежденной матрице. Полимераза йота (Pol ι) является гомологом Rad30 дрожжей и показывает уровень ошибочного встраивания 10^{-2} . Полимераза зета (Pol ζ) состоит из двух субъединиц REV3 и REV7, которые работают совместно с REV1.

Кроме синтеза на поврежденной матрице многие из этих ДНК-полимераз способны к прямому устранению повреждения. Так, человеческая полимераза лямбда (Pol λ) имеющая 32% гомологии с pol β , обладает лиазной активностью, способна вставлять нуклеотиды в маленькие бреши со свободной 5'-фосфатной группой и, вероятно, принимает участие в BER.

Меньше известно о полимеразе сигма (Pol ς , TRF4) (topoisomerase I related function), участвующей в когезии сестринских хроматид.

Pol eta (Pol η)	AA $\rightarrow$ (TT), A или G $\rightarrow$ AP-сайта, A или C $\rightarrow$ 8-окси-G, C $\rightarrow$ сшивки
Pol kappa (Pol κ)	A $\rightarrow$ AP-сайта или 8-окси-G
Pol iota (Pol ι)	A $\rightarrow$ AP-сайта или 8-окси-G, BER
Pol zeta (Pol ζ)	A или G $\rightarrow$ 6-4-фотопродуктов
Pol mu (Pol μ)	A $\rightarrow$ AP-сайта или 8-окси-G, AA $\rightarrow$ (TT), V(D)J-рекомбинация, NHEJ
Pol lambda (Pol λ)	BER
Pol sigma (Pol ς)	Когезия сестринских хроматид
Pol theta (Pol $\zeta\theta$)	Репарация межнитевых сшивок

Таблица 5. Низкопроцессивные ДНК-полимеразы эукариот.

О полимеразе тета ($\text{Pol}\theta$) можно сказать только то, что она является гомологом гена *mus308* дрозофилы, кодирующего ДНК-геликазу-полимеразу, вовлеченную в репарацию межнитевых сшивок.

Полимераза мю ($\text{Pol}\mu$) играет важную роль в соматическом гипермутагенезе иммуноглобулиновых генов и участвует в синтезе ДНК во время V(D)J рекомбинации и нехомологического воссоединения концов. Человеческая $\text{Pol}\mu$ также имеет высокую гомологию с терминальной дезоксинуклеотид-трансферазой, то есть способна к присоединению нуклеотида к концу нити ДНК без матрицы.. Все это говорит о большой плейотропности функций данной группы энзимов. В табл. 5 показано, какие нуклеотиды способна поставить данная полимераза напротив повреждения.

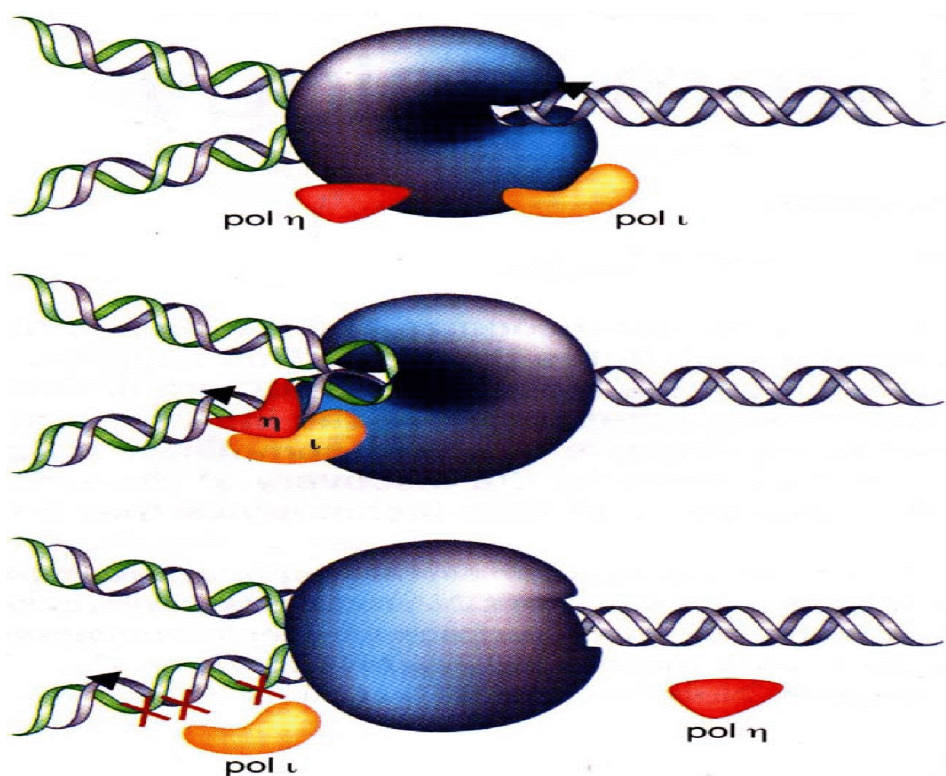


Рисунок 21. Синтез ДНК на поврежденной матрице.

Именно эта группа ДНК-полимераз ответственна за множественные мутации, возникающие при остановке репликации, вызванной повреждениями ДНК под действием различных агентов, и последующем ресинтезе (рестарте). Было несколько попыток связать деятельность этих полимераз с SOS функциями UmuDC у прокариот и, основываясь на этом, создать картину SOS-ответа у эукариот. Вопросы, к сожалению, до сих пор больше, чем ответов.

На рис. 21 изображена работа ДНК-полимеразы η , мутация в гене которой приводит к замещению ее полимеразой ι и развитию вариантной формы пигментной ксеродермы (XPV).

9. Репарация двунитевых разрывов.

Двунитевые разрывы ДНК (DSB, double strand breaks) являются наиболее тяжелыми повреждениями геномов эукариот и при отсутствии их репарации почти всегда приводят клетку к гибели. В частности, гибель клеток после действия ионизирующей радиации преимущественно связана с нерепарированными DSB, а также с хромосомными перестройками, возникающими при их неправильной репарации. DSB могут возникать спонтанно или после воздействия на клетку ионизирующей радиации и некоторых химических мутагенов.

В ядрах клеток эукариот находятся специфические для каждого вида наборы хромосом, причем одна хромосома содержит одну линейную молекулу ДНК. ДНК каждой хромосомы фланкирована особыми повторяющимися последовательностями, которые называются теломерами и составлены из большого числа tandemно расположенных блоков (TTAGGG) $_n$. Между теломерами каждой хромосомы находятся экспрессирующиеся гены, «молчащие» последовательности ДНК, а также один особый небольшой эпигенетически заданный участок (центромера), необходимый для правильной сегрегации данной хромосомы в митозе, так как именно к нему прикрепляются нити веретена деления. Теломеры являются единственными «легально дозволенными» двунитевыми концами ДНК в клетке. Появление в молекуле ДНК нерепарированного DSB приводит к нарушению ее непрерывности и к образованию ацентрического хромосомного фрагмента, теряющегося при митозе. Если же процесс

репарации DSB пройдет неточно и захватит не те концы, которые принадлежат одному и тому же разрыву, то в клетке появятся хромосомные перестройки, которые могут приводить к ее малигнизации. Каким образом это происходит, показано на рис. 22 (Томилин, 2002).

Одной из функций гомологической рекомбинации, которая, как мы уже говорили, возможна не только в мейотических, но и в соматических клетках позвоночных, является особый путь репарации двунитевых разрывов ДНК.

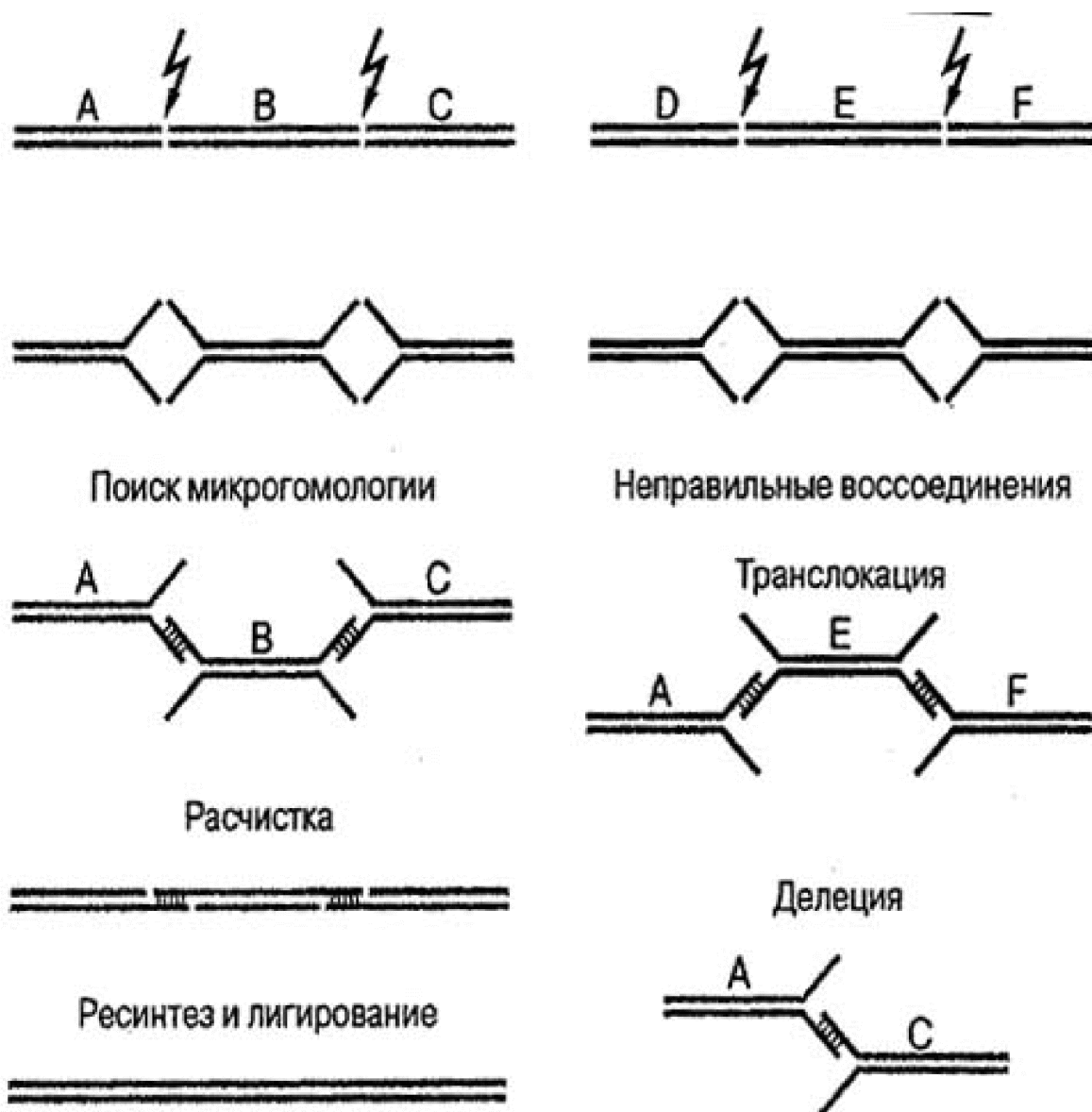


Рисунок 22. Воссоединение двунитевых разрывов ДНК.

Рекомбинационный механизм репарации DSB в дрожжах был впервые предложен в 1973 г. В. Г. Королевым и Л. М. Грачевой. Тогда предполагалось, что это - единственный возможный механизм репарации DSB, по своему генному контролю совпадающий с обычной гомологической рекомбинацией, однако оставалось неясным, работает ли такой механизм в соматических клетках позвоночных животных. Но к настоящему времени стало ясно, что рекомбинация не является основным способом репарации двунитевых разрывов. Репарация DSB путем гомологической рекомбинации (HRR, homologous recombination repair) происходит достаточно редко, так как для нее необходима вторая неповрежденная копия двунитевой ДНК, содержащая участок с нуклеотидной гомологией к поврежденному участку. При этом один из концов DSB внедряется в неповрежденную копию и инициирует обычный процесс генетической рекомбинации, так что понятия гомологической рекомбинации и рекомбинационной репарации у высших эукариот практически являются синонимами.

Главная опасность рекомбинационной репарации DSB в клетках позвоночных состоит в том, что их геномы содержат большое число повторов, по которым возможны «неправильные» гомологические взаимодействия, приводящие к хромосомным перестройкам за счет неравной рекомбинации. Неравная рекомбинация может и не приводить к хромосомным перестройкам, так как особенно эффективно гомологическая рекомбинация протекает путем генной конверсии между сестринскими хроматидами в поздней S-фазе и G2-фазе клеточного цикла. На механизмах, препятствующих неравной HR и появлению хромосомных перестроек между повторами мы остановимся отдельно.

Другими системами распознавания и репарации DSB в клетках эукариот являются прямое негомологическое воссоединение концов ДНК (NHEJ, nonhomologous end-joining) и отжиг по прямым повторам (SSA, single strand annealing). С них мы и начнем изучение репарации двунитевых разрывов.

9.1. Репарация двунитевых разрывов ДНК путем нехомологического воссоединения концов (NHEJ)

Как мы уже отмечали, главной задачей систем репарации DSB является необходимость восстановления непрерывности поврежденной хромосомы, то есть сшивания именно тех двух концов ДНК, которые появились вследствие одного и того же DSB. Для этого их нужно быстро фиксировать в ядре и изолировать от возможного взаимодействия с концами, образованными другими DSBs, не мешая при этом правильному процессингу концов ДНК и их сшиванию лигазой. Важно понимать, что появление столь серьезного повреждения ДНК как образование DSB, часто сопровождается сопутствующими повреждениями азотистых оснований и сахарофосфатного каркаса ДНК. Такие повреждения должны быть удалены с концов ДНК с помощью нуклеаз до их сшивания ДНК-лигазами. Из этого следует, что при NHEJ в местах воссоединений почти всегда (кроме редких случаев образования «чистых» двойных разрывов, не требующих нуклеазной расчистки) образуются микроделеции, то есть такая репарация является по самой своей природе неточной. Но геномы высших эукариот в основном (более чем на 90%) состоят из некодирующих последовательностей, и неточность NHEJ редко приводит к вредным мутациям, хотя и может вносить свой вклад в микроделеционный полиморфизм ДНК. Кроме того, нужно иметь в виду, что клетка способна эффективно репарировать лишь небольшое число DSB (несколько десятков), и количество микроделеций, возникающих при NHEJ, относительно невелико.

В принципе при воссоединении «неправильных» концов ДНК репарация DSB путем NHEJ может приводить и к большим делециям и транслокациям. Вероятнее всего, это происходит при большом количестве DSB, то есть у репарации путем нехомологического воссоединения концов есть какая-то своя система отбора и сравнения тех концов, которые должны быть объединены для «правильного» воссоединения, но при избытке повреждений она с этой задачей не справляется.

На рис. 23 видно, что первым к месту разрыва подходит гетеродимер Ku, состоящий из прочно связанных друг с другом белков Ku70 (70кд) и Ku80(86кд). Он образует ассиметричное кольцо, которое надевается на

свободный конец ДНК, как гайка на болт, цепляется за ДНК, и может продвигаться в глубину, позволяя связываться с длинным ДНК-концом другим белкам.

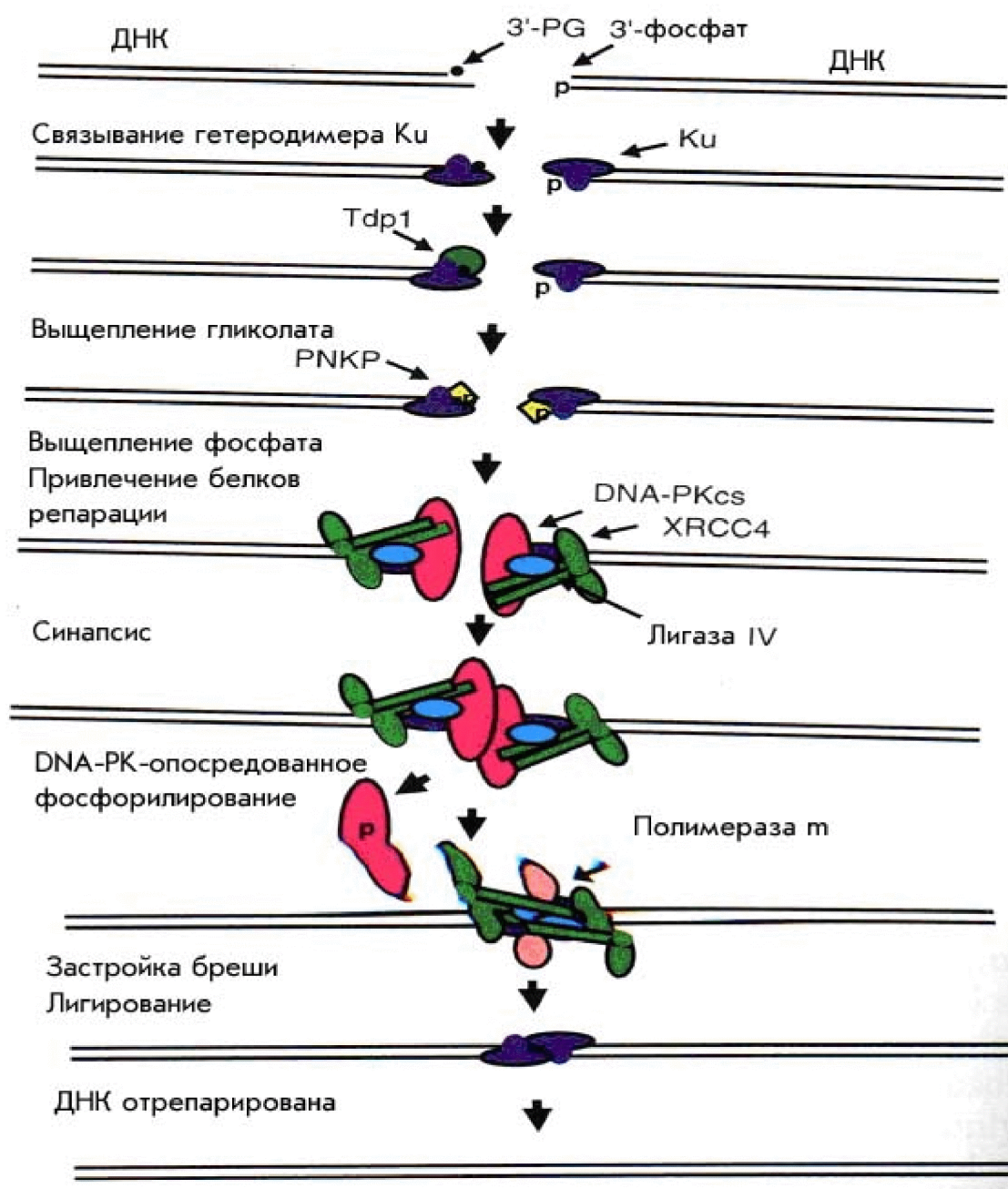


Рисунок 23. Репарация путем нехомологического воссоединения концов (NHEJ)

Обычно гетеродимер Ku покрывает 16-18 н.п. Вероятно, именно два гетеролимера Ku, связавшиеся с разными концами одного и того же DSB, удерживают эти концы вместе на начальной стадии репаративной реакции и способствуют их «правильному» воссоединению.

Затем к комплексу присоединяется каталитическая субъединица протеинкиназы DNA-PKcs. Это белок размером 350Кд, обладающий протеинкиназной активностью, также имеющий открытый канал, в котором может быть связано 12 н.п. двойной спирали ДНК. По некоторым данным, она присоединяется к ДНК после Ku и сдвигает гетеродимер вглубь от конца молекулы ДНК. По другим данным, DNA-PKcs имеет четкую границу связывания с ДНК на уровне 30 н.п. от конца. Вероятнее всего, происходит и то и другое - этот белок «перекрывает» собой гетеродимер Ku. Образование комплекса Ku с DNA-PKcs необходимо для включения киназной активности DNA-PK. Собственно так и образуется особый гетеротример - ДНК-зависимая протеинкиназа. Критичным для ее активации является денатурация концов ДНК, с которыми связывается DNA-PKcs, и вовлечение нескольких нуклеотидов однонитевого фрагмента в канал ее голофермента. Активированная DNA-PK способна фосфорелировать большую группу белков, включая сам гетеродимер Ku и нуклеазу Artemis.

Активированная DNA-PKcs также способна автофосфорелироваться, что приводит к ее диссоциации от ДНК. У мышей мутации в гене, кодирующем DNA-PKcs, приводят к появлению животных с фенотипом SCID (several cobine immunodeficiency), иначе называемых «голыми» мышами.

Белок XRCC4 был выделен как фактор, ответственный за радиочувствительность и дефект V(D)J рекомбинации в клеточной линии китайского хомячка XR-1. Этот белок имеет круглую «голову» и длинный (120Å) спиралевидный хвост. Обычно он образует гомотетрамер, в котором с каждого конца лежат по две «головы», соединенные четырьмя взаимодействующими хвостами. В репаративных реакциях XRCC4 всегда образует прочное соединение с лигазой IV, которая связывается с ним примерно в середине спирального хвоста. Эти белки формируют сложный комплекс, усиливающий ферментативную активность (например,

108

лигирование) каждого из его участников. При этом кажется вероятным, что белок XRCC4 играет в этом комплексе структурирующую роль, так как одновременно он связывается и с белками KU и с DNA-PKcs.

Нуклеазами, участвующими в NHEJ, являются WRN (Werner syndrome nuclease), Artemis и MRE11 (meiotic recombination exonuclease, дрожжевой гомолог называется RAD58). MRE11 и WRN обладают 3'-5' экзонуклеазной активностью и «предпочитают» протяженные 3'-концы, при этом гетеродимер Ku активирует активность WRN, а DNA-PK ее подавляет. В тоже время WRN обладает и ДНК-геликазной активностью, важной для процесса репарации с помощью гомологической рекомбинации (HR). Artemis обладает 5'-3' экзонуклеазной активностью, но после фосфорелирования DNA-PK приобретает еще и эндонуклеазную, которая позволяет ему расплетать шпильчатые петли, убирая выступающие 5'-концы и укорачивая 3'. Мутации, инактивирующие этот белок приводят у человека к крайне тяжелому наследственному синдрому радиочувствительности, сопряженной с иммунодефицитом (RS-SCID syndrome), подобному SCID у мышей.

Образование DSB после ионизирующего излучения почти всегда сопровождается фрагментацией ДНК при участии свободных радикалов, и позиционное расхождение между разрывами на отдельных нитях составляет не менее двух нуклеотидов. Это приводит к появлению выступающих частично комплементарных концов и однонуклеотидной брешы на каждой нити. Разрывы обычно имеют 5'-фосфатный (гидроксильный) конец, в то время как 3'-конец блокируется фосфатными или дезоксирибозными фрагментами и обычно представляет собой 3'-фосфогликолат ($-\text{PO}_4\text{CH}_2\text{COOH}$; PG). То есть для успешной репарации предварительно необходимо убрать блокирующую 3'-конец PG группу. Процесс NHEJ с этим успешно справляется, но именно по этой причине он обычно сопровождается микроделециями. И только тупые концы могут воссоединяться практически без вырезания концевых нуклеотидов.

Ферменты, способные убирать 3'-PGs идентифицированы. Это апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза APE1, а также белки TDP1 и PNKP, которая не только «приводит в порядок» 3'-конец, но в тоже время может фосфорелировать 5'-гидроксильные концы, причем это

фосфорелирование одновременно проходит на обеих нитях ДНК. Данная реакция происходит в первые же минуты и не нуждается в полностью собранном репарационном комплексе. Более того, присоединение DNA-PKcs блокирует реакцию вымывания 3'-PGs, что заставляет нас предположить наличие фермента, сходного по действию с ранее описанными, но способного работать в контексте всего репарационного комплекса. После ограниченного расплетания двунитевой ДНК в месте разрыва и «зачистки» на образующихся концах происходит их сопоставление по участкам микрогомологии (1-3 нуклеотида).

Зашивание бреши ведет ДНК-полимераза μ (Pol μ), одна из полимераз семейства X, включающего ДНК-полимеразы μ , β и λ . Главное их различие между собой состоит в том, что полимеразы μ образует прочный комплекс с XRCC4/LigIV, а полимеразы β на это не способна. Pol μ имеет домен, крайне сходный с таковым терминальной трансферазы, которая способна к добавлению нуклеотида к цепи при отсутствии матрицы в процессе V(D)J рекомбинации. То есть оба эти фермента вовлечены сходным образом в белковые комплексы, ведущие воссоединение концов, но в различных ситуациях. При этом клетки, дефектные по гену pol μ не являются гамма-чувствительными, что говорит о том, что есть и другая полимеразы, вероятнее всего – Pol λ , способная полноценно замещать Pol μ в реакции застройки брешей, так именно она (как и Pol μ), а не репарационная полимеразы β , имеет C-мотив, сходный с таковым белка BRCA1 (BRCT-motif). Этот мотив необходим для взаимодействия полимеразы с XRCC4 с образованием единого комплекса KU/Pol μ /XRCC4/LigIV. Представляется вероятным, что гетеродимер Ku остается связанным с ДНК вплоть до завершения процесса лигирования.

DNA-PKcs участвует в двух основных реакциях – во-первых, она способна удерживать рядом концы двунитевого разрыва, играет в этом удержании главную роль и делает это значительно лучше, чем гетеродимер Ku. Во-вторых, она способна к автофосфорелированию. Причем у нее есть по меньшей мере 5 сайтов автофосфорелирования, и это автофосфорелирование крайне функционально значимо. (Мутации хотя бы в одном из 5 известных сайтов приводят к повышению радиочувствительности). Вероятно, таким образом модулируется

активность DNA-ПК во время различных стадий репарационной реакции. К тому же DNA-ПК фосфорелирует и другие белки репаративного комплекса. Складывается представление, что она связывается с концами ДНК и удерживает их до тех пор, пока не будет сформирован весь репаративный комплекс и не будут найдены «партнеры» по объединению. В тот момент, когда две молекулы DNA-ПКcs от разных частей DSB вступают в контакт, они взаимно фосфорелируют друг друга и диссоциируют от репарационного комплекса, или, по крайней мере, отодвигаются от места реакции. В-третьих, DNA-ПК может быть необходима для фосфорилирования нуклеазы Artemis, то есть для активации ее способности открывать шпильки во время V(D)J рекомбинации и вырезания выступающих концов во время репарационной реакции NHEJ.

На рис. 23 нужно особо отметить, что комплекс XRCC4/LigIV привлекается в репарационную реакцию еще до того, как Pol μ проведет репаративный синтез. Это свидетельствует о необходимости структурного взаимодействия между Pol μ и XRCC4 и о вовлечении комплекса XRCC4/LigIV в сам процесс заполнения бреши. Гетеродимер Ku выравнивает выступающие концы ДНК обеих молекул, а глобулярные «головы» белка XRCC4 связываются благодаря своему ДНК-связывающему мотиву несколько дистальнее Ku, и таким образом определяют положение лигазы IV, которая свяжется с центральной частью С-концевого хвоста XRCC4 для последующего лигирования концов. На каждой нити работает тример, состоящий из 2 молекул XRCC4 и одной LigIV. Причем этот тример образуется до того, как DNA-ПКcs диссоциирует от репарационного комплекса. Сами DNA-ПКcs также прочно связаны с С-хвостами XRCC4 на разных сторонах разрыва, и при их синапсисе, взаимном автофосфорилировании и диссоциации от ДНК четыре молекулы XRCC4 образуют тетрамер, сплетаясь хвостами. Последним на отрепарированной ДНК остаются два объединившихся (или расположенных прямо друг за другом) гетеродимера Ku.

Мы описали первым именно этот процесс репарации двунитевых разрывов потому, что, не нуждаясь в партнере для рекомбинации, он

может протекать в любой фазе клеточного цикла, и к тому же используется клеткой в 1500 раз чаще, чем HRR.

9.2. Однонитевой отжиг (SSA, single strand annealing)) по прямым повторам.

В дополнение к каноническим системам репарации путем гомологической рекомбинации (HRR) и нехомологического воссоединения концов (NHEJ) есть еще один неконсервативный путь, называемый однонитевым отжигом по прямым повторам. Главное в этом процессе – сплайсинг двух концов ДНК по прямым повторам в двунитевых областях несколько отдаленных от концов DSB, который приводит к сохранению только одной копии повтора и делетированию всей последовательности между повторами. Мы рассмотрим SSA до репарации DSB путем гомологической рекомбинации, и не будем подробно останавливаться на белках, вовлеченных в процесс HR.

SSA обычно начинается с формирования нуклеазой или геликазой однонитевых выступающих концов на двунитевом разрыве ДНК. Затем следует отжиг гомологических последовательностей на открытых нитях, обрезание «лишних» концов и лигирование. Весь процесс характеризуется разными уровнями возможной гомологии – от микрогомологий до гомологичных последовательностей, содержащих сотни оснований. В настоящее время это - самый сложный для объяснения момент SSA (может быть существует несколько независимых путей). Общая схема этого пути репарации показана на рис. 24.

Первый шаг таков – концы ДНК расщепляются эндонуклеазами, скорее всего – входящими в комплекс MRN (matrix rearrangement nucleases), например, MRE11, благодаря ее хорошей способности выравнивать ДНК и щепить ее только по направлению 3'-5' и останавливаться, как только 5'-концы разных нитей смогут гомологически спариться. При этом образуются такие же длинные концы, как и при первом шаге HR. Необходимыми для процесса SSA являются геликазы WRN и BLM (Bloome syndrome mutated). 3'-концы, устойчивые к MRE11 и WRN, могут быть расщеплены ДНКазой III, основной 3'-5' экзонуклеазой млекопитающих.

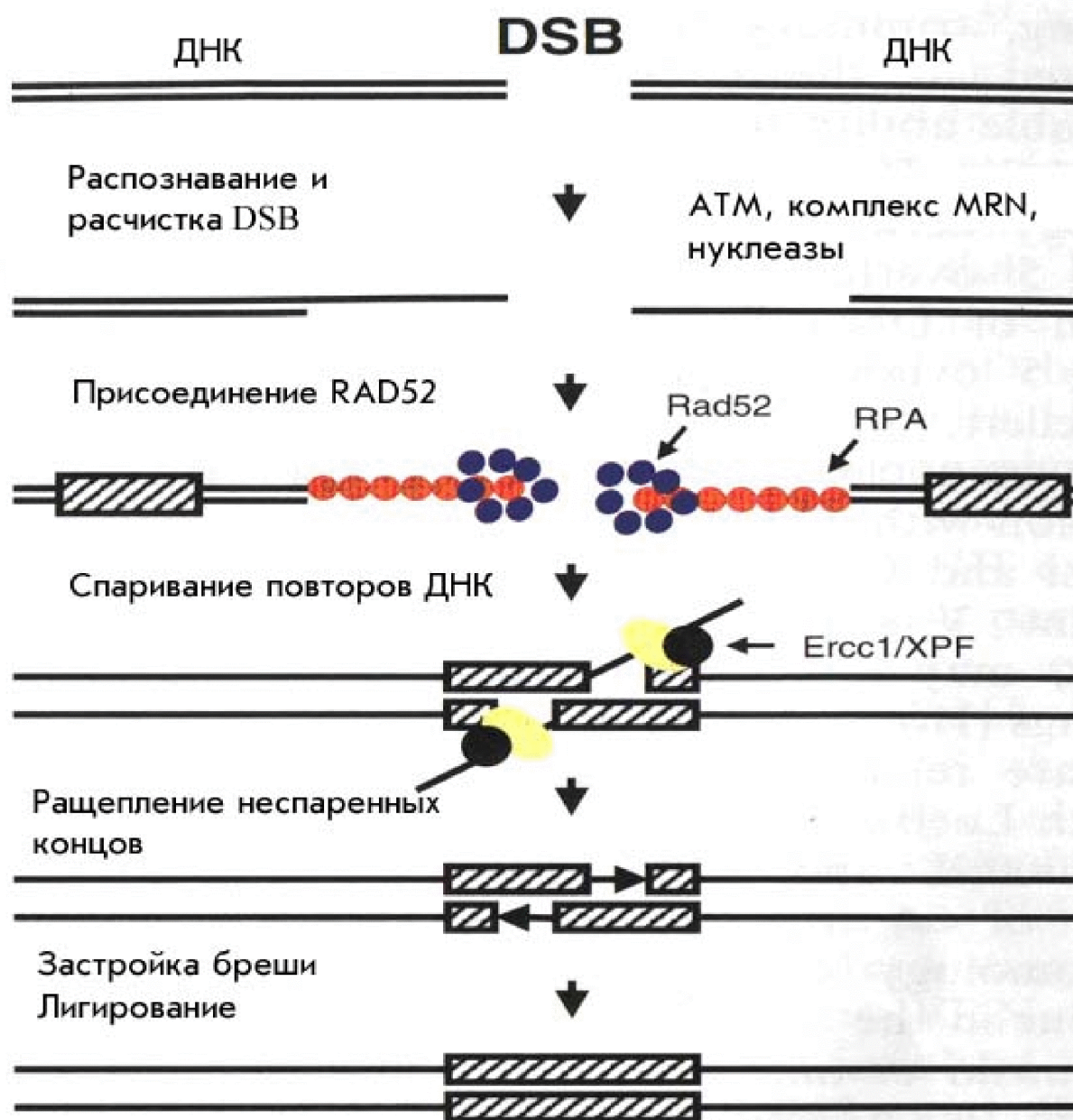


Рисунок 24. Репарация путем однонитевого отжига по прямым повторам (SSA)

При поиске гомологии по прямым повторам выступающий конец онДНК покрывается белком RPA, а на него надевается гептамер белков RAD52, который способствует распознаванию гомологии и объединению между комплементарными концами. Как только один из выступающих

концов обнаружит гомологию с соседней нитью, гомологи спарятся (отожгутся) друг с другом, а лишние концы будут «съедены» знакомой нам по системе NER нуклеазой ERCC1/XPF (RAD1/RAD10 у дрожжей)

В отличие от классического пути репарации двунитевых разрывов с помощью гомологической рекомбинации, SSA не нуждается ни во второй, донорной двунитевой молекуле ДНК, ни в белке RAD51, но нуждается в белке RAD52. Сшивание, вероятно, ведет лигаза I. Процесс SSA может разделяться на несколько различных путей в зависимости от необходимой длины прямого повтора, по которому будет проходить отжиг. Возможно, что в тех случаях, когда для SSA достаточно микрогомологии, в процесс вовлечен гетеродимер Ku. Но многие исследователи утверждают, что SSA по микрогомологии может проходить и без участия Ku, то есть без активации нуклеазы-геликазы WRN. Вероятно, сам процесс SSA является поиском более удобного и быстрого пути репарации двунитевых разрывов, чем гомологическая рекомбинация, который вела природа в процессе эволюции. Так что SSA можно рассматривать как варианты перехода между HRR и NHEJ – при протяженной гомологии – этот процесс ближе к HRR, а при микрогомологии – к NHEJ. Процесс SSA описан в первую очередь у дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*.

9.3. Репарация путем гомологической рекомбинации (HRR)

Репарация двунитевых разрывов путем гомологической рекомбинации (HR) считается безошибочным и, как уже не раз говорилось, осуществляется во время поздней S-фазы или G2-фазы. Общая схема этого процесса в клетках эукариот показана на рисунке. Необходимо обратить внимание, что на завершающем этапе HR может осуществляться двумя принципиально различными способами. Первый связан с разрешением классической холлидеевской структуры либо путем кроссинговера, либо путем генной конверсии, сопровождающимся образованием разрывов и в донорной, и в реципиентной ДНК и последующим, реальным (физическим) обменом соседними участками двунитевой ДНК. При репарации путем HR по второму механизму разрывы в донорной ДНК не образуются, а идет инициированный свободным концом ДНК ограниченный синтез в районе повреждения, а затем вновь синтезированная нить вытесняется и

отжигается со вторым свободным концом в реципиентном дуплексе. Таким образом, даже если рекомбинация произойдет между негомологичными хромосомами или негомологичным участкам гомологичных хромосом, то это не приведет к появлению хромосомных перестроек. Это очень важно для высших эукариот, так как их геном состоит на 90% из повторяющихся последовательностей, опасность рекомбинации между которыми достаточно велика.

В процесс репарации путем гомологической рекомбинации вовлечено большое число белков: RAD51, RAD52, RAD54, BRCA1, BRCA2, RAD51-паралоги: RAD51b,c,d, XRCC2, XRCC3 и комплекс MRN. Кроме этих белков, непосредственно участвующих в самом процессе рекомбинации, есть немало факторов, служащих триггерами клеточного ответа на повреждения ДНК, что приводит к изменению параметров клеточного цикла и запуску репарационных реакций. Таким триггерами являются протеинкиназы ATM (ataxia-teleangiectasia mutated), ATR (ataxia-teleangiectasia related), DNA-PK (DNA-dependent protein kinase). Все они являются гомологами PI-3-киназы (фосфатидилинозитол-3' киназы). Известно, что PI-3 киназа активно участвует в передаче сигналов в клетке и опосредует клеточный ответ на действие различных факторов роста, триггерных факторов клеточной дифференцировки и инсулин.

Запускает процесс HRR протеинкиназа ATM, которая каким-то образом, вероятнее всего через конформационные изменения ДНК, «чувствует» DSB. Затем она переходит в активную форму путем автофосфорелирования по серину в 1981 положении (Ser-1981) и, может быть, связывается с DSB. Активированная ATM фосфорелирует гистон H2AX, что привлекает белки BRCA1 (breast cancer 1) и NBS1 (Nijmegen breakage syndrome, Нийменгенским синдромом ломкости хромосом), которые ATM также фосфорелирует. NBS1 является частью комплекса MRN (NBS1/RAD50/MRE11) и прямой мишенью ATM, то есть главным переносчиком сигнала с ATM на MRN-комплекс. Белок BRCA1 служит якорем и координатором для дальнейшей сборки репарационного комплекса.

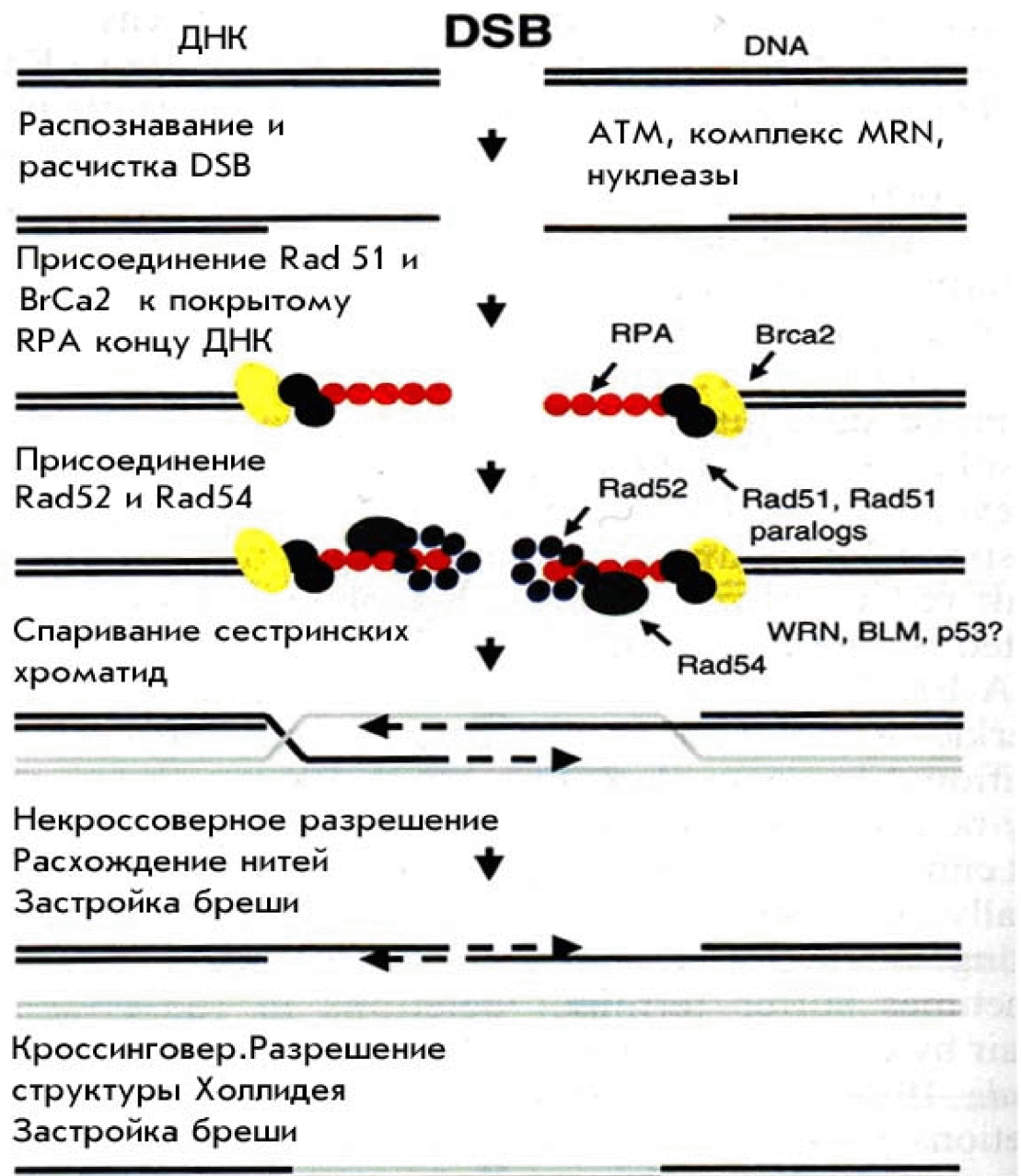


Рисунок 25. Репарация двунитевых разрывов путем гомологической рекомбинации (HRR).

Комплекс MRN (обладающий 3'-5'-экзонуклеазной активностью), скорее всего совместно с другими экзонуклеазами (обладающими 5'-3'-активностью) ращепляет ДНК для создания у двунитевого разрыва

выступающих концов, которые нужны для их перекрывания в процессе рекомбинации. MRE11, вероятно играет в этом комплексе главную роль, так как обладает одновременно и экзо(3'-5')- и эндонуклеазной (со сродством к днДНК) активностями. В состав MRN кроме NBS1 и MRE11 входит еще и АТФаза RAD50, раскручивающая ДНК. Общая схема этого пути репарации показана на рис. 25.

BRCA1 привлекает к разрыву BRCA2, который облегчает загрузку белка RAD51 (гомолог RecA) на одетую RPA (гомолог SSB-белка) нить ДНК. То есть у эукариот RAD51 вытесняет RPA с нити в комплексе с BRCA2. Участвующие в реакции паралоги RAD51 в свою очередь привлекают белки RAD52 и RAD54, может быть с помощью WRN и BLM геликаз. Так формируется активный 3'-конец ДНК, ведущий процесс гомологического спаривания и обмена нитей. RAD52 помогает RAD51 образовывать промежуточные комплексы при обмене нитей. Мономеры RAD52, как и в процессе SSA, образуют гептамерное кольцо, способное надеваться как на одонитевую, так и на двунитевую ДНК. RAD54 обладает АТФазной активностью и, взаимодействуя с геликазами, изменяет топологическую структуру ДНК. Эти топологические изменения, препятствуя суперскручиванию ДНК, облегчают RAD51 и RAD52 ее «распрямление» в районе DSB и способствуют их взаимодействию с другими белками репарации. Предполагается, что в некоторых случаях RAD54 может являться именно тем белком, поведение которого приводит к выбору пути репарации между SSA и HRR.

Известно, что в этом ДНК-белковом комплексе также обнаружен антионкоген P53, способный связываться с белками BRCA1, RAD51, WRN и BLM.

Геликазы WRN и BLM в процессе синапсиса внедряются в образовавшиеся холидеевские структуры. Именно в этот момент решается, каким образом эти структуры будут разрешены – с кроссинговером или без него. То есть эти геликазы, вероятнее всего, способны «открыть» донорную ДНК после завершения репаративного синтеза от места спаривания без ее разрывов. В эукариотических клетках существует и специфическая для структуры Холлидея геликазная-эндонуклеазная активность, способствующая ее разрешению, которая может быть

аналогична RuvABC-активности *E.coli*. У *S. cerevisiae* выделен комплекс Mus81-Mms4, который способен к правильному разрешению Холлидеевской структуры. Белок Mus81 был идентифицирован по его взаимодействию с белком Rad54. Он имеет гомологию с субъединицами структурно-специфической эндонуклеазы ERCC1/XPF (Rad1/Rad10), принимающей участие в NER. Также в разрешении Холлидеевских структур при HRR принимают участие паралоги белка Rad51 (XRCC2 и XRCC3, о которых мы подробнее поговорим ниже).

До сих пор точно не известно, какие ДНК-полимеразы и лигазы участвуют в процессе HRR.

Вероятно, роль HRR более значительна в эмбриональных клетках, чем в клетках взрослого организма. Об этом свидетельствует то, что нокаутные по основным генам HRR мыши погибают еще на эмбриональных стадиях, а клетки, мутантные по этим генам, вполне жизнеспособны

9.3.1. Роль гистона H2AX в репарации DSBs.

Завершая изучение процессов репарации DSBs, необходимо остановиться на механизмах, которые их запускают. К настоящему времени накоплены многочисленные экспериментальные данные, указывающие на то, что для репарации DSBs необходимо ремоделирование хроматина. Это ремоделирование происходит при строго ассоциированном с образованием DSB специфическом фосфорилировании С-концевого серина-139 вариантного гистона H2AX. Гистон H2AX (replacement histone) является одним из известных вариантов корового гистона H2A, который, в отличие от основного H2A и других коровых гистонов, может быть встроен в хроматин в течение всех фаз клеточного цикла, а не только во время S-фазы. Мегабазные участки хроматина, покрывающие DSB, можно легко визуализировать в ядрах или экстрактах облученных клеток как фокусы фосфорилированного по серину-139 гистона H2AX (названного γ -H2AX) с помощью специфических антител на фосфорилированный короткий пептид, соответствующий С-концу H2AX. Эти фокусы могут служить маркерами DSBs и способствовать изучению их индукции и процессинга. Фосфорилирование гистона H2AX происходит в первые же минуты после

образования DSB после γ -облучения, достигает максимума через 30-60 минут и способствует разрыхлению хроматина и эффективному связыванию белка Ku с образующимися концами ДНК. В то же время нужно помнить, что в нормальных клетках млекопитающих только около 5% нуклеосом содержит гистон H2AX, а их основная часть содержит обычный коровый гистон H2A, который при образовании DSB не фосфорилируется. Дефосфорилирование гистона γ -H2AX в клетках млекопитающих достоверно коррелирует с быстрой репарацией основной массы DSB системой NHEJ в течение первых 1.5-2 часов после γ -облучения. Однако небольшая часть фокусов γ -H2AX остается в ядрах в течение длительного времени, вплоть до 24 часов. В этих фокусах постепенно накапливается комплекс MRN и белок BRCA1, что указывает на возможную роль γ -H2AX и в репарации DSB путем HR.

Вероятно, ATM-зависимое фосфорилирование гистона H2AX все же не является необходимым условием самой репарации, а является лишь звеном в механизме, останавливающем клеточный цикл в ответ на повреждения ДНК (DNA damage checkpoint).

В клетках высших эукариот гистон H2AX фосфорилируется протеинкиназой ATM и ее инактивация приводит к нарушению этого фосфорилирования в первые минуты после облучения. Но в радиочувствительных клетках пациентов, дефектных по киназе ATM и страдающих наследственным заболеванием атаксия-телеангиэктазия (АТ), фокусы γ -H2AX после облучения все же выявляются. По-видимому, эти фокусы ассоциированы с сайтами репликации ДНК, так как в остановившихся в местах повреждения ДНК репликативных вилках фосфорилирование гистона H2AX проводит другая протеинкиназа – ATR.

9.3.2. Механизмы, обеспечивающие стабильность хромосом при наличии повторов и системы гомологической рекомбинации

В геномах высших эукариот присутствуют многочисленные повторяющиеся последовательности ДНК. У человека, например, такие повторы занимают более 40% всего генома. И этого следует, что при образовании DSBs вероятность одновременного образования нескольких разрывов по гомологичным повторам достаточно высока. Это может

привести к возникновению хромосомных перестроек за счет неравной рекомбинации между повторами, локализованными на разных хромосомах. Впрочем, вклад рекомбинации между негомологичными хромосомами в процессе HRR относительно невелик. Подсчитано, что чаще всего - примерно в 100 раз чаще, чем другими способами, - репарация путем HR происходит при гомологическом взаимодействии сестринских хроматид в поздней S- или G2- фазе клеточного цикла. Однако и в этом случае необходим контроль неравных сестринских обменов, возможных при неправильном совмещении близко расположенных повторов.

Впервые необходимость существования механизмов защиты от рекомбинации ДНК по повторам в клетках высших эукариот была осознана тем же самым М. Радманом, который открыл SOS-ответ у прокариот. Он предположил, что клетка избегает рекомбинации между повторами благодаря некоторой дивергенции их нуклеотидных последовательностей. Такая дивергенция при попытках рекомбинации ведет к образованию большого количества неспаренных нуклеотидов, распознаваемых системой MMR, которая и подавляет рекомбинацию. Эта гипотеза нашла экспериментальное подтверждение: в клетках мышей система MMR примерно в 10 раз снижала репарацию DSB путем HR даже при небольшой (1.5%) дивергенции последовательности нуклеотидов. В тоже время способность системы MMR подавлять рекомбинацию между реальными повторами в геномах высших эукариот имеет некоторые ограничения, природа которых неясна. Практически во всех известных случаях редкой внутримолекулярной гомологической рекомбинации между Alu-повторами в геноме человека степень дивергенции последовательностей была более 5%. Одновременно в геноме мышей и человека имеется много достаточно стабильных дупликаций с очень высокой степенью гомологии (более 98%).

Вторая гипотеза возможного подавления рекомбинации между повторами основана на том, что основной фермент поли-АДФ-рибозилирования PARP-1 (полимераза поли-АДФ-рибозы 1) способен быстро связывать образовавшиеся DSBs. Автомодификация PARP-1, то есть осуществляемое им самим поли-АДФ-рибозилирование, ведет к синтезу отрицательно заряженных нитей поли-АДФ-рибозы рядом с

120

разрывом ДНК. Эти нити или подавляют сборку рекомбинационного комплекса, или просто электростатически отталкивают способный участвовать в рекомбинации второй дуплекс ДНК. Таким образом возможная рекомбинация подавляется еще до выяснения степени гомологии между повторами.

Косвенным подтверждением этой гипотезы является то, что ферменты поли-АДФ-рибозилирования появляются в течение биологической эволюции одновременно с появлением в геномах большого количества повторов, но до сих пор остается неясным, может ли сама PARP-1 (или другие ферменты этой группы) специфически распознавать разрывы, локализованные именно в повторах. Существуют экспериментальные данные, что PARP-1 может активироваться при взаимодействии с известным репрессором транскрипции YY1, распознающим в геноме человека ретропозоны семейства Alu. Этот репрессор играет важную роль в негативном контроле некоторых ретровирусов и способен модифицировать хроматин с помощью гистоновых деацетилаз. Впрочем, активность YY1 как транскрипционного репрессора не обязательно связана с его способностью активировать PARP-1.

Роль PARP-1 и поли-АДФ-рибозилирования в подавлении рекомбинации между повторами не согласуется с данными о том, что у мышей, нокаутных по гену PARP-1, нет резкого возрастания числа хромосомных aberrаций, хотя частота сестринских обменов хроматид (СХО, SCE) несколько повышена. Не исключено, что другие ферменты поли-АДФ-рибозилирования дублируют важные антирекомбинационные функции. Подробнее о роли PARP-1 в процессах репарации мы поговорим ниже.

Третья гипотеза, объясняющая подавление гомологической рекомбинации между повторами, предполагает создание в области повторов особой локальной структуры хроматина, обеспечивающей надежную изоляцию концов ДНК при образовании двойных разрывов. Кепирование теломер может служить хорошо изученным примером такой изоляции. У позвоночных животных теломеры состоят из tandemных повторов (TTAGGG)_n, длина которых на каждой теломере может достигать 30 тысяч пар нуклеотидов. Кепирование теломер осуществляется

сложными белковыми комплексами, состоящими из белков, препятствующих слиянию теломер за счет HR и контролирующих теломеразу - (TTAGGG)_n-синтезирующий фермент. Главными белками этих теломерных комплексов у млекопитающих являются белки TRF1 и TRF2 (telomere repeat binding factor 1 и 2). TRF1 и TRF2 специфически распознают повторы (TTAGGG)_n и связываются с ними благодаря присутствию в этих белках особого Myb-подобного ДНК-связывающего домена. Основную двунитевую часть теломер покрывает белок TRF1, который является негативным регулятором их длины. Самый дистальный короткий (150 нуклеотидов) однотяжевый участок теломерной ДНК (overhang) сворачивается благодаря белку TRF2 в теломерную петлю и оказывается спрятанным внутри теломерного комплекса. Поэтому этот однотитевой конец не может «атаковать» гомологичные мишени на других хромосомах. Таким образом, TRF2 нужен для подавления слияний теломер, так как частота таких слияний повышается при ингибировании его экспрессии.

Было показано, что TRF1 также специфически взаимодействует с одной из субъединиц (p86) белка Ки, и это взаимодействие препятствует латеральному параллельному спариванию двунитевых ДНК, содержащих повторы (TTAGGG)_n, обнаруженное в опытах *in vitro*. Сам по себе гетеродимер Ки не может латерально связываться с двунитевой теломерной ДНК, но очень эффективно распознает любые внутренние DSB и после этого может инициировать процесс NHEJ, подавляя при этом возможность инициации HR. Белок Ки изолирует внутренний двунитевой разрыв от рекомбинационных белков, непосредственно связываясь с его концами. На теломерные повторы антирекомбинационная активность белка Ки направляется распознающим их сиквенс-специфическим белком TRF1.

В подавлении рекомбинации белком Ки при латеральном связывании с теломерной ДНК, вероятно, принимает участие взаимодействующая с ним ДНК-зависимая протеинкиназа (DNA-PK).

Схема защиты теломер представлена на рис. 26. Tank1 и 2 – теломерные человеческие полимеразы поли-АДФ-рибозы, Tin2 – TRF1-interacting nuclear protein 2, белки Rap1(repressor-activator protein 1) и Pot1

(protection of telomere 1) защищают одностороннюю часть теломеры и препятствуют работе теломеразы.

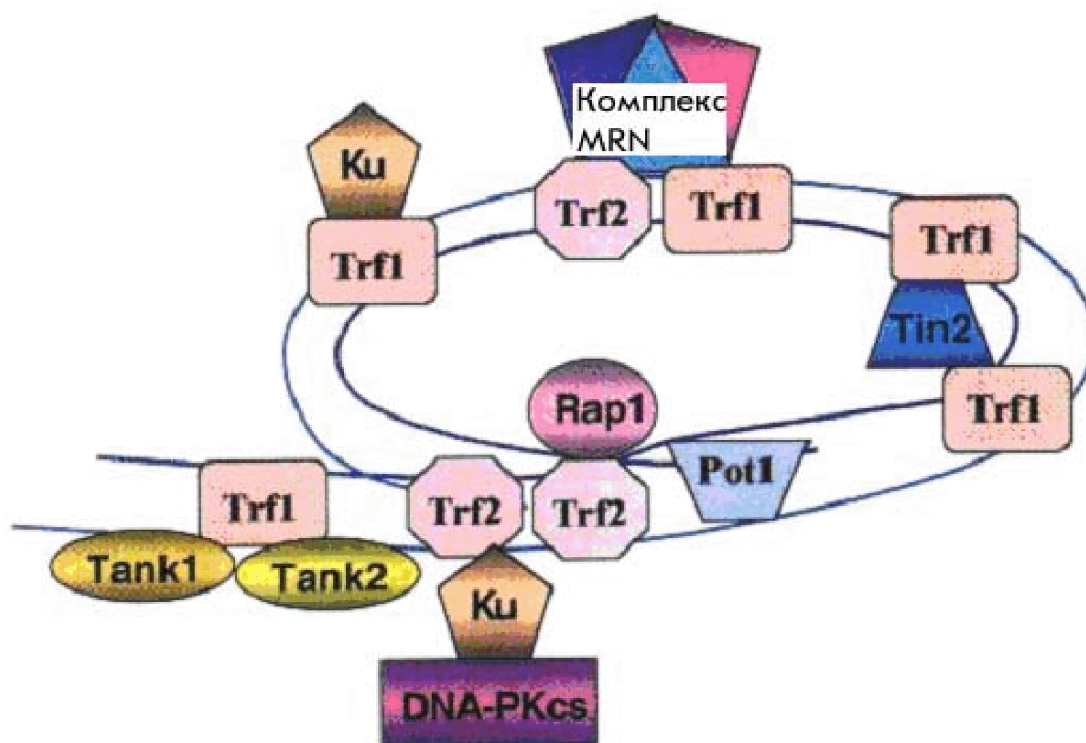


Рисунок 26. Организация теломеры. Теломерная ДНК, покрытая специфическими белками.

Впрочем, нужно учитывать, что теломеры представляют собой специализированные субхромосомные образования. Вопрос, работает ли сиквенс-специфический механизм защиты ДНК от рекомбинации по повторам на обычных внутренних (интерстициальных) хромосомных повторах, остается открытым. У многих видов позвоночных, например, у китайского хомячка, в большом количестве выявляются внутренние повторы (TTAGGG)_n, образующие большие блоки теломерного «гетерохроматина». Была выявлена ассоциация с этим гетерохроматином белка TRF1. Вероятно, на интерстициальных блоках (TTAGGG)_n белок

TRF1, взаимодействуя с гетеродимером Ки, способствует подавлению неравной гомологической рекомбинации между этими повторами.

Еще одна гипотеза предполагает не собственно защиту от рекомбинации по повторам, а как бы «экранирование» этого процесса. Разрешение структуры Холлидея в процессе репарации двунитевых разрывов путем гомологической рекомбинации у млекопитающих обычно происходит без внутреннего разрешения хиазмы, то есть без разрывов, а просто через разворачивание этой структуры геликазами и вытеснение донорной ДНК от места репаративной реакции. Это принципиальное отличие HRR от процесса гомологической рекомбинации в мейозе, когда разрывы и их последующее воссоединение обязательны. Таким образом, рекомбинация по повторам, даже если она и пройдет по повторам в нехомологичных хромосомах, будет незаметна, так как не сможет привести к каким-либо хромосомным перестройкам.

9.3.3. Болезни, связанные с дефектами генов, вовлеченных в репарацию двунитевых разрывов.

К сожалению, как и в случаях MMR и NER, мутации некоторых генов, участвующих в репарации DSBs, приводят к развитию различных наследственных синдромов. Все они характеризуются повышенной клеточной чувствительностью к действию γ -облучения и химических мутагенов и высоким риском развития онкологических заболеваний.

При описании процесса NHEJ мы уже упоминали тяжелый наследственный синдром иммунодефицита, развивающийся при мутациях гена, кодирующего нуклеазу Artemis. Синдромы повышенной радиочувствительности развиваются и в случаях мутаций в других генах, связанных с процессами нуклеазной расчистки места разрыва - RAD50 (ATLD, AT like disease), NBS1 (Нийменгенский синдром ломкости хромосом) и NHEJ – ligIV (ligIV syndrome).

Кроме ATM в передаче сигнала участвует и другая протеинкиназа из семейства PI3-киназ (фосфоинозитол-3-киназы) – ATR (ataxia-telangiectasia related), сходная с ней по структуре и хуже изученная, так как нокаутные по этому гену мыши гибнут в эмбриогенезе. Только в 2003 году было

показано, что нарушение репарации ДНК у больных синдромом Секеля, характеризующегося повышенной чувствительностью к ионизирующей радиации, связано с мутацией, инактивирующей ген ATR. ATR включается несколько позднее, пик ее активности наступает через 2-4 часа после повреждения ДНК. При отсутствии ATM ATR частично берет на себя ее функции. Недавно показано, что ATR образует гетеродимер со специфическим белком ATRIP (ATR interacting protein), что важно для чекпойнт-сигнала, хотя механизм этого влияния остается неизвестным.

Но есть целая группа хорошо изученных заболеваний, от которых страдает достаточно большое число пациентов, при которых мутации несут гены, вовлеченные в процессы гомологической рекомбинации и глобальный клеточный ответ на повреждения ДНК. Эти заболевания мы рассмотрим более подробно, так как основанные на них клеточные модели позволили разобраться в деталях многих процессов.

9.3.3.1. Атаксия-телеангиэктазия. Белок ATM.

Тяжелое наследственное заболевание атаксии-телеангиэктазии (АТ) или синдром Луи-Бар характеризуется расстройством движения (атаксией), расширением капилляров кожи и роговицы (телеангиэктазией), врожденным иммунодефицитом, нейродегенеративными изменениями, чувствительностью к ионизирующему излучению, резко повышенной предрасположенностью к опухолевым заболеваниям и ускоренным старением. Это заболевание очень подробно описано и является одним из «синдромов нестабильности генома». В различных человеческих популяциях АТ встречается с частотой от 1:40 000 до 1: 200 000 рождений. Гетерозиготное носительство этого заболевания распространено гораздо шире - по различным данным от 2% до 8% населения несут мутации, приводящие к АТ, в гетерозиготном состоянии. К тому же это гетерозиготное носительство также, как и сама АТ сопряжено с повышенным риском новообразований.

Традиционно сложилось представление о том, что повышенная чувствительность АТ- клеток к радиации является прямым результатом дефекта репарации повреждений, вызываемых ионизирующей радиацией. Это было самым распространенным объяснением этиологии данного

заболевания. Но многочисленные исследования не обнаружили достоверного изменения кинетики ликвидации как одно- так и двунитевых разрывов ДНК в клетках больных АТ по сравнению со здоровыми донорами после облучения. При этом большинство, если не все изученные штаммы клеток АТ, имеют сниженный и растянутый по времени репаративный синтез ДНК после действия ионизирующей радиации.

Долгое время при изучении АТ основным оставалось, основанное на выявленных методом изучения внепланового синтеза ДНК четырех группах комплементации, представление о существовании четырех различных генов. Прогресс в этой области был крайне медленным, несмотря на ярко выраженный клеточный фенотип, который использовали для получения комплементирующей ДНК. Но в 1995 году наконец-то было доказано, что у всех больных АТ поврежден один и тот же ген АТМ, картированный на 11 хромосоме (11q22-23). Этот научный прорыв резко ускорил изучение атаксии-телеангиэктазии. Особенно интересным оказался С-концевой домен белка АТМ, содержащей 400 аминокислот. Эта область показывает явное соответствие сиквенсу домена 100кД каталитической субъединицы особого белка - сигнального переносчика-медиатора - фосфатидилинозитол-3' киназы (PI-3 киназы) человеческих клеток и соответствующего ей дрожжевого белка Vps34.

Ген АТМ кодирует белок с молекулярным весом 350.6 кД, содержащий 66 экзонов. Это открытие подтвердило наличие только одного гена АТМ и показало, что описанные ранее различные группы комплементации АТ являются артефактом и свидетельствуют только о большом индивидуальном разнообразии данного заболевания на клеточном уровне. К настоящему времени обнаружено около 80 мутаций, приводящих к инактивации гена АТМ и развитию у пациентов атаксии-телеангиэктазии, и несколько меньшее число характерных для различных популяций полиморфизмов, не влияющих на активность белка АТМ. Таким образом к настоящему времени сложилось представление о том, что высокая вариабельность степени выраженности различных клинических признаков атаксии-телеангиэктазии все же основана на мутациях в одном гене, продукт которого вовлечен во множество белок-

белковых взаимодействий. Именно от этих взаимодействий и зависит характер и тяжесть заболевания в каждом конкретном случае.

К настоящему времени сложилась следующая картина, описывающая роль АТМ в клетке. Протеинкиназа АТМ является переносчиком сигнала на начальном этапе клеточного ответа на появление двунитевых разрывов ДНК. Она действует с самых первых минут после повреждения, фосфорелируя целый спектр белков-мишеней и запуская таким образом сразу несколько различных сигнальных путей. Преимущественная активация того или иного пути и приводит к различному протеканию репарационных процессов в клетке. Пик АТМ-зависимого ответа наступает через полчаса после действия повреждающего агента.

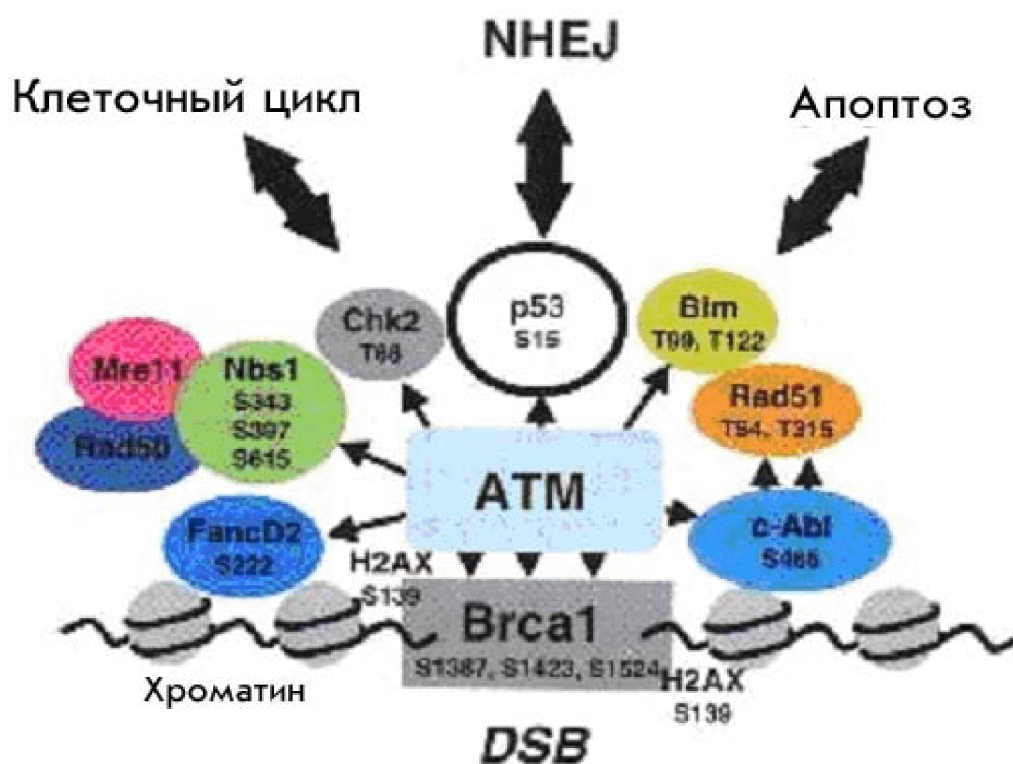


Рисунок 27. Белки - мишени протеинкиназы АТМ

До сих пор не совсем ясно, каким образом активируется сама АТМ, обычно находящаяся в клетке в неактивной гомодимерной форме. При появлении двунитевых разрывов ДНК две молекулы АТМ взаимно фосфорелируются и гомодимер распадается на две активные

протеинкиназы. Не ясно до конца и то, каким именно образом гомодимер ATM воспринимает сигнал о повреждении ДНК. Вероятно, неактивная ATM связывается с белками системы репарации неспаренных оснований MSH2 и MSH6. Можно предположить, что система MMR распознает повреждения, вызванные ионизирующей радиацией, образуя молекулярные «строительные леса», которые позволяют ATM фосфорелировать CHK2, активируя таким образом чек-пойнт S-фазы. То есть для быстрой реакции ATM на облучение необходима и нормальная активность системы MMR. Вероятнее всего, прямого взаимодействия ATM с ДНК нет. Она фосфорелирует гистон H2AX, что привлекает белки BRCA1 и NBS1 (являющийся частью комплекса MRN и прямой мишенью ATM, то есть главным переносчиком сигнала с ATM на MRN), которые ATM также фосфорелирует. Основные мишени ATM показаны на рис. 27. Существующие данные утверждают, что именно ATM определяет ранний чекпойнт-ответ, а ATR действует позднее, когда уже идет репарация повреждений ДНК, как вызванных ионизирующей радиацией, так и ультрафиолетовым излучением или остановкой вилочек репликации

Регуляторная роль ATM в передаче сигналов в клетке после действия ионизирующей радиации крайне высока. В зависимости от того, какой именно белок Ku70 или ATM будет действовать в первые минуты после образования двунитевого разрыва будет осуществляться тот или иной путь воссоединения концов (NHEJ или HDR соответственно). То есть ATM контролирует именно путь воссоединения двунитевых разрывов с помощью гомологической рекомбинации.

9.3.3.2. Белки BRCA1 и BRCA2.

Белки BRCA1 и BRCA2, гетерозиготное носительство мутаций в генах которых приводят к наследственным формам рака груди, также вовлечены в процесс репарации DSB. Многими авторами показано, что они выявляются в фокусах репарации методами иммунопреципитации. Эти белки не являются гомологами и выполняют в клетках различные функции. Мыши, нокаутные по этим генам гибнут еще во время эмбрионального развития.

На схеме строения BRCA1 (1863 аминокислоты) и BRCA2 (3418 аминокислот), изображенной на рис. 28, видны ключевые домены обоих белков. Это неродственные белки. BRCA1 имеет BRCT-мотив в С-конце (вероятно, служащий для белок-белковых взаимодействий и организации репарационных ферментов в комплексы), SQ-кластер, в котором расположены сайты фосфорелирования этого белка белками ATM и ATR, и ринг-домен на N-конце, также служащий для белок-белковых взаимодействий.

Для BRCA2 характерен очень большой 11 экзон, содержащий 8 BRC-повторяющихся мотивов, необходимых для связывания белка RAD51. Фрагмент BRCA2, содержащий аминокислотные остатки 788-1064, образует комплекс с RAD51, и с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания удалось показать, что оба белка локализованы *in vivo* в одних и тех же элементах синаптонемного комплекса.

Мыши, нокаутные по этим генам гибнут еще во время эмбрионального развития.

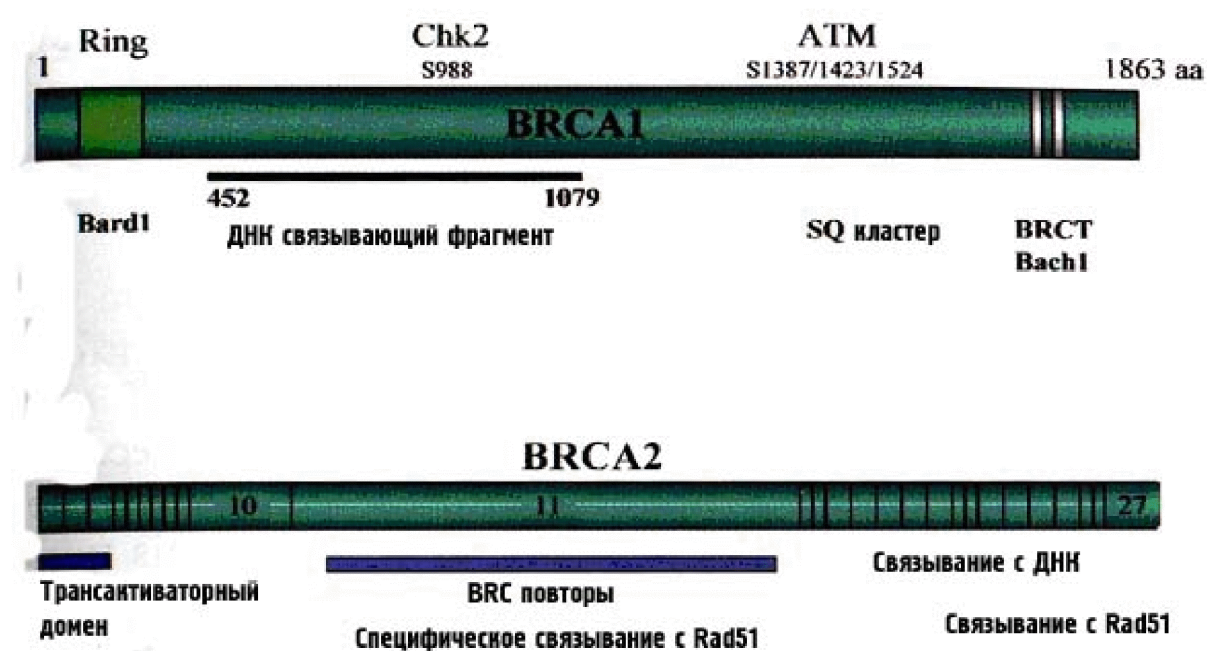


Рисунок 28. Схематическое изображение белков BRCA1 и BRCA2.

BRCA1 и BRCA2 обнаружены только у высших эукариот, что говорит о роли этих белков в организации сложных мультибелковых комплексов, участвующих во все более усложняющихся реакциях увеличивающихся геномов и способных вовлекаться в разнообразные клеточные процессы и связывать их между собой.

Продукт гена BRCA1 (опухолевого гена-супрессора) обладает ярко выраженной способностью к образованию комплексов с другими белками. Многочисленные белки репарации ДНК – BRCA1, MSH2, MSH6, MLH1, ATM, BLM и комплекс RAD50-MRE11-NBS1 могут быть обнаружены при совместной иммунопреципитации с ним в рамках единого комплекса, называемого BRCA1-associated surveillance complex (BASC). По современным представлениям BRCA1 совместно с комплексом Mre11-RAD50-NBS1 (MRN) являются основными белками – сенсорами, которые участвуют в распознавании двунитевых разрывов ДНК. BRCA1 взаимодействует с большим числом других белков, вовлеченных в процессы репарации ДНК, и служит якорем и координатором для дальнейшей сборки уже упомянутого белкового комплекса BASC, и, вероятно, одновременно является адаптором, предоставляющим дополнительные мишени для фосфорелирования киназам-переносчикам сигнала.

Многие белки, участвующие в передаче сигнала о повреждении ДНК и называемые медиаторами, содержат два повторяющихся домена, обнаруженных впервые в С-конце белка BRCA1 и названных поэтому BRCT-доменами. Их обычно называют BRCT-содержащими белками, они вовлечены в чекпойнт-ответ, распознают повреждения ДНК и привлекают другие белки, которые облегчают передачу сигнала вниз по сигнальному пути и репарацию ДНК. Это TopBP1 (topoisomerase II binding protein I), 53BP1 (P53 binding protein I) и MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint protein I), белок Rad9 дрожжей, известный своей ролью в контроле клеточного цикла. BRCT-домены имеют и уже упоминавшиеся ДНК-полимеразы λ и μ .

В тоже время белок BRCA1 способен к убиквитин-лигазной активности, которую он проявляет в комплексе с особым белком BARD1 (BRCA1-associated RING-domain protein 1). Белок BARD1, связываясь с белком P53

и принимая участие в его стабилизации, является одним из триггеров апоптоза. Во время S-фазы клеточного цикла белки BRCA1, BARD1 и RAD51 находятся в единых комплексах, выявляемых как “BRCA1 nuclear dots”, и при повреждении ДНК в этой фазе мигрируют в зону репаративной реакции.

Наследственные мутации в другом супрессорном гене, BRCA2, ответственны в 50% случаев за предрасположенность к раннему развитию рака молочной железы у женщин. Мышиные эмбрионы с дефектным геном BRCA2 обладают повышенной чувствительностью к γ -лучам и погибают на ранних стадиях развития. С-концевой фрагмент (36 аминокислотных остатков) белка BRCA2 мыши (всего 3328 остатка) взаимодействует с N-концевым районом белка mRad51 мыши (43 аминокислотных остатка). Гены, кодирующие белки BRCA2 и mRad51, экспрессируются в эмбрионах одновременно, поэтому очевидна функциональная значимость этого взаимодействия.

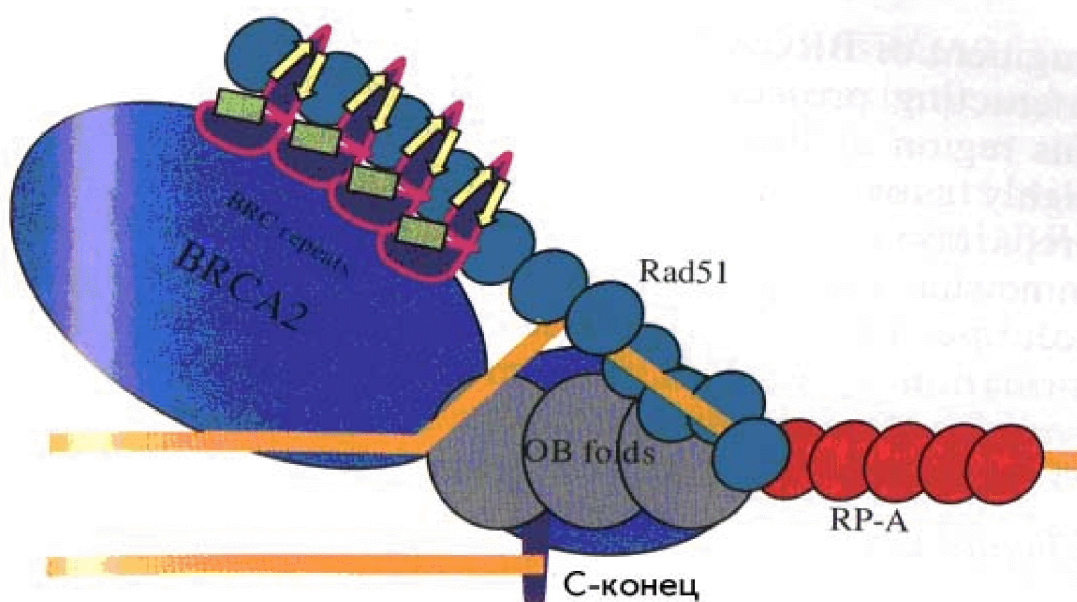


Рисунок 29. Взаимодействие между белками BRCA2 и hRAD51.

На рис. 29 показано, как именно RAD51 человека взаимодействует с районом BRC повтора, где происходит взаимопроникновение между мономерами RAD51 и BRCA2. Предполагается, что при этом взаимодействии мономеры RAD51 выстраиваются в одну линию на области BRC повтора, в то время как «хвостовой» С-конец белка (800 аминокислот) BRCA2 человека связывается с одностранным ДНК. Этот хвост отделен от района BRC-повтора областью, состоящей из трех олигонуклеотид-связывающих доменов (OB1\OB2\OB3), способных связываться с одностранным ДНК и «башней» между OB2 и OB3, содержащей трехспиральный узел, и так образует целый комплекс, способный смещать RPA и заменять его RAD51-филаментом. Причем надо заметить, что строение OB2\OB3 доменов достоверно сходно со строением белка RPA.

9.3.3.3. Геликазы семейства RecQ.

Обсуждая роль рекомбинации в стабильности клеточного генома, нельзя обойти вниманием и участие в этих процессах геликаз семейства RecQ.

Гомологи геликазы RecQ из *E. coli* обнаружены практически у всех организмов. Их строение показано на рис. 30.

RecQ-подобные геликазы вместе с топоизомеразой III играют важную роль не только в гомологической рекомбинации, но и в других клеточных процессах, таких как репликация и контроль клеточного цикла. Как уже говорилось, именно RecQ-подобные геликазы вместе с топоизомеразой III способны проводить требующие топологических изменений ДНК некротические разрешения Холлидеевской структуры. Такое разрешение процессов митотической рекомбинации у высших эукариот позволяет избежать возникновения разрывов в донорной ДНК и таким образом не допустить хромосомных перестроек в случае если в процесс гомологической рекомбинации будут вовлечены нехомологичные хромосомы или нехомологичные участки гомологичных хромосом.

У человека в процессах репарации двустранных разрывов ДНК крайне важны белки WRN и BLM, которые также являются гомологами RecQ-геликазы *E. coli*, и связаны с развитием таких тяжелых синдромов, как

132

синдром Вернера (ускоренное старение взрослых) и синдром Блюма соответственно. Оба эти синдрома характеризуются признаками ускоренного старения и повышенным риском опухолеобразования. Дефект другой RecQ-подобной геликазы – RecQ4 - приводит к развитию еще одного крайне редкого заболевания - синдрома Расмунда-Томсона.

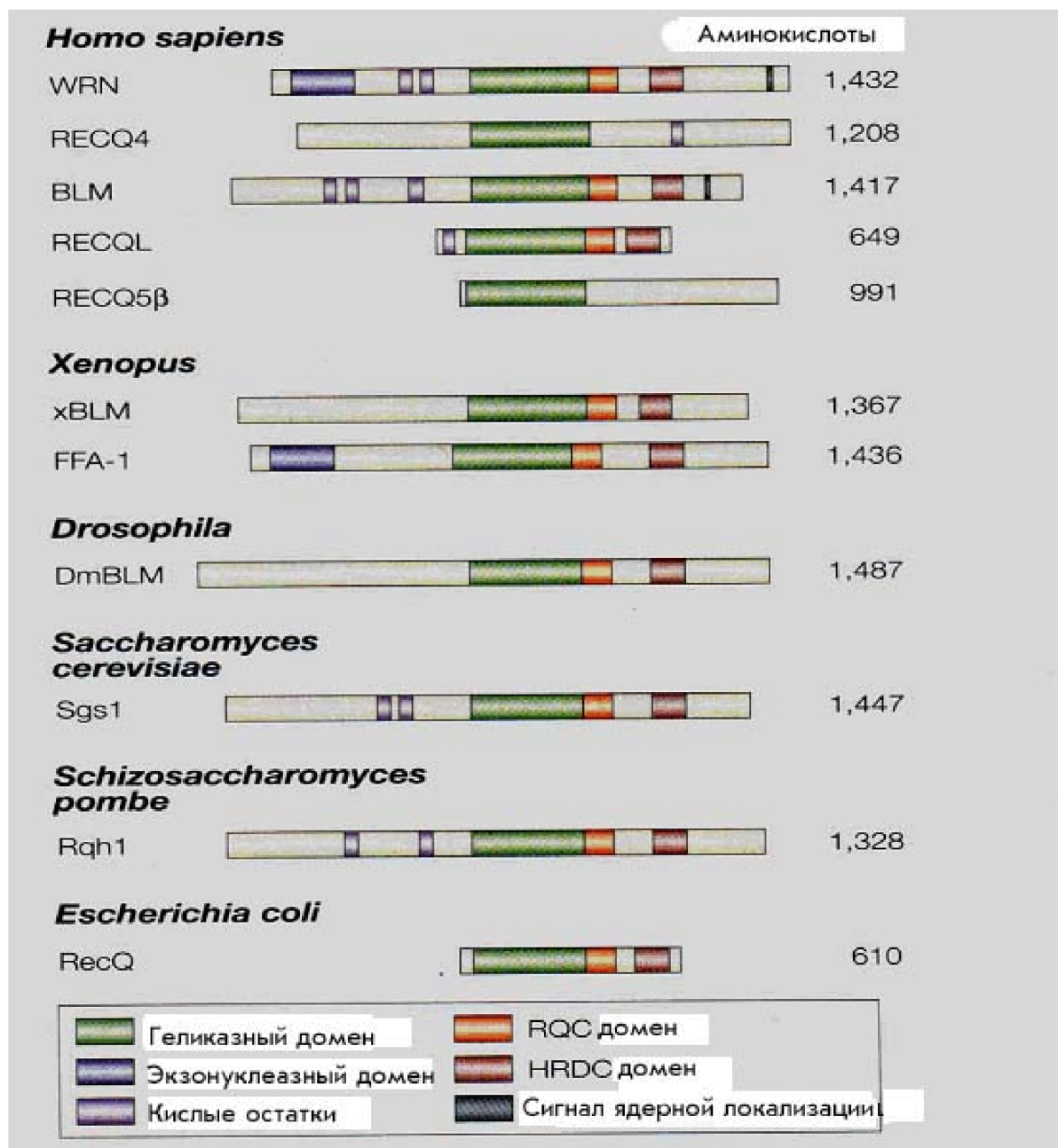


Рисунок 30. Сравнительное строение RecQ-подобных геликаз у различных видов.

9.3.3.4. Синдром Блюма

Больные, страдающие синдромом Блюма (BS) характеризуются крайне малым весом при рождении и остановкой роста, мужским гипогонадизмом, сниженной фертильностью и ранней менопаузой у женщин, предрасположенностью к диабету и новообразованиям. На лице под воздействием света развивается характерная телеангиэктазия в форме "бабочки", голова больных удлинена, у них резко снижен иммунитет и они легко подвержены инфекциям. В основной популяции больные BS крайне редки, но в популяции евреев-ашкенази частота заболевания достигает 1: 58 000. Эта болезнь является аутосомным рецессивным заболеванием. Исследования клеточных штаммов от пациентов с BS показали, что у них существенно длинее, чем в нормальных клетках время клеточного цикла, при этом за одно и то же время клетки BS способны синтезировать вдвое меньше ДНК, чем контрольные и удлинение вновь синтезированной нити ДНК происходит медленнее. Накапливающиеся же промежуточные продукты репликации имеют размер 20кБ, что достоверно больше, чем фрагменты Оказаки. При этом клетки BS сохраняют нормальный уровень ДНК-полимераз.

В клетках BS в культуре наблюдается большое количество спонтанных разрывов и перестроек и повышенный уровень соматической рекомбинации. Очень высоко количество особых хромосомных aberrаций - квадрирадиальных фигур, названных так за то, что хромосомы располагаются в них в четырех направлениях.

В клетках BS наблюдается также повышенный уровень спонтанных мутаций, причем этот эффект затрагивает как кодирующие участки ДНК, так и некодирующие повторы (т.е. транскрибируемую и нетранскрибируемую ДНК в равной степени).

В 1993-94 годах ген синдрома Блюма был картирован и сиквенированием и получил название BLM (Bloom-mutated). Он расположен на 15 хромосоме - 15q26.1 и кодирует белок в 1417

аминокислот с молекулярной массой 159 кД. При изучении этого белка была обнаружена его гомология с тремя уже известными геликазами. Участок 649-1041 содержит семь консервативных геликазных доменов идентичных аналогичным участкам человеческого RecQL (44%), *Saccharomyces cerevisiae* SGS1 (43%) и *Escherichia coli* RecQ (42%) белков. Все эти белки относятся к RecQ-геликазам. RecQ-белок *E.coli* обладает ДНК-зависимой АТФ-азной и ДНК-геликазной активностями и может перемещать одностороннюю ДНК в направлении 3'-5'. Также он вовлечен в пострепликативную репарацию УФ-повреждений. Дрожжевой белок SGS1 способен к взаимодействию с дрожжевыми Top2 α и Top3 β топоизомеразами. Продукт человеческого гена RecQL, выделенного из клеток HeLa, проявляет ДНК-зависимую АТФ-азную, ДНК-геликазную активности, а также способность к 3'-5' ДНК транслокациям. По аналогии BLM должен также обладать подобными свойствами.

В области 588-661 также были обнаружены три коротких мотива, подобных тем, которые описаны среди филогенетического многообразия большой субъединицы РНК полимеразы II. Роль этих мотивов неясна. Никакой другой гомологии в описанной аминокислотной последовательности не обнаружено, хотя негеликазные участки также имеют необычную структуру. В них очень много кислых, основных и полярных аминокислот, причем 13% N-концевой последовательности и 14% C-концевой составляют остатки серина. Функция столь сложных частей описанного белка остается пока неизвестной. Хотя возможно сделать несколько предположений. Эта негеликазная часть белка BLM близка по составу к негеликазной части уже упомянутого нами дрожжевого белка Sgs1 - самого близкого к BLM и по размеру. Мутанты по этому гену характеризуются медленным ростом, нерасхождением хромосом в митозе и ошибками их сегрегации в мейозе, а также повышенной частотой рекомбинации. Повышенная частота хромосомных перестроек, нарушение репликации и пониженная топоизомеразная активность характерны и для клеток больных BS. Можно предположить, что негеликазная часть этих белков связана именно с поддержанием стабильности хромосом в клетке.

При анализе последовательностей BLM от 10 различных клеточных линий BS было обнаружено 7 мутаций, четыре из которых приводили к остановке синтеза мРНК и образованию укороченной формы белка в 185, 271, 515 и 739 аминокислот, то есть без геликазной области. Причем последняя из этих мутаций наблюдалась у всех (в данном исследовании их было 4) пациентов евреев-ашкенази. Было высказано предположение, что почти все больные синдромом Блюма в популяции евреев-ашкенази несут одну и ту же мутацию. Еще две миссенс мутации обнаружены в консервативной области гомологичной RecQ и одна замена цистеина на серин в С-конце. Не совсем ясно, каким образом подобная мутация приводит к появлению BS фенотипа. При этом можно предположить, что белок BLM не является необходимым для сохранения жизни индивидуума, так как у больных этот белок полностью инактивирован. Вероятно, какие-то другие факторы в клетке способны частично замещать утерянную BLM активность.

BLM фосфорелируется белком ATM, он играет важную роль в разрешении холидеевской структуры и способен связываться с RAD51 и с BRCA1, входя в состав так называемого BASC (BRCA1 associated genome surveillance complex) – комплекса, по современным представлениям являющегося сенсором повреждений генома.

9.3.3.5. Синдром Вернера

Синдром Вернера или прогерия взрослых (WS) - достаточно редко встречающееся аутосомное рецессивное заболевание, характеризующееся всеми симптомами старения в более раннем возрасте, было впервые описано Вернером в 1904 году. Больные рано начинают выглядеть старообразно, еще в возрасте до 20 лет резко седеют и теряют волосы, имеют кожные изменения, подобные таковым при склеродерме, ранние морщины, "старческий" голос - все это позволяет говорить об ускоренном старении. WS характеризуется также широким спектром патологии, обычно связываемой с возрастными изменениями. Это атеросклероз, остеопороз, диабет, катаракта, различные типы доброкачественных и злокачественных опухолей.

Болезнь активно развивается в возрасте от 20 до 40 лет, обычно больные умирают от сердечно-сосудистой недостаточности или рака, средний возраст смерти - 47 лет. Также при этом заболевании наблюдается маленький рост, гиперпигментация, гиперкератоз, сухость кожи, телеангиэктазия, "птичье" лицо, гипогонадизм и пониженная фертильность у лиц обоего пола. Исследования на клеточном уровне подтверждают ускоренное старение у больных WS. Известно, что популяция фибробластов в культуре способна к ограниченному числу удвоений, причем клетки, взятые от более молодых индивидуумов, обладают более высокой репликативной способностью, чем клетки особей старшего возраста. Число подобных удвоений для каждого вида животных различно и носит название числа или лимита Хейфлика. Для человека лимит Хейфлика равен примерно 50-60. Было проведено сравнение клеток WS с клетками здоровых доноров, как такого же, так и более старшего возраста. Клетки больных WS растут значительно медленнее, раньше демонстрируют морфологические изменения, характерные для "стареющих" клеточных культур, и значительно быстрее исчерпывают свой пролиферативный потенциал - обычно после 10-20 удвоений популяции. При этом наблюдается большее сходство с клетками, взятыми от пожилых доноров. Вероятно, именно с этим связано характерное для синдрома Вернера состояние кожных покровов.

Пониженная способность к репликации связана с геномной нестабильностью. Повышенный уровень хромосомных перестроек наблюдается как *in vitro*, в культурах фибробластов WS, так и *in vivo*, в фибробластах и лимфоцитах больных. Также было показано увеличение уровня соматических мутаций в клетках WS., существенно расширившие наши знания об этом заболевании. Ген WS, названный исследователями WRN, был картирован на 8 хромосоме в районе p12-21. и секвенирован. Белок, кодируемый этим геном, состоит из 1 432 аминокислот и в своем центральном домене имеет семь ранее описанных мотивов, характерных для суперсемейства ДНК и РНК геликаз. Присутствие последовательности DEAN и участка связывания АТФ подтверждает, что этот белок является функциональной геликазой.

Геликазный домен WRN имеет достоверную гомологию с другими геликазами - RecQ *E. coli*, Sgs1 *S. cerevisiae*, RECQL человека. При этом как С, так и N конец не обнаруживают гомологии ни с какими ранее описанными белками. Обычно геликазы работают в комплексе с другими белками и именно С и N концы отвечают за связывание с ними. При этом оказалось, что любая мутация, вне зависимости от того, затрагивает она геликазную область или нет, приводит к полной потере белком своей функции. Первые четыре мутации, описанные при синдроме Вернера, были выявлены именно в С-конце. Эти мутации были обнаружены у 83% японских пациентов, они приводили к синтезу несколько укороченного белка с интактным геликазным доменом. После дальнейшего поиска мутаций и изучения дополнительно нескольких семей больных были обнаружены еще 5 мутаций. Две из них находились в N-конце и приводили к явно укороченному белку, сохранившему только часть N-концевого домена, а три остальные располагались в геликазной области и нарушали ее строение. Ген WRN исследован очень подробно, в нем выделены 35 экзонов размером от 68 пар оснований (14 экзон) до 768 (35 экзон), геликазная область занимает 14-21 экзоны. До сих пор остается неясным, каким образом мутации гена WRN приводят к такому сложному системному заболеванию, как синдром Вернера.

Белок WRN является не только геликазой но и 3'-5'-экзонуклеазой, он способен связываться с RPA, Ku, P53. Фосфорелирует его DNA-PK. Вероятно, он вовлечен не только в NHR, но и в NHEJ.

9.3.3.6. Анемия Фанкони.

Существует еще несколько генетических болезней, которые традиционно связывают с дефектами репарации ДНК, не обязательно четко связанными с чувствительностью к γ - или УФ облучению. Одной из них является анемия Фанкони (ФА), заболевание, характеризующиеся в первую очередь общей цитопенией, то есть пониженным количеством всех клеточных элементов крови, а также многочисленными нарушениями роста и развития. Серьезно болезнь была впервые описана Фанкони в 1967 году. Исследование более 90 семей привело к выводу о рецессивном аутосомном наследовании этого заболевания. ФА характеризуется повышенной

138

частотой новообразований у больных и их кровных родственников, эта частота в 15 000 раз выше, чем в детской популяции в среднем.

В клетках больных ФА наблюдается повышенный уровень как спонтанных хромосомных aberrаций, так и aberrаций, возникающих в ответ на действие различных химических агентов, особенно тех, которые приводят к поперечным сшивкам нитей ДНК: азотистого иприта, митомицина, диэпоксидбутана и псоралена. Они характеризуются удлиненной фазой G2, которая в ФА клетках продолжается в два раза дольше, чем в обычных.

При этом в γ -облученных клетках ФА наблюдается резко сниженный уровень апоптоза по сравнению с контролем; в соответствии с наблюдениями о зависимости апоптоза от повышения уровня белка Р53 в нормальных клетках после облучения, в клетках ФА белок Р53 не стабилизируется.

Неспособность ФА клеток избавляться от межнитевых сшивок ДНК после воздействия митомицина была показано достаточно давно и послужила основой для представлений о дефекте репарации подобных сшивок в этих клетках. Эти результаты воспроизводятся не всегда и не после действия любых подобных агентов, но вполне допустимым объяснением для таких фактов может служить генетическая неоднородность этого заболевания.

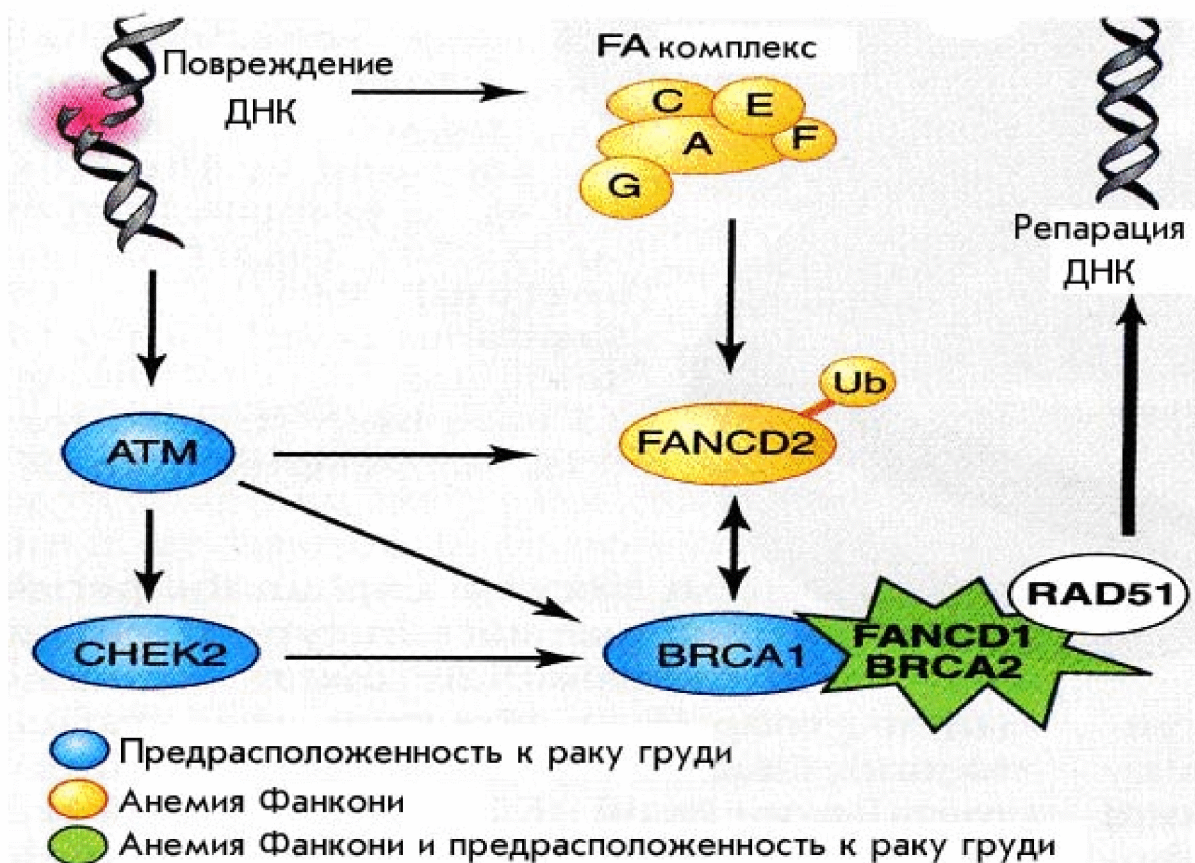


Рисунок 31. Взаимодействие белков, вовлеченных в развитие анемии Фанкони.

Ранее было описано 8 групп комплементации FA, но как и при AT их число изменилось. Описанная ранее как редкая группа комплементации FAD1 оказалась результатом гомозиготной мутации гена BRCA2, приводящей к синтезу этого белка без крайнего участка С-конца. Эта группа больных характеризуется не только симптомами FA, но и высоким риском возникновения рака молочной железы, что отличает ее от типичных случаев. Другие гены (A, C, D2, E, F, G,) тоже клонированы. Все они вместе способны образовывать единый ядерный комплекс и связываться с белком BRCA1, с которым обнаруживаются колокализованными в ядре. Вероятно, они участвуют в одном и том же сигнальном пути, активирующемся в ответ на образование поперечных ДНК-сшивок и остановку репликации. Существуют данные еще о двух группах комплементации – связанной с X-хромосомой FAB и еще одном вероятном участнике того же самого общего ядерного комплекса FAL

(именно этот белок представляется необходимым для убиквитинирования FAD2). Схематически все эти взаимодействия белков FA между собой представлены на рис. 31.

Димер FANCD2 напрямую фосфорелируется белком ATM, и это необходимая составляющая чек-пойнта S-фазы в клеточном ответе на ионизирующее облучение. Нормальное функционирование белков FA необходимо для сохранения хромосомной стабильности в течение S- и G2-фаз клеточного цикла. Для осуществления этой функции, необходимо моноубиквитинирование белка FAD2 по лизину-561, которое осуществляется комплексом белков BRCA1/BARD1 при обязательном участии общего ядерного комплекса всех остальных FA-белков. Схема процесса показана на рис. 32.

На рис. 32 показано, что шаги а-е важны для обнаружения ДНК-повреждений и активации чекпойнт-ответа. Репарация повреждений, останавливающих репликацию (о которой мы будем подробнее говорить позже) может осуществляться с помощью рекомбинации без ошибок (ж) или с помощью синтеза на поврежденной матрице, который может сопровождаться мутациями (з). Вероятно, фосфорелирование или убиквитинирование белка FAD2 может быть важным для выбора между этими путями репарации.

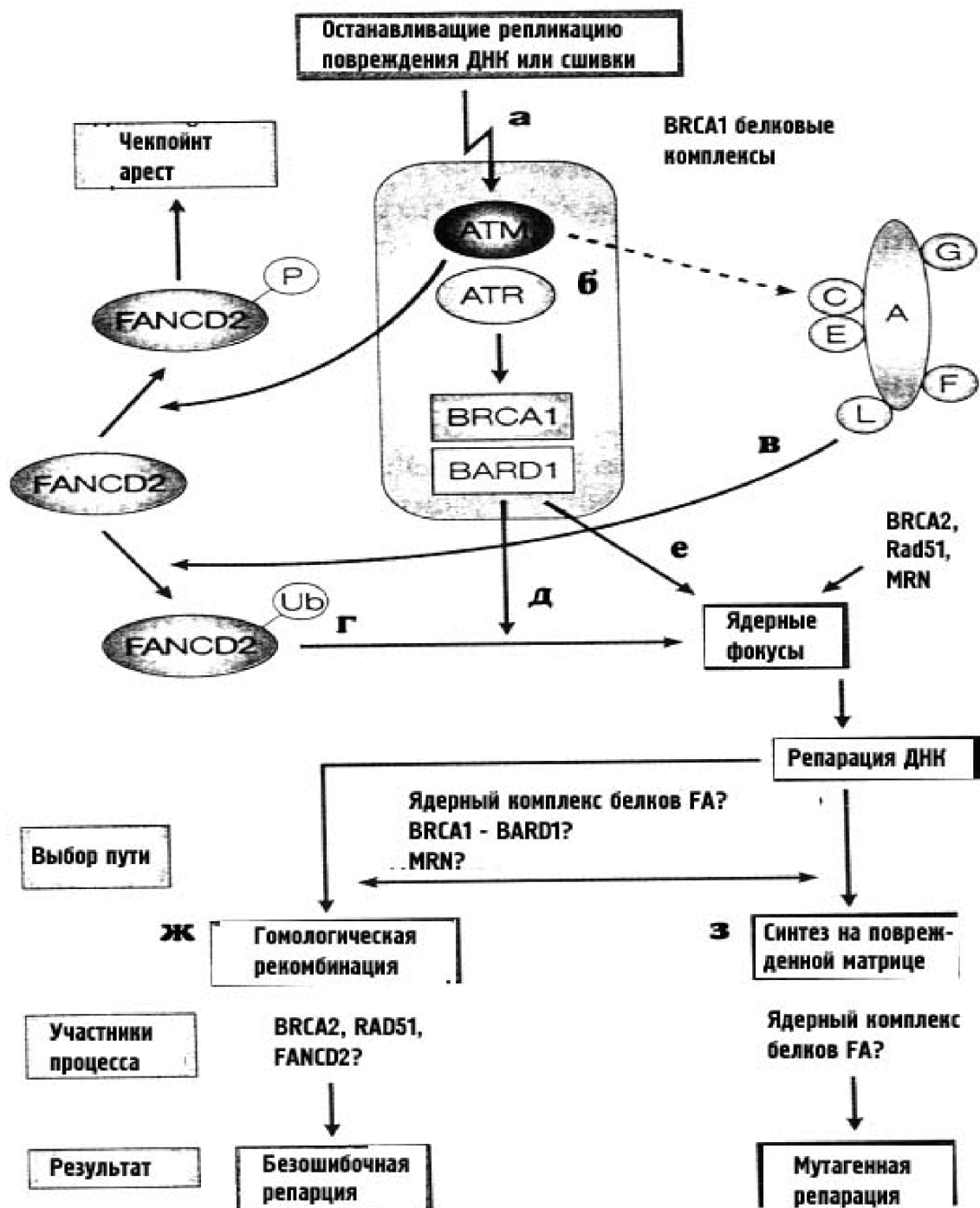


Рисунок 32. Роль белков анемии Фанкони в сохранении клеткой хромосомной стабильности

10.1. Защитники генома. Белок P53.

Многократно упоминаемый ранее белок Р53 играет большую роль в репарации двунитевых разрывов и может влиять на выбор пути репарации между ННН и ННН. Многофакторная роль белка Р53 в репарации, контроле клеточного цикла и апоптозе делает крайне сложным выделение именно роли в репарации DSBs. Было показано, что Р53 способен связываться как с однонитевой так и с двунитевой ДНК в том месте, где происходит нуклеазная 3'-5' расчистка и способствует отжигу гомологов. Так же он способен связываться с мисмэтчами и трехнитевыми структурами, а также с холлидеевскими структурами, способствуя их разрешению. При этом он связывается с комплексами BRCA2 с WRN и BLM, регулируя геликазные активности WRN и BLM.

Как уже говорилось, в условиях нормального функционирования в клетке содержание и активность р53 невелики. Хотя в некоторых типах клеток содержание р53 и может быть заметным, он находится в неактивной латентной форме. Латентная форма р53 лишена способности активировать транскрипцию р53-респонсивных генов. Это не означает, однако, что, находясь в латентной форме, р53 полностью лишен какой-либо активности. Возможно, в такой форме он играет какую-то роль именно в процессах репарации ДНК. В частности, было обнаружено, что латентная форма р53, лишенная способности связываться с ДНК, может узнавать участки одноцепочечной ДНК, неспаренные основания, а также имеет повышенную 3'-5'-экзонуклеазную активность. Напротив, активированная форма р53 утрачивает экзонуклеазную активность, но приобретает способность связываться с ДНК.

Активация гена р53 происходит под действием повреждения ДНК. При этом, несмотря на то, что в регуляторной области промотора гена р53 имеются участки связывания некоторых транскрипционных факторов, изменения транскрипции самого гена р53 происходят редко. Существенная активация гена р53 на транскрипционном уровне известна только для ранних эмбрионов, а также для недифференцированных эмбриональных тератокарцином, где уровень мРНК р53 повышен на порядок по сравнению с клетками взрослого организма.

Накопление p53 в ответ на стрессы происходит даже в присутствии ингибиторов синтеза РНК и белка, что говорит о его послетрансляционном характере. При этом происходит значительная стабилизация p53.

Кроме количественного накопления p53 происходят также глубокие качественные изменения белковой молекулы, сопровождающиеся ее переходом от латентного в функционально-активное состояние. Эти изменения происходят за счет фосфорилирования, дефосфорилирования, ацетилирования, метилирования и гликозилирования различных участков белковой молекулы, а также за счет образования ковалентных и нековалентных комплексов с другими белками. Многообразие участков модификации и факторов, взаимодействующих с p53, обеспечивает тонкую регуляцию его активности. Активация p53 не является необратимой, поскольку имеются механизмы обратной связи, позволяющие вернуть p53 в менее активное или латентное состояние после преодоления дефектов и сбоев в работе клетки.

Основное фосфорелирование белка P53 по серину в 15 положении проводит белок ATM. Вероятно, в этом процессе каким-то образом участвует и белок BARD1, способствуя этой стабилизации.

Для функционирования p53 как фактора транскрипции требуется его взаимодействие с ДНК. Модификация С-концевой части молекулы, индуцируемая разнообразными стрессовыми механизмами, сопровождается конформационной перестройкой и приобретением белком способности связываться с ДНК. Но для начала транскрипции требуется сложное взаимодействие N-концевой транскрипционно-активаторной части p53 с компонентами транскрипционного аппарата - белками комплекса TFIID - TBP (TATA-Box Binding Protein) и TBP-ассоциированными факторами TAFII. Небольшой гидрофобный участок p53 вокруг Leu-22 и Trp-23 отвечает за взаимодействие сразу с несколькими белками транскрипционного аппарата. Кроме того, для активации специфических промоторов в комплексе с TFIID должны присутствовать транскрипционные коактиваторы - CREB-binding protein (CBP) и близкородственный ему белок p300. p300/CBP обладает гистон-ацетил-трансферазной активностью. Ацетилирование гистонов играет

144

важную роль в модуляции структуры хроматина при активации транскрипции, увеличивая доступность хроматина для транскрипционного аппарата. р300/CBP способен напрямую взаимодействовать с комплексом РНК-полимеразы II и таким образом служить проводником, обеспечивающим инициацию транскрипции в ответ на связывание транскрипционного фактора. N-Концевой трансактивационный домен р53 также взаимодействует с р300/CBP.

Некоторые сигналы, например, γ -излучение, приводят к стабилизации белка Р53 с одновременным увеличением уровня белка Р53 в устойчивом состоянии. В клетках больных АТ нарушен путь регуляции «сверху» этого процесса (нет фосфорелирования белка Р53 протеинкиназой АТМ), что приводит к отсутствию стабилизации Р53 и остановки клеточного роста в ответ на радиационные повреждения ДНК. В негативном пути регуляции повышение уровня Р53 приводит через взаимодействие с ТВР к супрессии транскрипции генов, усиливающих рост клеток, что ведет к ингибированию пролиферации. Мутантный Р53 не может супрессировать транскрипцию и таким образом ингибировать экспрессию генов, отвечающих за клеточный рост, которые поддерживают пролиферацию. В позитивном регуляторном пути повышение уровня белка Р53 дикого типа приводит к стимуляции транскрипции генов, которые вовлечены в процессы репарации ДНК и тех, которые негативно регулируют клеточный рост, что приводит к остановке клеточного цикла в фазе G1.

На рис. 33 изображено, как именно может работать Р53 в качестве антионкогена.

Продукт гена *mdm2* является клеточным регулятором функций Р53 дикого типа и находится под его положительным контролем. Возрастание уровня MDM2 действует по принципу отрицательной обратной связи на возросший уровень Р53 в системе авторегуляции этого белка, которая при вовлечении белка Р53 в комплекс с MDM2 способна снять блок с продвижения клетки по циклу. Увеличение экспрессии MDM2 из-за разрегулирования экспрессии или в результате амплификации может приводить к опухолеобразованию. К тому же многие продукты ДНК онковирусов, например полноразмерный антиген вируса SV-40, 55кД белок аденовируса E1B и продукт гена папилломы человека E6 ингибируют

трансактивацию белка Р53 дикого типа и, блокируя таким образом функции Р53, могут частично способствовать канцерогенезу. Другие сигналы также могут влиять на клеточный рост и опухолеобразование через посредство Р53 дикого типа. Например, продукт гена аденовирус Е1А индуцирует апоптоз в клетках с Р53 дикого типа. Ингибирование активности Р53 с помощью котрансфекции Е1А и Е1В запрещает апоптоз и способствует трансформации. И, наконец, неправильные ДНК-интермедиаты и структуры могут повысить уровень Р53 дикого типа и привести к апоптозу, убирающему поврежденные клетки, или остановке клеточного роста, если ДНК не может быть отрепарирована.

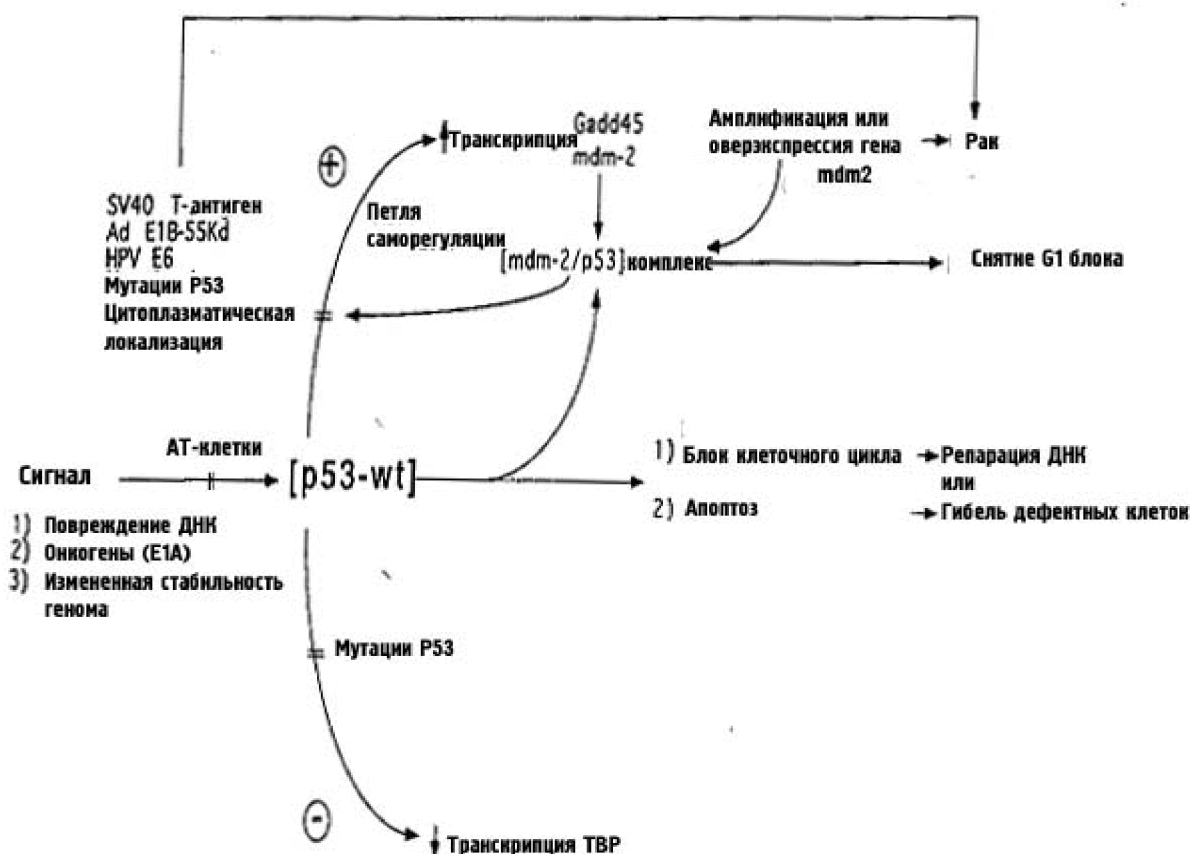


Рисунок 33. Схема работы белка Р53.

Эти механизмы действуют как защитники генома и противостоят преобразованию нормальных клеток в опухолевые. Потеря функции Р53

дикого типа в результате мутаций, образования комплексов с продуктами онкогенных вирусов или с клеточными негативными регуляторами, или изменения его внутриклеточной локализации приводит к утере защитных свойств и способствует развитию онкологических заболеваний. Вероятно, P53 способен также контролировать RAD51-зависимую гомологичную рекомбинацию, которая может быть одной из причин возникновения хромосомных перестроек в ходе развития опухоли. К настоящему времени сложилось представление, что белки BRCA1, BRCA2 и P53 являются составляющими единого репарационного ядерного комплекса, а различные белок-белковые взаимодействия связаны с регуляцией активности этого комплекса.

Наличие наследственного гетерозиготного носительства мутаций, инактивирующих P53 приводят к развитию синдрома Ли-Фромени, характеризующегося семейными формами рака различной этиологии.

10.2. Защитники генома. Роль PARP в репарации

Важную роль в регуляции репарации ДНК играют белки семейства PARP – полимеразы поли-АДФ-рибозы. Эти белки, ассоциированные с хроматином способны к модификации многих белков путем их поли-АДФ-рибозилирования. Во время этого процесса PARP использует энергию НАД⁺ для катализа образования длинных негативно заряженных нитей поли-АДФ-рибозы, линейной или ветвистой структуры, длиной в 200-400 миномеров. Разложение этого полимера происходит под воздействием специальной гликогидролазы (PARG), и приводит к образованию моно-АДФ-рибозилированного белка и моно-АДФ-рибозы. К настоящему времени описаны 6 различных PARP, содержащих консервативный каталитический домен, ответственный за синтез поли-АДФ-рибозы. PARP-1 играет большую роль в репарации ДНК, а роль PARP-2, ν PARP, танкиразы 1 и 2, а также Ti PARP досих пор полностью не определена. Кроме участия в регуляции процессов репарации, PARP-1 вносит вклад и в долгожительство млекопитающих. Считается, что она принимает участие в переключении клеточных программ между апоптозом и некрозом. PARP-1 имеет молекулярный вес 113 кД и состоит из трех различных доменов – N-концевой ДНК-связывающий домен с двумя цинковыми пальцами, C-

концевой домен, который содержит каталитическую субъединицу для связывания НАД⁺, и центральный домен, работающий как акцепторный сайт для поли-АДФ-рибозы. При появлении повреждений ДНК, вызванных ионизирующей радиацией или алкилирующими агентами, PARP-1 специфически связывается с одонитевыми разрывами ДНК, что и приводит к ее авто-поли-АДФ-рибозилированию и нековалентному взаимодействию с другими белками. PARP-1 и, вероятно, PARP-2 могут быть вовлечены в репарацию ДНК тремя путями, которые изображены на рис. 34 и перечислены ниже:

1. Измененная PARP-1 способна напрямую взаимодействовать с XRCC1 и pol β , играющими ключевую роль в BER. PARP-2 также может связываться с этими белками и лигазой III. При стимуляции *in vitro* PARP-1 связывается также с нуклеазой FEN-1 и участвует в изменении репарационного синтеза при BER длинными фрагментами. Клетки мышей, дефектных по гену PARP-1 характеризуются повышенной чувствительностью к алкилирующим агентам (например, метил-метан-сульфонату -MMS), сниженным уровнем воссоединения разрывов ДНК и повышенным апоптозом.

2. PARP-1 принимает участие в ремоделировании хроматина под действием повреждений ДНК. Было показано, что автоизмененная PARP-1 взаимодействует с 20S протеасомой через длинный полимер АДФ-рибозы, что повышает протеолитическую активность 20S-протеосомы и активирует ее способность деградировать поврежденные окисленные гистоны, причем самый высокий уровень деградации характерен для гистона H1 (поврежденный H1 полностью убирается из хроматина за 30 минут). Деградация гистонов ведет к структурному ремоделированию хроматина, позволяя ферментам, вовлеченным в репарацию ДНК, достичь сайта повреждения.

3. У целого ряда белков, вовлеченных в репарацию ДНК и чекпойнт-ответ на повреждения ДНК, обнаружен специфический мотив для связывания с поли-АДФ-рибозой. Это P53, P21, XPA, MSH6, XRCC1, лигаза III, DNA-PKcs, Ku70, NF-kB, Pol ϵ , индуцибельная NO₂-синтетаза, активируемая каспазами ДНКазы, теломераза. Полирибозилируя этот мотив, PARP-1

потенциально может влиять на различные функции этих белков, такие как регуляция транскрипции, репарации ДНК, клеточного цикла и апоптоза.

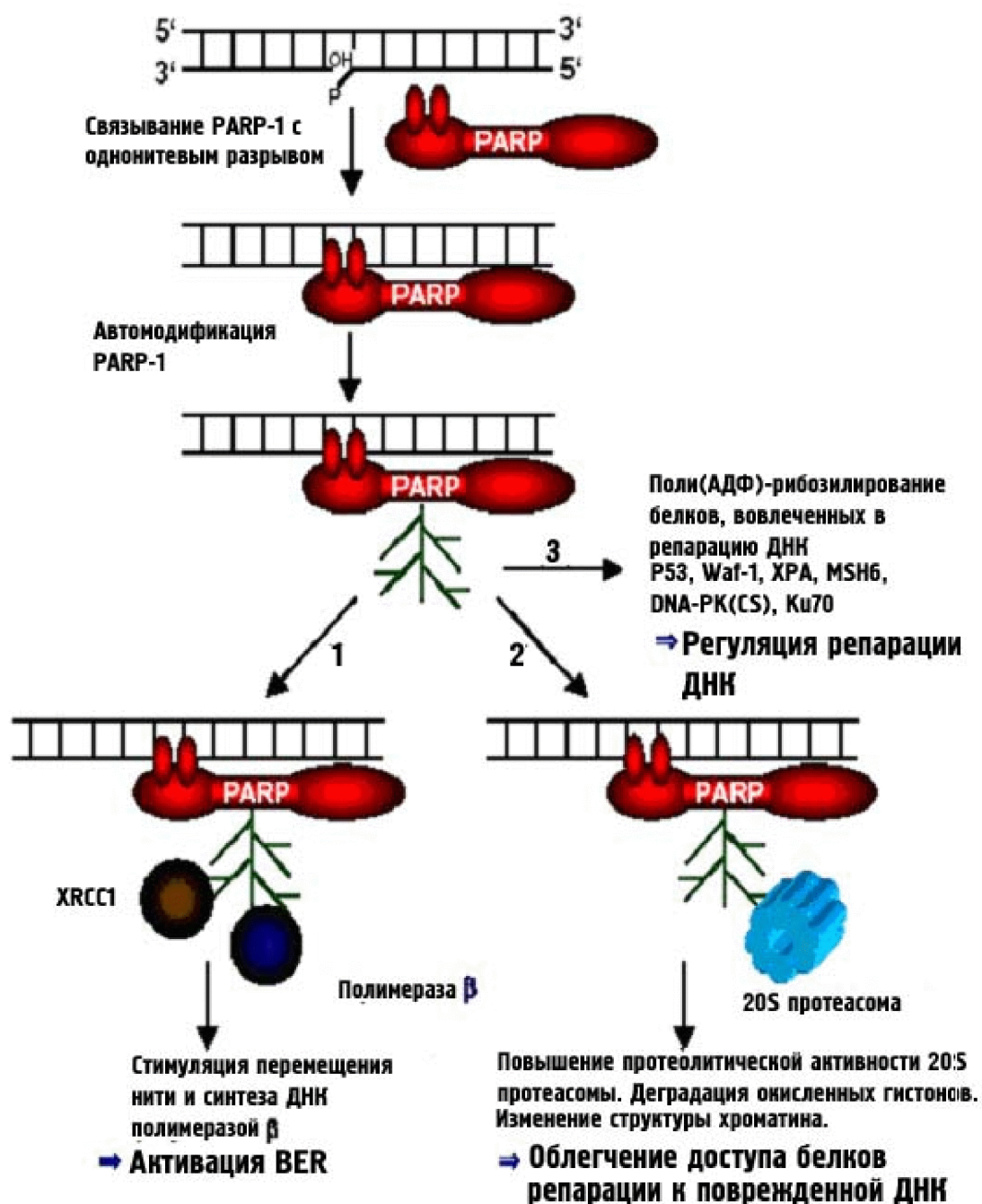


Рисунок 34. Вовлечение в репарацию белков PARP. Пояснения в тексте

Таким образом, роль белков PARP шире, чем просто защита ДНК млекопитающих от рекомбинации по повторам, о которой мы говорили раньше.

10.3. Белки, комплементирующие чувствительность клеток грызунов к ионизирующей радиации

Как и в случае чувствительности к УФ-облучению, так и при изучении ответа клетки на γ -облучение, были получены многочисленные мутанты клеток грызунов, чувствительные к действию данного повреждающего агента. Белки человека, способные комплементировать эту чувствительность, получили название XRCC (X-ray sensitivity cross complementing). Впоследствии многие из них (как и белки NER – ERCC) изменили свое название в связи с подробным описанием молекулярного дефекта в этих клеточных линиях. Сводные данные об их названиях и функциях приведены в табл. 6.

В настоящее время функциональный анализ генов XRCC продолжает вносить свой вклад в понимание процессов репарации двунитевых разрывов ДНК у человека и механизмов генетической нестабильности, приводящей к раку. Новые данные позволяют ответить на давно существующие вопросы о том, как разрешаются промежуточные структуры при гомологической рекомбинации и как замедляется репликация ДНК при наличии повреждений, то есть как осуществляется чекпойнт S-фазы. Проверка функций XRCC генов в процессе нехомологического воссоединения концов показала их парадоксальную роль в точности репарации и поддержании теломер. Так, XRCC-5-7 (теперь эти белки обычно называют Ku70, Ku80, DNA-PKcs) зависимое нехомологическое воссоединение концов обычно происходит с высокой точностью, так как концы аккуратно выравниваются при отсутствии микрогомологии в последовательностях. В тоже время активность, связанная с нехомологическим воссоединением концов вовлечена и в уменьшение и в опосредование слияния теломер. Таким образом нарушение нехомологического воссоединения концов может приводить к

150

удлинению теломер, а нарушение гомологической рекомбинации к их укорочению.

Ген	Путь репарации	Активность
XRCC1	BER	Образует гетеродимер с лигазой III
XRCC2	HRR	Образует гетеродимер с RAD51D, который способен связаться с RAD51B и RAD51C
XRCC3	HRR	Резольвазная активность, связывается с RAD51D
RAD51L1/RAD51B	HRR	
RAD51L2/RAD51C	HRR	
RAD51L3/RAD51D	HRR	Напрямую связывается с геликазой BLM
XRCC11/BRCA2/FAD1	HRR	Напрямую взаимодействует с RAD51
XRCC9/FAG	HRR?	Входит в комплекс генов FA, напрямую взаимодействует с BRCA2
XRCC4	NHEJ	Взаимодействует с лигазой IV
XRCC5/Ku80	NHEJ	Гетеродимер с Ku70, связывание концов ДНК
XRCC6/Ku70	NHEJ	Гетеродимер с Ku80, связывание концов ДНК
XRCC7/DNA-PKcs	NHEJ	Каталитическая субъединица, образующая активную протеинкиназу с гетеродимером Ku
XRCC8, XRCC10	??	

Таблица 6. Гены XRCC.

Правильное функционирование XRCC генов, вовлеченных в оба процесса необходимо для генетической стабильности, но потеря этих

путей приводит к разным последствиям, причем дополнительные дефекты гомологической рекомбинации более серьезны – они вызывают нарушение митоза и анеуплоидию. Это приводит к возникновению рака и/или усилению опухолевой прогрессии, но с некоторыми различиями – при нарушениях нехомологического воссоединения концов преимущественно возникают опухоли лимфоидной ткани, а при нарушениях в процессах гомологической рекомбинации – опухоли груди и яичников.

В организме человека существует множество процессов, в которых участвуют белки репарации двунитевых разрывов. Приведем два примера:

11. V(D)J рекомбинация

V(D)J рекомбинация опосредуется специальным белковым комплексом, который называется V(D)J-рекомбиназой. В него входят ряд белков, одновременно вовлеченных в репарацию двунитевых разрывов ДНК и два специфических белка Rag1 и Rag2, которые вносят двунитевые разрывы в ДНК и остаются связанными с этими концами вплоть до их воссоединения, которое опосредуется как самими белками Rag, так и другими белками репарационного комплекса. В этом процессе теряется часть последовательностей, а несколько нуклеотидов, напротив, может быть случайно вставлено. Это приводит к тому, что обычно два из трех вновь образованных гена непродуктивны, но это вполне разумная плата за повышенную вариабельность. В-клетки, которые производят антитела прочно связавшиеся с антигеном способны в костном мозге пройти еще один раунд активации Rag-генов и V(D)J рекомбинации, что меняет рецептор на поверхности клетки и приводит к процессу, называемому «редактированием рецепторов».

В и Т лимфоциты распознают антигены благодаря специальной системе рецепторов (иммуноглобулины и рецепторы Т-клеток соответственно), которые имеют распознающие антиген районы, состоящие из variable (V), diversity (D) b joining (J) сегментов генов, образующихся в процессе V(D)J-рекомбинации. Собственно само объединение V,D,J сегментов требует участия белков Rag и факторов, участвующих нехомологическом воссоединении концов (NHEJ): DNA-PK, XRCC4, ligIV, Artemis.

12. Перемещение мобильного элемента Sleeping Beauty

Хорошим примером негомологической рекомбинации может служить мобильный элемент Sleeping Beauty (SB), который перемещается по геному с помощью различных факторов, вовлеченных в процессы репарации ДНК, как это показано на рис. 35. Для эффективной транспозиции необходимы факторы NHEJ (системы негомологического воссоединения концов ДНК): Ku, DNA-PK, Xrcc4 и HR (гомологической рекомбинации): Xrcc3/Rad52C. Artemis также необходим для этого процесса, он расщепляет ДНК-шпильки в сайтах эксцизии. Ku физически взаимодействует с транспозазой, а DNA-PK является фактором, критичным для транспозиции. И, в отличие от процессов репарации, не использует свои киназные активности. ATM вовлечена в репарацию сайта эксцизии и увеличивает уровень транспозиции. Таким образом, одни и те же белки участвуют в различных, но механистически сходных процессах, таких как транспозиция, рекомбинация, репарация и V(D)J рекомбинация.

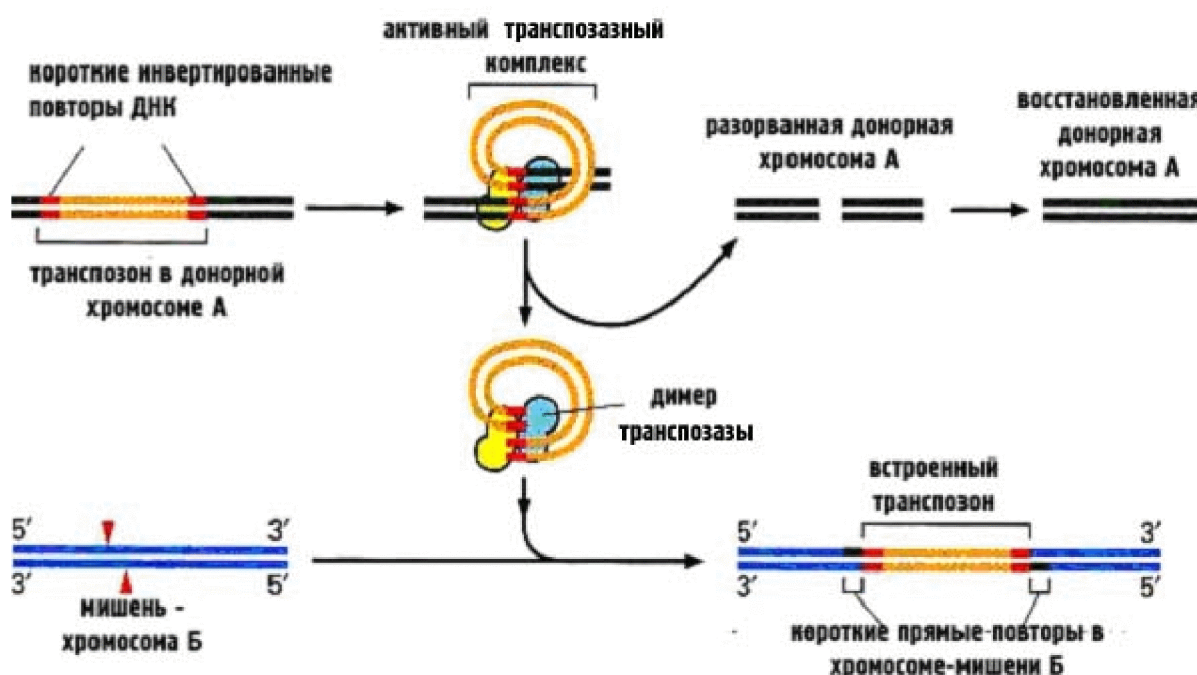


Рисунок 35. Транспозиция мобильного элемента путем негомологической рекомбинации.

13. Пострепликативная репарация.

Пострепликативной, как это следует из названия, принято называть репарацию, которая происходит в клетке после завершения процессов репликации. Очевидно, что это может быть не один, а несколько независимых процессов, происходящих в одно и то же время клеточного цикла. Естественно, что все эти процессы были открыты не одновременно, и долгое время под названием «пострепликативная репарация» подразумевался только процесс гомологической рекомбинации, инициируемый одонитевыми брешами, образовавшимися напротив неотрепарированных пиримидиновых димеров. С этого процесса мы и начнем изучение пострепликативной репарации ДНК.

13.1. Пострепликативная, или рекомбинационная, репарация.

В 1968 году американцы У. Рапп и П. Ховард-Фландерс исследовали облученные УФ-светом бактерии, у которых был нарушен синтез эндонуклаз, участвующих в эксцизионной репарации нуклеотидов. Опыты проводили в темноте для того, чтобы не мог осуществиться и процесс фотореактивации. Таким образом, после УФ-облучения в ДНК этих клеток оказывалось много невырезанных перимидиновых димеров. В тот момент, когда ДНК-полимераза, ведущая репликацию, доходила до первого из них, она на 10 секунд застывала на месте. Этот обнаруженный Раппом и Ховардом-Фландерсом факт задержки синтеза был неоднократно подтвержден другими исследователями. Необходимо сознавать, что задержка на 10 секунд весьма значительна, так как репликация у кишечной палочки идет со скоростью 1000 нуклеотидов в секунду. Затем ДНК полимераза каким-то образом ухитрялась перебраться за пиримидиновый димер и возобновить синтез позади повреждения. Тоже самое повторялось и перед следующим димером. Известно, что репликацию ДНК у *E.coli* осуществляет специальный комплекс из нескольких десятков белков. Каким образом весь этот белковый комплекс может перебраться через повреждение и возобновить реакцию репликации без помощи затравки (короткого участка РНК, без которого синтез ДНК

154

невозможен) до сих пор до конца не ясно. В результате такого перемещения ДНК-полимеразного комплекса и последующего ресинтеза формируется дочерняя ДНК с бреши, то есть участок дочерней нити, иногда длиной в несколько генов, оказывается неудоенным, причем в родительской нити напротив бреши так и остается нерепарированное повреждение ДНК.



Рисунок 36. Пострепликативная репарация у *E. coli*.

Такая ситуация может привести клетку к гибели, и чтобы этого избежать, в клетке включается специальный механизм, основанный на рекомбинации, в процессе которой белок RecA ведет гомологичное спаривание нитей. Из изначально свободной от дефектов комплементарной нити матричной ДНК, на которой процесс репликация ДНК был правильно завершен, вырезается участок ДНК, равный по длине участку бреши, и встраивается в брешь. Затем лигазы соединяют концы вставленного фрагмента с концами нормально синтезированного участка дочерней нити. После этого другие ферменты репарации устраняют дефект в исходно поврежденной нити. Одновременно брешь, оставшаяся после вырезания участка из родительской нити, застраивается ДНК полимеразой I. Эта модель, представленная на рис. 36, как мы уже говорили, описывает только один из механизмов пострепликативной репарации.

У эукариот процесс пострепликативной репарации существенно сложнее, причем репаративные реакции могут идти различными путями, один из которых приводит к появлению мутаций (является мутагенным) и, вероятно, связан с ДНК-полимеразами, способными вести синтез на поврежденной матрице. Этот механизм еще иногда называют «проходом» повреждения. В то же время накопленные экспериментальные данные показывают, что существует и механизм зашивания брешей без ошибок, причем преимущественным механизмом является безошибочный обход повреждения.

Очевидно, что есть момент «решения», каким именно путем будет идти пострепликативная репарация.

К настоящему времени сложилось представление, что ключевую роль в процессах пострепликативной репарации и выборе того или иного ее пути у эукариот играет убиквитинирование вовлеченных белков. Поэтому нам кажется необходимым сделать здесь небольшое отступление.

13.2. Убиквитин и убиквитин-связывающие белки.

Убиквитин – это крайне консервативный белок, состоящий из 76 аминокислотных остатков и обнаруженный во всех клетках. Он является основным кофактором АТФ-зависимой деградации белков.

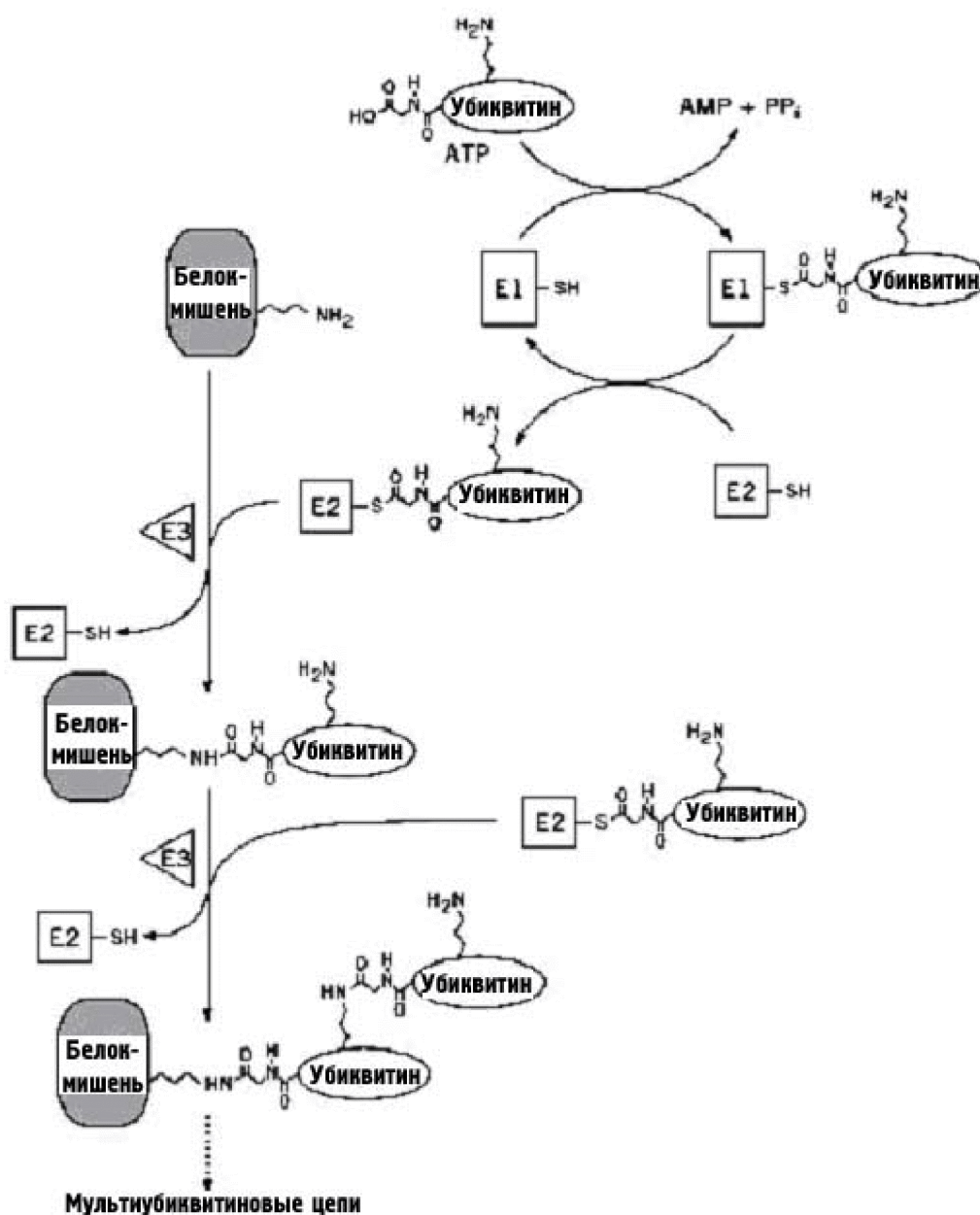


Рисунок 37. Убиквитинирование белков.

При активации убиквитина его С-концевые лизины могут связаться с субстратом. Это происходит путем ковалентного связывания через ϵ -NH₂ группу лизина белка-субстрата, таким образом, что у большинства связанных с убиквитином белков С-конец одного убиквитина связывается с Lys48 следующего, образуя мультиубиквитиновые цепи. Белки,

претерпевающие подобное убиквитинирование, преимущественно проходят деградацию в составе 26S протеосом. Полиубиквитиновые цепи разбираются на отдельные молекулы собственными концевыми гидролазами. Эти ферменты образуют большое семейство и их роль до конца не ясна.

Белки, связанные с убиквитином, можно разделить на три основные группы: активирующие (E1), переносящие (связывающие) (E2) и убиквитин-лигазы (E3). Количество белков в каждой группе различно у разных видов. Например, у человека только один белок E1, около 15 белков E2, а E3 – множество, причем самой разной структуры.

E2-белки содержат 16кД домен, лизины которого способны связывать и переносить убиквитин на белки-субстраты. Сам перенос осуществляется убиквитин-лигазами E3. Большинство из E3 способны к образованию длинных убиквитиновых цепей, скорее всего, в комплексе с E2 или друг с другом. Интересны несколько классов этих белков. Во-первых, это НЕСТ-домен-содержащие белки (НЕСТ-домен гомолог С-концевого домена онкогена E6-АР, участвующего в деградации Р53 при вирусном заражении), которые важны для разворота РНК-полимеразы, а также участвуют в регуляции клеточного цикла и мембранных натриевых каналов. Другая группа E3 – это белки APC (anaphase-promoting complex). Еще одна убиквитин-лигаза SCF участвует в регуляции клеточного цикла совместно со специфической E2 – Cdc34. Схема взаимодействия белков в процессе убиквитинирования показана на рис. 37. Гомологом убиквитина является белок SUMO, причем эта гомология затрагивает прежде всего четвертичную структуру, а не просто аминокислотную последовательность (там гомология всего около 20%). Этот белок содержит такой же глициновый С-конец и способен связываться с субстратом по тому же принципу, что и убиквитин. SUMO взаимодействует с ядерным поровым комплексом, и связывание с ним белков-субстратов способствует их белковому импорту-экспорту из ядра, а не деградации.

Вероятно, главная роль убиквитина и подобных ему белков состоит в «мечении» белков-субстратов и решения их дальнейшей судьбы, что играет ключевую роль во многих клеточных процессах.

13.3. Rad6-зависимая пострепликативная репарация.

Процесс пострепликативной репарации (PRR, post replication repair) у дрожжей называется еще Rad6-зависимой репарацией, так как была обнаружена группа белков, эпистатически связанных с Rad6 и вовлеченных в этот процесс. Rad6-зависимый путь PRR является эволюционно консервативным: у *E.coli* гомолог Rad6 вовлечен в процесс ресинтеза (рестарта репликации) при SOS-ответе, гомологи найдены у *S.pombe* и мыши, причем участвуют в сходных процессах обхода повреждения. Rad6-зависимый путь контролируется белками Rad6 и Rad18, образующими гетеродимер, способный к связыванию с ДНК и обладающий убиквитин-связывающей активностью.

Гетеродимер Rad6/Rad18 и белок Rad5 необходимы для одного из путей пострепликативной репарации. Rad6 является классическим E2-убиквитин-связывающим ферментом, образующим множество убиквитиновых цепей через связывание лизином в 48 положении. Rad18 является ДНК-связывающим белком с убиквитин-лигазной активностью. Комплекс Ubc13/Mms2 также является E2-убиквитин-связывающим ферментом, но формирует убиквитиновые цепи через лизин в 63 положении. Rad5 является ДНК-связывающим белком, который привлекает комплекс Ubc13/Mms2 к ДНК, а также служит связующим звеном между комплексами Ubc13/Mms2 и Rad6/Rad18. Функции этих белков пока точно не определены, но их гомологи существуют и у млекопитающих. Rad6 имеет два гомолога в клетках человека, с которыми взаимодействует человеческий гомолог Rad18 (hRad18). Участие самого hRad18 в пострепликативной репарации доказано. Ген Mms2 считается частью безошибочного пути PRR, контролируемого Rad6, его продукт способен образовывать прочный комплекс с белком Ubc13, который в свою очередь способен к альтернативному убиквитинированию лизина в 63 положении.

Белок Rad18 обладает способностью связываться с одонитевой ДНК, таким образом комплекс Rad6/Rad18 способен связаться с остановившейся вилкой репликации, так как там имеется одонитевой «хвост». При этом Rad6 может убиквитинировать белки остановившегося комплекса репликации.

Мутагенный путь пострепликативной репарации основан на способности полимераз семейства γ вести синтез на поврежденной матрице. Это процесс аналогичный SOS-репарации у прокариот. Вероятнее всего, убиквитинирование процессивной ДНК-полимеразы δ необходимо для ее деградации или перемещения, позволяющего полимеразам γ -семейства занять ее место и провести синтез на поврежденной матрице.

Безошибочный путь пострепликативной репарации состоит из одного из вариантов синтеза на поврежденной матрице (Rad30-зависимого) и путей обхода повреждений, для которых необходимы белки Rad5, Mms2, Ubc13, Srs2, а также ДНК-полимераза- δ , PCNA и некоторые белки гомологической рекомбинации. Схема этого процесса предложена на рис. 38.

О низкопроцессивных ДНК-полимеразах эукариот, участвующих в процессе «прохода» повреждению, мы уже подробно говорили при изучении SOS-ответа у *E.coli*.

Rad5 является членом семейства SWI/SNF, как и CSA, обладая АТФазной активностью. Он может способствовать ремоделированию хроматина и помогать белкам репарации подойти к ДНК, а также участвовать в переключении матрицы при остановке вилки репликации. Это делает его одним из главных игроков.

PCNA может быть моноубиквитинирован Rad6 и Rad18, полиубиквитинирован Rad6, Rad18, Rad5, Mms2, Ubc13, и «сумоирован» Ubc9, что играет важную роль в выборе субпути Rad6-зависимой PRR. Таким образом различные модификации PCNA могут определять тот тип репарации, который будет использован при ресинтезе (рестарте репликации). Связаны ли модификации PCNA с внутри S-фазными чекпойнт-функциями не ясно.

Ген Srs2 является гомологом ДНК-геликазы UvrD *E.coli* и проявляет антирекомбинационную активность, антагонистическую активности Rad51 – то есть он способен разрушать его активные филаменты. Интересно, что Srs2 способен взаимодействовать с pol32 – субъединицей ДНК-полимеразы- δ . Во время чек-пойнт ответа на повреждение ДНК Srs2 может быть фосфорелирован Mec1 и Rad53 –киназами. Именно этот белок может быть мишенью чек-пойнт-киназ в комплексе белков остановившейся вилки

репликации внутри S-фазы. Вероятно, у него есть еще дополнительные функции вне PRR. В то же время Srs2, Mec1 и Rad5 могут кооперироваться в осуществлении независимого от рекомбинации Ресинтеза (рестарта репликации). Таким образом, выбор субпути может также зависеть от регуляции клеточного цикла – то есть от чекпойнт-ответа.

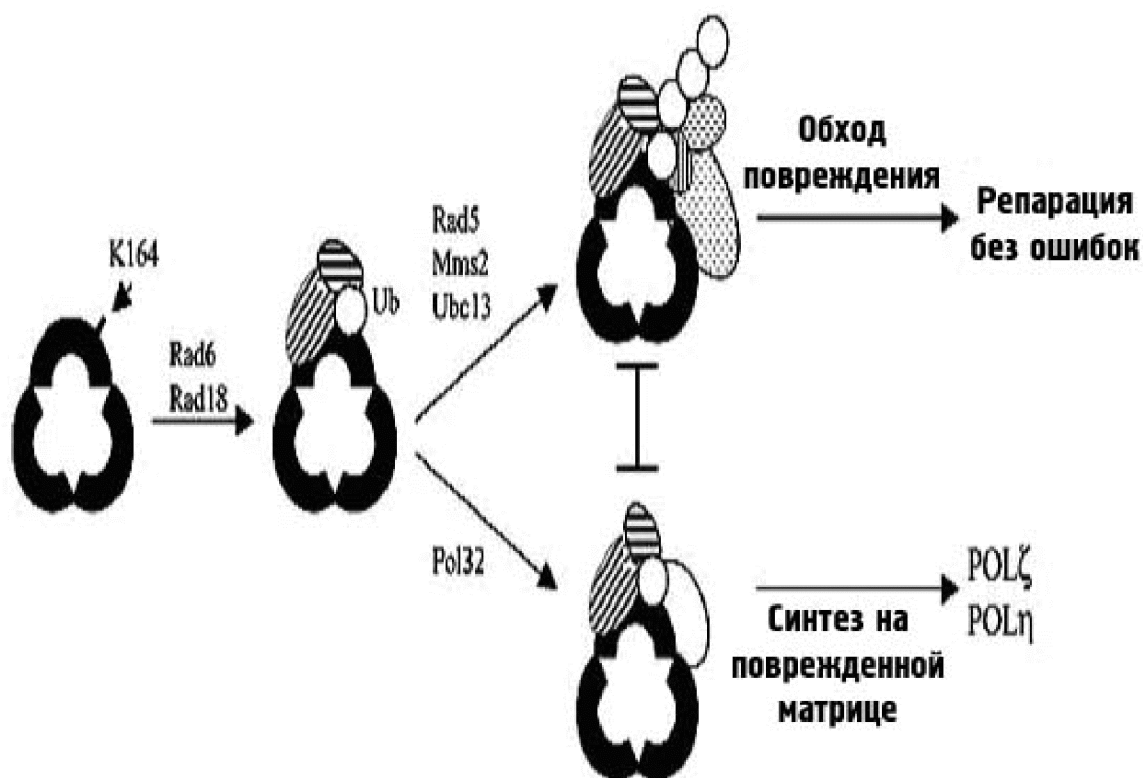


Рисунок 38. Два пути пострепликативной репарации у эукариот.

Возможно, что сам Rad51 является ингибитором однонитевого отжига по прямым повторам (вытесняя Rad52). Вероятно, Rad51-зависимую рекомбинацию можно считать репликацией, индуцированной разрывами. Мишенью для Rad51 могут служить не только однонитевые бреши, но и отожденные друг на друге вновь синтезированные сестринские хроматиды остановившейся вилки репликации, так как там есть двунитевые концы, или просто разрушающаяся вилка с двойными концами ДНК.

Роль чекпойнт-сигналов и привлечения факторов репарации в процессах пострепликативной репарации до конца неясно.

14. Репарации поврежденных вилок репликации и ресинтез

Для репарации поврежденных вилок репликации существенна рекомбинация, которая снижает уровень мутагенеза, связанного с «перескакивающими» полимеразы. Доказано существование репликации, зависящей от рекомбинации в таких случаях, как конъюгация и трансдукция у бактерий, а у эукариот при мейозе, поддержании стабильности теломер и немутагенной репарации репликативных вилок. Документально подтверждено существование ресинтеза (рестарта репликации), связанного с рекомбинацией. В УФ-облученных клетках пекарских дрожжей в районе остановившихся вилок репликации образуются Холлидеевские структуры, а в выживших клетках возрастала частота генной конверсии и межгенной митотической рекомбинации. Одновременно было показано, что мутанты Rad6, Rad18 и Rad52 дефектны по пострепликативной репарации. Мутантный фенотип Rad6 и Rad52 при этом полностью соответствуют мутантному фенотипу RecA у *E.coli*. Вероятно, Rad52 играет ведущую роль в самом процессе рекомбинации, а Rad6 участвует в нем только на уровне регуляции. Нужно помнить, что для возникновения видимой Холлидеевской структуры требуется только отжиг цепей и ничего больше.

Гетеродимер Rad6/Rad18 совершенно необходим для работы любой системы, способной успешно завершать репликацию поврежденной ДНК. Мутанты по обоим этим генам крайне УФ-чувствительны и неповрежденные новосинтезированные нити ДНК в них после УФ-облучения не образуются.

Специфическая для структуры Холлидея геликазная-эндонуклеазная активность, способствующая ее разрешению, связана с комплексами Rad1/XPF и Mus81-Mms4. Одновременно оба эти комплекса способны к распознаванию остановившейся вилки репликации (выглядеющей как вилка с «хвостом») и не проявляют сродства к обычным вилкам репликации. Вероятно, комплекс Mus81-Mms4 привлекается в район остановившейся

вилки репликации белками чекпойнт-ответа, а его эндонуклеазная активность может участвовать в процессах, направленных на продолжение репликации. Для этого предложено множество моделей.

Белок Mgs1 (WHIP) является еще одним из возможных участников специального субпути PRR. Это ДНК-независимая АТФаза, способная образовывать комплекс с ДНК-полимеразой- δ и геликазой Sgs1 (так же как человеческий WHIP с WRN), появляется в районе остановившейся репликативной вилки и способствует прохождению репликативным комплексом зоны повреждения.

14.1. Модель прохода повреждения с переключением матрицы.

Схематически эти модели изображены на рис. 39 и 40.

Первый способ, изображенный на рис. 39, основан на том, что при остановке вилки репликации перед повреждением на лидирующей нити, синтез на отстающей может продолжаться и приводить к появлению более длинного фрагмента вновь синтезируемой нити. Происходит разворот вилки с отжигом на сестринской хроматиде и продолжением синтеза лидирующей нити на вновь синтезированной отстающей. Как только лидирующая нить удлинится так, чтобы перекрыть остановившее продвижение вилки повреждение, вилка разворачивается обратно и матричные нити спариваются со вновь синтезированными. Таким образом синтез продолжается, а повреждение оказывается обойденным.

На рис. 40 показано, что этот процесс может проходить и несколько иначе. При остановке вилки репликации перед повреждением на лидирующей нити, синтез на отстающей может продолжаться и приводить к появлению более длинного фрагмента вновь синтезируемой нити.

Эта вновь синтезированная нить может спариться со вновь синтезированной ДНК на лидирующей нити, так что вновь образованная ДНК на лидирующей нити сможет обойти повреждение. После прохождения поврежденного участка восстанавливается нормальная структура вилки репликации.

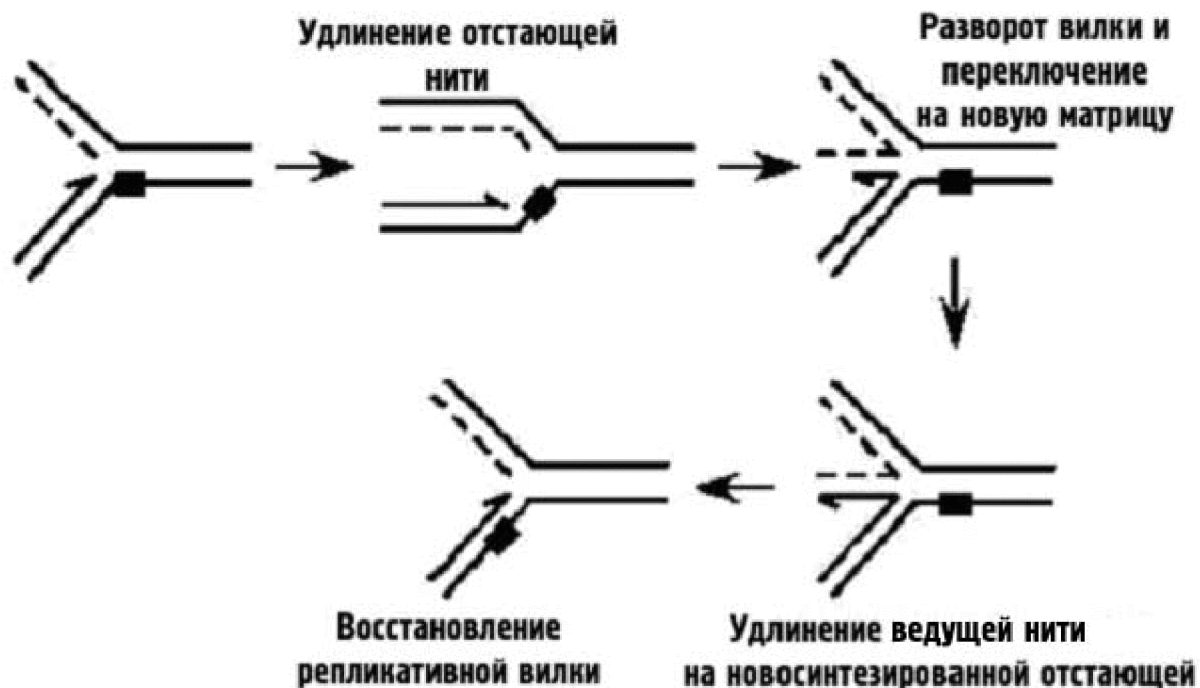


Рисунок 39. Модель обхода повреждения с восстановлением репликативной вилки (1).

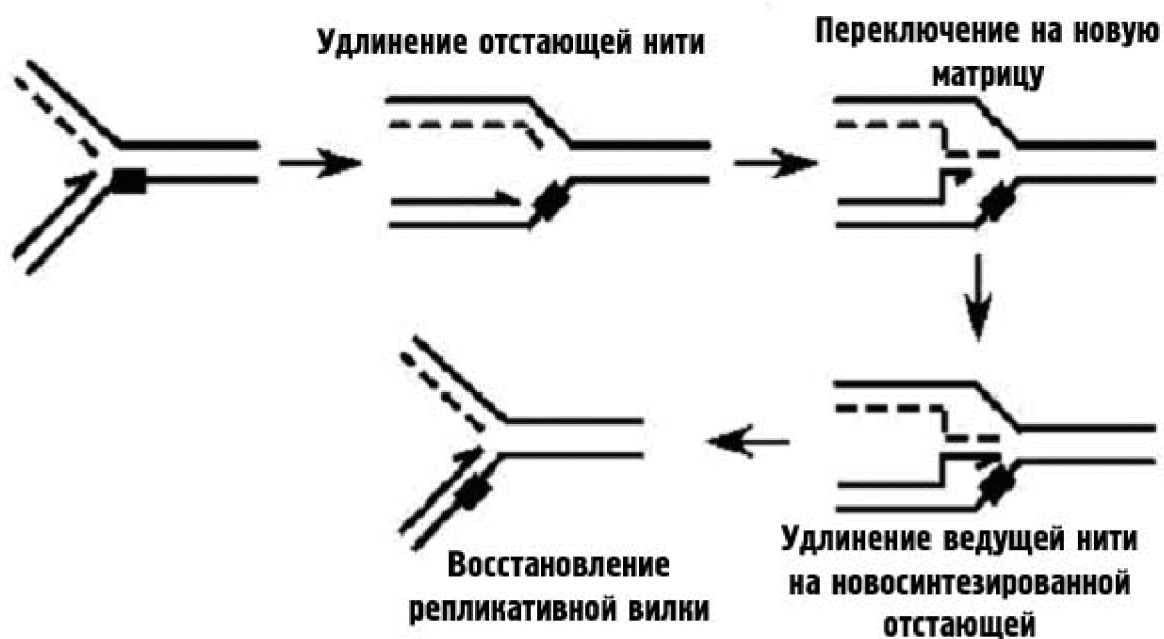


Рисунок 40. Модель обхода повреждения с восстановлением репликативной вилки (2).

14.2. Остановка репликации и ресинтез. Привлечение белков репарации.

Как мы уже неоднократно говорили, повреждения ДНК можно разделить на те, которые приводят к мутациям, но не способны остановить движение репликативной вилки, и те массивные повреждения ДНК, которые напрямую останавливают ее репликацию. Мы уже обсуждали возможные пути репарации таких повреждений и последующего ресинтеза. Индуцированная повреждениями ДНК остановка репликации приводит к привлечению многих белков репарации к месту повреждения, то есть к остановленной вилке репликации. Как именно происходит это привлечение до сих пор окончательно не ясно. Во время нормального процесса репликации ДНК PCNA (proliferating cell nuclear antigen) образует скользящий зажим и стимулирует процесс репликации ДНК-полимеразами. «Загрузка» PCNA на ДНК осуществляется так называемым «загрузчиком зажима» (clamp loader), которым является фактор репликации C (RFC). При аресте репликации многочисленные факторы могут выполнять функции PCNA и RFC. Функцию PCNA при репарации ДНК берет на себя, вероятнее всего, «зажим, специфический для поврежденной ДНК» (Rad9-1-1 комплекс), состоящий из белков Rad9, Hus1 и Rad1. Эти белки служат стыковочной платформой для многочисленных репарационных белков. Здесь уместно отметить, что Hus1 под действием ионизирующей радиации перемещается из цитоплазмы в ядро, где соединяется с PCNA и Rad9.

Другой человеческий белок Rad17 связан с хроматином еще до повреждения ДНК. В ответ на повреждение он фосфорелируется белком ATM и затем способствует присоединению к хроматину комплекса Rad9-1-1. У человека и дрожжей показано непосредственное объединение Rad17 с комплексом Rad9-1-1. Rad17 может замещать большую субъединицу комплекса RFC, образуя новый комплекс с малыми субъединицами RFC, обозначаемый Rad17- RFC. Комплекс Rad17- RFC функционирует как загрузчик зажима для Rad9-1-1 и таким образом указывает генам репарации на сайт повреждения. У дрожжей показано, что высокоошибочная низкопроцессивная полимераза DinB взаимодействует с

белками Hus1\Rad1, а их совместная ассоциация с хроматином является зависимой от Rad17.

15. Современные представления и знания о механизмах активации чекпойнтов и белках, вовлеченных в разные стадии этого процесса.

Повреждения, индуцированные в ДНК действием ионизирующей радиации, влияют на пути активации точек сверки (чекпойнтов), которые останавливают движение клетки в G1 и G2 фазах, и вызывает временную задержку в прохождении фазы S. Чекпойнты совместно с репарацией и апоптозом вовлечены в круговорот, который определяет основной ответ клетки на повреждение ДНК. Активация чекпойнт-ответа обычно включает сенсоры и медиаторы повреждений ДНК, переносчики сигнала и эффекторы. Вероятно, главную роль в чекпойнт-ответе играют белки ATR и ATM, а также CHK1 и CHK2-киназы. Также важна роль лежащих ниже эффекторов, таких как P53 и семейство белков-фосфатаз CDC25. Процессы репарации ДНК и геномной стабильности напрямую связаны с активацией чекпойнтов.

Уже не менее 50 лет известно, что облучение вызывает задержку нормального прохождения клеток по циклу. При этом остановки происходят во всех фазах, хотя в G2 их легче всего обнаружить. Раньше эту задержку рассматривали как пассивный ответ клетки, причиной которого были повреждения в ДНК. Было очевидно, что в клетке инициируются особые процессы, помогающие облученным клеткам каким-то образом бороться с возникшими повреждениями и облегчить их репарацию. В 1980 году Пэйтнер с соавторами показали, что подобная задержка или крайне мала или полностью отсутствует в клетках больных АТ, которые в то же время являются крайне чувствительными к ионизирующей радиации. Затем были выделены дрожжевые мутанты с повышенной чувствительностью к радиации и отсутствием задержки клеточного цикла. К настоящему времени стало понятно, что существуют механизмы «обзора» генома (genome-surveillance), обычно определяемые термином «чекпойнт повреждений ДНК» (DNA damage checkpoint), лишь одним из проявлений которого является задержка клеточного цикла. Современные научные представления допускают, что единство задержек, вызванных облучением

на разных стадиях клеточного цикла, оказывается зависимым от активации отдельного чекпойнта повреждений ДНК.

Параллельно изучались и последовательно выстраивались и сами процессы, необходимые для прохождения клеткой всех фаз клеточного цикла. К настоящему времени подтверждено, что клеточный цикл контролируется независимыми регуляторными переходами, которые приводят ДНК в состояние, способное к удвоению и клеточному делению. Эти переходы завершаются активацией циклин-зависимых киназ (CDKs), действием протеолитических путей и изменением состояния хроматина. CDKs являются основными компонентами белковой машины клеточного цикла и их активность строго регулируется несколькими независимыми путями, включая ассоциацию с соответствующими циклинами, фосфорелирование по определенным серин/треониновым или тирозиновым аминокислотным остаткам и связывание со специфическими белками-ингибиторами. Не удивительно, что CDKs являются также и одними из основных мишеней чекпойнт-ответа. Продвижение по клеточному циклу, опосредованное соответствующей белковой машиной, «проверяется» механизмами «обзора», который следит за тем, чтобы клетки не перешли в следующую фазу, пока все события предыдущей фазы не завершены. Эти механизмы «обзора», известные как чекпойнты клеточного цикла, являются идеологически (концептуально) отличными от чекпойнтов ДНК повреждений. Хотя наше современное знание о молекулярных механизмах различных чекпойнтов выявляет все большее их сходство.

Подобно многим другим областям современной биологии, изучение чекпойнтов питается убеждением, что уточнение их молекулярных механизмов будет способствовать пониманию причин геномной нестабильности и рака, так как любой ген, вовлеченный в чекпойнты ДНК повреждений, важен для стабильности генома и/или связан с наследственной предрасположенностью к раку. К тому же нарушение чекпойнт-контроля может быть отличительным признаком опухолевых клеток, поэтому большие усилия прикладываются для поиска агентов, которые могли бы сломать эти нарушенные чекпойнты. Подобные агенты

можно было бы использовать в противоопухолевой терапии совместно с другими, например с облучением.

15.1. Генеральные концепции и основные игроки.

Чекпойнты повреждений ДНК определяются как система взаимодействующих путей, работающих совместно, распознавая повреждения в ДНК и вызывая клеточный ответ. Процесс передачи сигнала и участвующие в нем белки формально разделяются на сенсоры, переносчики и эффекторы, как показано в табл. 7. Сенсоры прямо или опосредованно распознают повреждения ДНК, служат сигналом этих нарушений и инициируют каскад биохимических реакций. Переносчиками обычно являются протеинкиназы, которые изменяют и усиливают сигнал о повреждениях от сенсоров, фосфорелируя другие киназы или нижележащие белки-мишени. Эффекторные белки включают самые последние нижележащие мишени протеинкиназ - переносчиков сигнала. Эффекторный уровень чекпойнта повреждений ДНК пересекается с машиной клеточного цикла. В таблице приведены белки, которые сейчас считаются основными сенсорами и переносчиками. Впервые мы употребляли эти термины, описывая процессы репарации двунитевых разрывов ДНК.

До сих пор остается неясным самый первый шаг в распознавании ДНК-повреждений. Первоначально кандидатами на роль первичных сенсоров были признаны два белка, способные непосредственно активироваться при связывании с одно- и двунитевыми разрывами ДНК. Это, соответственно, полимераза поли(АДФ)-рибозы PARP и ДНК-зависимая протеинкиназа DNA-PK. Однако вскоре стало ясно, что эти белки не являются необходимыми для инициации глобального ответа клетки на повреждения, и имеют только локальное значение, хотя DNA-PK, вероятно, каким-то образом способствует восстановлению S-фазы после задержки.

В работах на бактериях, а затем на эукариотических клетках было показано, что однонитевая ДНК способна инициировать сигнал для некоторых путей репарации. Но это не стыкуется с представлением о том, что чекпойнт-сигналы связаны с двунитевыми разрывами ДНК, то есть инициируются двунитевой ДНК и/или связанными с ней изменениями

конформации хроматина. Если это так, то те пути репарации, при которых образуются протяженные участки двунитевой ДНК должны генерировать более сильный чекпойнт-ответ, чем те, при которых количество двунитевой ДНК ограничено. То есть, нехомологическое воссоединение концов будет давать более слабый сигнал, чем гомологическая рекомбинация, при которой в процесс репарации вовлечены более протяженные участки двунитевой ДНК.

Функция	Комплекс	Гены
Сенсоры/ посредники (медиаторы)	RFC-подобный PCNA-подобный BRCT-домен-содержащий DSB распознающий/репарирующий	RAD17 RFC2-5 RAD9 RAD1 HUS1 BRCA1 53BP1 TopBP1 MDC1 Mre11 RAD50 NBS1
Переносчики (трансдусеры)	PI3-киназы Белки, связывающиеся с PI3- подобными киназами Эфektorные киназы	ATM ATR ATRIP CHK1 CHK2

Таблица 7. Белки чекпойнт-ответа клетки на повреждение ДНК.

В настоящее время работы на дрожжевых моделях выявили два белковых комплекса – кандидата на роль сенсоров: Rad17-RFC и 9-1-1, о

которых мы говорили, изучая остановку репликации при повреждении ДНК. У этих комплексов есть функциональные гомологи в системе репликации ДНК и их функции частично подобны таковым при чекпойнт-ответе. Rad17-RFC комплекс состоит из Rad17 и четырех небольших субъединиц репликативного комплекса RFC (RFC2, RFC3, RFC4, RFC5), состоящего из 5 субъединиц. RFC распознает и связывается с узлом однонитевой /двунитевой ДНК и способствует «загрузке» на ДНК гомотримерного белка, обладающего «зажим»-подобной структурой, необходимого для усиления процессивности ДНК-полимераз δ и ϵ . Это подтверждает точку зрения, что Rad17-RFC комплекс служит «загрузчиком» комплекса 9-1-1 на поврежденную ДНК. 9-1-1 комплекс состоит из субъединиц RAD9, HUS1 и RAD1, которые взаимодействуют между собой и образуют PCNA-подобную структуру, которая «загружается» на ДНК как скользящий зажим, так же как и PCNA. Есть предположение, что 9-1-1 комплекс также увеличивает количество вовлеченной в реакцию двунитевой ДНК для того, чтобы усилить чекпойнт-ответ. К сожалению, до сих пор остается неясным, как именно RAD17-RFC и 9-1-1 комплексы вовлечены в процесс инициации сигнала на двунитевых разрывах и вообще функционируют во время хорошо известных путей репарации двунивых разрывов ДНК.

Другие белки, такие как комплекс Mre11-RAD50-NBS1 и BRCA1 участвуют в распознавании именно двунитевых разрывов ДНК. BRCA1, вероятно, является адаптором, предоставляющим дополнительные мишени для фосфорелирования киназам-переносчикам сигнала, он взаимодействует с большим числом белков, вовлеченных в процессы репарации ДНК, и собирает белковый комплекс, вероятно, участвующий в инициации и передаче сигнала (BASC - BRCA1 associated genom surveillance complex). Каковы основные функции BRCA1 – сенсорные или трансдусерные – до сих пор неясно.

Белки, называемые медиаторами, прототипом которых является дрожжевой RAD9, участвуют в передаче сигнала. Они содержат два повторяющихся домена, обнаруженных в С-конце белка BRCA1 и названных поэтому BRCT-доменами. BRCT-содержащие белки найдены у млекопитающих, но имеют функции, сходные с таковыми дрожжевого

170

RAD9. Среди подобных белков описаны BRCA1, TopBP1 (topoisomerase II binding protein I), 53BP1 (P53 binding protein I) и MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint protein I). Все эти белки вовлечены в чекпойнт-ответ, они распознают повреждения ДНК и привлекают другие белки, которые облегчают передачу сигнала вниз и репарацию ДНК.

Две активно изучаемые киназы из семейства PI3-киназ (фосфоинозитол-3-киназы) ATM и ATR работают непосредственно сразу же после сенсоров повреждений. ATM играет решающую роль в чекпойнтах повреждений ДНК, контролируя начальное фосфорилирование многих ключевых белков общего ответа, например таких, как P53, MDM2, BRCA1, CHK2, MDC1 и NSB1. При отсутствии ATM ее функции частично берет на себя ATR, сходная с ней по структуре и хуже изученная, так как нокаутные по этому гену мыши гибнут в эмбриогенезе, а клетки в культуре нежизнеспособны. Ассоциированный с ATR человеческий синдром (синдром Секеля) выявлен всего два года назад.

Не ясно до конца, каким именно образом ATR и ATM активируются сами (взаимное фосфорилирование ATM в гомодимере) в ответ на различные воздействия, и как они помогают другим белкам связываться с ДНК (по принципу Ku и DNA-PK). Недавно показано, что ATR образует гетеродимер со специфическим белком ATRIP (ATR interacting protein I), что важно для чекпойнт-сигнала, хотя механизм этой важности остается неизвестным. Может быть подобный партнер существует и у ATM.

Современные данные утверждают, что именно ATM определяет ранний чекпойнт-ответ, а ATR действует позднее, когда уже идет репарация ДНК повреждений, как вызванных радиацией, так и ультрафиолетом или остановкой репликативных вилок.

Следующим шагом в генерации чекпойнт-ответа является активация CHK1 и CHK2 киназ (checkpoint kinase 1 and 2). Эти структурно неродственные киназы имеют частично перекрывающуюся специфичность, то есть часто фосфорилируют одни и те же белки. CHK2 фосфорилируется ATM, что приводит к ее активации. CHK1 фосфорилируется по серину-345 ATR в ответ на действие ультрафиолета или гидроксимочевина. Таким образом в процессе формирования чекпойнт-ответа ATM функционально связана с CHK2, а ATR - с CHK1.

15.2. Молекулярные механизмы G1-чекпойнта.

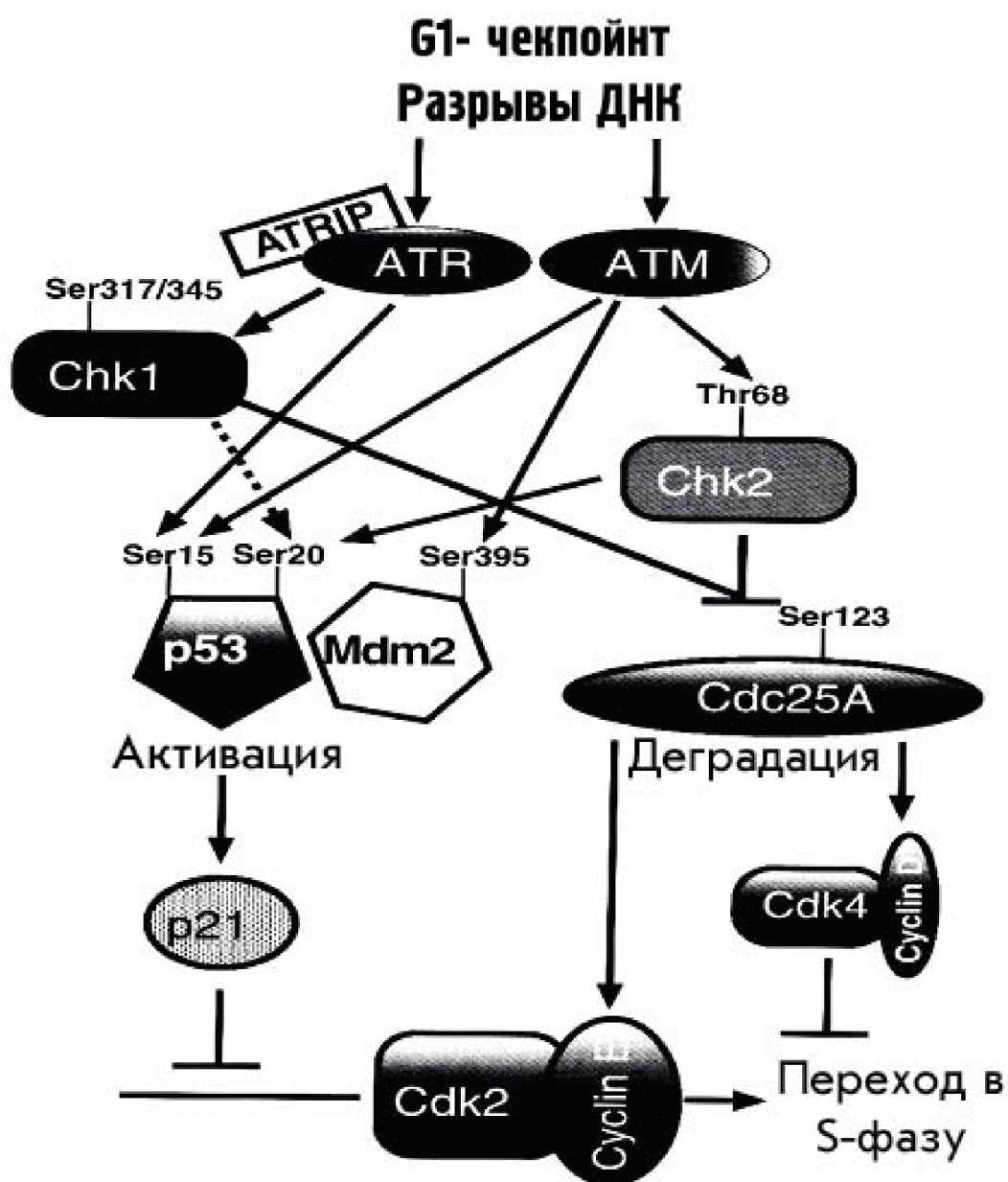
Движение по клеточному циклу вызывается активацией двух ключевых регуляторных киназ - CDK4 и CDK2, ассоциированных с циклинами D и E. Фосфорелирование этими киназами белков-мишеней приводит к переходу клетки в фазу S, что требует одновременной инактивации ингибиторов, таких как RB (ретинобластома) и активации киназ-промоторов S-фазы, таких как CDC45. Онкоген *myc* может служить в этой системе транскрипционным фактором, и одновременно с RB, повышать количество и активность комплекса циклин E-CDK2 киназы, который приводит к инициации репликации путем конечной активации CDC45-киназы. Именно комплекс циклин E-CDK2 киназа является мишенью двух ветвей процесса, индуцированного повреждениями ДНК и приводящего к задержке клеточного цикла в фазе G1.

Все это подробно показано на рис. 41. G1-чекпойнт при повреждении ДНК имеет две различающиеся по своей кинетике ветви. Причем обе фазы реакции используют ATM/ATR и CHK1/CHK2 киназы.

Первая, острая фаза реакции направлена на то, чтобы заблокировать циклин E- CDK2-киназу в неактивном состоянии, что достигается ингибированием или протеосомной деградацией фосфатазы CDC25. Затем следует более длительный и глубокий G1-арест, также связанный с инактивацией комплекса циклин E- CDK2 киназа, что достигается благодаря стабилизации белка P53 и его последующей – относительно более медленной – работе как транскрипционного фактора, активирующего синтез соответствующих белков, в первую очередь - P21. Вероятно, именно и только P21 является мишенью P53, важной для G1-чекпойнта при повреждении ДНК. Одновременно различными путями разрушается комплекс между P53 и его ингибитором MDM2, что также усиливает эту реакцию. Последующая активация транскрипции MDM2, опосредованная тем же P53, является дополнительным путем регуляции активности P53.

Хотя бытует представление, что чекпойнты после повреждения ДНК нужны для репарации, но нет никаких данных, что G1-чекпойнт как-либо способствует репарации двунитевых разрывов. Вероятнее всего, роль G1-чекпойнта в поддержании клеточной стабильности в том, что путем P53-

опосредованного апоптоза элиминируются клетки, содержащие ДНК-повреждения.



Рисунк 41. Схема G1-чекпоцнта, возникающего в ответ на повреждение ДНК.

15.2. Молекулярные механизмы S-чекпойнта.

В отличие от G1 или G2-чекпойнтов, задержка в S-фазе относительно короткая и может затрагивать только часть генома. Длительность G1 или G2-чекпойнтов связана с процессами репарации ДНК и апоптоза. Отсутствие задержки в S-фазе обычно называется радиорезистентным синтезом ДНК (характерным, например, для АТ-клеток).

В отличие от G1-чекпойнта, в S-чекпойнте не участвуют гены P53 и P21. То есть активация и стабилизация P53 в S-фазе не приводит к изменению его активности как транскрипционного фактора, а может быть связана только с его ролью в процессах репликации ДНК и репарации, спаренной с транскрипцией. Деградация CDC25, приводящая к тому, что комплекс циклин E- CDK2 киназа остается в неактивной форме и не может вызвать дальнейшее продвижение по клеточному циклу, происходит примерно так же, как и при G1-чекпойнте. ATM-CHK2-CDC25-CDC45 образуют систему быстрого ответа для подавления различных связанных с клеточным циклом процессов, включая репликацию ДНК. ATM-зависимый ответ достигает максимума через полчаса после воздействия, а ATR-CHK1-CDC25 ветвь ингибирования достигает максимума через 2-4 часа, хотя мишенью является тот же самый серин-123 фосфатазы CDC25A.

Все это подробно показано на рис. 42.

Дополнительными мишенями ATM являются BRCA1, MRE11-NBS1-RAD50-комплекс, а также недавно описанный новый белок MDC1, содержащий BRCT-повтор. Представляется, что эти белки каким-то недостаточно ясным образом вызывают промежуточные задержки S-фазы. MDC1, например, может быть медиатором тонких реакций, происходящих вокруг гистона H2AX, и привлекать другие белки к месту ДНК-повреждения. Есть также данные о прямом взаимодействии белка MDC1 с CHK2.

В некоторых работах показана такая же связь CHK2 с белками BRCA1 и NBS1. Вероятно, эти белки, как и MRE11, играют какую-то роль в восстановлении репликации ДНК при данном чекпойнте.

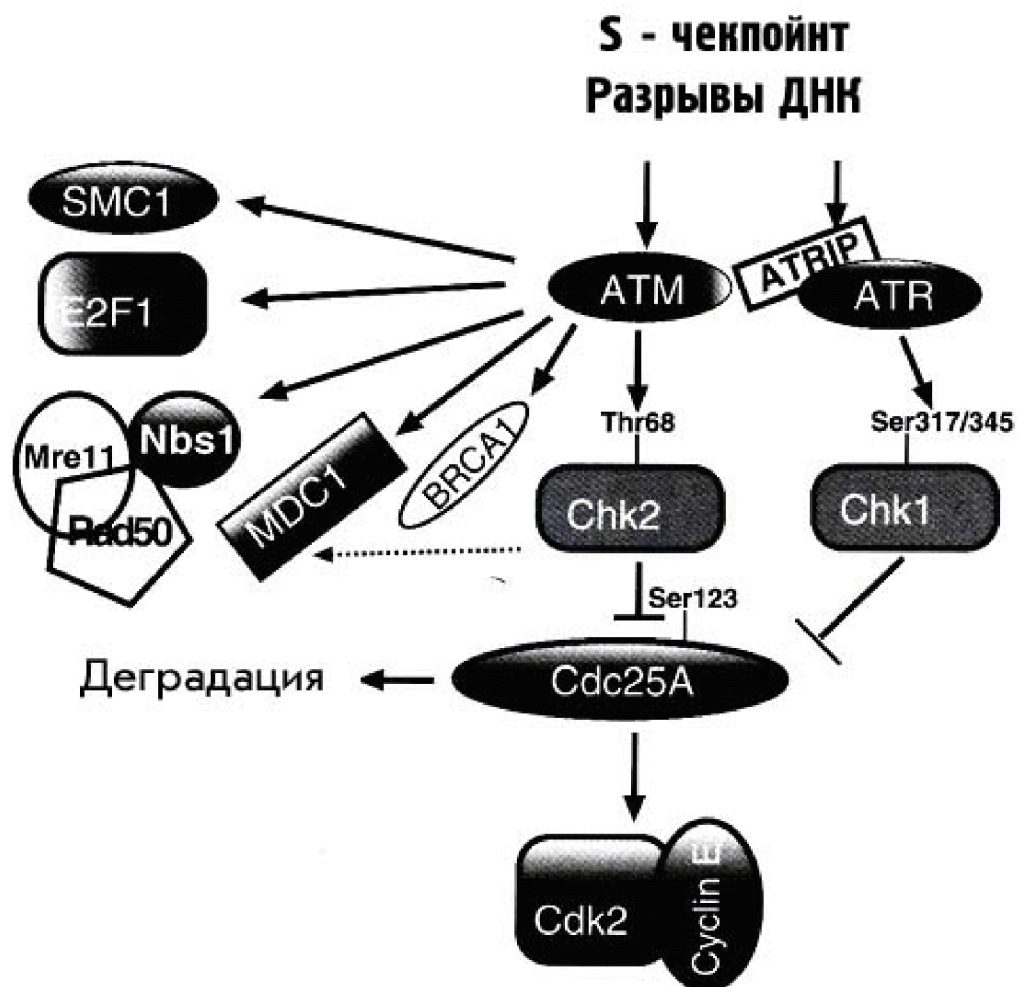


Рисунок 42. Схема S-чекпойнта, возникающего в ответ на повреждения ДНК.

15.3. Молекулярные механизмы G2-чекпойнта.

Временная остановка клеточного цикла в ответ на облучение является одним из первых описанных эффектов радиации. G2-арест в этом контексте рассматривался, как пассивный процесс – следствие наличия поврежденной ДНК. Сейчас мы приходим к представлению, что G2-чекпойнт является наиболее активным ответом клетки, играющим серьезную роль в репарации ДНК. Ключевым эффектором этого процесса является необходимая для перехода клетки в митоз CDC2 (CDK1) киназа, активирующаяся при ее ассоциации с циклином В. Это отличие данного

чекпойнта от G1 и S-чекпойнтов и утверждение его центральной роли в регуляции клеточного цикла.

Все это подробно показано на рис. 43. G2-арест требует изменения множества регуляторных процессов, вовлеченных в нормальный переход клетки из G2 в M: блокирование киназных функций самой CDC2, отсутствие или перемещение циклина B, а также изменение активности других белков, влияющих на регуляторный комплекс CDC2-циклин B. Основным событием, контролирующим входение в митоз, является снятие ингибирующего фосфорилирования с CDC2 по тирозину в 15 положении и триптофану в 14, для чего необходима активная фосфатаза. Таким образом, G2-арест ингибирует это дефосфорилирование, то есть ключевым его событием является регуляция активности фосфатазы CDC25C. Так, активация ATM приводит к активации CHK2 через фосфорилирование триптофана в 68 положении. Активная CHK2 в свою очередь фосфорилирует CDC25C по серину в 215 положении, что приводит к блокированию ее функций. Фосфорилированная форма фосфатазы CDC25C связывается с белком 14-3-3 σ , что поддерживает ее каталитическую неактивность и способствует переходу в цитоплазму и секвестрированию. Вторая ветвь G2-чекпойнта опосредуется через ATR/CHK1 активацию. При этом пути одновременно фосфорилируется-выключается белок CDC25A, а также фосфорилируется серин-549 белка Wee1, что облегчает его связывание тем же белком 14-3-3 σ и приводит к усилению ингибиторной активности киназ по отношению к CDC2. Это придает второй ветви большую гибкость в контроле и консолидации G2-ареста.

Сами повреждения ДНК тоже могут регулировать активность CDC2 через циклин B. В некоторых клеточных линиях после облучения резко падает уровень мРНК циклина B, возможно из-за ее повышенной нестабильности, причем этот эффект определяет протяженность G2-ареста. Также нужно иметь в виду, что циклин B во время G1 и S фаз имеет цитоплазматическую локализацию и перемещается в ядро только к началу митоза. Также есть данные, что белок 14-3-3 σ приводит к секвестрированию циклина B в цитоплазме в ответ на повреждение ДНК.

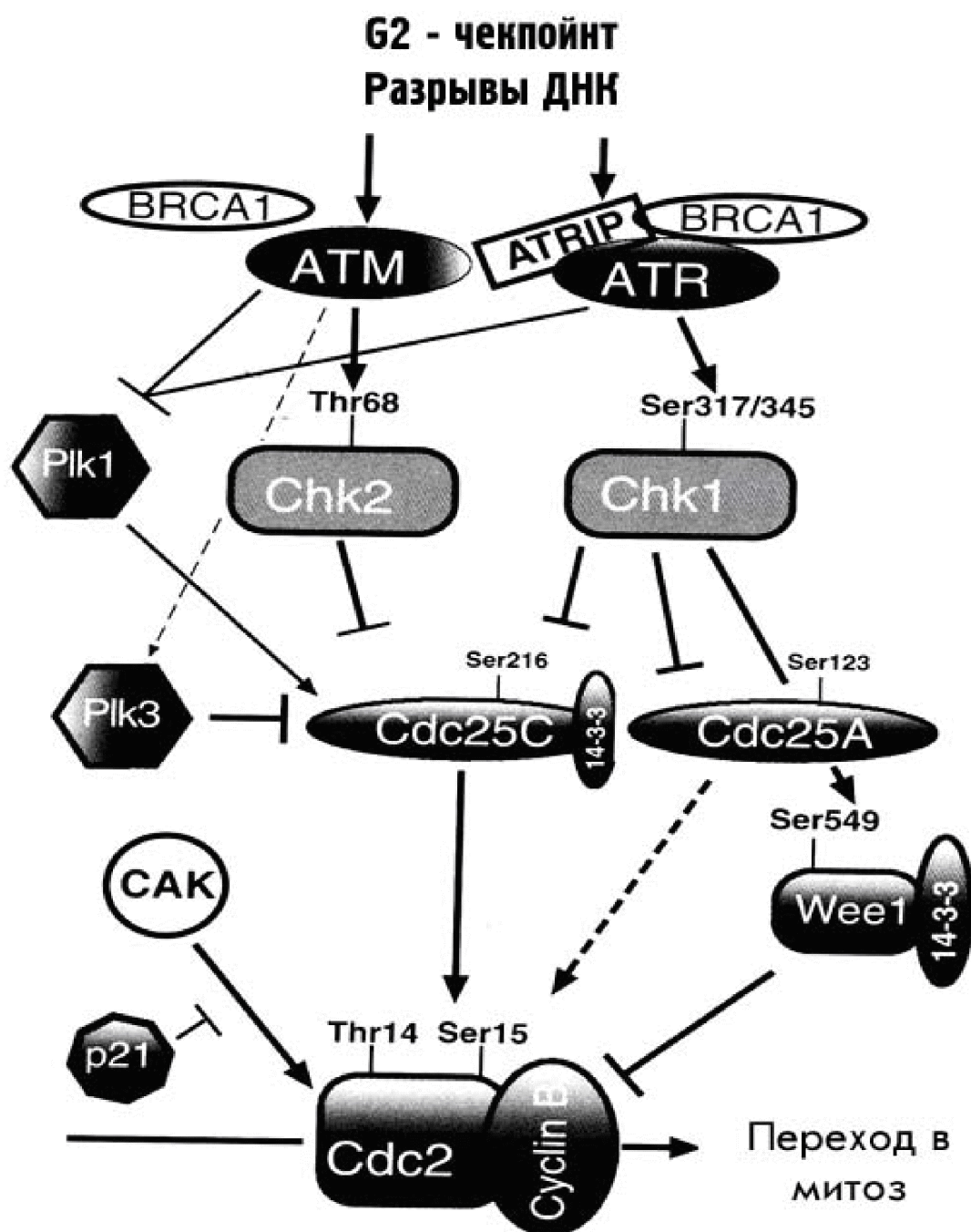


Рисунок 43. Схема G2-чекпойнта, возникающего в ответ на повреждение ДНК.

Недавно были описаны еще два белка – регулятора CDC25C, принимающих участие в G2-чекпойнте, названные PLK1 и PLK3 (Polo-like kinase). Белки этого семейства принимают активное участие в митозе,

включая вход и выход из него. У них всех есть крайне консервативный карбоксильный домен, имеющий два блока очень высокой гомологии, названные поло-боксами. PLK1 является позитивным регулятором CDC25C-активности в необлученных клетках и, специфически фосфорелируя ее, способствует вхождению в митоз. PLK3, напротив, активируется ATM в ответ на повреждение ДНК, взаимодействует с CDC25C, фосфорелируя ее по серину-216, что приводит к ингибированию ее активности. Еще одной возможностью остановить вход в митоз при наличии повреждений в ДНК является взаимодействие белка PCNA с P21, CDC25C и комплексом CDC2-циклин В, но не одновременное, а последовательное. Показано, что связывание P21 и CDC25C с комплексом PCNA-CDC2-циклин В является совершенно особым и не позволяет CDC25C дефосфорелировать CDC2 для активации митоза. В дополнение к этому, P21 может блокировать особую киназу САК (CDKs activating kinase), которая активирует CDC2 путем фосфорелирования триптофана в 161 положении. Участие P21 в G2-ответе указывает на то, что в нем участвует и P53. Роль P53 в поддержании G2-ареста состоит в том, что он активирует транскрипцию трех вовлеченных в него белков: GADD45, P21 и 14-3-3σ и подавляет транскрипцию CDC2 и циклина В.

И, наконец, есть данные о вовлеченности в G2-арест BRCA1, опосредованно через ATM/ATR или напрямую, через активацию CHK1, но механизм этого остается неясным.

Таким образом, к настоящему времени стало ясно, что G2-реакция клетки на облучение зависит от фазы цикла, в которую это произошло. Одновременно становится понятным, что G2 чекпойнт-ответ разделяется на два молекулярно различных пути. Один начинается сразу же после облучения, захватывает клетки, облученные непосредственно в G2-фазе и является ATM-зависимым, проходящим и независимым от дозы. Он приводит к резкому снижению митотического индекса. Второй, который развивается позже, в клетках, облученных на более ранних стадиях клеточного цикла, является ATM-независимым, зато зависимым от дозы и приводит к накоплению клеток в фазе G2.

15.4. Чекпойнты, вызванные повреждениями ДНК и репарация двунитевых разрывов.

Широко распространенное мнение о том, что чекпойнты способствуют репарации ДНК кажется очевидным, но это никогда не было строго доказано. Представляется ясным, что чекпойнт – это не только «период ожидания» внутри клеточного цикла. Для того, чтобы оценить репарацию потенциально летальных повреждений, были использованы различные экспериментальные подходы, затрагивающие время задержек в клеточном цикле. Рассматривая чекпойнты, вызванные повреждением ДНК, и процессы репарации ДНК, можно попытаться объединить их с основными событиями нормального клеточного цикла. Дискуссия обычно ведется вокруг двунитевых разрывов ДНК и их репарации, но может быть распространена и на другие типы ДНК-повреждений. То есть, регулируемые переходы из фазы в фазу клеточного цикла, связанные с чекпойнтами, должны приводить ДНК в состояние, удобное для репарации двунитевых разрывов. Двунитевые разрывы ДНК могут индуцироваться во всех фазах клеточного цикла, но их репарация оптимально происходит только в некоторых, так как на них могут накладываться изменения хроматина, связанные с прохождением клеточного цикла. Таким образом чекпойнт-ответ может быть полезен в нескольких направлениях: (1) оставить время для репарации в тех фазах клеточного цикла, в которых двунитевые разрывы ДНК образовались; (2) позволить частичный процессинг повреждений и допустить переход в следующую фазу, в которой эти повреждения ДНК будут оптимально репарированы; (3) препятствовать угрожающему изменению конформации хроматина, которое может усложнить правильную репарацию.

Нужно напомнить, что репарация двунитевых разрывов в основном (1:1500) происходит путем негомологического воссоединения концов, и лишь небольшая часть DSBs удаляется из генома крайне важным для понимания радиочувствительности клеток методом гомологической рекомбинации. Негомологическое воссоединение концов – процесс быстрый, 75% разрывов зашиваются в течение первых 20 минут, к тому же этот процесс активен во всех фазах клеточного цикла, включая S-фазу.

Неприятно, но очевидно, что этот процесс нельзя рассматривать как зависимый от чекпойнт-ответа на повреждения, так как сам чекпойнт-ответ достигает максимума только через 1-2 часа. Итак, репарация двунитевых разрывов путем нехомологического воссоединения концов является чекпойнт-независимым процессом.

С другой стороны, накоплено много данных, подтверждающих зависимость от чекпойнт-ответа репарации путем гомологической рекомбинации. В ней участвуют многие белки, вовлеченные в чекпойнт-ответ, к тому же медленное протекание этого процесса соответствует времени чекпойнт-ответа.

В настоящее время предложена модель-идея, что нехомологическое воссоединение концов – это только первый шаг процесса репарации двунитевых разрывов, цель которого просто сохранить целостность генома, несмотря на низкую точность. За ним следует процесс гомологической рекомбинации, цель которого восстановить, так как это принципиально важно, точную последовательность нуклеотидов вокруг разрыва. Эта вторая фаза репарации таким же образом может восстанавливать точность всех репарационных процессов. По этой (весьма спекулятивной) теории, репарация двунитевых разрывов ДНК – процесс многоступенчатый, начинающийся с синапсиса концов и завершающийся восстановлением точной последовательности ДНК. Быстрый начальный шаг NHEJ крайне чувствителен к изменениям конформации хроматина, которые происходят при вхождении клетки в S-фазу и в митоз, и могут приводить к разделению концов, усложняя их правильное воссоединение. Последующие шаги чекпойнт-ответа, кажется, более тесно связаны с дальнейшими ступенями репарации и могут приводить ДНК в состояние, при котором репарация путем гомологической рекомбинации будет идти более эффективно. В тоже время они могут блокировать биохимические процессы, связанные с репликацией ДНК и делением.

Заключение.

В течение всего курса изучения репарации ДНК главной задачей представлялось создание общей картины взаимодействия большого числа (больше 150) генов и кодируемых ими белков в процессах поддержания

180

стабильности передающейся по наследству информации и предотвращения появления мутаций. Новая парадигма – представление о динамических изменениях молекулы ДНК при ее повреждении и репарации позволяет глубже понять происхождение и эволюцию живых организмов, их способность приспосабливаться к изменениям окружающей среды.

Детальное знание процессов репарации ДНК, а также кинетики и молекулярных основ чекпойнт-ответа клетки на повреждения ДНК, могут быть продуктивно применены как в различных областях теоретической биологии, так и в прикладных исследованиях, например, при выработке стратегии сочетанной терапии опухолей, включая различные способы подавления чекпойнт-ответа после радиотерапии.

В завершение приведем сводную таблицу генов, вовлеченных в процессы репарации, мутации в которых могут приводить к тяжелым наследственным заболеваниям человека

Приложение 1.

Гены репарации ДНК, связанные с различными наследственными болезнями человека

Коррекция неспаренных оснований

MSH2, MSH6, MLH1 – наследственный неполипозный рак толстого кишечника. Гетерозиготное носительство.

Экцизионная репарация нуклеотидов

XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF, XPG – пигментная ксеродерма

CSA, CSB, CS/XPB, CS/XPD, CS/XPG – синдром Коккейна

TTDA, TTD/XPB, TTD/XPD – трихотриодистрофия

Способность к синтезу ДНК на поврежденной матрице

XP-V –вариантная форма пигментной ксеродермы

Репарация двунитевых разрывов ДНК и глобальный клеточный ответ

ATM –атаксия-телеангиэктазия или синдром Луи-Барр

NBS1 – Нийменгенский синдром ломкости хромосом

WRN – синдром Вернера или прогерия взрослых

BLM – синдром Блюма

FAA, FAC, FAD2, FAE, FAF, BRCA2 – анемия Фанкони

Artemis – RS-SCID.

BRCA1, BRCA2 – наследственный рак молочной железы.

Гетерозиготное носительство.

P53 – синдром Ли-Фромени, наследственная предрасположенность к опухолям различной этиологии

LIGIV – BR180 (ligIV syndrome)

RAD50 – ATLD (AT-like disease)

Приложение 2.

Универсальный генетический код

Название аминокислот и их буквенное обозначение	ДНК кодоны
A Ala	GCU, GCC, GCA, GCG
R Arg	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
N Asn	AAU, AAC
D Asp	GAU, GAC
C Cys	UGU, UGC
Q Gln	CAA, CAG
E Glu	GAA, GAG
G Gly	GGU, GGC, GGA, GGG
H His	CAU, CAC
I Ile	AUU, AUC, AUA
L Leu	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
K Lys	AAA, AAG
M Met	AUG
F Phe	UUU, UUC
P Pro	CCU, CCC, CCA, CCG
S Ser	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
T The	ACU, ACC, ACA, ACG
W Trp	UGG
Y Tyr	UAU, UAC
V Val	GUU, GUC, GUA, GUG
---	UAA, UGA, UAG

Список литературы.

- Жимулев В.Ф.* Общая и молекулярная генетика. Сибирское университетское издательство. Новосибирск. 2003. 527 с.
- Коничев А.С.* Молекулярная биология: Учеб. Для студ. Пед. Вузов / М.: Издательский центр «Академия», 2005. 400 с.
- Молекулярная биология: Структура и биосинтез нуклеиновых кислот. Учеб. Для биол. Спец. Вузов/ В.И.Агол, А.А.Богданов, В.А.Гволздев, А.И.Грагеров, А.М.Колчинский, А.Д.Мирзабеков, В.Г.Никифоров.; под ред. А.С.Спирина. М., Вычш. шк., 1990. 352 с.
- Патрушев Л.И.* Искусственные генетические системы. В 3-х т. Т. 1. Генная и белковая инженерия. М.: Наука. 2004. 526 с.
- Сингер М., Берг П.* Гены и геномы. В 2-х т. Т. 1. Пер. с англ. М.:«Мир». 1998. 373 с.
- Василенко Н.Л., Невинский Г.А.* Ферменты прямой, эксцизионной и коррекционной репарации высших и низших организмов и их биологическая роль. Мол.биол., 2003. 37:944-960.
- Завильгельский Г.Б.* “Translesion synthesis”, или молекулярный «стипель-чез». Мол.биол., 2000. 34:201-209.
- Крутяков В.М.* Ферментативные механизмы антимутагенеза: роль автономных 3'→5- экзонуклеаз. Бреслеровские чтения. 2002. 85-94.
- Ланцов В.А.* Репарация ДНК и канцерогенез: универсальные механизмы репарации у про- и эукариот и последствия их повреждения у человека. Мол.биол., 1998. 32:757-772.
- Ланцов В.А.* Рекомбинация, репарация и репликация: взаимосвязь и взаимозависимость. Бреслеровские чтения. 2002. 27-42.
- Сойфер В.Н.* Репарация генетических повреждений. Соросовский образовательный журнал, 1997. 8:4-13.
- Стивак И.М.* Болезни с первичными и вторичными дефектами репарации ДНК. Цитология, 1999. 41:338-380.
- Томилин Н.В.* Репарация двунитевых разрывов ДНК и стабильность хромосом в клетках высших эукариот. Бреслеровские чтения. 2002. 70-84.

Чумаков П.М. Функция p53: выбор между жизнью и смертью.
Биохимия, 2000. 65:34-47.



2

Рисунок С.В.Жеребцова.

Boss - XPA and RPA can recognise damaged DNA. Then we'll recruit TF IIH to open up the structure, cut out the damaged DNA segment (ERCC1/XPC and XPG) then replicate the missing sequence with DNA pol ϵ , RFC and PCNA, and then ligate the new stretch with DNA ligase.

Some of my chaps can crawl along the DNA strand, flip out each base one-by-one, check it, and cut out any wrong 'uns.



BASE FLIPPING

We can unwind duplex DNA, then degrade it from the mismatch..



↓ Pair it with homologous DNA



↓ Process from Holliday junctions and religate.



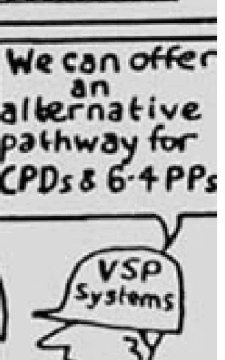
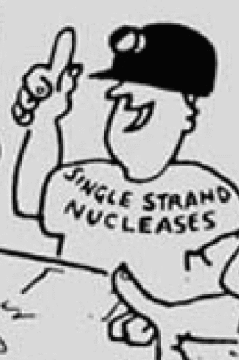
Well, my crew of damage-specific DNA N-glycosylases and AP endonucleases can chop out all sorts of mismatched and damaged bases

Yeah.. then my lads can excise the single-strand DNA (Exo I, Exo III, RecJ) and DNA pol I can re-synthesise the daughter strand, then ligate.

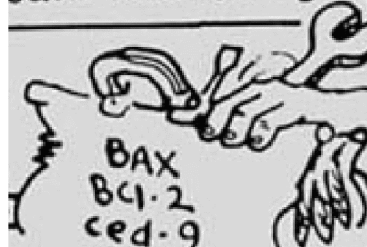
We can offer an alternative pathway for CPDs & 6-4 PPs

VSP Systems

dy ..



use, I tell you! Damage is too great! self-destruct button trigger apoptosis - safe than sorry!



Give us a strong UV source, and we can photo reactivate some damage directly!