

ПОСТРЕПЛИКАТИВНАЯ РЕПАРАЦИЯ (PRR) ДНК.

PRR У ЭУКАРИОТ – ПУТЬ RAD6-RAD18

## Пострепликативная репарация (PRR) включает:

1. Рекомбинационная репарация брешей, расположенных против повреждений в комплементарной цепи ДНК.
2. Репарация путем синтеза ДНК через DD (в обход DD) – *translesion synthesis* (TLS). К последней относят SOS-репарацию у бактерий и аналогичные процессы у эукариот.
3. Репарация поврежденных вилок репликации ДНК.

При высоком уровне DD, например при интенсивном УФ-облучении, точные системы репарации NER и BER могут не справляться до начала репликации с обилием DD.

Так как DD блокируют прохождение аппарата репликации по ДНК, но не препятствуют возобновлению репликации на участке за DD, то во вновь синтезированной цепи может образоваться брешь размером до 1000 п.н.

Такие бреши могут репарироваться путем RecA-зависимой рекомбинационной репарации, обнаруженной Howard-Flanders'ом у *E.coli* в 1968 г.

Синтез ДНК через повреждение

Ключевую роль в процессах синтеза ДНК через повреждение играют специализированные TLS-ДНК-полимеразы. Большинство из них относится к семейству  $\gamma$  ДНК-полимераз.

У *E.coli* это неточные – error-prone (мутагенные) SOS-индуцибельные ДНК полимеразы IV (Din) и V.

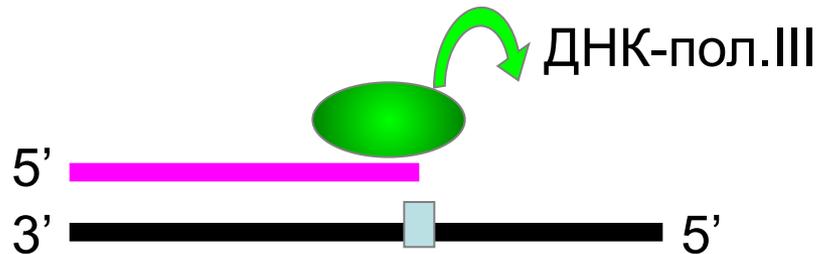
У эукариот описаны: Rev1, Pol  $\zeta$  (*дзета*) и Pol  $\eta$  (*эта*) у дрожжей и Pol  $\eta$ , Pol  $\iota$  (*иота*), Pol  $\kappa$  (*каппа*) и Rev1 у млекопитающих.

Эти ферменты способны помещать в свои активные центры поврежденные основания, в том числе объемные аддукты (обычные ДНК-полимеразы в таких случаях останавливаются), и, тем самым, обходить DD.

Отметим, что некоторые авторы справедливо подчеркивают, что TLS не является репарацией в строгом смысле этого слова, так как не обеспечивает восстановления исходной нуклеотидной последовательности. Поэтому для ее обозначения предпочитают употреблять слово «толерантность».

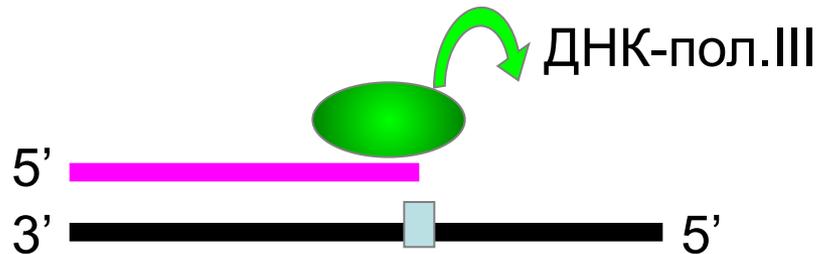
На следующем слайде в качестве напоминания пройденного представлена упрощенная схема SOS-репарации у *E.coli*.

# SOS-репарация



1. Многие мутагены повреждают основания ДНК, что приводит к невозможности специфического спаривания оснований.
2. В результате репликация блокируется.
3. У про- и эукариотических организмов репликационные блоки обходятся с помощью встраивания неспецифических оснований.
4. У *E.coli* этот процесс нуждается в индукции **SOS-системы**.

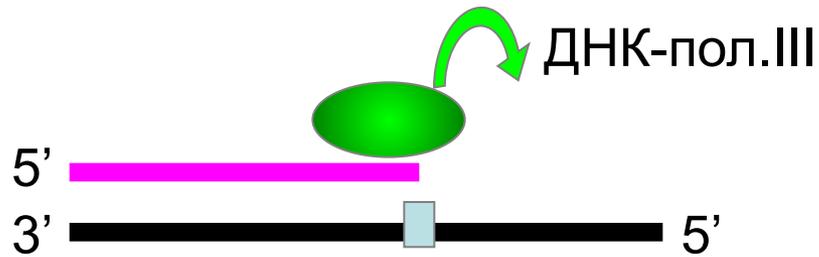
# SOS-репарация



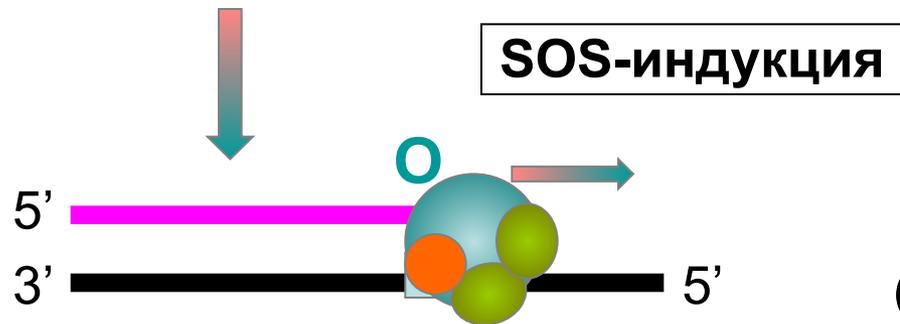
## SOS-индукция

1. Ключевая роль в SOS-индукции принадлежит белку RecA. Он связывается с белком SSB и с однонитевой ДНК и образует ДНК-белковые филаменты, представляющие собой активную форму белка, обозначаемую как RecA\*.
2. RecA\* является сигналом, запускающим индукцию SOS-регулона (около 30 генов), продукты которых необходимы для выживания клетки при массовых повреждениях ДНК.
3. В SOS-регулон входят гены UmuD, UmuC и DinB, продукты которых необходимы для «обходной» (*translesion*) репликации.
4. Обходная репликация является неточной, склонной к ошибкам. В результате повышается частота мутаций.

# SOS-репарация

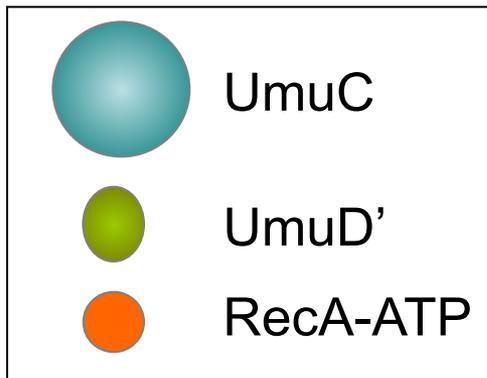


 – некомплементарный нуклеотид

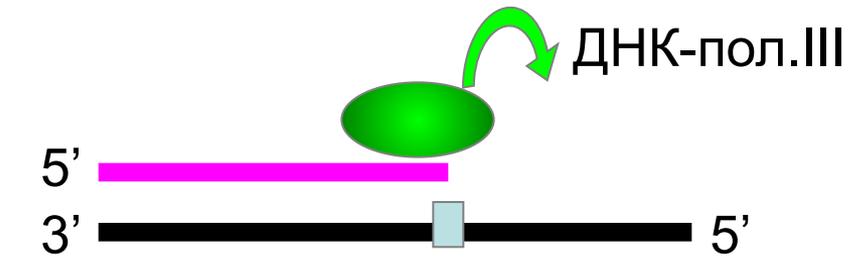


ДНК-полимераза V  
(2UmuD'-UmuC-RecA-ATP)

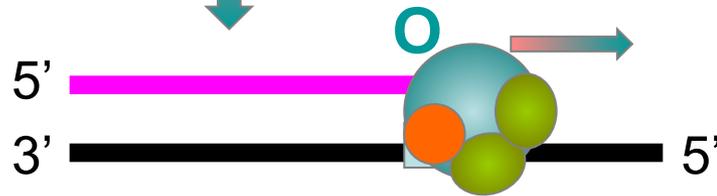
ДНК-полимераза IV  
(DinB)



# SOS-репарация



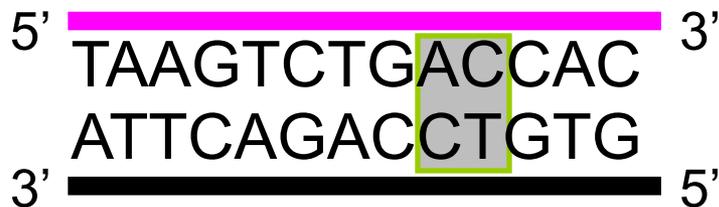
SOS-индукция



ДНК-полимераза V  
(2UmuD'-UmuC-RecA-ATP)

ДНК-полимераза IV  
(DinB)

Ошибки



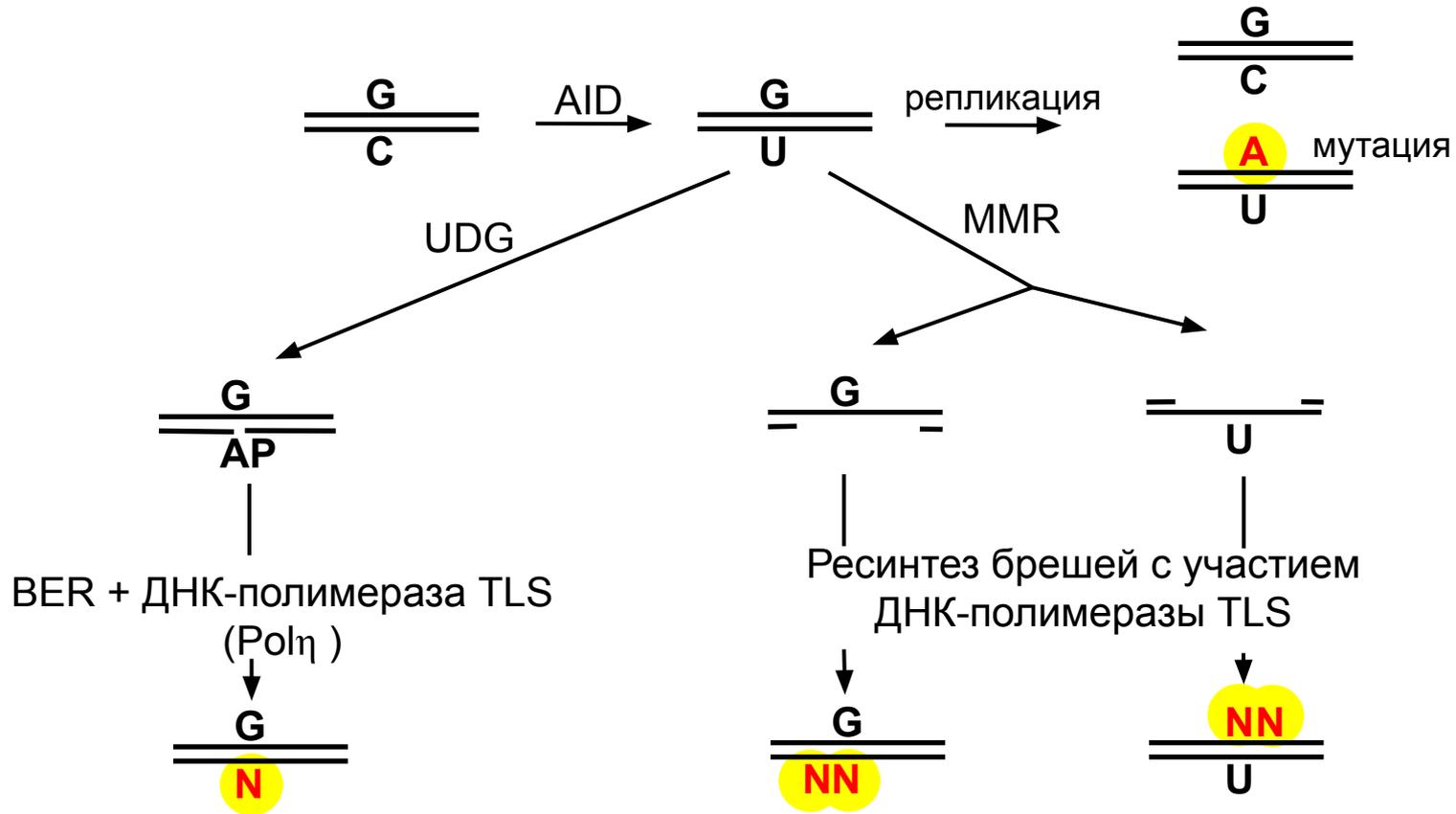
У эукариот с блоком репликации также помогает справиться рекомбинационная репарация (отличающаяся от таковой у прокариот), но преобладают системы TLS, как правило, за счет снижения или потери точности репликации. Репликация продолжится, но во вновь синтезированную цепь ДНК будут внесены ошибки (мутации).

Неудивительно, что мутанты по генам, кодирующим компоненты TLS, проявляют **антимутаторный** фенотип.

Чтобы поддерживать оптимальный уровень мутационной изменчивости, в природе соотношение в работе точных и неточных систем репарации отработано за счет их регуляции.

В некоторых специализированных клетках и тканях, например на определенной стадии формирования генов иммуноглобулинов в дифференцирующихся В-лимфоцитах, частота мутаций превышает спонтанный уровень на несколько порядков (соматический гипермутагенез).

# Соматический гипермутагенез с участием AID и ДНК-полимеразы TLS



AID – activation induced deaminase

N – любой нуклеотид (мутация)

AP – апиримининовый сайт

UDG – урацил-ДНК-гликозилаза

PRR поврежденных вилок репликации ДНК

У эукариот к PRR относят, главным образом, процессы репарации DD в вилках репликации ДНК.

DD, оказавшиеся в реплицирующихся цепях не имеют матриц для эксцизионной репарации, поскольку в вилках репликации они находятся в ОН форме.

Обычно реплицирующий ДНК аппарат останавливается (*stalls*) перед DD. Для продолжения репликации необходима PRR.

Известны две ветви PRR, осуществляемые группой белков, которые модифицируют белок PCNA в остановленной (*stalled*) вилке репликации.

Важную роль в обоих путях играют белки PCNA и RFC.

Ядерный белок PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) при обычной репликации действует как фактор процессивности ДНК-полимеразы  $\delta$  (Pol $\delta$ ). Белок представляет собой пример ДНК-зажима (*DNA clamp*), обхватывающего ДНК. Он же помогает ДНК-полимеразе TLS удерживать ДНК.

PCNA функционирует в виде гомотримера.

PCNA связывается с ДНК с помощью RFC (*replication factor C*).

# Proliferating cell nuclear antigen



**Тример PCNA человека (DNA clamp) в собранном виде.**

PCNA, но уже в модифицированной (убиквитинированной) форме, вовлечен в PRR, которая включает две ветви:

Ветвь 1. Обход DD (*translesion synthesis* – TLS), который осуществляется с участием специализированных error-prone TLS-ДНК-полимераз.

Рекрутирование (привлечение) TLS-полимеразы происходит в результате убиквитинирования PCNA консервативным комплексом белков Rad6-Rad18, одинаковым у дрожжей и человека.

Rad6 – убиквитин-конъюгирующий фермент (E2), Rad18 – убиквитинлигаза (E3), которая является также ДНК-связывающим белком. Мутации, инактивирующие белки Rad6 и Rad18, вызывают гиперчувствительность ко многим ДНК-повреждающим агентам.

Моноубиквитинирование лизина в PCNA в положении 164 (K164) активирует путь TLS (ветвь 1).

Ветвь 2. Переключение матричных цепей, которое осуществляется через DD с помощью механизма гомологичной рекомбинации.

Белок PCNA – главный компонент в активации обоих суб-путей (ветвей), а также в выборе пути PRR, по которому пойдет клетка.

Для загрузки PCNA на ДНК требуется RFC.

Ключевым моментом в этих процессах является посттрансляционная модификация PCNA посредством убиквитинирования.

Убиквитины и убиквитин-подобные белки являются наиболее известными и распространенными модификаторами многих белков. Убиквитины конъюгируют с белками-мишенями путем образования изопептидной связи между карбоксильным концом убиквитина и  $\epsilon$ -аминогруппой одного из лизиновых остатков в белке-мишени.

Убиквитины задействованы в деградации ненужных белков (в 26S-протеосоме), а убиквитинирование как механизм модификации белков участвует в регуляции практически всех клеточных процессов, включая клеточный рост, деление, движение, сигнальные системы, апоптоз и т.д.

Связывание убиквитина с мишенью происходит в 3 энзиматических этапа: 1) убиквитин активируется убиквитин-активирующим энзимом E1 в АТФ-зависимой реакции; 2) активированный убиквитин переносится к убиквитин-конъюгирующему энзиму E2; 3) затем убиквитин-лигаза (E3) ковалентно связывает убиквитин со специфическим субстратом.

Сам убиквитин может далее модифицироваться путем формирования полиубиквитинированной цепи через различные лизиновые остатки.

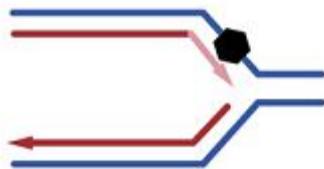
Деубиквитинирование осуществляется специальными энзимами.

Из убиквитин-подобных белков наиболее известен SUMO – small ubiquitin-like modifier.

Сумоилирование регулирует многочисленные клеточные процессы: активность факторов транскрипции, белок-белковые взаимодействия, структуру X, связывание белков с ДНК и др.

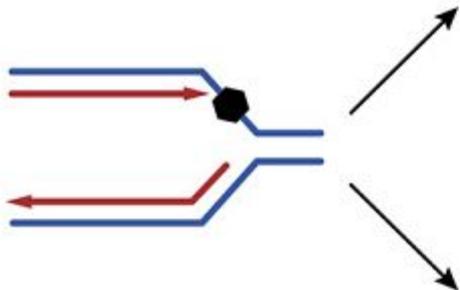
# Толерантность к повреждению ДНК обеспечивается переключением матриц белком Rad5 (по H.L.Klein, 2007)

Синтез продолжается после повреждения за счет ДНК-полимераз TLS

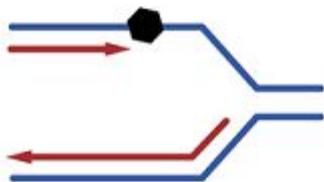


Ветвь 1

Белки Rad6-Rad18 обеспечивают синтез ДНК в обход повреждения (TLS)



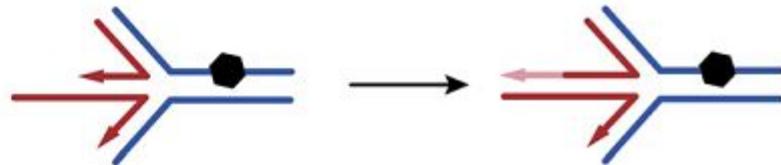
Rad6-Rad18 и Rad5-Ubc13-Mms2 переключают синтез с одной матрицы на другую



Удлинение отстающей цепи, образование бреши в лидирующей цепи

Реверсия вилки репликации за счет хеликазной и ренатурирующей активности белка Rad5 («chicken foot»)

Удлинение участка дочерней лидирующей цепи с использованием отстающей цепи в качестве матрицы



Ветвь 2

Рисунок: Толерантность к повреждению ДНК обеспечивается переключением матриц белком Rad5

## Ветвь 1 (левая верхняя часть рисунка)

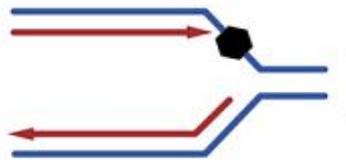
Репликация ДНК может пройти в обход DD (TLS) с участием белков Rad6 и Rad18.

Если репликация ДНК останавливается перед DD в матричной цепи, комплекс Rad6-Rad18 может возобновить синтез ДНК путем моноубиквитинирования PCNA и привлечения TLS-полимеразы Pol $\zeta$  к сайту, на котором затормозилась репликация.

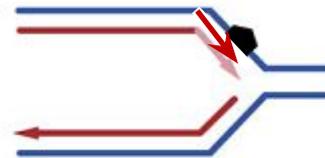
# Толерантность к повреждению ДНК обеспечивается переключением матриц белком Rad5

## Ветвь 1 (TLS)

Белки Rad6-Rad18  
обеспечивают синтез ДНК  
в обход повреждения



Синтез продолжается после повреждения  
за счет полимеразы TLS



**Ветвь 1.** У многих бактерий, а также архей и эукариот выявлены несколько TLS ДНК-полимераз – ортологов ДНК-полимерамам IV и V *E.coli*. Большинство из них составляют к отдельное семейство ДНК-полимераз Y. В семейство Y входят ДНК-полимеразы: архея *Sulfolobus solfataricus* – Dbh и Dro4; дрожжи – Pol $\eta$  (*эма*) (RAD30A), Pol $\iota$  (*юта*) (Rad30B), а также ДНК-зависимая дезоксицитидилтрансфераза Rev1; человек/млекопитающие – Pol $\eta$  (гомолог XPV (*xeroderma pigmentosum variant*) или дрожжевого белка Rad30A), Pol $\iota$ , Pol $\kappa$  (*каппа*) и Rev1. Еще одна известная TLS-полимераза Pol  $\zeta$  (*дзета*) относится к семейству В ДНК-полимераз.

Все ДНК-полимеразы семейства Y лишены корректирующей 3'-5'-экзонуклеазной активности, что предотвращает удаление встраиваемого некомплементарного нуклеотида.

Эти ферменты способны помещать в свои активные центры поврежденные основания (обычные ДНК-полимеразы в таких случаях останавливаются) и, тем самым, обходить DD.

Однако некоторые TLS-полимеразы в определенных случаях способны осуществлять TLS, восстанавливая точную последовательность нуклеотидов в сайте DD. Это будет истинная репарация, причем error-free repair. Например, Pol $\eta$  преодолевает csTT (*cis-syn-тимин-тиминовый димер*), встраивая напротив него правильные нуклеотиды. В отсутствие Pol $\eta$  ее заменяют неточные Pol $\iota$  и Pol $\kappa$ . Отметим, что csTT является причиной примерно 80% всех УФ-индуцированных мутаций.

Во многих случаях в TLS участвуют две или более ДНК-полимеразы. Одна из них (инserter) встраивает нуклеотид напротив DD, тогда как другая (экстендер) продолжает синтез после встроенного нуклеотида. Если роль inserтеров могут играть большинство TLS-полимераз, то в качестве экстендера обычно выступает Pol $\zeta$ .

Возможно, что участие в TLS Pol $\zeta$ , отличающейся большей точностью, в качестве экстендера вместе с менее точными inserтерами Pol $\eta$  и Pol $\kappa$  позволяет снижать мутагенное действие последних.

Поскольку TLS-ДНК-полимеразы эффективны на поврежденных и низко процессивны и неточны на неповрежденных матрицах, необходимо удалить их из вилки репликации после прохождения через DD и заменить их на обычные (точные) репликативные ДНК-полимеразы.

Вследствие высокого мутагенного потенциала TLS-полимераз для клетки жизненно важно регулировать их взаимодействия с ДНК.

Система регуляции активности и смены отдельных ДНК полимераз в вилке репликации сложна и мало изучена.

Однако можно привести некоторые из механизмов, лежащих в основе такой регуляции:

TLS-полимеразы отличаются низкой процессивностью на неповрежденных матрицах и высокой – на поврежденных.

Решающую роль в обеспечении процессивности играет скользящий эажим.

Как было отмечено выше, TLS-полимеразы взаимодействуют с белками-зажимами ДНК типа PCNA, которые удерживают в контакте репликативные ДНК-полимеразы и ДНК-матрицы.

Например, Pol IV и Pol V *E.coli* взаимодействуют с гомодимером  $\beta$ -субъединиц ДНК-полимеразы III, представляющим собой ДНК-зажим.

Эукариотические TLS-полимеразы  $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$  и  $\zeta$  физически контактируют с гомотримерным PCNA. Такие взаимодействия позволяют полагать, что зажим может служить платформой, удерживающей вместе и репликативную, и TLS-полимеразу, тем самым обеспечивая возможность их переключения в зависимости от необходимости в одной из них.

Альтернативная возможность заключается в последовательных взаимодействиях различных ДНК-полимераз с PCNA, где посттрансляционная модификация зажима может осуществлять переключение полимераз с обычной на TLS и обратно.

В клетках мыши мутаген бенз[α]пирендигидродиолэпоксид (BPDE) индуцирует арест репликации ДНК (чекпойнт S-фазы) и вызывает моноубиквитинирование белка PCNA.

Моноубиквитинированный PCNA привлекает TLS Pol $\kappa$ , которая осуществляет обход DD и освобождение от ареста репликации.

В клетках мутанта (*rad18*), дефектного по E3 убиквитинлигазе Rad18, PCNA не способен к взаимодействию с Pol $\kappa$ . Наоборот, сверхэкспрессия белка Rad18 индуцирует убиквитинирование PCNA и ассоциацию PCNA с Pol $\kappa$  независимо от DD.

Взаимодействия TLS-полимераз с зажимом может не только удерживать TLS-полимеразу в позиции, позволяющей быстрое прохождение через DD, но могут устранять ее потенциальную мутагенность или ограничивать доступ к неповрежденной ДНК, то есть регулировать функции TLS-полимераз.

Известен альтернативный гетеротримерный ДНК-зажим, проявляющий структурное сходство с PCNA и называемый 9-1-1.

У млекопитающих и дрожжей *Schizosaccharomces pombe* зажим 9-1-1 представляет собой комплекс белков RAD9-HUS1-RAD1, откуда происходит его название.

У дрожжей *S.cerevisiae* комплексу 9-1-1 соответствуют белки Rad17, Mec3 и Ddc1.

У *S.cerevisiae* комплекс Rad6-Rad18 активирует функции чекпойнтов в ответ на DD, катализируя моноубиквитинирование K197 в Rad17 – субъединице комплекса 9-1-1.

Основная функция 9-1-1 заключается в активации DD-чекпойнта, поэтому его обычно называют чекпойнтовым комплексом.

Кроме того, он может ассоциировать с несколькими репарационными белками, например, белком NER Rad14 *S.cerevisiae* и другими белками дрожжей и млекопитающих.

Такое разнообразие взаимодействий указывает на непосредственное участие 9-1-1 в регуляции процессов репарации.

Кроме того, комплекс 9-1-1 может быть вовлечен в регуляцию индуцированного Pol $\zeta$ -зависимого мутагенеза, так как у мутантов *rad17* и *tes3* *S.cerevisiae* наблюдается снижение уровня УФ-мутагенеза, сходное с таковым у мутанта, дефектного по Pol $\zeta$ .

Показано также, что комплекс необходим для рекрутирования Pol $\zeta$  к DD, что объясняет роль комплекса в УФ-мутагенезе.

Более того, 9-1-1 частично требуется для спонтанного Pol $\zeta$ -зависимого мутагенеза.

Таким образом, этот чекпойнтовый зажим является важным регулятором TLS в осуществлении и спонтанного, и индуцированного мутагенеза.

В совокупности представленные данные свидетельствуют о роли комплекса белков Rad6-Rad18 в глобальном контроле генов в пути, эквивалентном SOS-ответу у бактерий, а также в координации различных путей DD-ответов через убиквитинирование двух ДНК-зажимов – PCNA и 9-1-1.

## PRR: ВЕТВЬ 2

### ПЕРЕКЛЮЧЕНИЕ ЦЕПЕЙ ДНК В ВИЛКЕ РЕПЛИКАЦИИ

Продолжение рисунка: Толерантность к повреждению ДНК обеспечивается переключением матриц белком Rad5.

Ветвь 2 (по существу, это тот же механизм *copy choice*).

Полиубиквитинирование PCNA в положении K63 запускает путь переключения матричных цепей.

С помощью генетического анализа у дрожжей, в дополнение к *RAD6* и *RAD18*, идентифицированы еще 3 гена, *MMS2*, *UBC13* и *RAD5*, которые выполняют важные функции в этом субпути.

Белок Ubc13 – убиквитин-конъюгирующий фермент, который формирует гетеродимер с Mms2.

Еще одним участником может быть SUMO-конъюгирующий белок Ubc9.

Все 3 модификации (с участием Rad6-Rad18, Rad5-Ubc13-Mms2 и Ubc9) затрагивают один и тот же консервативный (и у дрожжей, и у человека) лизиновый остаток **K63** в PCNA, то есть метят PCNA для выполнения им альтернативных функций. Показано, что эти модификации по-разному влияют на устойчивость к DD.

Продолжение рисунка: Толерантность к повреждению ДНК обеспечивается переключением матриц белком Rad5

Белок Rad5 – член семейства SWI/SNF, который сочетает активности АТФ-азы, ДНК-хеликазы, ренатурации (отжига) цепей ДНК, а также E3-убиквитин-лигазы.

Rad5 узнает разветвленные молекулы ДНК (с тремя или четырьмя отростками) и связывается с ними. Он способен расплести структуры типа вилок репликации с тремя отростками при условии, что отростки гомологичны.

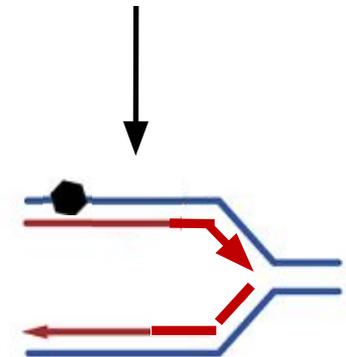
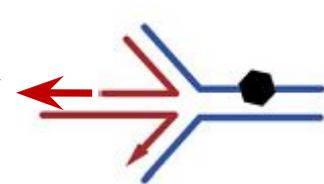
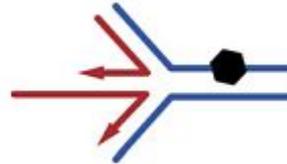
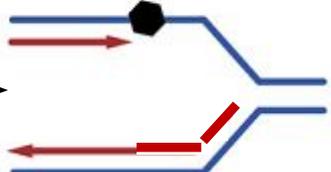
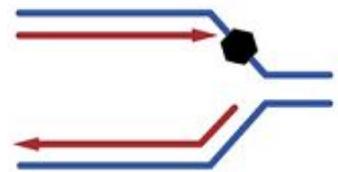
Эти данные объясняют, как Rad5 может путем расплетания и последующего отжига новосинтезированных цепей формировать из вилки репликации структуру с четырьмя отростками, известную в литературе под названием «*chicken foot*».

# Толерантность к повреждению ДНК обеспечивается переключением матриц белком Rad5

Удлинение отстающей цепи, образование бреши в лидирующей цепи

Реверсия вилки репликации за счет хеликазной и ренатурирующей активности белка Rad5

Удлинение участка дочерней лидирующей цепи с использованием отстающей цепи в качестве матрицы



Восстановленная вилка репликации

Rad6-Rad18 и Rad5-Ubc13-Mms2 переключают синтез с одной матрицы на другую

Белок PCNA, моноубиквитинированный по K63 комплексом Rad6-Rad18, далее может быть модифицирован путем полиубиквитинирования (последовательного присоединения к K63 дополнительных остатков убиквитина) с помощью белков Rad5, Ubc13 и Mms2, чтобы обеспечить обход DD путем переключения матриц.

На рисунке отстающая цепь растет, при этом в лидирующей цепи напротив DD остается брешь.

Белок Rad5 осуществляет реверсию вилки репликации за счет сочетания хеликазной и ренатурирующей активностей и формирует вилку из четырех отростков, в которой спарены дочерние и матричные цепи (структура *chicken foot*). В таком случае дочерняя отстающая цепь может служить в качестве матрицы для роста лидирующей цепи (репаративный синтез).

Реверсированная вилка должна регрессировать путем обратной миграции ветвей, чтобы восстановить вилку уже с тремя отростками и завершить репликацию.