Сохранение и модификация ДНК:

РЕПАРАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ

Часть 1

Мутации и мутагены

Основные термины

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

Мутационная теория

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

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

Классификация мутаций

I. **В зависимости от факторов, вызывающих мутации, их разделяют на спонтанные и индуцированные.**

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

Классификация мутаций

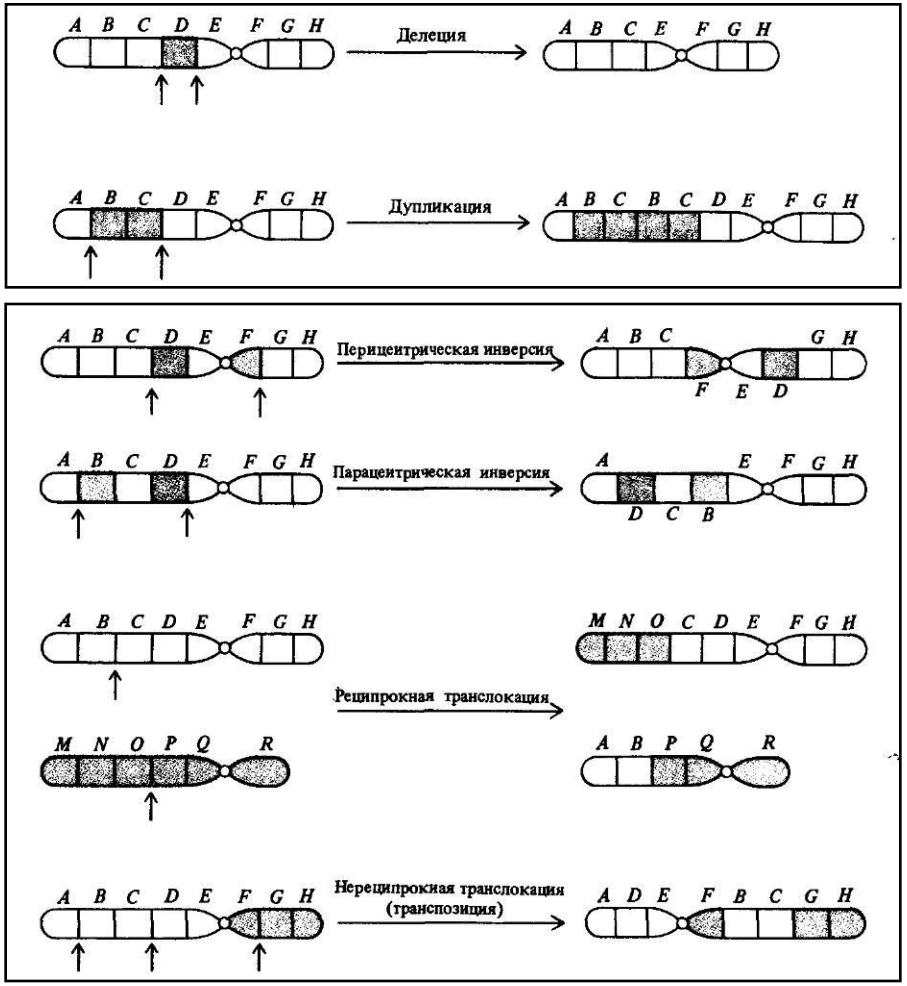
II. **В зависимости от размеров сегментов генома, подвергающихся преобразованиям, мутации разделяют на геномные, хромосомные и генные.**

1. **<u>При геномных мутациях</u>** происходит внезапное изменение числа хромосом, кратное целому геному.

   а) <u>Полиплоидизация</u> – умножение наборов хромосом, при котором происходит образование полиплоидных организмов, геном которых представлен 4n, 6n и т.д. В зависимости от происхождения хромосом в полиплоидах различают

   - <u>Аллополиплоидию</u> в результате которой происходит объединение при гибридизации *целых неродственных* геномов.
   - <u>Аутополиплоидию</u> для которой характерно адекватное увеличение числа хромосом *собственного генома*, кратное 2n.

Классификация мутаций



2. **<u>При хромосомных мутациях</u>** происходят как изменение числа отдельных хромосом в геноме (<u>анеуплоидия</u>), так и крупные перестройки структуры отдельных хромосом (<u>хромосомные аберрации</u>):

a) <u>Делеция</u> - потеря части генетического материала.

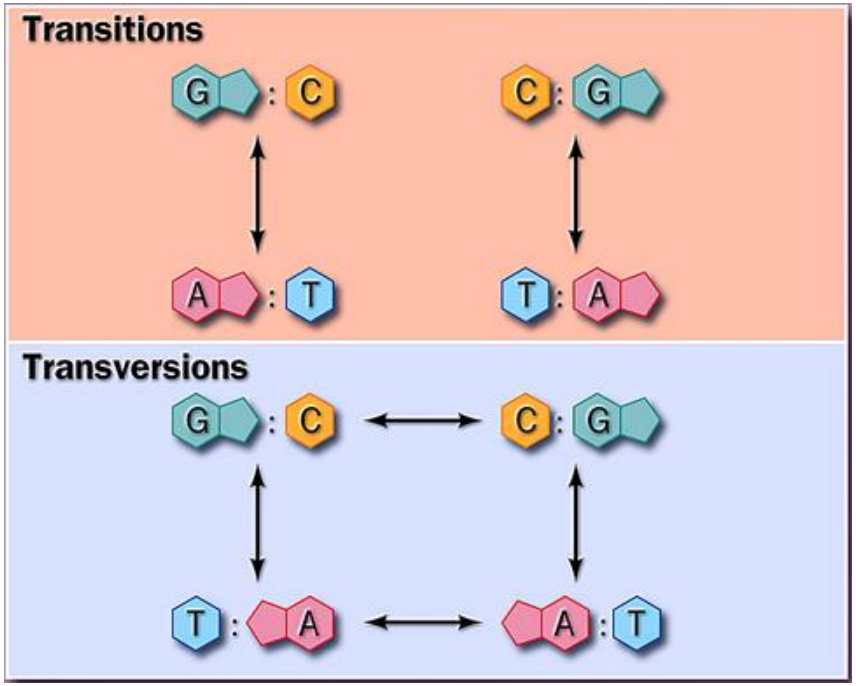
b) <u>Дупликация</u> - удвоение части генетического материала.

c) <u>Инверсия</u> - изменение ориентации сегментов хромосом в отдельных хромосомах.

d) <u>Транслокация</u> - перенос части генетического материала с одной хромосомы на другую.

Классификация мутаций

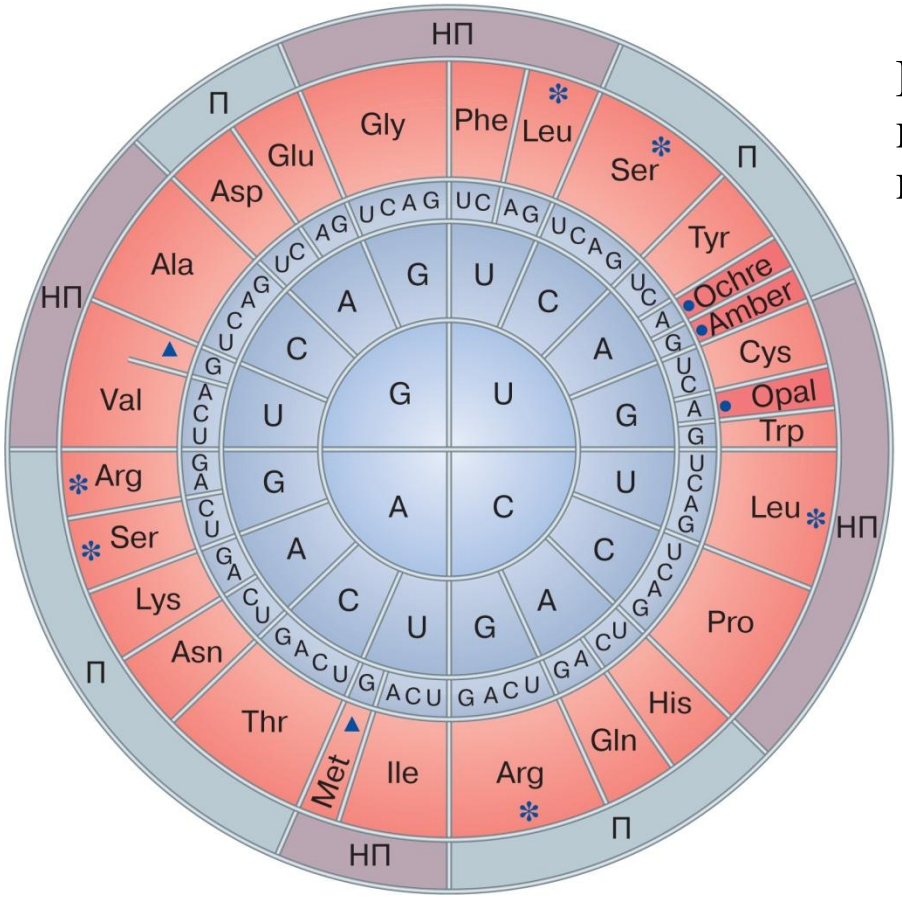
3. **<u>Генные мутации</u>** - изменения первичной структуры ДНК генов под действием мутагенных факторов (встречаются более часто, чем предыдущие два типа мутаций).
   a) В результате генных мутаций происходят замены, делеции и вставки одного или нескольких нуклеотидов, транслокации, дупликации и инверсии различных частей гена.



b) Если изменяется лишь один нуклеотид, говорят о <u>точковых мутациях</u>. Точковые мутации с заменой оснований разделяют на два класса:

- <u>транзиции</u> (замена пурина на пурин или пиримидина на пиримидин)
- <u>трансверсии</u> (замена пурина на пиримидин или наоборот).

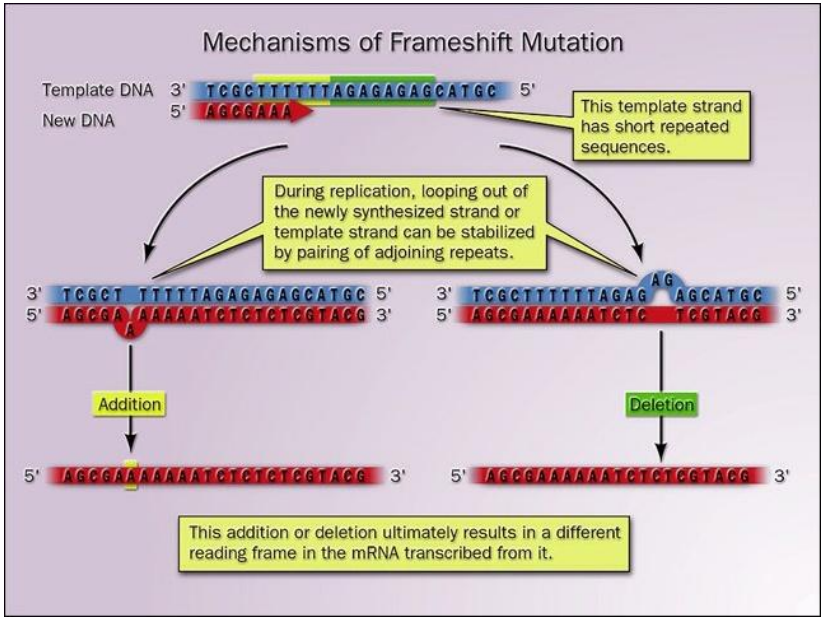
Классификация мутаций

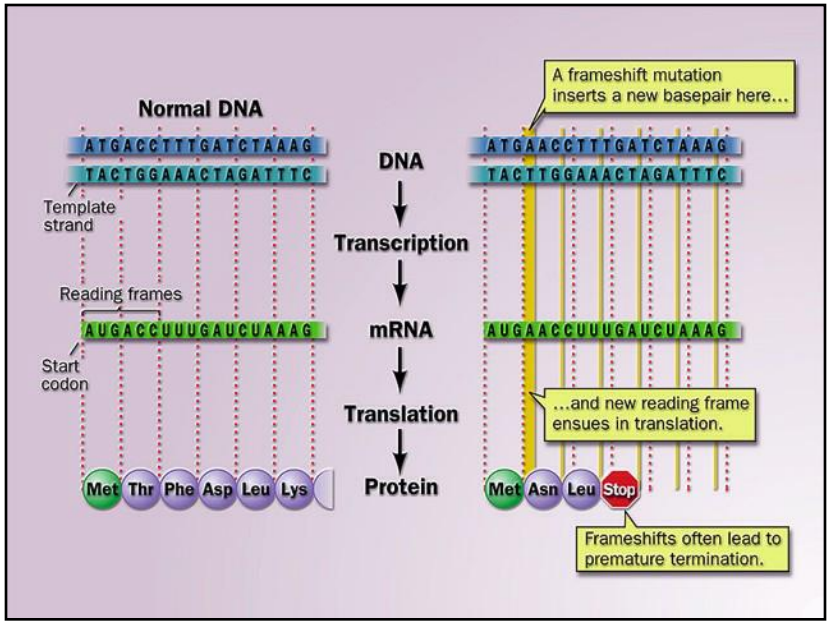


Из-за вырожденности генетического кода могут быть три генетических последствия точковых мутаций:

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

Классификация мутаций





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

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

Классификация мутаций

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

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

Основные источники мутаций

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

Ошибки репликации

Точность процесса репликации определяется:

1. Различиями в свободной энергии у канонических или ошибочных пар азотистых оснований ДНК, образующихся по правилам Уотсона–Крика в водных растворах (различия порядка~1–3 ккал/моль и обеспечивают точность 1 ошибка на каждые 100 нуклеотидов).
2. Наличием свойственной многим бактериальным и эукариотическим ДНК-полимеразам 3’→5’-экзонуклеазной корректирующей активности (ошибочно включенные нуклеотиды, некомплементарные матрице, удаляются с 3’-конца растущей цепи ДНК перед включением следующего нуклеотида в строящуюся цепь ДНК).

- **Таким образом точность функционирования ДНК-полимераз не является абсолютной**, а зависит от взаимодействия белков и ферментов системы репликации и матричной ДНК. Изменение свойств этих белков или матрицы как спонтанно, так и под действием различных модифицирующих агентов приводит к ошибкам в репликации ДНК и мутациям.

Мутагенные воздействия

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

Ионизирующее излучение

Ярко выраженным мутагенным действием обладают:

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

Механизм воздействия:

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

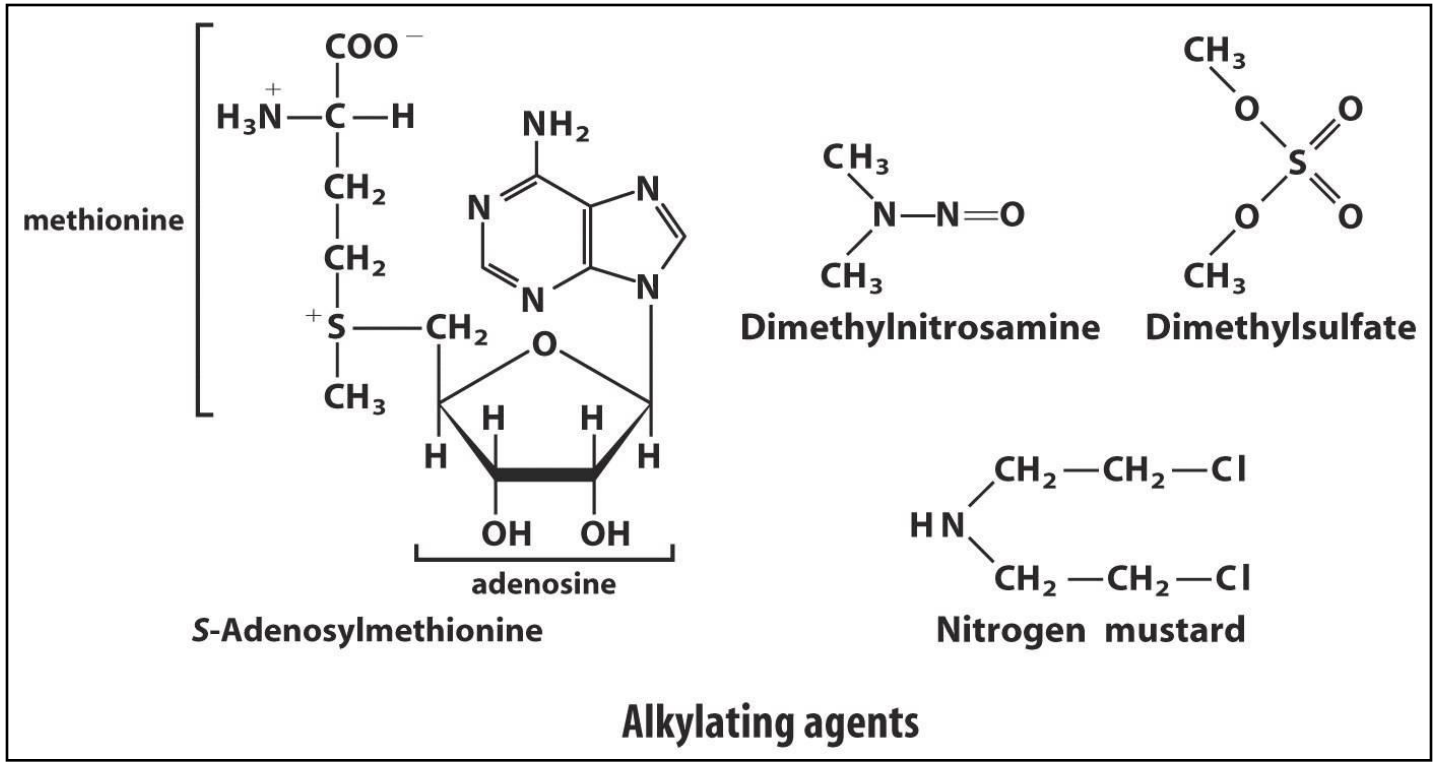
Химические мутагены

- Многие химические соединения обладают способностью взаимодействовать с ДНК или с ее низкомолекулярными предшественниками и вызывать мутации. Химические мутагены можно разделить на две большие группы

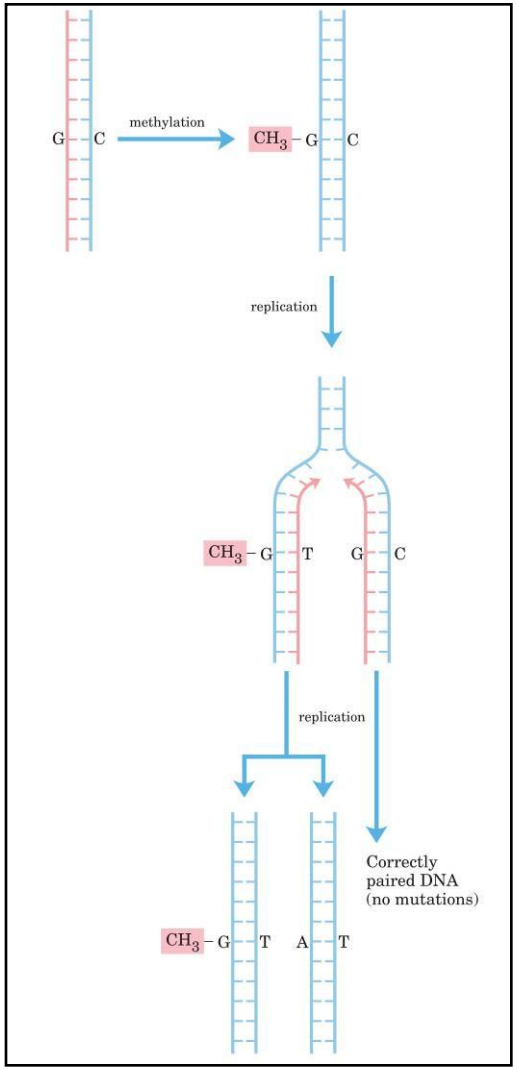
1. “Явные мутагены” - химические соединения изначально являются реакционноспособными мутагенами, способными непосредственно взаимодействовать с ДНК и изменять ее химическую структуру.
2. “Скрытые мутагены” или промутагены – исходные химические соединения для превращения в мутагены сначала претерпевают *метаболическую активацию* под действием ферментативных систем организма.

Алкилирующие агенты

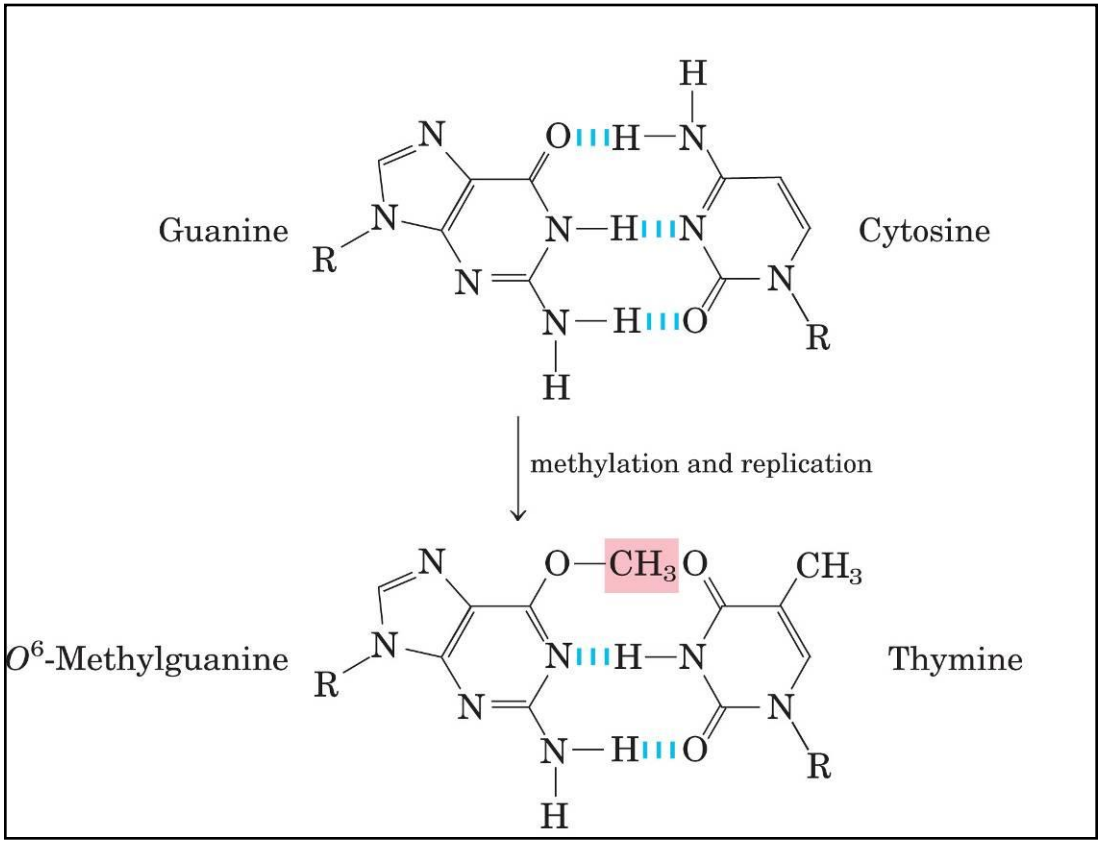
- Наиболее обширным классом химических мутагенов экзогенного происхождения являются **алкилирующие агенты**.
- Механизм повреждающего воздействия заключается в спонтанном (без участия ферментативных систем организма) переносе алкильных групп этих химических соединений на биологические макромолекулы,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

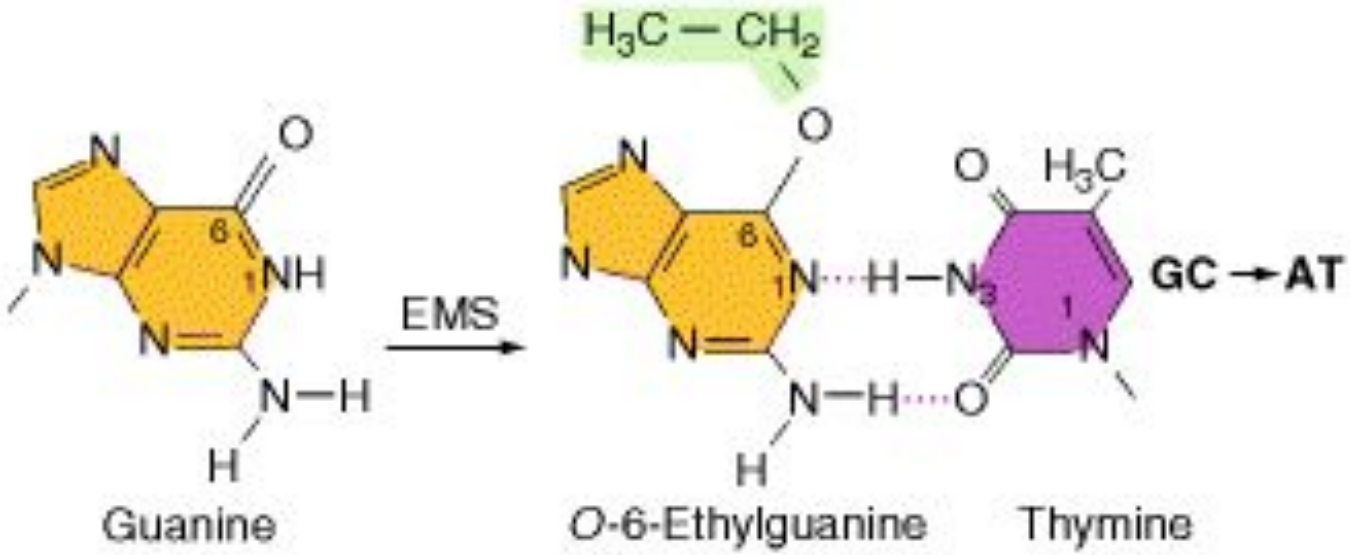


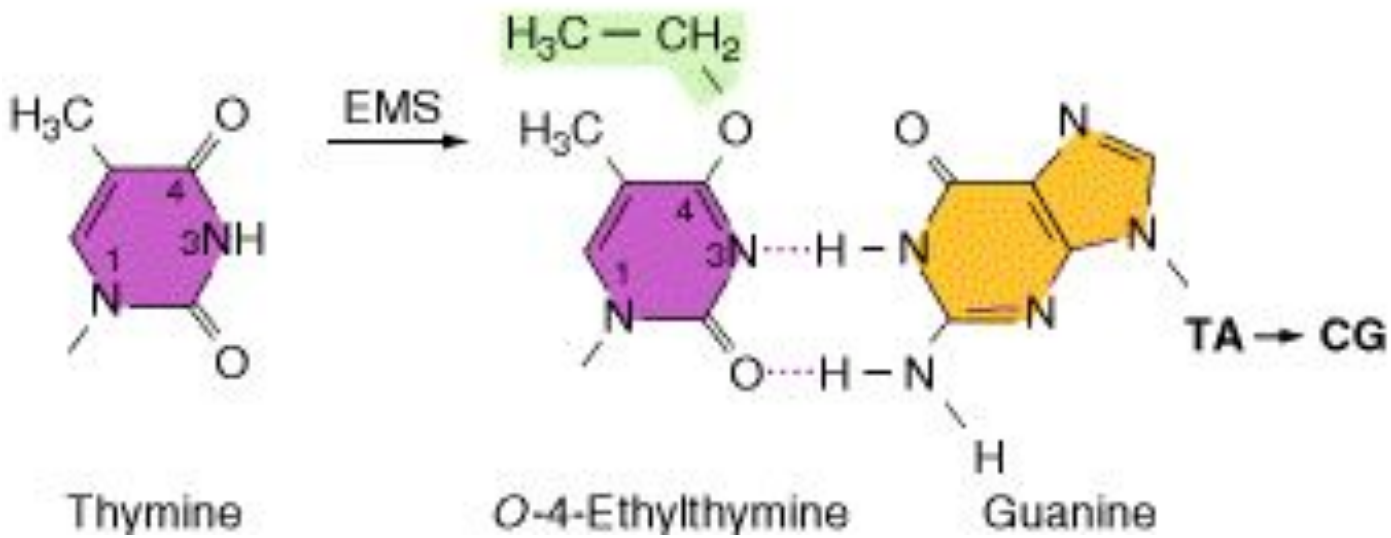
Алкилирующие агенты



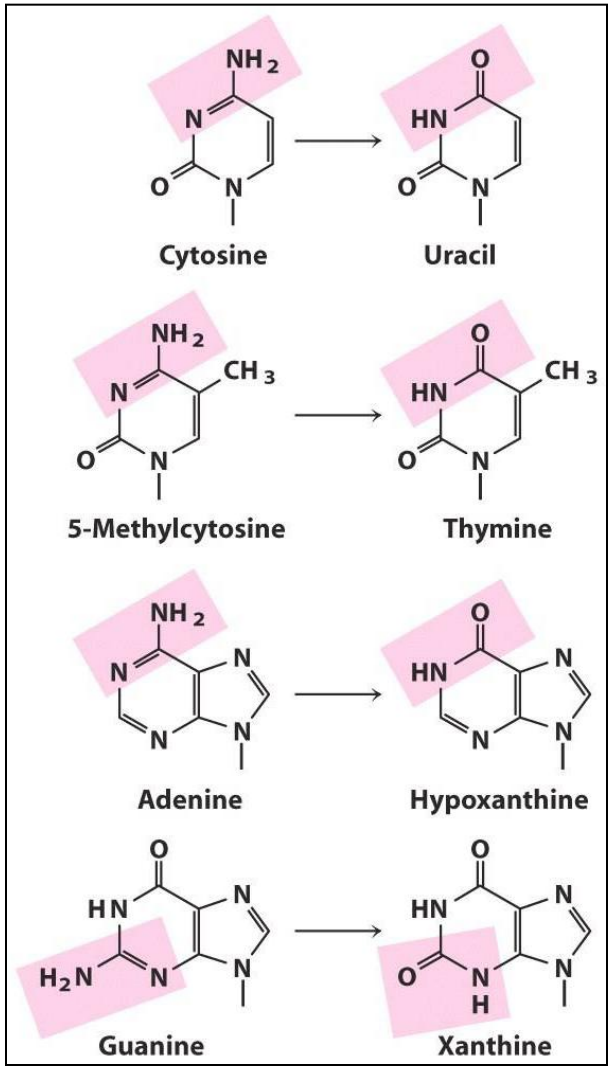
- Главным источником мутаций, возникающих под действием алкилирующих агентов, является алкилирование O-6 в гуанине и O-4 в тимине ДНК.




H3C — CH2
EMS
GC → AT
Guanine
O-6-Ethylguanine
Thymine


H3C — CH2
EMS
TA → CG
Thymine
O-4-Ethylthymine
Guanine

Азотистая кислота как мутаген



<u>Азотистая кислота</u> образуется из нитритов ($NaNO_2$ и KNO_2) в водных растворах при низких значениях pH.

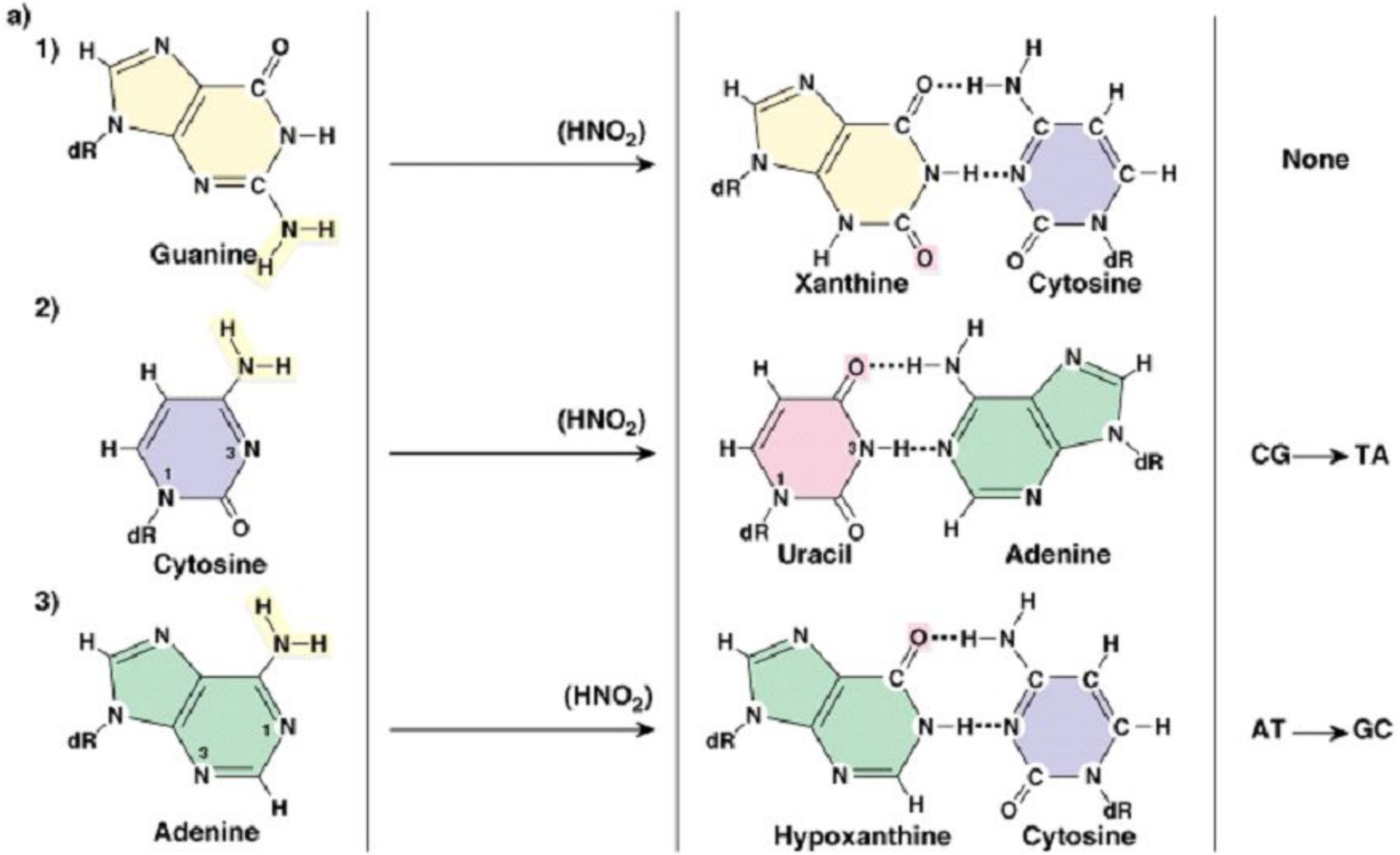
- Механизм повреждающего действия заключается в дезаминировании азотистых оснований нуклеиновых кислот.

В результате:

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

Дезаминирование

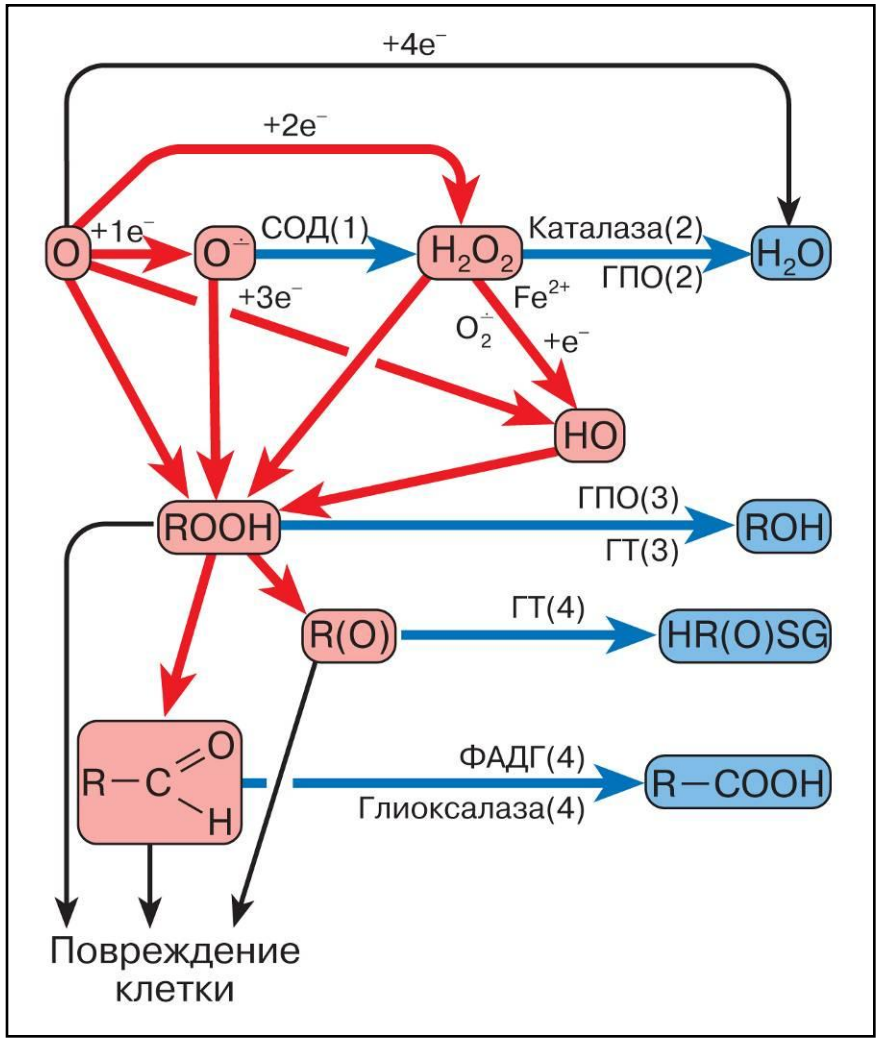
основание	мутаген	модиф.	партнер по	мутагенный



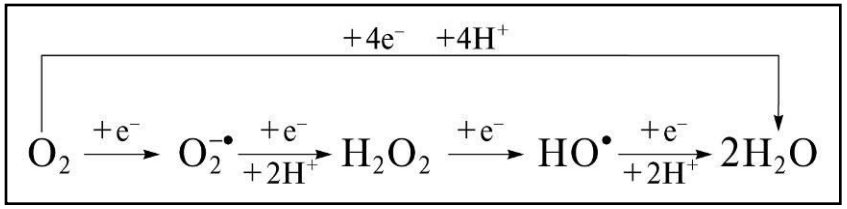
Органические перекиси как мутагены

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

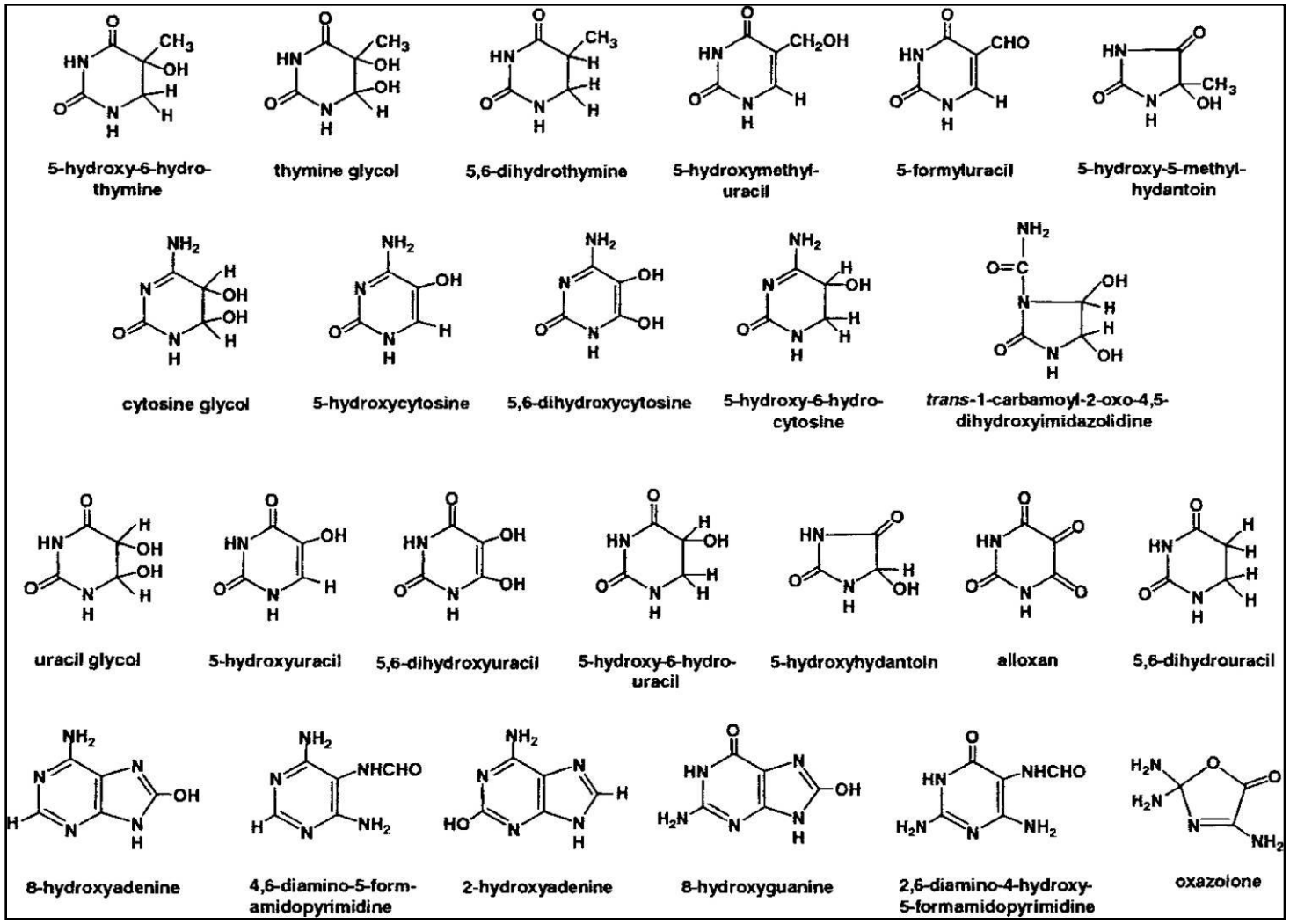
Активные формы кислорода



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



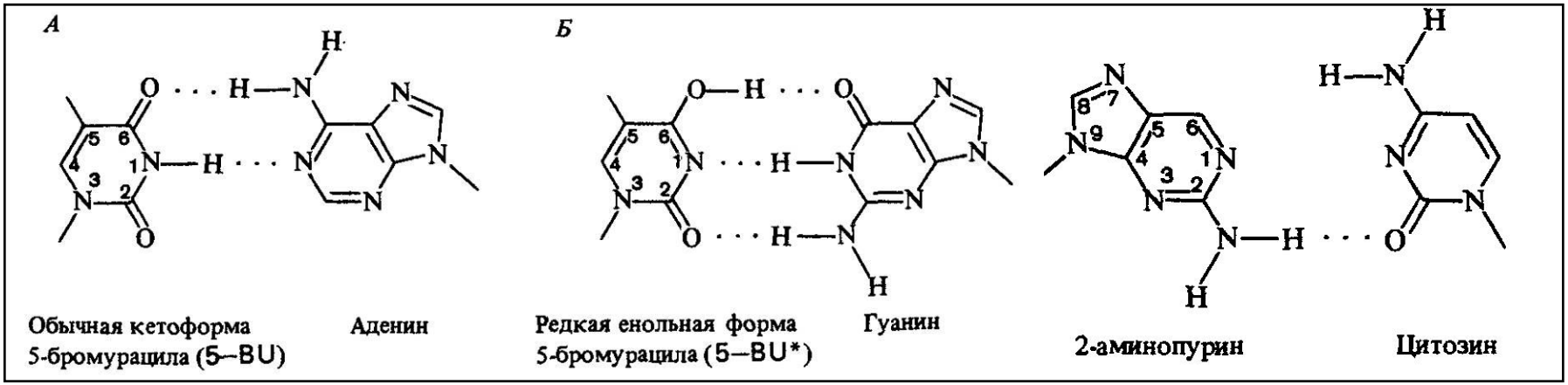
Активные формы кислорода



Аналоги нуклеозидов и оснований

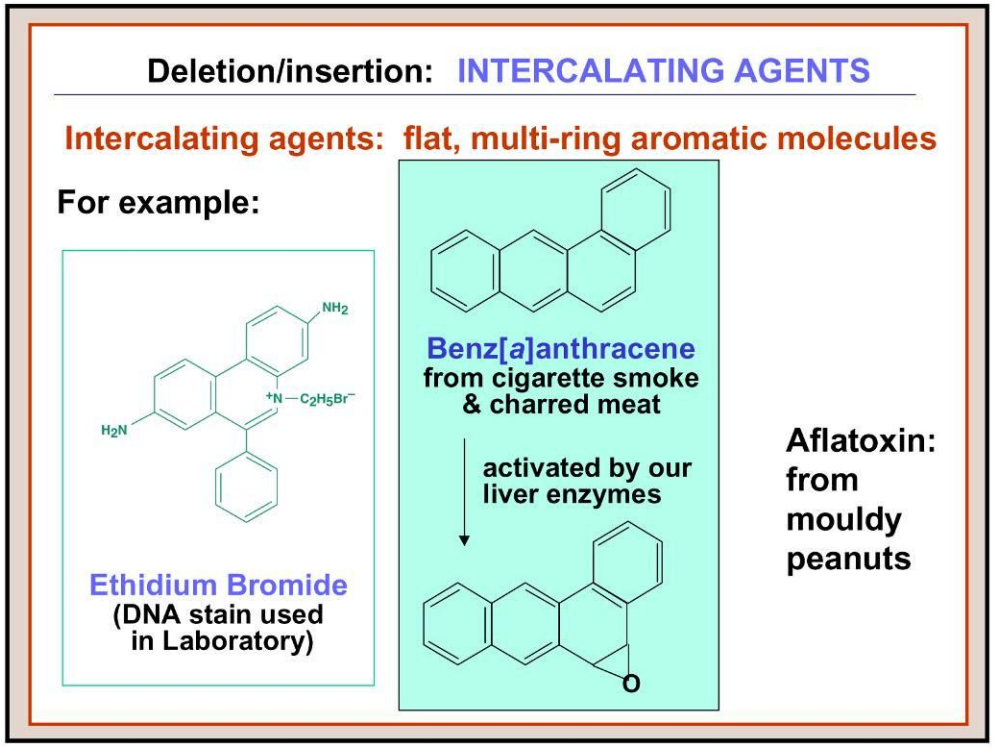
Аналоги нуклеозидов и оснований: 5-бромдезоксиуридин и 2-аминопурин, так же являются сильными мутагенами.

- **<u>5-бромдезоксиуридин</u>** обычно включается в ДНК вместо цитозина и спаривается с аденином, что приводит к образованию транзиций GC→AT.
- **<u>2-аминопурин</u>** включается вместо аденина и спаривается с цитозином, в результате чего возникают обратные транзиции AT→GC.

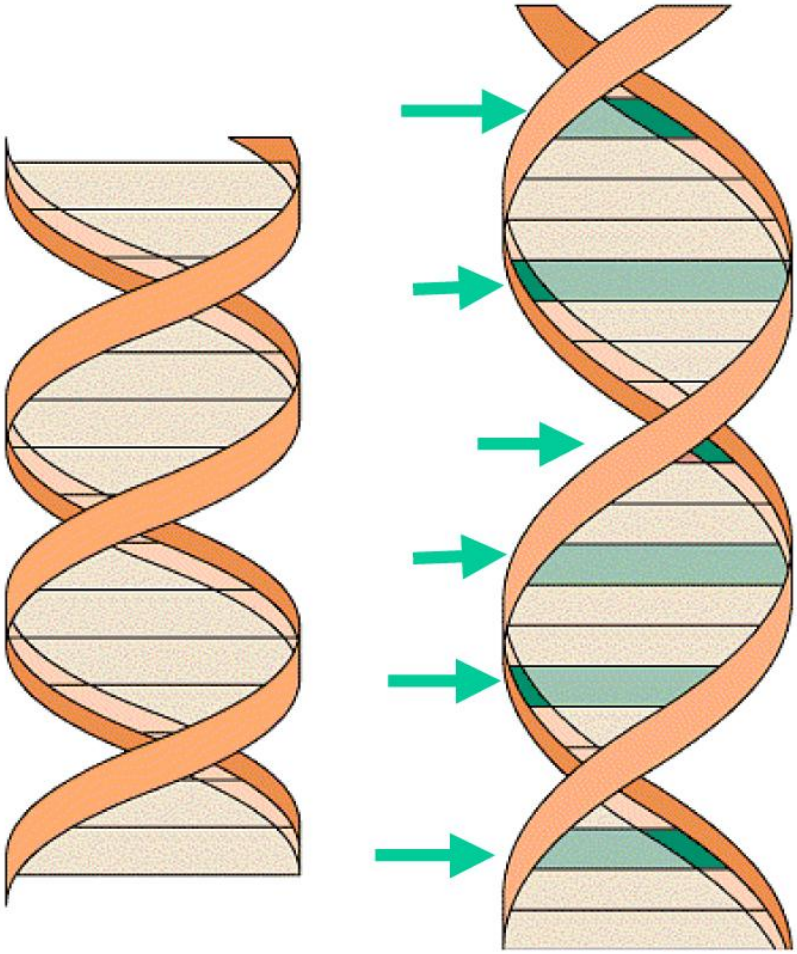


Интеркалирующие соединения

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



Deletion/insertion: INTERCALATING AGENTS



Original DNA

DNA stretched by intercalated ligands

Stretching changes the frame needed by DNA Polymerase during replication.

Extra nucleotides are added during replication

The DNA reading frame for RNA synthesis is changed:

amino acid changes

altered protein

Метаболическая активация проканцерогенов

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

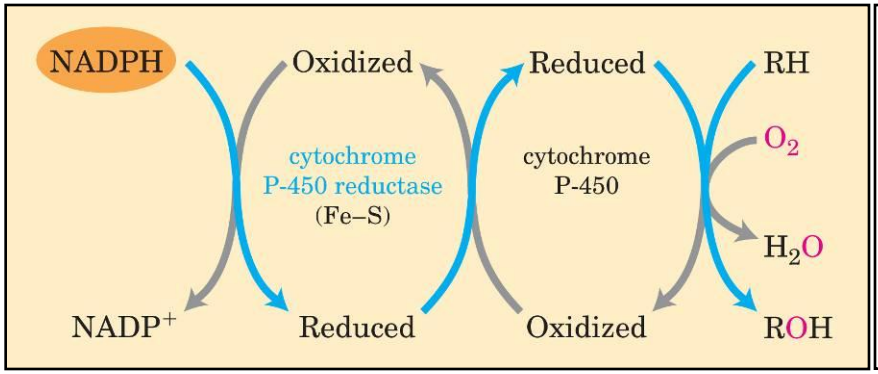
Цитохромы Р-450

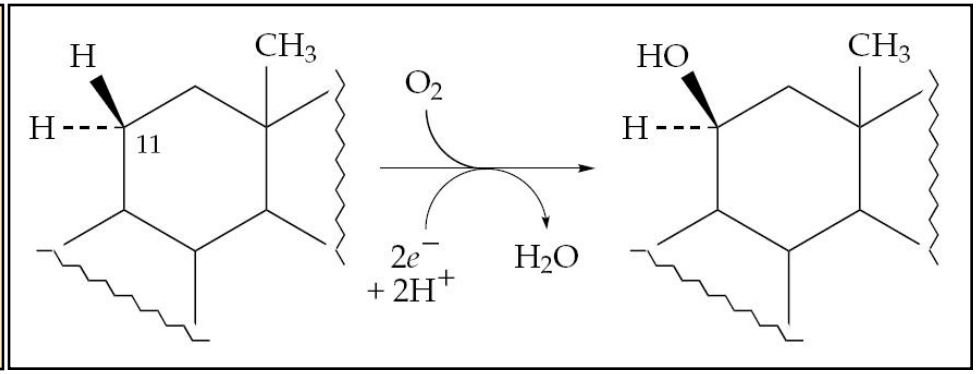
В первой фазе метаболизма ксенобиотиков принимают участие **цитохромы <u>группы Р-450</u>**. Эти ферменты в организме представлены большим числом (>20) изоформ, каждая из которых, как правило, обладает широкой субстратной специфичностью.

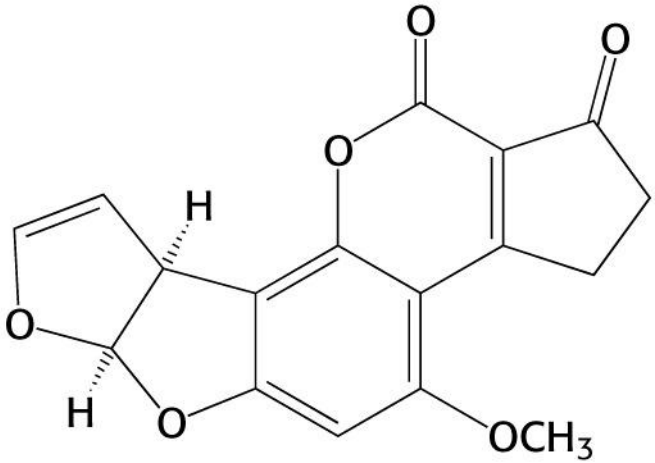
- Обобщенное уравнение химической реакции, осуществляемой цитохромами Р-450:

  $S + NAD(P)H + O_2 \rightarrow SO + NAD(P)+ + H_2O$

  (S – молекула субстрата, а SO – ее окисленная форма)
- Молекулы цитохрома Р- 450 интегрированы в мембраны гладкого ЭР, которые так же содержат небольшую электронтранспортную цепь.

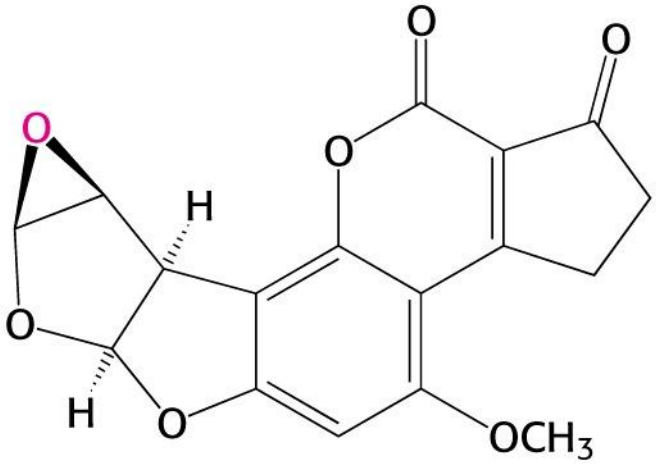






Aflatoxin B_1

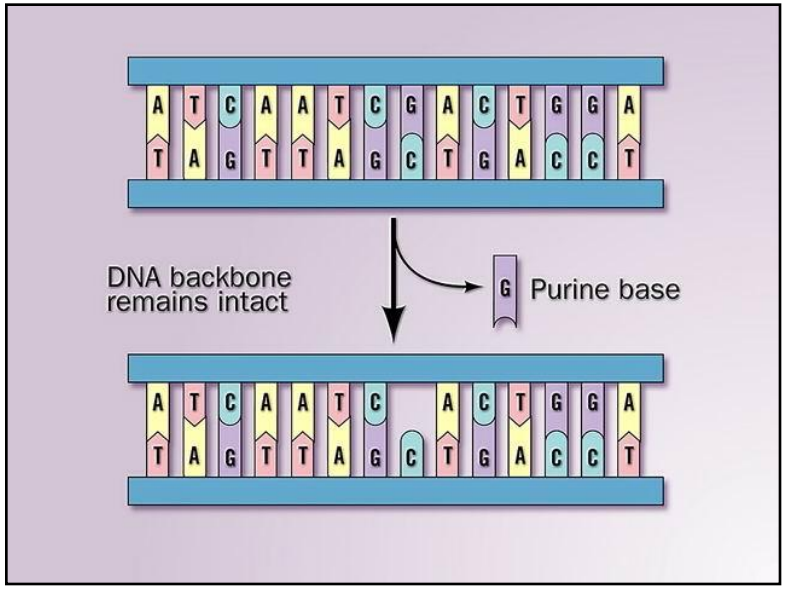
Cytochrome P450

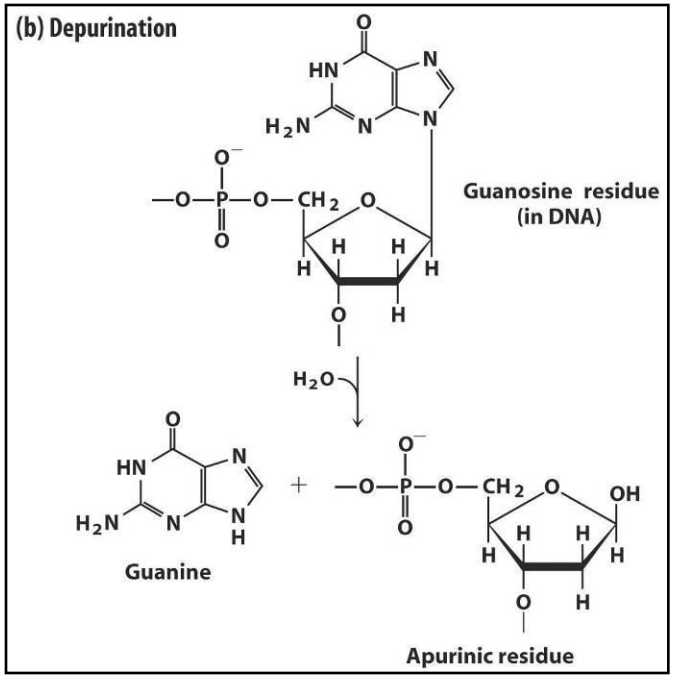


Active DNA-modifying agent

Эндогенные мутагены

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





При тепловой депуринизации происходит разрыв лабильной β-N-гликозидной связи (между основанием и рибозой). Наиболее легко это происходит для пуриновых нуклеотидов, для пиримидинов более трудно.

В результате в молекуле ДНК на месте этих оснований образуется брешь, названная **<u>АП-сайтом</u>** (разрыв фосфодиэфирного остова не происходит).

Эндогенные мутагены

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

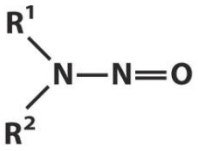
5-Метилцитозин – одно из модифицированных оснований ДНК, представляет собой "**горячую точку**" возникновения мутаций путем спонтанного дезаминирования, так как в результате удаления его аминогруппы образуется нормальное основание Т, не распознаваемое системами репарации как мутантное.

Эндогенные мутагены

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

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

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



Nitrosamine

Часть 2

Механизмы репарации

Определение

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

Общие сведения

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

Основной принцип репарации

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

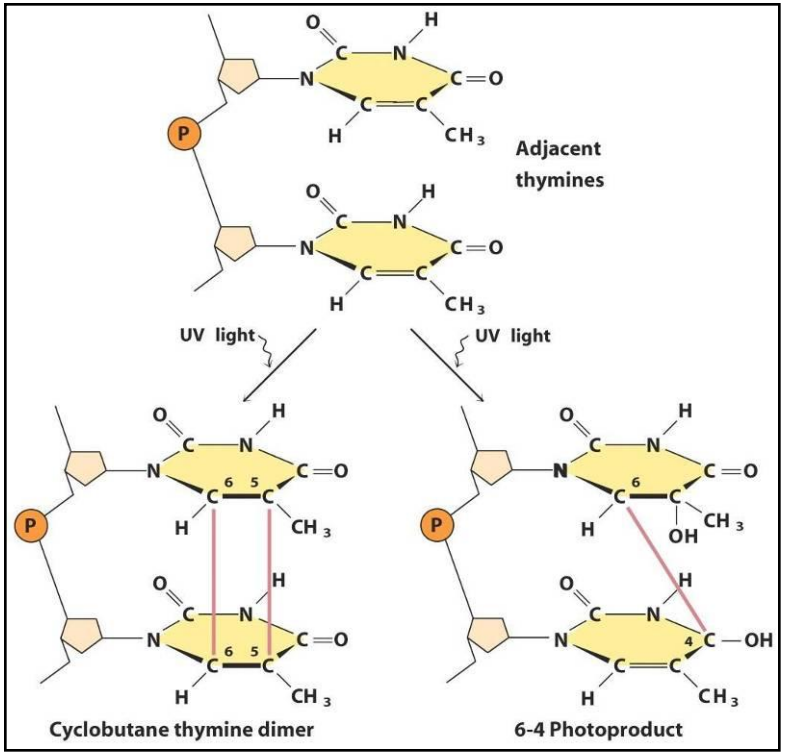
Повреждения ДНК

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

Основные повреждающие факторы

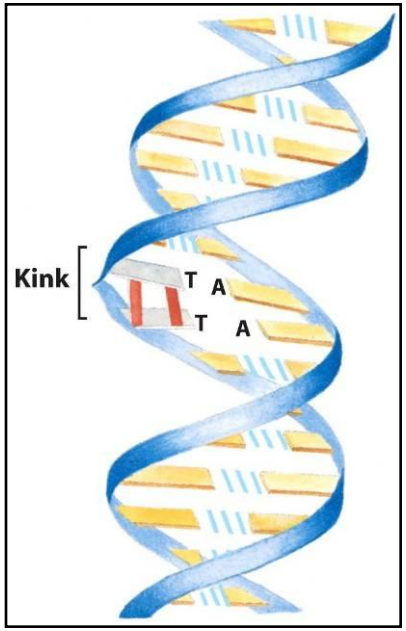
- Ионизирующие агенты:
  - Ультрафиолетовый свет.
  - Радиоактивные вещества.
  - Активные формы кислорода.
- Химические мутагены (например алкилирующие агенты).
- Эндогенные мутагены.
- Ошибки ферментов репликации.
- Мутации в генах ферментов общего метаболизма ДНК и как следствие увеличение частоты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

Пиримидиновые димеры



Двойная связь между пятым и шестым атомами углерода в составе пиримидиновых оснований под действием УФ-света может рваться.

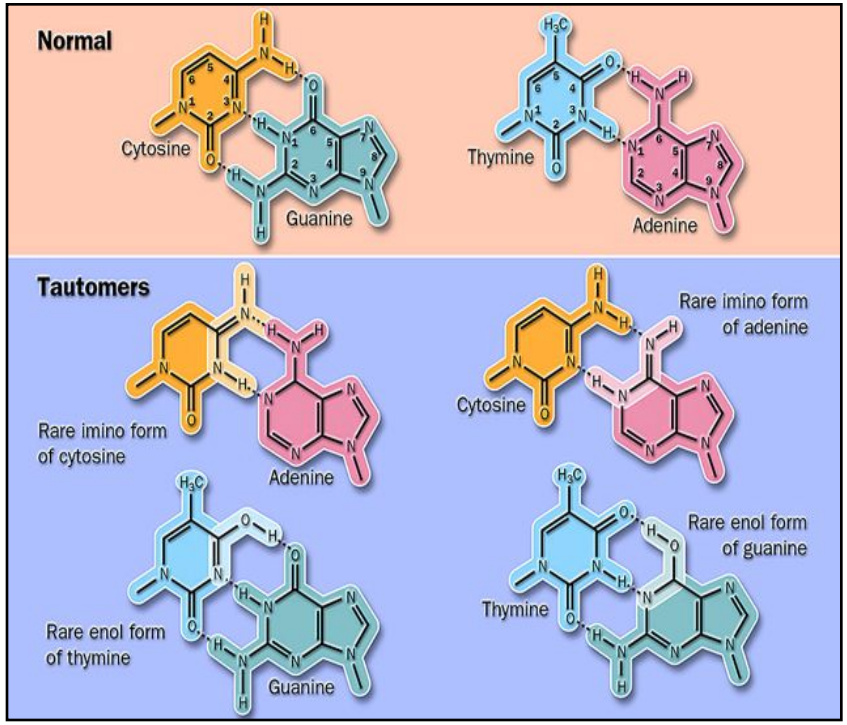
Атомы остаются связанными одиночной связью, а в результате разрыва другой связи образуются две свободные валентности.



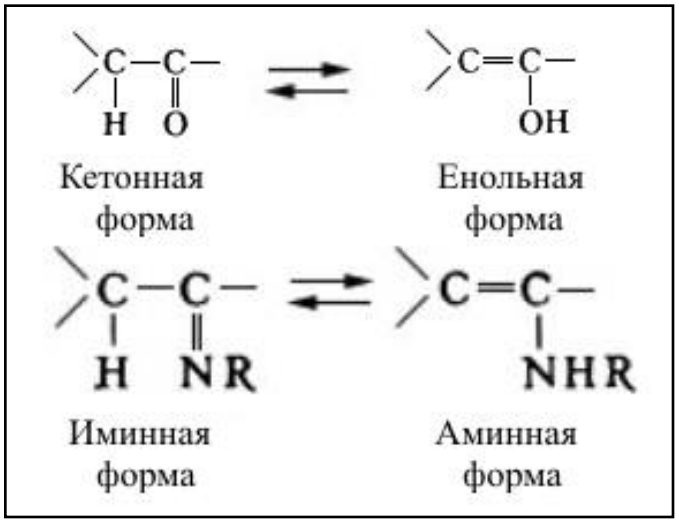
Расстояние между параллельными плоскостями оснований в B-форме оказывается как раз таким, чтобы освободившиеся при УФ-облучении валентности между C5-C6 атомами пиримидиновых оснований, расположенных рядом в цепи ДНК, могли замкнуться друг на друга и сформировать циклобутановое кольцо.

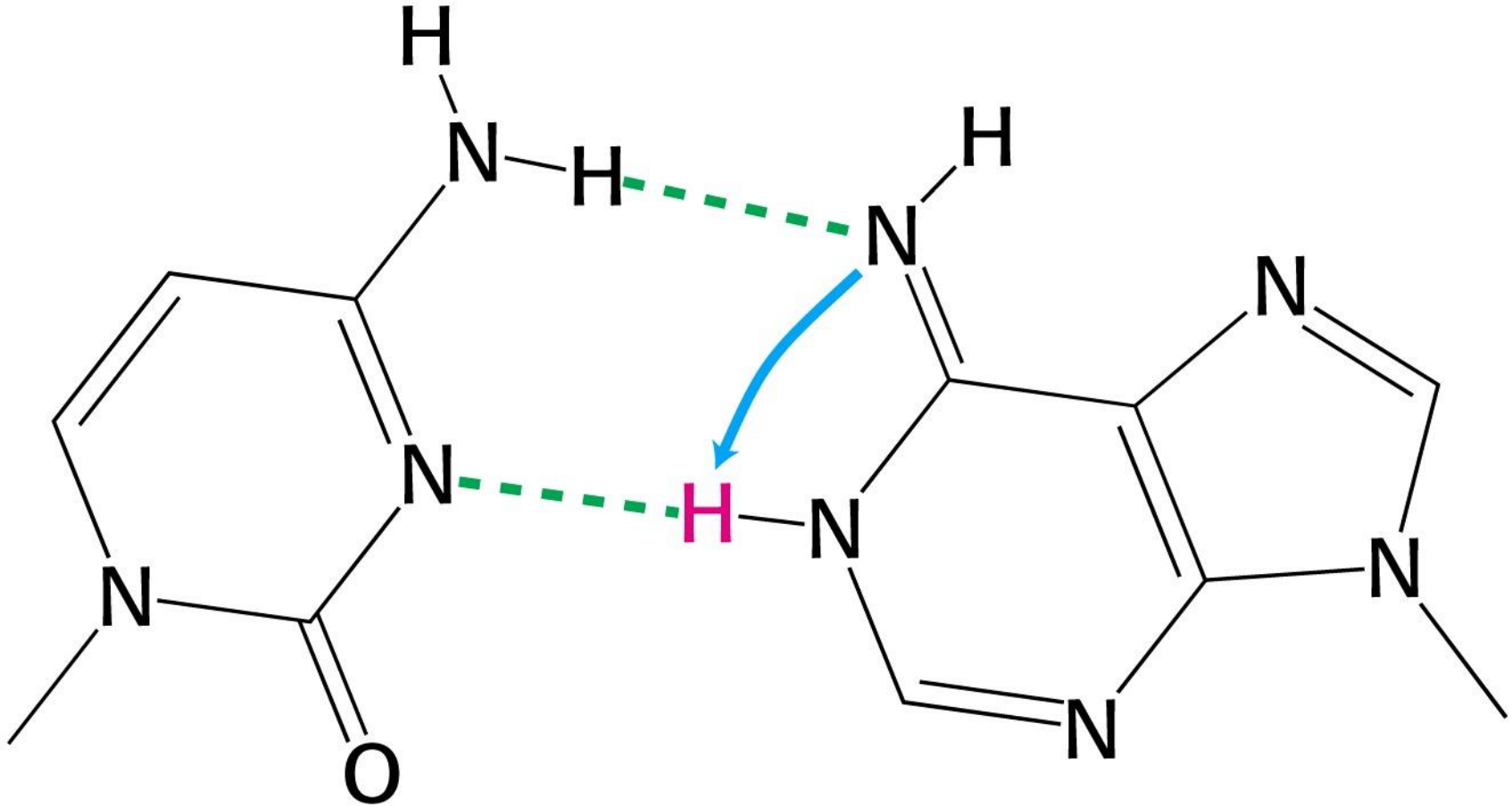
Таутомерные переходы

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



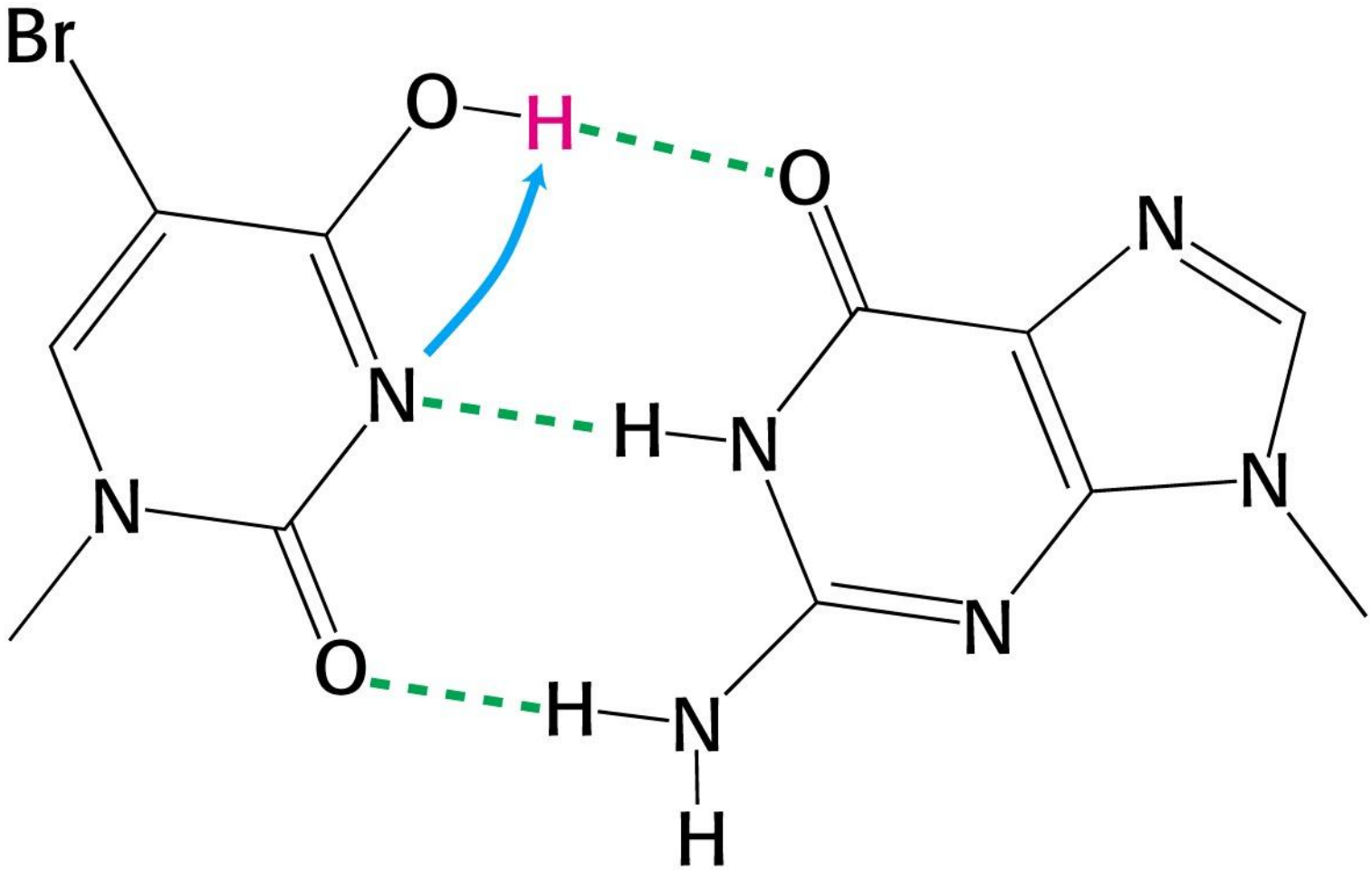
- Образующиеся в момент репликации <u>редкие иминные и енольные формы</u> оснований влекут за собой их ошибочное спаривание, а следовательно понижают точность работы ДНК-полимераз.





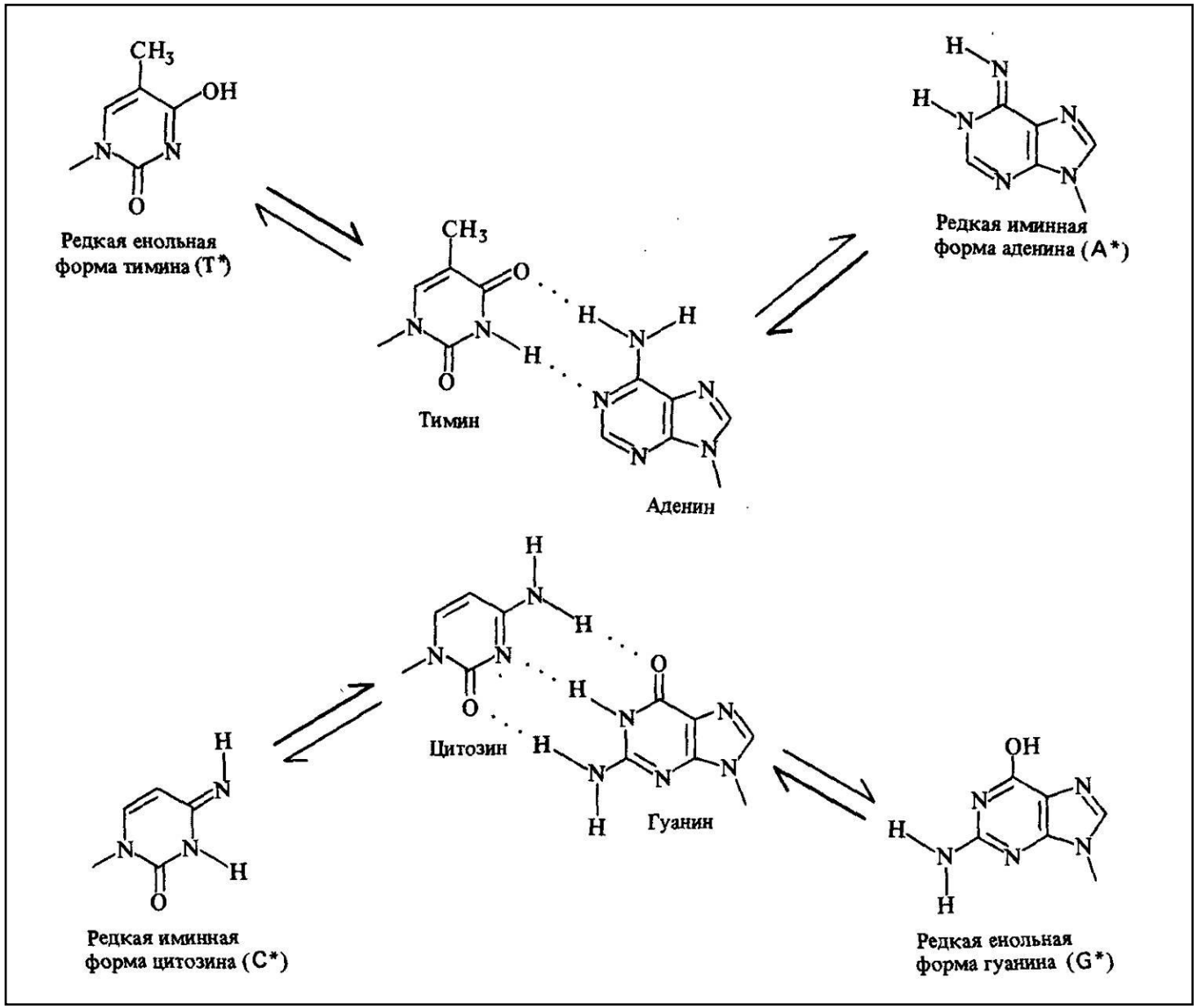
Cytosine

Adenine
(rare imino tautomer)



5-Bromouracil
(enol tautomer)

Guanine


Редкая енольная форма тимина (T*)
Тимин
Аденин
Редкая иминная форма аденина (A*)
Цитозин
Гуанин
Редкая иминная форма цитозина (C*)
Редкая енольная форма гуанина (G*)

Разнообразие систем репарации

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

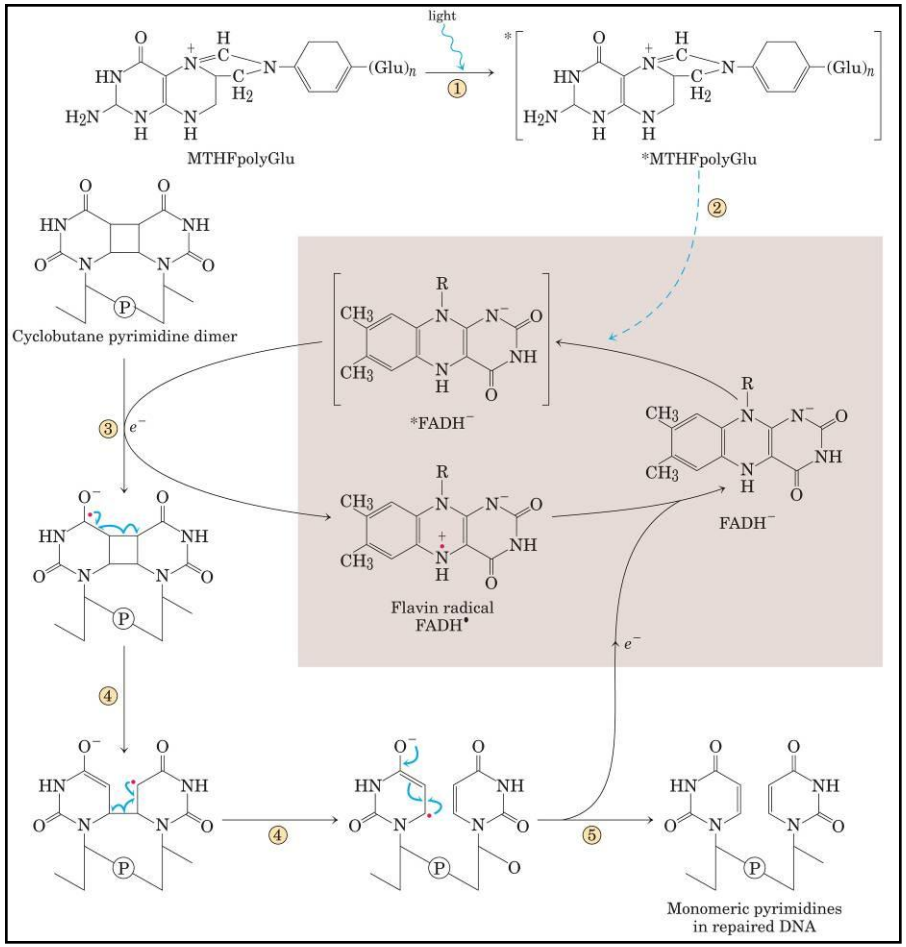
Разнообразие систем репарации

- **<u>Прямая репарация:</u>**
  - Фотореактивация.
  - Дезалкилирование модифицированных нуклеотидов.
  - Сшивание однонитевых разрывов.
  - Прямая вставка оснований в АП-сайт.

- **<u>Непрямая репарация:</u>**
  - Эксцизионная репарация ДНК путем удаления поврежденных азотистых оснований (BER).
  - Эксцизионная репарация ДНК путем удаления нуклеотидов (NER).
  - Репарация ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR).
  - Пострепликативная (рекомбинационная) репарация.
  - SOS-репарация.

Фотореактивация

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

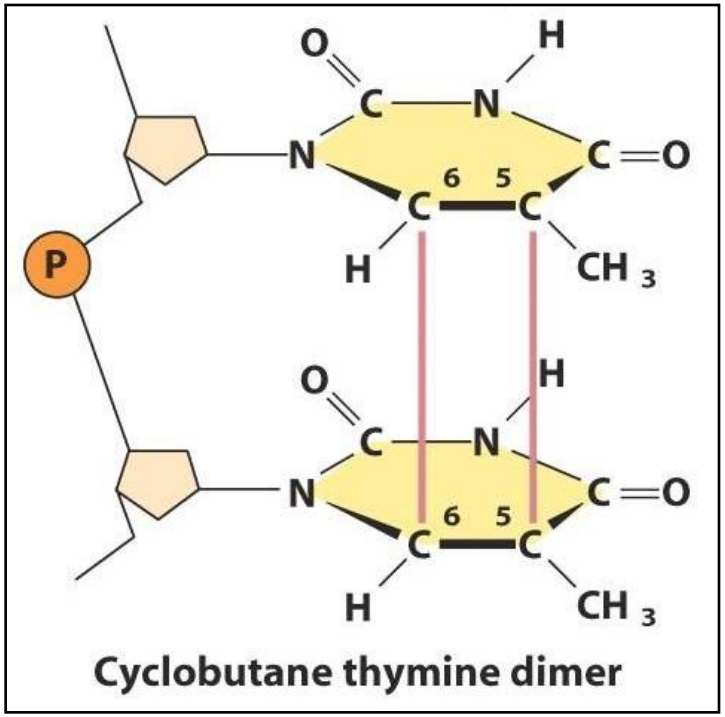


<u>Метенилтетрагидрофолатное производное</u> выполняет роль светоулавливающей антенны для квантов синего света (λ=300-500 нм).

Энергия возбужденного квантом света фолата передается на <u>$FADH^-$</u> в активный центр фермента.

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

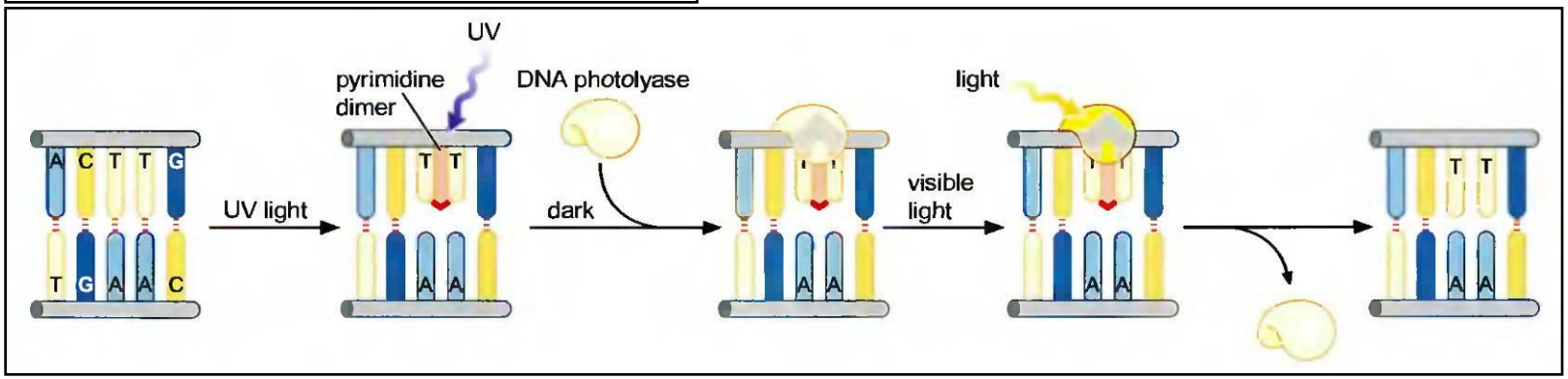
Фотореактивация



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

Фотолиаза непосредственно взаимодействует с поврежденным участком ДНК.

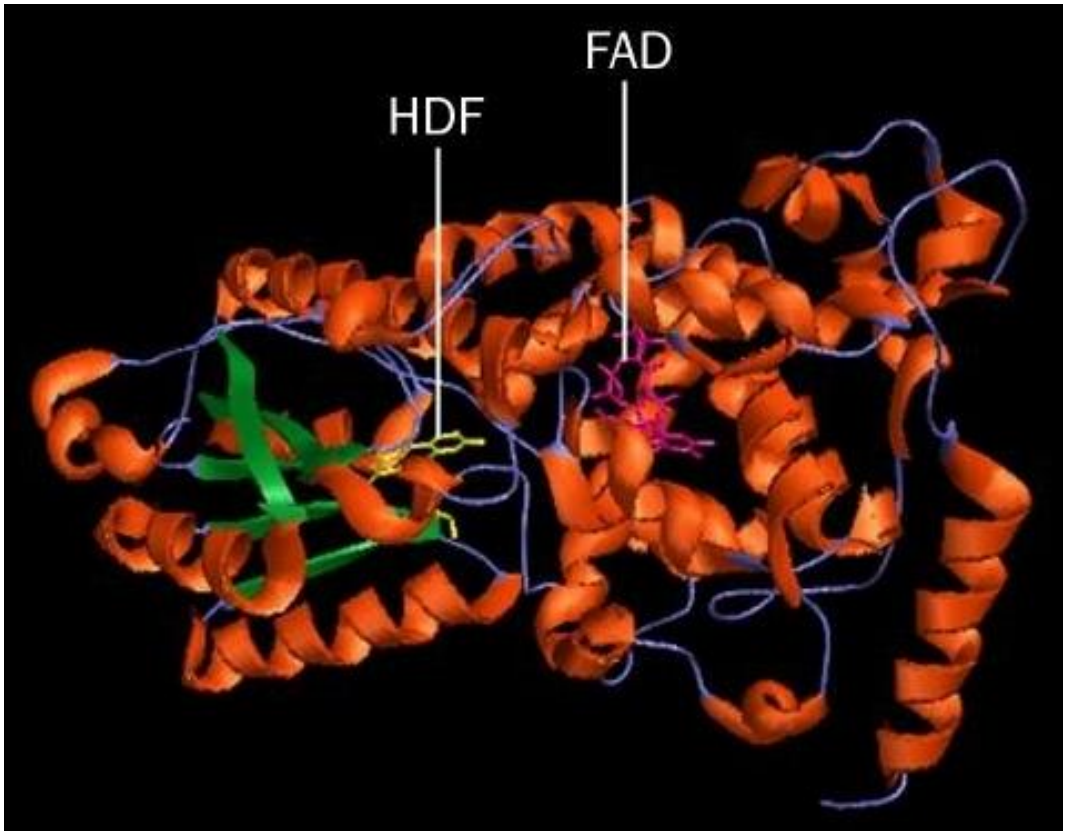
Видимый свет абсолютно необходим для работы фотолиазы.



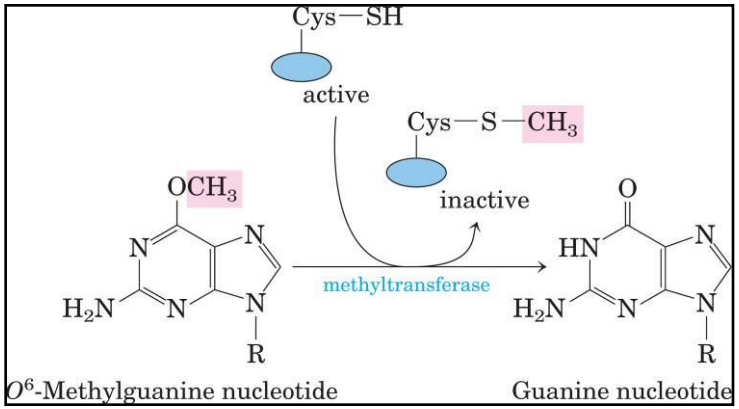
Структура фотолиазы

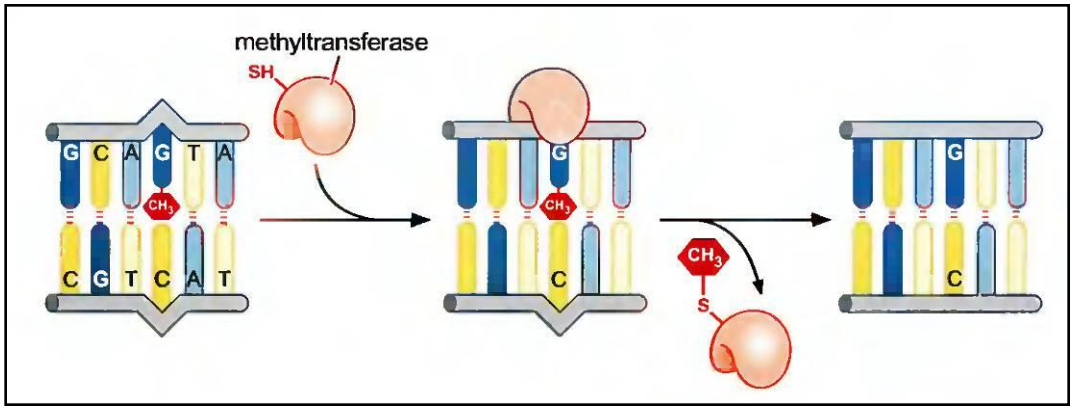
Фотолиаза содержит два кофактора: светоулавливающий метенилтетрагидрофолат (HDF) и генерирующий свободные радикалы $FADH^{-}$.

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



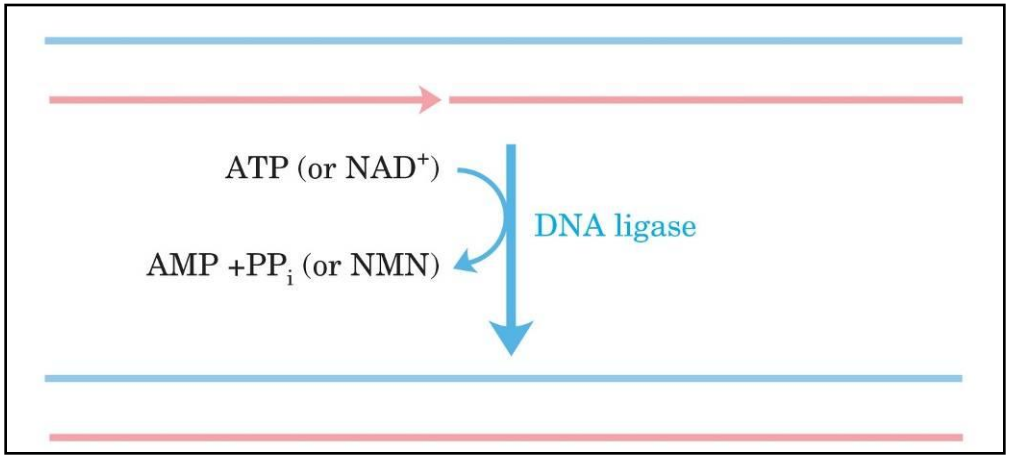
Репарация алкилированных оснований

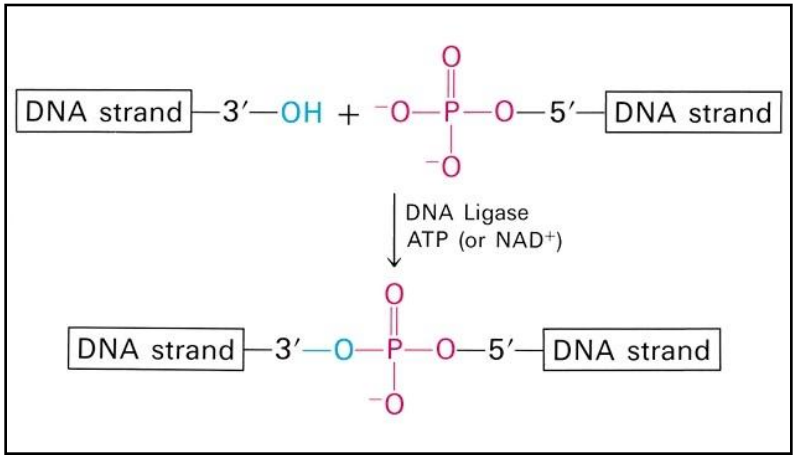




- В клетках синтезируются белки метилтрансферазы, которые могут захватывать метильные группы от модифицированного основания и благодаря этому восстанавливать исходную структуру ДНК.
- Важно отметить, что метилтрансфераза, захватив метильную группу, не может от нее освободиться. Тем самым в прямом смысле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

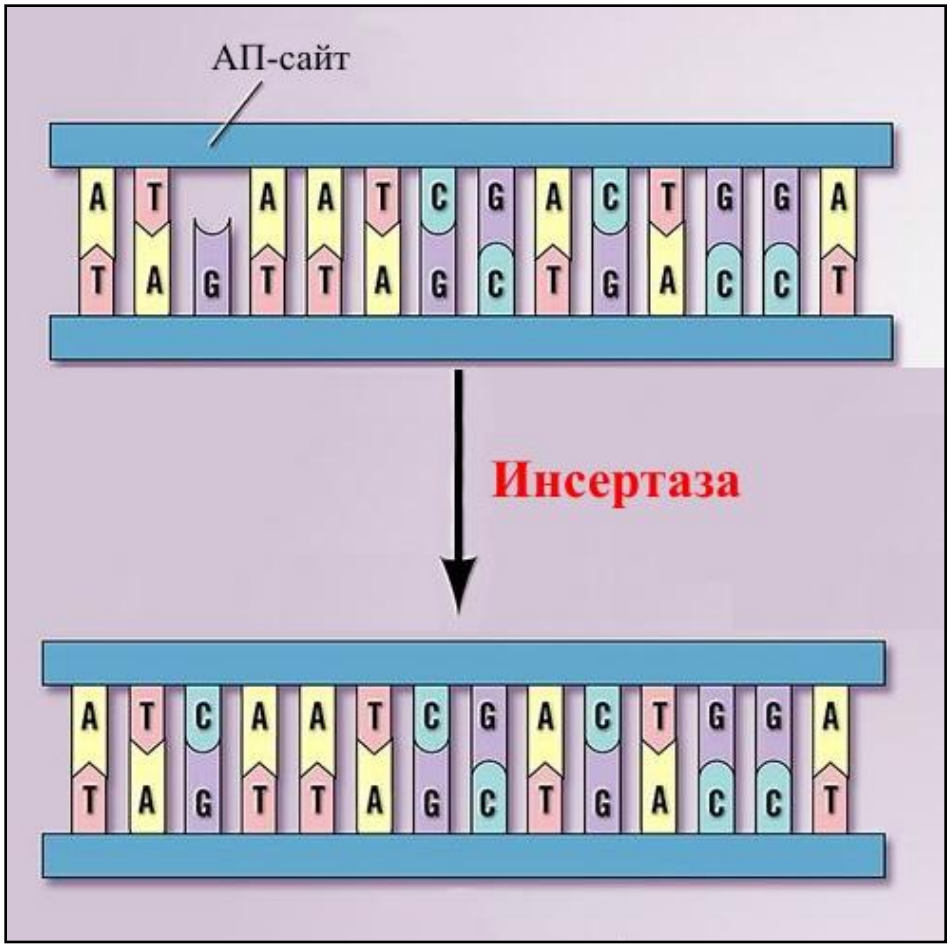
Сшивание однонитевых разрывов:





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

Вставка оснований в АП-сайт



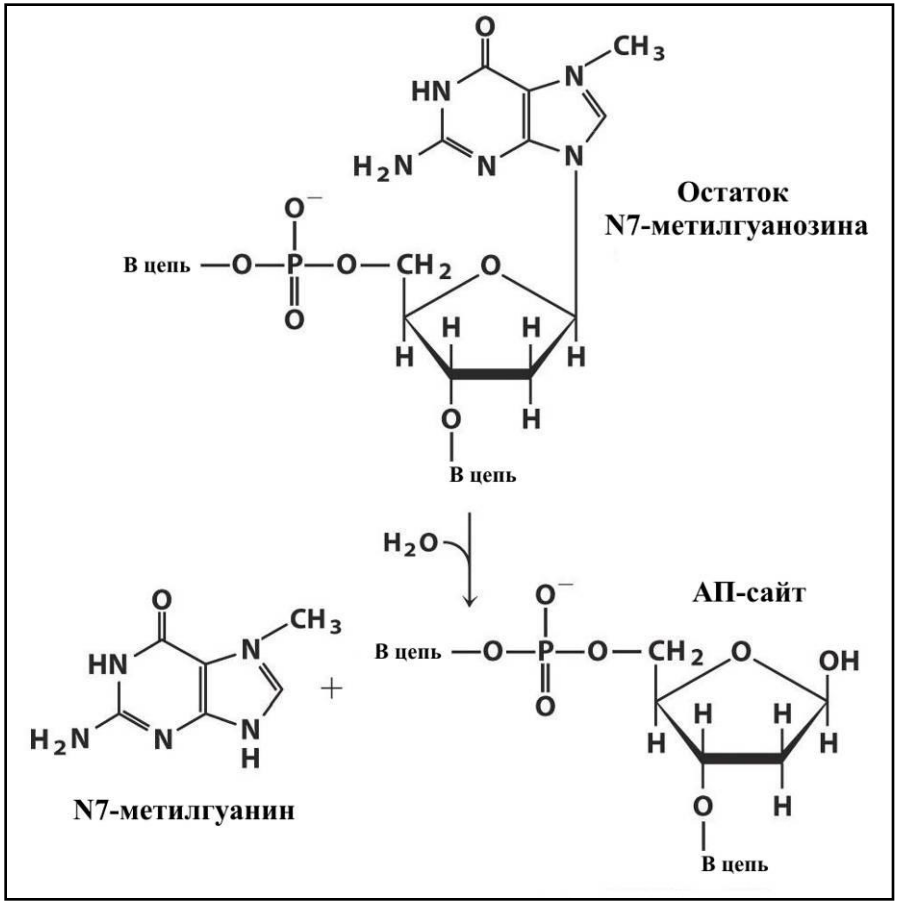
Ковалентная связь между основанием и сахаром (β-гликозидная связь) может рваться. Тогда в молекуле ДНК на месте этих оснований образуется брешь, названная АП-сайтом.

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

Структура ДНК приобретает исходный неповрежденный вид.

Эксцизионная репарация ДНК путем удаления поврежденных азотистых оснований (BER)

Base excision repair – BER



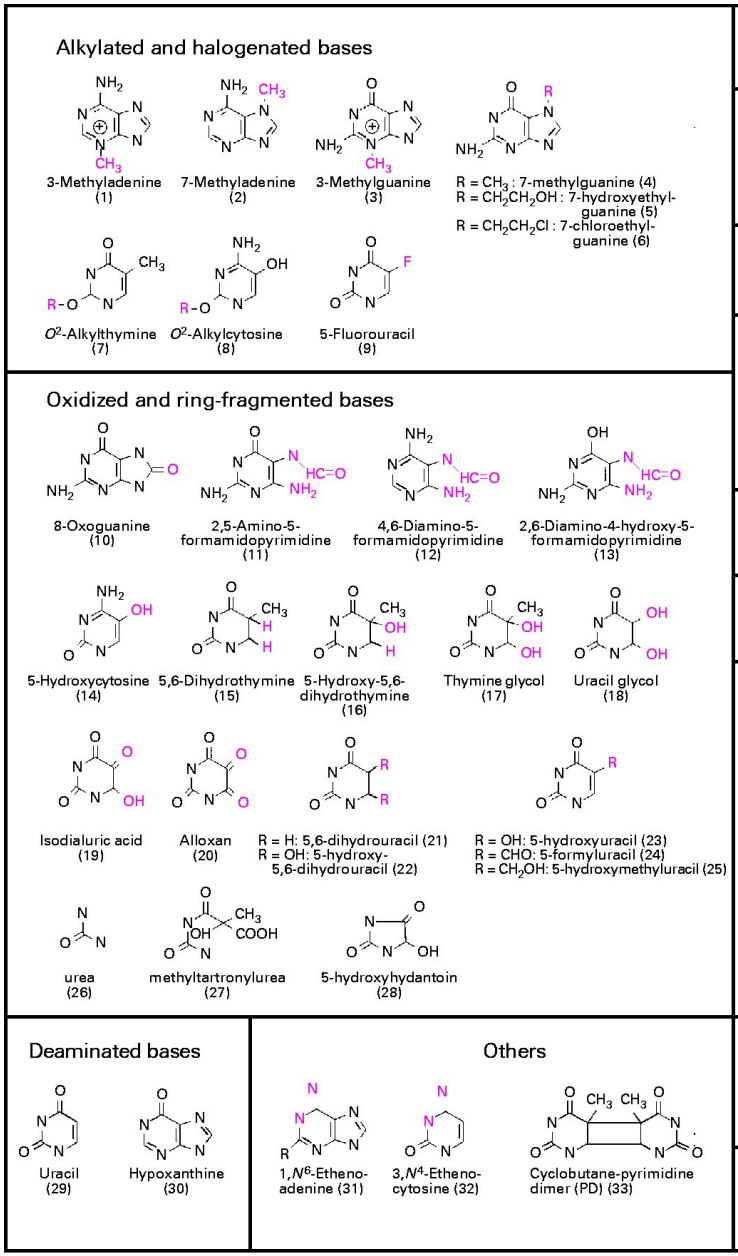
Система BER обеспечивает защиту геномной ДНК от повреждений, вызываемых главным образом алкилирующими агентами, а также эндогенными генотоксическими соединениями, включая внутриклеточные радикалы кислорода и другие реакционноспособные метаболиты

BER начинает функционировать с отщепления ошибочно включенных или модифицированных оснований от дезоксирибозы под действием ключевого фермента – **ДНК-гликозилазы**, обладающего способностью отщеплять большое число модифицированных оснований ДНК

Разнообразие гликозилаз

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

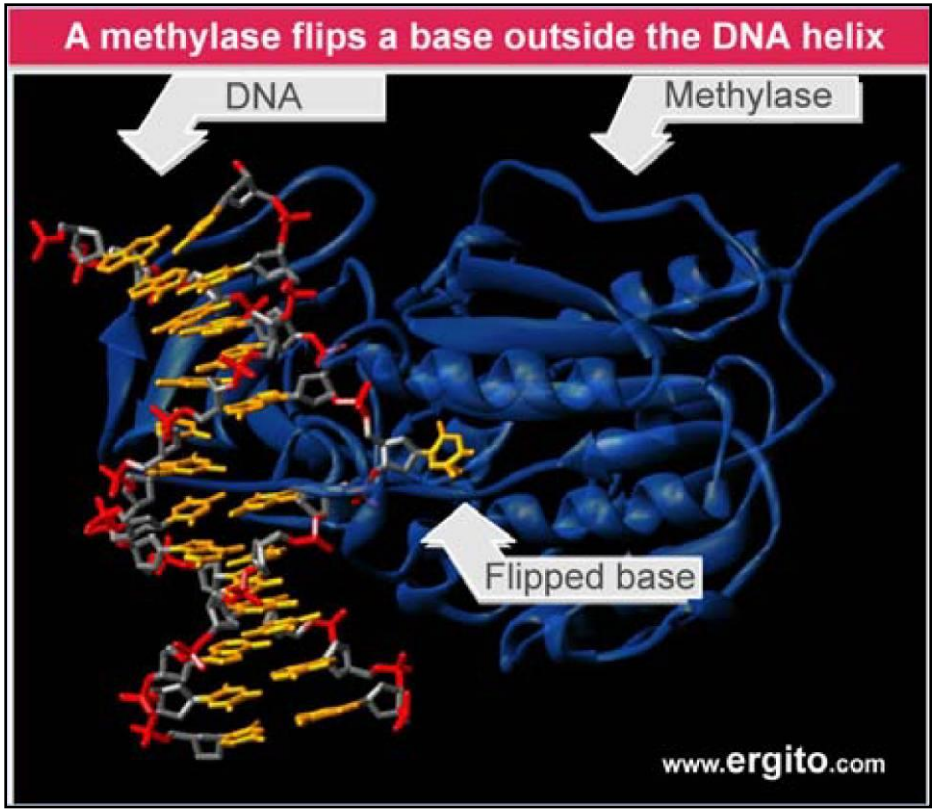
Существует много ДНК-гликозилаз, которые адресно узнают различные повреждения



Enzyme	Source/gene	Reported DNA substrates	β-Lyase activity
Uracil-DNA glycosylases (UDGs)	Viral	29	No
	Bacterial (*ung*)	9, 19, 23,	No
	S. cerevisiae (*UNG1*)	29	No
	Plants	29	No
	Human (*UNG*)	19, 20, 23,	No
G/T(U)mismatch-DNA glycosylases	*M. thermoautotropicum*	, , G/G, A/G, T/C, U/C	No
	Insects	29	No
	Human	T, 29	No
Alkylbase-DNA glycosylases	*E. coli* (*tag*)	, 3	No
	E. coli (*alkA*)	–8, 24, 25, 30–32 (G, A)	No
	S. cerevisiae (*MAG*)	–6, 30, 31	No
	S. pombe (*mag1*)	1	?
	A. thaliana (*MPG*)	1	?
	Rodent/human (*MPG*)	–6, 10, 30, 31	No
5-Methylcytosine-DNA glycosylase	Chick	, T in G/T	No
	Human	5-MeC	No
Adenine-specific mismatch-DNA glycosylases	*E. coli* (*mutY*)	A in G/A, , C/A	Yes/no
	Bovine, human (*MYH*)	A in , 10/A, C/A	Yes?
DNA glycosylases removing oxidized pyrimidines (EndoIII-like)	*E. coli* EndoIII (*nth*)	14–18, 20–23, –28	Yes
	S. cerevisiae (*NTG1*)	11, 12, 13, 17	Yes
	S. pombe (*nth*)	17,	Yes
	Bovine/human EndoIII homologue	17,	Yes
EndoVIII	*E. coli*	15, 17	Yes
EndoIX	*E. coli*	26	?
Hydroxymethyl-DNA glycosylase	Mouse	, 29	No
	Bovine	25	Yes?
Formyluracil-DNA glycosylase	Human	24	?
DNA glycosylases removing oxidized purines	*E. coli* (*fpg*)	10–13	Yes
	S. cerevisiae (*OGG1*)	10 (opposite or T)	Yes
	S. cerevisiae (*OGG2*)	10 (opposite or A)	Yes
	D. melanogaster S3	10	Yes
Pyrimidine-dimer-DNA glycosylases	T4	, 12	Yes
	M. luteus (*pdg*)	33	Yes
	N. mucosa	33	Yes

Структура гликозилаз

Механизм работы гликозилаз



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

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

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

ДНК гликозилазы «выворачивают» модифицированное основание наружу и отщепляют его от сахаро-фосфатного остова

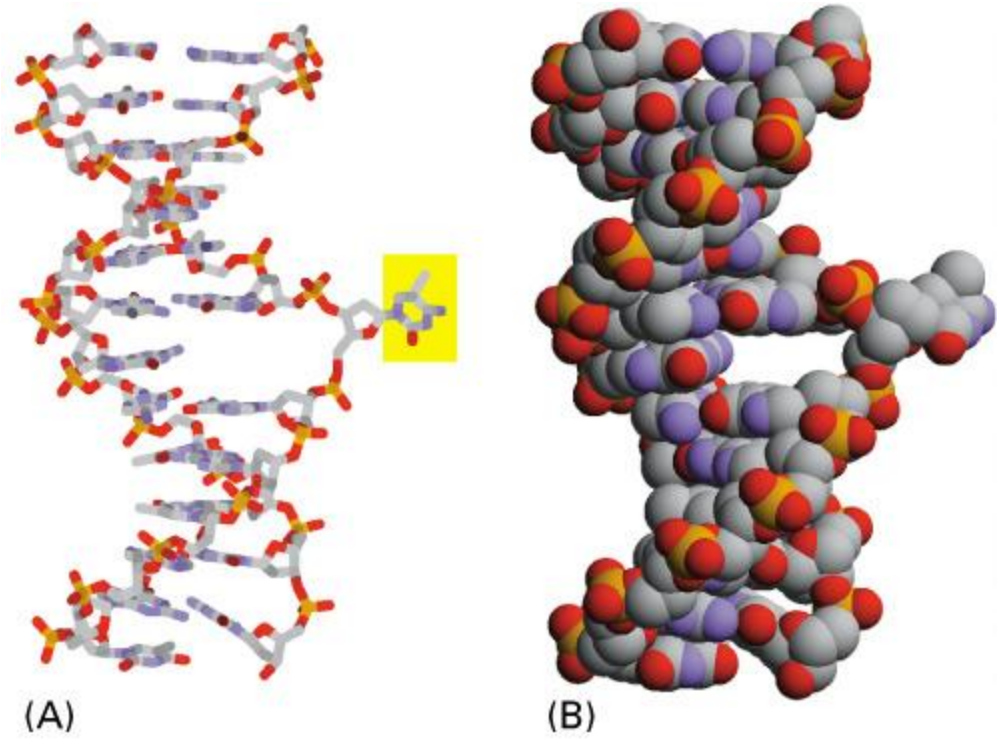
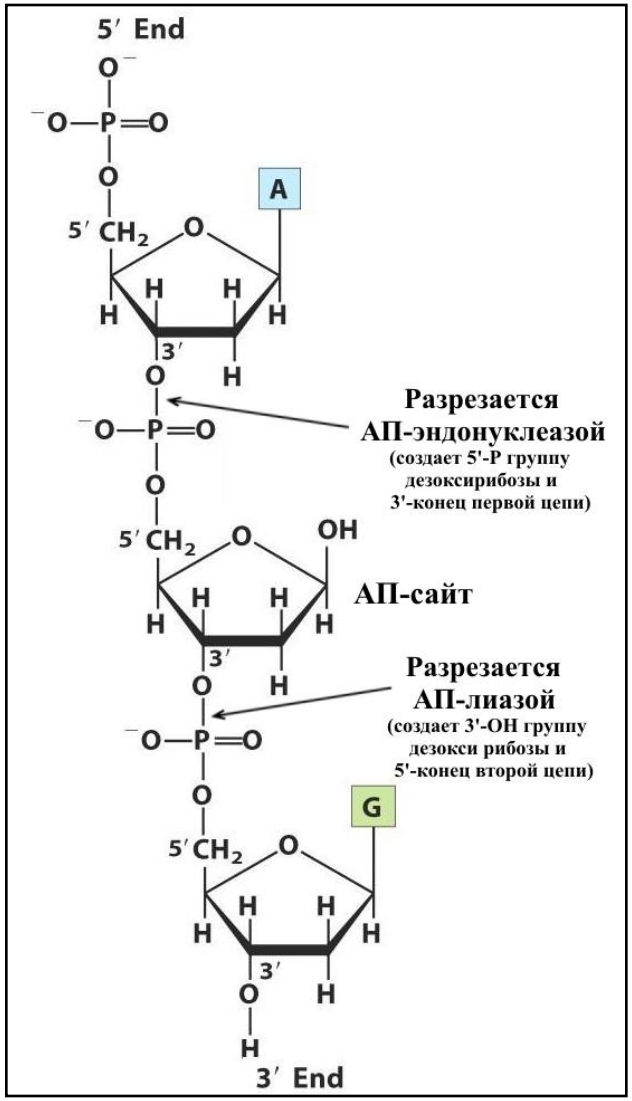


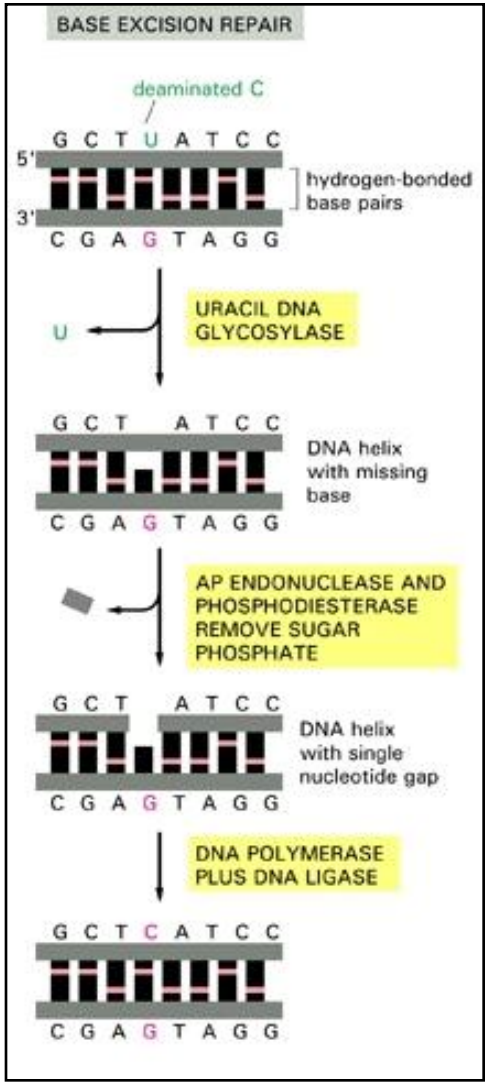
Figure 5–51. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Base excision repair – BER



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

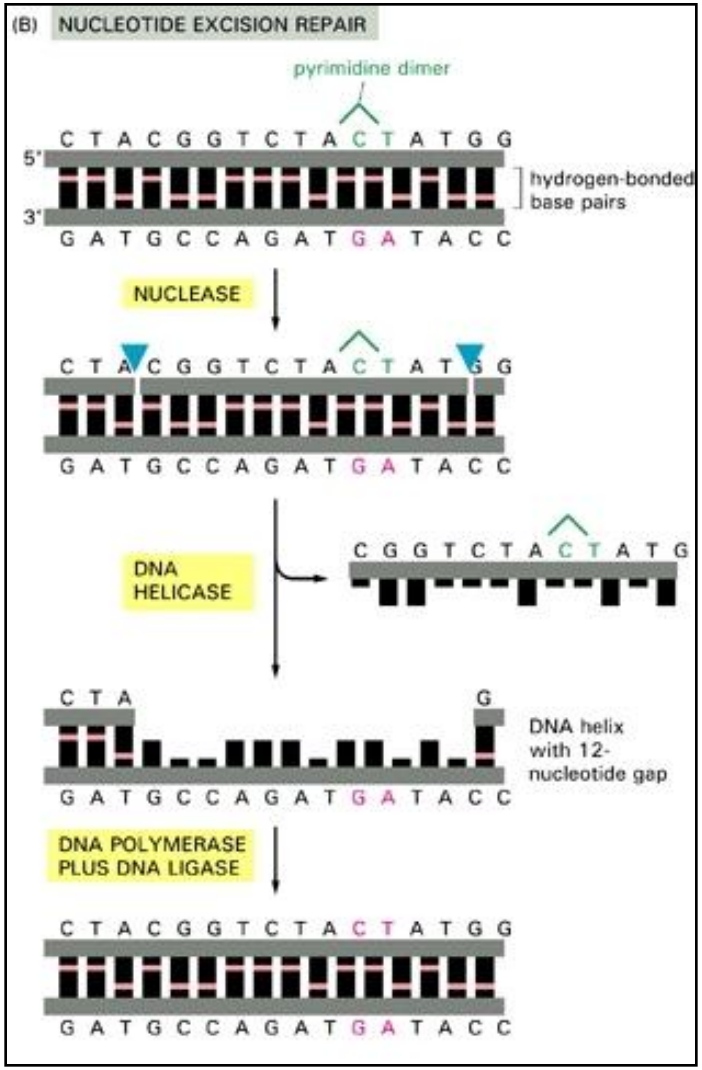
Base excision repair – BER



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

Эксцизионная репарация ДНК путем удаления нуклеотидов (NER)

Nucleotide excision repair – NER



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

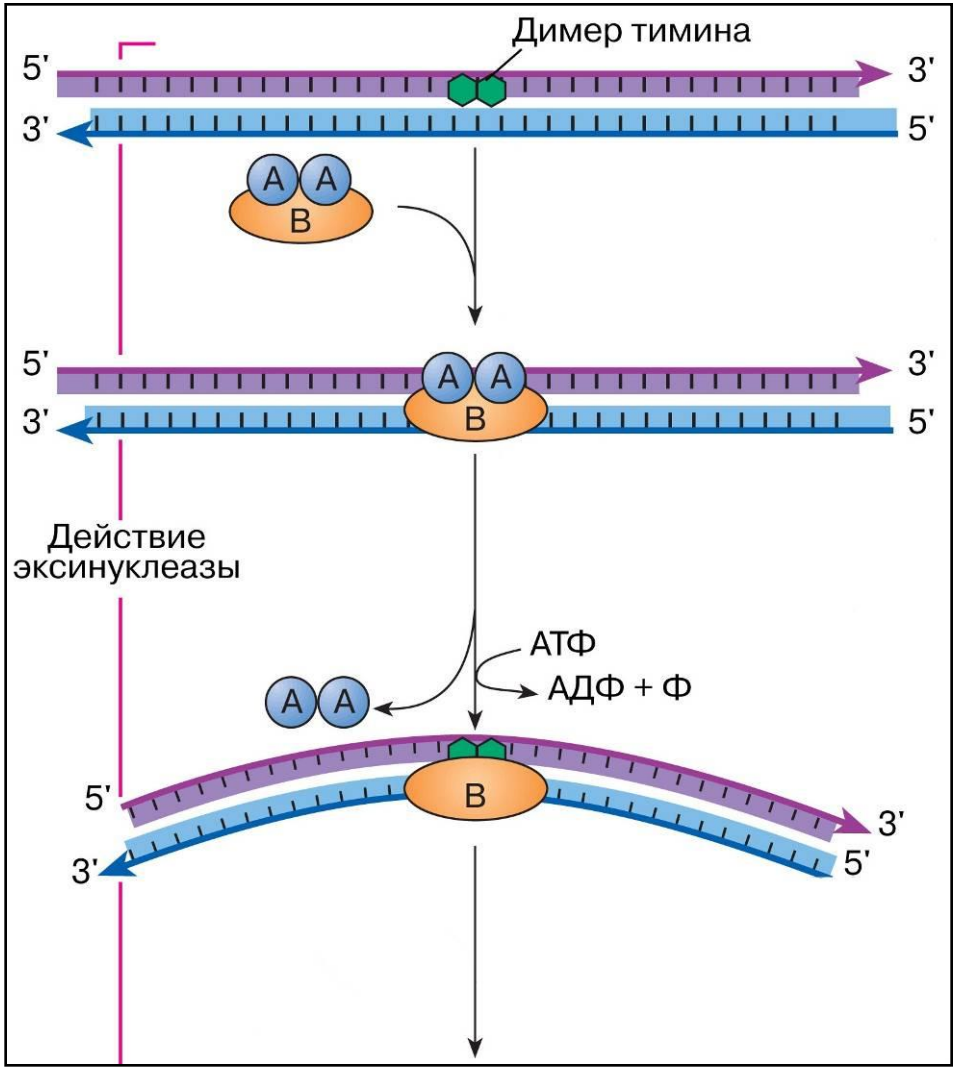
Процесс NER условно можно разделить на четыре этапа:

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

Nucleotide excision repair – NER

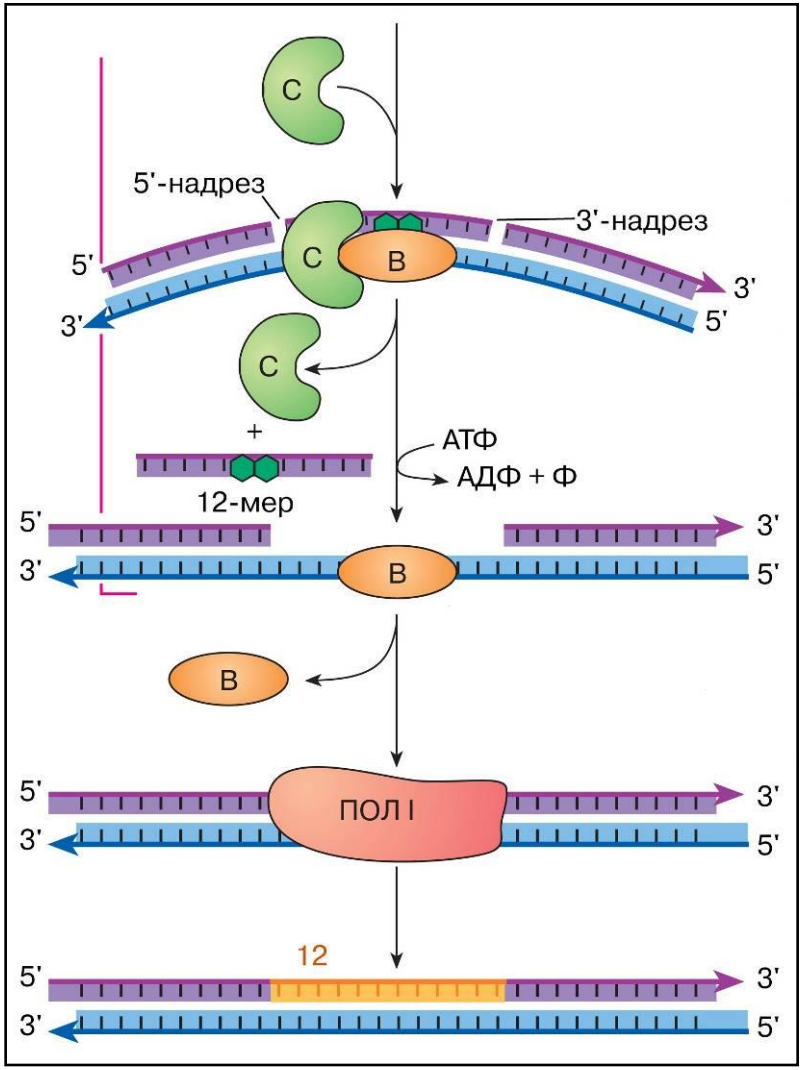
- В отличии от **BER**, субстратами системы **NER** являются не только поврежденные (модифицированные) основания, но и одиночные ошибочно спаренные нуклеотиды, а также петли длиной в 1–3 нуклеотида.
- Но в отличие от системы **MMR**, удаляющей неправильно спаренные основания, **NER** не может идентифицировать,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

Механизм работы



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

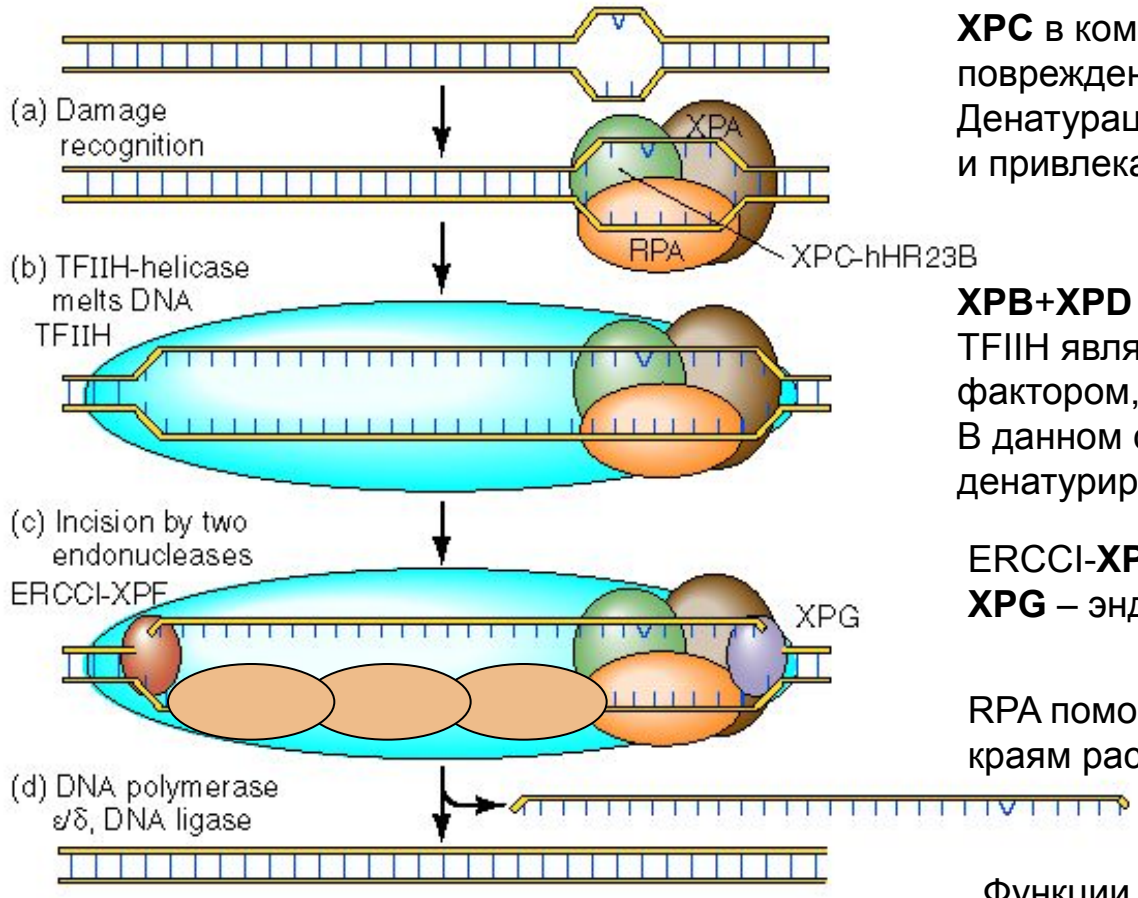
Механизм работы



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

У эукариот механизм эксцизии нуклеотидов в общих чертах схож с прокариотическим, но существенно отличается в деталях

Повреждения в ДНК могут узнаваться либо особой группой белков (global NER) либо РНК-полимеразой (transcription-coupled NER)



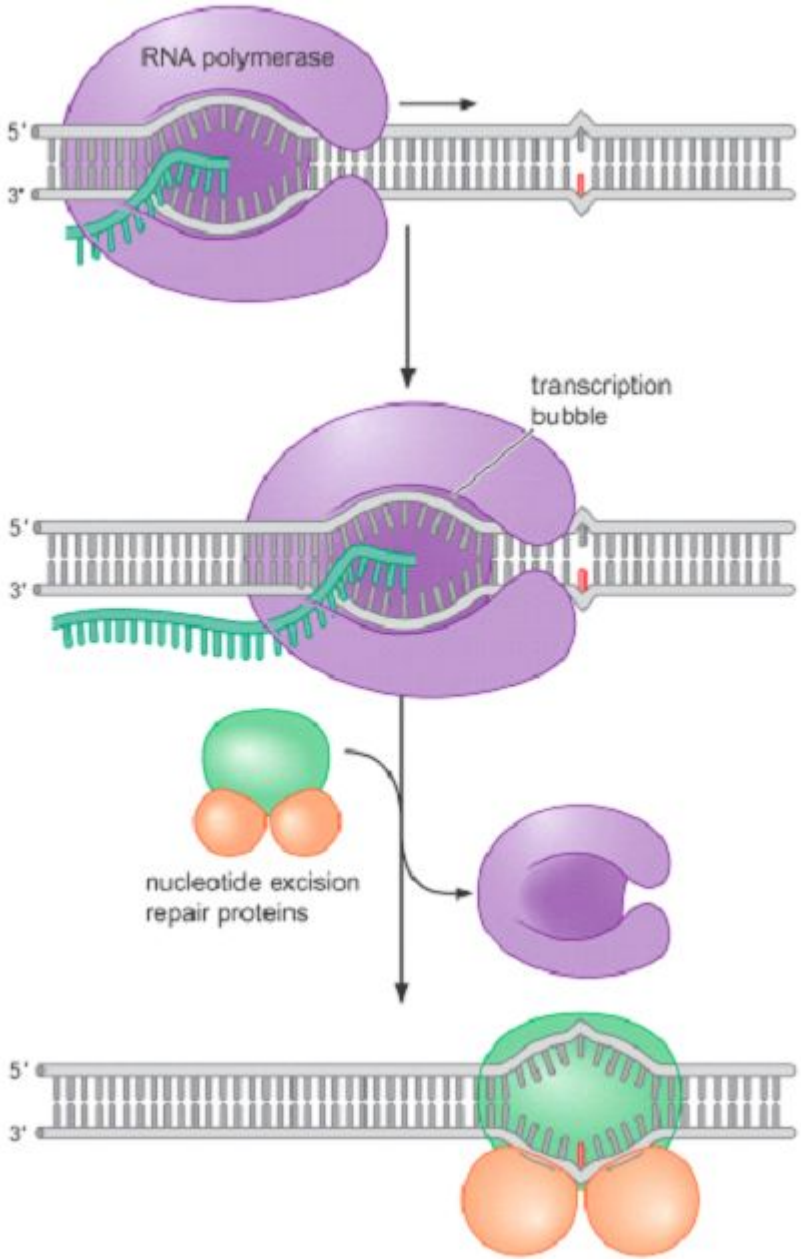
XPC в комплексе с hHR23B узнают повреждения и вызывают локальную Денатурацию ДНК. **XPA** стабилизирует комплекс и привлекает другие белки

XPB+XPD - субъединицы TFIIH
TFIIH является общим транскрипционным фактором, обладающим хеликазной активностью. В данном случае TFIIH расширяет локально-денатурированный участок

ERCCI-**XPF** – эндонуклеаза, вносящая 5'-разрыв
XPG – эндонуклеаза, вносящая 3'-разрыв

RPA помогает позиционировать нуклеазы по краям расплавленного участка ДНК

Функции **XPE** не понятны. In vitro этот белок не нужен



Повреждения ДНК могут вызвать остановку элонгирующей РНК-полимеразы

Ферменты NER узнают такой задержанный комплекс и процессируют его подобно комплексу XPA-XPC –hHR23B

XPC - damage recognition

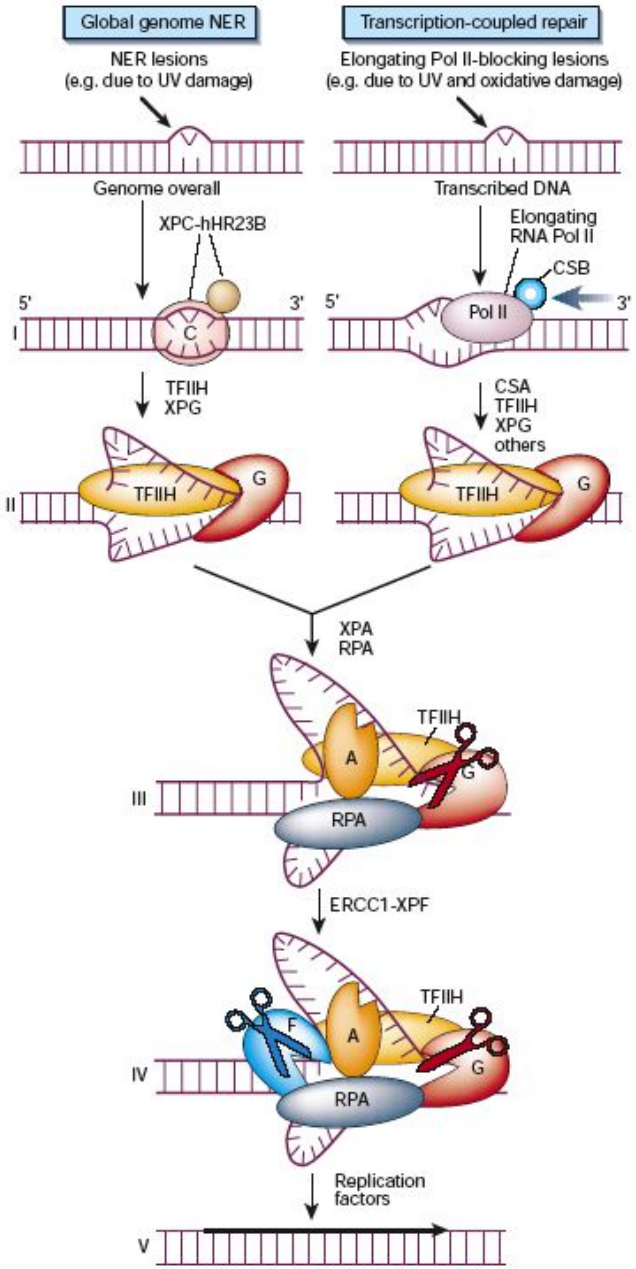
XPB & XPD – TFII H DNA helicase

XPA stabilisation of SS DNA fragment

ERCC1-XPF - 5' incision

XPG - 3' incision

(junction specific endonucleases)



CSA & CSB - role in processing RNAP II?

Различия NER у про- и эукариот

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

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

Репарация ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR)

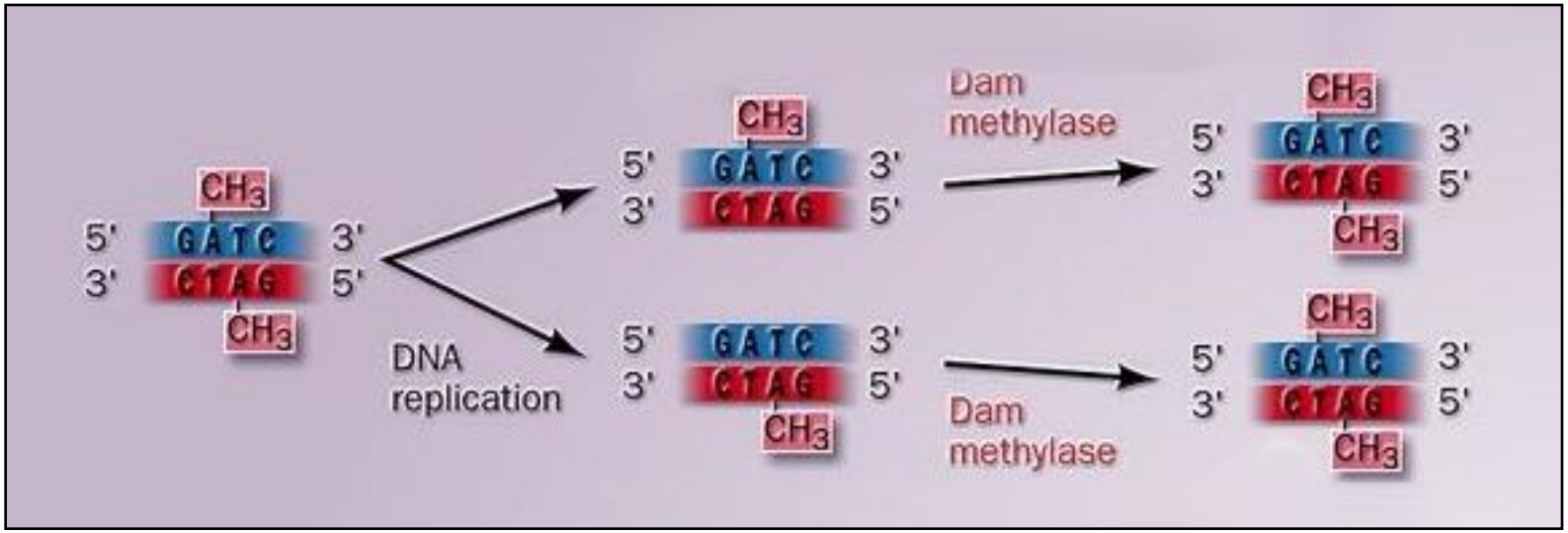
Mismatch repair - MMR

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

Система MMR выполняет в клетке несколько важных функций:

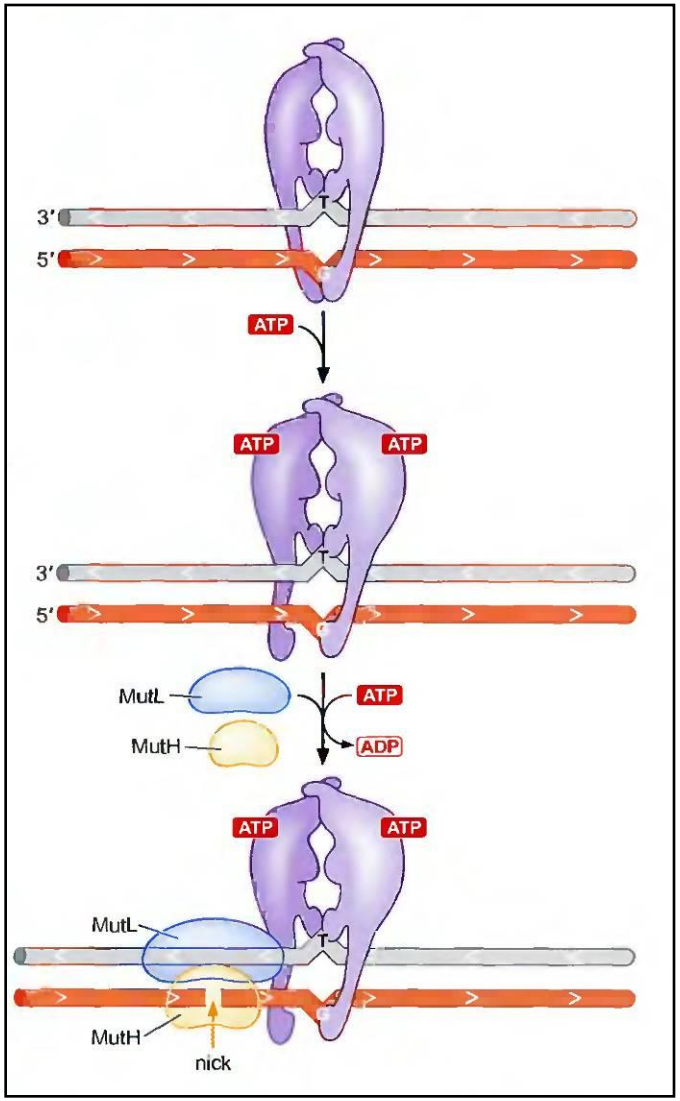
1. Исправляет ошибки репликации ДНК, меняя ошибочно включенные нуклеотиды.
2. Обеспечивает гомологичную рекомбинацию между дивергировавшими последовательностями ДНК, посредством процессинга промежуточных продуктов рекомбинации.
3. Обеспечивает задержку клеточного цикла в ответ на повреждения ДНК.

Метилирование матричных цепей



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

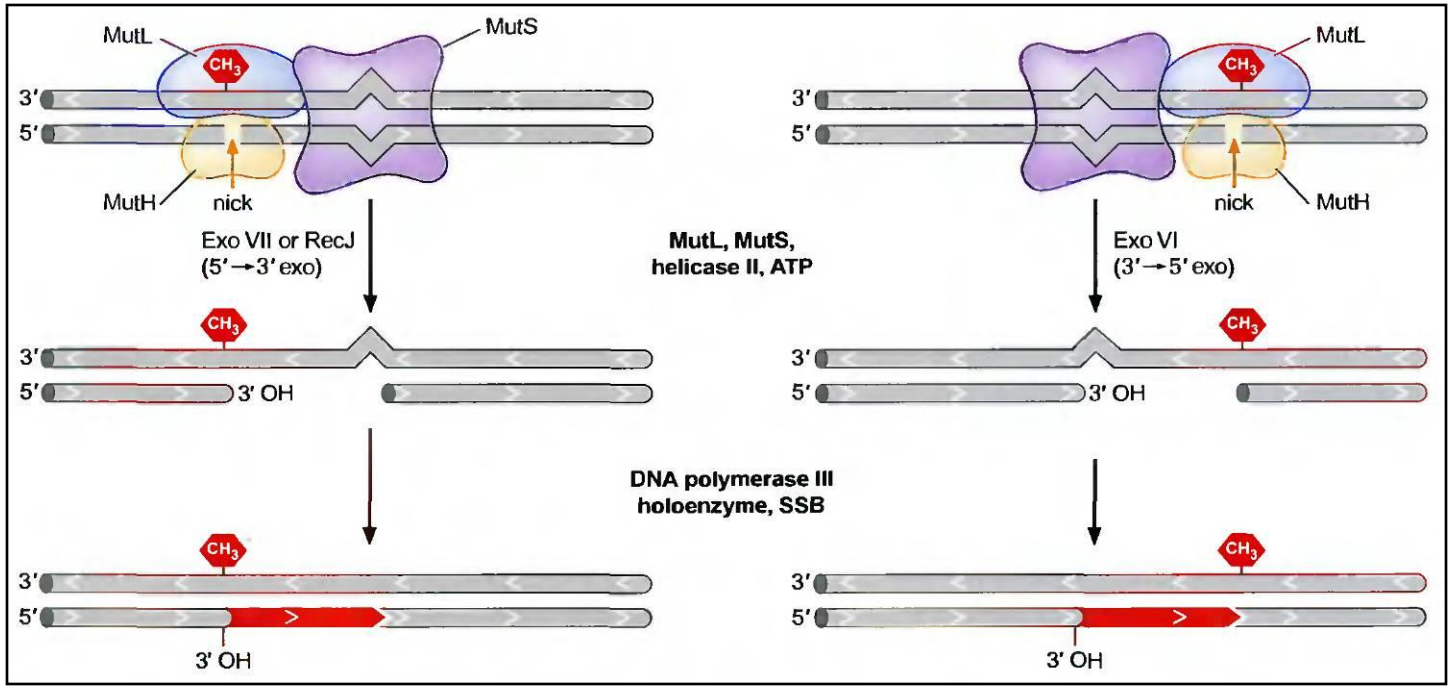
Механизм работы



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

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

Механизм работы



4. После полной сборки комплекса MutHLS, активации эндонуклеазной активности MutH и внесения разрывов в GATC-сайты дочерней цепи, происходит **<u>экзонуклеазное выщепление</u>** участка поврежденной цепи от первичного разрыва до мисмэтча.

- Надрезы могут быть внесены как с 5'-, так и с 3'-стороны относительно неправильно включенного в дочернюю цепь нуклеотида.

5. Затем в обоих случаях бреши должны быть застроены **<u>ДНК-полимеразой</u>**, а концы воссоединены с помощью **<u>ДНК-лигазы</u>**.

Другие системы

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

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

В эукариотических клетках также существует система коррекции ошибок репликации

Обнаружены гомологи MutS и MutL; гомолога MutH не обнаружено

гомологи MutS (MSH — **M**ut**S** **h**omolog) образуют два гетеродимерных комплекса

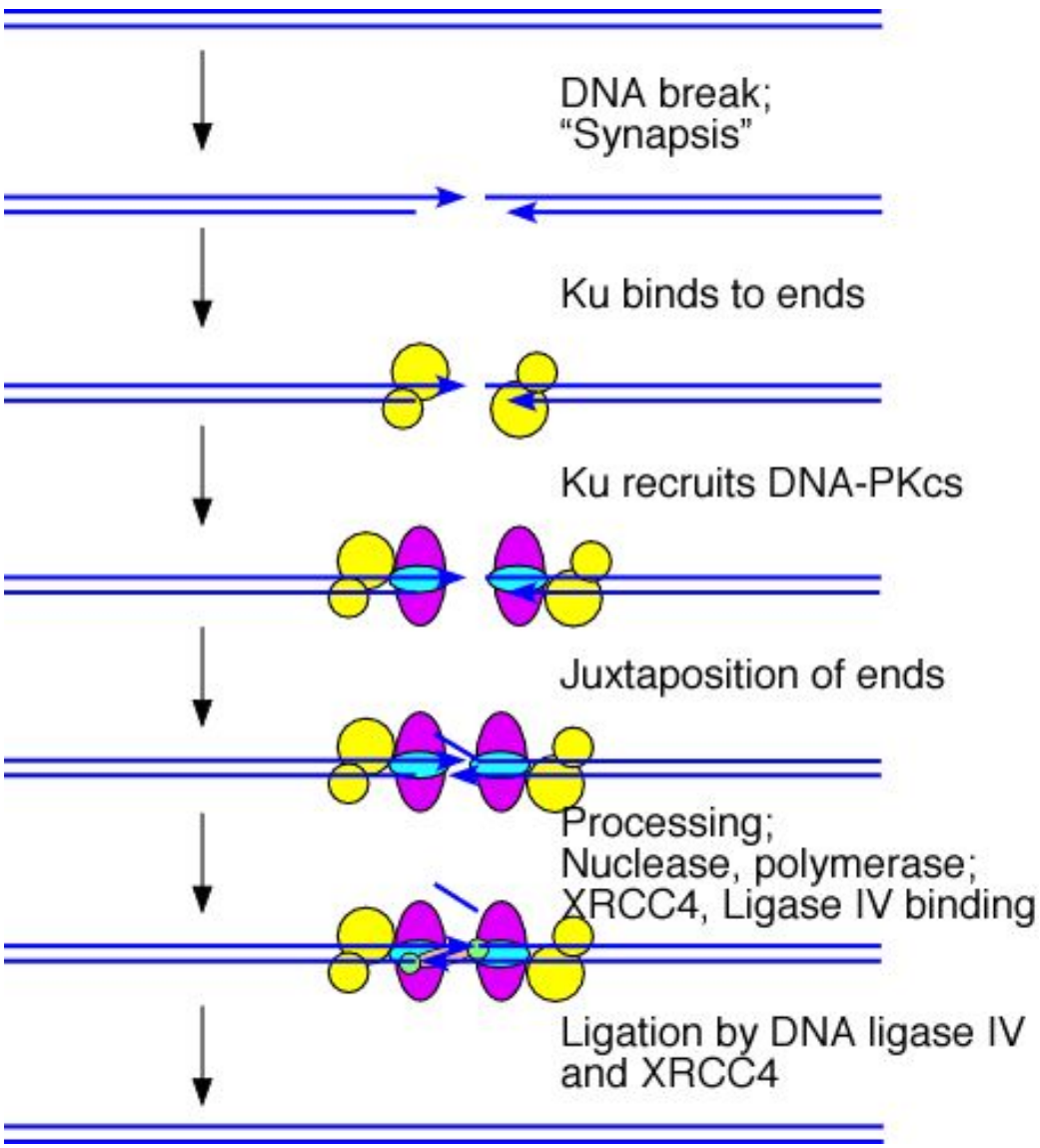
-- MSH2-MSH6 (MutSα) узнает неспаренные нуклеотиды и короткие «инделы»

-- MSH2-MSH3 (MutSβ) узнает длинные «инделы»

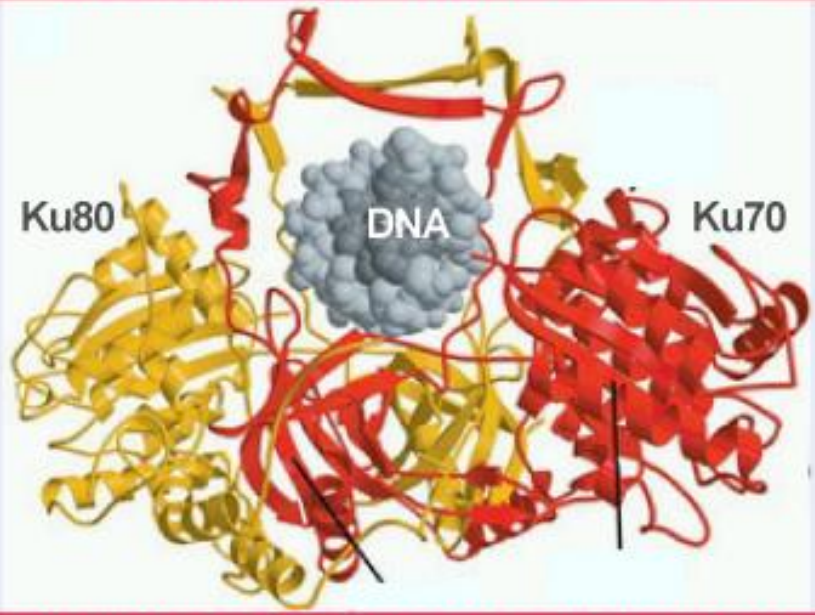
Механизм распознавания новосинтезированной цепи не известен

наличие разрывов?

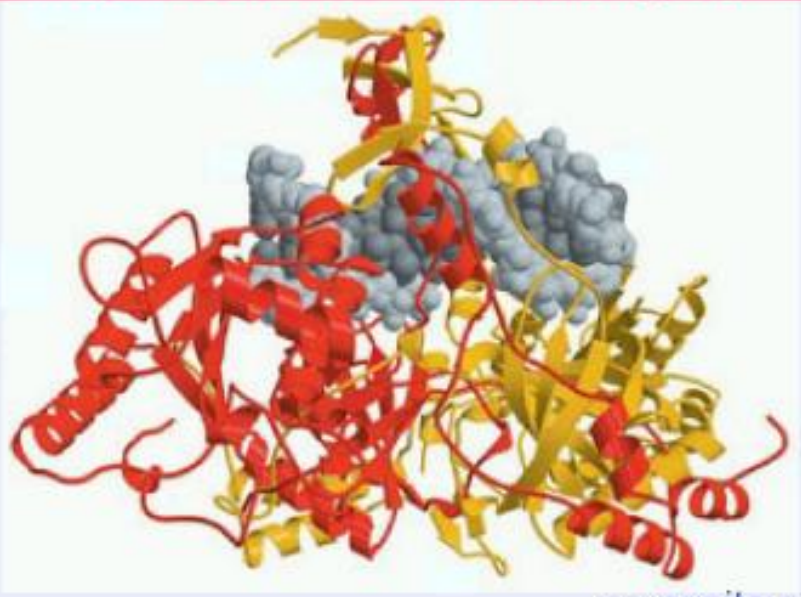
Non-Homologous End Joining (Double Strand Breaks)



Ku surrounds DNA seen in cross section



Ku extends for 2 helical turns along DNA



www.ergito.com

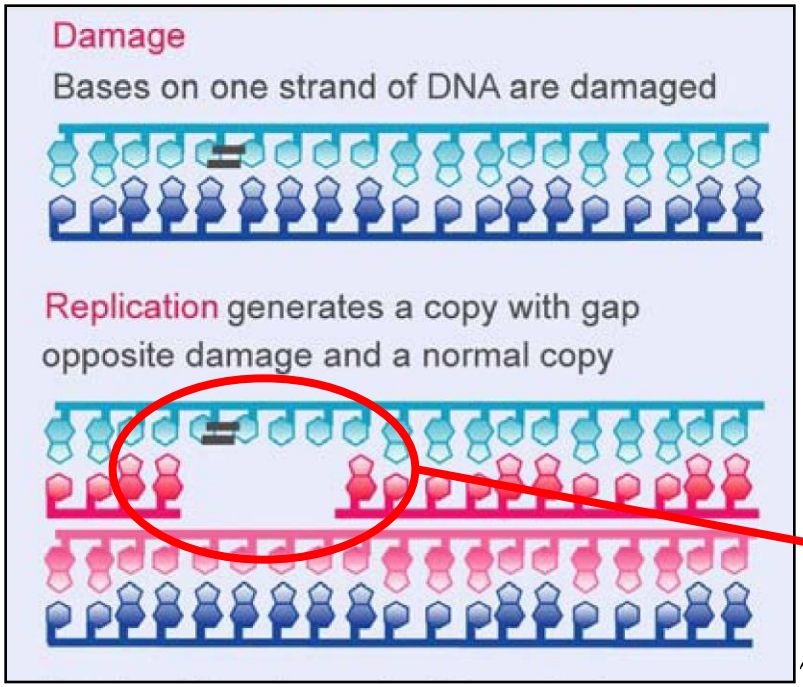
Пострепликативная (рекомбинационная) репарация

Рекомбинационная репарация

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

Рекомбинационная репарация

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



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

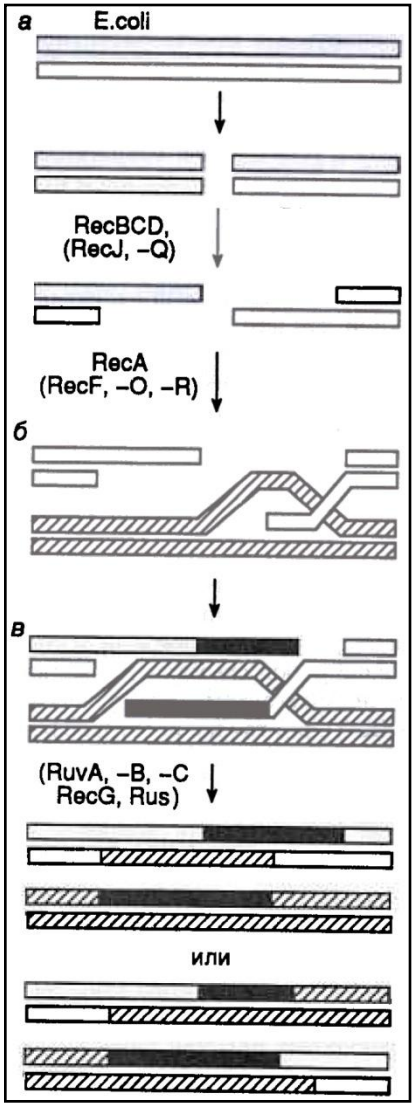
Рекомбинационная репарация

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

Поврежденный дуплекс является **гомологичным** к ДНК второго дуплекса, не содержащего повреждений.

Таким образом для репарации необходимо осуществить **одноцепочечный обмен** между неповрежденным донорным дуплексом и разорванным акцепторным. В результате брешь в поврежденном дуплексе будет заполнена последовательностью из донорного дуплекса, а поврежденное основание будет репарировано.

Механизм процесса

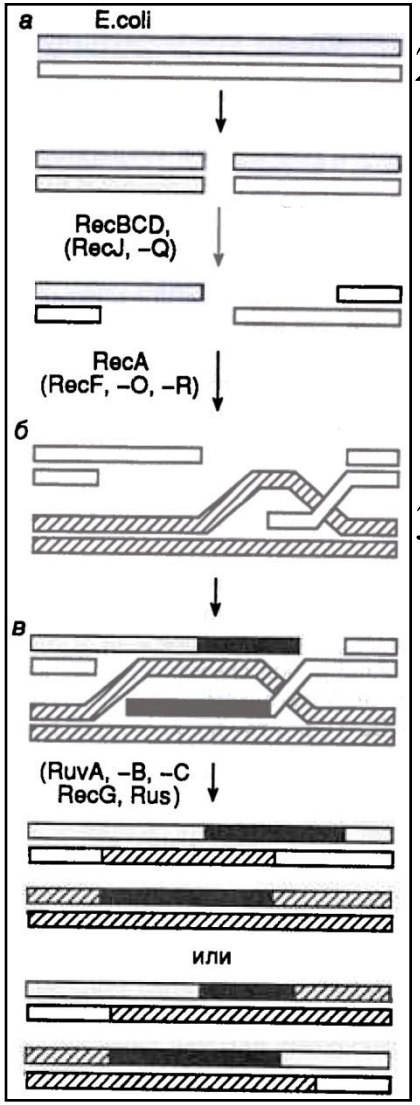


Главный этап рекомбинационной репарации заключается в **<u>активации генов rec</u>**, участвующих так же и в процессе гомологичной рекомбинации.

Процесс репарации условно разделяют на три фазы:

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

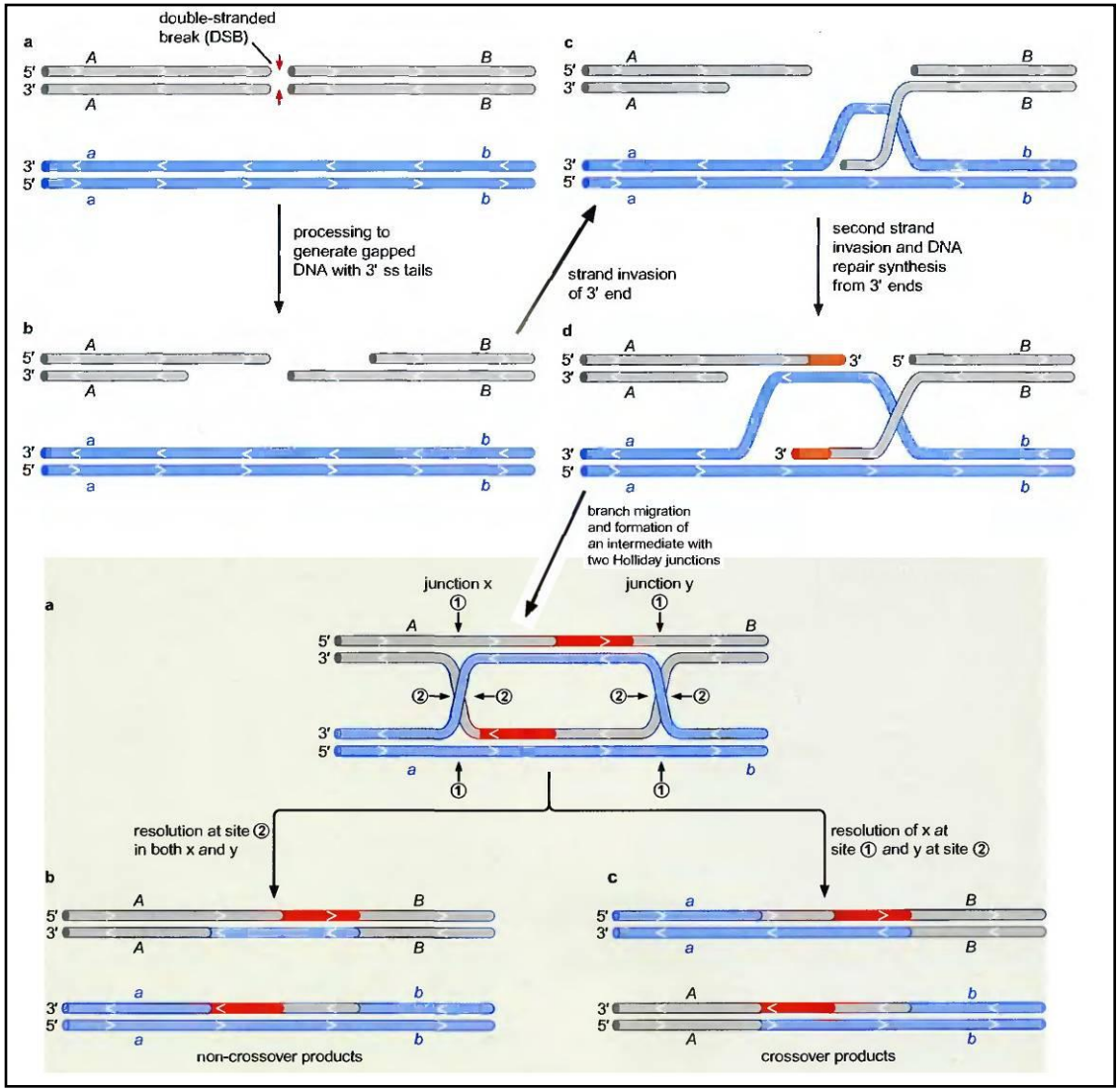
Механизм процесса



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

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

Рекомбинационная репарация



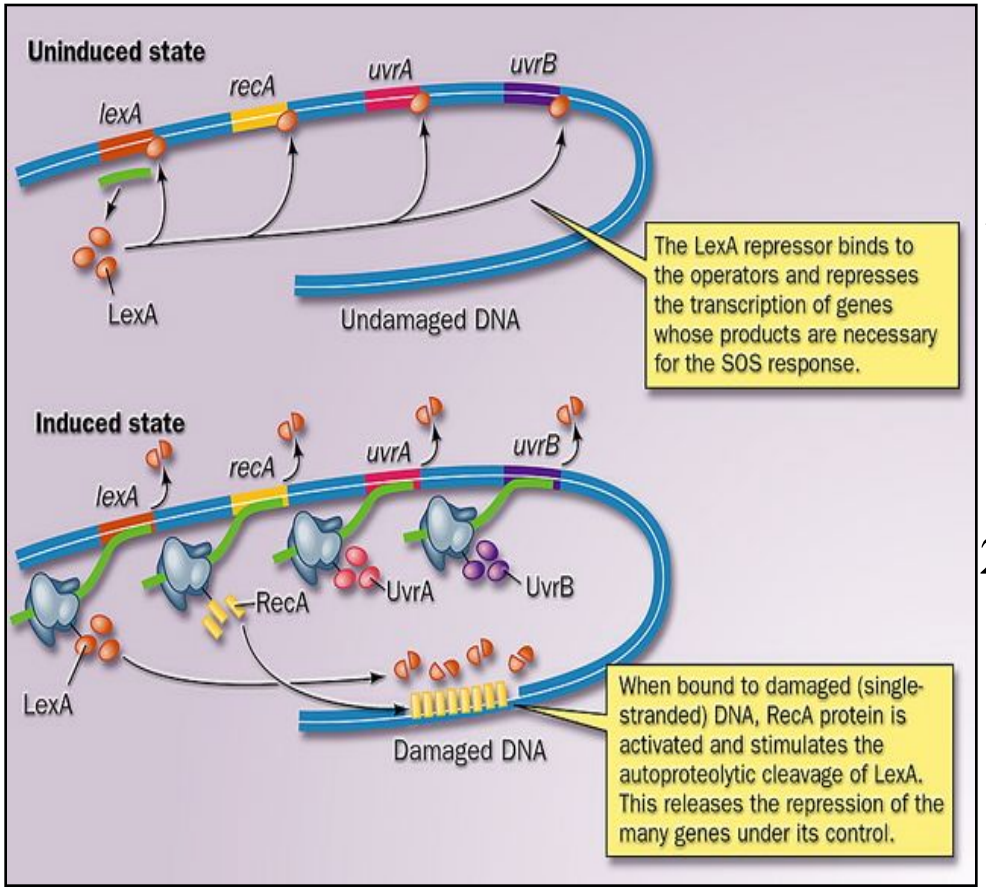
Часть 3

SOS-репарация и SOS-мутагенез

SOS-репарация

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

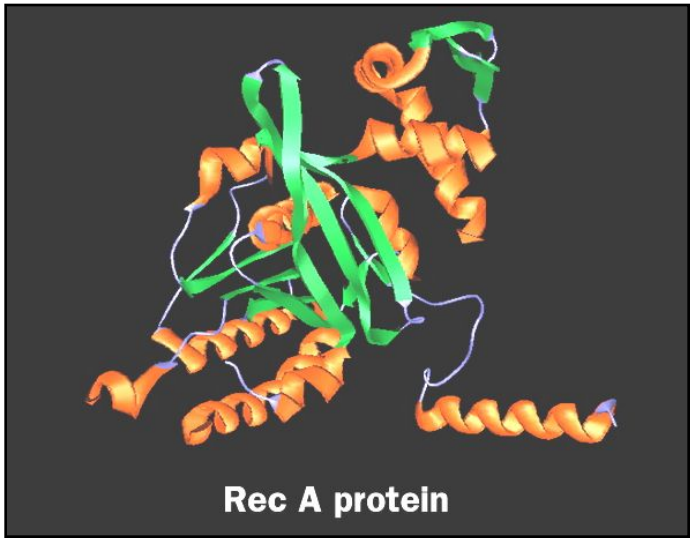
Индукция SOS-репарации

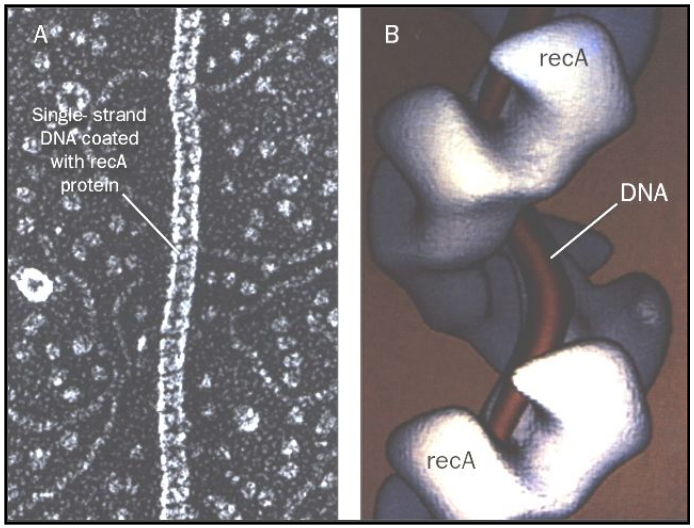


- Белок LexA является репрессором гена *recA* и более 20 других генов и оперонов, составляющих **SOS-регулон**.

1. В ответ на повреждение ДНК или ингибирование репликации, при остановке ДНК-полимеразы на поврежденном участке ДНК, вырабатывается внутриклеточный **SOS-сигнал**.
2. В результате индукции SOS-сигнала белок **recA** связывается с одноцепочечными участками ДНК содержащими повреждения и в ходе конформационного перехода обратимо превращается в активированную форму RecA*.

Активация белка RecA



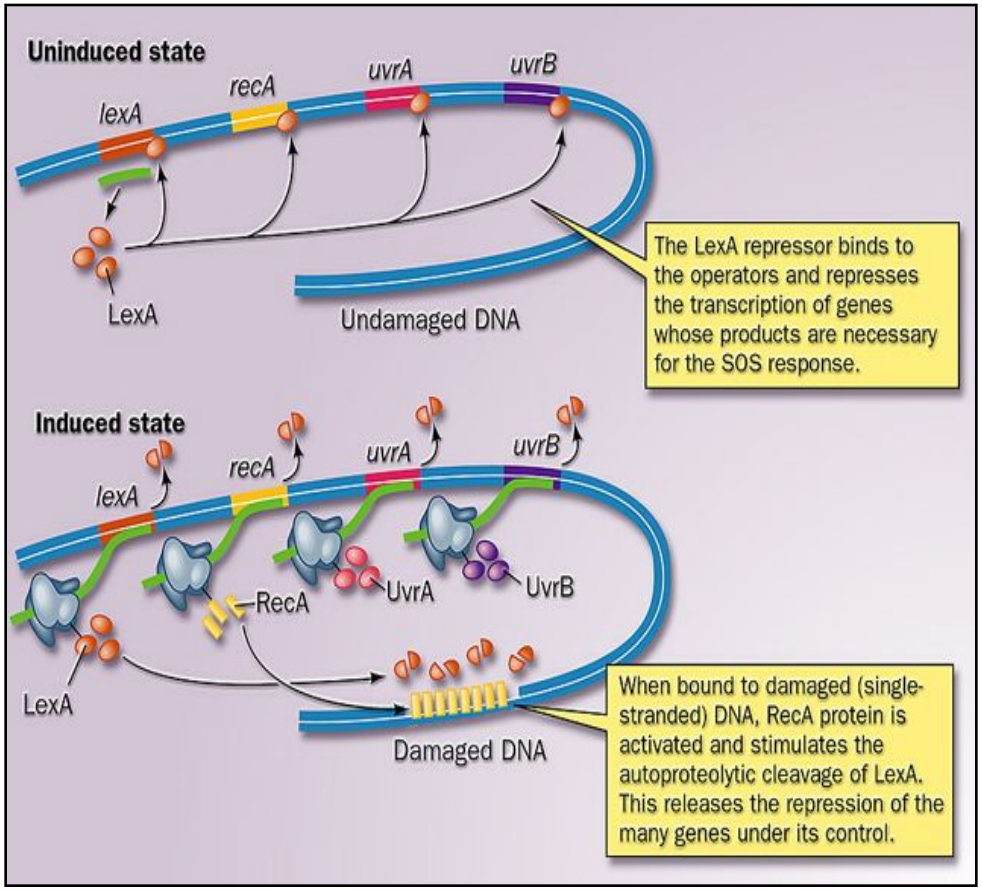


Точно еще не выяснено как индукции SOS-сигнала, как и его природа, влияет на связывание белка **recA** с одноцепочечными участками ДНК содержащими повреждения.

Это обусловленно огромным разнообразием повреждений, которые индуцируют SOS-ответ. Возможны различные предположения:

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

Индукция SOS-репарации



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

Основные термины

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

Индукция SOS-репарации

- **Ключевыми белками, задействоваными в процессе введения ошибок ДНК-полимеразой, являются продукты двух генов – <u>umuD и umuC</u>.**

6. Они составляют единый **<u>umuCD-оперон</u>**, находящийся под контролем репрессора LexA, а следовательно входящий в состав SOS-регулона, активирующегося при наличии непреодолимых препятствии для репликации клеточной ДНК.
7. Во время индукции SOS-ответа белок UmuD, подобно белку LexA, расщепляется по аутокаталитическому механизму, запускаемому при взаимодействии с RecA*.
8. В результате образуется полипептид **UmuD’** , включающий С-концевые остатки UmuD. В клетке UmuD’ существуют в виде гомодимеров, которые способны объединяться с белком UmuC, образуя комплекс $(UmuD')_2$–UmuC .

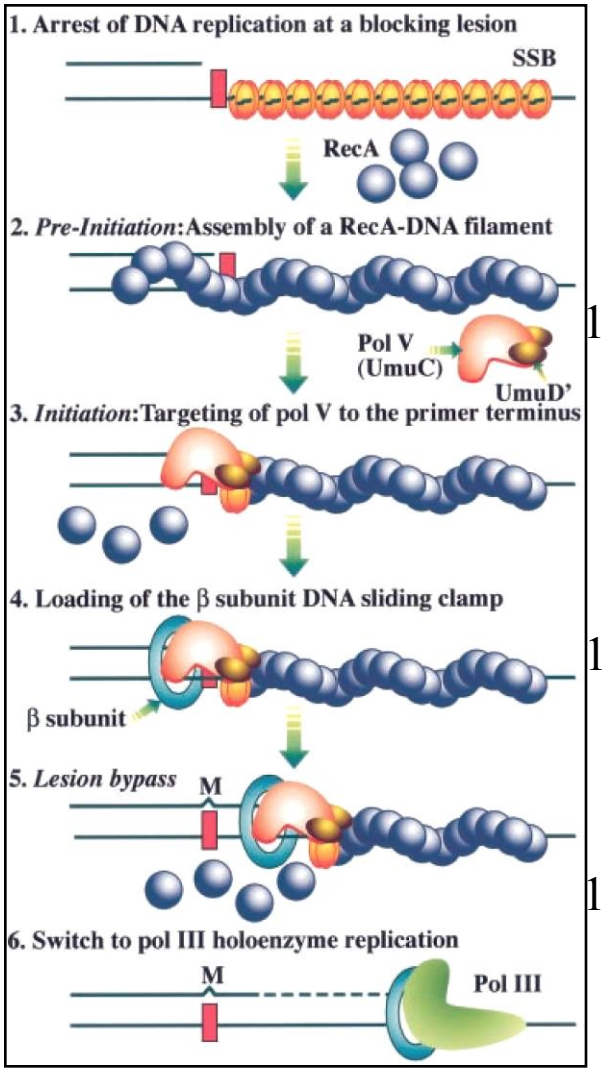
ДНК-полимераза 5

DNA polymerases in *E. coli*		
I	*polA*	major repair enzyme
II	*polB*	minor repair enztme
III	*polC*	replicase
IV	*dinB*	SOS repair
V	*umuD'$_2$C*	SOS repair

- **Настоящая роль белкового комплекса (UmuD')$_2$–UmuC в процессе SOS-репарации неизвестна. Существует две основных концепции:**

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

Индукция SOS-репарации



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

Функции белка RecA

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

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

ДНК-полимераза 4

DNA polymerases in *E. coli*		
I	*polA*	major repair enzyme
II	*polB*	minor repair enztme
III	*polC*	replicase
IV	*dinB*	SOS repair
V	*umuD'$_2$C*	SOS repair

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

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

Окончание SOS-репарации

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

Вырезание профагов

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

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

SOS репарация у E. Coli

Прежде всего об остановке репликации надо сообщить

Rec A

Связывается с однонитевой ДНК и образует ДНК-белковые филаменты
Однонитевые участки ДНК образуются при остановке репликативных вилок

Lex A

Мастер-регулятор транскрипции генов, кодирующих участвующие в репарации повреждений ДНК белки (31ген или более)

Димеры Lex A связываются с SOS боксами (20 п.н. консенсусы) в операторах генов репарации и ингибирует транскрипцию

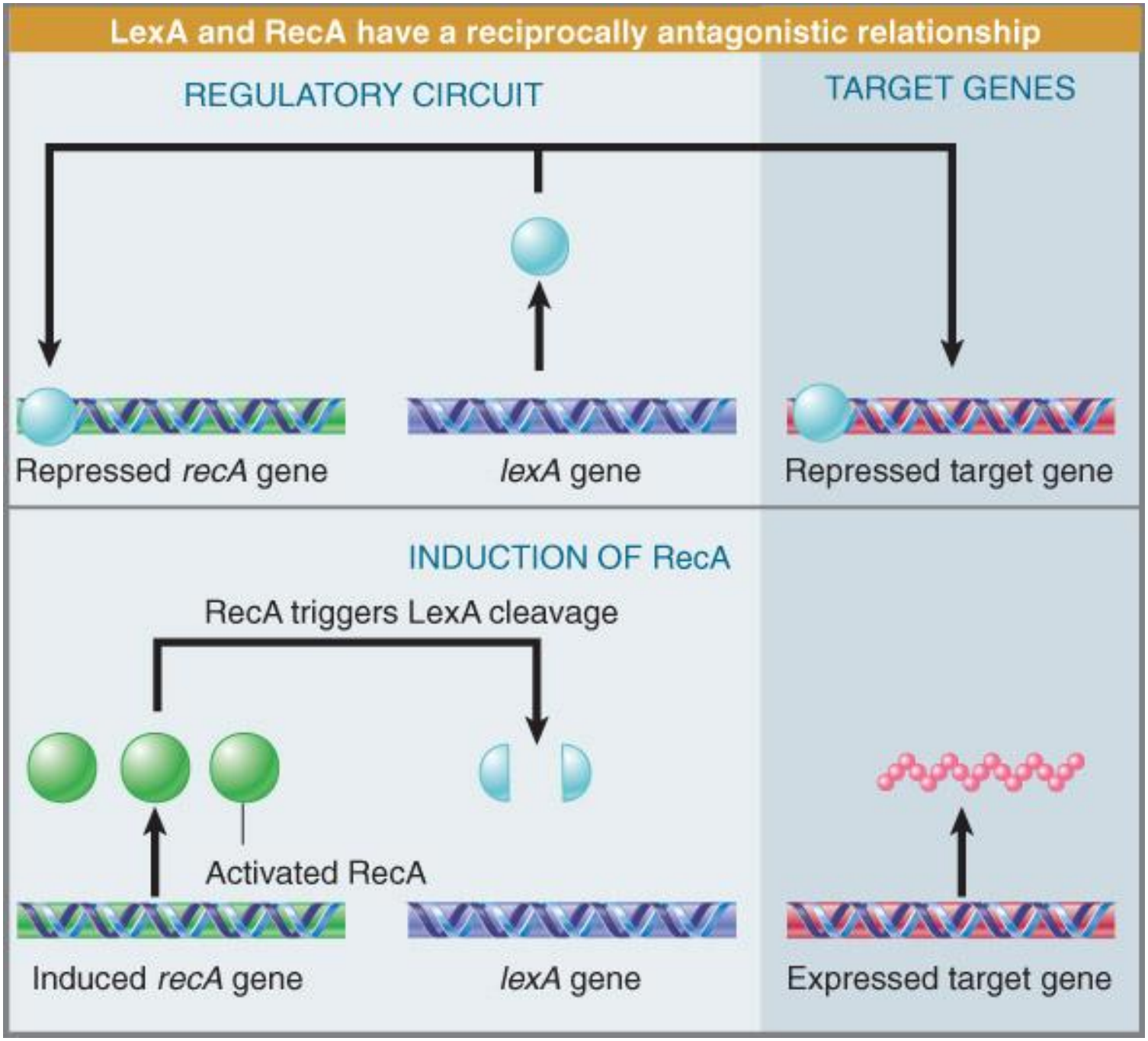
Филаменты Rec A стимулируют аутопротеолиз Lex A

При снижении концентрации Lex A сначала активируются, гены, контролируемые операторами, в состав которых входят низкоафинные Lex A боксы

lexA, recA, uvrA, uvrB, and uvrD

При дальнейшем снижении уровня Lex A активируются гены, обеспецивающие осуществление репарации с ошибками (мутазы)

UmuDC оперон


LexA and RecA have a reciprocally antagonistic relationship
REGULATORY CIRCUIT
TARGET GENES
Repressed recA gene
lexA gene
Repressed target gene
INDUCTION OF RecA
RecA triggers LexA cleavage
Activated RecA
Induced recA gene
lexA gene
Expressed target gene

UmuD повергается автопротеолитическому расщеплению с образованием активного фрагмента UmuD’

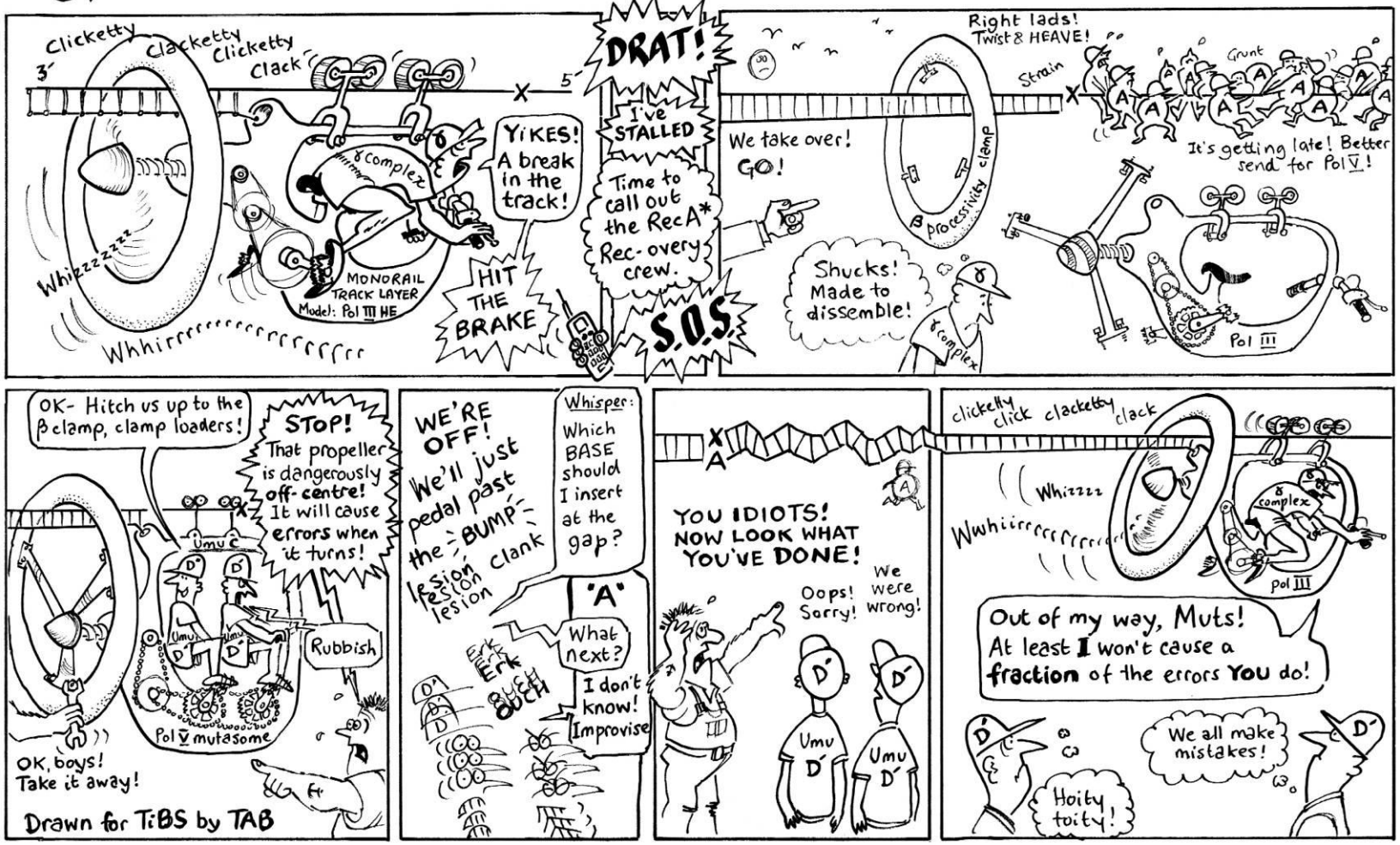
UmuD’ активирует черезблоковую полимеразу UmuC

комплекс (UmuD’)2-UmuC теперь называют **ДНК полимераза V**
эта полимераза осуществляет репликацию через AP сайты, тимидиновые димеры и ряд других повреждений

My Ron's a Good Man!

TODAY'S 'GOOD' ADVICE:

GETTING IT "WRONG" SOMETIMES WORKS OUT "RIGHT"...
(Mut-catalysed error-prone translesion synthesis)



Рекомендуемая литература

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