

Государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Иркутский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра патологической физиологии с курсом клинической иммунологии

**Л. О. Гуцол, С. Ф. Непомнящих**

# **Пострадиационное восстановление ДНК**

Учебное пособие

Иркутск  
ИГМУ  
2015

**УДК 577.346(075.8)**

**ББК 28.071я73**

**Г98**

*Рекомендовано ЦКМС ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России к использованию в учебном процессе в качестве учебного пособия для студентов, обучающихся по образовательной программе высшего образования – программе специалитета по специальности Медицинская биохимия (протокол № 4 от 23.04.2015 г.).*

*Авторы:*

**Л. О. Гуцол** – канд. биол. наук, доцент кафедры патологической физиологии с курсом клинической иммунологии ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России

**С. Ф. Непомнящих** – канд. мед. наук, старший преподаватель кафедры патологической физиологии с курсом клинической иммунологии ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России

*Рецензенты:*

**И. В. Клименков** – канд. биол. наук, доцент кафедры физико-химической биологии ФГБОУ ВПО ИГУ

**М. В. Ясько** – канд. мед. наук, доцент кафедры химии и биохимии ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России

**Гуцол, Л. О.**

**Г98** Пострадиационное восстановление ДНК : учебное пособие / Л. О. Гуцол, С. Ф. Непомнящих ; ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России, Кафедра патологической физиологии с курсом клинической иммунологии. – Иркутск : ИГМУ, 2015. – 55 с.

Учебное пособие «Пострадиационное восстановление ДНК» важно для студентов, изучающих радиобиологию, которые после окончания обучения будут работать врачами в научно-исследовательских институтах и лабораториях, занимающихся изучением влияния радиации на организм человека в целом и на клеточном уровне в частности.

Учебное пособие «Пострадиационное восстановление ДНК» предназначено для студентов, обучающихся по образовательной программе высшего образования – программе специалитета по специальности Медицинская биохимия.

**УДК 577.346(075.8)**

**ББК 28.071я73**

© Гуцол Л. О., Непомнящих С. Ф., 2015

© ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России, 2015

## Оглавление

Список сокращений.....	4
Введение.....	5
I. Повреждение ДНК при облучении ионизирующим излучением .....	6
II. Механизмы контроля целостности ДНК.....	11
III. Репарация ДНК.....	13
III.1. Классификация механизмов репарации .....	13
III.2. Механизмы репарации ДНК .....	14
III.2.1. Прямая репарация ДНК .....	14
III.2.1.1. Фотореактивация пиримидиновых димеров.....	14
III.2.1.2. Репарация AP-сайтов прямой вставкой пуринов.....	15
III.2.1.3. Прямая репарация однонитевых разрывов ДНК .....	166
III.2.2. Э ксцизионная репарация .....	16
III.2.2.1. Эксцизионная репарация оснований (BER) .....	20
III.2.2.2. Эксцизионная репарация неспаренных оснований .....	23
III.2.2.3. Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER) .....	26
III.2.3. SOS-ответ .....	28
III.2.4. Репарация, связанная с рекомбинацией.....	31
(Пострепликативная репарация, рекомбинационная репарация) .....	31
III.2.4.1. Репарация путем гомологической рекомбинации .....	32
III.2.2.2. Репарация путем негомологического воссоединения концов ДНК.....	35
III.2.2.3. Однонитевой отжиг по прямым повторам .....	36
Заключение.....	38
Тестовые задания.....	39
Эталоны ответов к тестовым заданиям.....	41
Белки и ферменты репарации.....	42
Словарь используемых терминов .....	49
Рекомендуемая литература.....	53

## Список сокращений

BER (base excision repair) – эксцизионная репарация оснований

DSB (double strand breaks) – двухнитевые разрывы ДНК

GG-NER (global genome nucleotide excision repair) – вариант NER, осуществляет поиск и удаление объемных повреждений во всем геноме, включая нетранскрибируемые участки и молчащий хроматин

MMR (mismatch repair) – эксцизионная репарация неспаренных оснований

NER (nucleotide excision repair) – эксцизионная репарация нуклеотидов

TC-NER (transcription-coupled nucleotide excision repair) – вариант NER, осуществляет поиск и удаление объемных повреждений в транскрибируемых участках

AP – апуриновый, апиримидиновый сайт

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

Гр – грей

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИИ – ионизирующее излучение

РНК – рибонуклеиновая кислота

## Введение

Учебное пособие «Пострадиационное восстановление ДНК» предназначено для самоподготовки студентов медицинских вузов, обучающихся по специальности высшего образования Медицинская биохимия.

В пособии разбираются различные виды повреждения ДНК под действием ионизирующего излучения.

Рассматриваются изменения метаболизма на клеточном уровне, механизмы – чекпойнты, запускающие реализацию процессов репарации ДНК. Уделяется внимание роли различных белков, определяющих факт и вид повреждения. Приведены классификации механизмов репарации по времени проведения, в зависимости от сложности, продолжительности восстановления повреждений ДНК, а также от уровня повреждения.

Уделяется внимание механизмам и особенностям репарации ДНК в соответствии с приведенными классификациями.

В пособии даются тестовые задания для самопроверки изучаемого материала и эталоны к ним. А также приведен список встречающихся в тексте белков и ферментов репарации, словарь слов, используемых в тексте, и дан перечень используемой литературы.

## I. Повреждение ДНК при облучении ионизирующим излучением

При облучении клетки ионизирующим излучением поражаются все ее структуры. Вероятность поражения тех или иных молекул определяется их размером: чем крупнее молекула, тем больше вероятность ее повреждения. Факторами повреждения при облучении являются не только электромагнитное излучение или заряженные частицы, но и продукты радиолиза воды – активные радикалы кислорода.

Судьба клетки определяется степенью повреждения ДНК. При ионизации ДНК поглощенная энергия может мигрировать по нуклеотидной цепи до локализации в «слабых» местах. В ДНК такими местами являются фосфатно-углеродная связь, а также пуриновые и пиримидиновые кольца (рис. 1).

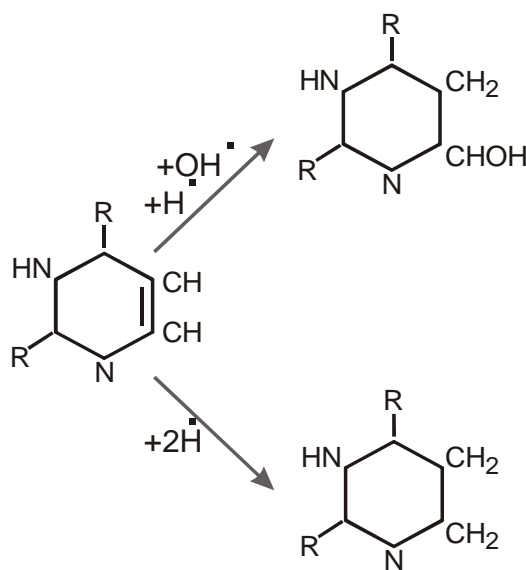


Рис. 1. Модификация пиримидиновых оснований под влиянием продуктов радиолиза воды.

При облучении ИИ возникают следующие повреждения ДНК.

1) Окисление азотистых оснований и образование перекисей нуклеотидов.

После облучения у пиримидиновых оснований, под воздействием радикала  $OH^\bullet$  на двойную связь между четвертым и пятым углеродными

атомами происходит насыщение двойной связи с последующим образованием гидроперекисей (рис. 2).

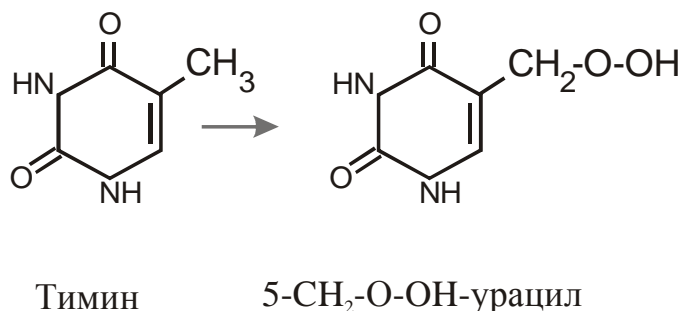


Рис. 2. Образование перекиси урацила.

Наиболее чувствительны к действию облучения пиримидиновые основания, в то время как пуриновые основания в 1,5–2 раза более устойчивы к действию облучения.

Количество поврежденных оснований ДНК при облучении примерно в 4 раза превышает число односторонних разрывов.

## 2) Гидролиз – дезаминирование, депуринизация, депиримидинизация.

При депуринизации и депиримидинизации участка молекулы ДНК образуется AP-сайт. AP-сайт (апиримидиновый сайт, apurimidinic site) – участок в нуклеотидной последовательности ДНК, в котором разорвана связь между остатком дезоксирибозы и пиримидиновым (тимин, цитозин) основанием, но сохраняется пентозофосфатный остов. После этого в молекуле образуется брешь – пентозо-фосфатные группы без оснований (рис. 3). При этом ковалентная связь между основанием и пентозом (гликозидная связь) разрушается и пуриновое или пиримидиновое основание «выпадает» из молекулы ДНК.

Дезаминирование – отщепление аминогруппы от азотистого основания с образованием нового вещества. Реакции дезаминирования цитозина и превращение его в урацил, аденина в гипоксантин, гуанина в ксантин происходят значительно реже, чем депуринизация (рис. 4).

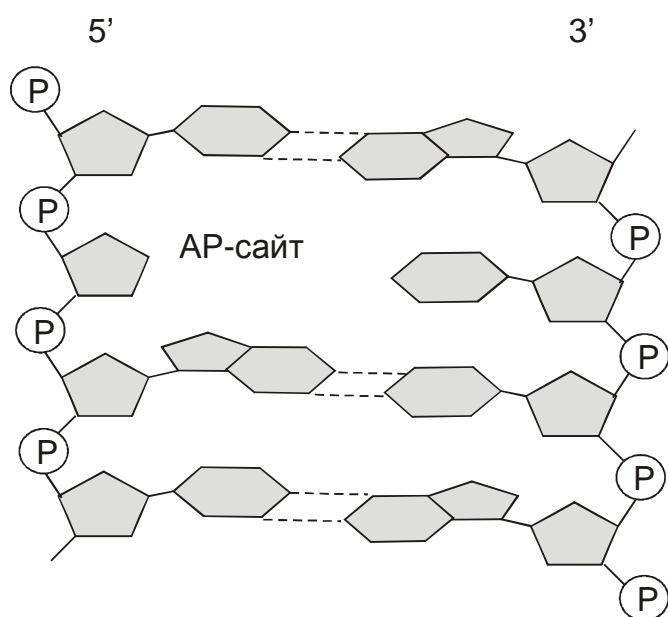


Рис. 3. AP-сайт в молекуле ДНК.

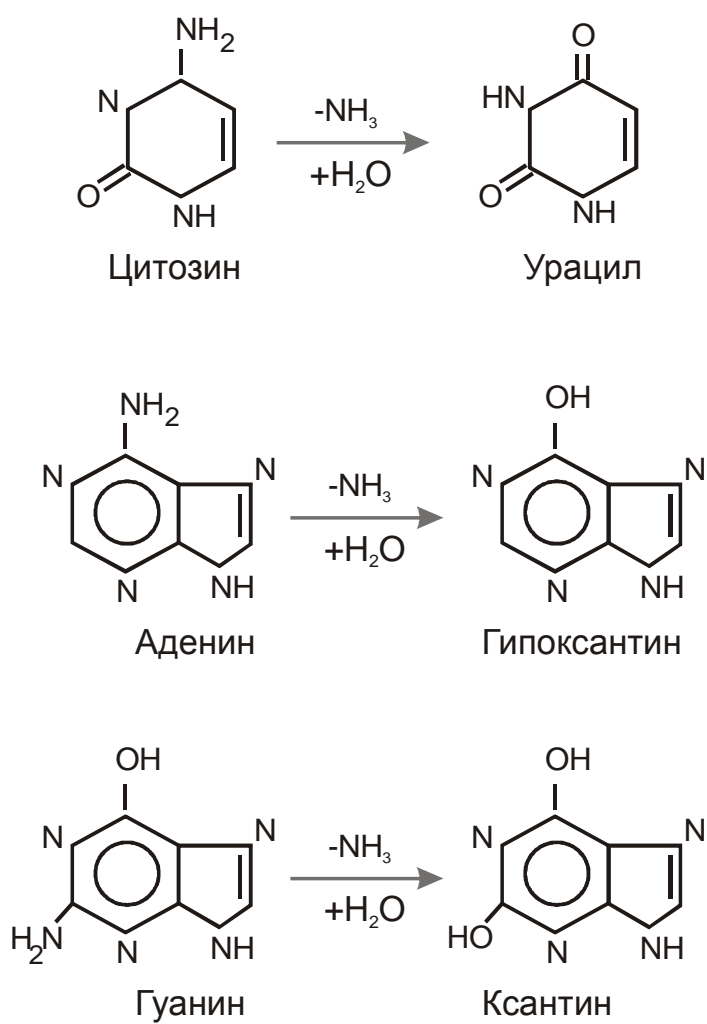


Рис. 4. Дезаминирование азотистых оснований.



3) Димеризация пиримидинов (чаще всего тимина, реже цитозина) – образование димеров пиримидиновых оснований.

Под действием ионизирующего излучения двойная связь между 5 и 6 атомами углерода в составе пиримидиновых оснований (тимине и цитозине) может разрываться. Атомы углерода остаются связанными одной связью. Освободившиеся валентности между C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> атомами последовательно расположенных оснований формируют пиримидиновый димер (рис. 5).

В зависимости от того, какие основания соединены в димер, их называют димерами тимина, цитозина или тимин-цитозиновыми димерами.

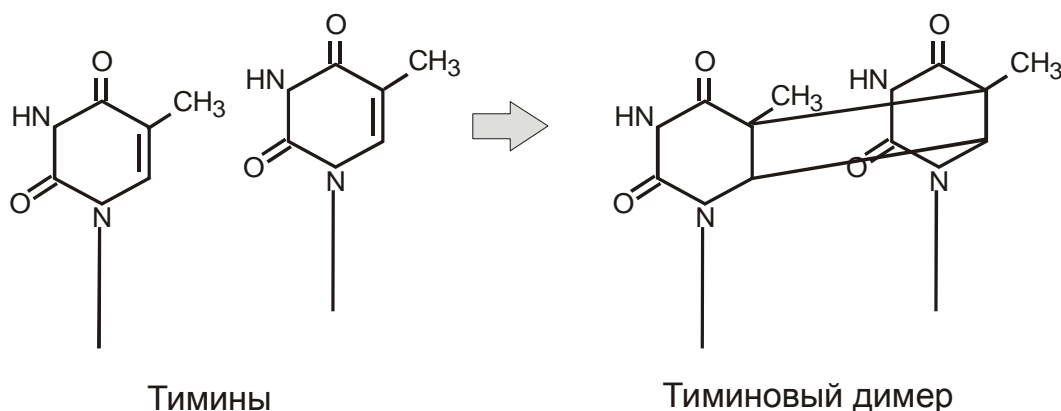


Рис. 5. Образование тиминового димера.

#### 4) Разрыв цепей (одиночные и двойные разрывы).

Одиночные разрывы нитей ДНК. Разрыв связей в пентозо-фосфатном скелете нарушает непрерывность нити ДНК. Если разорвана одна из нитей, говорят об однонитевом или одиночном разрыве. Вокруг однонитевого разрыва появляются локальные участки денатурации ДНК, которые включают около 10 пар оснований.

Двойные (двухнитевые) разрывы нитей ДНК (совпадение разрывов противоположных нитей ДНК в одной точке). Двойные разрывы образуются как при случайном пространственном совпадении одиночных разрывов в противоположных нитях ДНК, так и вследствие одномоментного повреждения

обеих нитей при выделении в данном микрообъёме клетки большого количества энергии.

5) *Межнитевые сшивки – образование поперечных связей:*

- между основаниями одной нити ДНК или двух параллельных нитей ДНК;
- между ДНК и белковыми молекулами, например гистонами.

ДНК находится в клетке в составе хроматина – комплекса ДНК и белков. Хромосомы связаны с мембраной с помощью специальных мембранных белков. Облучение приводит к повреждению отдельных молекул ДНК, белка и липидов, изменяет связи белка с ДНК, приводит к нарушению структуры ДНК-мембранных комплексов. Также облучение индуцирует образование ковалентных сшивок ДНК-белок – между аминокислотами белка и азотистыми основаниями ДНК, что приводит к нарушению раскручивания ДНК для репарации и репликации, т.к. нарушает доступность отдельных участков ДНК.

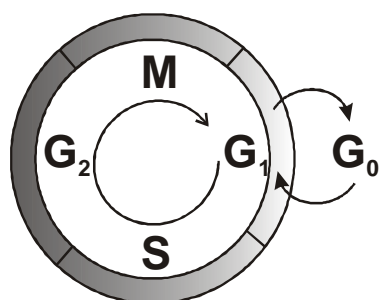
При воздействии редкоизионизирующего излучения в дозе 2 Гр, вызывающего гибель от 10 до 90 % клеток разных тканей человека, в ДНК одной клетки образуется около 2000 однонитевых и 80 двухнитевых разрывов, повреждается 1000 оснований и формируется 300 сшивок с белком. Именно эти поражения и лежат в основе радиационной гибели клетки, длительного нарушения эффективности деления ее потомков и злокачественного перерождения, а в случае воздействия на половые клетки – и генетических последствий облучения родителей для потомства.

Повреждения ДНК, наблюдающиеся после облучения, не являются уникальными. Они возникают и в необлученных клетках. Поэтому в ходе эволюции сформировалась сложная система репарации ДНК, которая может восстановить большинство повреждений ДНК, полученных при облучении.

## II. Механизмы контроля целостности ДНК

Повреждения, возникающие в ДНК после облучения, изменяют метаболизм клетки и активируют процессы репарации ДНК или апоптоза клетки. Запускают реализацию этих процессов специальные механизмы «обзора» генома, которые называются «сверочные точки (чекпойнты) повреждений».

В клетке существует несколько чекпойнтов с различающимися, в зависимости от цикла клетки, функциями. Если клетка «проходит» контрольную точку, то она продолжает «двигаться» по клеточному циклу. В противном случае, клетка останавливается и следующая фаза клеточного цикла не наступает до тех пор, пока не будут устранены препятствия, не позволявшие клетке пройти через контрольный пункт. Существует как минимум четыре контрольных точки клеточного цикла (рис. 6).



M - митоз  
G<sub>1</sub> - пресинтетический период интерфазы  
G<sub>0</sub> - период покоя  
S - синтетический период интерфазы  
G<sub>2</sub> - постсинтетический период интерфазы

Рис. 6. Периоды клеточного цикла.

– Точка в G<sub>1</sub>, где проверяется интактность ДНК, перед вхождением в S-фазу. Если ДНК содержит повреждения, вероятнее всего, клетки элиминируются путем p53-опосредованного апоптоза.

– Сверочная точка в S-фазе, в которой проверяется правильность репликации ДНК. Например, клетка останавливается в этой фазе при недостатке нуклеотидов в ДНК.

– Сверочная точка в G<sub>2</sub>, в которой проверяются повреждения, пропущенные при прохождении предыдущих сверочных точек, либо

полученные на последующих стадиях клеточного цикла. В G2 фазе детектируется полнота репликации ДНК, и клетки, в которых ДНК недореплицирована, не входят в митоз.

– В контрольной точке сборки веретена деления проверяется, все ли кинетохоры прикреплены к микротрубочкам.

Система чекпойнтов повреждения ДНК в настоящее время изучена недостаточно хорошо. Белки, принимающие участие в этой системе, по значимости (роли) разделяют на три группы: сенсоры, медиаторы, эффекторы.

В группу сенсоров входят белки, определяющие факт повреждения ДНК и вид повреждения. Предполагают, что эту функцию могут выполнять некоторые из белков комплекса репликации. Найдя повреждение, сенсорные белки передают информацию посредникам, которые, в свою очередь, инициируют клеточный ответ: остановку клеточного цикла и репарацию ДНК или апоптоз клетки.

Основными белками-медиаторами являются два консервативных белка-киназы ATM<sup>1</sup> (Ataxia-Telangiectasia Mutated) и ATR (ATM Related).

ATM и ATR связываются с поврежденным участком и фосфорилируют различные белки-мишени, например, BRCA1 и p53, которые и реализуют клеточный ответ.

Белок p53 постоянно присутствует в клетке в очень низкой концентрации. Постоянное разрушение белка в здоровой клетке обеспечивается белком Mdm2 (убиквитин-лигазой), направляющей p53 к протеасомам для разрушения. Фосфорилирование p53 после повреждения ДНК снижает его связывание с Mdm2. В результате снижается деградация p53, и его концентрация в клетке возрастает.

Белок p53 регулирует экспрессию более десяти белков, ответственных за активацию различных супрессорных систем – индукторов апоптоза,

---

<sup>1</sup> Мутации в двух аллелях гена ATM приводят к развитию заболевания атаксия-телеангиэктазия (ataxia-telangiectasia). Это заболевание характеризуется нейродегенеративными процессами, иммунодефицитом и предрасположенностью к злокачественным новообразованиям.

регуляторов клеточного цикла в фазе G1, ингибиторов роста и ангиогенеза. Активация этого белка влечет за собой активацию этих процессов.

Белок BRCA1 обладает схожими эффектами. Он взаимодействует с белками репарационных систем и стимулирует восстановление нормальной структуры ДНК. Одновременно индуцирует остановку клеточного цикла – усиливает активность p53 и активирует белки, останавливающие клетки в G1 и в G2-фазе клеточного цикла.

### **III. Репарация ДНК**

#### **III.1. Классификация механизмов репарации**

Процесс, позволяющий живым организмам восстанавливать повреждения, возникающие в ДНК, называют репарацией. Все репарационные механизмы основаны на том, что ДНК – двухцепочечная молекула, т. е. в клетке есть как минимум 2 копии генетической информации. Если нуклеотидная последовательность одной из двух цепей оказывается повреждённой или изменённой, информацию можно восстановить по второй комплементарной сохраненной цепи; если же разрыв затрагивает обе цепи ДНК, информация для восстановления заимствуется из гомологичной хромосомы.

В организмах как эукариот, так и прокариот существуют много репаративных систем, включающих сотни разных белков. Классифицировать системы репарации можно по разным признакам:

##### **1. Классификация по времени проведения репарации:**

- до репликации ДНК (фаза G1);
- в процессе репликации ДНК (фаза S);
- пострепликативная репарация (фаза G2).

##### **2. Классификация по механизмам репарации:**

- прямая репарация (прямое химическое исправление повреждений);

- эксцизионная репарация;
- SOS-репарация;
- рекомбинантная репарация.

3. По виду репарируемых повреждений:

- удаление пиримидиновых димеров;
- устранение однонитиевых разрывов;
- устранение двухнитиевых разрывов;
- репарация AP-сайтов и др.

## **III.2. Механизмы репарации ДНК**

### **III.2.1. Прямая репарация ДНК**

Прямая репарация – наиболее простой и быстрый путь устранения повреждений в ДНК. Устранение дефекта происходит в одну стадию.

С помощью реакций этого типа может быть исправлено только ограниченное число повреждений. Реакциями прямой репарации являются:

1. фотореактивация пиримидиновых димеров
2. репарация AP-сайтов прямой вставкой пуринов
3. прямая репарация однонитиевых разрывов ДНК.

#### **III.2.1.1. Фотореактивация пиримидиновых димеров**

Расщепление связи в тиминовых димерах и восстановление исходной структуры ДНК происходит при участии ферментов фотолиаз. ДНК-фотолиазы – это группа ферментов, активируемых светом, с длиной волны 300–600 нм (видимая область). Эти ферменты имеют в своем составе особый светочувствительный центр.

Фотолиаза связывается с поврежденным участком. Затем свет активирует фотолиазу и она разрывает связи, возникшие между пиримидиновыми кольцами ДНК (рис. 7). После расщепления связей в поврежденных основаниях

и восстановления их формы фотолиаза отходит от ДНК. Прямое восстановление структуры ДНК на этом завершено.

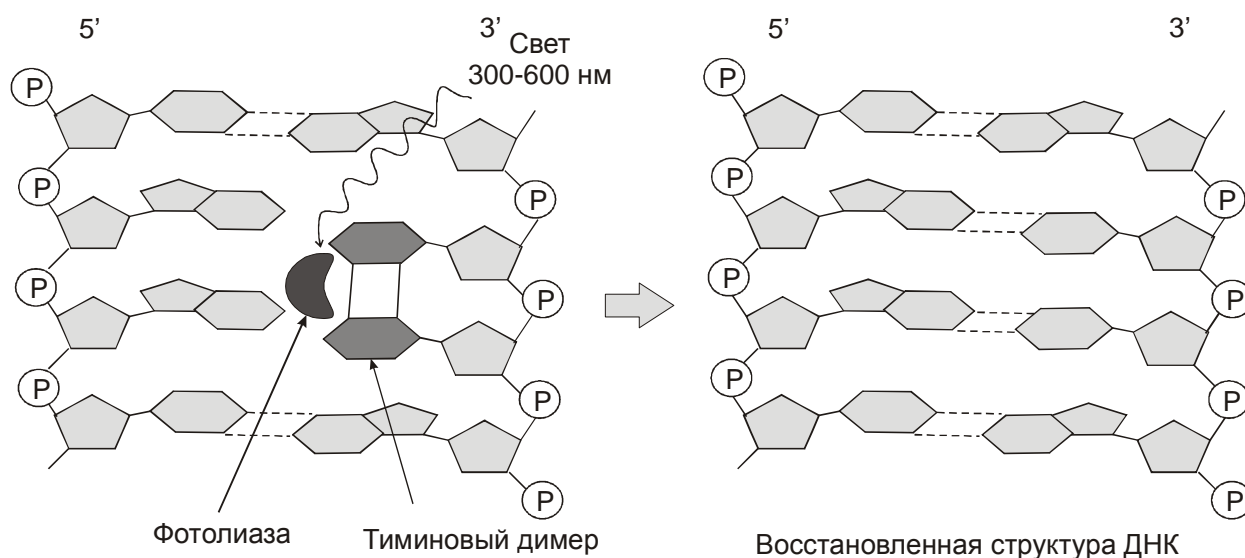


Рис. 7. Процесс фотореактивации.

Это единственная пока найденная ферментная реакция, в которой фактором активации служит не химическая энергия, а энергия видимого света.

Фотолиазы были найдены у бактерий, дрожжей, дрозофилы, иглокожих. Наличие этого фермента у высших млекопитающих, включая человека, обсуждается.

### III.2.1.2. *Репарация AP-сайтов прямой вставкой пуринов*

При формировании AP-сайта активируется фермент ДНК-инсертаса (от англ. insert – вставлять). Инсертаса присоединяет основание к дезоксирибозе в соответствии с правилом комплементарности. Структура ДНК приобретает исходный неповрежденный вид. При этом типе репарации нет необходимости разрезать цепь ДНК, вырезать неправильный нуклеотид и репарировать разрыв. Однако этот механизм репарации работает медленно и таким образом может быть исправлено небольшое число AP-сайтов.

### III.2.1.3. Прямая репарация однонитевых разрывов ДНК

Для восстановления структуры ДНК при однонитевых разрывах может оказаться достаточно работы одного фермента – ДНК-лигазы (от англ. *ligate* – соединять, перевязывать).

ДНК-лигазы – ферменты, катализирующие ковалентное сшивание цепей ДНК в дуплексе при репликации, репарации и рекомбинации. Они образуют фосфодиэфирные мостики между 5'-фосфорильной и 3'-гидроксильной группами соседних дезоксирибонуклеотидов в местах разрыва ДНК (рис. 8) или между двумя молекулами ДНК. Реакция протекает с затратой энергии АТФ. Для образования этих мостиков лигазы используют энергию гидролиза макроэргической связи АТФ.

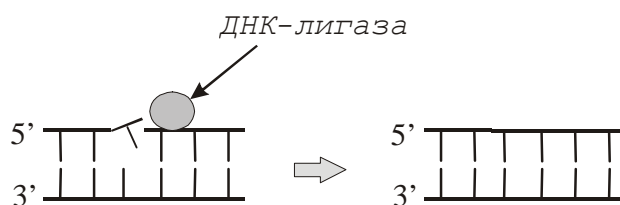


Рис. 8. Участок ДНК с однонитевым разрывом, который восстанавливается ДНК-лигазой.

У высших организмов встречается несколько типов ДНК-лигазы. В этом типе репарации принимает участие ДНК-лигаза I.

### III.2.2. Эксцизионная репарация

В клетке имеются более сложные реакции восстановления структуры ДНК, при которых поврежденные участки вырезаются из цепи ДНК; при этом могут удаляться не только поврежденные участки, но и соседние с ними нуклеотиды (отсюда происходит и термин «эксцизионная репарация», от *excision* – вырезание). Образовавшиеся бреши заполняются неповрежденным материалом. Для эксцизионной репарации необходима вторая (комплементарная) цепь ДНК. Все типы эксцизионной репарации имеют общие этапы.



1 этап. Распознавание повреждения. Например, ДНК-гликозилазы, которые перемещаются по ДНК, выворачивая основание из спирали, чтобы оценить его статус.

2 этап. Надрезание нити пентозофосфатного остова ДНК осуществляют ферменты эндонуклеазы. Эндонуклеазы – это ферменты, способные осуществлять гидролиз внутренних фосфодиэфирных связей и таким образом расщеплять молекулы ДНК. Участвуют в рекомбинации, репарации, рестрикции.

3 этап. Эксцизия участка, содержащего повреждение.

Осуществляют ферменты нуклеазы. Бракованное основание удаляется в одиночку или вместе с окружением – участками цепи в 2-10 нуклеотидов. Размер вырезаемого куска и «заплаты», зависит от самого повреждения и соотношения имеющихся в клетке ДНК-полимераз.

Эксонуклеазы – белки из группы нуклеаз, отщепляющие концевые мононуклеотиды от полинуклеотидной цепи путём гидролиза фосфодиэфирных связей между нуклеотидами. В зависимости от способности гидролизовать связи на 3' и 5' концах полинуклеотидной цепи различают 3' и 5' экзонуклеазы. Эксонуклеазы встречаются в клетках как обособленно, так и в составе ферментативных комплексов. Например, ДНК-полимераза I содержит 5' экзонуклеазу, которая отщепляет РНК-праймер, прикрепленный непосредственно к тому месту, на котором происходит синтез ДНК.

4 этап. Репаративный синтез на неповрежденной матрице. Встраивание нуклеотидов проводят ферменты ДНК-полимеразы. ДНК-полимеразы – ферменты, катализирующие полимеризацию дезоксирибонуклеотидов вдоль цепочки нуклеотидов ДНК, которую фермент «читает» и использует в качестве шаблона.

Синтез цепей ДНК происходит в направлении 5'→3' растущей цепи, т.е. очередной нуклеотид присоединяется к свободному 3'-ОН-концу предшествующего нуклеотидного остатка. Синтезируемая цепь всегда

антипараллельна матричной цепи. В ходе репликации образуются 2 дочерние цепи, представляющие собой копии матричных цепей.

Эукариоты содержат по меньшей мере пятнадцать видов ДНК-полимераз, которые различаются по числу субъединиц, молекулярной массе, ассоциации с разными вспомогательными белками и функциональному назначению.

- ДНК-полимераза  $\alpha$ . Начинает синтез фрагмента ДНК на комплементарной цепи. Присоединяясь к определённому сайту одноцепочечной ДНК, ДНК-полимераза  $\alpha$  синтезирует небольшой фрагмент РНК-праймер, состоящий из 8–10 рибонуклеотидов. Затем синтезирует фрагмент цепи ДНК, около 50 дезоксирибонуклеотидов. Такая многофункциональность ДНК-полимеразы  $\alpha$  обусловлена особенностями ее строения. Она состоит из четырёх субъединиц, каждая из которых выполняет определённую функцию: «узнавание» сайта репликации, синтез праймера (8–10 рибонуклеотидов), синтез фрагмента цепи ДНК, около 50 дезоксирибонуклеотидов. После этого к транскрипции приступают полимеразы  $\delta$  и  $\epsilon$ .
- ДНК-полимераза  $\beta$  и ДНК-полимераза  $\lambda$  – присоединение к 3'-концу разорванной цепи только одного нуклеотида (например, при short patch пути BER).
- ДНК-полимераза  $\gamma$  – осуществляет репликацию митохондриальной ДНК.
- ДНК-полимераза  $\delta$  – продолжает синтез новой цепи в направлении от 5'- к 3'-концу после ДНК-полимеразы  $\alpha$ , а также участвует в репарации, вставляя в брешь большое количество нуклеотидов. Ассоциирован с белком PCNA (proliferating cell nuclear antigen), который удерживает полимеразу  $\delta$  на матричной цепи ДНК и синтез идет до тех пор, пока фрагмент не достигнет нужной длины.
- ДНК-полимераза  $\epsilon$  – иногда замещающая ДНК-полимеразу  $\delta$  во время синтеза 3'-5'-моноспирали.

Обнаружены и другие эукариотические полимеразы, которые пока недостаточно изучены.

Ни одна эукариотическая полимеразы не может отщеплять праймеры, то есть не обладает 5'-3'-эксонуклеазным действием. Эту функцию выполняют другие ферменты. Полимеразы, осуществляющие элонгацию ( $\gamma$ ,  $\delta$  и  $\epsilon$ ) обладают 3'-5'-эксонуклеазными свойствами.

У бактерий обнаружено пять ДНК-полимераз:

- ДНК-полимераза I задействована в восстановлении ДНК, обладает и 5'-3', и 3'-5'-эксонуклеазным действием;
- ДНК-полимераза II участвует в репликации поврежденной ДНК. Обладает способностью 5'-3'-удлинения цепочки и 3'-5'-эксонуклеазным действием;
- ДНК-полимераза III – основная полимеразы бактерий, обладающая также 3'-5'-эксонуклеазным действием;
- ДНК-полимераза IV, V – принимают участие в реализации SOS-ответа. Эти ДНК-полимеразы имеют низкую точность копирования и осуществляют мутагенную репликацию ДНК. Эти полимеразы могут включать в новосинтезированную цепь неправильные нуклеотиды.

5 этап. Лигирование – сшивание двух цепей ДНК ферментами-лигазами.

У млекопитающих обнаружено несколько типов лигаз.

- ДНК-лигаза I лигирует фрагменты Оказаки в ходе репликации отстающей цепи ДНК и участвует в эксцизионной репарации.
- ДНК-лигаза II – его функция малоизучена; имеются две теории образования этого фермента. Согласно первой теории, лигаза II является продуктом деградации фермента лигазы III. По второй теории, фермент кодируется тем же геном, что и ДНК-лигазы III, различие формируется при сплайсинге.
- ДНК-лигаза III участвует в эксцизионной репарации и в рекомбинации.

ДНК-лигаза IV катализирует окончательный этап негомологичного соединения (non-homologous end joining – NHEJ) двухнитевых разрывов ДНК. Также требуется для V(D)J рекомбинации<sup>2</sup> генов иммуноглобулинов.

### **Типы эксцизионной репарации**

Основные типы эксцизионной репарации получили свои названия в зависимости от того, какие именно повреждения исправляются.

1. Эксцизионная репарация оснований (base excision repair, BER).
2. Эксцизионная репарация неспаренных оснований (mismatch repair, MMR).
3. Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER, nucleotide excision repair).

Эти типы репарации, несмотря на лежащий в их основе общий процесс вырезания участка ДНК с повреждением, принципиально различаются между собой.

#### **III.2.2.1. Эксцизионная репарация оснований (BER)**

Объектом эксцизионной репарации оснований служат неправильно спаренные, алкилированные, окисленные и т.п. основания. Этот тип повреждений не вызывает серьезных изменений в структуре двойной спирали ДНК, не приводит к нарушению репликации ДНК и остановке клеточного цикла, но служит источником мутаций.

Выделяют два пути BER репарации.

- 1 – репарация короткими фрагментами (short path repair);
- 2 – репарация длинными фрагментами (long path repair).

#### **Репарация короткими фрагментами**

В ходе этой репарации вначале удаляется основание поврежденного нуклеотида, затем – дезоксирибоза. Образовавшаяся брешь заполняется новым нуклеотидом. Этот процесс проходит в несколько этапов (рис. 9).

---

<sup>2</sup> V(D)J-рекомбинация – механизм соматической рекомбинации ДНК, происходящий на ранних этапах дифференцировки лимфоцитов и приводящий к формированию антиген-распознающих участков иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора.

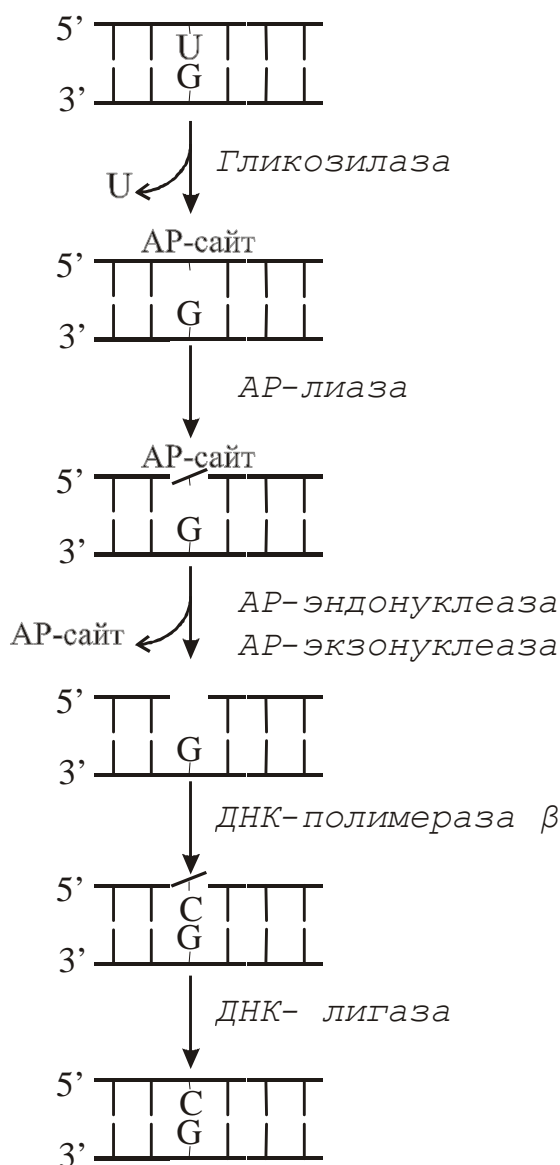


Рис. 9. Процесс BER репарации короткими фрагментами у эукариот.

**1 этап** – распознавание и удаление поврежденного основания.

Распознают поврежденные основания ферменты ДНК-гликозилазы. Эти же ферменты гидролизуют N-гликозидную связь между пентозофосфатным остовом и поврежденным основанием.

ДНК-гликозилаза выворачивает основание наружу и оценивает его на предмет повреждения. Как только фермент находит и распознает поврежденное основание, он отщепляет его от пентозы.

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 широкий, а у некоторых – узкий. У *E.coli* к настоящему времени выделено и описано 8, а у человека – 11 различных гликозилаз (вырезают различные аномальные основания – 8-оксогуанин, урацил, метилпурины и др.).

**2 этап** – гидролиз 3', 5'-фосфодиэфирной связи в месте повреждения.

Этот процесс реализуется ферментом эндонуклеазой, которая гидролизует 3', 5'-фосфодиэфирную связь.

**3 этап** – удаление AP-сайта.

Как только в цепи ДНК возникает разрыв, в работу вступает ещё один фермент – АП-экзонуклеаза у эукариот (фосфодиэстераза у *E. coli*), который отщепляет от цепи дезоксирибозу, лишённую основания. В одной цепи ДНК появляется брешь размером в один нуклеотид. Напротив бреши в противоположной нити ДНК расположен неповрежденный нуклеотид.

**4 этап** – вставка нуклеотида.

К 3'-концу образовавшейся бреши присоединяется ДНК-полимераза  $\beta$  у эукариот (полимераза I у *E. coli*) и вставляет комплементарный нуклеотид.

**5 этап** – сшивка двух соседних фрагментов.

Соединяет неповрежденный и вновь синтезированный участки цепи ДНК фермент ДНК-лигаза. Он образует фосфодиэфирные мостики между 5'-фосфорильной и 3'-гидроксильной группами соседних дезоксинуклеотидов.

### **Репарация длинными фрагментами**

Этот путь активизируется, если поврежденный участок не ограничивается одним нуклеотидом или поврежденное основание не может быть убрано ДНК полимеразой. В этом случае выщепляется от 2-х до 13-и нуклеотидов. После вставки первого нуклеотида полимеразы- $\beta$  отсоединяется от ДНК и присоединяются полимеразы  $\delta$  или  $\epsilon$ . Эти полимеразы связаны с белком PCNA (proliferating cell nuclear antigen), который удерживает полимеразу  $\delta$  на матричной цепи ДНК: три молекулы PCNA плотно взаимодействуют друг с другом, формируя замкнутое кольцо вокруг двойной спирали ДНК и синтез идет до тех пор, пока фрагмент не достигнет нужной длины.

Во время этого синтеза участок цепи ДНК, ранее спаренный с тем, который служит матрицей для синтеза, вытесняется, образуя свободно свешивающийся фрагмент ДНК – flap. Затем специальные ферменты его удаляют: у прокариот – дезоксирибонуклеаза IV, у эукариот – FEN1 (flap endonuclease I).

Такой механизм репарации реализуется у *E. coli* и человека для вырезания неповрежденных (немодифицированных) ошибочно спаренных нуклеотидов. Механизм последовательного эндо- и экзонуклеазного расщепления ДНК не используется для удаления поврежденных (измененных) нуклеотидов. Это связано, по-видимому, с тем, что такие нуклеотиды часто являются ингибиторами экзонуклеаз.

Одним из решений данной проблемы стало использование ферментной системы, которая вносит одноцепочечные разрывы по обе стороны от поврежденного нуклеотида на некотором расстоянии от него с последующим удалением одноцепочечного фрагмента ДНК, содержащего измененный нуклеотид. Такой механизм эксцизионной репарации функционирует у всех исследованных видов живых организмов.

### ***III.2.2.2. Эксцизионная репарация неспаренных оснований***

Эксцизионная репарация неспаренных оснований (mismatch repair, MMR, коррекция неспаренных оснований, КНО) исправляет ошибочно встроенные неповрежденные основания, которые не образуют нормальное Уотсон-Криковское спаривание (G/T, G/G, A/C и C/C). Такие пары называют мисмэтчами (mismatch). Также мишенями этого типа репарации являются межнитевая сшивка, фотопродукты, протяженные вставки и делеции.

В основе этого механизма репарации лежит неполная схожесть дочерней нити ДНК и материнской сразу после репликации. Отличия дочерней нити заключаются в следующем:

1. материнская нить ДНК несет метилированные аденины, а в дочерней нити до окончания репликации аденины еще не метилированы. Их метилирование происходит только после окончания репликации;
2. в дочерней нити некоторое время остаются недолигированные одностранные разрывы (бреши), образовавшиеся во время репликации.

У *E. coli* комплекс ферментов MMR различает неметилированные участки, у эукариот – одностранные разрывы.

Подробно механизм MMR изучен на *E. coli*. Этапы MMR (рис. 10).

**1 этап** – Распознавание некомплементарного нуклеотида.

Этот процесс происходит при участии специальных белков Mut S, Mut L, Mut H. Каждый из белков выполняет свою специфическую функцию.

– Mut S находит неправильную пару и связывается с этим фрагментом.

– Mut H присоединяется к метилированному (по аденину) участку – GATC<sup>3</sup>-, расположенному вблизи некомплементарной пары.

– белок Mut L связывает белки Mut S и Mut H в единую структуру и завершает образование активного фермента.

Эндонуклеазную активность в сформированном комплексе проявляет Mut H. Этот комплекс гидролизует фосфодиэфирную связь в неметилированной цепи с двух сторон от мисмэтча.

**2 этап** – отсоединение «неправильного» участка между двумя надрезами и образование бреши.

К свободным концам участка цепи, несущего неправильный нуклеотид, присоединяется экзонуклеаза. Отщепляя по одному нуклеотиду в направлении 3'→5' или 5'→3' (в зависимости от типа фермента) концу дочерней цепи, она устраняет участок, содержащий некомплементарную пару. Раскручивает участок цепи ДНК перед экзонуклеазой фермент хеликаза II (белок MutU). В

---

<sup>3</sup> После завершения репликации происходит метилирование нуклеотидных остатков вновь образованных цепей ДНК. Метильные группы присоединяются ко всем остаткам аденина в последовательности -GATC-, при этом образуется N<sup>6</sup>-метиладенин.



поддержании этого участка ДНК в раскрученном состоянии участвуют SSB-белки.

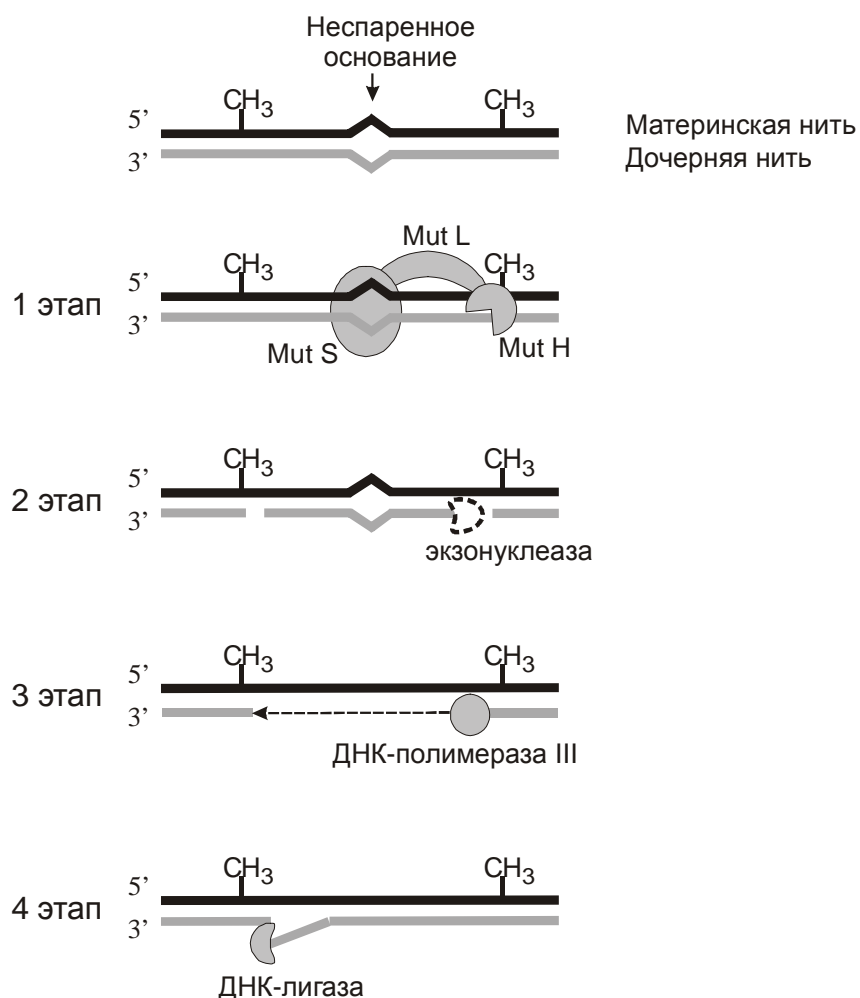


Рис. 10. Этапы реакций MMR у *E. coli*. Пояснения в тексте.

### 3 этап. Застраивание бреши.

Освободившийся участок материнской нити ДНК застраивается ДНК-полимеразой III.

**4 этап.** Соединение основного и вновь синтезированного участков цепи катализирует фермент ДНК-лигаза.

В результате всей цепи реакций участок мисмэтча заменяется правильной комплементарной парой.

## **Особенности MMR у эукариот**

Ключевые белки MMR – MutL и MutS высококонсервативны, строение этих белков мало отличается у всех организмов от *E.coli* до человека. У *E.coli* эти белки (и кодирующие их гены) уникальны, у эукариот имеется по несколько их гомологов. Например, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* обнаружены 3 гомолога Mut L и 6 гомологов Mut S, у человека – 11 гомологов Mut L и 4 Mut S. Гомологов белка Mut H у эукариот не обнаружено. Это связано с принципиально иным типом различения родительской и вновь синтезированной нитей ДНК.

### **III.2.2.3. Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER)**

Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER, nucleotide excision repair) исправляет пиримидиновые димеры, различные аддукты и межнитевые сшивки. Т.е. система NER способна удалить из ДНК почти все возможные повреждения.

В механизме эксцизионной репарации как прокариоты, так и эукариоты гидролизуют 3'–5' 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. Ферментная система, вносящая такие двойные одноцепочечные разрывы, получила название эксцизионной нуклеазы (эксцинуклеазы).

В клетках *E.coli* распознавание повреждения, раскручивание ДНК и эксцизия участка цепи осуществляется тремя белками – UvrA, UvrB и UvrC (название происходит от английского ultra-violet resistant). Эукариоты, включая дрожжи и человека, не имеют прямых гомологов системы UvrABC, но сам механизм NER у них сходен с таковым у прокариот.

У человека процесс NER осуществляется за счет координированной работы примерно 30 белков, последовательно формирующих на ДНК комплексы переменного состава. Из них – семь белков-продуктов генов, которые относятся к семейству XP<sup>4</sup> (XPA-XPB).

Выделяют два варианта NER, различающихся на уровне начального узнавания повреждения.

1. GG-NER (global genome nucleotide excision repair) – осуществляет поиск и удаление объемных повреждений во всем геноме, включая нетранскрибируемые участки и молчащий хроматин.

2. TC-NER (transcription-coupled nucleotide excision repair) – осуществляет поиск и удаление объемных повреждений в транскрибируемых участках.

### **Этапы GG-NER у человека**

1 – Распознавание повреждения.

На поверхности ДНК формируются белковые комплексы XPA-RPA, которые движутся вдоль цепи, отыскивая повреждение.

2 – Раскручивание ДНК.

После распознавания повреждения XPA взаимодействует с комплексом белков TFIIH, который локально раскручивает ДНК.

3 – Эксицизия повреждения ДНК.

ХРС удерживает комплекс ферментов NER на поврежденном участке ДНК, а ферменты XPF и XPG работают как ножницы: одноцепочечный разрыв с 3'-конца повреждения формирует эндонуклеаза XPG, с 5'-конца повреждения – XPF.

4 – Репаративный синтез и лигирование.

Образовавшаяся брешь заполняется PCNA-зависимыми ДНК-полимеразами  $\delta$  и  $\epsilon$  и сшивается ДНК-лигазой III.

---

<sup>4</sup> У человека мутации хотя бы в одном из них могут привести к возникновению наследственного заболевания — пигментной ксеродермы (xeroderma pigmentosum, XP).

## Особенности TC-NER

В начале 80-х годов было сформулировано представление о преимущественной репарации ДНК: транскрибируемая часть генома репарируется быстрее, чем молчащая.

У *E.coli* был открыт белок, названный TRCF (transcription repair coupling factor), который «убирает» комплекс РНК-полимеразы вместе с транскриптом с ДНК, если тот остановится перед повреждением. Одновременно к месту повреждения ДНК привлекаются компоненты репаративной системы и собирается комплекс эксцизионной нуклеазы. Нуклеотиды поврежденной цепи вырезаются, и брешь репарируется. После этого РНК-полимераза в составе транскрипционного комплекса продолжает транскрипцию.

В клетках у человека восстановление протекает намного быстрее благодаря включению в процесс еще двух белков – CSA<sup>5</sup> и CSB. РНК-полимераза II, остановившаяся в процессе транскрипции перед поврежденным участком ДНК, распознается комплексом CSA–CSB и перемещается в сторону от повреждения без разрушения четвертичной структуры транскрипционного комплекса. Одновременно комплекс CSA–CSB привлекает компоненты репаративной системы XPA и TFIIH к месту повреждения ДНК и помогает сборке эксцизионного комплекса. Нуклеотиды поврежденной цепи вырезаются, и брешь репарируется. После этого РНК-полимераза в составе транскрипционного комплекса продолжает транскрипцию.

### III.2.3. SOS-ответ

SOS-репарация ДНК – это последняя возможность для ДНК, которая подошла к репликации, имея не устраненные повреждения, сохранить целостность. Если репликация на первом же не устраненном повреждении «остановится», то клетка может погибнуть.

---

<sup>5</sup> У человека мутации в генах этих белков вызывают наследственное заболевание – синдром Кокэйна (Cockayne's syndrom, CS).

В процессе эволюции сформировался крайне рискованный механизм репарации, названный «SOS-репарация ДНК». Этот механизм был впервые обнаружен в 1953 г. Дж. Уэйглом. Основная задача такой системы – пройти поврежденный участок ДНК таким образом, чтобы не блокировалось действие ДНК-полимеразы. В результате клетка спасается от гибели на данном этапе и может обеспечить митоз, хотя будут ошибки и высокий риск гибели клетки.

Наиболее изучена SOS-репарация у *E.coli*, ключевыми белками которой являются белки Rec A и Lex A.

### **Механизм SOS-репарации у *E.coli***

Если в ДНК появляются летальные дефекты, блокирующие ДНК-полимеразу в процессе репликации (например, одноцепочечные разрывы, AP-сайты, пиримидиновые димеры и др.), в клетке активируется система SOS репарации.

Эта система состоит из нескольких десятков белков (RecA, LexA, UmuD, UmuC и др.). В активном состоянии эти белки способствуют формированию полимеразы V, для которой характерна низкая специфичность (сродство) к материнской цепи ДНК. Это свойство позволяет вставлять в дочернюю цепь нуклеотид, не комплементарный нуклеотиду материнской цепи, преодолевать место повреждения и продолжать процесс репликации. В неповрежденной ДНК активность генов, ответственных за синтез белков полимеразы V, блокируется белком LexA.

Этапы SOS-репарации (рис. 11).

1 – В цепи ДНК формируется повреждение, которое ДНК-полимераза III не может пройти и репликация останавливается.

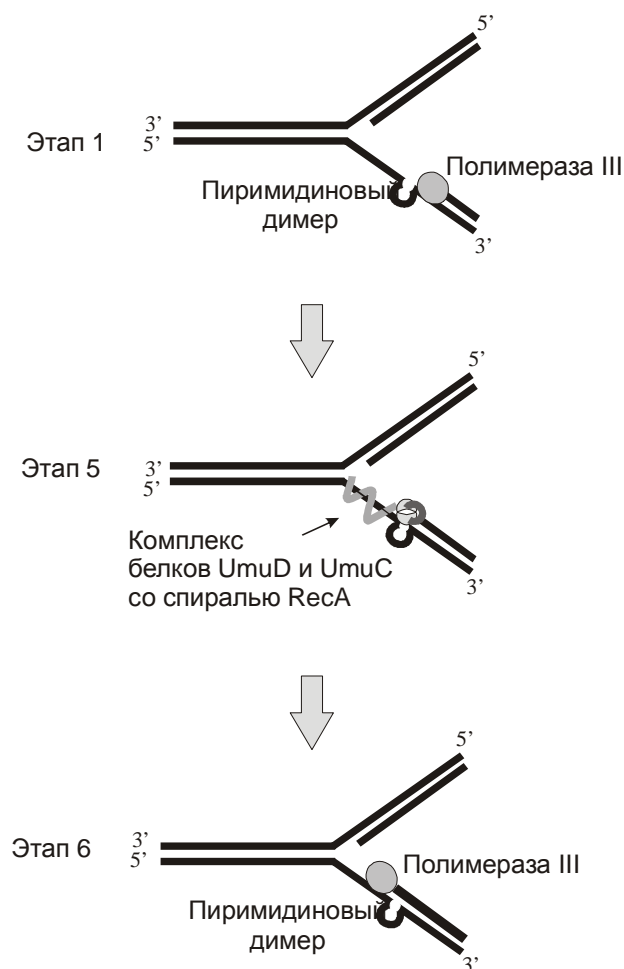


Рис. 11. SOS-ответ у *E. coli*. Пояснения в тексте.

2 – Это событие активирует синтез белка RecA<sup>6</sup>. Этот белок взаимодействует с белком-репрессором LexA и способствует его аутопротеолизу. После этого и запускается синтез белков, способствующих SOS-репарации.

3 – вновь синтезированный белок RecA закручивается спиралью вокруг одноцепочечной ДНК для ее стабилизации.

4 – активация синтеза белков UmuD и UmuC и др.

5 – синтезированные белки UmuD и UmuC соединяются со спиралью RecA и образуют комплекс (UmuD')<sub>2</sub>-UmuC (полимераза V). Основная задача этого комплекса – «проскочить» сложный дефект без формирования бреши напротив дефекта. После привлечения комплекса (UmuD')<sub>2</sub>-UmuC к месту

<sup>6</sup> Гомолог у человека – Rad51.

повреждения, он вытесняет один из структурных компонентов ДНК-полимеразы III и занимает его место, начиная полимеризацию случайных нуклеотидов на поврежденной матрице. В результате возрастает выживаемость клетки (SOS-репарация) и создаются условия для возникновения мутации (SOS-мутагенез) (рис. 11).

б – после прохождения дефектного участка полимераза V отсоединяется от цепи ДНК и работу возобновляет полимераза III (рис. 11).

### **III.2.4. Репарация, связанная с рекомбинацией**

#### **(Пострепликативная репарация, рекомбинационная репарация)**

В некоторые репарационные процессы, кроме репликации – синтеза новой ДНК на месте вырезанного поврежденного участка, – вовлечена и рекомбинация.

При этом виде репарации ферменты вызывают рекомбинацию с участками неповрежденных цепей другой молекулы ДНК. В результате разорванная (содержащая брешь) и неповрежденная цепи репарируемой молекулы ДНК оказываются спаренными с неповрежденными комплементарными участками ДНК. Такой механизм является преимущественным при возникновении двухнитевых разрывов.

Двухнитевые разрывы ДНК (DSB, double strand breaks) являются наиболее тяжелыми повреждениями геномов эукариот и при отсутствии их репарации почти всегда приводят клетку к гибели. Появление в молекуле ДНК не репарированного 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.

Репарация не всегда заканчивается восстановлением исходной молекулы. Вместо восстановления разорванной связи может возникнуть связь между свободными концами двух противоположных нитей молекулы ДНК, между

свободными концами в местах разных разрывов одной и той же нити ДНК и даже между свободными концами разных молекул ДНК. Такое разнообразие новых связей является следствием того, что нити ДНК в ядре упакованы плотно. Неправильное воссоединение разрывов приводит к возникновению хромосомных перестроек.

Неверная репарация оснований, а также их химическая модификация ведет к появлению неспаренных оснований. В последствие это приведет к синтезу белка с неверной структурой. К тому же, не комплементарное основание меняет геометрию молекулы ДНК.

Выделяют следующие варианты репарации, связанной с рекомбинацией:

- 1) путем гомологической рекомбинации;
- 2) путем негомологического воссоединение концов ДНК;
- 3) отжиг по прямым повторам.

У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* преобладает гомологичная рекомбинационная репарация. У млекопитающих преобладает негомологичное восстановление концов ДНК.

#### **III.2.4.1. Репарация путем гомологической рекомбинации**

Для реализации этого вида репарации необходима вторая неповрежденная копия нуклеотидной последовательности, гомологичной поврежденному участку. При этом один из концов DSB внедряется в неповрежденную копию и инициирует обычный процесс генетической рекомбинации. Т.о. происходит одноцепочечный обмен между неповрежденным дуплексом и разорванным.

Репарация двухнитевых разрывов путем гомологической рекомбинации является безошибочной и осуществляется во время поздней S-фазы или G2-фазы.

У прокариот известны все ферменты, реализующие каждый этап рекомбинации. Кодирующие их гены называются *rec* (recombination). У *E. coli* выявлено более 20 таких белков.



В процессе репарации путем гомологической рекомбинации выделяют три фазы (рис. 12).

1. В пресинаптической<sup>7</sup> фазе белок RecBCD расплетает двухцепочечную молекулу ДНК в месте разрыва и гидролизует одну из цепей, оставляя выступающий одноцепочечный участок (т.е. этот белок обладает хеликазной и экзонуклеазной активностями).

2. В этой фазе формируется синапсис гомологичных участков двух сестринских молекул ДНК с вхождением комплементарного одноцепочечного участка в ДНК-дуплекс и последующим репаративным синтезом ДНК. Поиск гомологичных участков и обмен цепями, необходимыми для рекомбинации, происходят с участием белка RecA.

Молекулы белка RecA собираются на одной нити поврежденной ДНК по принципу «конец-в-конец», образуя вокруг ДНК правозакрученную белковую спираль. В результате возникает нитевидное образование – RecA-ДНК-филамент. В филаменте двухцепочечная ДНК изменяет свою конформацию, и оказывается растянутой в 1,5 раза. Затем, этот белок втягивает внутрь своей спирали молекулу двухнитевой ДНК с образованием трехнитевой структуры (одна нить от поврежденной молекулы ДНК и две нити от неповрежденной ДНК). И нить поврежденной молекулы ДНК начинает достраиваться по комплементарному участку неповрежденной молекулы. В месте репарации формируется структура Холлидея<sup>8</sup>.

3. В постсинаптической фазе репарации образовавшиеся структуры Холлидея разделяются с помощью белков RuvA, -B и -C, RecG и др. с образованием двух независимых молекул ДНК

Завершают процесс репарации лигазы. До сих пор точно не известно, какие ДНК-полимеразы и лигазы участвуют в процессе гомологичной рекомбинации.

---

<sup>7</sup> Синапсис – конъюгация хромосом, попарное временное сближение гомологичных хромосом, во время которого между ними может произойти обмен гомологичными участками.

<sup>8</sup> Структуры Холлидея – динамичная крестообразная структура, образуемая четырьмя нитями ДНК.

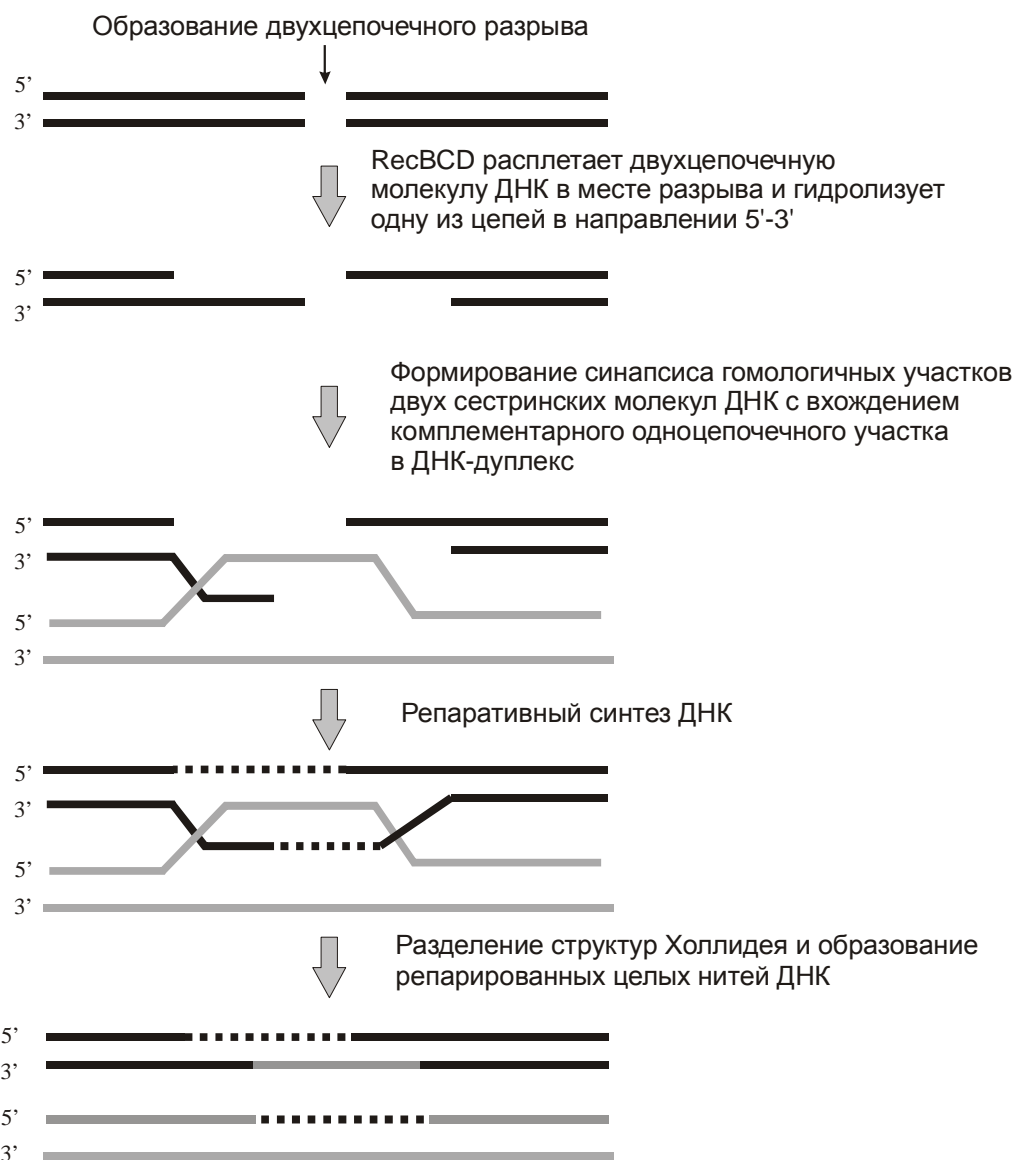


Рис. 12. Репарация двухнитевых разрывов путем гомологической рекомбинации у *E. coli*.

Похожие механизмы используются клетками для рекомбинационной репарации одноцепочечных брешей, остающихся в молекулах ДНК из-за блокировки репликативного синтеза ДНК модифицированными нуклеотидами.

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

Вероятно, роль репарации двухнитевых разрывов путем гомологической рекомбинации более значительна в эмбриональных клетках человека, чем в клетках взрослого организма.

### **III.2.2.2. *Репарация путем негомологического воссоединения концов ДНК***

Репарация двухцепочечных разрывов ДНК этим способом обеспечивается целым набором белков: белок Ku, ДНК-лигазой IV и белок XRCC4 и др. Все эти белки консервативны у всех эукариот, включая дрожжи и млекопитающих.

В ходе этой репарации порванные концы соединяются напрямую, без использования матрицы для синтеза. Противоположные концы оборванных нитей ДНК фиксируются друг против друга и удерживаются от расхождения с помощью белков Ku. Эти белки формируют Ku-гетеродимер в виде кольца, которое надевается на свободный конец ДНК (рис. 13). При этом он не контактирует с основаниями ДНК, а образует несколько связей с пентозофосфатным остовом и подгоняется пространственно к виткам спирали ДНК так, чтобы они расположились в кольце белка строго определенным образом.

Затем гетеродимеры противоположных концов ДНК связываются друг с другом, образуя мостик. К этому мостику присоединяются ферменты, принимающие участие в репарации.

Появление столь серьезного повреждения ДНК, как образование DSB, часто сопровождается сопутствующими повреждениями азотистых оснований и пентозофосфатного каркаса ДНК. Такие повреждения удаляются с концов ДНК с помощью нуклеаз. Они удаляют поврежденные нуклеотиды и подрезают выступающие концы нитей ДНК, подравнивая их.

Затем присоединяется ДНК-полимераза  $\mu$  или ДНК-полимераза  $\lambda$  и заполняет бреши.

Завершает процесс лигаза IV, которая сшивает восстановленные фрагменты в единое целое.

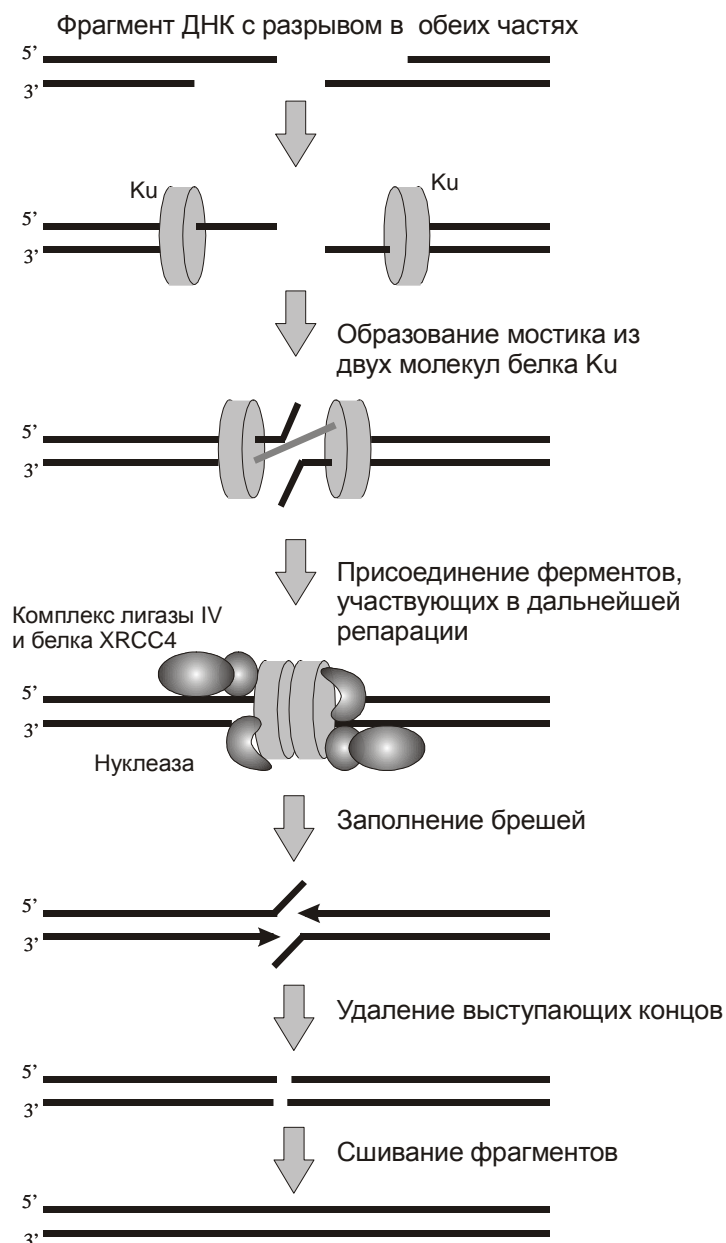
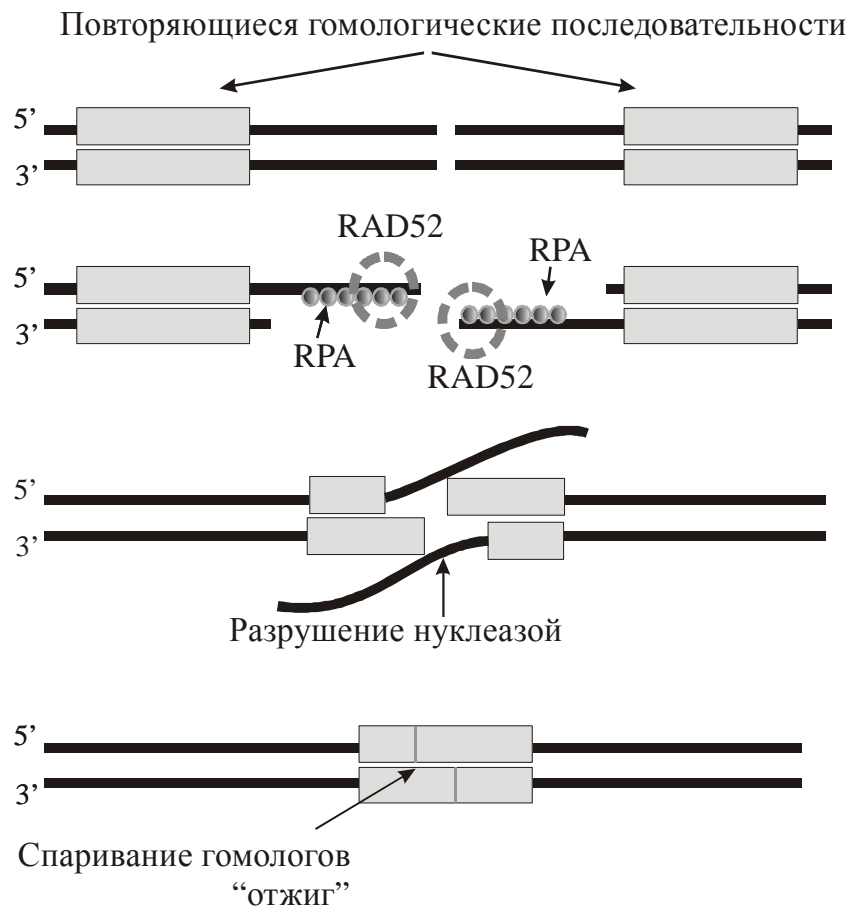


Рис. 13. Последовательность реконструкции ДНК при негомологичном соединении концов.

### III.2.2.3. Однонитевой отжиг по прямым повторам

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

Этот путь репарации активируется при параллельном разрыве молекулы ДНК, при котором нет условий для комплементарного соединения нуклеотидов двух цепей. В этом случае происходит лизис нитей ДНК по направлению 3'→5' до обнаружения одинаковых последовательностей на параллельных нитях (рис. 14).



*Рис. 14.* Репарация путем однонитевого отжига по прямым повторам .

Нуклеотиды в этих последовательностях выщепляются таким образом, чтобы два конца наложились («перекрылись») друг на друга. При поиске гомологии по прямым повторам выступающий конец одной нити ДНК покрывается белком RPA (репликативный белок А), который связывается с одноцепочечными нитями ДНК в ходе репликации ДНК, не позволяя ДНК скручиваться. Поверх этих белков надевается комплекс белков RAD52, который способствует распознаванию гомологии и объединению концов комплементарными последовательностями. Как только один из выступающих концов обнаружит гомологию с соседней нитью, гомологи спарятся (отожгутся) друг с другом, а лишние концы, образовавшиеся по направлениям 5'→3', «съедаются» нуклеазой XPF. Сшивание концов проводит лигаза I.

Этот путь может приводить к появлению мутаций, т. к. последовательность ДНК между повторами всегда удаляется и часть генетического материала теряется.

## Заключение

Пострадиационное восстановление – ликвидация повреждения, вызванного воздействием ионизирующего излучения. В клетке активируются системы, направленные на элиминацию поврежденных молекул белков и углеводов и восстановление поврежденных мембран. ДНК является уникальной молекулой для клетки, поэтому они не элиминируются, а осуществляется попытка их репарации. Репарация ДНК является частью более общего комплекса физиологических процессов, которые направлены на обеспечение стабильности генетического материала и обновления жизненно важных систем клетки после облучения ионизирующим излучением.

Пострадиационное восстановление проявляется на различных уровнях биологической организации от молекулярного до организменного. В его основе лежат физиологические процессы, направленные на обеспечение стабильности генетического материала и клеточного обновления жизненно важных систем. В облученных клетках активируется репарация сублетальных и потенциально летальных повреждений. Репарация сублетальных повреждений более характерна для активно делящихся клеток, например клеток костного мозга и эпителия кишечника. При этом первыми репарируются повреждения, делающие клетку более чувствительной к повторному облучению. Репарация сублетальных повреждений обычно бывает полной и завершается до вступления облученных клеток в период синтеза ДНК.

Репарация потенциально летальных повреждений характерна для клеток, находящихся в фазе покоя (G<sub>0</sub>), например, для клеток печени, почек, головного мозга. В этом случае выживаемость клеток возрастает с увеличением временного интервала между облучением и воздействием стимула к клеточной пролиферации или при снижении мощности дозы излучения. Репарация потенциально летальных повреждений обычно не является полной, часть популяции представляют клетки, потерявшие способность к «бесконечному» размножению и отмирающие после одного или нескольких делений.

## Тестовые задания

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. КАКИЕ ИЗ ОСНОВАНИЙ НАИБОЛЕЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫ К ДЕЙСТВИЮ ОБЛУЧЕНИЯ:
  - 1) пуриновые
  - 2) пиримидиновые
2. У КАКИХ ОСНОВАНИЙ ДВОЙНАЯ СВЯЗЬ N-C В ПЯТИЧЛЕННОМ ЦИКЛЕ ПОДВЕРГАЕТСЯ АТАКЕ:
  - 1) пиримидиновые
  - 2) пуриновые
3. ПОД ДЕЙСТВИЕМ КАКОГО ФАКТОРА РАЗРЫВАЕТСЯ ДВОЙНАЯ СВЯЗЬ МЕЖДУ И 6 АТОМАМИ УГЛЕРОДА ПИРИМИДИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ:
  - 1) ионизирующее излучение
  - 2) заряженные частицы
  - 3) продукты радиолиза воды
4. СКОЛЬКО ОДНОНИТЕЕВЫХ РАЗРЫВОВ ОБРАЗУЕТСЯ В ОДНОЙ КЛЕТКЕ ДНК:
  - 1) 300
  - 2) 1000
  - 3) 2000
  - 4) 80
5. В КАКУЮ ГРУППУ БЕЛКОВ СИСТЕМЫ ЧЕКПОЙНТОВ ВХОДЯТ БЕЛКИ-КИНАЗЫ
  - 1) сенсоры
  - 2) медиаторы
  - 3) эффекторы
6. КЛАССИФИКАЦИЯ ПО МЕХАНИЗМАМ РЕПАРАЦИИ:
  - 1) прямая
  - 2) SOS-репарация
  - 3) до репликации ДНК
  - 4) в процессе репликации ДНК
  - 5) эксцизионная
  - 6) рекомбинантная
  - 7) пострепликативная
7. 1 ЭТАП ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ:
  - 1) эксцизия участка с повреждением
  - 2) распознавание повреждения
  - 3) надрезание нити пентозофосфатного остова ДНК

8. ФУНКЦИЯ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ  $\gamma$ :

- 1) присоединение одного нуклеотида
- 2) синтез новой цепи
- 3) замещение ДНК-полимеразу
- 4) репликация митохондриальной ДНК

9. 5 ЭТАП РЕПАРАЦИИ КОРОТКИМИ ФРАГМЕНТАМИ:

- 1) гидролиз фосфодиэфирной связи
- 2) удаление AP-сайта
- 3) распознавание и удаление поврежденного основания
- 4) вставка нуклеотида
- 5) сшивка двух соседних фрагментов

10. РЕПАРАЦИЯ ДЛИННЫМИ ФРАГМЕНТАМИ:

- 1) вырезание ошибочно встроенных неповрежденных нуклеотидов
- 2) распознавание и удаление поврежденного основания
- 3) исправление ошибочно встроенных оснований

11. ЭУКАРИОТ УДАЛЯЕТ:

- 1) измененный нуклеотид в составе 12-13-членных олигомеров
- 2) в составе одноцепочечных фрагментов ДНК длиной в 27-29 нуклеотидов

12. ПРОКАРИОТ УДАЛЯЕТ:

- 1) измененный нуклеотид в составе 12-13-членных олигомеров
- 2) в составе одноцепочечных фрагментов ДНК длиной в 27-29 нуклеотидов

13. ЭТАПЫ GG-NER У ЧЕЛОВЕКА:

- 1) распознавание повреждения
- 2) застраивание бреши
- 3) раскручивание ДНК
- 4) эксцизия повреждения ДНК
- 5) распознавание нуклеотида
- 6) репаративный синтез и лигирование

14. SOS-РЕПАРАЦИЯ ДНК:

- 1) возможность для ДНК сохранить целостность
- 2) поиск и удаление повреждений во всем геноме
- 3) поиск и удаление повреждений в транскрибируемых участках

15. НА ПОВЕРХНОСТИ ДНК КАКИЕ БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ ОТЫСКИВАЮТ ПОВРЕЖДЕНИЕ:

- 1) ХРС
- 2) ХРГ
- 3) ХРА- RPA
- 4) ХРФ 3

16. БЕЛОК У E.coli TRCF:

- 1) удаляет объемные повреждения во всем геноме
- 2) удаляет объемные повреждения в транскрибируемых участках
- 3) раскручивает ДНК



4) убирает комплекс РНК-полимеразы с транскриптом с ДНК

17. ПРИ РЕКОМБИНАЦИИ:

- 1) вырезают ошибочно встроенные неповрежденные нуклеотиды
- 2) распознают и удаляют поврежденные основания
- 3) ферменты вызывают рекомбинацию с участками неповрежденных цепей другой молекулы ДНК
- 4) удаляют повреждения во всем геноме

18. ВАРИАНТЫ РЕПАРАЦИИ, СВЯЗАННЫЕ С РЕКОМБИНАЦИЕЙ:

- 1) путем гомологической рекомбинации;
- 2) путем негомологического воссоединения концов ДНК
- 3) отжиг по прямым повторам
- 4) эксцизия повреждения ДНК

19. ПРОЦЕСС РЕПАРАЦИИ ЗАВЕРШАЮТ:

- 1) сенсоры
- 2) медиаторы
- 3) эффекторы
- 4) лигазы

20. РОЛЬ РЕПАРАЦИИ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ПУТЕМ ГОМОЛОГИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ БОЛЕЕ ЗНАЧИТЕЛЬНА:

- 1) в эмбриональных клетках человека
- 2) в клетках взрослого организма

21. РОЛЬ ЛИГАЗЫ IV В ПРОЦЕССЕ НЕГОМОЛОГИЧЕСКОГО ВОССОЕДИНЕНИЯ КОНЦОВ ДНК:

- 1) удаление выступающих концов
- 2) присоединение ферментов, участвующих в дальнейшей репарации
- 3) заполнение брешей
- 4) сшивание восстановленных ферментов в единое целое

22. ЧАСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ТЕРЯЕТСЯ ПРИ:

- 1) одностранным отжиге по прямым повторам
- 2) присоединении ферментов, участвующих в дальнейшей репарации
- 3) заполнении брешей

**Эталоны ответов к тестовым заданиям**

1 – 2	2 – 1	3 – 1	4 – 3	5 – 2
6 – 1, 2, 5, 6	7 – 1	8 – 4	9 – 5	10 – 1
11 – 2	12 – 1	13 – 1, 3, 4, 6	14 – 1	15 – 3
16 – 4	17 – 3	18 – 1, 2, 3	19 – 4	20 – 1
21 – 4	22 – 1			

## Белки и ферменты репарации

**ATM** (Ataxia-Telangiectasia Mutated) – один из белков, инициирующих систему репарации ДНК. Мутации в двух аллелях гена ATM приводят к развитию заболевания атаксия-телеангиоэктазия (ataxia-telangiectasia). Это заболевание сопровождается гиперчувствительностью к ионизирующему излучению, иммунной недостаточностью, риском злокачественных заболеваний, мозжечковой атаксией вследствие дегенерации нейронов и др.

**ATR** (ATM Related) – один из белков, инициирующих систему репарации ДНК.

**BRCA1** – взаимодействует с белками репарационных систем и стимулирует восстановление нормальной структуры ДНК. Одновременно индуцирует остановку клеточного цикла – усиливает активность p53 и активирует белки, останавливающие клетки в G1 и в G2-фазе клеточного цикла.

**CSA–CSB** – комплекс этих белков распознает РНК-полимеразу, остановившуюся в месте повреждения ДНК, перемещает в сторону и привлекает к месту повреждения репаративные ферменты.

**FEN1** (flap endonuclease I) (гомолог белка Rad27 дрожжей) – шлепающая (flap) эндонуклеаза. Этот фермент удаляет РНК затравочной цепи при репликации ДНК и тем самым предотвращает образование шпилечных структур на свободном конце фрагмента Оказаки. При репарации FEN1 удаляет последовательность поврежденных нуклеотидов в процессе BER-репарации длинными фрагментами. Для активации фермента необходим белок PCNA.

**Ku** – белок, который формирует гетеродимер в виде кольца, которое надевается на свободный конец ДНК и предохраняет нити ДНК от расхождения при двухнитевых разрывах.

**LexA** – белок, блокирующий транскрипцию генов SOS-репарации.

**Mdm2** – убиквитин-лигаза, постоянно разрушающая p53 в здоровой клетке, направляя его для разрушения в протеасомы.

**Mut L** – белок ферментативного комплекса MMR. Связующим между mut S и mut H служит белок mut L, его присоединение завершает образование активного фермента.

**Mut S** – белок ферментативного комплекса MMR – находит некомплементарную пару и связывается с этим фрагментом (MMR).

**Mut H** – белок ферментативного комплекса MMR – присоединяется к метилированному (по аденину) участку -GATC-, расположенному вблизи некомплементарной пары. (MMR). Формирование комплекса Mut S-Mut L-Mut H способствует проявлению у белка mut H эндонуклеазной активности.

**p53** – регулирует экспрессию более десяти белков, ответственных за активацию различных супрессорных систем – индукторов апоптоза, регуляторов клеточного цикла в фазе G1, ингибиторов роста и ангиогенеза. Активация этого белка влечет за собой активацию этих процессов.

**PCNA** (proliferating cell nuclear antigen) – предотвращают диссоциацию фермента от матрицы ДНК. У эукариот три молекулы PCNA плотно взаимодействуют друг с другом, формируя замкнутое кольцо вокруг двойной спирали ДНК и удерживают полимеразу  $\delta$  на матричной цепи ДНК.

**RAD52** – белок, который способствует распознаванию гомологии и объединению концов комплементарными последовательностями при одностороннем отжиге.

**RecA** – белок, принимающий у *E. coli* участие в гомологичной рекомбинации и SOS-репарации. Его молекулы собираются на ДНК по принципу «конец-в-конец», образуя вокруг ДНК правозакрученную белковую спираль. В результате возникает нитевидное образование – RecA-ДНК-филамент. В

филаменте двухцепочечная ДНК изменяет свою конформацию, и оказывается растянутой в 1,5 раза. При гомологичной рекомбинации этот белок втягивает внутрь своей спирали молекулу двухнитевой ДНК с образованием трехнитевой структуры, что создает условия для обмена одиночными цепями. При SOS-репарации инициирует деградацию белка LexA и способствует формированию активного комплекса (UmuD')<sub>2</sub>-UmuC.

**RecBCD** – белок, участвующий в процессе репарации путем гомологической рекомбинации, расплетает двухцепочечную молекулу ДНК в месте разрыва и гидролизует одну из цепей, оставляя выступающий одноцепочечный участок (т. е. этот белок обладает хеликазной и экзонуклеазной активностями).

**RPA** (replication protein A) – белок у эукариот, который связывается с одноцепочечными нитями ДНК в ходе репликации ДНК, не позволяя ДНК скручиваться.

**RuvA, -B и -C, RecG** – белки, расщепляющие структуру Холлидея, делая в нитях ДНК надрезы, которые затем зашиваются ДНК-лигазой.

**SSB-белки** (от англ, single strand binding proteins) – белки у прокариот, связывающиеся с одноцепочечными нитями ДНК. SSB-белки, не закрывая азотистых оснований, связываются с одноцепочечной ДНК по всей длине разделившихся цепей и таким образом предотвращают их комплементарное скручивание и образование «шпилек». Участвуют в поддержании этого участка ДНК в раскрученном состоянии.

**TFIIH** – комплекс белков, обеспечивающий хеликазную и протеинкиназную активности, необходимые для расплетания ДНК в районе инициации и фосфорилирования С-концевого домена РНК-полимеразы. Участвует также в репарации ДНК, выступает еще и в роли киназы, активирующей циклинзависимую протеинкиназу.

**TRCF** (transcription repair coupling factor) – белок, который «убирает» комплекс РНК-полимеразы вместе с транскриптом с ДНК, если тот остановится перед повреждением.

**(UmuD')<sub>2</sub>-UmuC** – формируют ДНК-полимеразу IV, принимающую участие в SOS-репарации.

**UvrA, UvrB и UvrC** (ultra-violet resistant). – белки, осуществляющие эксцизионную репарацию нуклеотидов в клетках *E.coli*.

**XP** – семейство белков (ХРА-ХРГ) у человека, осуществляющие NER репарацию. Мутации хотя бы в одном из них могут привести к возникновению наследственного заболевания – пигментной ксеродермы (xeroderma pigmentosum, XP).

- ХРА-РРА – комплекс на поверхности ДНК, который движется вдоль цепи, отыскивая повреждение.
- ХРГ – эндонуклеаза, формирующая одноцепочечный разрыв с 3'-конца от повреждения.
- ХРФ – эндонуклеаза, формирующая одноцепочечный разрыв с 5'-конца от повреждения.

**ДНК-гликозилазы** – распознают поврежденные основания и гидролизуют N-гликозидную связь между пентозофосфатным остовом и поврежденным основанием. У всех живых организмов имеется несколько ДНК-гликозилаз с разной субстратной специфичностью. Принимает участие в BER-репарации.

**ДНК-инсертаса** – фермент, который присоединяет в AP-сайте основание к дезоксирибозе в соответствии с правилом комплементарности.

**ДНК-лигазы** – ферменты, катализирующие ковалентное сшивание цепей ДНК в дуплексе при репликации, репарации и рекомбинации. Они образуют фосфодизфирные мостики между 5'-фосфорильной и 3'-гидроксильной

группами соседних дезоксирибонуклеотидов в местах разрыва ДНК. У эукариот выделены следующие типы ДНК-лигаз.

- ДНК-лигаза I лигирует фрагменты Оказаки в ходе репликации отстающей цепи ДНК и участвует в эксцизионной репарации.
- ДНК-лигаза II – его функция малоизучена; имеются две теории образования этого фермента. Согласно первой теории, лигаза II является продуктом деградации фермента лигазы III. По второй теории, фермент кодируется тем же геном, что и ДНК-лигазы III, различие формируется при сплайсинге.
- ДНК-лигаза III участвует в эксцизионной репарации и в рекомбинации.
- ДНК-лигаза IV катализирует окончательный этап негомологичного соединения двухнитевых разрывов ДНК. Также требуется для V(D)J рекомбинации генов иммуноглобулинов.

**ДНК-полимеразы** – ферменты, катализирующие полимеризацию дезоксирибонуклеотидов вдоль цепочки нуклеотидов ДНК. Эукариоты содержат по меньшей мере пятнадцать видов ДНК-полимераз, которые различаются по числу субъединиц, молекулярной массе, ассоциации с разными вспомогательными белками и функциональному назначению.

- ДНК-полимераза  $\alpha$ . Начинает синтез фрагмента ДНК на комплементарной цепи. Присоединяясь к определённому сайту одноцепочечной ДНК, ДНК-полимераза  $\alpha$  синтезирует небольшой фрагмент РНК – праймер, состоящий из 8–10 рибонуклеотидов. Затем синтезирует фрагмент цепи ДНК, около 50 дезоксирибонуклеотидов. Такая многофункциональность ДНК-полимеразы  $\alpha$  обусловлена особенностями ее строения. Она состоит из четырёх субъединиц, каждая из которых выполняет определённую функцию: «узнавание» сайта репликации, синтез

праймера (8–10 рибонуклеотидов), синтез фрагмента цепи ДНК, около 50 дезоксирибонуклеотидов. После этого к транскрипции приступают полимеразы  $\delta$  и  $\epsilon$ .

- ДНК-полимераза  $\beta$  – катализирует реакцию присоединения к 3'-концу разорванной цепи только одного нуклеотида. Полимеразы  $\beta$  и  $\lambda$  присоединяют всего один нуклеотид, т. е. накладывают маленькую заплатку (short patch путь BER).
- ДНК-полимераза  $\gamma$  – осуществляет репликацию митохондриальной ДНК.
- ДНК-полимераза  $\delta$  – продолжает синтез новой цепи в направлении от 5'- к 3'-концу после ДНК-полимеразы  $\alpha$ , а также участвует в репарации, вставляя в брешь большое количество нуклеотидов. Ассоциирован с белком PCNA, который удерживает полимеразу на матричной цепи ДНК, и синтез идет до тех пор, пока фрагмент не достигнет нужной длины.
- ДНК-полимераза  $\epsilon$  – иногда замещает ДНК-полимеразу  $\delta$  во время синтеза 3'-5'-моноспиралей.
- Существуют также другие эукариотические ДНК-полимеразы, которые пока недостаточно изучены:  $\theta$ ,  $\lambda$ ,  $\phi$ ,  $\sigma$  и  $\mu$ .

Ни одна эукариотическая полимеразы не может отщеплять праймеры, то есть не обладает 5'-3'-экзонуклеазным действием. Эту функцию выполняют другие ферменты. Полимеразы, осуществляющие элонгацию ( $\gamma$ ,  $\delta$  и  $\epsilon$ ) обладают 3'-5'-экзонуклеазными свойствами.

У бактерий обнаружено пять ДНК-полимераз:

- ДНК-полимераза I задействована в восстановлении ДНК, обладает и 5'-3', и 3'-5'-экзонуклеазным действием;

- ДНК-полимераза II участвует в репликации поврежденной ДНК. Обладает способностью 5'-3'-удлинения цепочки и 3'-5'-экзонуклеазным действием;
- ДНК-полимераза III – основная полимеразы бактерий, обладающая также 3'-5'-экзонуклеазным действием;
- ДНК-полимераза IV, V – принимают участие в реализации SOS-ответа. Эти ДНК-полимеразы имеют низкую точность копирования и осуществляют мутагенную репликацию ДНК. Эти полимеразы могут включать в новосинтезированную цепь неправильные нуклеотиды.

**ДНК-фотолиазы** – это группа ферментов, активируемых светом с длиной волны 300–600 нм; расщепляют пиримидиновые димеры.

**ДНК хеликазы** – ферменты раскручивающие двухцепочечную спираль ДНК с затратой энергии гидролиза АТФ. ДНК-хеликаза II – продукт гена *mutU*, также известного как ген *uvrD*, *uvrE*, или *recL*.

**Экзонуклеазы** – белки из группы нуклеаз, отщепляющие концевые мононуклеотиды от полинуклеотидной цепи путём гидролиза фосфодиэфирных связей между нуклеотидами. В зависимости от способности гидролизовать связи на 3' и 5' концах полинуклеотидной цепи различают 3'- и 5'-экзонуклеазы. Экзонуклеазы встречаются в клетках как обособленно, так и в составе ферментативных комплексов. Например, ДНК-полимераза I содержит 5'-экзонуклеазу, которая отщепляет РНК-праймер, прикрепленный непосредственно к тому месту, на котором происходит синтез ДНК.

**Эндонуклеазы** – это ферменты, способные осуществлять гидролиз внутренних фосфодиэфирных связей и таким образом расщеплять молекулы ДНК. Участвуют в рекомбинации, репарации, рестрикции.



## Словарь используемых терминов

**AP-сайт** – (апиримидиновый сайт, apyrimidinic site) – участок в нуклеотидной последовательности ДНК, в котором разорвана связь между остатком дезоксирибозы и пиримидиновым (тимин, цитозин) основанием, но сохраняется пентозофосфатный остов.

**V(D)J-рекомбинация** – механизм соматической рекомбинации ДНК, происходящий на ранних этапах дифференцировки лимфоцитов и приводящий к формированию антиген-распознающих участков иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора.

**Ацентрический фрагмент** – участок хромосомы, отделившийся от нее путем отщуровки и не содержащий центромер в одной или обеих хроматидах; обычно быстро элиминируется, или образует микроядра, способные сохраняться в течение нескольких клеточных делений.

**Апоптоз** – генетически обусловленный процесс физиологической гибели клеток.

**ДНК-дуплекс (DNA duplex)** – двухцепочечная форма ДНК.

**Кинетохор** – веретено деления в клетке эукариот.

**Лигирование** – сшивание ферментами-лигазами двух цепей ДНК.

**Малигнизация** – приобретение клетками нормальной или патологически измененной ткани, в т. ч. доброкачественной опухоли, свойств злокачественной опухоли; в основе лежат нарушения процессов дифференцировки и пролиферации клеток.

**Мисмэтчи (mismatch)** – ошибочно встроенные неповрежденные основания, которые не образуют нормальное Уотсон-Криковское спаривание. (G/T, G/G, A/C и C/C).

**Радиолиз воды** – химическое или физико-химическое превращение воды под действием ионизирующего излучения с образованием

высокоактивных гидроксильного и водородного радикалов; в присутствии кислорода образуется также свободный радикал гидроперекиси и перекись водорода, являющиеся сильными окислителями.

**Рекомбинация ДНК** – процесс обмена участками молекул ДНК путем разрыва и соединения разных молекул

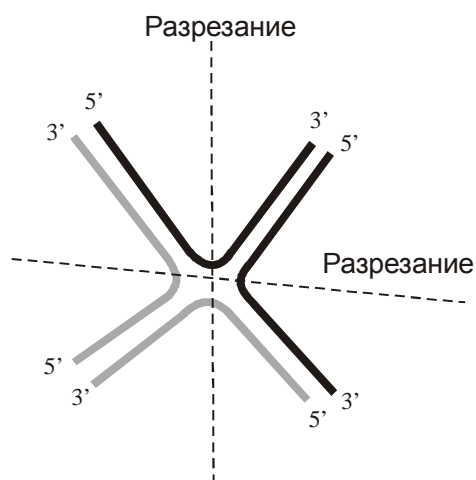
**РНК-праймер** (РНК-затравка) – олигорибонуклеотид, синтезируемый с участием РНК-полимеразы или ДНК-праймазы с 5'-конца. РНК-праймер с участием ДНК-полимеразы III (ДНК-полимеразы  $\alpha$ ) инициируется синтез новой молекулы ДНК (или фрагмента Оказаки).

**Синапсис** – конъюгация хромосом, попарное временное сближение гомологичных хромосом, во время которого между ними может произойти обмен гомологичными участками.

**Синдром Коккёйна** – наследственное заболевание с поражением кожи и её придатков, органов зрения, слуха и нарушением репарации ДНК. Гены CSA и CSB кодируют белки, взаимодействующие с подгруппой белков РНК-полимеразы 2, фермента, участвующего в эксцизионной репарации ДНК. В отличие от пигментной ксеродермы, также сопровождаемой повышенной чувствительностью к УФО, не отмечено существенного увеличения частоты рака кожи. Это позволяет предполагать, что дефект при синдроме Коккёйна находится в системе репарации транскрибируемых (активных) генов, не затрагивая механизм полной репарации генома.

**Структура Холлидея** – динамичная крестообразная структура, образуемая четырьмя нитями ДНК во время гомологичной рекомбинации. Название структура получила по имени британского молекулярного биолога Робина Холлидея. Структура Холлидея состоит из пары гомологичных последовательностей ДНК и поэтому может скользить вдоль спиралей ДНК. Этот процесс осуществляется белками и является АТФ-зависимым. В результате скольжения структуры Холлидея формируется гетеродуплекс,

содержащий по одной цепи от каждой из двух исходных ДНК-спиралей. Структуры Холлидея присутствуют в клетке лишь кратковременно.



У бактерий соединение двух спиралей ДНК в структуре Холлидея разделяется ферментативно при помощи специализированной эндонуклеазы RuvC. Этот фермент расщепляет структуру Холлидея, делая в нитях ДНК надрезы, которые затем зашиваются ДНК-лигазой.

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.

**Однонитевый отжиг** (single-strand annealing) – ренатурация, соединение однонитевых ДНК или РНК водородными связями с комплементарными им последовательностями с образованием двухнитевого полинуклеотида. Этот не совсем корректный термин возник из-за двусмысленности английского слова annealing, означающего как отжиг металлов в металлургии, так и приведение в естественное (натуральное) состояние, ренатурацию.

**Пигментная ксеродерма** (xeroderma pigmentosum) – группа наследственных заболеваний, вызванных нарушением системы эксцизионной репарации ДНК, протекающих с различными симптомами поражения кожи, фоточувствительностью, злокачественными новообразованиями. Является следствием дефектов генов системы эксцизионной репарации ДНК. Кожа больных пигментной ксеродермой обладает повышенной чувствительностью к дневному свету, что проявляется в виде фотодерматозов, включая рак кожи. В ряде случаев отмечены аномалии нервной системы, причиной которых являются мутации в одном из семи генов: ХРА, ХРВ, ...ХРГ. Однако описаны

больные с классическими симптомами пигментной ксеродермы, но с ненарушенной системой NER. Для клеток этих больных характерны изменения в так называемой пострепликативной репарации.

**Протеасома** – очень крупная мультисубъединичная протеаза, присутствующая в клетках эукариот, архей и некоторых бактерий. В эукариотических клетках протеасомы содержатся и в ядре, и в цитоплазме. Основная функция протеасомы – протеолитическая деградация ненужных и повреждённых белков до коротких пептидов (4–25 аминокислотных остатков), которые затем могут быть расщеплены до отдельных аминокислот.

**Фрагменты Оказаки** (по имени исследователя, который их впервые обнаружил) – относительно короткие фрагменты ДНК, которые образуются на отстающей цепи в процессе репликации ДНК. Длина фрагментов Оказаки у *E. coli* составляет около 1000–2000 нуклеотидов, и обычно 100–200 нуклеотидов у эукариот.

**Чекпойнт** – сверхточные точки повреждений.

**Эксцизия** – удаление, вырезание.

**Эксцинуклеазный комплекс** – содержащий эндонуклеазу белковый комплекс, который вырезает участок поврежденной ДНК в ходе эксцизионной репарации.

## Рекомендуемая литература

### Основная литература

1. Биохимия : учебник / под ред. Е. С. Северина. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 784 с.
2. Клаг, Уильям С. Основы генетики / У. С. Клаг, М. Р. Каммингс. – М. : Техносфера, 2007. – 896. с
3. Коничев С. А. Молекулярная биология / С. А. Коничев, Г. А. Севастьянова. – М. : Академия, 2005. – 400 с.
4. Разани С. В. Хроматин: упакованный геном / С. В. Разин, А. А. Быстрицкий. – М. : Бином. Лаборатория знаний, 2009. – 176 с.
5. Спивак И. М. Экология. Повреждение и репарация ДНК : учебное пособие / И. М. Спивак. – СПб : Изд-во Политехн. ун-та, 2006. – 91 с.

### Дополнительная литература

1. Долгова Е. В. Репарация межпозвоночных сшивок молекулы ДНК / Е. В. Долгова, А. С. Лихачева, К. Е. Орищенко, Е. А. Алямкина, С. С. Богачев, М. А. Шурдов // Вестник ВОГиС. – 2010. – Том 14, № 2. – С. 332–356.
2. Основы медицинской радиобиологии / под ред. И. Б. Ушакова. – СПб : ООО «Издательство Фолиант», 2004. – 384. С.
3. Пестряков П. Е. Механизмы функционирования SSB белков в процессах клеточного метаболизма ДНК / П. Е. Пестряков, О. И. Лаврик // Успехи биологической химии. – 2008. – Т. 48. – С. 65–104.
4. Патрушев Л. И. Экспрессия генов /Л. И Патрушев. – М. : Наука, 2000. – 330 с.
5. Петрусева И. О. Молекулярные механизмы действия системы общегеномной эксцизионной репарации нуклеотидов / И. О. Петрусева, А. Н. Евдокимов, О. И. Лаврик // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2014. – Вып. № 1 (20), том 6. – С. 24-32.

6. Ушаков В. Ю. SOS-система репарации ДНК у бактерий (обзор) // Вестник Пермского университета. – 2010. – Вып. 2. – С. 19–30.
7. Шилова Л. Роль механизмов репарации ДНК в радиационном адаптивном ответе *Drosophila melanogaster*: Дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08 / Сыктывкар, 2013. – 315 с.

*Учебное издание*

**Гуцол Людмила Олеговна  
Непомнящих Светлана Федоровна**

**Пострадиационное восстановление ДНК**

*Учебное пособие*