

REPAIR OF GENETIC DAMAGE

V. N. SOYFER

The following mechanisms of repair are described: direct repair, excision of damages based by glycosylases, nucleotides' excision, repair of mismatched nucleotides, postreplicative and SOS-repair. Distribution of repair enzymes among different representatives of the living world as well as hereditary diseases development after damaging of repair enzyme genes are discussed.

Описаны механизмы репарации генетических повреждений на молекулярном уровне: прямая репарация повреждений, эксцизионная репарация, репарация неспаренных оснований, пострепликативная и SOS-репарация. Рассмотрена распространенность репарирующих ферментов в живом мире и возникновение наследственных болезней в результате нарушения генов, управляющих синтезом этих ферментов.

РЕПАРАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ

В. Н. СОЙФЕР

Университет им. Джорджа Мейсона, Фэйрфакс,
Вирджиния, США

ВВЕДЕНИЕ

Репарация генетических повреждений — свойство живых организмов восстанавливать повреждения, возникшие в ДНК в результате воздействия разнообразных мутагенных факторов как радиационной, так и химической природы. Оно было открыто относительно недавно, менее полувека назад.

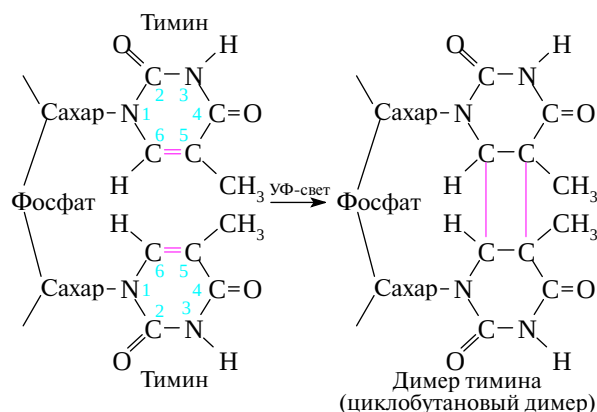
В настоящее время описано много реакций репарации. Одни более просты и происходят немедленно после мутагенного воздействия, другие требуют индукции синтеза новых ферментов и поэтому растянуты во времени. Некоторые реакции идут до того, как клетки вступят в новую фазу деления, другие могут осуществляться и после того, как клетка закончила деление (при этом часть повреждений в геноме сохраняется неотрепарированной). Есть совершенно удивительные реакции, когда клетки “стараятся” спасти свою жизнь ценой введения новых мутаций. Исследование процессов репарации идет полным ходом, новые и новые принципы, а не только отдельные детали уже известного “костяка” реакций появляются в печати каждый год. Опубликовано много книг, посвященных репарации и связи ее с мутагенезом. Сейчас стало очевидным, что от того, как клетки справляются с повреждениями, зависит не просто возникновение мутаций, но и такие кардинальные процессы, как появление наследственных болезней и раковых опухолей, старение. По-видимому, репарация сыграла ведущую роль в эволюции живых существ.

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ РАЗЛИЧНЫХ РЕАКЦИЙ РЕПАРАЦИИ

Фотореактивация и другие виды “прямой” репарации. В 1949 году немецкий генетик Альберт Кельнер, бежавший из гитлеровской Германии в США, обнаружил, что в клетках бактерий и грибов, таких, как стрептомицеты и пенициллы, облученных ультрафиолетовым (УФ) светом, а затем перенесенных на видимый свет, частота мутаций падает, а выживаемость резко возрастает по сравнению с клетками, оставленными после облучения в темноте. Кельнер пришел к выводу, что на свету проходят реакции восстановления и какие-то поврежденные молекулы или части их возвращаются к норме. Нужно подчеркнуть, что в 1949 году большинство генетиков еще не понимали ведущей роли ДНК в наследственности, имели весьма смутные представления о структуре хромосом и даже не знали, что дрожжи и

другие грибы — эукариоты. Поэтому объяснение, данное Кельнером восстановлению повреждений на свету, было по-настоящему пионерским. Макс Дельбрюк, другой эмигрант из Германии, будущий Нобелевский лауреат, подсказал Кельнеру название для описанного им явления — фотореактивация. В том же 1949 году сходный процесс был найден у бактериальных вирусов и высших организмов — в яйцах морской звезды.

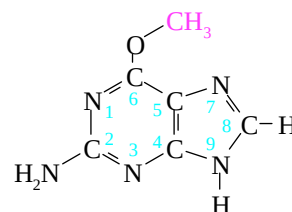
В кратком обзоре невозможно описать сколь угодно подробно историю того, как открытие Кельнера обрастало новыми и новыми подробностями. Можно лишь сказать, что, к чести первооткрывателя фотореактивации, он быстро пришел к выводу, что за процесс исправления ответственна простая реакция в наследственном аппарате. Этот вывод был сделан еще до знаменитой работы Дж. Уотсона и Ф. Крика, в которой они в 1953 году постулировали существование ДНК в виде двойных спиралей и приписали ДНК функцию наследственных молекул. В 1958 году был впервые выделен фермент, осуществляющий фотореактивацию, который сейчас называют фотолиазой. В 1960 году голландские ученые Р. Бьюкерс и У. Берендс изучили процесс повреждения нуклеиновых кислот УФ-светом и выделили специфический продукт, который возникал только в том случае, если колебания нитей ДНК сводили к минимуму путем замораживания растворов. Оказалось, что двойная связь между пятым и шестым атомами углерода в составе пиримидиновых оснований (тимине и цитозине в ДНК и цитозине и урациле в РНК) под действием УФ-света может рваться. Атомы остаются связанными одиночной связью, а в результате разрыва другой связи образуются две свободные валентности. Обычно ДНК в клетках находятся в так называемой Б-форме, когда плоскости оснований параллельны друг другу и расстояние между плоскостями равно примерно 3,4 Å. Это расстояние 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 более сложное, так называемое цикlobутановое кольцо:



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

Фотореактивация заключается в том, что фермент фотолиаза расщепляет вновь образовавшиеся связи между соседними пиримидиновыми основаниями и восстанавливает нативную структуру. В 1963 году фотолиаза была выделена и очищена. В настоящее время выяснено, что в фотолиазе есть участок, либо сам служащий светочувствительным центром, который способен адсорбировать фотоны (в синей части спектра), либо связывающийся с кофакторами, адсорбирующими свет. Хотя тонкие реакции механизма поглощения света фотолиазами до сих пор до конца не поняты, ясно, что свет активирует фотолиазу, которая затем распознает димеры в облученной ДНК, присоединяется к ним и разрывает возникшие между пиримидиновыми кольцами связи. После этого фотолиаза отходит от ДНК. Прямое восстановление структуры ДНК на этом завершено. Это единственная пока найденная ферментная реакция, в которой фактором активации служит не химическая энергия, а энергия видимого света. Все остальные типы репарации не требуют активации светом и потому первое время носили собирательное название “темновая репарация”. Сейчас этот термин практически не встречается.

Репарация O⁶-алкилированного гуанина. Советский генетик И.А. Рапопорт в 1944—1948 годах нашел новый класс химических мутагенов — алкилирующие агенты, способные добавлять к взаимодействующим с ними молекулам алкильные (метильные, этиловые, пропиловые, бутиловые) боковые группы. Аналогичный результат вскоре был получен английским генетиком Шарлоттой Ауэрбах. В конце 60-х годов стало ясно, что эти мутагены алкилируют пуриновые и пиримидиновые основания в ДНК. Один из наиболее мощных алкилирующих мутагенов, метил-нитро-нитрозогуанидин, может алкилировать гуанин, присоединяя метильную группу к кислороду, связанному с шестым атомом кольца:



Полученный продукт был назван O⁶-метил-гуанином (или сокращенно O⁶-меГ). В 1978—1979 годах генетики и биохимики обнаружили, что метильная группа может отщепляться от гуанина и тогда

происходит прямое восстановление структуры ДНК в этой точке. В 1982–1988 годах было установлено, что такой же механизм функционирует при репарации O^4 -алкилтимина. Последующие исследования показали, что в клетках есть белки метилтрансферазы, которые могут захватывать метильные группы от модифицированного гуанина и благодаря этому восстанавливать исходную структуру ДНК. Интересно 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. Если для каждого акта прямой репарации O^6 -меГ или O^4 -алТ нужна новая молекула белка, клетка вынуждена запустить синтез новых его порций. Как правило, внутри клетки их накапливается несколько тысяч, чтобы обеспечить нужды репарации: по одной молекуле уходит на одно повреждение. Если процесс возникновения новых повреждений в ДНК идет медленнее, чем синтез новых порций белков, то последних хватает на захват всех метильных групп в гуанинах и мутации не возникают. Если же скорость внесения новых повреждений превышает скорость синтеза белков, последние перестают справляться со всеми повреждениями и в клетках накапливаются мутации. В минуту в клетке *E. coli* может синтезироваться порядка 100 молекул метилтрансфераз. Следовательно, мутации не возникнут, если скорость возникновения O^6 -меГ повреждений будет меньше 100 в минуту. Для справки: кишечные палочки делятся каждые 30 минут и, таким образом, клетка за один клеточный цикл может накопить не более 3000 метилтрансфераз.

Репарация одонитевых разрывов ДНК. Еще один тип реакций прямой репарации был обнаружен для одонитевых разрывов ДНК, индуцируемых, например, ионизирующим излучением. При этом с помощью фермента ДНК полинуклеотидлигазы (от англ. *ligase* — соединять, связывать) происходит прямое воссоединение разорванных концов в молекуле ДНК.

Репарация АП-сайтов за счет прямой вставки пуринов. Голландский ученый Т. Линдал в 1979 году нашел, что при некоторых типах повреждений пуриновых оснований ковалентная связь между основанием и сахаром (гликозидная связь) может рваться. Тогда в молекуле ДНК на месте этих оснований образуется брешь, названная АП-сайтом. Термин приложим также к случаям, когда из ДНК выпадают пиримидиновые основания (термин АП-сайт, таким образом, объединяет все случаи выпадения оснований с образованием и апуриновых и апиримидиновых сайтов). Описаны ферменты, названные инсертазами (от англ. *insert* — вставлять), которые могут вставлять в брешь такое же основание, какое было до поражения, и соединить его с сахаром. Структура ДНК приобретает исходный неповрежденный вид.

Эксцизионная репарация. Существуют более сложные реакции восстановления, напоминающие хирургические вмешательства в структуру ДНК, когда поврежденные участки вырезаются из цепи ДНК (отсюда происходит и термин “эксцизионная репарация”, от англ. *excision* — вырезание), а затем образовавшиеся бреши заполняются неповрежденным материалом.

А. Вырезание поврежденных оснований гликозилазами и застройка АП-сайтов. К настоящему времени описано много типов ферментов-гликозилаз, каждый из которых узнает разнообразные поврежденные основания (такие, как метилированные, окисленные, восстановленные, дезаминированные основания, основания, связанные с формамидными группировками, и т.п., табл. 1). Гликозилазы присоединяются к ним, рвут гликозидные связи между модифицированным основанием и сахаром дезоксирибозой, за счет чего образуются АП-сайты. АП-сайт распознается теперь другим ферментом, АП-эндонуклеазой¹. Последние найдены у бактерий, растений, животных, включая человека. Как только в нити ДНК возникает разрыв, в работу вступает еще один фермент — фосфодиэстераза: он отщепляет от ДНК ту сахарофосфатную группу, к которой теперь не присоединено основание. Появляется брешь в одной цепи ДНК размером в один нуклеотид. Напротив бреши в противоположной нити ДНК расположен неповрежденный нуклеотид, и следующий фермент — ДНК полимеразы I вставляет в брешь комплементарный ему нуклеотид, присоединяя его к свободному 3'ОН-концу. Чтобы соединить два свободных конца (3'ОН-конец вставленного нуклеотида и 5'-конец, ранее образовавшийся при разрыве нити ДНК АП-эндонуклеазой), вступает в действие еще один фермент — полинуклеотидлигаза. Теперь вся структура ДНК полностью восстановлена: неправильное основание удалено, сахарофосфат, к которому это основание было прикреплено, вырезан из нити ДНК, брешь заполнена правильным нуклеотидом, и все одонитевые разрывы залечены. Поскольку последовательность реакций запущена в действие путем расщепления гликозидной связи, этот вид репарации получил название “вырезание оснований с помощью гликозилаз”.

Б. Вырезание нуклеотидов. Другим типом эксцизионной репарации является более сложная и энергетически более дорогая реакция вырезания не просто поврежденного основания, а значительного участка цепи ДНК перед и позади повреждения (рис. 1). Эту реакцию в клетках *E. coli* выполняет мультиферментный комплекс, содержащий эндонуклеазы, кодируемые тремя генами: *uvrA*, *uvrB* и

¹ Нуклеазами называют ферменты, способные расщеплять сахарофосфатную цепь. Они могут рвать эту цепь внутри полимерной молекулы ДНК или РНК, и тогда их называют эндонуклеазами, или же с концов полимеров, и тогда их называют экзонуклеазами.

Таблица 1. Основные типы обнаруженных к настоящему времени 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 формамидо-пиримидинов или 8-оксигуанин	2,6-диамино-4-окси-5-N-метилформамидо-пиримидин или 8-оксигуанин + АП-сайт
5,6-НТ-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 гидролизованной 5'-гликозидными связями + АП-сайты

* Из кн.: *Friedberg E., Walker G., Siede W. DNA Repair and Mutagenesis. Wash. (D.C.): ASM Press, 1995.* Печатается с разрешения авторов.

uvrC (названия генов даны по первым буквам слов *ultra violet repair*). Комплекс получил название “эксинуклеаза”.

Процесс был обнаружен в клетках человека в лаборатории Р. Сетлоу в США и в моей группе (В. Сойфер, Н. Яковлева-Сойфер и А. Мустафина) в 1970 году. Поиск эксцизионной репарации у растений оказался более трудным. Сначала американцы Дж. Троско и Э. Мансур не смогли ее обнаружить и в 1969–1973 годах заявили, что высшие растения либо не получили в ходе эволюции этот важный механизм, либо в ходе той же эволюции утеряли его. Однако в 1973–1978 годах в моей лаборатории, когда я еще работал в Москве, эксцизионная репарация у растений была найдена, а затем изучены процессы повреждения ДНК растений облучением и алкилированием. Было показано, что подавление репарации ведет к резкому увеличению числа мутаций хромосом, замедлению роста и развития растений и к другим нежелательным последствиям. В последние годы эксцизионную репарацию интенсивно исследовали ученые многих стран мира. В частности, было показано, что человеку требуется в среднем в четыре раза больше ферментов репарации, чем бактериям (эксинуклеаза состоит по крайней мере из 17 белков, застройка бреши идет с участием ДНК полимераз σ или ϵ), а вырезаемый из поврежденной ДНК кусок имеет длину не 12, а 29 нуклеотидов и т.д.

Репарация неспаренных оснований. Довольно часто (у *E. coli* один раз на 10 тыс. пар нуклеотидов, у эукариотов еще чаще) во время репликации ДНК происходят ошибки спаривания, в результате которых

вместо комплементарной пары нуклеотидов А + Т или Г + Ц в дочернюю цепь ДНК оказываются включенными нуклеотиды, некомплементарные нуклеотидам в материнской нити (их называют мисмэтчами — от англ. *mismatch*). Однако ДНК полимеразы обладают следующим свойством: после подстановки очередного нуклеотида в растущую нить ДНК (полимеразный комплекс движется в направлении от 5'-конца синтезируемой нити к 3'-ОН-концу) делать шаг назад (в направлении от 3' к 5') и вырезать последний нуклеотид, если он некомплементарен нуклеотиду в матричной нити ДНК¹. Этот процесс исправления ошибок спаривания, или коррекции, иногда не срабатывает, и тогда в ДНК по окончании репликации остаются невырезанными некоторые неправильные пары, остаются мисмэтчи. Для их устранения клетки живых организмов обладают специально созданной Природой системой репарации.

При неправильном спаривании, в отличие от всех описанных выше случаев репарации модифицированных или поврежденных оснований и нуклеотидов, в структуре ДНК не появляется необычных оснований, неправилен лишь характер спаривания. Как же клетка в таком случае ухитряется распознать неправильность и начать репарацию? Ясно, что неправильное спаривание (ошибка репликации) может затронуть только дочернюю нить ДНК; матричная

¹ См. статью О.О. Фаворовой “Сохранение ДНК в ряду поколений: репликация ДНК” (Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 4. С. 11–17).

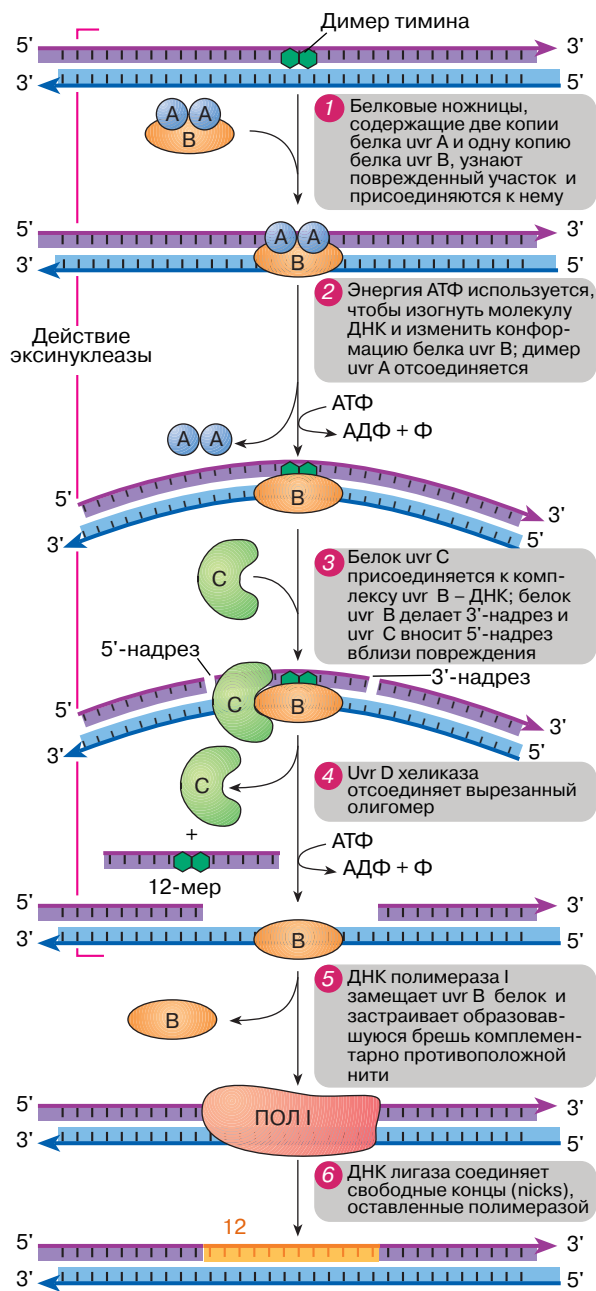
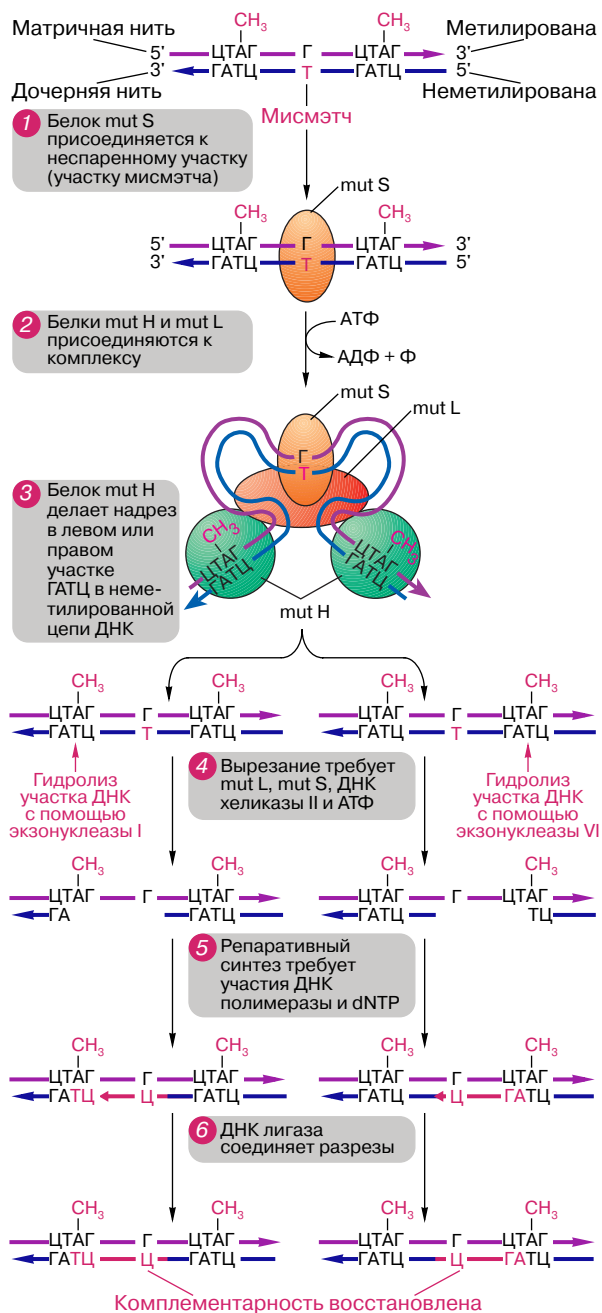


Рис. 1. Репарация ДНК по механизму вырезания нуклеотидов (экзационная репарация нуклеотидов): 1 – распознавание повреждений белками, кодируемыми генами *UvrA* и *UvrB*; 2 – изгиб молекулы ДНК и изменение конформации белка *uvrB*; 3 – внесение двух односторонних надрезов ДНК с обеих сторон от повреждения с помощью белков *uvrB* и *uvrC*; 4 – расплетание ДНК в участке между двумя надрезами с помощью белка *uvrD* (хеликазы), отсоединение содержащего дефект фрагмента длиной 12 нуклеотидов (12-мер) с образованием бреши; при этом расходуется энергия еще одной молекулы АТФ; 5 – застройка образованной бреши с помощью ДНК полимеразы; 6 – соединение свободных концов (nicks), оставленные полимеразой ДНК с помощью ДНК лигазы

нить в процессе репликации остается неизменной (если в матричной нити появилось повреждение и не было исправлено с помощью репарации, то это и есть мутация, и она будет воспроизводиться при репликации во всех последующих поколениях). Следовательно, система репарации мисмэтчей должна оперировать на дочерней нити и производить замену некомплементарных оснований только в ней. Клетки при этом используют важное различие в структуре матричной и дочерней нитей, найденное в 70-х годах. Оказалось, что вскоре после окончания репликации специальные ферменты – метилазы присоединяют метильные группы к аденинам в последовательностях ГАТЦ. Поэтому во время следующего раунда репликации нити ДНК оказываются различимыми: материнская нить ДНК несет метилированные аденины, а в дочерней нити до окончания репликации аденины еще неметилированы. Их метилирование начнется только по окончании репликации. Пока они остаются неметилированными, клетки должны успеть отрепарировать мисмэтчи.

В кишечной палочке этот процесс идет под контролем продуктов четырех генов: *MutH*, *MutL*, *MutS* и *MutU* (*MutU*, как было выяснено позже, есть не что иное, как ген *UvrD*, или хеликаза II). Процесс начинается с того, что к некомплементарной паре мисмэтча присоединяется белок *mutS*. С ним тут же связываются белок *mutL* и две молекулы белков *mutH*. Каждый из белков *mutH* распознает участок ГАТЦ и обладает эндонуклеазной активностью, с помощью которой ДНК в этой последовательности может быть надрезана вблизи аденина в неметилированной нити. Надрезы могут быть внесены как в 5'-, так и в 3'-положение относительно аденина. Мультимолекулярный комплекс, составленный из этих белков, массивен и связывает длинный фрагмент ДНК. Последний протягивается через комплекс до тех пор, пока два участка ГАТЦ, расположенные по обе стороны от мисмэтча, удерживаемого белком *mutS*, не окажутся захваченными молекулами белков *mutH*. Иногда расстояние между участками ГАТЦ может превышать несколько тысяч нуклеотидов. Каждый из белков *mutH* распознает участок ГАТЦ и разрывает дочернюю нить около неметилированных аденинов. Если такой надрез сделан с 5'-стороны от аденина (справа на рис. 2), к нему присоединится еще один белок – экзонуклеаза, которая расщепит нити ДНК в направлении 5' → 3'. Этот белок начнет свою работу, разрушит всю дочернюю нить ДНК до места неправильного спаривания и даже пройдет несколько дальше. Если же первичный надрез будет сделан эндонуклеазой, оперирующей в содружестве с *mutH* белком, расположенным с 3'-стороны мисмэтча (слева на рис. 2), то потребуются другая экзонуклеаза,двигающаяся по ДНК в направлении 3' → 5'. Ее работа будет продолжаться до тех пор, пока не будет устранен участок мисмэтча. Затем как в случае с 5' → 3'-, так и с 3' → 5'-экзонуклеазой бреши должны быть застроены



ДНК-полимеразой, а концы воссоединены с помощью лигаз. Разумеется, для высвобождения концов нитей после внесения первичных разрезов молекула ДНК должна быть расплетена (требуется белок хеликаза), нужны также источники энергии в виде АТФ, а для застройки брешей требуются дезоксирибонуклеотидтрифосфаты. Процесс обнаружен в клетках человека, дрожжей и некоторых других организмов.

Пострепликативная, или рекомбинационная, репарация. В 1968 году американцы У. Рапп и П. Ховард-Фландерс исследовали облученные УФ-светом бактерии, у которых были повреждены гены, ответственные за синтез эксинуклеаз. В результате эксизионная репарация стала невозможной. Поскольку опыты проводили в темноте, то и фотореактивация не могла осуществиться. В этих клетках матричная ДНК содержала много невырезанных димеров тимина, и в момент, когда ДНК полимераза, ведущая репликацию, доходила до первого из них, она буквально застыла на этой точке. Спустя 10 секунд ДНК полимераза ухитрялась каким-то образом перебраться за димер тимина и возобновляла синтез позади дефекта, пока снова не «наткнулась» на димер. В результате формировалась дочерняя ДНК с брешами напротив повреждения. Сейчас мы знаем, что репликацию ДНК осуществляет не один лишь фермент ДНК полимераза III, но комплекс из нескольких десятков белков. Как они могут перебираться через повреждение — не до конца разгаданная загадка. Как тот же комплекс может возобновлять реакцию репликации без помощи затравки (короткого участка РНК, без которого синтез ДНК невозможен)¹ — также неясно. Но обнаруженный Раппом и Ховардом-Фландерсом факт задержки синтеза никто не оспаривает. Сама же задержка на 10 секунд весьма значительна, так как репликация у кишечной палочки идет со скоростью 1000 нуклеотидов в 1 секунду. Таким образом, участок дочерней нити, иногда длиной в несколько генов, оказывается неудвоенным при синтезе ДНК, причем в зоне напротив брешы (в матричной цепи) так и остается незалеченным

¹ См. статью О.О. Фаворовой «Сохранение ДНК в ряду поколений: репликация ДНК» (Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 4. С. 11–17).

Рис. 2. Репарация неправильно спаренного участка (мисмэтча) у бактерий кишечных палочек (*E. coli*). Двойная спираль ДНК была только что отреплицирована; матричная цепь несет уже метилированные основания, в то время как дочерняя нить еще неметилирована. Белки mutH и mutL разрезают в ходе описываемого процесса репарации только неметилированные сайты GATC. Матричная цепь ДНК остается целостной и служит матрицей для восстановления правильной последовательности в образовавшихся брешах: 1 – белок mutS распознает неспаренный участок и присоединяется к нему; 2 – образование репарационного комплекса за счет присоединения белков mutH и mutL к белку mutS; на осуществление этой реакции тратится одна молекула АТФ; 3 – разрезание ДНК в участке GATC, расположенных перед и позади сайта мисмэтча; 4 – длинный участок ДНК, расположенный между двумя надрезами и несущий мисмэтч, должен быть отсоединен от молекулы ДНК, в результате чего возникает длинная однонитевая брешь; в расплетении двунитевой ДНК принимают участие хеликазы и расходуются несколько молекул АТФ; 5 – застройка длинной брешы ДНК полимеразой с использованием дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP); 6 – соединение оставшихся после завершения репликации однонитевых разрывов с помощью ДНК лигаз. В результате всей цепи участок мисмэтча заменяется правильной (комплементарной) парой

дефект, и это может привести клетку к гибели. Чтобы его залечить, клетка прибегает к приему, похожему на рекомбинацию (рис. 3). Из комплементарной нити матричной ДНК (она была свободна от дефектов), на которой репликация ДНК уже завершена, с помощью белка *гесА* вырезается участок ДНК, равный по длине участку бреши и встраивается в брешь. Затем лигазы соединяют концы вставленного фрагмента с концами нормально синтезированного участка дочерней нити. После этого другие ферменты репарации устраняют дефект в исходно поврежденной нити и ДНК становится залеченной. Одновременно брешь, оставшаяся после вырезания участка из материнской нити, застраивается ДНК полимеразой I и концы соединяются лигазой.

SOS-репарация. Что случится, если клетка подошла к моменту, когда нужно реплицировать ДНК, но в ней остались повреждения, которые ни одна из описанных выше систем репарации не смогла устранить? Репликация застопорится на первом же неустраненном поражении, и если их в ДНК много, клетка должна погибнуть. В этих условиях в клетках активируется еще один крайне рискованный механизм репарации, обнаруженный впервые в 1974 году югославским ученым Мирославом Радманом, эмигрировавшим во Францию. Радман установил, что при этом индуцируется синтез белков, которые присоединяются к ДНК полимеразному комплексу, «загрубляют» его работу, и такой «подпорченный» комплекс становится способным строить дочернюю ДНК напротив дефектных звеньев матричной нити, но, разумеется, в дочерней нити теперь появляется довольно много ошибок, мутаций. Радман остроумно назвал этот механизм «SOS-репарация» от международно признанного сигнала бедствия SOS (спасите наши души). Принцип метода пояснен на рис. 4. В результате SOS-репарации клетка спасается от гибели на этом этапе: ее ДНК оказывается удвоенной, хотя и с ошибками, и теперь может произойти клеточное деление, но если жизненно важные функции все-таки безнадежно испорчены, такая клетка все равно погибнет позже из-за неспособности правильно функционировать. Если же возникшие мутации не окажут летального действия, клетка худобно, но проживет и ее потомки будут нести уже теперь всегда наследственную память о пережитых некогда последствиях мутационной катастрофы. Конечный исход читатель может дорисовать в своем воображении сам, так же как легко может себе представить, чем обернется устойчивое загрязнение среды обитания для любых организмов, включая человека, если им придется все чаще и чаще прибегать к индуцированному загрязнению ответу типа SOS-репарации.

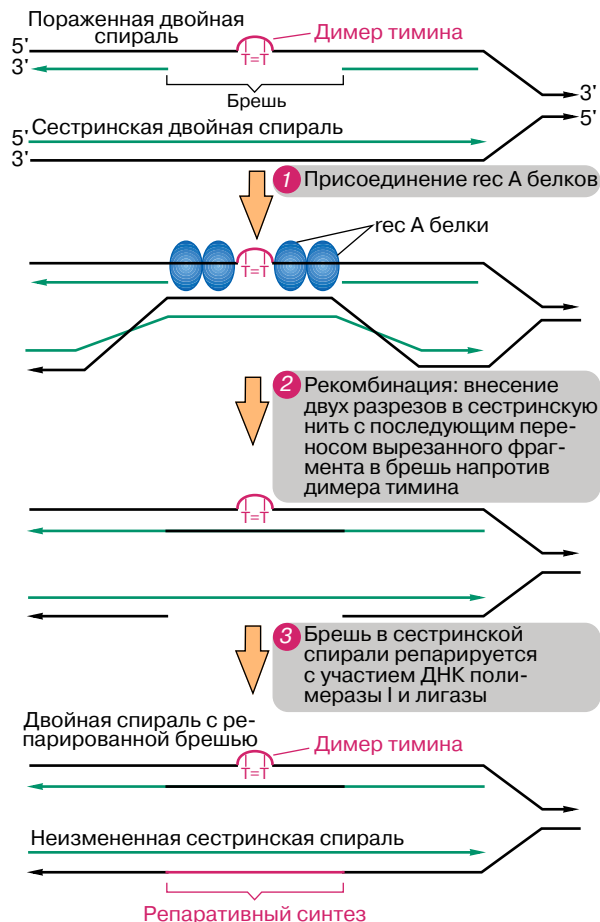


Рис. 3. Пострепликативная репарация ДНК. Если до начала репликации ДНК из нее не были устранены все дефекты, то одна из нитей материнской молекулы будет нести повреждение (красным цветом выделен димер тимина), а комплементарная ей нить будет свободна от повреждений (нити материнской молекулы показаны черным цветом). На поврежденной нити репликация завершится тем, что напротив димера тимина в заново синтезированной нити (зеленого цвета) окажется брешь, в то время как сестринская двойная спираль не будет нести повреждения. После этого может пройти пострепликативная репарация поврежденного участка: 1 – молекулы белка *гесА* (синие) присоединяются к зоне бреши; 2 – под контролем белков *гесА* произойдет рекомбинация – участок комплементарной цепи сестринской нити (черная) переносится в район бреши; 3 – брешь в сестринской ДНК застраивается в ходе репликативного синтеза (застроенный участок показан красным цветом); концы новой и старой нитей соединяются лигазой

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ РЕПАРИРУЮЩИХ СИСТЕМ В ЖИВОМ МИРЕ

Фотореактивация, как мы уже знаем, была обнаружена одновременно у прокариотов (бактерий и вирусов) и эукариотов (дрожжей). Однако более

сложные реакции сначала не были найдены в клетках млекопитающих, и в особенности у человека. Начался долгий процесс поиска методов биохимических исследований, которые помогли бы найти разнообразные механизмы репарации в мире живых существ. В табл. 2 дано сегодняшнее представление о распространенности способов восстановления дефектов в ДНК у различных типов организмов. На-

Таблица 2. Репарирующие ферменты среди представителей живого мира

Тип репарации	Бактерии	Растения	Насекомые	Животные	Человек
Фотореактивация	+	+	+	+	+
Репарация O ⁶ -гуанинов	+	+	+	+	?
Экцизионная репарация оснований	+	?	?	+	+
Экцизионная репарация нуклеотидов	+	+	+	+	+
Мисмэтч-репарация	+	?	?	+	+
Пострепликативная репарация	+	+	?	+	+
SOS-репарация	+	?	?	+	+

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

до подчеркнуть, что исследования в этой области идут интенсивно во всем мире. В 1994 году редакция одного из самых авторитетных научных журналов — “Science” (“Наука”), по традиции посвящающая каждый год предпоследний выпуск журнала самому важному событию в науке за этот год, посвятила его репарации ДНК. Этот выбор был связан с тем, что именно в том году было окончательно доказано увеличение частоты раковых заболеваний от подавления мисмэтч-репарации.

ДЕФЕКТЫ РЕПАРАЦИОННЫХ СИСТЕМ И НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ

В 1968 году Джеймс Кливер нашел причину коварной и неизлечимой болезни человека — пигментной ксеродермии. У носителей болезни под действием обычного солнечного света, в котором всегда присутствуют УФ-лучи, на коже возникают сначала красные пятна, которые постепенно переходят в незарастающую коросту, чаще всего трансформирующуюся в раковые опухоли (рис. 5). Кливер нашел, что первопричиной этого заболевания служат дефекты разных репарирующих систем. Многочисленные исследования выявили варианты болезни, обусловленные дефектами всевозможных систем

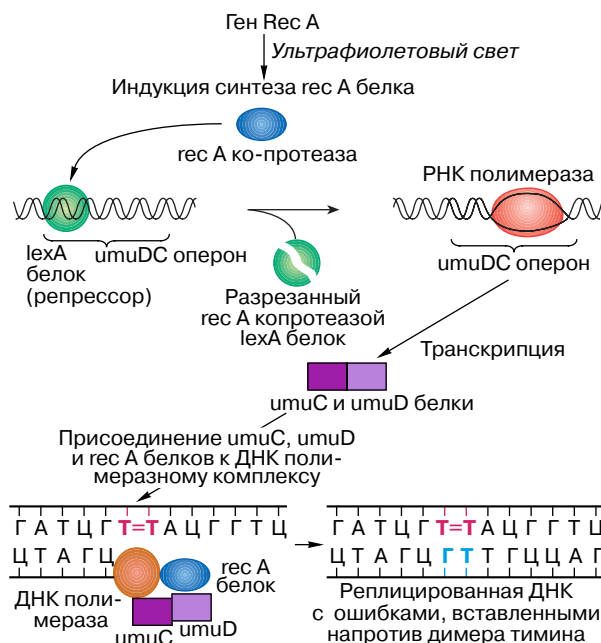


Рис. 4. Индуцируемая УФ-светом SOS-репарация. Большие дозы УФ-облучения приводят к возникновению большого числа повреждений ДНК, часть которых остается нерепарируемой к моменту начала репликации. В этих условиях активируется синтез ко-протеазы *recA* белка, которая участвует в расщеплении (протеолизе) многих белков. В частности, *recA* ко-протеаза может узнать и разрезать другой белок — кодируемый геном *LexA* и являющийся репрессором почти 20 генов, в том числе оперона *umuDC*. Разрушение *lexA* белков открывает возможность начать транскрипцию многих оперонов: РНК-полимераза связывается с их промоторами, и в частности с промотором оперона *umuDC*, и начинает транскрипцию генов *UmuC* и *UmuD*. Около 5 лет тому назад большинство генетиков согласилось с гипотезой, что вновь синтезированные белки *umuC* и *umuD* способны присоединиться к комплексу “ДНК-полимераза III — *recA* белок”, изменить его, после чего репликационный комплекс продолжит синтез дочерней нити ДНК на поврежденной матрице и подставит в участках напротив повреждений любые случайные нуклеотиды, только чтобы пройти эти участки. Репликация ДНК таким образом завершится, однако дочерняя нить будет нести мутации напротив дефектов в материнской нити. В настоящее время стало ясно, что даже эта довольно сложная схема нуждается в значительном усложнении, например, белок *umuD* под действием *recA* ко-протеазы расщепляется на две части, и только одна из них ответственна за введение ошибок во вновь синтезированные дочерние цепи ДНК

репарации. В настоящее время известно, что многие другие наследственные болезни человека обязаны своим возникновением повреждениям отдельных этапов различных процессов репарации. Список этих болезней, пополняемый все новыми примерами, приведен в табл. 3.



Рис. 5. Клинические проявления наследственных болезней, обусловленных дефектами генов, кодирующих белки репарации: 1 – пигментная ксеродермия: а – у девочек выявлен дефект генов эксцизионной репарации, обуславливающий развитие пигментной ксеродермии, поэтому они вынуждены всю жизнь избегать попадания ультрафиолетового света на кожу и практически жить при искусственном освещении; б – кожные изменения, возникающие у ребенка, находящегося на видимом свете; в – глубокие поражения кожи у взрослого, страдающего пигментной ксеродермией. 2 – атаксия-телангиэктазия: а – этот 22-летний больной не может передвигаться самостоятельно вследствие атаксии (расстройства координации движений) и привязан к инвалидной коляске; б – расширение капилляров (телангиэктазия; в русском переводе принят термин “телеангиэктазия”) в глазу у больного. 3 – синдром Блума: характерная красная пигментация на лице больного, по форме напоминающая очертание бабочки, которая возникает вследствие болезненного поражения капилляров

Таблица 3. Примеры наследственных болезней человека, обязанных своим возникновением дефектам репарирующих ферментов

Болезнь	Что нарушено в системах репарации	Затронутые гены	Симптомы и последствия заболевания
Болезни, вызываемые преимущественно дефектами эксцизионной репарации			
Пигментная ксеродермия (ПК) Классическая ПК (ей соответствуют 90% клинических случаев ПК)	Эксцизионная репарация нуклеотидов (нарушение вырезания, застройки брешей и др.). Разнообразные дефекты репарационных процессов, контролируемых многими генами (так называемые варианты ХР-генов), активно изучаются в настоящее время	XPA XPB XPC XPD XPE XPF XPG	Сверхчувствительность к УФ-свету, ведущая к появлению красных пятен на коже, переходящих в незаживающие коросты и нередко в рак кожи; неврологические расстройства (синдром Де Санктиса–Качиони); поражения век, бровей и глаз. Распространение: 1 случай на 250 000 человек в Европе и США; 1 : 40 000 человек в Японии
Вариантная ПК (10% случаев)	Наряду с некоторыми дефектами, присущими классической ПК, наблюдается изменение параметров репликации ДНК	(Так называемые варианты ХР-генов)	
Трихотриодистрофия (ТТД)	Повышенная фоточувствительность ДНК (примерно в 50% случаев заболеваний), нарушение вырезания димеров тимина или недостаточная скорость застройки брешей после вырезания нуклеотидов, возможны нарушения транскрипции	XPD и, возможно, другие гены	Нехватка серы в белках волос и их ломкость, ведущая к ломкости волос, “тигровость” волос (чередование светлых и темных полос по длине волоса, выявляемое под микроскопом); ихтиоз; часто умственная и физическая отсталость; дефекты полового развития; аномалии кожи и зубов; нередко раковые заболевания
Синдром Кокэйна	Дефекты репарирующих эндонуклеаз и дефектность репарации повреждений в транскрибируемых участках ДНК	CSA CSB XPB XPD? XPG?	Карликовость, вызываемая задержкой роста и развития в младенческом и детском возрасте при нормальном уровне гормонов роста, глухота, атрофия зрения, кальцификация костей черепа и др.
Анемия Фанкони	Дефекты репарации повреждений от химических мутагенов и канцерогенов (но не УФ-света), обусловленные дефектами эндонуклеаз, дефектами распознавания кросс-сшивок ДНК; пониженная способность к апоптозу после ионизирующего облучения; двукратное удлинение G ₂ -фазы клеточного цикла и др.	FAA FAB FAC	Сверхчувствительность к химическим мутагенам и канцерогенам, уменьшение количества всех клеточных элементов крови, различные аномалии врожденных способностей, деформация пальцев и другие виды скелетных нарушений, урогенитальные нарушения, микроцефалия, микрофтальмия, дефекты уха и потеря слуха, сердечные и гастроинтестинальные нарушения

Болезнь	Что нарушено в системах репарации	Затронутые гены	Симптомы и последствия заболевания
Болезни, вызываемые преимущественно дефектами репаративного синтеза и дефектного клеточного ответа на поражения ДНК			
Атаксия-теланги-эктазия (синдром Луи-Бара)	Дефекты репаративного синтеза ДНК, нарушения клеточного цикла, высокая частота спонтанных хромосомных аномалий, увеличенная чувствительность к ионизирующим излучениям и радиомиметикам, к УФ-свету и агентам сходного действия (таким, как 4-нитрохинолиноксид)	Четыре группы комплементарности	Появляется у одного из 40 тыс. новорожденных, основные поражения отмечены в нервной и иммунной системах (мозжечковая атаксия, приводящая к нарушениям координации мышц, шатающейся походке и прогрессирующей умственной отсталости, кожным нарушениям, предрасположенности к раковым заболеваниям и др.)
Синдром Блума	Замедленная репликация ДНК и подавленный репаративный синтез, высокая частота хромосомных aberrаций, особенно сестринских хроматидных обменов, по-видимому обусловленная низкой активностью лигаз (молекулярная причина дефекта пока неясна)		Резко уменьшенный вес новорожденных, задержанный рост; при непродолжительном пребывании на солнечном свете на лице появляется характерная красная пигментация, по форме напоминающая бабочку и вызванная расширением капилляров; повышенная чувствительность к вирусным инфекциям; резко повышенный риск раковых заболеваний
Болезни, вызываемые преимущественно дефектами мисмэтч-репарации			
Наследственный неполипозный рак прямой кишки	Исследования 1994 года показали, что наиболее часто болезнь вызывается дефектами мисмэтч-репарации. В настоящее время исследования в данном направлении ведутся во многих лабораториях мира	Аналоги бактериальных генов MutS и MutL	Наиболее часто встречающаяся наследственная предрасположенность к раку (1 : 200 человек), требующая, как правило, каскада последовательного мутирования специфических локусов в нескольких хромосомах человека, приводящего к активации нескольких онкогенов

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытие и детальное изучение процессов репарации ДНК стало одним из интереснейших и важных достижений молекулярной генетики второй половины XX века. Аргументом в пользу решающей роли процессов репарации в эволюции жизни на Земле стали эксперименты американского ученого Артура Корнберга. Долгое время он, первооткрыватель ДНК полимераз, пытался осуществить в пробирке искусственный синтез ДНК, но это ему не удавалось. Вместо линейных полимеров он получал разветвленные (и нежизнеспособные) молекулы ДНК. И только когда в середине 70-х годов он ввел в реакционную смесь ферменты репарации, то добился успеха: начали синтезироваться нормальные двунитевые молекулы ДНК, без ветвящихся сахарофосфатных нитей и других дефектов. После этого стали думать, что и в природе эволюция первых клеток без ферментов репарации произойти не могла. Так ли это было на самом деле, могут установить только специально спланированные опыты по воссозданию жизни в условиях лаборатории, однако пока это задача будущего.

Рис. 1–3 воспроизведены с разрешения издательства в модифицированном виде из кн.: *Snustad P., Simmons M., Jenkins J. Principles of Genetics*. John Wiley and Sons, Inc., 1997. Рис. 4 воспроизведен с изменениями из кн.: *Weaver F., Hedrick P.W. Principles of*

Genetics. 3 ed., 1993, с разрешения издателя. Остальные рисунки воспроизведены с разрешения авторов и издательства из кн.: *Friedberg E., Walker G., Siede W. DNA Repair and Mutagenesis*. Wash. (D.C.): ASM Press, 1995. Автор выражает признательность всем авторам и издательствам, любезно разрешившим использовать их иллюстрации.

* * *

Валерий Николаевич Сойфер, доктор физико-математических наук, профессор Университета им. Джорджа Мейсона и директор Лаборатории молекулярной генетики этого университета, расположенного в пригороде Вашингтона (США), академик Нью-Йоркской академии наук, иностранный член Национальной академии наук Украины, Российской академии естественных наук, почетный доктор Казанского и Иерусалимского университетов, председатель Правления Международной Соросовской Программы Образования в Области Точных наук и ее генеральный директор, награжден Международной медалью Грегора Менделя за достижения в области биологических наук. Основной круг научных интересов – изучение структуры и функционирования ДНК, репарации, молекулярных последствий загрязнения окружающей среды, истории науки. Автор 18 книг и более 200 научных работ.