

ЛУКАШ Л.Л.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,  
Украина, 03680, г. Киев, ул. Заболотного, 150, lukash.imbg@gmail.com, (067) 269-58-87

## ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЦЕЛОСТНОСТИ ДНК КЛЕТОЧНЫМИ РЕПАРАТИВНЫМИ СИСТЕМАМИ

В обзоре рассмотрены четыре из шести основных репаративных систем клетки. Некоторые из них были изучены нобелевскими лауреатами 2015 года в области химии. Общее название их работы – «За исследование механизмов репарации ДНК». Многочисленные первичные повреждения ДНК, индуцированные экзогенными и эндогенными факторами, исправляются сложными клеточными системами, включающими репаративные ферменты и другие белки. Мутационные изменения в генах, кодирующих репаративные энзимы, являются самыми опасными, так как драматически увеличивают частоту мутаций в про- и эукариотических клетках. Однако, благодаря постоянной и корректной работе репаративных ферментов, целостность клеточной ДНК восстанавливается, именно поэтому организмы на нашей планете все еще живы и функционально активны.

*Ключевые слова:* репарация ДНК, репаративные энзимы, про- и эукариотические клетки, первичные повреждения, мутации.

Процесс, позволяющий живым организмам исправлять повреждения и восстанавливать целостность структуры генетической матрицы, называется репарацией ДНК или генетической репарацией, а клеточные системы, участвующие в нем, – репаративными. Именно репаративные энзимы устраняют многочисленные первичные повреждения ДНК, которые в противном случае могут реализоваться в мутации. ДНК всех живых организмов постоянно подвергается воздействию повреждающих факторов. Многие из них приходят извне (ультрафиолет, радиация, тысячи химически активных веществ в нашей пище), другие – образуются внутри клеток. Живые организмы просто не могли бы существовать, если бы репаративные ферменты – эти крошечные «молекулярные роботы» – не исправляли бесчисленное количество ошибок, возникающих в ДНК. Об этом мало кто задумывается, но наконец-то работа репаративных ферментов была оценена по достоинству, по

крайней мере в мире науки. Рассмотрим все по порядку.

Прошло немногим более 90 лет с момента открытия экспериментального мутагенеза Германом Меллером (1927). В первые десятилетия после этого открытия в центре генетических исследований были феноменология и закономерности индуцированного мутагенеза, физического, химического и биологического (в зависимости от природы воздействующих факторов, которые его вызывают). Позднее стало появляться все больше исследований, посвященных первичным повреждениям ДНК, молекулярным механизмам мутаций и репаративным системам клетки [1, 2]. Последнее направление привлекло особое внимание в связи с присуждением в 2015 году Нобелевской премии по химии «За исследование механизмов репарации ДНК» трем ученым-биологам: шведу Томасу Линдалу и американцам Полу Модричу и Азису Санкару [3].

**Причины спонтанных мутаций.** Известно, что мутации могут возникать как под влиянием мутагенов, так и спонтанно, хотя установить причины появления последних реально трудно. Долгое время считали, что спонтанные мутации вызываются мутагенами окружающей среды, в частности такими, как естественный фон радиации, УФ-облучение и многочисленные химические загрязнители среды (по данным ВОЗ, к последним отнесена даже еда, которая содержит смеси мутагенов и канцерогенов). Однако, согласно литературным данным, у человека только 1/10 часть спонтанных мутаций может быть отнесена на счет внешнего естественного фона [1].

Гораздо более весомыми по своему вкладу в мутагенез оказались факторы внутренние, которых мы в принципе избежать не можем. И второй наиболее существенной причиной спонтанных мутаций считают ошибки при реализации основных матричных процессов на генетической матрице: репликации, рекомбинации и репарации. Значительный вклад в мутагенез вносит процесс репликации ДНК. При работе

ДНК-полимеразы количество неверно включенных нуклеотидов составляет около 300 000 на каждое клеточное деление. Часть первичных повреждений устраняет сама ДНК-полимераза с помощью своей экзонуклеазной активности, но большинство из них исправляется клеточными репаративными системами. Поэтому существенной составляющей спонтанного мутагенеза являются нарушения в самих системах репарации. Мутации в некоторых репаративных генах-мутаторах *E.coli* (*mutS* и *mutL*) увеличивают спонтанную мутабельность в 100, а в других (*mutT*, *mutD* и *mutH*) – в  $10^3$ – $10^5$  раз [1].

Третьей и, возможно, не менее существенной причиной спонтанных мутаций являются перемещения в геноме собственных мобильных генетических элементов (МГЭ). По расчетам М. Грина, сделанным на основе анализа природы спонтанных мутаций у дрозофилы, около 80% таких мутаций возникают вследствие транспозиций МГЭ (у человека они составляют приблизительно 10%) [1].

**Первичные повреждения ДНК** под влиянием внешних и внутренних факторов могут возникать с частотой от нескольких сотен до тысяч случаев в каждой клетке/час. С точки зрения причин возникновения их можно разделить на: 1) ошибки репликации (неправильные включения, спаривания и химические модификации оснований); 2) ошибки репарации, особенно при наличии мутаций в генах, кодирующих репаративные ферменты; 3) ошибки рекомбинации (например, неравный внутригенный кроссинговер); 4) одно- и двуниевые разрывы ДНК; 5) инсерции и делеции нуклеотидных оснований при транспозициях МГЭ; 6) выщепление отдельных оснований; 7) присоединение к основаниям модифицирующих групп; 8) образование мутагенных метаболитов [2].

К числу основных структурных ошибок ДНК следует отнести: повреждения и модификации одиночных нуклеотидов, изменения пары нуклеотидов, одно- и двухцепочечные разрывы, поперечные сшивки между основаниями одной цепи или разных цепей ДНК. На уровне отдельных оснований наиболее часто происходят ошибки спаривания и включения оснований. Дело в том, что основания в матричной цепи ДНК в течение короткого времени могут находиться в так называемой таутомерной форме, позволяющей включение в комплементарную цепь неверного основания, и это делает ошибки неизбежными. Также довольно часто происхо-

дят дезаминирование цитозина с превращением его в урацил, присоединение к основаниям метильных, этильных и более сложных алкильных групп и отщепление отдельных оснований от цепи ДНК, в результате чего возникают апуриновые и апиримидиновые бреши.

**Принципы работы клеточных репаративных систем:** если одна из двух цепей ДНК оказывается поврежденной, генетическую информацию репаративный фермент может восстановить по второй, комплементарной; гораздо реже при повреждении обеих нитей ДНК в качестве матрицы используется правильная цепь гомологичной хромосомы. По сложности молекулярного механизма есть три пути для устранения первичных повреждений в молекулах ДНК: прямое возвращение к исходному состоянию, вырезание поврежденного участка и замена его нормальным, рекомбинационное восстановление в обход поврежденного участка. Известно всего 6 основных клеточных репаративных систем [1, 2].

Репарация ДНК может происходить в несколько этапов: 1) «узнавание» измененных участков (ДНК-хеликаза); 2) «вырезание» неправильного нуклеотида, основания или модифицирующей группировки; 3) «доставление», если надо, недостающего участка ДНК по принципу комплементарности и 4) связывание концов ДНК-лигазой (рис.). Выделяют два основных типа репарации: дорепликативную (прямое удаление алкильных групп, а также фотореактивация и эксцизионная репарация) и пострепликативную, которая осуществляется с помощью механизмов рекомбинации и репликации ДНК. Репарация может осуществляться конститутивно с помощью ферментов, которые постоянно присутствуют в клетках (фотореактивация, эксцизия, пострепликативная репарация), а также индуцироваться в ответ на повреждение ДНК или прекращение ее синтеза путем активации генов, контролирующих различные репаративные функции (*MGMT*, *SOS*) [2].

Клеточные механизмы прямой репарации обеспечивают быстрое восстановление исходной структуры ДНК путем удаления повреждения без разрыва цепи. К этому типу относится репарация повреждений, вызванных метильными или алкильными группами, а также фотореактивация пиримидиновых димеров, репарация за счет экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы, репарация одноцепочечных разрывов ДНК с помощью полинуклеотидлигазы. В

этих случаях репаративные ферменты справляются со своей задачей практически в одиночку. При работе других систем образуются сложные репаративные комплексы (об этом будет сказано ниже).

**Фотореактивация** исторически была первым механизмом прямой репарации, который открыли А. Кельнер, Р. Дюльбекко и И.Ф. Ковалев в 1949 г. Почти одновременно и независимо друг от друга они установили, что освещение видимым светом актиномицетов, бактериофагов и парамеций восстанавливает их жизнеспособность после УФ-облучения в летальных дозах. На молекулярном уровне первичные повреждения, тиминовые димеры, индуцированные УФ-облучением, разрушаются под действием видимого света, а тимины возвращаются к своей исходной форме. Процесс катализируется ферментом фотолиазой, которая активируется фотоном света и расщепляет димер, но этот фермент присутствует в клетках в очень малых количествах [1–3].

Нобелевский лауреат Азиз Санкар выделил ген *phr*, кодирующий фотолиазу, получил рекомбинантные конструкции, наработал рекомбинантную фотолиазу в больших количествах и в деталях, вплоть до квантового уровня, изучил процесс этой репарации [3,4]. Фотолиаза была обнаружена у прокариот и низших эукариот, однако ее нет у человека (этот механизм сохранился у сумчатых). Поэтому Азиз Санкар обратил свое внимание на систему так называемой «темновой» репарации, которая удаляет УФ-повреждения медленно и в отсутствие видимого света.

**«Темновая» или эксцизионная репарация нуклеотидов** была открыта в 1964 году несколькими группами исследователей Бойса Р., Говарда-Флендерса П., Сетлоу Р. и Кэрриера У. Было установлено, что есть три белка (*uvrA*, *uvrB*, *uvrC*), которые образуют некий репаративный комплекс, способный вырезать участки ДНК длиной 13 п.н. (*uvr* – от английского UV-resistant, устойчивый к ультрафиолету). Азиз Санкар изучил детально все этапы эксцизионной репарации нуклеотидов на микроорганизмах и в клетках человека [3, 4]. Оказалось, что существуют сложные реакции восстановления, напоминающие хирургические вмешательства в структуру ДНК. Схематически это выглядит следующим образом. Тиминовый димер опознается мультисубъединичным ферментом *uvrA*, *B*, *C*-эндонуклеазой, который кодируется тремя

генами: *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*. Этот комплексный фермент, который назвали эксцинуклеазой (Excinuclease), делает надрез с двух сторон от повреждения. Затем участок, содержащий повреждение, удаляется экзонуклеазами, а брешь заполняется с помощью ДНК-полимеразы I, а разорванные концы соединяются ДНК-лигазой. У человека образуются другие более сложные белковые комплексы: в восстановительном процессе участвуют репаративные ферменты, кодируемые генами 9 семейств, но принцип их действия такой же.

Как выяснилось, эксцизионная репарация нуклеотидов для жизни в целом гораздо важнее, чем фотореактивация. Например, у человека исправление вызванных ультрафиолетовым светом повреждений опирается исключительно на эксцизионную репарацию нуклеотидов. Дефекты в работе ферментов этой системы репарации вызывают тяжелейшее наследственное заболевание – пигментную ксеродерму: даже легкое облучение солнечным светом приводит к ожогам и мутациям и, как правило, – к раку кожи [2]. Можно сказать, что эксцизионная репарация нуклеотидов универсальна, но исправляет она не более 10% всех повреждений, возникающих в ДНК [3].

**Мисмэтч-репарация.** Как уже отмечалось, довольно часто (у *E.coli* один раз на 10 тпн, у эукариот еще чаще) во время репликации ДНК происходят ошибки спаривания: в дочернюю цепь включаются нуклеотиды, которые не комплементарны нуклеотидам материнской нити, в результате чего возникают неправильные пары, которые называют «мисмэтчами» (mismatch). Есть одноименная система репарации, которая способна исправить такие ошибки. Важно, что неправильное основание встраивается в дочернюю нить ДНК, а материнская нить в процессе репликации остается неизменной. Но как система различает материнскую и дочернюю нити ДНК? У бактерий есть специальный фермент ДНК-метилаза, маркирующий метильной группой аденин в особой последовательности -GATC-. Сразу после синтеза эта последовательность в течение нескольких минут не метилируется в дочерней нити (-GATC-). И пока дочерние нити не метилированы, репаративные ферменты должны успеть их отрепарировать. У человека механизм мечения другой более сложный (асимметричное связывание некоторых белков), но без маркировки эта система репарации работать не может [1–3].

Когда второй нобелевский лауреат Пол Модрич начинал свои исследования, было известно, что у *E.coli* в процесс инициации репарации вовлечены продукты 4 генов (*mutS*, *mutL*, *mutH* и *mutU*), но молекулярные механизмы не были изучены. Оказалось, что процесс репарации начинается с формирования большого репаративного комплекса [3, 5]. Вначале к некомплементарной паре оснований присоединяются две молекулы белка MutS, которые фиксируют мисмэтч. Когда ученые в 2000 году определили структуру MutS, две молекулы белка оказались очень похожими на сложенные в молитве ладони, между которыми зажата ДНК. И это служит сигналом для присоединения к молекулам MutS одной молекулы MutL, двух молекул белка MutH и других белков. Мультимолекулярный комплекс, составленный из этих белков, массивен, и он отграничивает фрагмент ДНК, который подлежит репарации: между меткой и мисмэтчем. Белок MutH распознает метилирован-

ный участок GA<sup>me</sup>TC-, но надрез делает вблизи аденина, в дочерней неметилированной цепи (-GATC-). С места этого разрыва фрагмент дочерней цепи удаляется экзонуклеазами в направлении мисмэтча, зажатого димером белка MutS. Достигнув неправильной пары, процесс разрушения нити ДНК останавливается. После этого недостающий участок дочерней цепи вновь синтезируется ДНК-полимеразой III на правильной материнской матрице, а ДНК-лигаза соединяет разорванные концы. Схема работы этой системы репарации, которая выполняет все основные этапы восстановительного процесса, представлена на рисунке.

Система мисмэтч-репарации обнаружена в клетках человека, дрожжей и некоторых других организмов. У человека мутации в генах, ответственных за эту систему репарации, приводят к развитию наследственного рака кишечника.

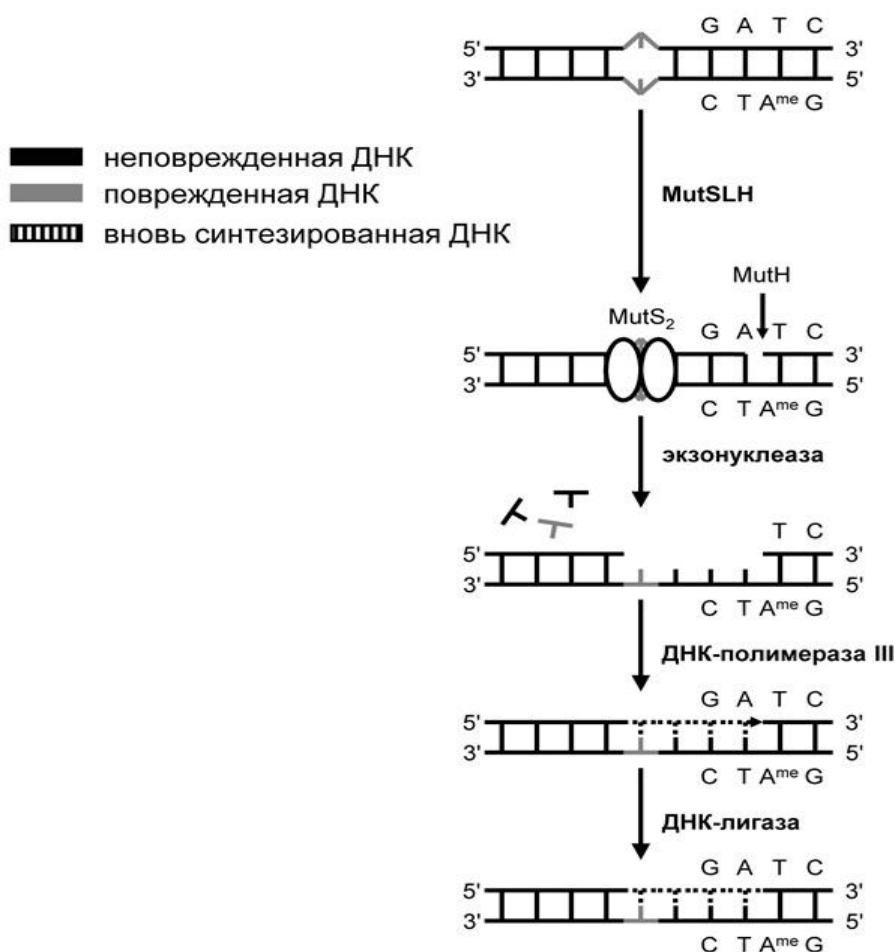


Рис. Мисмэтч-репарация. Димер белка MutS узнает неправильную пару нуклеотидов, а белок MutH – метилированный участок -GA<sup>me</sup>TC-. Затем MutH вносит разрыв в неметилированную дочернюю цепь, и участок ДНК (вплоть до неправильной пары) вначале удаляется, а затем синтезируется вновь [3].

**Экцизионная репарация оснований (ДНК-гликозилазная система).** Множество модифицированных оснований (например, апуриновые сайты) не вносят значительных искажений в структуру ДНК, поэтому не узнаются системой экцизионной репарации нуклеотидов. Для их удаления нужны более чувствительные репаративные ферменты в частности, такие, как ДНК-гликозилазы. В разработку экцизионной репарации оснований, которая устраняет подавляющее большинство повреждений, внес свой вклад третий нобелевский лауреат – Томас Линдал [3, 6, 7]. Он предсказал существование ДНК-гликозилаз и экспериментально подтвердил, как они работают: обнаруживают аномальное основание и катализируют его отделение от дезоксирибозы путем разрушения гликозидной связи между основанием и сахаром. К настоящему времени описано множество гликозилаз, каждая из которых узнает определенный тип модифицированных оснований: метилированные, окисленные, восстановленные, дезаминированные, связанные с формамидными группировками.

В месте, где соответствующая гликозилаза удаляет основание, образуется брешь (апуриновый сайт, если отсутствует А или G, и апиридиновый сайт, если нет С или Т). Фермент АР-эндонуклеаза опознает наличие бреши и разрезает остов ДНК на 5'-конце от поврежденного основания. Затем ДНК-полимераза-бета с помощью фосфодиэстеразной активности удаляет фосфат на 5'-конце надрезанной нити. Образовавшаяся делеция одного нуклеотида заполняется ДНК-полимеразой бета и связывается ДНК-лигазой.

Помимо исправления подавляющего большинства повреждений экцизионная репарация оснований лежит в основе эпигенетических процессов, т. е. направленной модификации ДНК, которая регулирует активность генов. В раковых клетках некоторые системы репарации выключены, и ингибиторы экцизионной репарации оснований сейчас рассматриваются как новый перспективный способ создания лекарств в онкологии [3, 7].

**O<sup>6</sup>-метилгуанин-ДНК метилтрансфераза (MGMT).** Есть одно наиболее распростра-

ненное и мутагенно опасное повреждение O<sup>6</sup>-метилгуанин, для удаления которого эволюционно сформировался уникальный репаративный фермент O<sup>6</sup>-метилгуанин-ДНК метилтрансфераза. Одна молекула MGMT переносит алкильную группу с гуанина на свой цистеиновый остаток (без разрыва цепи ДНК), а сама при этом инактивируется. Если повреждений слишком много и молекул репаративного фермента не хватает, O<sup>6</sup>-метилгуанин связывается с тиминном вместо цитозина, что приводит в следующем цикле репликации к транзиции – замене пары GC на AT. Американский ученый-химик Энтони Пэг в 1973 г. открыл и изучил механизм действия репаративного фермента MGMT [8], который присутствует у всех изученных про- и эукариот, но отсутствует у растений.

В настоящее время в отделе генетики человека ИМБГ НАН Украины проводятся фундаментальные исследования, основная идея которых состоит в реализации влияния факторов биологической и химической природы на транскрипцию гена *MGMT* и активность кодируемого им репаративного фермента MGMT с целью оптимизировать лечение злокачественных опухолей [9]. Проблема состоит в том, что высокая активность MGMT в раковых клетках человека определяет их устойчивость к алкилирующей химиотерапии. В рамках проекта COMBIOM 7 рамочной программы ЕС нами совместно с отделом биомедицинской химии ИМБГ НАН Украины разработан способ получения и идентификации потенциальных ингибиторов активности MGMT для усиления эффективности действия алкилирующих соединений в опухолевых клетках. В результате получены новые ингибиторы, усиливающие токсическое и мутагенное действие алкилирующих соединений. К сожалению, алкилирующая химиотерапия приводит к повреждению не только раковых, но и нормальных тканей больного, особенно гемопоэтических. Поэтому в нормальных клетках после лечения надо стимулировать репаративные процессы. С этой целью нами изучено и предложено ряд природных соединений (ростовые факторы, цитокины, лектины, гормоны) для модуляции экспрессии репаративного фермента MGMT в клетках человека.

## References

1. Zhimulev I.F. General and molecular genetics. Novosibirsk: Siberian University Press, 2003. 480 p. (Russian).
2. Ivanov V.I., Baryshnikova N.V., Bileva D.S., Dadali E.L., Konstantinova L.M., Kuznetsova O.V., Polyakov A.V. Genetics. M.: Akademkniga, 2006. 638 p. (Russian).

3. Нобелевская премия по химии – 2015. URL: [https://elementy.ru/novosti\\_nauki/432590/Nobelevskaya\\_premiya\\_po\\_khimi\\_2015](https://elementy.ru/novosti_nauki/432590/Nobelevskaya_premiya_po_khimi_2015) (Last accessed: 27.02.2018).
4. Aziz Sancar. Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry*. 1994. Vol. 33. P. 2–9.
5. Paul Modrich. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu. Rev. Genet.* 1991. Vol. 25. P. 229–253.
6. Tomas Lindahl. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 1993. Vol. 362. P. 709–715.
7. Лауреаты Нобелевки по химии открыли путь к лечению рака. URL: <http://www.vesti.ru/doc.html?id=2672759#> (Last accessed: 27.02.2018).
8. Pegg A.E. Multifaceted roles of alkyltransferase and related proteins in DNA repair, DNA damage, resistance to chemotherapy, and research tools. *Chem Res Toxicol.* 2011. Vol. 24. P. 618–639.
9. Lukash L., Boldt J., Pegg A. et al. Effect of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase on the frequency and spectrum of mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the *HPRT* gene of diploid human fibroblasts. *Mutat Res.* 1991. Vol. 250. P. 397–409.

#### **LUKASH L.L.**

*Institute of molecular biology and genetics of NAS of Ukraine,  
Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 150, e-mail: lukash.imbg@gmail.com*

#### **RENEWING DNA INTEGRITY BY CELL REPAIR SYSTEMS**

The four of six main cell repair systems have been reviewed. Some of them have been studied by Nobel laureates of 2015 year in the field of chemistry. The common title of their work is “For investigation of DNA repair mechanisms”. Numerous primer damages of DNA induced by exogenous and endogenous factors are corrected by complex cell systems including repair enzymes and other proteins. Mutational changes in the genes coding the repair enzymes are the most dangerous because they dramatically increase mutation frequency in pro- and eukaryotic cells. But due to the constant and correct action of cell repair enzymes DNA integrity is renewing, that is why the organisms on our planet are still alive and functionally active.

*Keywords:* DNA repair, reparative enzymes, pro- and eukaryotic cells, primer damages, mutations.

#### **ЛУКАШ Л.Л.**

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
Україна, 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 150, e-mail: lukash.imbg@gmail.com*

#### **ВІДНОВЛЕННЯ ЦІЛІСНОСТІ ДНК КЛІТИННИМИ РЕПАРАТИВНИМИ СИСТЕМАМИ**

В огляді розглянуто чотири з шести головних репаративних систем клітини. Деякі з них були досліджені нобелівськими лауреатами 2015 року в галузі хімії. Загальна назва їхньої роботи «За дослідження механізмів репарації ДНК». Багаточисельні первинні пошкодження ДНК, індуковані екзогенними та ендогенними чинниками, виправляються складними клітинними системами, які включають репаративні ферменти та інші білки. Мутаційні зміни в генах, що кодують репаративні ензими, є найнебезпечнішими, оскільки драматично підвищують частоту мутацій у про- та еукаріотичних клітинах. Однак, завдяки постійній і коректній роботі репаративних ферментів, цілісність клітинної ДНК відновлюється, і саме тому організми на нашій планеті все ще живі та функціонально активні.

*Ключові слова:* репарація ДНК, репаративні ензими, про- та еукаріотичні клітини, первинні пошкодження, мутації.