

УДК 663.1

**ХИМИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕПАРАЦИИ ДНК
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ****Лопатина А.Б.***ГОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», Пермь,
e-mail: panachev@pstu.ru*

В данном научном обзоре рассматриваются теоретические химического обеспечения механизмов репарации ДНК микробиологических систем на примере одноклеточных структур – бактерий. Описаны понятия самовосстановления и репарации ДНК за счет функционирования ферментных систем. Описаны механизмы распознавания повреждений, систем узнавания и выявления поврежденных участков и процессы подключения способов устранения поломок. Большое внимание уделяется механизмам повреждения бактерий ультрафиолетом. Однако описывается и механизм восстановления ДНК с помощью солнечного света. Подробно освещены механизмы репарации ДНК, такие как: фотореактивация, мисматч-репарация, эксцизионная репарация нуклеотидов, рекомбинационная репарация, воссоединение негомологичных концов. Все эти механизмы, изучаемые на примере одноклеточных структур, имеют место быть и в структурах многоклеточных, включая и организм человека. Поэтому изучение химического и ферментного обеспечения механизмов репарации ДНК на примере микробиологических систем является важной и актуальной задачей современной химии.

Ключевые слова: ДНК, репарация, фотореактивация, ферменты**CHEMICAL NATURE OF DNA REPAIR MECHANISMS
IN THE MICROBIAL SYSTEMS****Lopatina A.B.***Perm National Research Polytechnic University, Perm, e-mail: panachev@pstu.ru*

This scientific review discusses the theoretical chemical ensure DNA repair mechanisms of microbial systems on an example of single-celled structures – bacteria. Describes the concept of self-healing and DNA repair due to the functioning of enzyme systems. The mechanisms of damage recognition systems, recognition and identification of damaged areas and the process of connecting ways to eliminate breakdowns. Much attention is paid to the mechanisms of damage to the bacteria with ultraviolet light. In this work is described the mechanism of DNA repair by sunlight. Details covered DNA repair mechanisms such as photoreactivation, mismatch repair, nucleotide excision repair, recombination repair, non-homologous end reunion. All these mechanisms, has been studied in single-celled structures are in place to be multicellular structures, including the human body. Therefore, the study of chemical and enzymatic DNA repair mechanisms to ensure the example of microbial systems is an important and urgent task of modern chemistry.

Keywords: DNA, repair, photoreactivation, enzymes

В настоящее время современная наука все больше и больше внимания уделяет нанообъектам, молекулярной биологии и молекулярной химии. Безусловно, что первыми объектами для изучения на молекулярном уровне становятся одноклеточные структуры, такие как бактерии, вирусы. ДНК этих структур, являющихся носителями информации, в первую очередь подвергается расщеплению, попыткам синтеза, подвергается различным облучениям, солнечному, радиоактивному, с целью исследования ответной реакции на воздействие этих факторов. Безусловно, изучение химических реакций на уровне микробиологических структур экстраполируется на попытки понимания течения подобных процессов и реакций в структурах живого человеческого организма, что и делает эти опыты актуальными и важными. Исследование закономерности мутационных процессов на уровне клеток, а затем и организма челове-

ка в целом невозможно без понимания закономерностей происхождения мутаций на уровне одноклеточных субъектов. Попытки изучения ДНК и химических реакций, протекающих в клетках бактерий насчитывают уже десятки лет. Успехи современной химии, биохимии и молекулярной химии являются огромными, но даже при таком прогрессивном изучении молекулярных и субмолекулярных процессов загадки природы, сотворившей и встроившей процессы самовосстановления, саморегуляции и репарации ДНК, превосходят все мыслимые и немыслимые ожидания. 2015 год ознаменовался вручением Нобелевской премии трем ученым за вклад в изучение механизмов репарации ДНК. Целью данной работы является описание теоретических основ химического обеспечения механизмов репарации ДНК микробиологических систем, с экстраполяцией полученных результатов на макроуровень, в том числе на уровень ор-

анизма человека, что делает изучение этой проблемы важной и актуальной задачей.

Исследования ДНК на одноклеточных организмах, бактериях выявили механизм восстановления ДНК бактерий после повреждений, нанесенных ультрафиолетом, при воздействии этого же самого солнечного света. То есть тот фактор, который является повреждающим, является также и восстанавливающим. Это явление было названо фотореактивацией и положило основу для дальнейших исследований механизмов репарации ДНК [9]. Подобные результаты исследований получили и другие ученые – Альберт Кельнер и Нобелевский лауреат, вирусолог [3].

В настоящее время известно несколько разных механизмов репарации ДНК. ДНК всех живых организмов постоянно подвергается воздействию повреждающих факторов: ультрафиолет, радиация, тысячи химически активных веществ в нашей пище, химические соединения, содержащиеся в кофе и кофейных напитках. Но гораздо важнее факторы внутренние, которых мы не можем избежать в принципе. Главных таких факторов три. Во-первых, весь наш обмен веществ основан на кислородном дыхании. Митохондрии – клеточные органеллы, в которых кислород используется для производства АТФ, «энергетической валюты» наших клеток, – работают не с абсолютной эффективностью, и промежуточные активные формы кислорода утекают из них и способны повреждать ДНК. Во-вторых, как известно, мы в среднем на 60% состоим из воды, которая, в общем, тоже очень активное соединение и постоянно гидролизует ДНК. Наконец, еще одним важным источником повреждений в ДНК служат ошибки ферментов, которые ее копируют, – ДНК-полимераз; количество неверно включенных нуклеотидов составляет около 300 000 на каждое клеточное деление.

Фотореактивация – один из частных примеров механизма реактивации, или прямого восстановления, при котором поврежденное звено ДНК превращается в нормальное без каких-то промежуточных шагов. В случае фотореактивации происходит вот что. Под влиянием ультрафиолетового света соседние основания тимина в ДНК могут сшиваться друг с другом и образовывать так называемые циклобутановые пиримидиновые димеры, которые очень сильно искажают структуру ДНК и не дают возможности ДНК-полимеразам копировать поврежденный участок. Бактерии же содер-

жат фермент фотолиазу, который использует энергию видимого света для того, чтобы расщепить связи между основаниями в димере, превращая его опять в два тимина.

Фотолиазу открыл в конце 1950-х годов Стэн Руперт (Stan Rupert) [7], с которым когда-то работал нынешний нобелевский лауреат Азиз Санджар, который впервые клонировал фотолиазу, то есть выделил кодирующий ее ген, а потом произвел генно-инженерный белок. Тем самым Санджар сумел произвести изучаемый белок в нужных для исследования количествах, поскольку природной фотолиазы в бактериях очень мало. Фотолиаза – это пример сложной химической системы, осуществляющей фотокатализ: путь энергии, принесенной фотоном, поглощенным 5,10-метенилтетрагидроптероилполиглутаматом – хромофором в составе белка – через второй хромофор (флавинадениндинуклеотид) к циклобутановому пиримидиновому димеру сейчас прослежен вплоть до квантовомеханического описания. Помимо этого Санджар изучал и явление «темновой репарации». Бактерии, облученные ультрафиолетом, способны исправлять внесенные повреждения не только на свету – просто для этого нужно гораздо больше времени. Фотолиаза помогает темновой репарации, но без нее вполне можно обойтись, так как в эту работу включаются другие ферменты.

К тому времени было известно, что в темноте тиминового димеры постепенно исчезают из ДНК (это открытие сделал в начале 1960-х годов Ричард Сетлоу (Richard B. Setlow) [2, 10]. После облучения ультрафиолетом в клетках начинается синтез ДНК (автор этого открытия Филип Ханаволт (Philip Hanawalt)). Были известны три гена, которые отвечали за темновую репарацию, их назвали *uvrA*, *uvrB* и *uvrC* (*uvr* – от английского «UV-resistant», устойчивый к ультрафиолету), но оставалось совершенно непонятно, как же всё это в клетке происходит. Опять же, в основном проблемы были в том, что белков этих в клетке очень мало, и исследовать их из-за этого очень трудно.

Санджар изобрел метод бактериальных «макси-клеток», который позволял получать огромный избыток нужного продукта при минимальном загрязнении другими клеточными белками. На рубеже 1970–80-х годов им пользовались десятки лабораторий для идентификации самых разных белков, а сам изобретатель с его помощью быстро охарактеризовал белковые продукты генов *uvrA*, *uvrB* и *uvrC* и показал, что они

образуют комплекс, который назвали эксци- нуклеазой (Excinuclease) – он был способен вырезать (англ. excise) кусок ДНК размером 13 пар нуклеотидов вокруг тиминового димера. От этого весь механизм получил название эксцизионной репарации нуклеотидов (Nucleotide excision repair). Дальнейшие исследования позволили установить, что после вырезания фрагмента, содержащего повреждение, ДНК-полимераза синтезирует нормальный участок цепи ДНК и процесс репарации завершается ферментом ДНК-лигазой, которая восстанавливает целостность остова ДНК.

Эксцизионная репарация нуклеотидов для жизни в целом гораздо важнее, чем фотореактивация. Например, у человека фототелиаза нет – из всех млекопитающих ее сохранили только сумчатые, а у остальных сохранились гомологи фототелиазы, криптохромы, отвечающие за суточные. Поэтому вся репарация вызванных ультрафиолетовым светом повреждений у нас опирается исключительно на эксцизионную репарацию нуклеотидов. Белки этой системы в организме человека не похожи на бактериальные, но принцип работы тот же – вырезать отрезок ДНК и заменить его новым. Дефекты эксцизионной репарации нуклеотидов вызывают тяжелейшее наследственное заболевание – пигментную ксеродерму, при которой малейшее пребывание на солнце приводит к ожогам, и за несколько лет жизни развивается рак кожи. Для этого заболевания очень характерен рак кончика языка – человек на свету облизывает пересохшие губы, и этих нескольких секунд облучения достаточно, чтобы в ДНК возникло столько повреждений, что они в отсутствие репарации вызывают мутации и рак. Еще более важно то, что фотореактивация – процесс, специфичный только для тиминовых димеров, другие повреждения ею не исправляются, а вот эксцизионная репарация нуклеотидов универсальна и помогает бороться с огромным числом самых разнообразных повреждений ДНК, например, с теми, что вызываются канцерогенами в табачном дыме.

Эксцизионная репарация нуклеотидов исправляет до 10% всех повреждений, возникающих в ДНК человека. При ее некомпетентности или недостаточности подключаются другие механизмы восстановления ДНК, такие как мисматч-репарация (DNA mismatch repair, от английского слова mismatch – неправильная, неподходящая пара, мезальянс). Аналогом этого названия

является термин «репарация гетеродуплексов», «репарация неканонических пар оснований». Это система, которая исправляет ошибки ДНК-полимераза, если те включают в ДНК при синтезе не те нуклеотиды, что нужно, – образуют не пары А:Т и Г:С, а что-то другое, например Г:Т. Такое случается редко, но всё же случается, потому что ни один фермент не работает со стопроцентной точностью. Системой распознавания неправильно включенного нуклеотида являются другие ферменты. Помимо этого, важно понимать, что могут быть не поврежденные, а нормальные нуклеотиды, просто не подходящие друг другу по паре оснований. И для этого в организме также существуют специфические ферменты.

Многие бактерии маркируют материнскую цепь при помощи метильных групп, которые специальный фермент, ДНК-метилаза Dam, вводит в основания аденина, находящиеся в последовательностях -GATC-. Таким образом, сразу после синтеза ДНК эта последовательность на протяжении нескольких минут остается полуметилированной – то есть несет метильные группы в материнской цепи и не содержит их во вновь синтезированной дочерней цепи. Этого времени системе мисматч-репарации достаточно для того, чтобы работать. В организме человека механизм, различающий материнскую и дочернюю цепь, другой и более сложный, основанный на асимметричном связывании некоторых белков при репликации, – но он всё равно существует, мисматч-репарация без такого механизма работать не может.

После маркировки цепей метильными группами образуются дуплексы между цепочками ДНК бактериофагов, отличающихся на один нуклеотид. Это позволило изучать дальнейшие процессы в неправильных парах нуклеотидов и с изолированными белками системы репарации, и в клетках бактерий. Сразу после репликации с полуметилированными последовательностями -GATC- связывается белок MutH. Одновременно с неправильной парой нуклеотидов связываются две молекулы белка MutS. Две молекулы белка оказались очень похожими на сложенные в молитве ладони, между которыми зажата ДНК. Когда расстояние между MutH и димером MutS позволяет им взаимодействовать (в чем им помогает третий член системы, MutL), белок MutH превращается в эндонуклеазу, которая расщепляет неметилированную цепь в последовательности -GATC-. Начиная с этого разрыва, до-

черная цепь ДНК затем удаляется в направлении связанного белка MutS. Достигнув неправильной пары оснований, разрушение ДНК останавливается, после чего недостающий участок ДНК вновь синтезируется.

Полом Модричем были открыты основные принципы мисматч-репарации и у бактерий, и у человека [6]. Система мисматч-репарации в организме человека очень похожа на бактериальную, за исключением принципа определения материнской и дочерней цепи. Мутации в генах, ответственных за мисматч-репарацию, приводят к развитию наследственного рака кишечника и служат самой распространенной причиной этого заболевания.

Самой важной системой репарации является эксцизионная репарация оснований. Она устраняет подавляющее большинство всех повреждений. К ним относятся как раз те, которые неизбежно возникают в ДНК под действием воды и кислорода, но и многие другие повреждения тоже ею исправляются. Если поломки в других системах репарации вызывают тяжелые заболевания, неисправность эксцизионной репарации оснований у человека, за редкими исключениями, в заболеваниях не проявляется – эмбрионы гибнут на самых ранних стадиях.

Открытие эксцизионной репарации оснований Томас Линдаль [4, 5] связывает с исследованиями химической реактивности ДНК, к чему его вдохновила знаменитая «Белая книга» – переведенная на английский язык монография «Органическая химия нуклеиновых кислот» академика Н. К. Кочеткова с соавторами [1]. Ранние представления о ДНК, как химически устойчивой молекуле, которая лишь изредка повреждается под влиянием ультрафиолета, радиации или химических мутагенов, в корне неверно – ДНК в водной среде повреждается постоянно. Выбрав две простых и легко идущих химических реакции – превращение цитозина в урацил (который в норме встречается в РНК, но не в ДНК) и апуринизацию (отщепление от ДНК аденина или гуанина), – Линдаль быстро показал, что они протекают и в изолированной ДНК, и в живой клетке. Более того, получив ДНК, в которой часть цитозина была заменена на урацил, он обнаружил и фермент, который удалял урацил в виде свободного основания – урацил-ДНК-гликозилазу (Uracil DNA glycosylases) – и открыл новый вид репарации.

По пути эксцизионной репарации оснований происходит репарация небольших

поврежденных оснований и апуринизированных нуклеотидов, которые не вносят значительных искажений в структуру ДНК и поэтому не узнаются системой эксцизионной репарации нуклеотидов. Сначала поврежденное основание узнается одним из ферментов, относящимся к классу ДНК-гликозилаз (DNA glycosylase), которые выщепляют его из ДНК. ДНК-гликозилазы обладают групповой специфичностью – некоторые удаляют из ДНК только окисленные пуриновые основания, другие – окисленные пиримидины, третьи – алкилированные основания, четвертые – урацил и т. п. После этого фермент АП-эндонуклеаза разрывает ДНК рядом с повреждением, ДНК-полимераза встраивает один (так называемая «короткозаплаточная репарация») или несколько нуклеотидов («длиннозаплаточная репарация»), и репарация завершается ДНК-лигазой. В процессе эксцизионной репарации оснований участвуют еще несколько белков, но они играют вспомогательную роль.

Эксцизионная репарация оснований используется не только для восстановления ДНК, но и в других процессах. Например, ту же урацил-ДНК-гликозилазу клетки человека используют для борьбы с вирусами, в частности с ВИЧ. Существует специальный фермент АРОВЕС [8], который в вирусной ДНК массово превращает цитозин в урацил, а урацил-ДНК-гликозилаза потом такую ДНК расщепляет. Иммунный ответ также требует участия урацил-ДНК-гликозилазы, которая в этом случае отвечает за генерацию разнообразия антител. Эксцизионная репарация оснований лежит в основе эпигенетических процессов – направленной модификации ДНК, которая регулирует активность генов. В раковых клетках некоторые пути репарации выключены, и ингибиторы оставшихся путей, главным образом эксцизионной репарации оснований, сейчас рассматриваются как новые многообещающие лекарства в онкологии.

В России основные исследования репарации ДНК ведутся в нескольких лабораториях Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН в Новосибирске; есть группы, работающие в этом направлении в МГУ, Институте молекулярной генетики РАН, Институте цитологии РАН в Санкт-Петербурге, Петербургском институте ядерной физики.

Помимо описанных способов репарации ДНК, существуют и уже описанные механизмы ее восстановления, такие как

рекомбинационная репарация (Homologous recombination), когда для восстановления правильной последовательности ДНК используется ее копия с другой хромосомы, и воссоединение негомологичных концов (Microhomology-mediated end joining), когда часть ДНК теряется, но это часто неважно, потому что она приходится на некодирующие области. Оба этих вида репарации используются, когда нужно исправить двуцепочечный разрыв ДНК. Есть системы толерантности к повреждению (Translesion synthesis), когда клетка может функционировать и даже делиться, несмотря на то, что с ее геномом не всё в порядке. Есть клеточные системы ответа на повреждение (DNA damage response), которые определяют, как клетке вести себя и функционировать в случае повреждения ее ДНК: делиться, остановить деление и попытаться отрепарировать повреждение, погибнуть или использовать еще какой-нибудь, неизвестный в настоящее время механизм саморегуляции. За исследование последней системы в 2015 году Стефан Элледж (Stephen Elledge) и Эвелин Виткин (Evelyn M. Witkin) получили Ласкеровскую премию (Lasker Award). Эвелин Виткин открыла первую систему координированного клеточного ответа на повреждение ДНК – SOS-ответ.

Таким образом, все химические реакции, происходящие на уровне ДНК бактерии, свойственны и клеткам человеческо-

го организма, за малым исключением или с некоторыми вариациями. Однако голографичность энзимных механизмов и репаративных процессов ДНК бактерии в общем и целом схожи с химическими процессами, протекающими в клетках макроорганизма, что делает задачу изучения химических процессов репарации ДНК микросистем еще более актуальной.

Список литературы

1. Кочетков Н.К., Будовский Э.И., Свердлов Е.Д., Симукова Н.А., Турчинский М.Ф., Шибяев В.Н. Органическая химия нуклеиновых кислот. – М., Химия, 1970. – 718 с.
2. Сетлоу Р., Поллард Э. Молекулярная биофизика. – М.: Мир, 1964. – 440 с.
3. Dulbecco R., and Freeman, G., *Virology*, 8, 396 (1959).
4. Lindahl T. New class of enzymes acting on damaged DNA // *Nature*. – 1976. – V. 259. – P. 64–66.
5. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature*. – 1993. – V. 362. P. 709–715.
6. Modrich P. Methyl-directed repair of DNA base pair mismatches in vitro // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 1983. – V. 80. – P. 4639–4643.
7. Paul Modrich P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair // *Annu. Rev. Genet.* – 1991. – V. 25. – P. 229–253.
8. Rupert C.S., Goodgal Sol H., and Herriott, Roger M., 1958, Photoreactivation in vitro of Ultraviolet Inactivated *Hemophilus influenzae* Transforming Factor, *Journal of General Physiology*, 41: 451–471.
9. Sancar A. A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region // *Cell*. – 1983. – V. 33. – P. 249–260.
10. Sancar A. Structure and function of DNA photolyase // *Biochemistry*. – 1994. – V. 33. – P. 2–22.
11. Setlow, Richard B., 1997, DNA Damage and Repair: A Photobiological Odyssey, *Photochemistry and Photobiology*, 65S: 119S-122S.