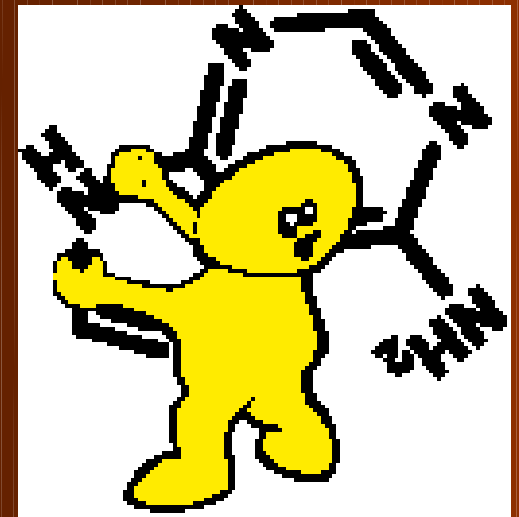
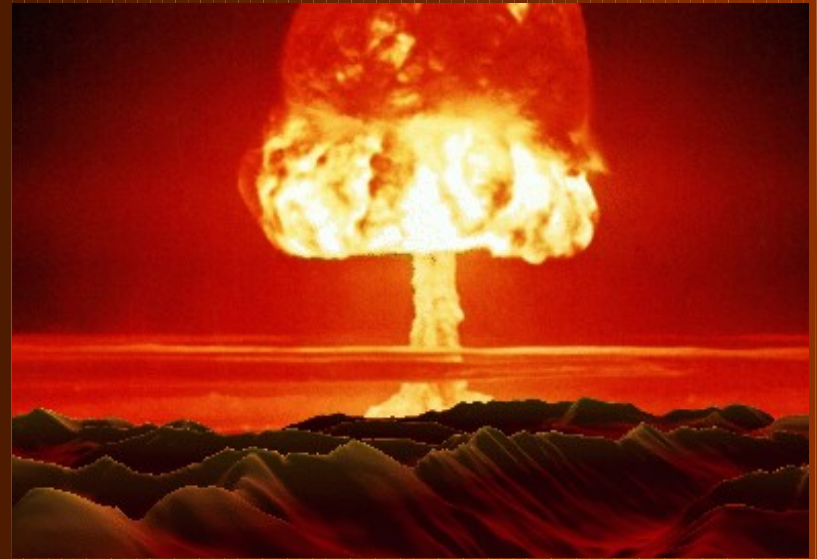
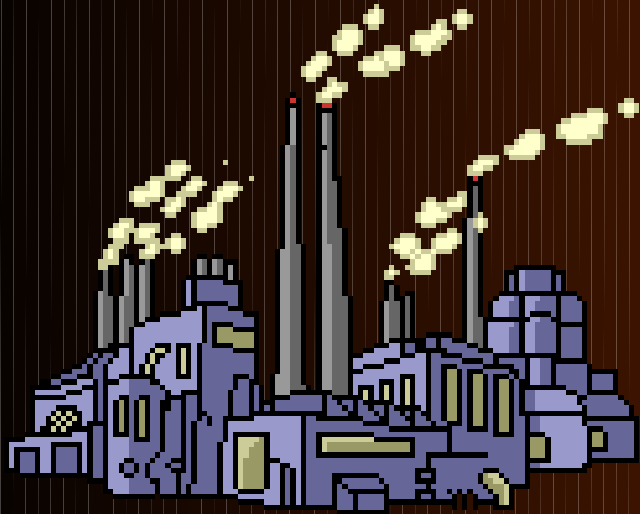


Генетический контроль мутационного процесса

- Первичная структура ДНК является динамичной и подвергается постоянным изменениям.



- Многие из этих изменений возникают в результате ошибок репликации, рекомбинации и репарации.
- Другие изменения являются результатом природной нестабильности специфических химических связей, проявляющейся при нормальных физиологических условиях.



- ДНК в живых клетках взаимодействует со множеством химических соединений и некоторыми физическими агентами, многие из которых присутствуют в окружающей среде.



- Все эти *изменения в молекулярной структуре* генетического материала являются *повреждениями ДНК*.
- Эндогенные ДНК-повреждающие агенты повреждают ДНК с помощью тех же самых химических механизмов, что и ДНК-повреждающие агенты окружающей среды
- Повреждения ДНК приводят к двум главным следствиям: **возникновению мутаций и гибели клеток**.
- Повреждение ДНК – это неотъемлемый аспект жизни в биосфере.

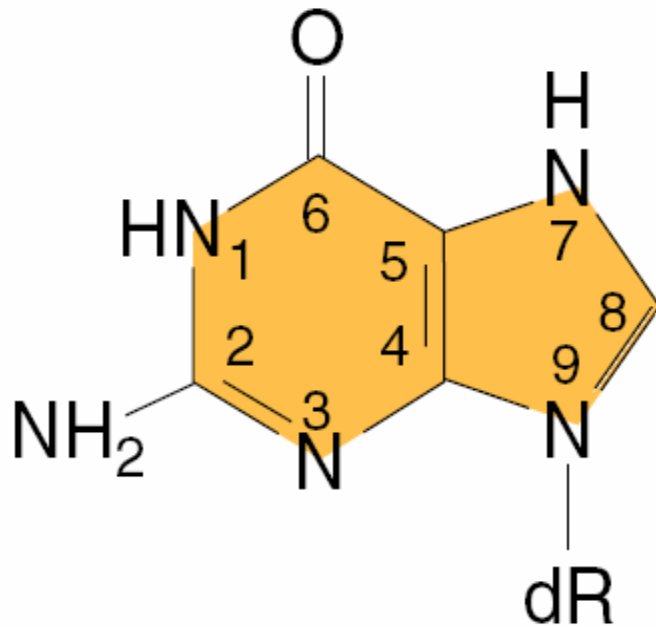
- Повреждения ДНК можно разделить на два класса – спонтанные и индуцированные (обусловленные воздействием внешней среды).

Основные повреждения ДНК

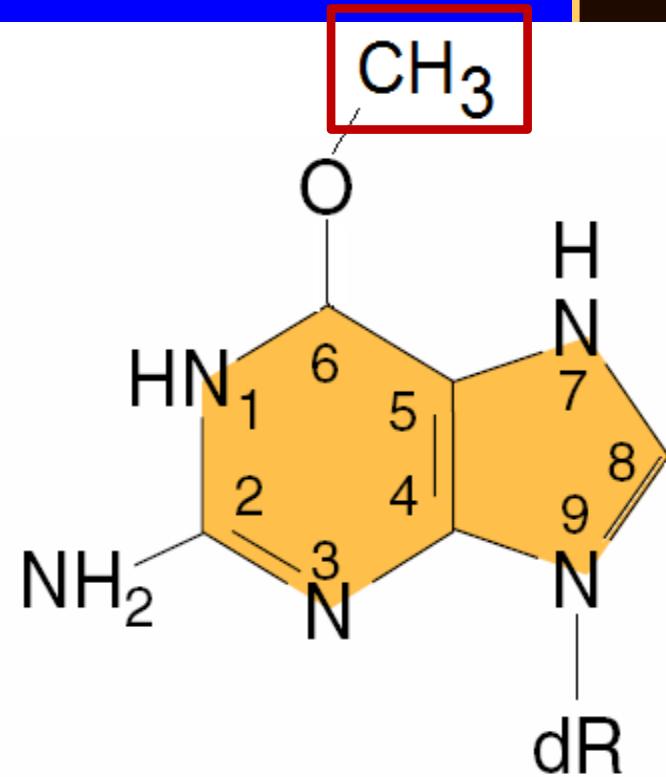


Основные повреждения ДНК

 **CH₃** алкилирование



Гуанин



O⁶-метилгуанин

Основные повреждения ДНК



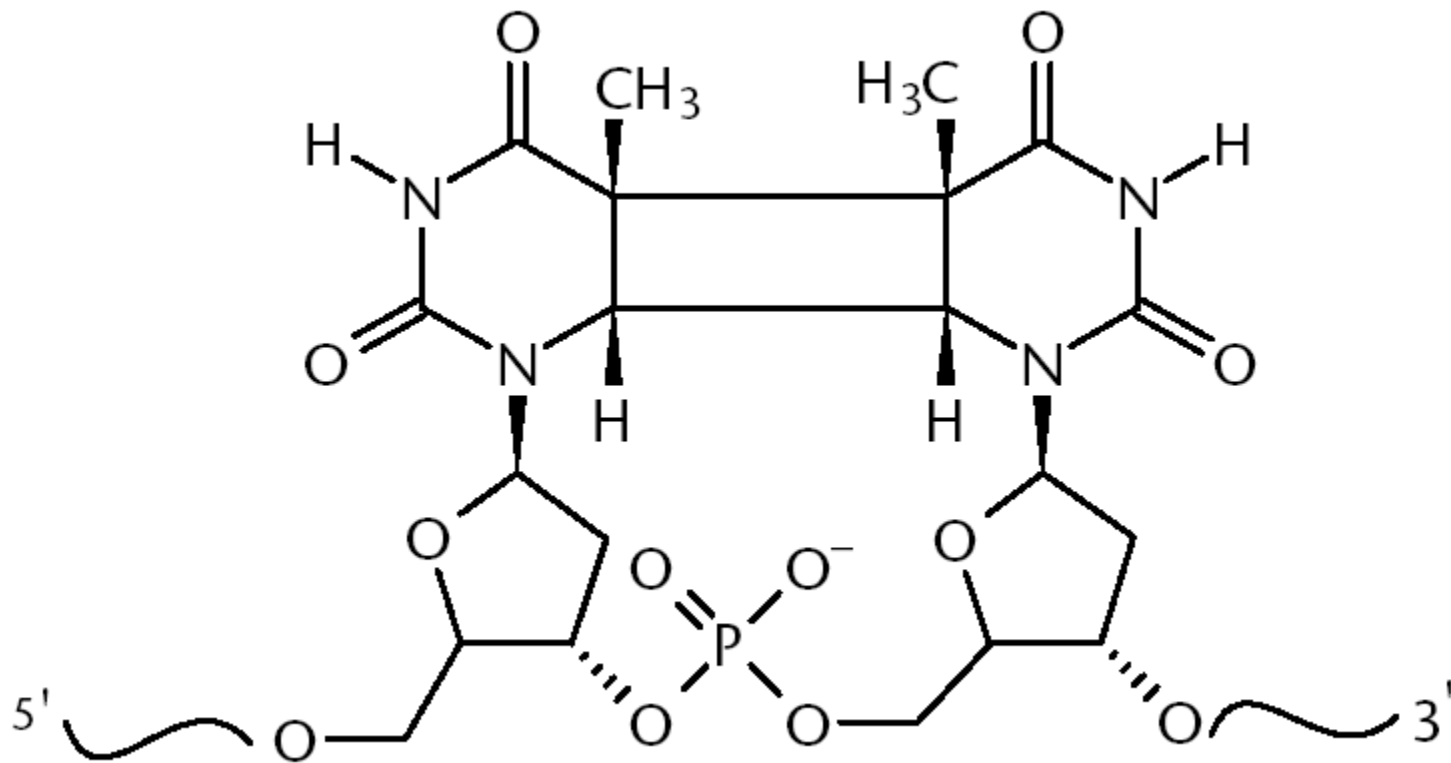
Основные повреждения ДНК



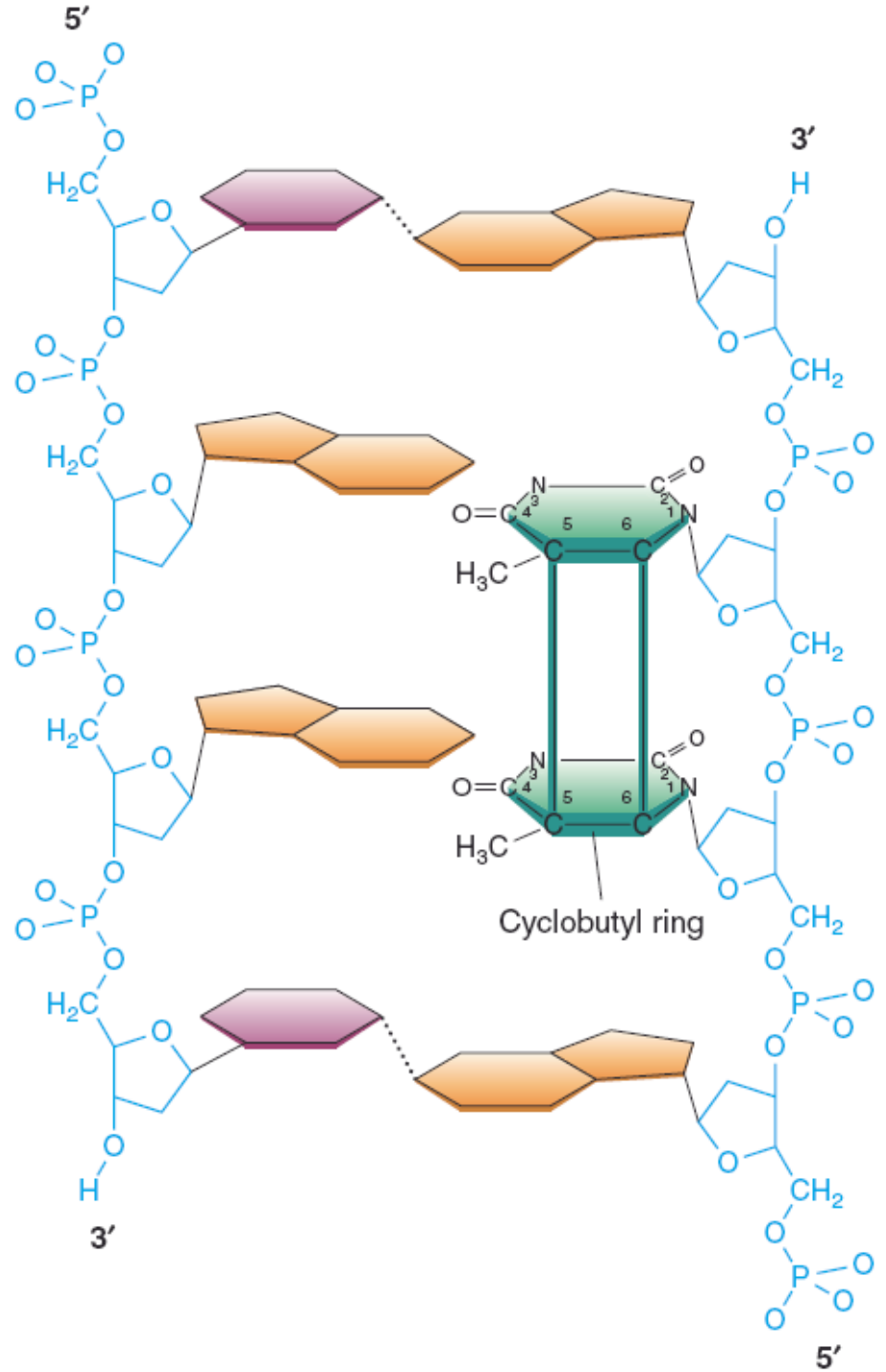
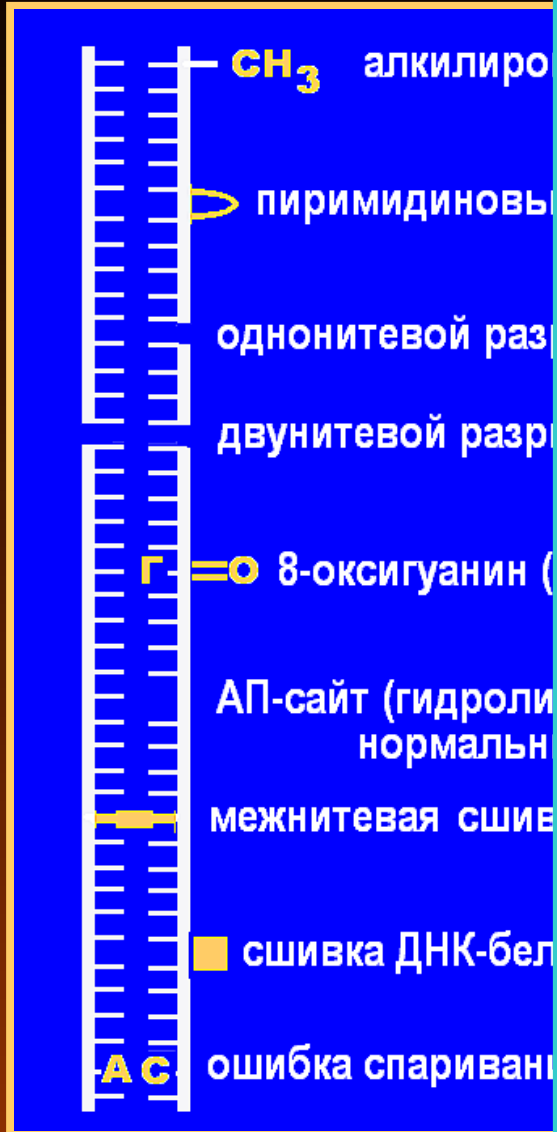
CH₃ алкилирование



пиримидиновый димер (УФ-лучи)

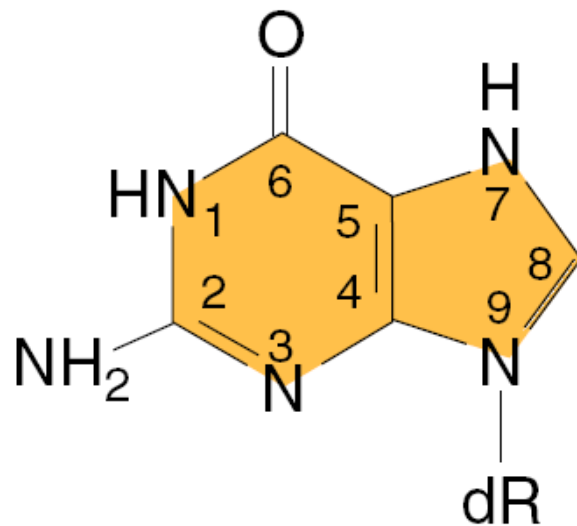


Основные п

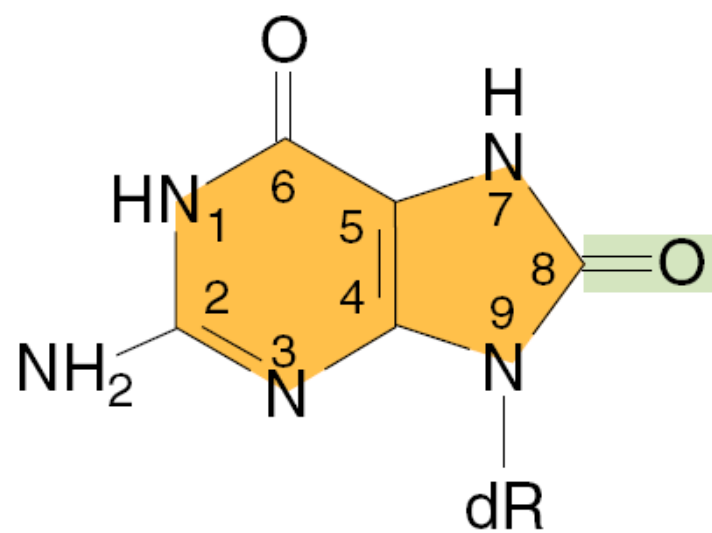


Основные повреждения ДНК





Гуанин



8-оксигуанин

G-C 8-оксигуанин (активные формы кислорода)

АП-сайт (гидролиз N-гликозидной связи при нормальных физиологических условиях)

межнитевая сшивка (митомицин С, азотистый иприт)

сшивка ДНК-белок (ионизирующая радиация)

AC ошибка спаривания

Основные повреждения ДНК



- Повреждение ДНК – это не мутация.
- Большая часть повреждений ДНК восстанавливается репаративными системами.

- Мутация – это наследственное изменение в нуклеотидной последовательности генома организма.

Точковые мутации – изменения, включающие одну пару нуклеотидов

А Т Г Г С Т
Т А С С Г А

Дикий тип

А Т А Г С Т
Т А Т С Г А

А Т С Г С Т
Т А Г С Г А

Замена пары нуклеотидов

▼
А Т Г С Т
Т А С Г А

Выпадение (делеция) пары нуклеотидов

▼
А Т А Г Г С Т
Т А Т С С Г А

Вставка пары нуклеотидов

Замены оснований: транзиции и трансверсии



Транзиция – замена одного основания на другое основание той же химической категории:

(пурин заменяется пурином:

$A \rightarrow G$ или $G \rightarrow A$;

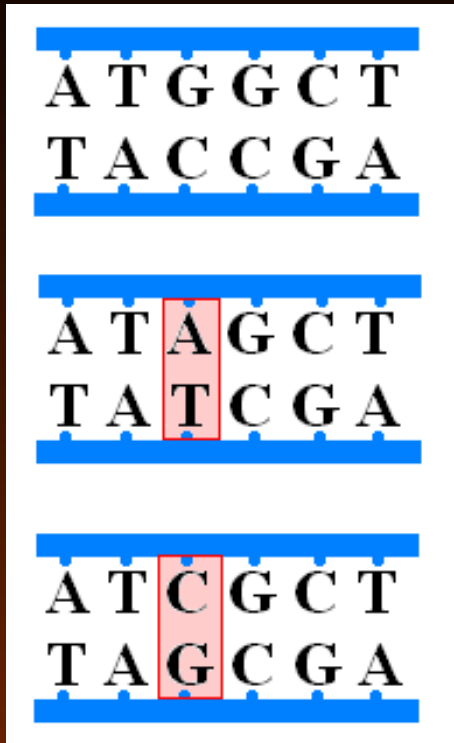
пиримидин заменяется пиримидином:

$C \rightarrow T$ или $T \rightarrow C$)

На уровне двунитевой ДНК эти замены выглядят так:

$AT \leftrightarrow GC$ или $TA \leftrightarrow CG$

Замены оснований: транзиции и трансверсии



Трансверсия – замена основания одной химической категории на основание другой химической категории:

(пурин заменяется пиримидином:

$C \rightarrow A$, $C \rightarrow G$, $T \rightarrow A$, $T \rightarrow G$;

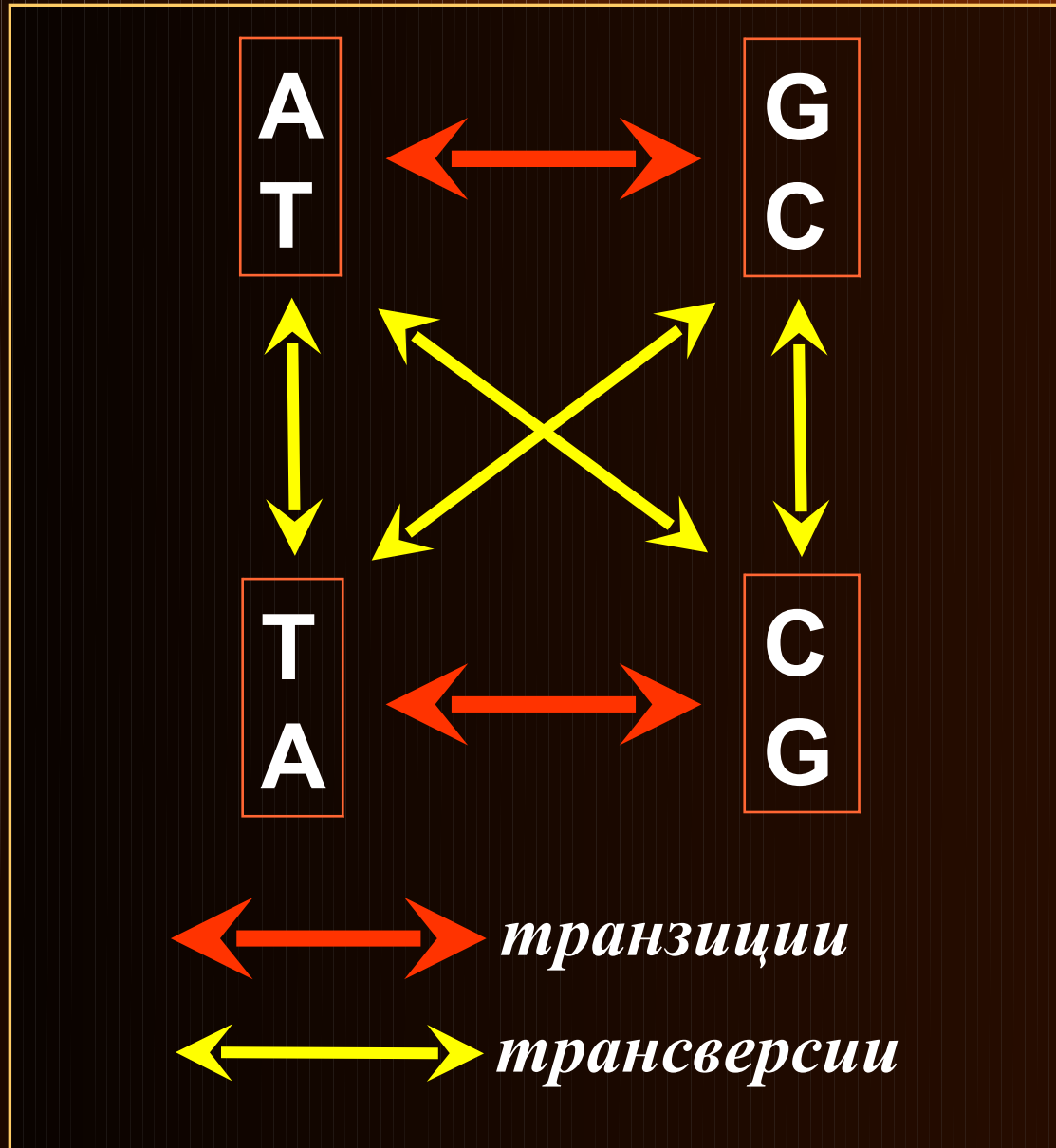
пиримидин заменяется пурином:

$A \rightarrow C$, $A \rightarrow T$, $G \rightarrow C$, $G \rightarrow T$)

На уровне двунитевой ДНК эти замены выглядят так:

$AT \leftrightarrow TA$, $GC \leftrightarrow CG$, $TA \leftrightarrow GC$,
 $AT \leftrightarrow CG$

Классификация замен пар оснований



Генетический код

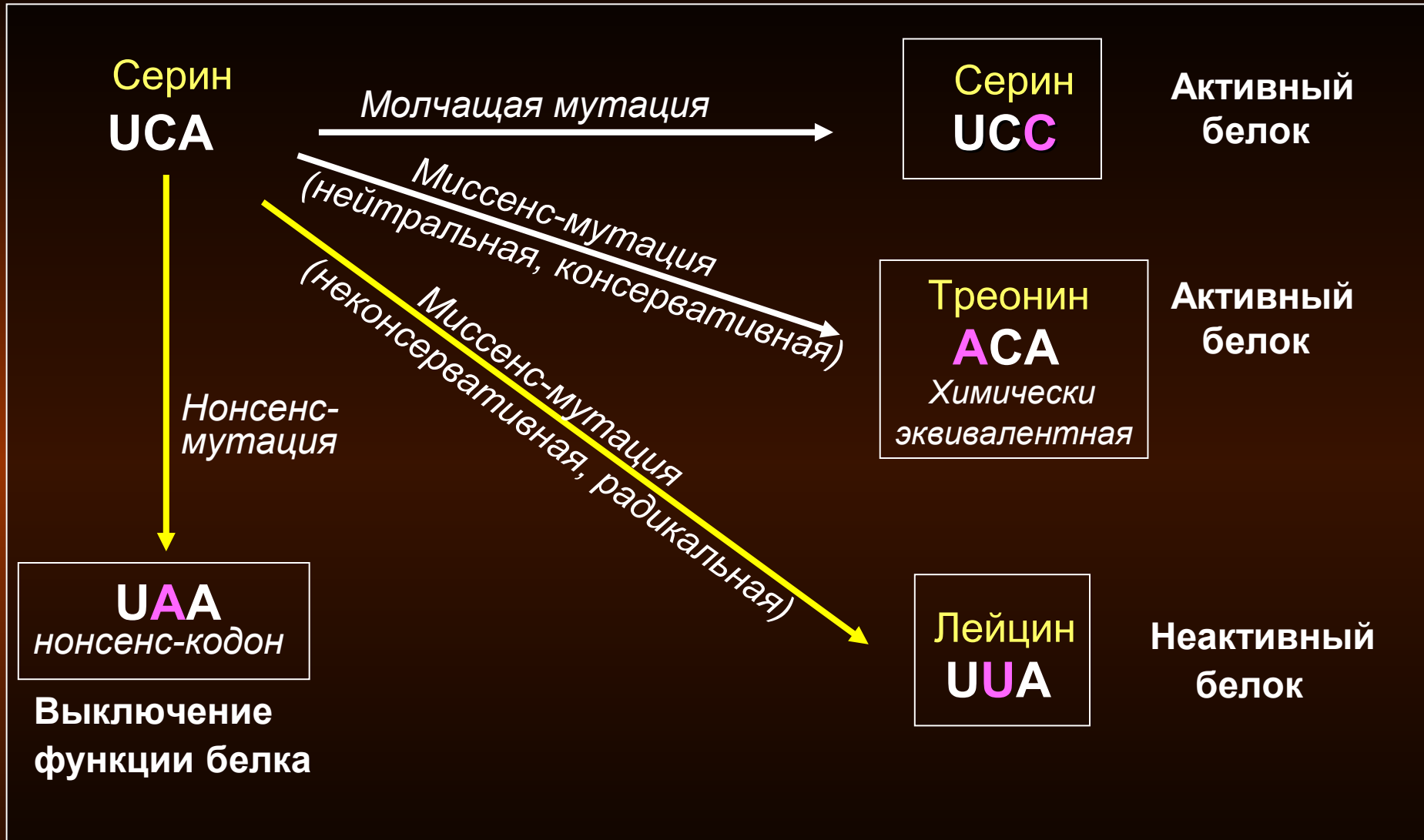
		Вторая буква				
		U	C	A	G	
Первая буква	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG } Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG } Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

Генетический код – способ кодирования аминокислотной последовательности белков при помощи последовательности нуклеотидов.

Свойства генетического кода

- 1. Триплетность** – значащей единицей кода является сочетание трёх нуклеотидов (триплет, или кодон).
- 2. Непрерывность** – между триплетами нет знаков препинания, то есть информация считывается непрерывно.
- 3. Неперекрываемость** – один и тот же нуклеотид не может входить одновременно в состав двух или более триплетов.
- 4. Однозначность** – определённый кодон соответствует только одной аминокислоте.
- 5. Вырожденность** – одной и той же аминокислоте может соответствовать несколько кодонов.
- 6. Универсальность.**

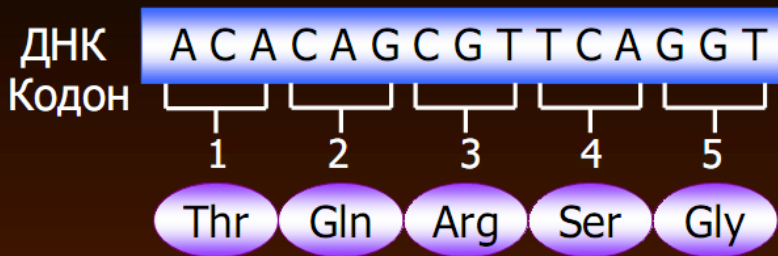
Точковые мутации на молекулярном уровне



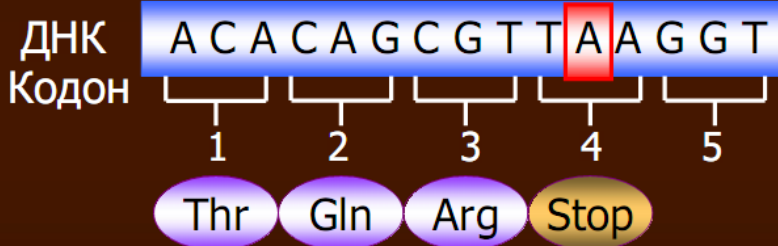
Миссенс-мутация – изменение смысла кодона, приводящее к замене аминокислоты.

Нонсенс-мутация – образование бессмысленного кодона, приводящее к преждевременной терминации трансляции.

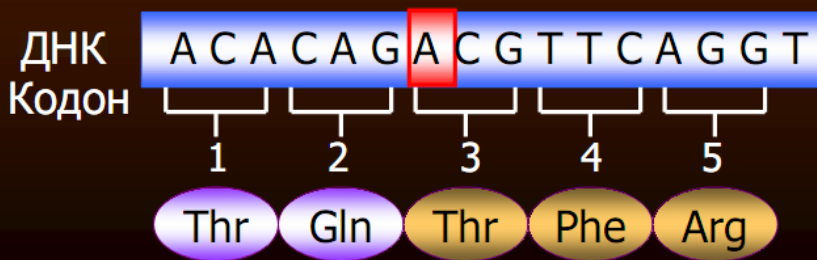
Точковые мутации на молекулярном уровне



Дикий тип



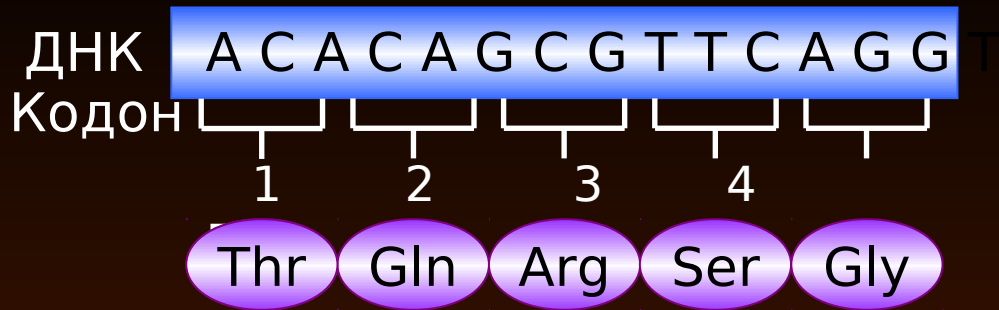
Нонсенс-мутация



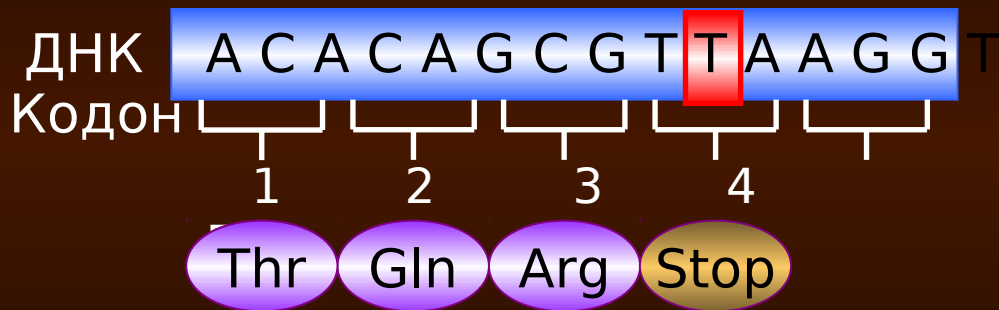
Мутация со сдвигом
рамки считывания
(frameshift)

Мутация со сдвигом рамки считывания – мутация, связанная со вставкой или выпадением одного или нескольких нуклеотидов (не кратным трем). В результате, начиная с данного места триплетный код нарушается и из-за неправильного считывания мРНК синтезируется совершенно другой белок.

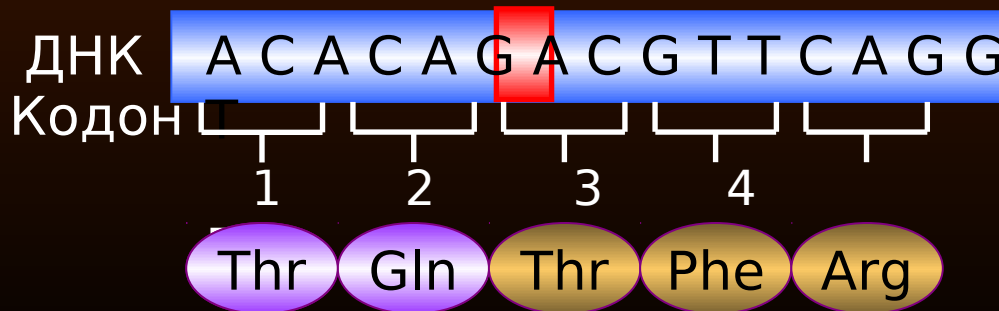
Точковые мутации на молекулярном уровне



Дикий тип



Нонсенс-мутация



Мутация со сдвигом
рамки считывания
(frameshift)

Индукцированный мутагенез

Химические мутагены:

Аналоги оснований.

Интеркалирующие агенты.

Алкилирующие агенты.

Соединения, реагирующие с ДНК непосредственно или после метаболических превращений.

Физические мутагены:

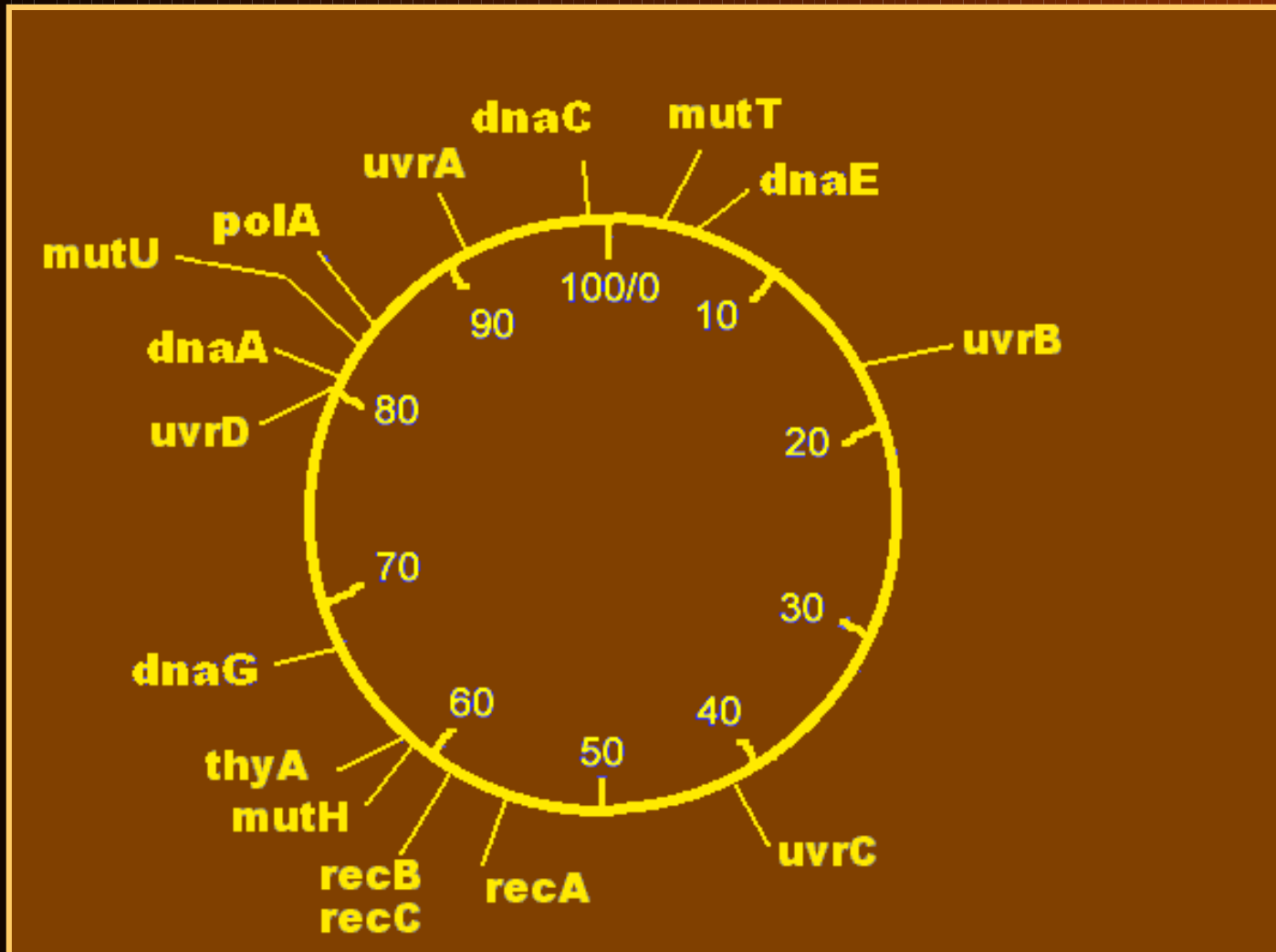
Ионизирующее излучение.

УФ-излучение.

Спонтанный мутагенез

Спонтанные мутации возникают в естественных условиях в результате нормальных клеточных процессов или при взаимодействии клеток с окружающей средой.

Локализация генов-мутаторов у *E.coli*



Эти гены контролируют синтез предшественников ДНК, синтез самой ДНК или процессы репарации

Темпы спонтанного мутирования

Организм	Частота возникновения мутаций	
	На 1 п.н. на репликацию	На геном на репликацию
Бактериофаги	$(2-70) \cdot 10^{-8}$	$\sim 4 \cdot 10^{-3}$
<i>Escherichia coli</i>	$5 \cdot 10^{-10}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$2 \cdot 10^{-10}$	$2,7 \cdot 10^{-3}$
<i>Drosophila melanogaster</i>	$3 \cdot 10^{-10}$	$6 \cdot 10^{-2}$
<i>Mus musculus</i>	$2 \cdot 10^{-10}$	$5 \cdot 10^{-1}$
<i>Homo sapiens</i>	$5 \cdot 10^{-11}$	$2 \cdot 10^{-1}$

Темп спонтанного мутирования

May be I am wrong
 equals to one m...
 million. Human...
 divided by 3×10^8
 generation

Y-rated

Curr. Biol. doi:10.1016/j.cub.2009.07.032 (2009)
 DNA sequencing of the human
 Y chromosome suggests that humans carry

family members. Twelve mutations were confirmed in
 ~10.15 Mb; eight of these had occurred in vitro and four
 in vivo. The latter could be placed in different positions on
 the pedigree and led to a mutation-rate measurement of
 3.0×10^{-8} mutations/nucleotide/generation (95% CI: 8.9×10^{-9} – 7.0×10^{-8}), consistent with estimates of 2.3×10^{-8} – 6.3×10^{-8} mutations/nucleotide/generation for the same Y-chromosomal region from published human-chimpanzee comparisons [5] depending on the generation and split times assumed.

cropped up during that time. Extrapolating out to the 6-billion-odd base pairs of the complete human genome, that translates to roughly one mutation per 30 million base pairs per generation on average.

For a longer story on this research, see <http://tinyurl.com/nv9u59>

Бактерии

Escherichia coli

Saccharomyces cerevisiae

Drosophila melanogaster

Drosophila melanogaster

Mus musculus

Homo sapiens

nucleotide

airs, not 30

только одной

n one

DM

ЦИЮ

)⁻³

)⁻³

$2,7 \cdot 10^{-3}$

$6 \cdot 10^{-2}$

$5 \cdot 10^{-1}$

$2 \cdot 10^{-1}$

$5 \cdot 10^{-11}$

Частоты некоторых мутаций, вызывающих значительное изменение фенотипа

Организм	Частота мутаций на гамету на одну генерацию
<u><i>Escherichia coli</i></u> Устойчивость к стрептомицину	10^{-9} *
<u><i>Drosophila melanogaster</i></u> Коричневые глаза	$3 \cdot 10^{-5}$
<u><i>Homo sapiens</i></u> Ахондроплазия Ретинобластома Мышечная дистрофия	$\sim 1 \cdot 10^{-5}$

* на клетку на одну генерацию

Спонтанный мутагенез

Уровень спонтанного мутагенеза специфичен для каждого вида и контролируется на генетическом уровне.

Уровень спонтанного мутагенеза является результатом баланса между возникновением и исправлением ошибок.



Наша планета
существует $\sim 10^{17}$ с.

Геном человека содержит
 3×10^9 пар нуклеотидов.

Организм человека состоит
из 10^{14} клеток.

Ко взрослому возрасту в
клетках организма человека
накапливается 10^{15} мутаций.

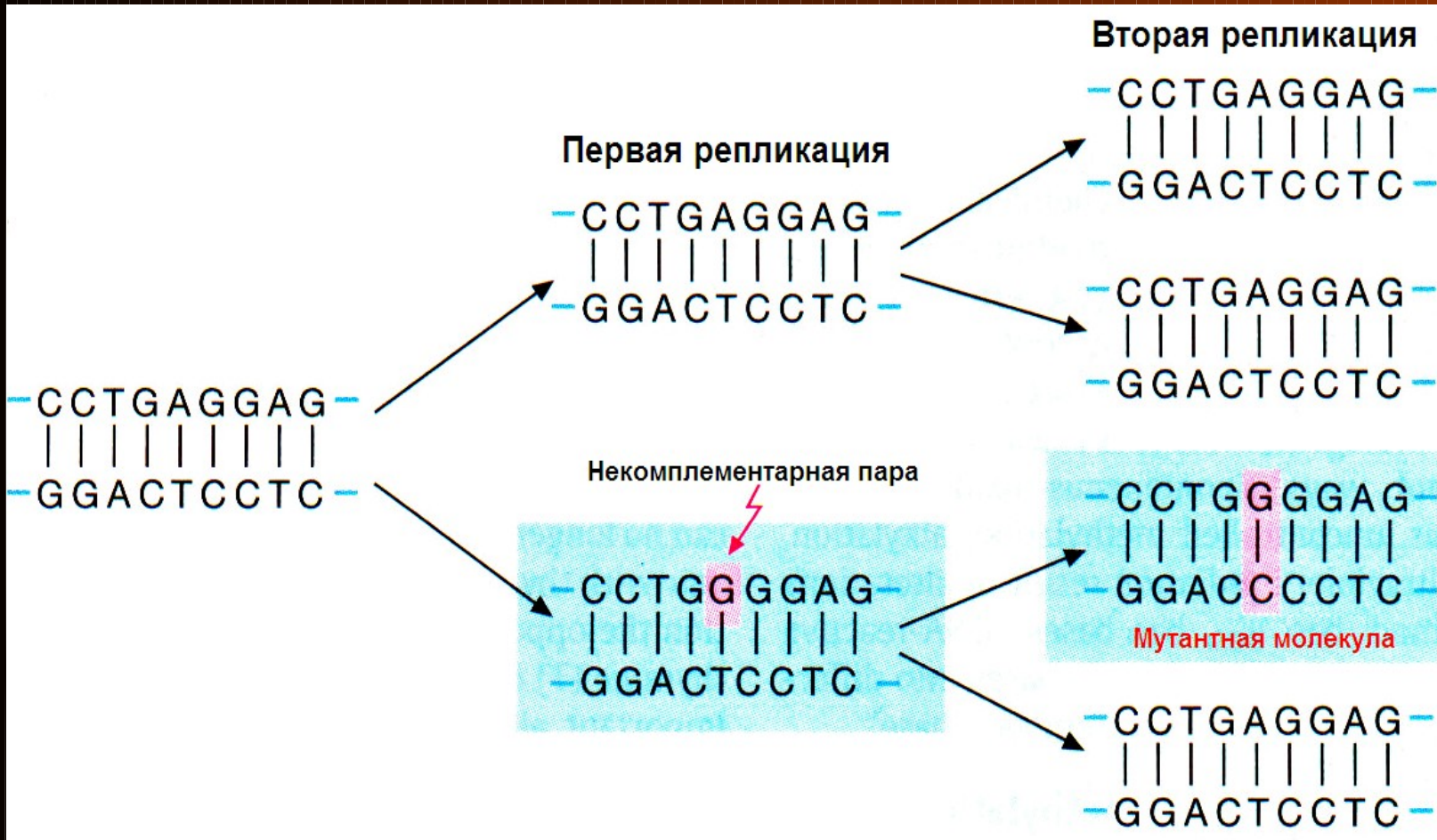
Продолжительность жизни
человека $\sim 2 \times 10^9$ с.

Причины возникновения спонтанных мутаций

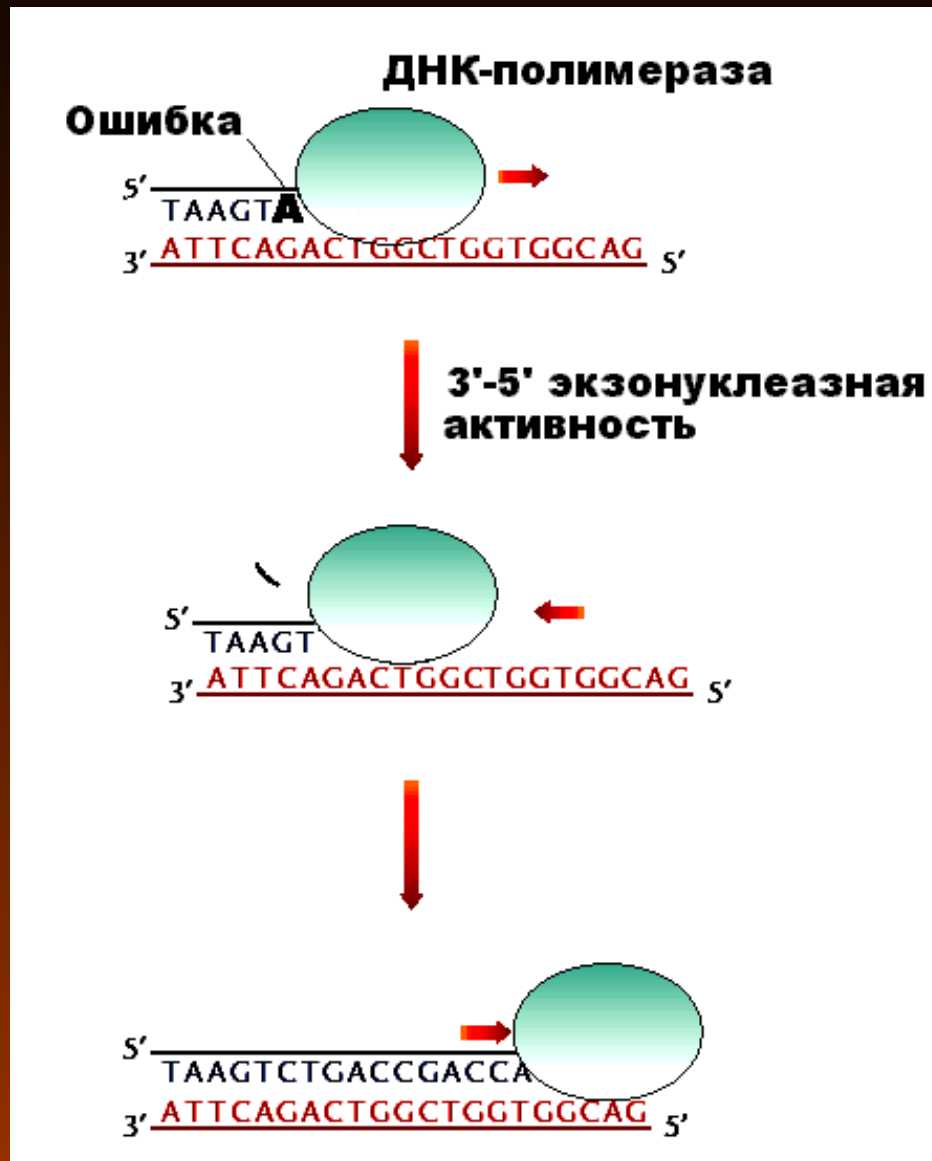
- Генетические процессы – репликация, репарация и рекомбинация.
- Химическая модификация оснований ДНК и их утрата.
- Окислительные нарушения ДНК (активные формы кислорода - перекись водорода, супероксид и др).
- Транспозиция мигрирующих элементов.

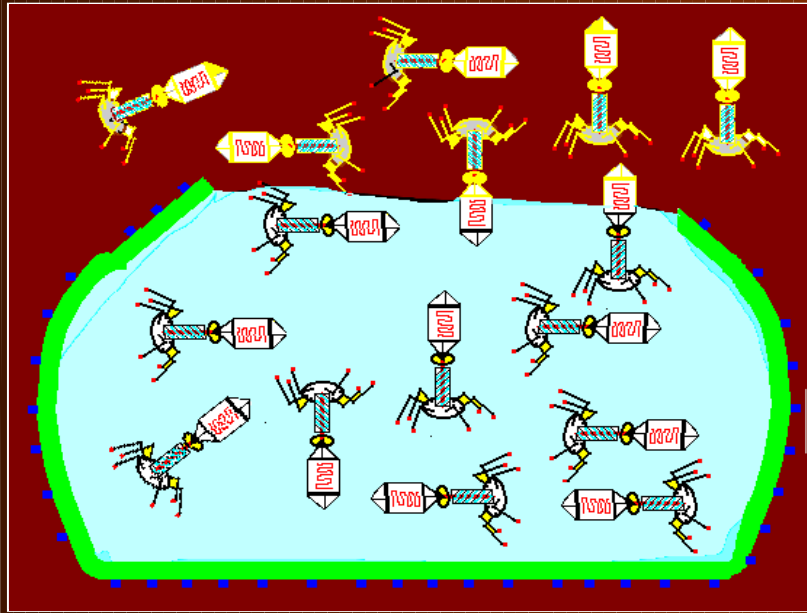
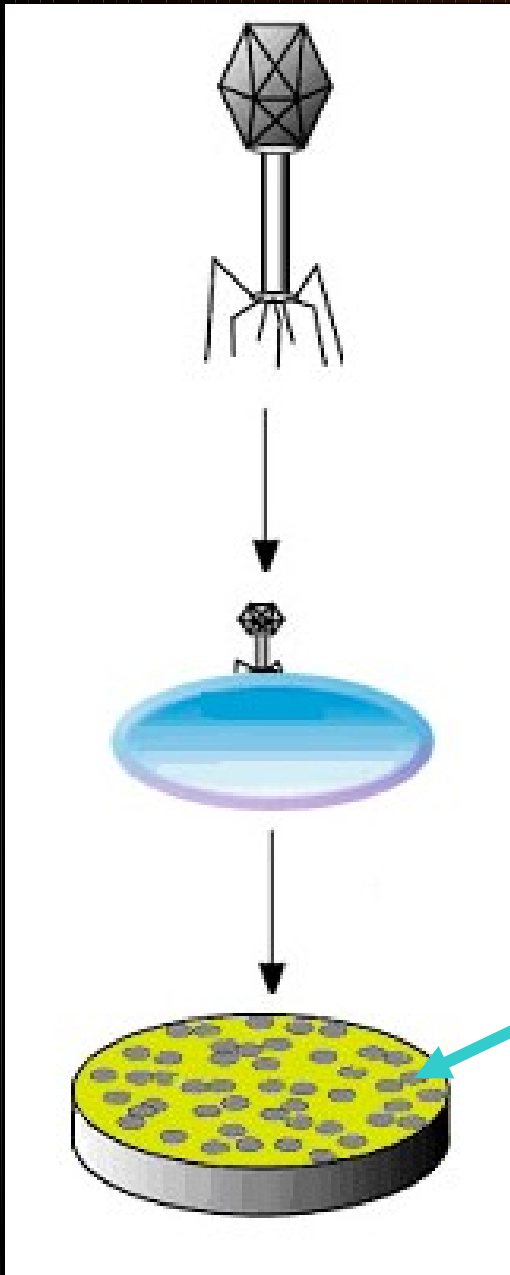
- Главным источником спонтанных мутаций являются ошибки ДНК-полимеразы

Ошибки репликации



3'-5'-экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы корректирует ошибочно встроенные основания

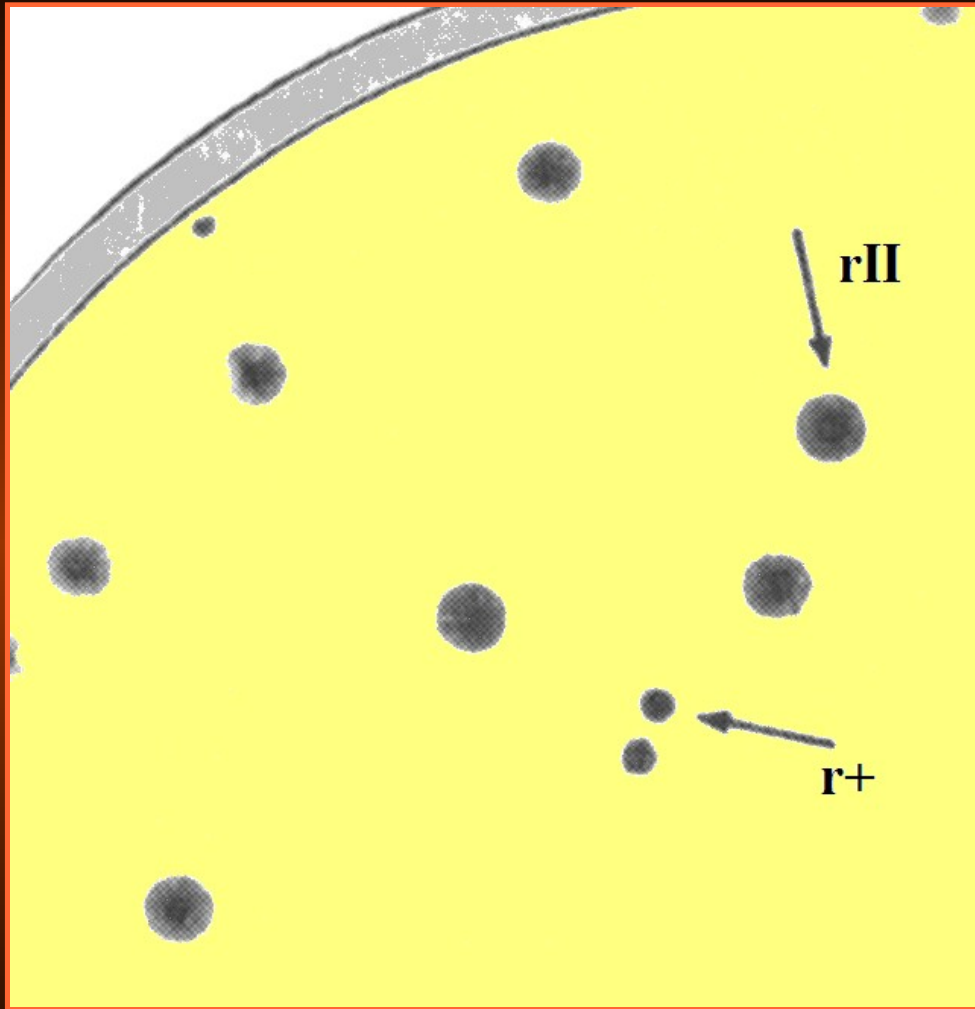




Лизис бактерии и выход фагового потомства

Каждая **негативная колония** (стерильное пятно, бляшка) — результат размножения и лизиса многих бактерий потомством одной фаговой частицы.

Мутанты rII фага T4 образуют на газоне *E.coli* более крупные по сравнению с диким типом негативные колонии



Частота возникновения rII-мутантов составляет около 10^{-4}

Морфология стерильных пятен фага T4 дикого типа (r+) и мутанта rII

Мутаторный и антимутаторный эффект ts-мутаций по гену 43 фага T4

1. Были получены температурочувствительные мутанты фага T4, которые характеризовались изменением уровня частот образования крупных стерильных пятен. У одних мутантов был повышен уровень мутабельности по гену rII, у других – понижен.
2. У мутантов обоих типов мутации были локализованы в гене 43, который кодирует ДНК-полимеразу.

Мутаторный и антимутаторный эффект ts-мутаций по гену 43 фага T4

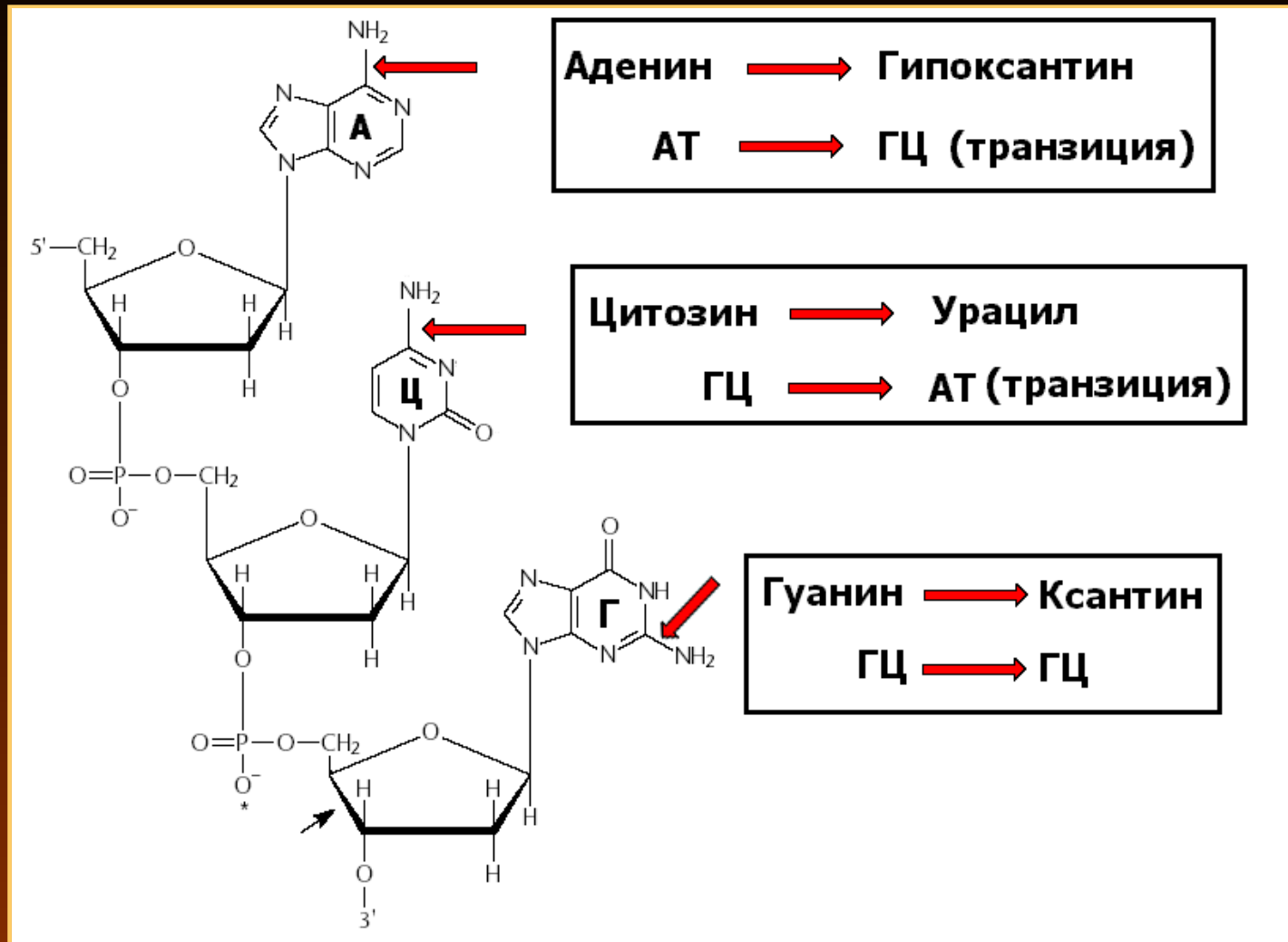
ts-мутация	Частота мутаций r+→rII (%)	Тип ts-мутации	ДНК-полимеразная активность (%)	3'-5'-экзонуклеазная активность (%)
L56	3000	мутатор	~100	20
A58	20	анти-мутатор	25	~100
Дикий тип	100 (10 ⁻⁴)	норма	100	100

Механизмы поддержания генетической стабильности, связанные с репликацией ДНК у *E.coli*

Механизм	Совокупный эффект на частоту ошибок
Спаривание оснований	$\sim 10^{-1} - 10^{-2}$
ДНК-полимераза (селекция оснований и 3'-5'-экзонуклеазная активность)	$\sim 10^{-5} - 10^{-6}$
Вспомогательные белки (SSB и другие)	$\sim 10^{-7}$
Пострепликативная коррекция неспаренных оснований	$\sim 10^{-10}$

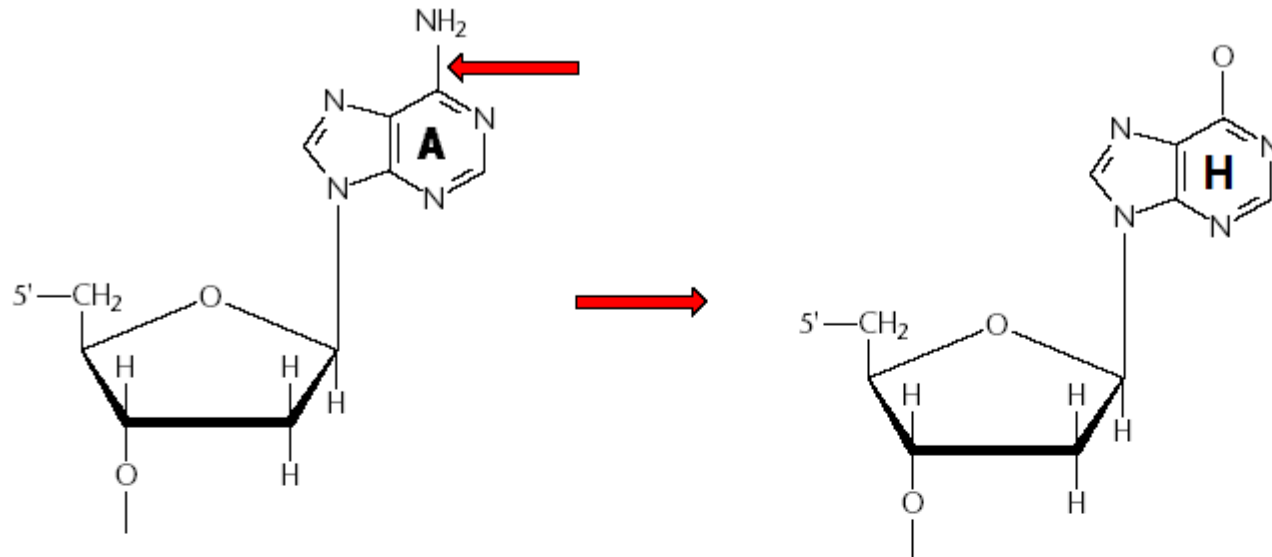
**Другие спонтанные нарушения,
приводящие к повреждениям
ДНК**

Образование транзиций в результате дезаминирования оснований



Гидролиз экзоциклических аминогрупп цитозина, аденина и гуанина - дезаминирование происходит при нормальных физиологических условиях.

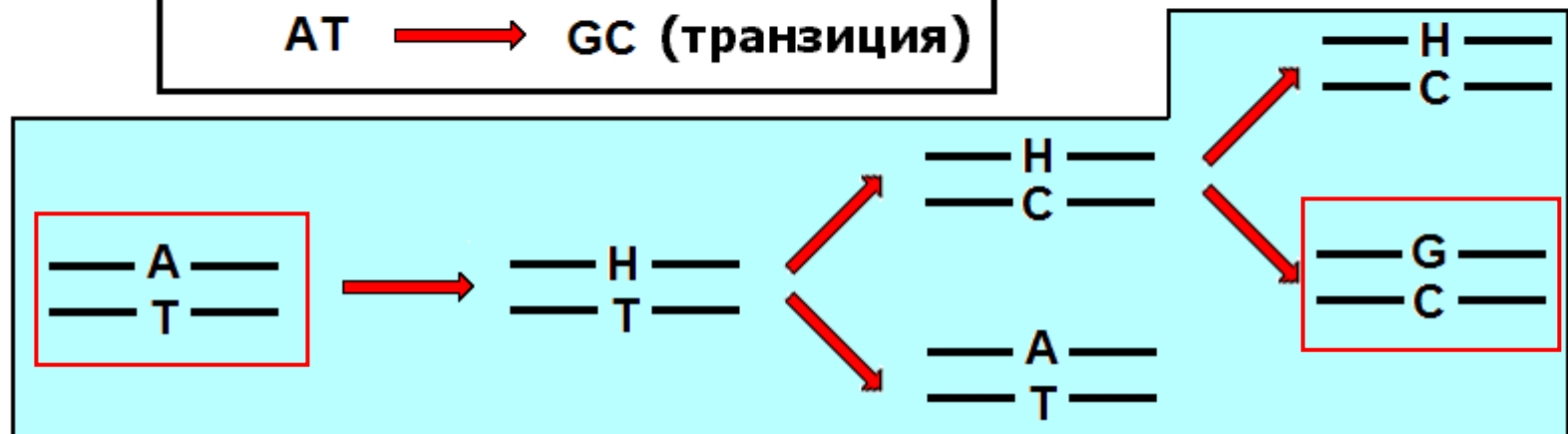
Образование транзиций в результате дезаминирования оснований



Аденин \longrightarrow Гипоксантин

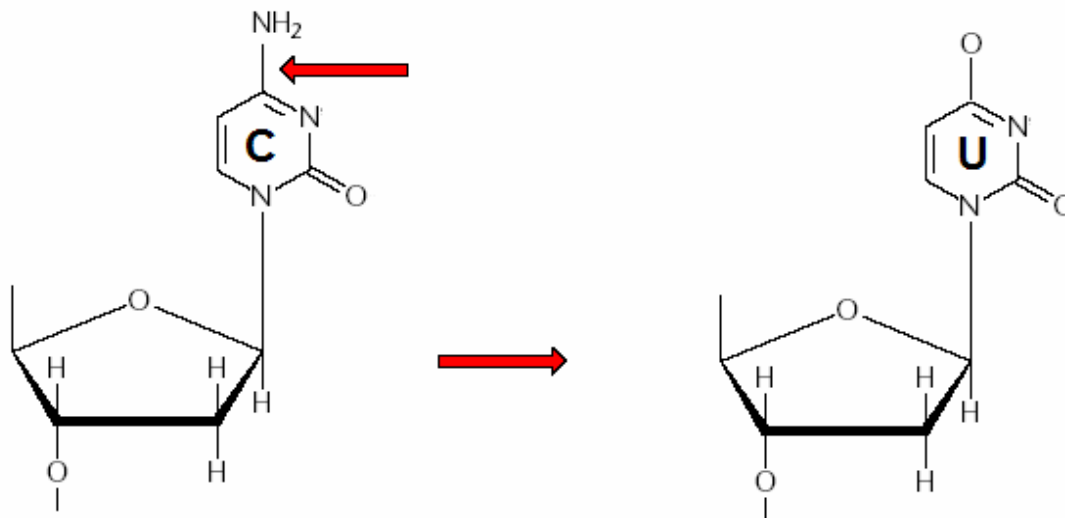
АТ \longrightarrow GC (транзиция)

Вторая репликация



Первая репликация

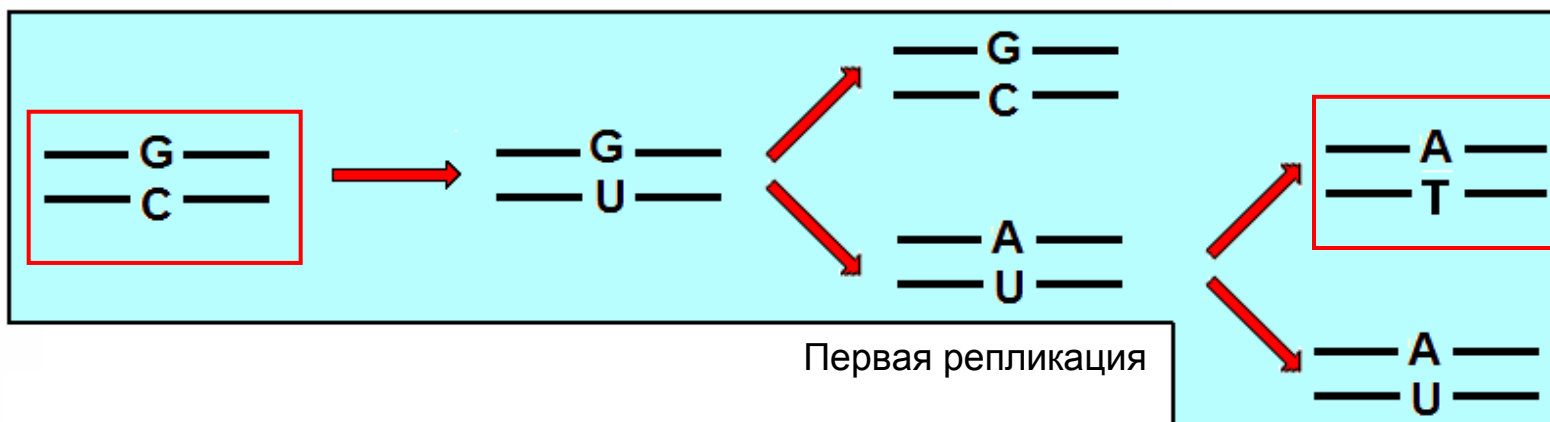
Образование транзиций в результате дезаминирования оснований



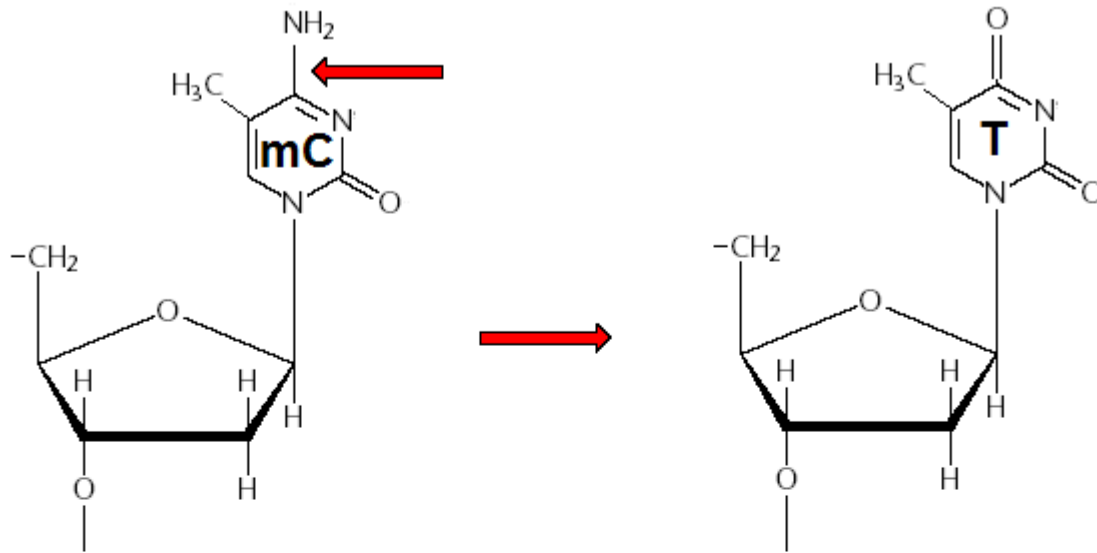
Цитозин → Урацил
GC → AT (транзигия)

В клетках млекопитающих дезаминирование цитозина происходит со скоростью 1000 оснований на клетку за сутки

Вторая репликация

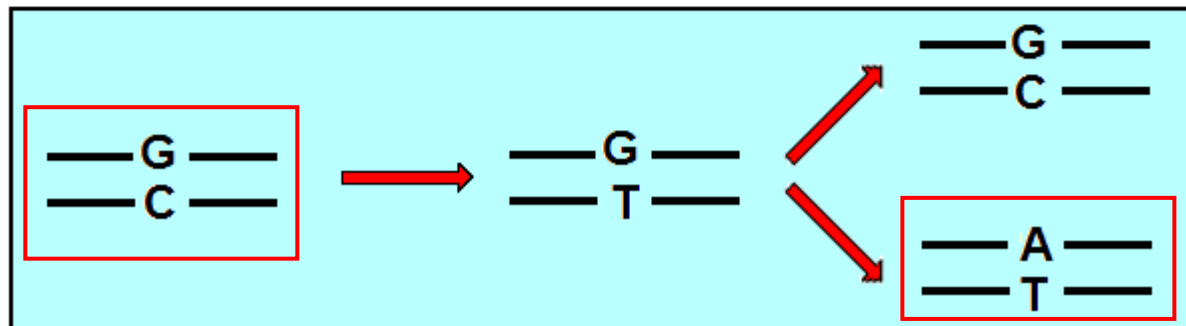


Образование транзиций в результате дезаминирования оснований

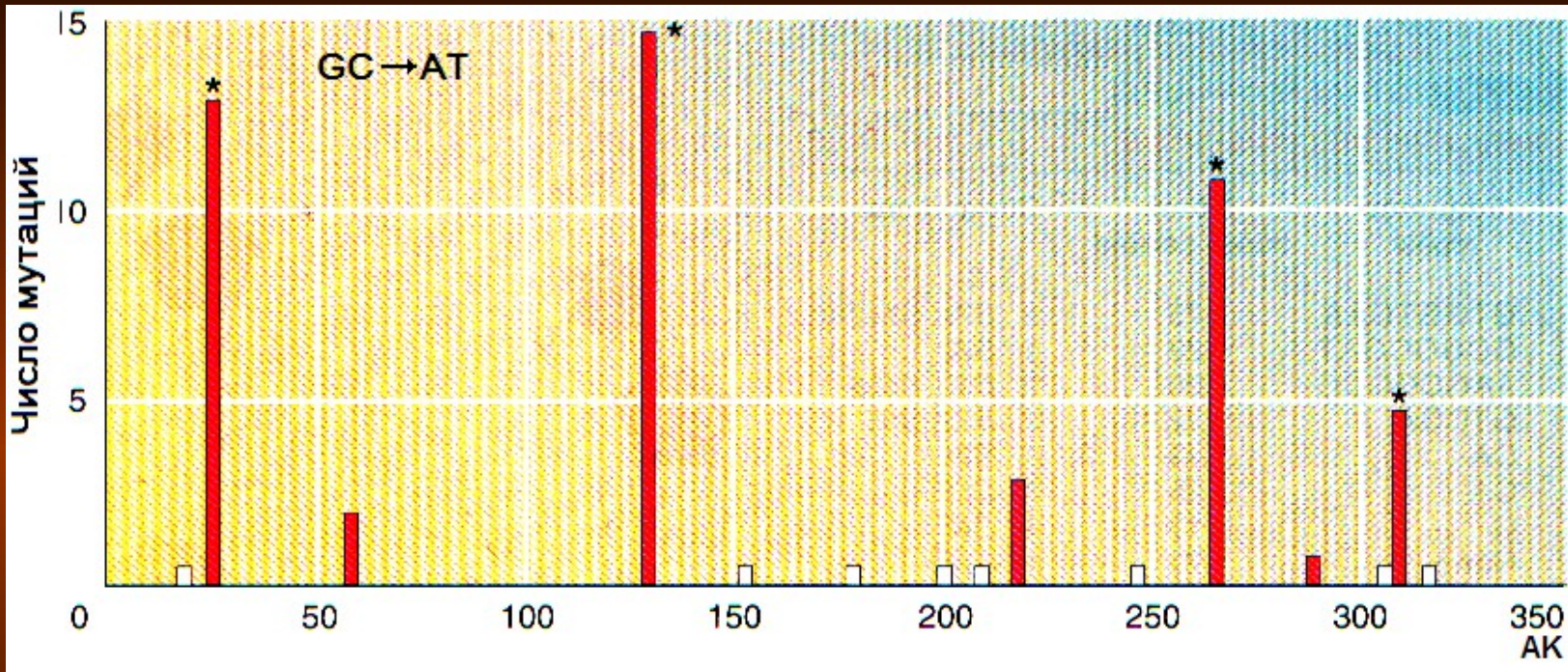


Метилцитозин \longrightarrow Тимин

GC \longrightarrow AT (транзиция)



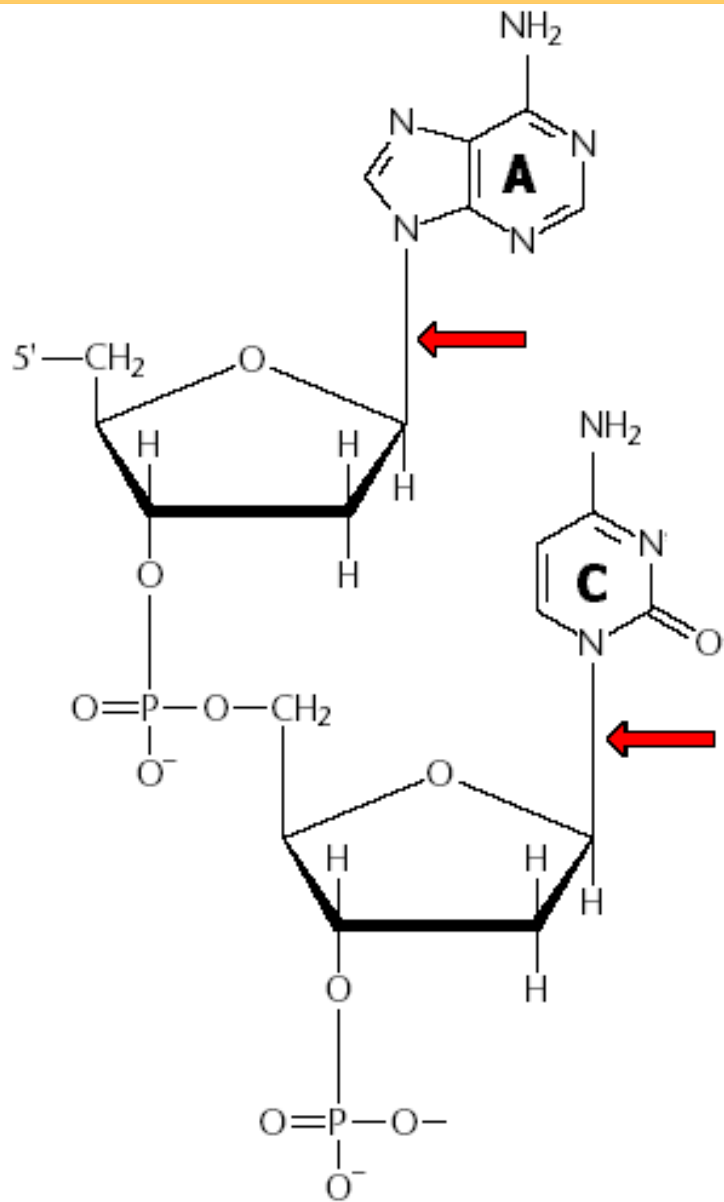
Сайты, содержащие метилцитозин, являются горячими точками, характеризующимися повышенной мутабельностью



(горячие точки по 5-метилцитозину в гене *lacI*)

Из 50 независимо отобранных мутаций 44 были в 4-х сайтах с метилцитозином (*) и только 6 приходились на 11 неметилированных сайтов (в белых – мутаций не выявили)

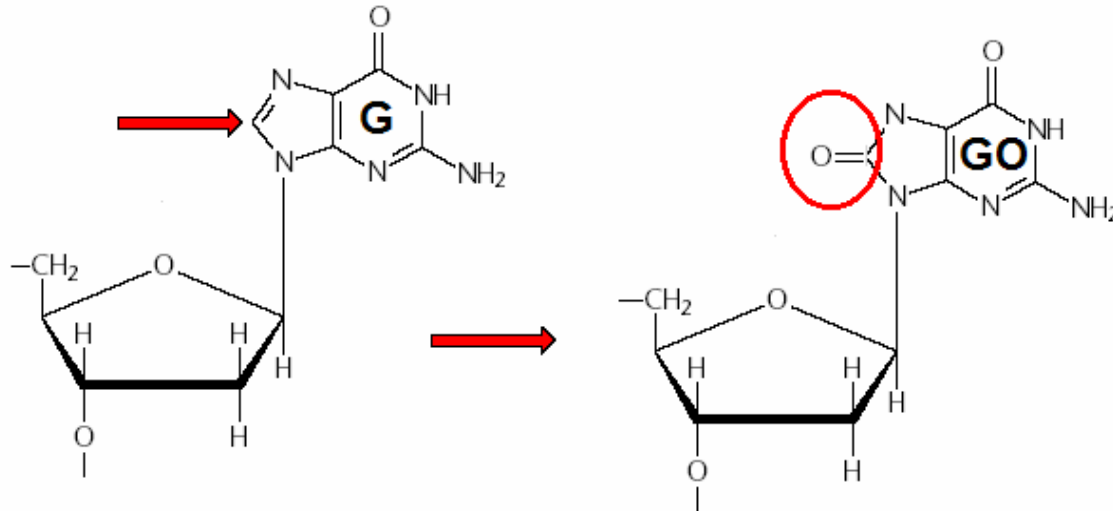
Образование апиридиновых и апуриновых сайтов в результате гидролиза гликозидной связи между основанием и дезоксирибозой



В каждой клетке млекопитающих за одну 20-ти часовую генерацию происходит образование около 10000 апуриновых сайтов и около 500 – апиридиновых.



Окислительные повреждения ДНК



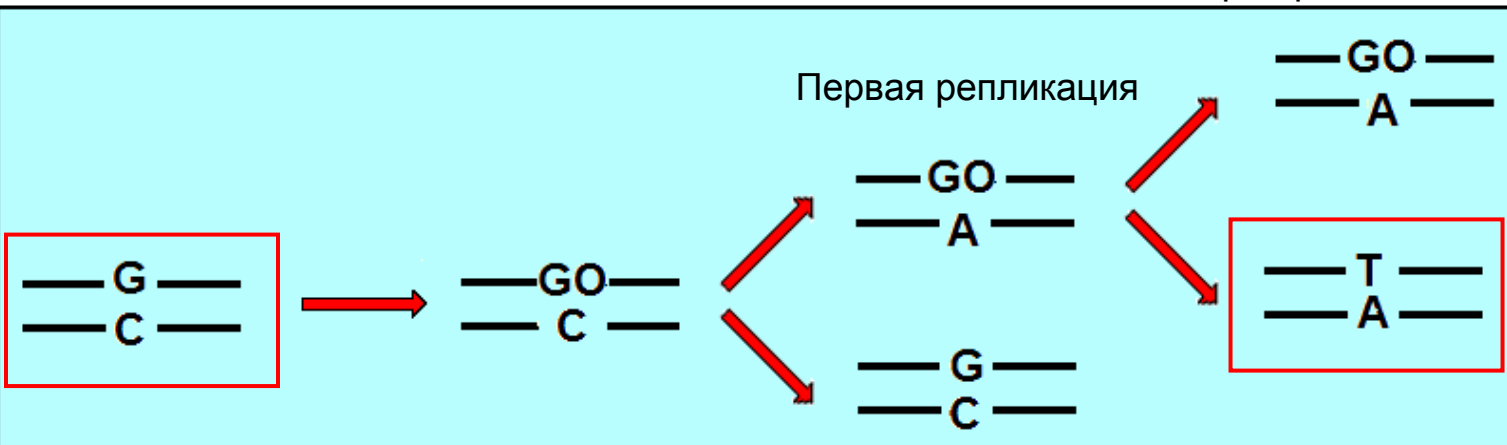
Гуанин



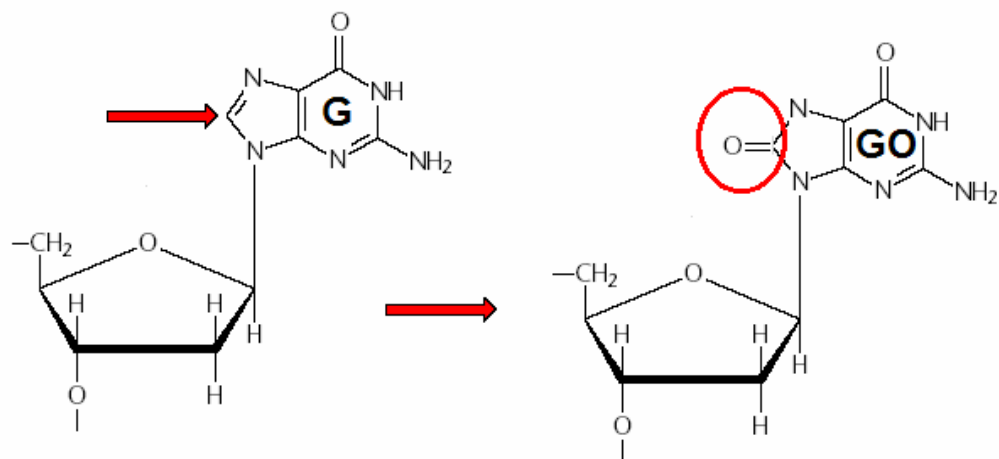
8-оксигуанин

GC → TA (трансверсия)

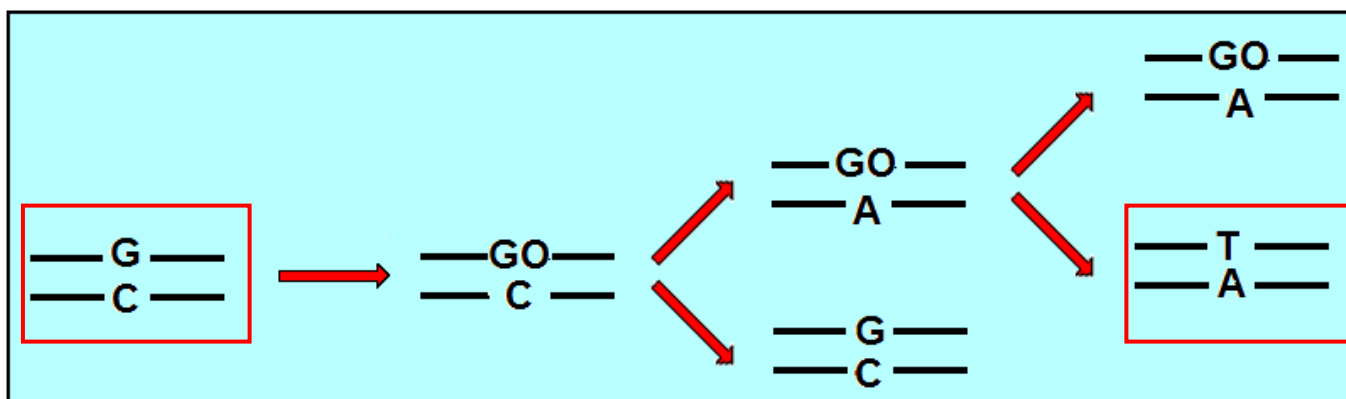
Вторая репликация



Окислительные повреждения ДНК



Гуанин \longrightarrow 8-оксигуанин
GC \longrightarrow ТА (трансверсия)



Количество окислительных повреждений ДНК составляет от нескольких сотен до нескольких десятков тысяч на клетку (млекопитающих) за сутки.

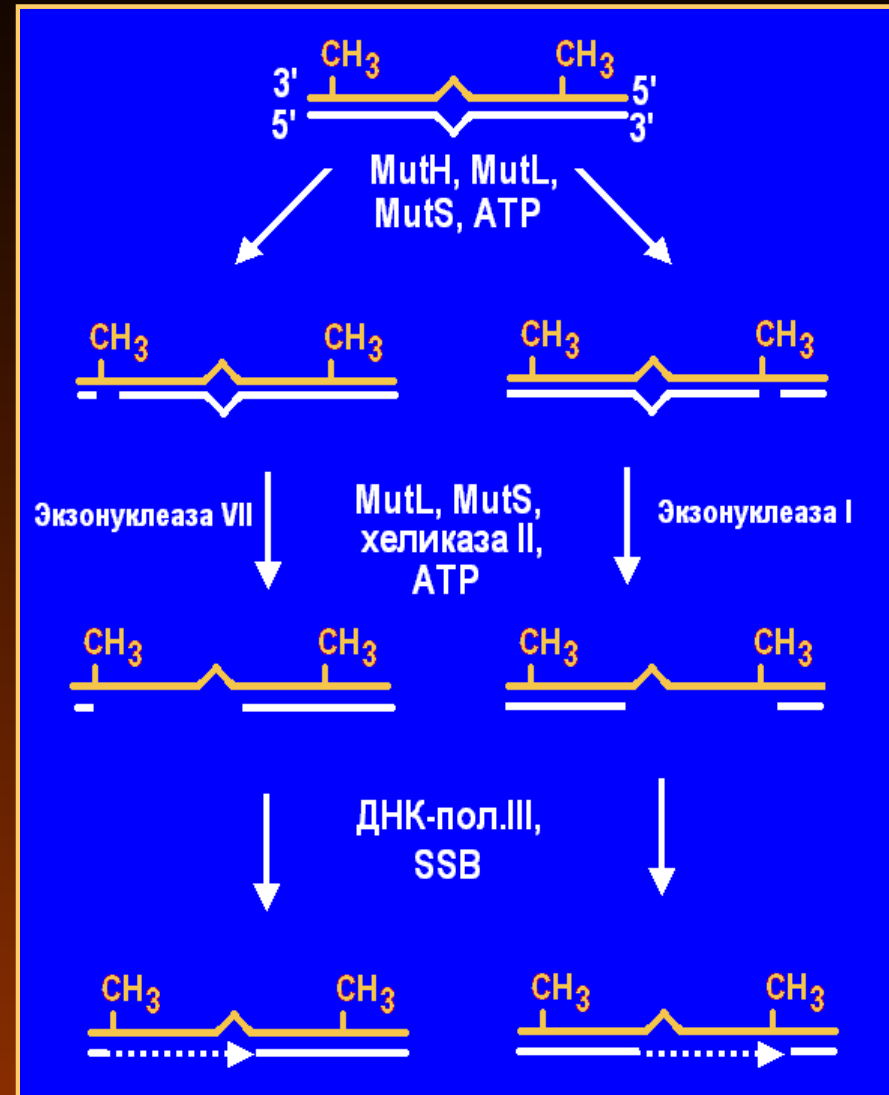
Репарация неспаренных оснований

Хеликаза II = UvrD=MutU

Экзонуклеаза I – 3'-5'-активность

Экзонуклеаза VII – 5'-3'-активность

dam, mutH, mutL, mutS,
mutU - мутаторы



Мутагенность и канцерогенность

- Большая часть канцерогенов является также и мутагенами.
- Эти агенты вызывают рак в соматических клетках, индуцируя в них мутации.

Мутагенность и канцерогенность

- У человека есть набор генов, так называемых генов-супрессоров опухолей (например ген p53).
- Эти гены кодируют белки, подавляющие образование опухолей.
- У значительной части больных раком гены-супрессоры опухолей содержат мутации.

p53



Апоптоз



Остановка клеточного
цикла

Супрессия
опухоли

Мутагенность и канцерогенность



Рекомендуемая литература

Дополнительная

Блохин Д.Ю. Как убить бессмертную клетку.
Химия и жизнь, 2009, 3: 20-25.