Молекулярная биология:

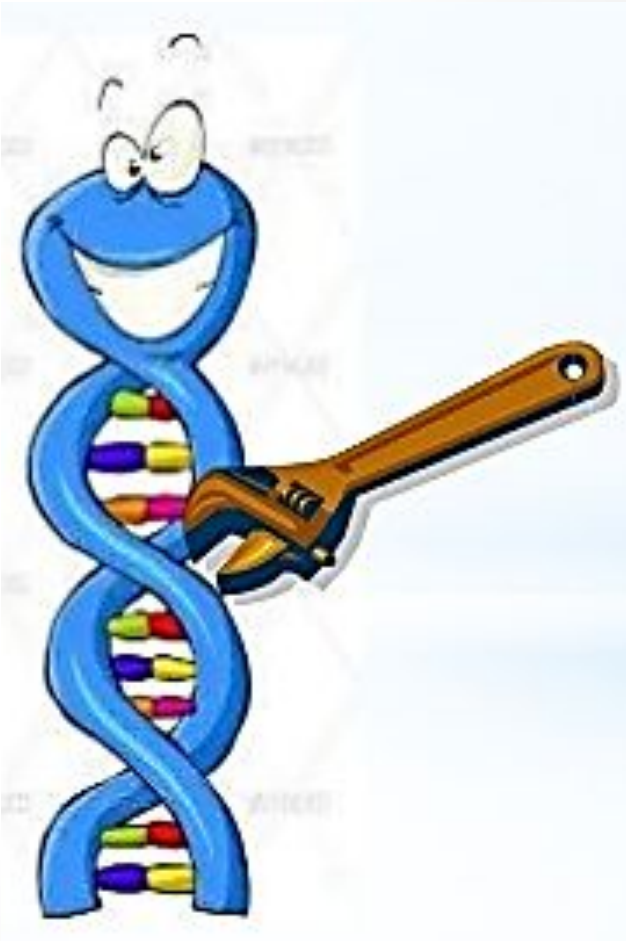
Лекция 1: Механизмы репарации

Доминова Ирина Николаевна

Механизмы репарации

Репарация – Процесс, позволяющий живым организмам восстанавливать повреждения, возникающие в ДНК.

Оказывается возможной благодаря особенностям строения молекулы ДНК – наличия в ней двух комплементарных цепей. Повреждение одной из них может исправляться при использовании второй цепи в качестве матрицы.



Историческая справка

1927 – **H. Muller**: рентгеновские лучи индуцируют мутации

1928 – **F. Gates**: УФ излучение на максимуме поглощения ДНК приводит к гибели бактерий

1935 – **A. Hollaender и J.Curtis**: восстановление ДНК после УФ-излучения

1941 – **A. Hollaender и J. Emmons**: спектр действия = спектру поглощения УФ

1944 – **O. Avery, C. MacLeod и M. MsCarty**: ДНК – генетический материал

1949 – **A. Kelner, R. Dulbecco**: фотореактивация

1953 – **J. Weigle**: реактивация фага λ

1956 – **S. Goodgal**: доказательство роли ферментов в фотореактивации

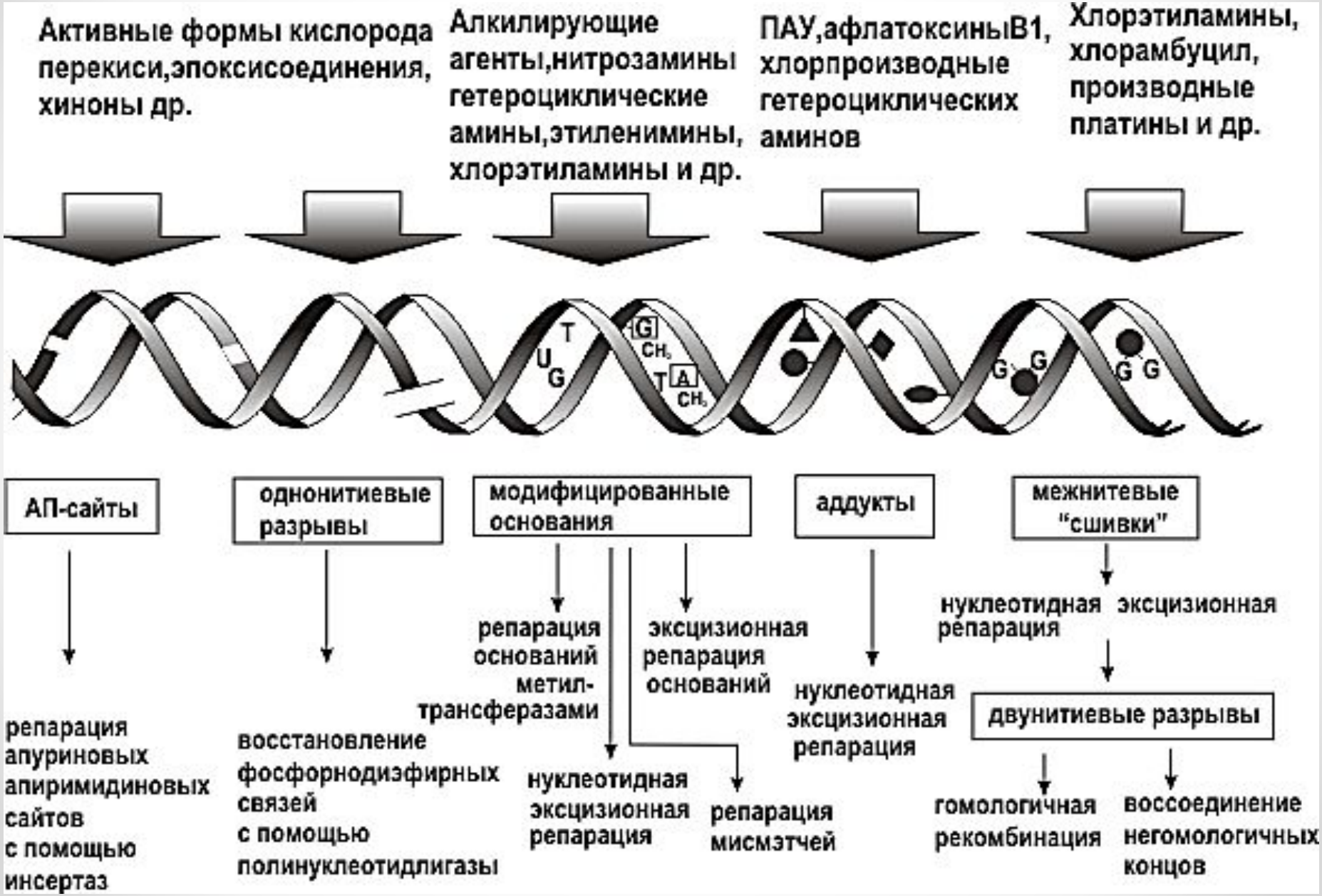
1961 – **R. и J. Setlow**: димеры тимина приводят к повреждению ДНК

1964 – **R. Setlow и W. Carrier, R. Boyce и P. Howard-Flanders**: эксцизионная репарация

1974 – **T. Lindahl**: эксцизионная репарация оснований

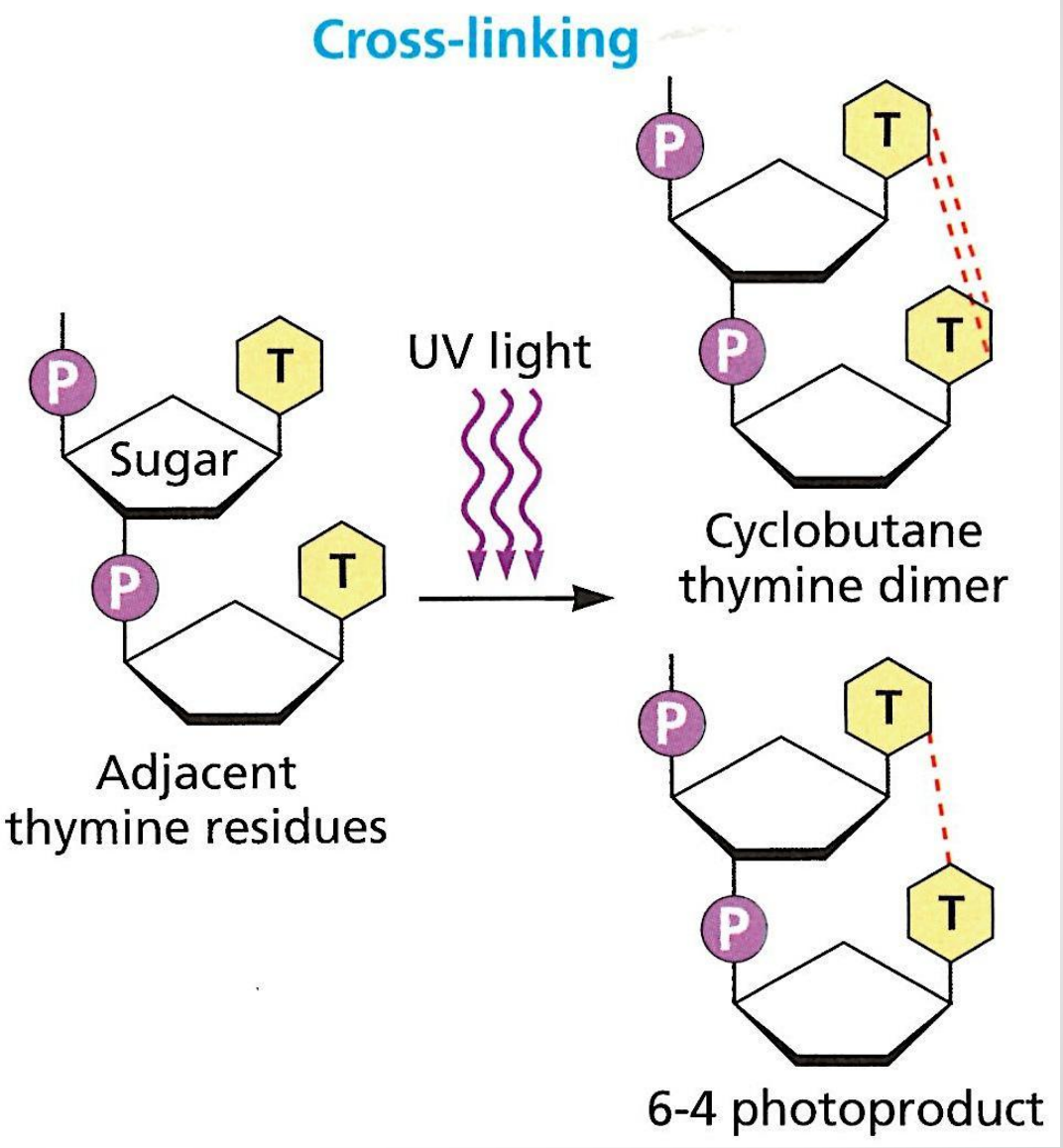
1975 – **J. Wildenberg и M. Meselson**: репарация ошибочно спаренных оснований

Факторы, приводящие к ошибкам

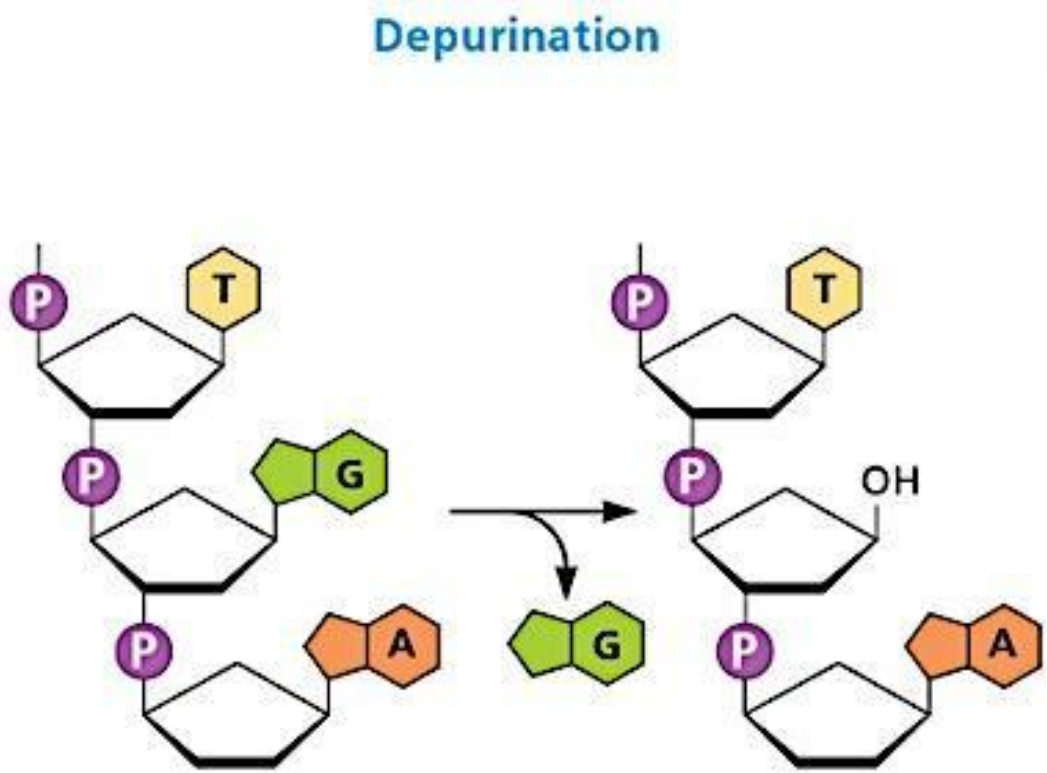


Типы повреждений ДНК

- Образование **ковалентных сшивок** между цепями ДНК под действием бифункциональных агентов;
- Образование **циклобутановых димеров**, возникающих при поглощении УФ, между соседними пиримидинами в цепи

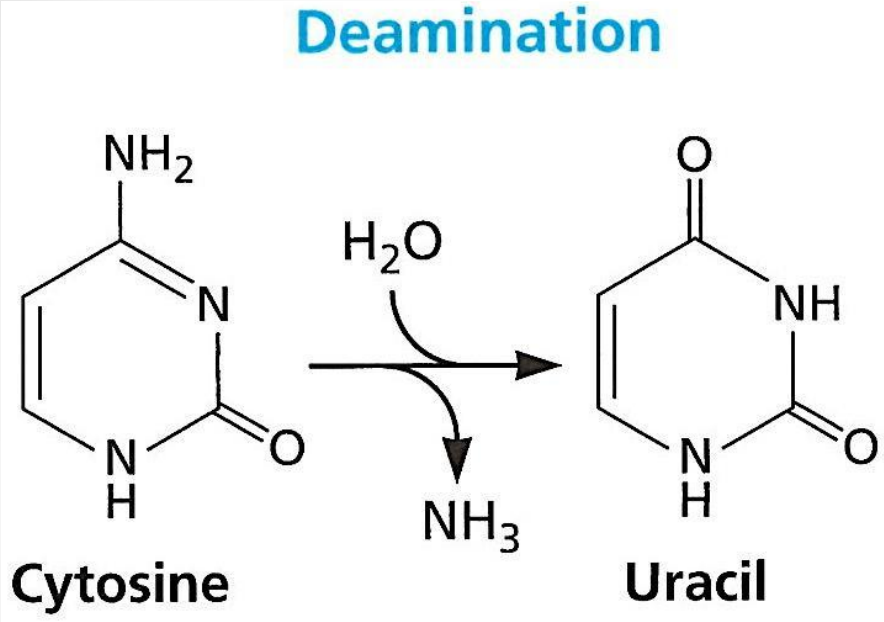


Типы повреждений ДНК

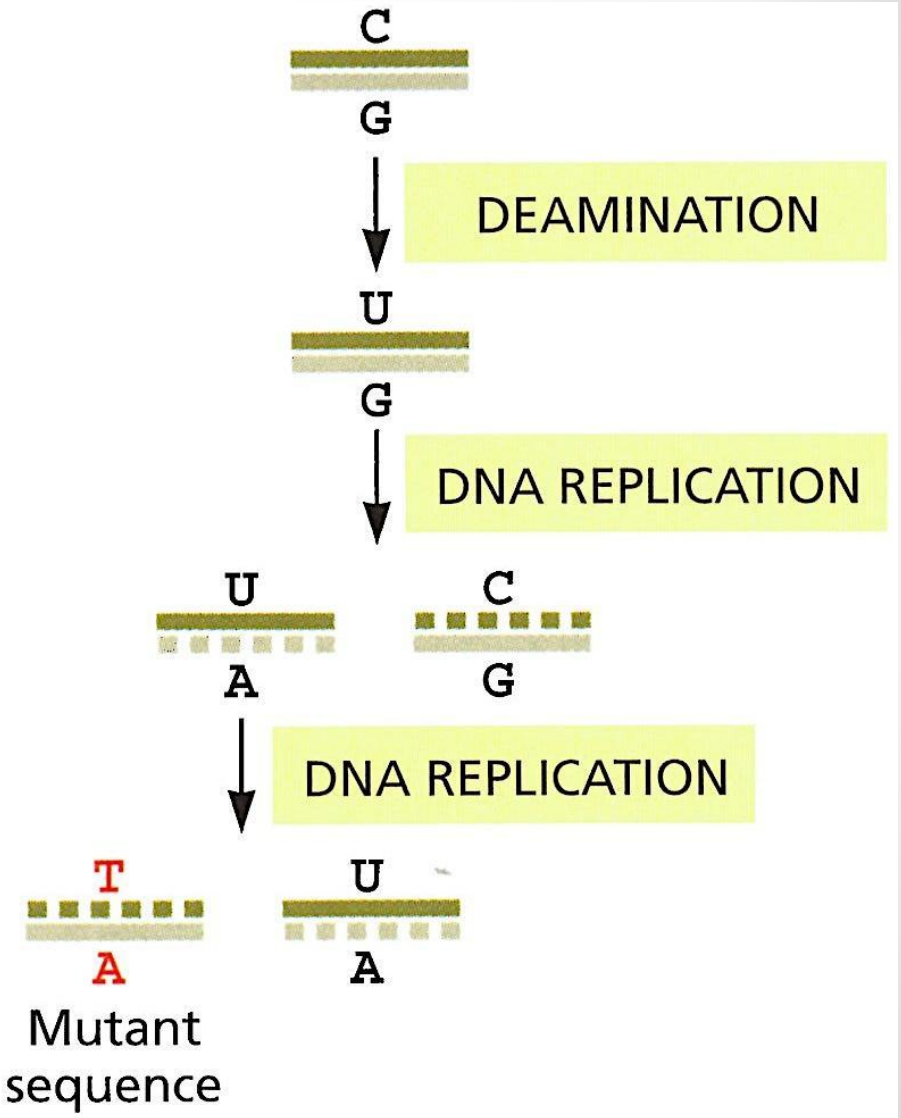


Разрыв (β-N)-гликозидных связей между пурином и дезоксирибозой (**депуринизация**), который чаще всего является следствием повышения температуры. За сутки в клетке человека совершается от 5000 до 10000 актов депуринизации

Типы повреждений ДНК

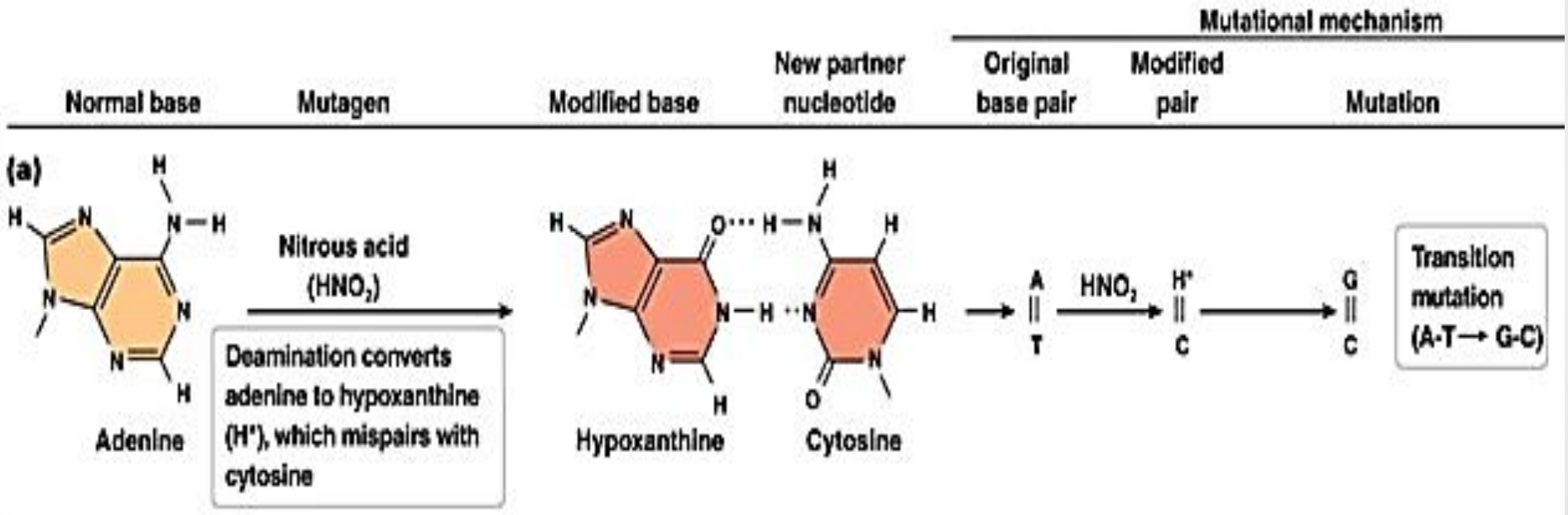


Спонтанное **дезаминирование** остатков цитозина и аденина с образованием, соответственно, остатков урацила и гипоксантина (примерно 100 событий на геном в сутки)

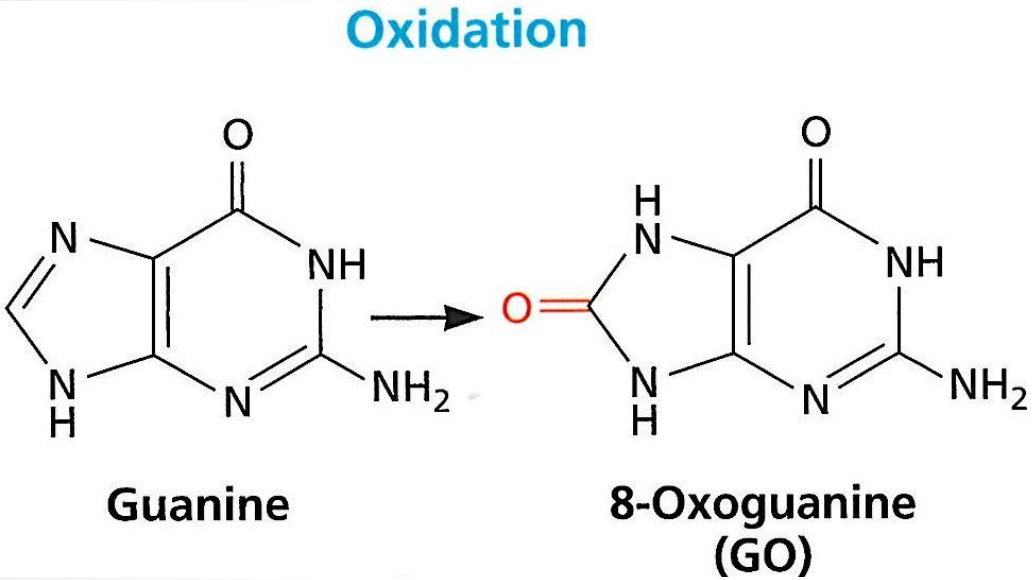


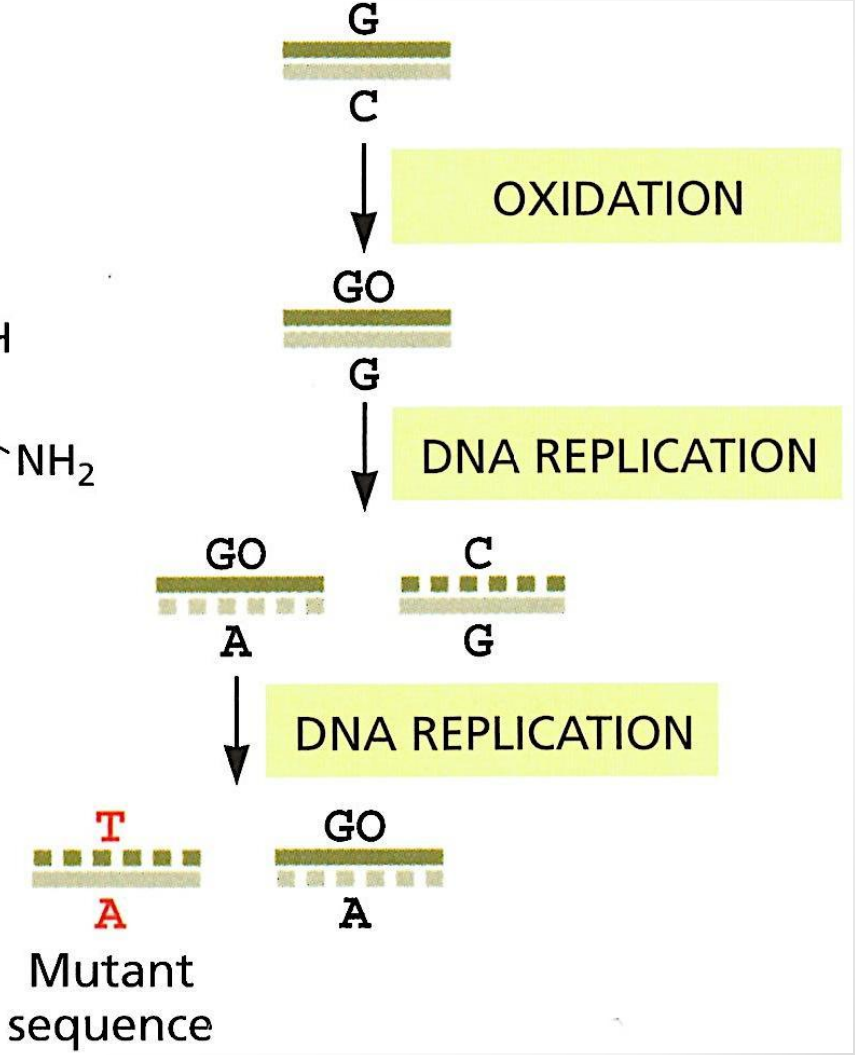
Типы повреждений ДНК

Дезаминирование

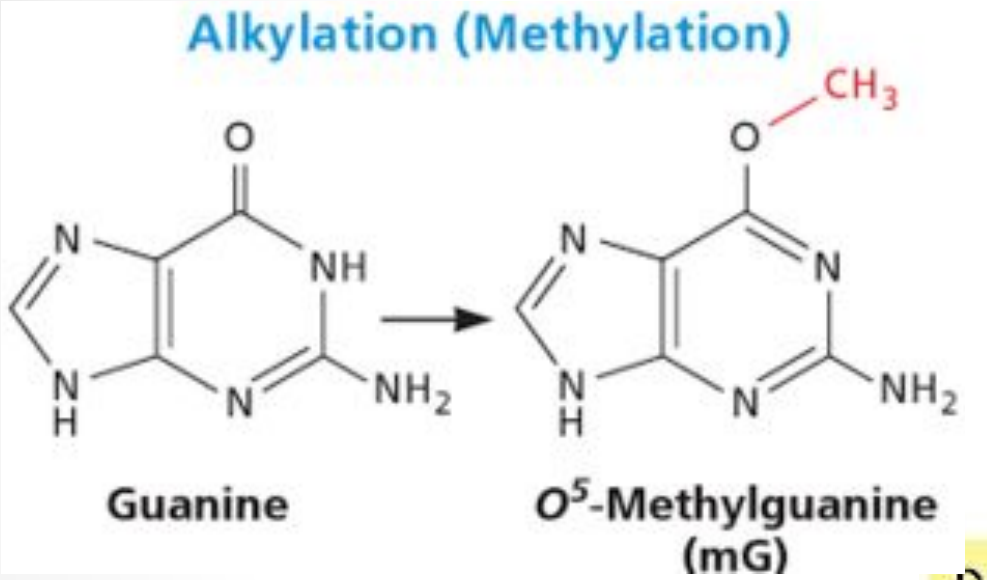


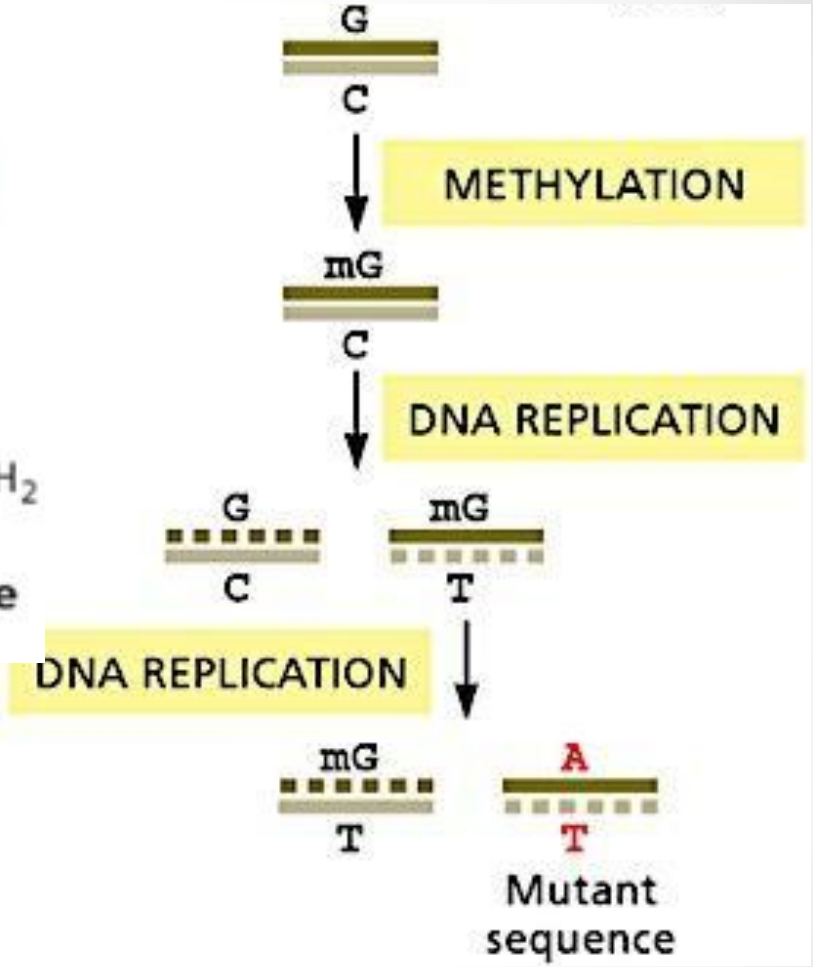
Типы повреждений ДНК





Типы повреждений ДНК

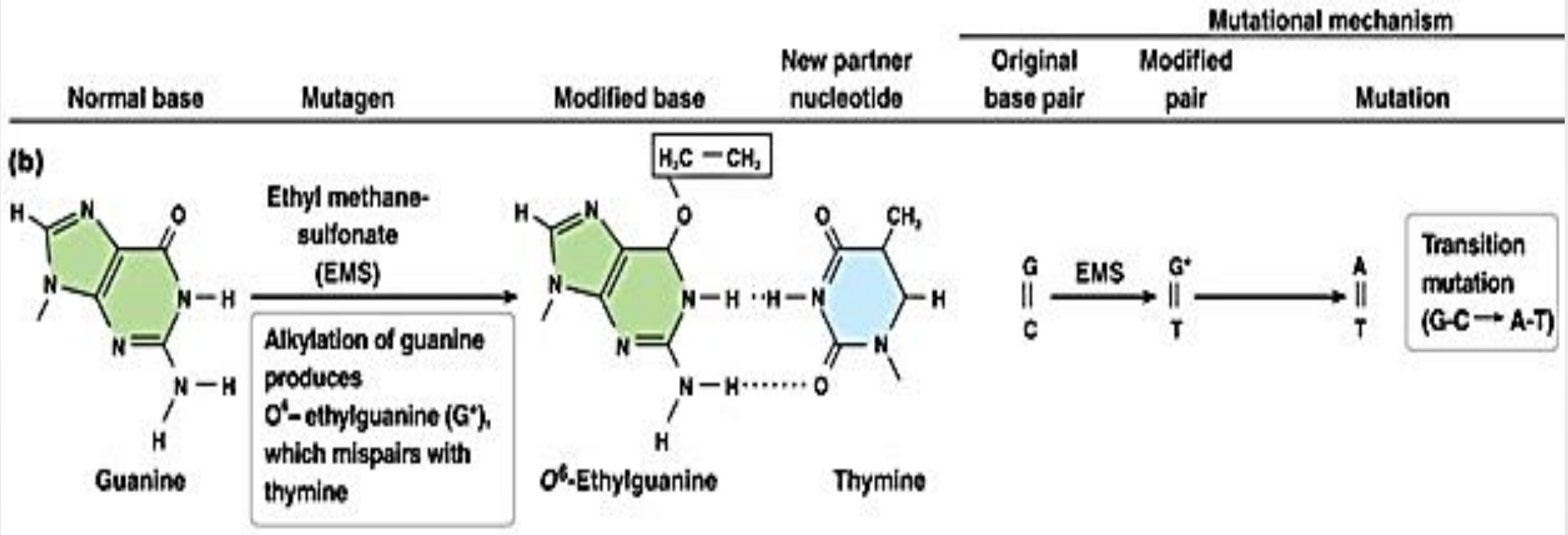




Алкилирование азотистых оснований под действием химических веществ особого класса (алкилирующих агентов)

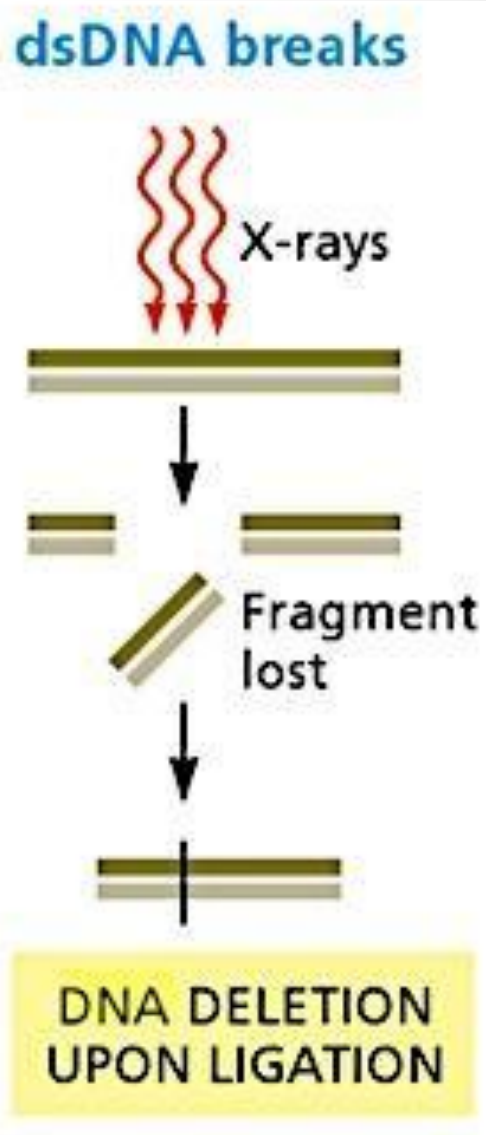
Типы повреждений ДНК

Алкилирование



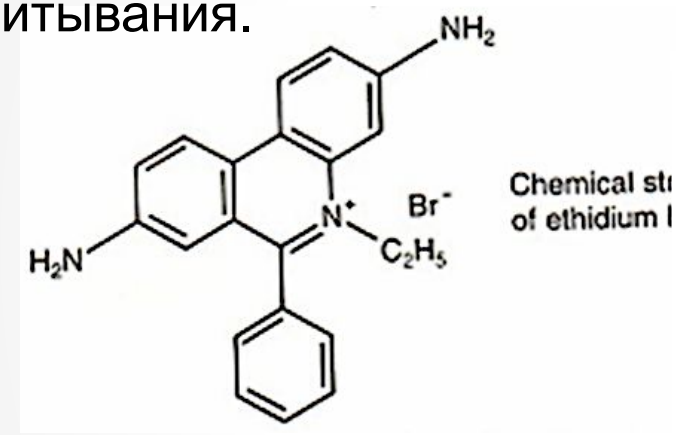
Типы повреждений ДНК

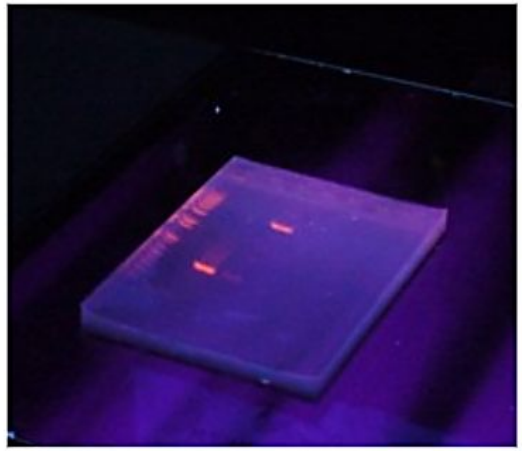
Двухцепочечные разрывы индуцируются внеклеточными агентами, такими, как ионизирующая радиация и генотоксичные химические продукты, и спонтанно возникают в процессе репликации ДНК и образуются на непродолжительное время в процессе мейоза или рекомбинации в иммунной системе

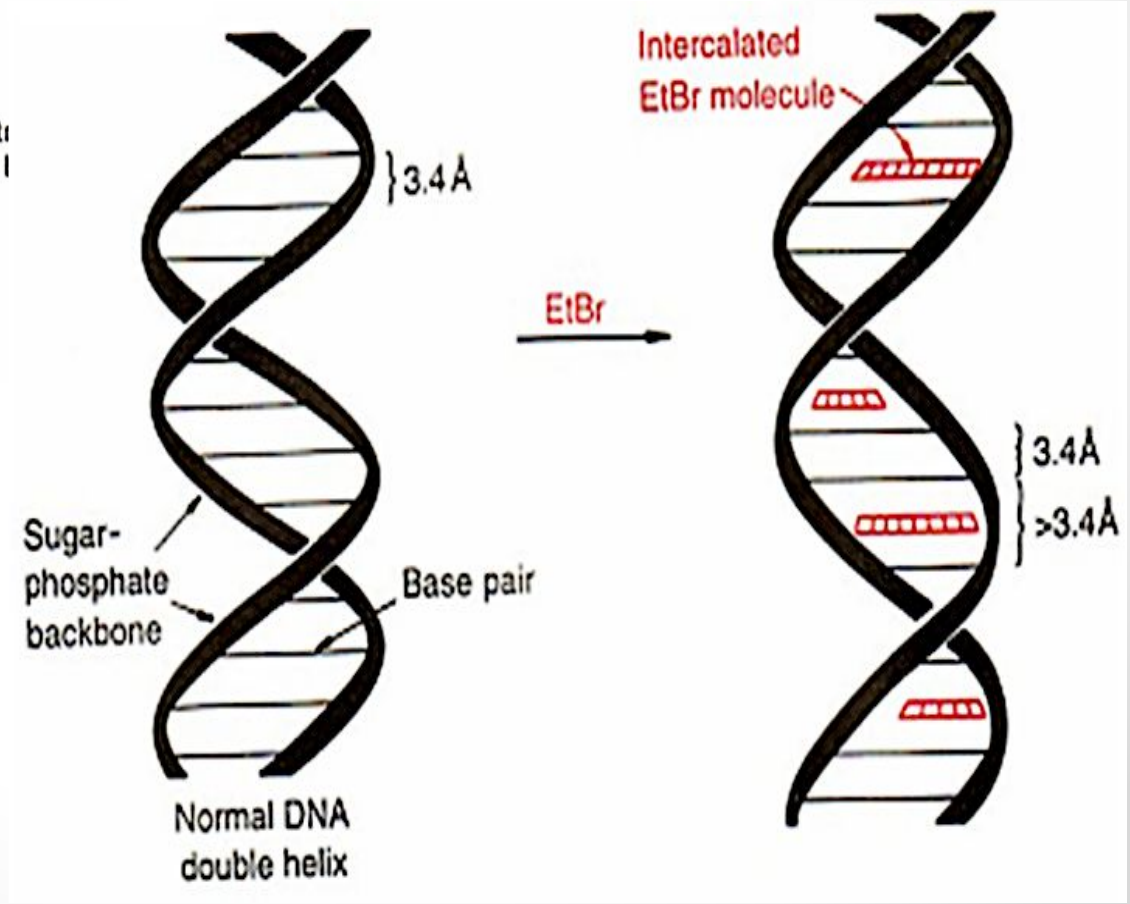


Типы повреждений ДНК

Интеркалирующие агенты (EtBr) встраиваются между основаниями в ДНК, искажая вторичную структуру цепи и вызывая стресс, приводящие к появлению к появлению разрывов в цепи, а те, в свою очередь, к не эффективной репарации и, как следствие, к мутациям рамки считывания.

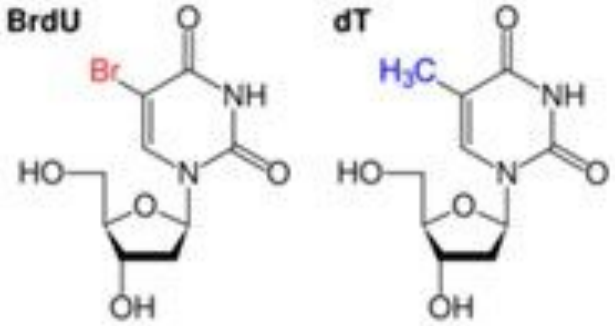


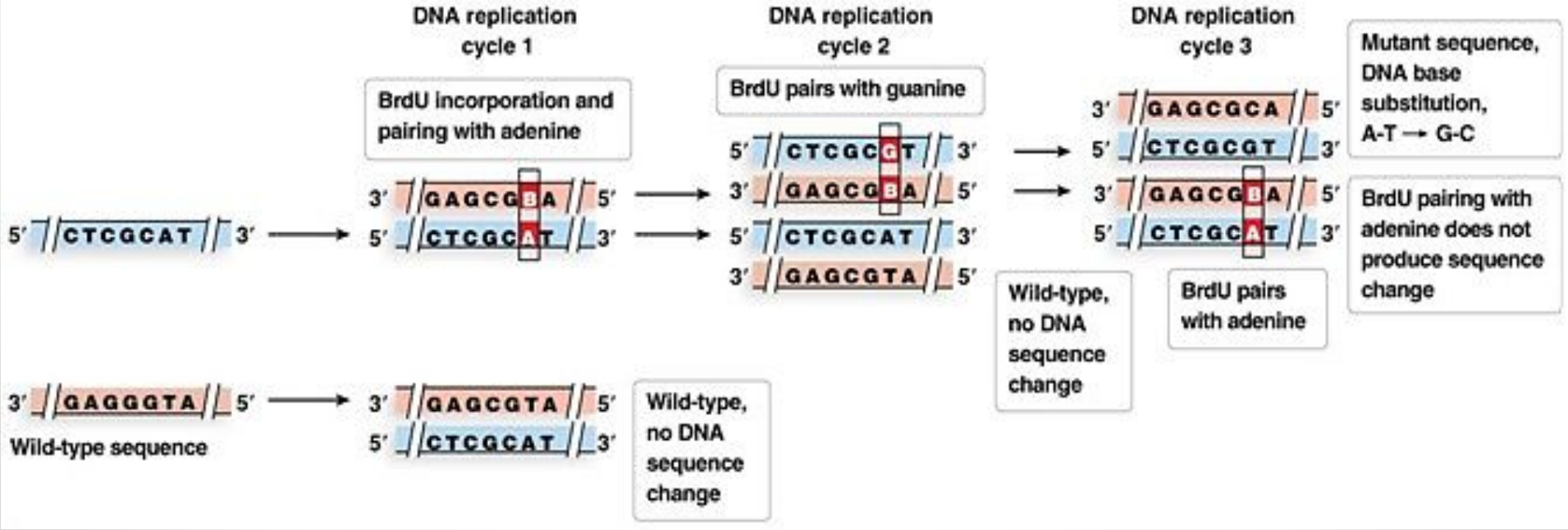




Типы повреждений ДНК

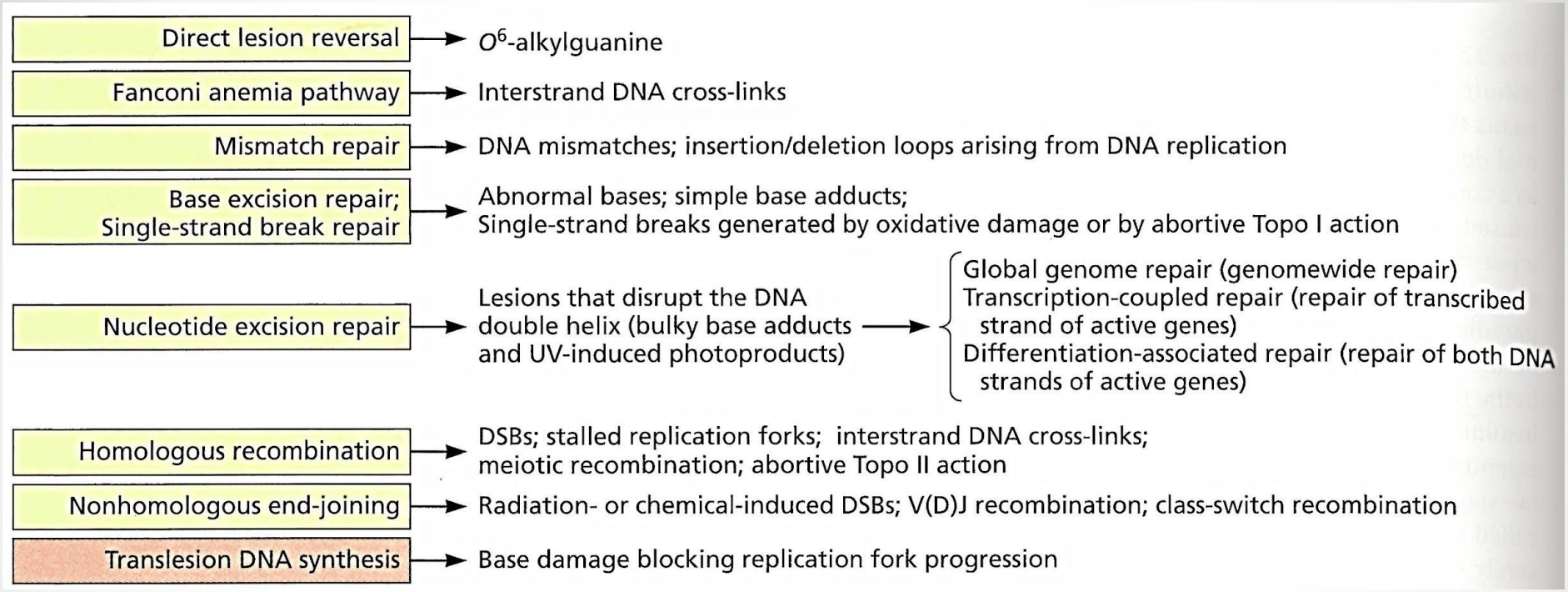
Встраивание аналогов оснований – химический веществ (5-бромдезоксиуридин) схожих по структуре с нормальными основаниями ДНК, т.к. не распознаются полимеразой как неправильные.





Пути и механизмы репарации

Пути и механизмы репарации



Желтым отмечены классические пути репарации, приводящие к восстановлению структуры ДНК с ошибками и без.

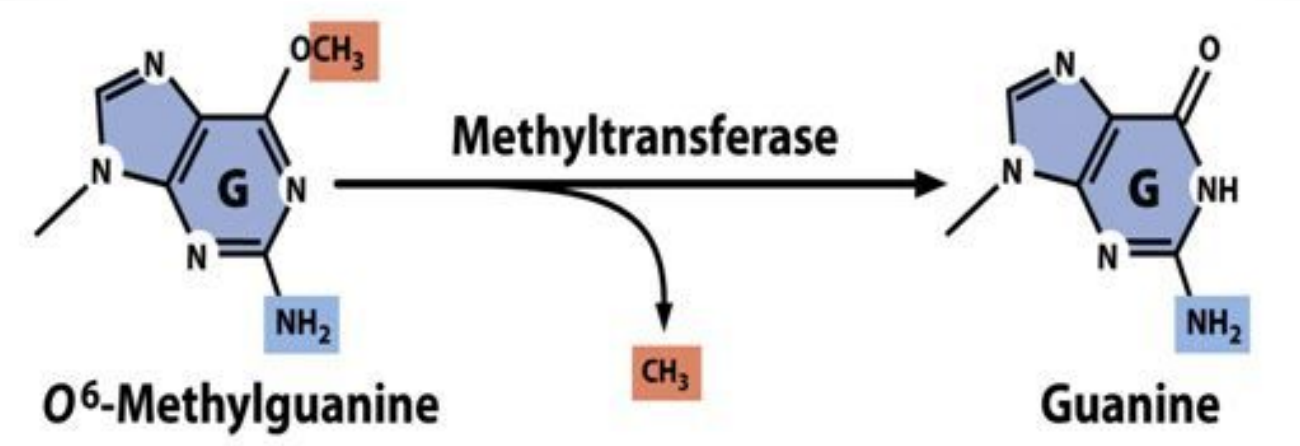
Оранжевым – механизм, который позволяет обходить повреждение на молекуле ДНК в процессе репликации.

Также некоторые из этих путей репарации участвуют в нормальных физиологических процессах, таких как мейотическая рекомбинация и перегруппировка генов иммуноглобулина для образования репертуара молекул иммуноглобулина.

Пути и механизмы репарации

Прямая репарация: поврежденные основания (O^6-алкилгуанин или циклобутановый димер примидина) восстанавливаются посредством химических реакций

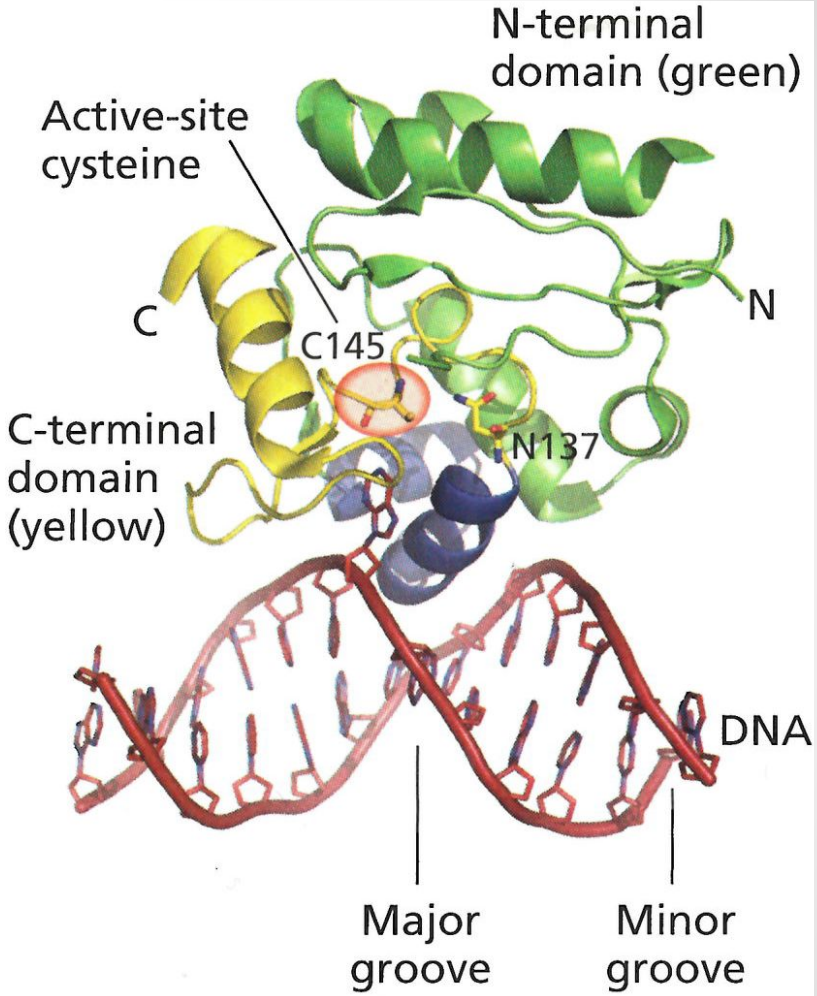
- **Метилтрансфераза** удаляет метильную группу у метилгуанина, превращая его в нормальный гуанин



Некоторые алкилирующие агенты применяются при химиотерапии, т.к. алкилированные основания блокируют репликацию, при этом активный механизм репарации на основе O^6-алкилгуанин алкилтрансферазы (AGT) лимитирует эффективность данного типа лечения раковых заболеваний.

Пути и механизмы репарации

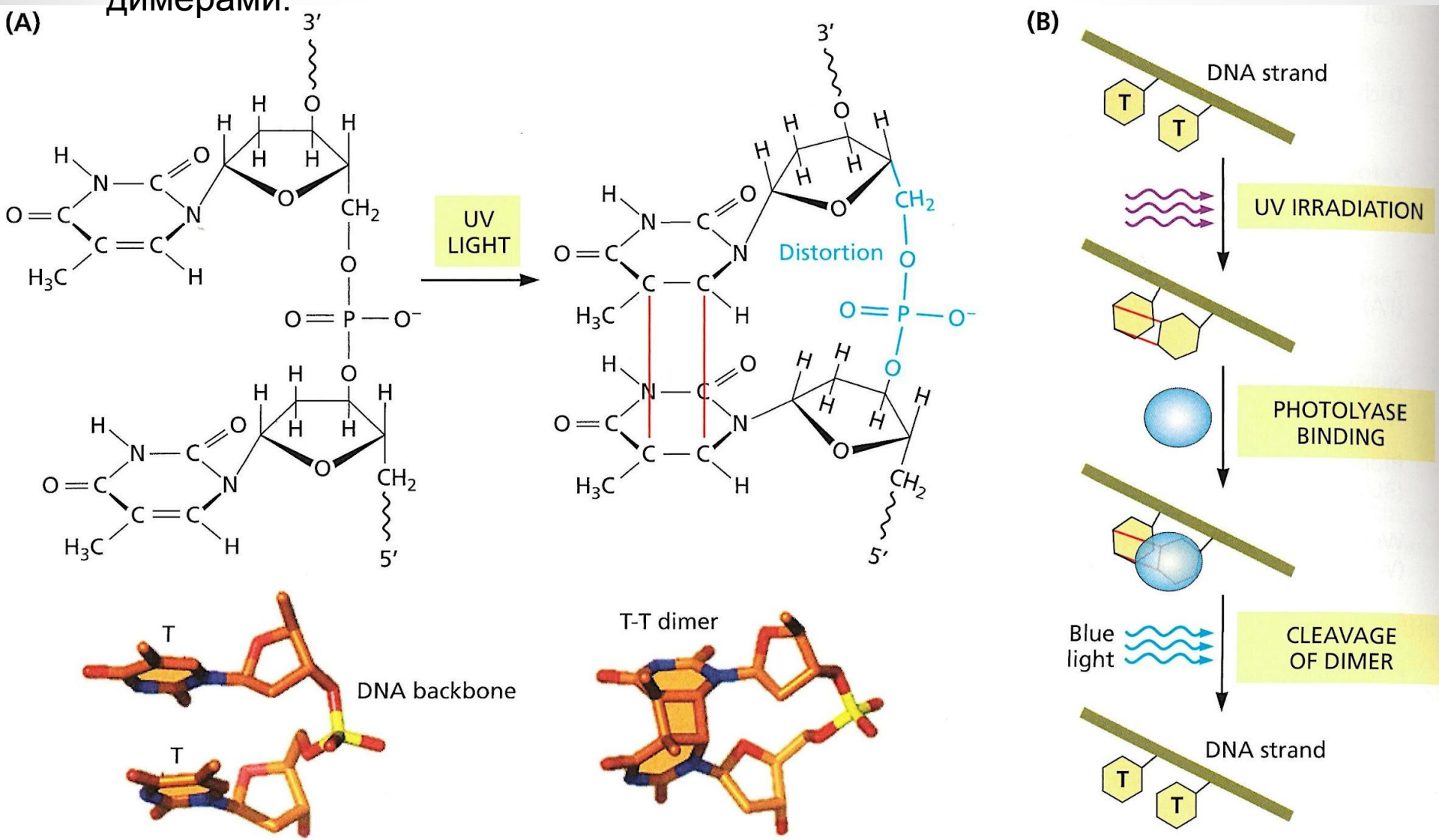
AGT осуществляет стехиометрический и необратимый перенос алкильной группы от O^6-алкилированного нуклеотида на цистеин в собственном активном сайте без индуцирования повреждений ДНК. Т.о. AGT – и трансфераза и акцептор алкильной группы. Присоединив алкильную группу AGT больше не может избавиться от нее, после чего фермент деградирует, поэтому не совсем верно называть AGT ферментом.



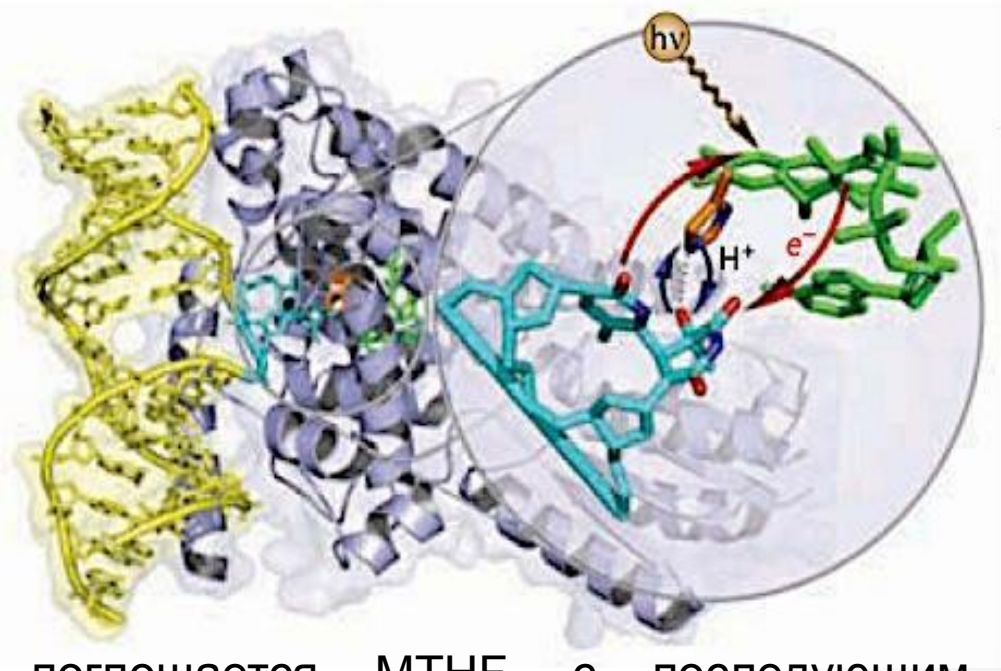
AGT ферменты обнаружены у всех 3-х доменах жизни: Бактерий, Архей и Эукариот. Однако, некоторые организмы, включая Растения и *Schizosaccharomyces pombe*, лишены ферментов с подобным функционалом.

Пути и механизмы репарации

- **Фотолиаза**, обнаруженная у E. coli и многих эукариот (за исключением плацентарных млекопитающих), разрывает ковалентные связи между димерами.



Пути и механизмы репарации



Фотолиаза – белок, состоящий из 471 АК-ты и работающий в комплексе с 2 хромофорами: $FADH^-$ и MTHF (5,10-метинил-тетрагидрофолилглутамат).

Реакция репарации включает 4 этапа:

1) свето-независимый этап:

Фотолиаза связывается с поврежденной областью ДНК;

2) свето-зависимый этап:

Излучение в синем спектре поглощается MTHF, с последующим безызлучательным переносом энергии возбуждения с MTHF* на $FADH^-$;

3) Электрон переносится с возбужденного $FADH^{-*}$ на циклобутановый димер тимина, что приводит расщеплению димера и образованию интактной цепи ДНК;

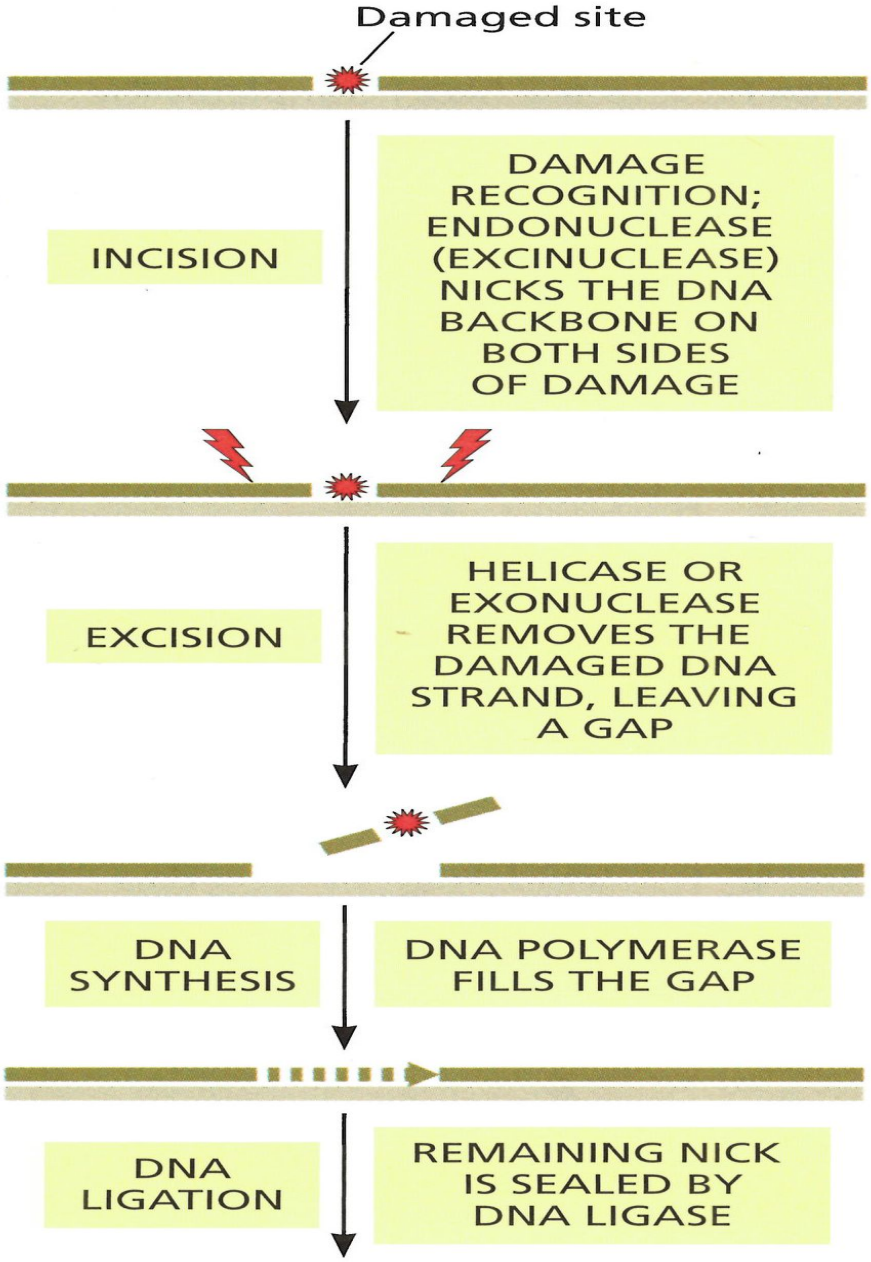
4) Электрон передается от восстановленной цепи ДНК назад FADH, завершая каталитический цикл.

Пути и механизмы репарации

Эксцизионное восстановление нуклеотидов (NER): восстановление оснований, нарушающих нормальную спирализацию ДНК.

Наиболее распространенный механизм репарации у эукариот и прокариот, состоящий из 4 этапов:

1. разрезание цепи;
2. вырезание поврежденного участка (22 – 30 нуклеотидов);
3. синтез комплементарной цепи;
4. лигирование.



Пути и механизмы репарации

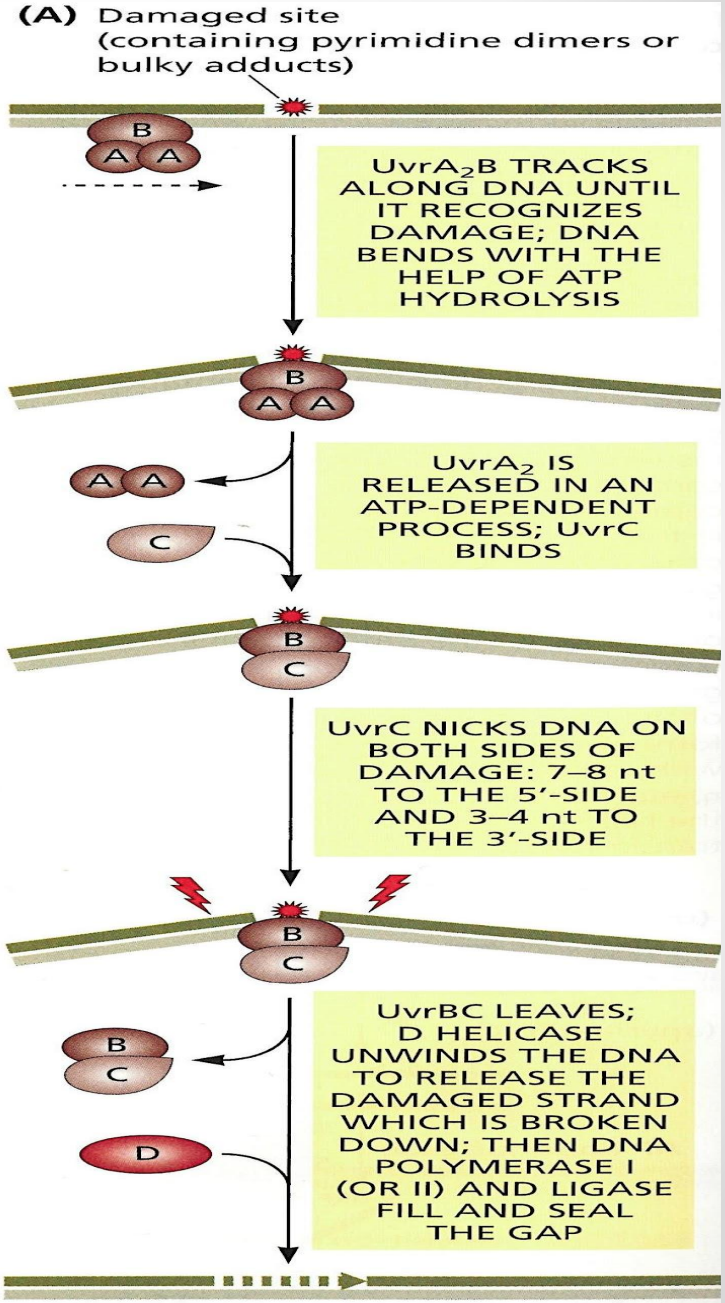
NER может осуществляться двумя путями.

1. В первом случае происходит гидролиз фосфодиэфирной связи по 3'- или 5'- концу на некотором расстоянии от ошибочно спаренного (поврежденного) нуклеотида, который далее целиком удаляется под действием 5'->3'- (или 3'->5'-) экзонуклеазы, гидролизующей цепь ДНК в соответствующем направлении от первоначального одноцепочечного разрыва в репарируемой цепи. Образующаяся брешь далее заполняется ДНК-полимеразой. Такой механизм репарации реализуется у *E. coli* и человека.
2. Второй механизм функционирует у всех исследованных видов организмов и заключается в использовании ферментной системы, которая вносит одноцепочечные разрывы по обе стороны от поврежденного нуклеотида на некотором расстоянии от него с последующим удалением одноцепочечного фрагмента ДНК, содержащего измененный нуклеотид.

Пути и механизмы репарации

NER у бактерий

Комплекс белков ***UvrA*** и ***UvrB*** связывается с молекулой ДНК и передвигаются по ней до тех пор, пока не доходят до повреждения. ***UvrA*** диссоциирует, позволяя связаться с цепью нуклеазе ***UvrC***. Комплекс ***UvrBC*** разрезает цепь с 2-х сторон от повреждения. После отсоединения комплекса ***хеликаза D*** раскручивает ДНК для удаления вырезанного поврежденного участка. После чего ***ДНК полимераза (I*** или ***II)*** и ***лигаза*** достраивают участок.



Пути и механизмы репарации

NER у эукариот:

- ***Global genome repair (GGR)***
- ***Transcription-coupled repair (TCR)***.

Направлены на репарацию одних и тех же повреждений во всем геноме или только в транскрибируемых генах. TRC наблюдается также и у бактерий. GGR необходим пролиферирующим клеткам, чтобы геном был правильно реплицирован и транскрибирован. В дифференцированных клетках работает TRC, поскольку в них не происходит репликации.

Пути и механизмы репарации

NER у эукариот:

- ***Global genome repair (GGR)***
- ***Transcription-coupled repair (TCR)***.

Наличие повреждений в транскрибируемых генах может иметь 2 последствия:

1. Повреждение приводит к образованию миссенс или нонсенс мутаций и как следствие нефункциональный белок;
2. РНК полимераза II останавливается на повреждении, как следствие отсутствует продукция РНК и белка, более того, полимераза изымается из пула активных полимераз и деградирует или служит сигналом для начала TRC.

Пути и механизмы репарации

NER у человека на примере пигментной ксеродермы (XP).
Анализ различных клеточных линий XP определил 7 генов (от XPA до XPG), мутации в которых ответственны за XP.

XPA – белок, обладающий доменом типа "цинковые пальцы", участвует в распознавании поврежденного участка ДНК. XPA взаимодействует своим N-концевым доменом с гетеродимером ERCC1-XPF, а C-концевым доменом – с TFIIH, обладает эндонуклеазной активностью, специфичной в отношении одноцепочечной ДНК.
Белок **RPA** образует комплекс с XPA и усиливает его специфичность в отношении поврежденной ДНК, необходим для репликации ДНК и репаративного синтеза, а также для прохождения этапа двойного надреза ДНК во время NER, обладает умеренным сродством к поврежденной ДНК.
TFIIH - олигомерный комплекс, один из семи основных факторов транскрипции, необходимых для эффективного функционирования РНК-полимеразы II, фактор репаративной системы.
XPC – белок, существующий в виде гетеродимера в комплексе с белком p58, который является гомологом белка Rad23 дрожжей (HHR23B). XPC слабо связывается с TFIIH и очень прочно с одноцепочечной ДНК.
ERCC1 (DNA excision repair protein)/XPF – белковый комплекс, с которым взаимодействует белок XPA.
XPG – белковый комплекс, обладающий эндонуклеазной активностью, специфичной в отношении одноцепочечной ДНК; вовлекается в эксцизионный комплекс посредством взаимодействия с TFIIH и RPA.

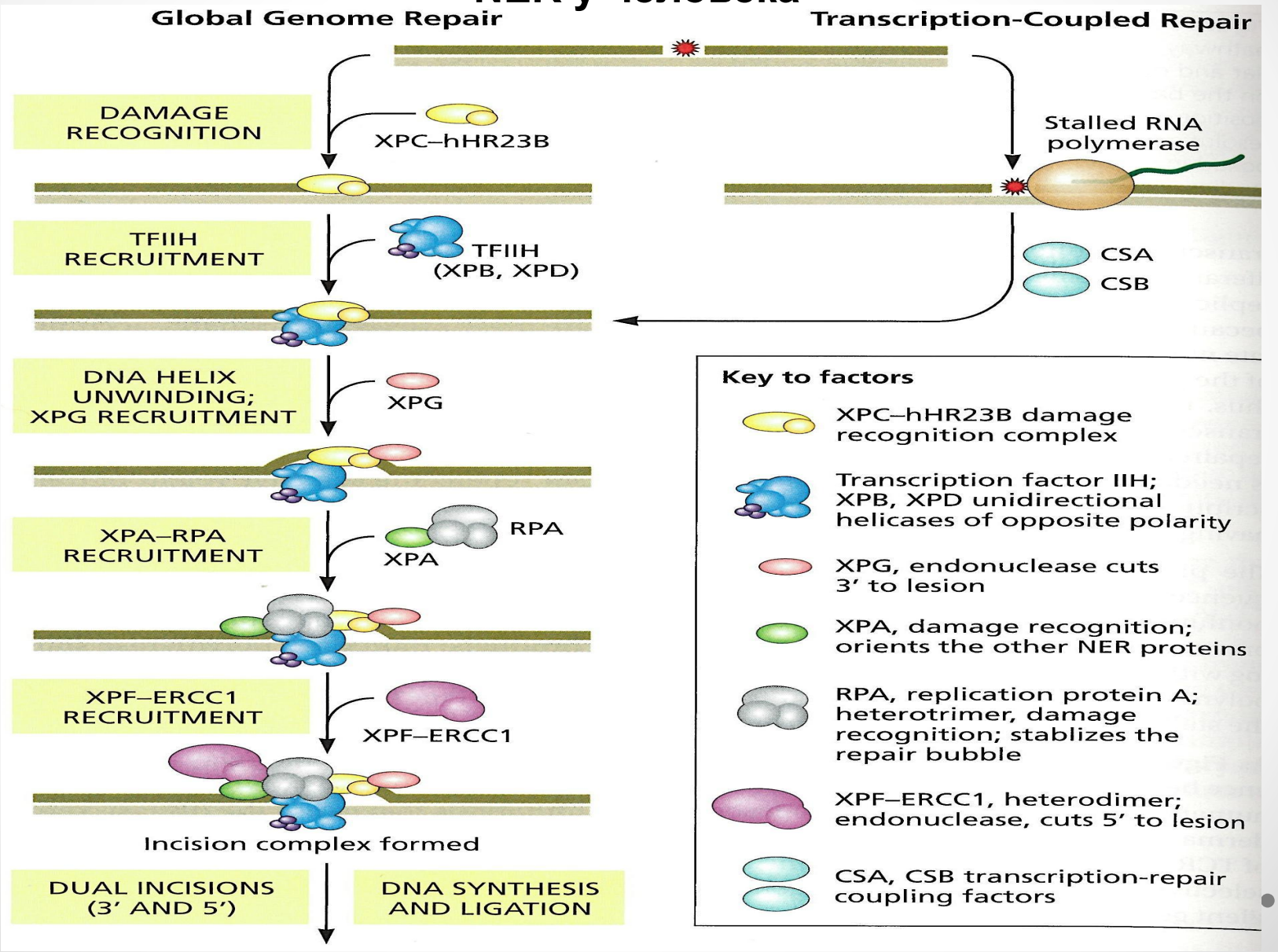
Пути и механизмы репарации

NER у человека

Белковая система	Белки системы / субъдиницы	Ферментативная активность	Функция в репарации
XPA	XPA (p31)	Связывание ДНК	Распознавание повреждения
RPA	P70; p34; p11	То же	То же
TFIIH	XPB/ERCC3 (p89) XPD/ERCC2 (p80) p 62 p 44 Cdk7 (p41) CycH (p38) p34	ДНК-зависимая АТРаза Локальное расплетание ДНК Фактор транскрипции Киназа, активирующая Cdk	Образование преинцизионного комплекса Сопряжение транскрипции и репарации
XPC	XPC (p125)/ HHR23B (p112)	Связывание ДНК	?
XPF	XPF/ERCC4 (p112) ERCC1 (p33)	Эндонуклеаза	5’-Концевое надрезание ДНК
XPG	XPG/ERCC5 (p135)	»	3’-Концевое надрезание ДНК

Пути и механизмы репарации

NER у человека



Пути и механизмы репарации

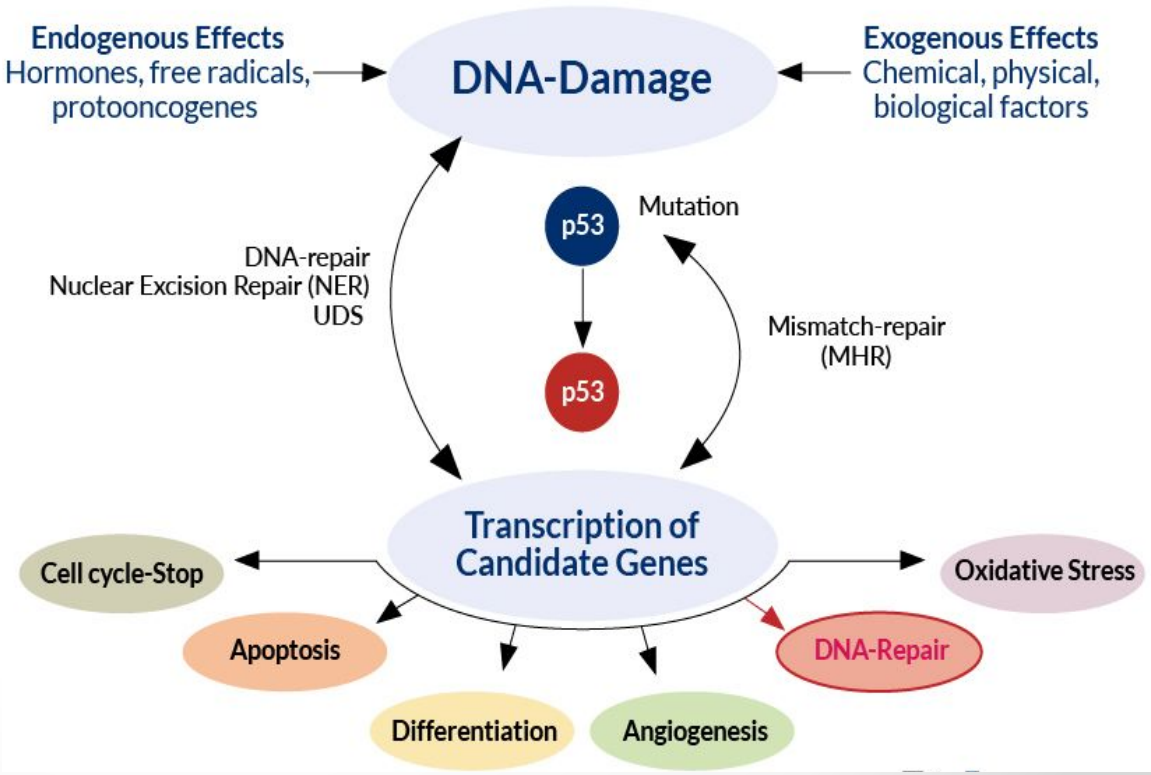
NER у человека

Human Gene	Protein Function	Analogous to *E. coli:*
XPA	Binds damaged DNA	UvrA/UvrB
XPB	Helicase, Component of TFIIH	UvrD
XPC	DNA damage sensor	
XPD	Helicase, Component of TFIIH	UvrD
XPE	Binds damaged DNA	UvrA/UvrB
XPF	Works with ERRCI to cut DNA	UvrB/UvrC
XPG	Cuts DNA	UvrB/UvrC

Пути и механизмы репарации

Регуляция NER

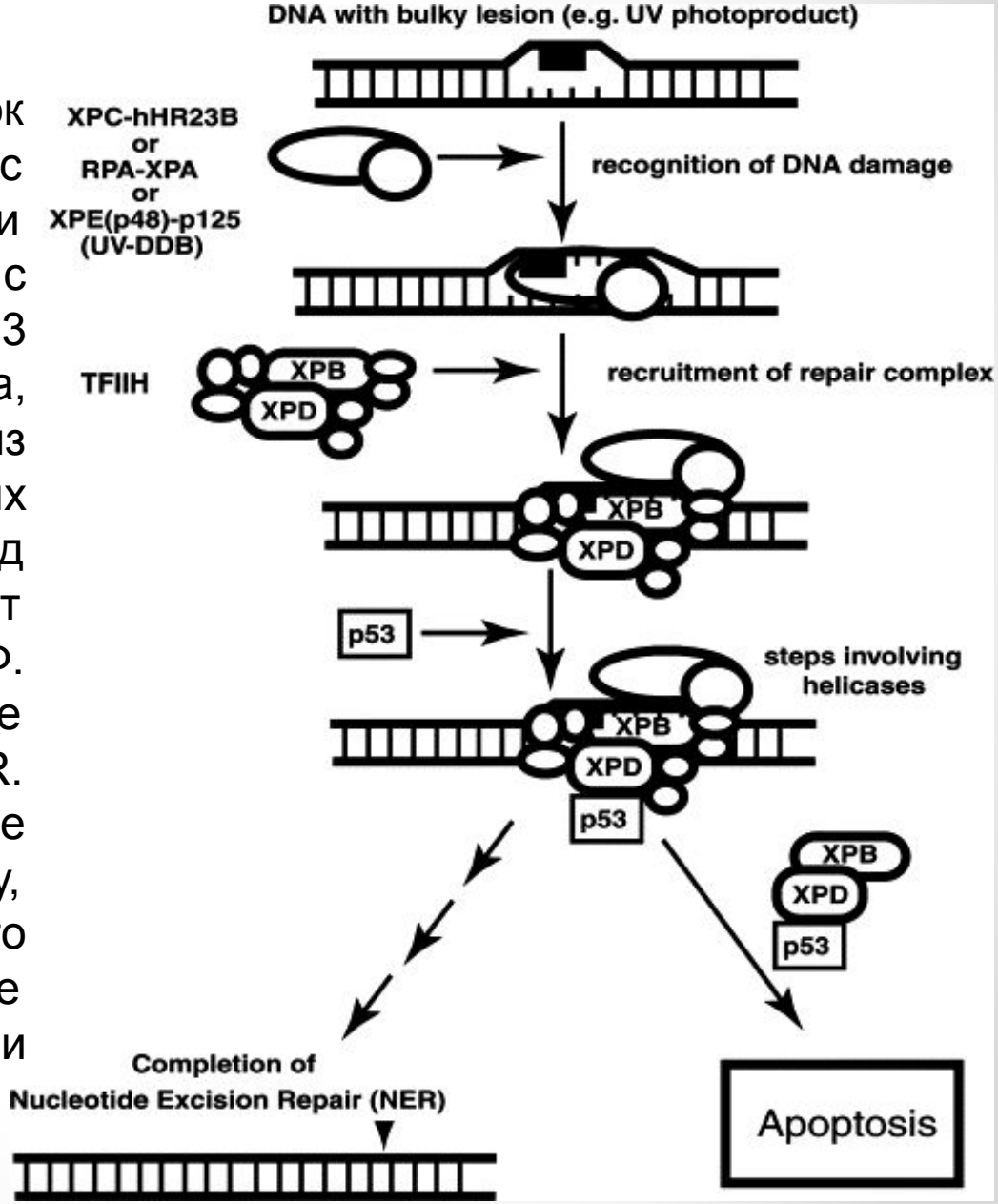
Для клеток животных не характерен SOS-ответ, свойственный клеткам E. coli и представляющий собой суммарную реакцию бактериальной клетки на повреждение ДНК различными агентами, проявляющийся в усилении транскрипции генов NER. Посттрансляционные модификации белков репарации, происходящие в ответ на повреждение ДНК, не влияют на активность эксцинуклеазы человека. Обнаружено, что повреждения ДНК стабилизирует белок p53 – белок-супрессор опухолевого роста, являющийся регулятором транскрипции.



Пути и механизмы репарации

Регуляция NER

Имеются данные о том, что белок p53 может взаимодействовать с белками XPB и RPA, необходимыми для NER. Однако клетки с инактивированными генами p53 (p53(-/-)), как и клетки дикого типа, эффективно удаляют из поврежденной ДНК два основных фотопродукта, возникающих под действием УФ-света, и обладают такой же устойчивостью к УФ. Поэтому считается, что белок p53 не оказывает прямого влияния на NER. Белки Cdk7 и циклин H, которые образуют Cdk-активирующую киназу, входят в состав комплекса TFIIH, что позволяет предполагать наличие связи репарации ДНК с фазами клеточного цикла.



Пути и механизмы репарации

Эксцизионное восстановление оснований (NEB):
удаление поврежденных оснований в следствие химических изменений оснований: образование урацила при дезаминировании цитозина, метилированных оснований и окисленных (8-оксогуанин).

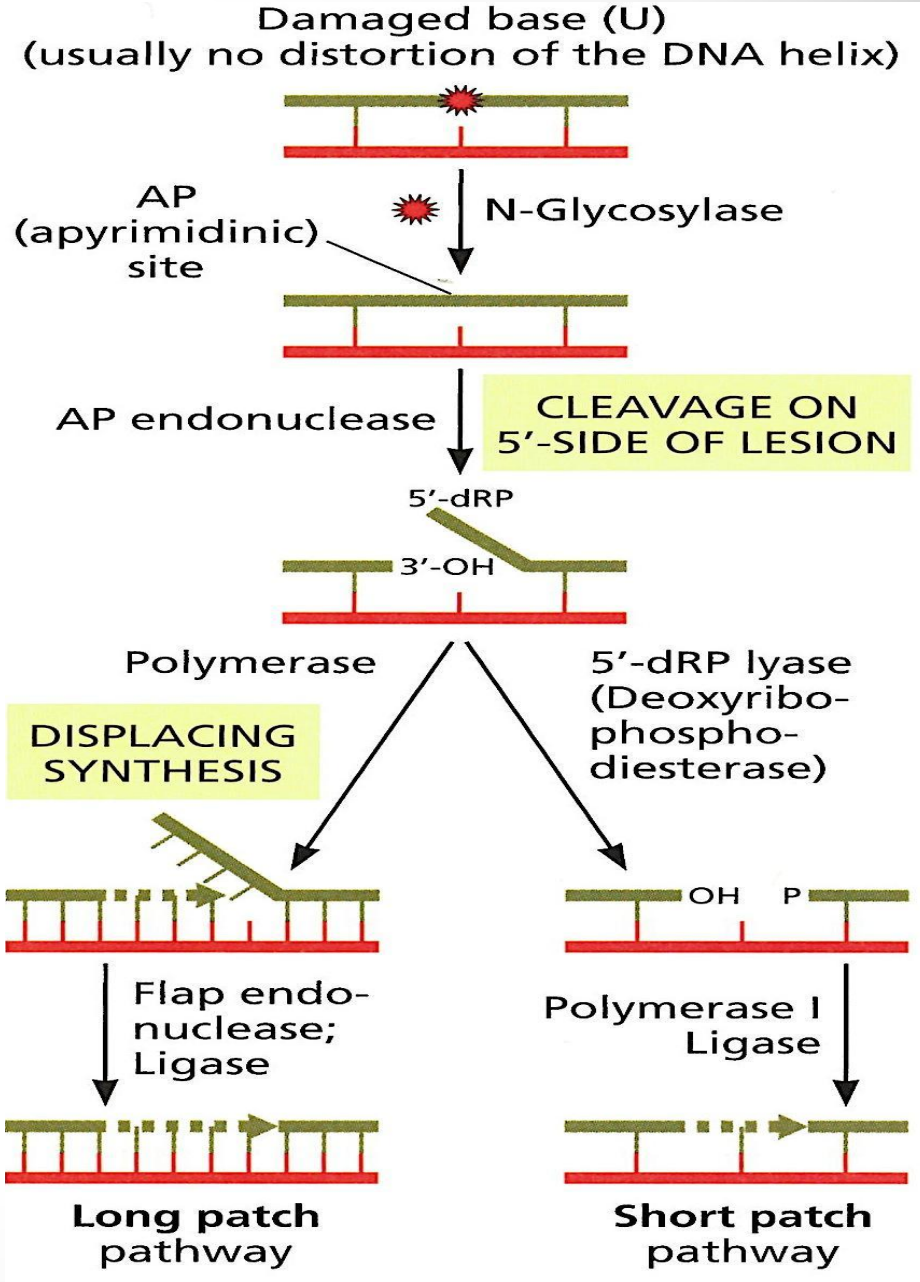
NEB этапы:

1. Расщепление гликозидной связи;
2. Удаление основания;
3. Достройка основания.

Пути и механизмы репарации

NEB этапы:

1. Расщепление с помощью N-гликозилазы гликозидной связи между поврежденным основанием и дезоксирибозой;
2. Образуется апуриновый/апиримидиновый сайт (AP), который распознает AP эндонуклеаза;
3. На основе длины участка выделяют: короткий (замена 1 нуклеотида; 99% всех случаев) и длинный (замена 2 и более нуклеотидов; 1% случаев) пути, различающиеся участвующими в них ферментами;
4. Фосфодиэстераза отщепляет фосфодезоксирибозу с образованием бреши в 1 или несколько нуклеотидов;
5. ДНК полимераза вставляет нормальные нуклеотиды;
6. ДНК лигаза сшивает концы.

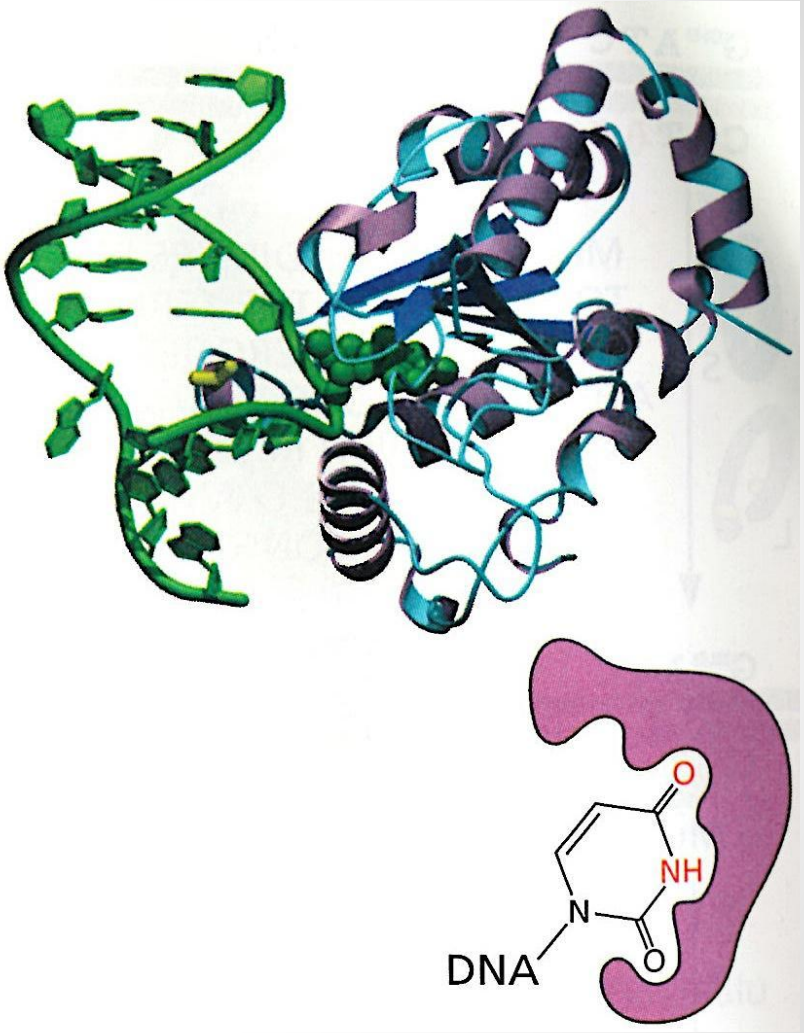


Пути и механизмы репарации

Для некоторых алкилированных оснований (N-метиладенина, 3-метиладенина, 7-метилгуанина) почти во всех клетках есть специфические N-гликозилазы.

Вырезания урацила осуществляется с помощью **урацил-ДНК гликозилазы** (**UNG**).

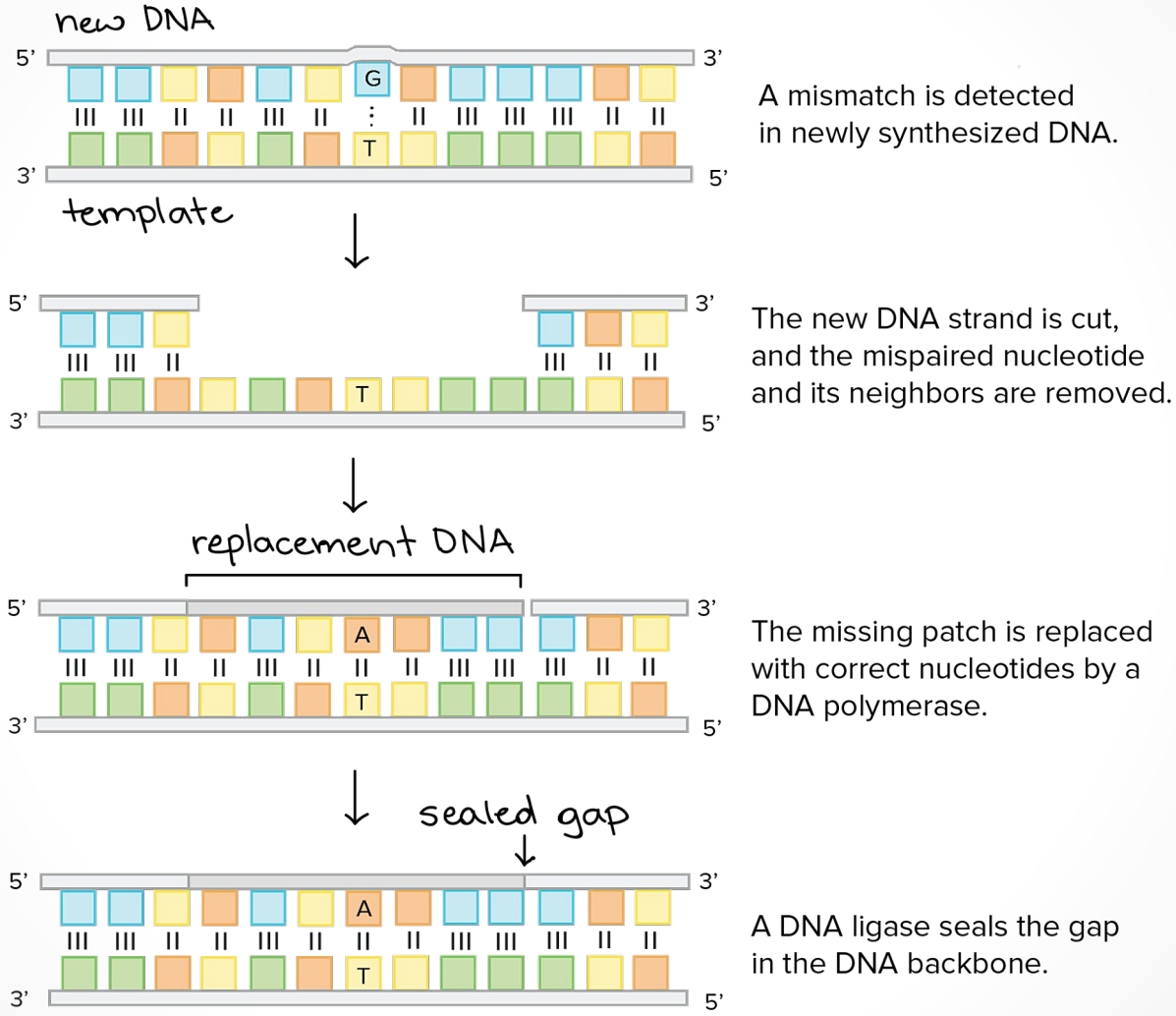
Для выявления урацила в цепи происходит термическое или спонтанное плавление пар T-A и U-A без активного участия фермента. После чего урацил захватывается ферментом и удаляется из цепи ДНК.



Структура урацил-ДНК гликозилазы (UNG)

Пути и механизмы репарации

Репарация ошибочно спаренных оснований (MMR)



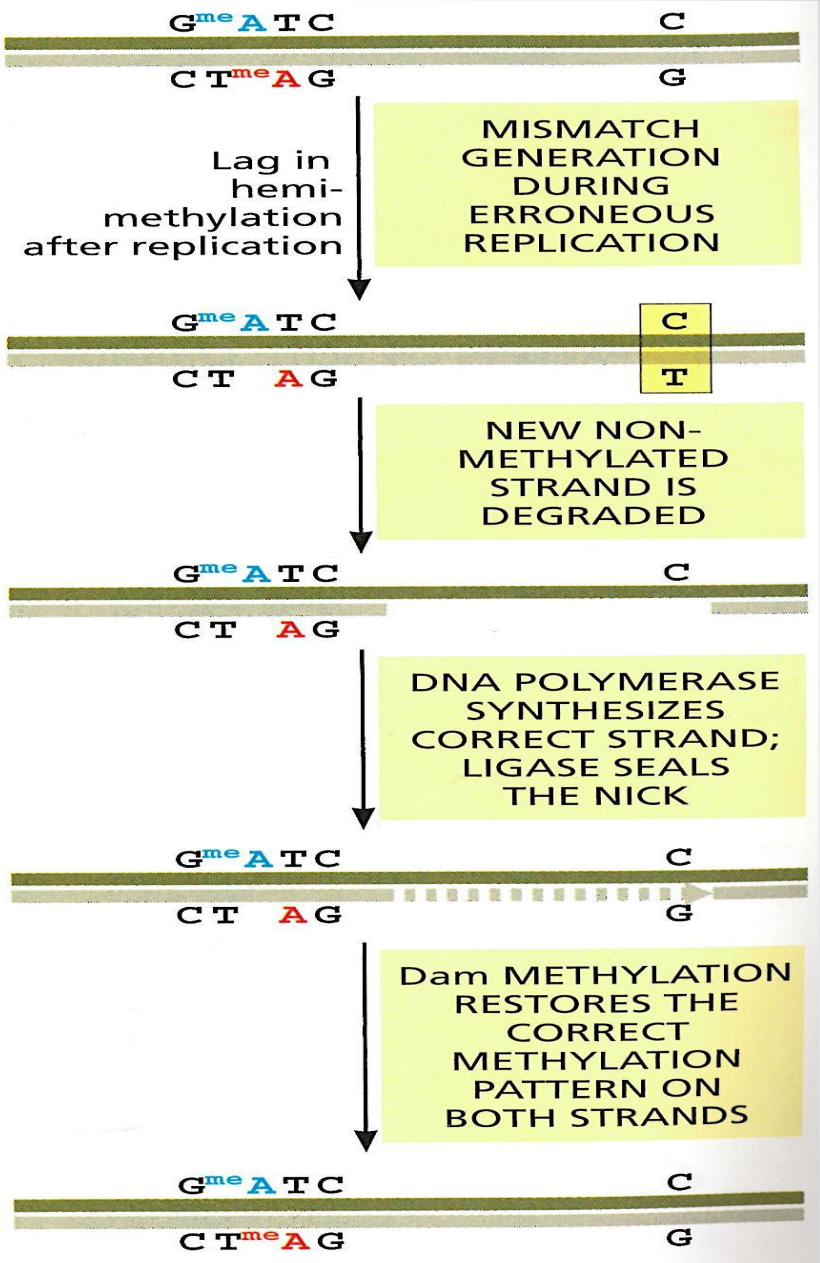
У бактерий и эукариот MMR требует ген Mut. Мутации в нем приводят к увеличению частоты спонтанных мутаций в геноме после репликации.

Пути и механизмы репарации

Метил-направленная MMR у бактерий

Распознавание неправильно спаренного основания осуществляется с помощью всегда метилированного аденина на обоих цепях ДНК в GATC (встречается каждые 256 п.о.). CH3- к новой цепи добавляется с запаздыванием на 2 мин с и требует активации Dam метилтрансферазы. Гемиметилаза распознает CH3- на старой цепи и метит новую.

У эукариот фермент Dnmt1, участвующий в метилировании CpG динуклеотидов, не принимает участия в MMR.

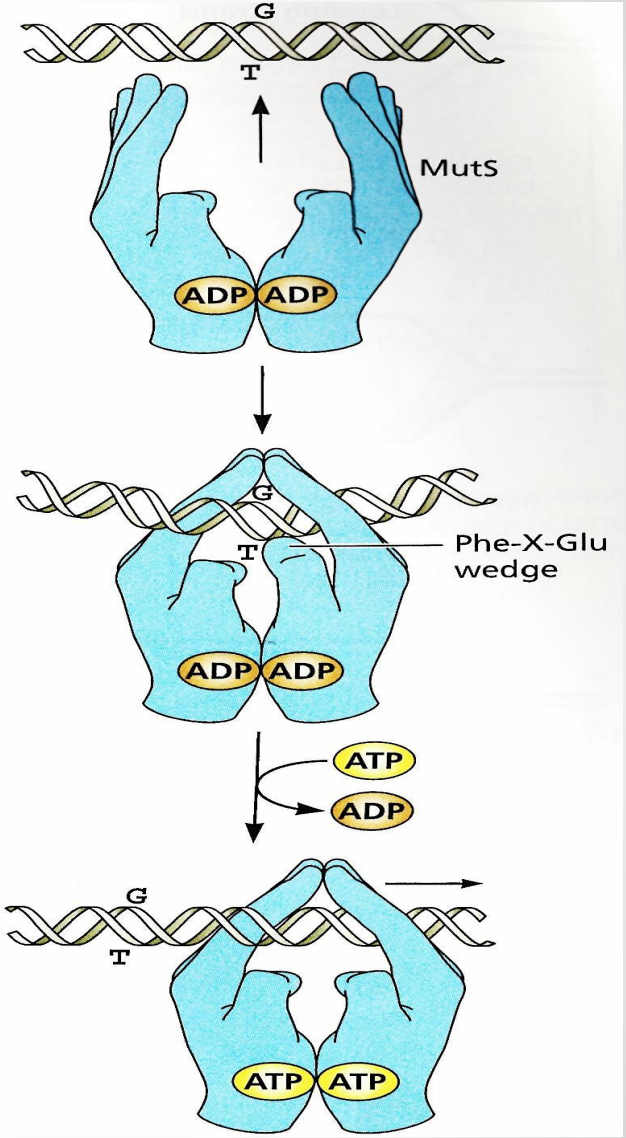


Пути и механизмы репарации

Метил-направленная MMR у бактерий в процессе репликации

Инициация MMR происходит при связывании комплекса MutS-MutL с ДНК.

В отсутствии связи с ДНК пальцевой домен MutS не структурирован и открыт, а ATP-связывающие сайты димеризованы. В присутствии ДНК с ошибкой ADP-связи образуют захват MutS вокруг ДНК и удерживают, т.о., неправильную пару посредством Phe-X-Glu «клина», вставленного в малую бороздку ДНК. В присутствии ATP происходят конформационные изменения, приводящие к удалению «клина» и возможности MutS захвата свободно перемещаться по цепи.



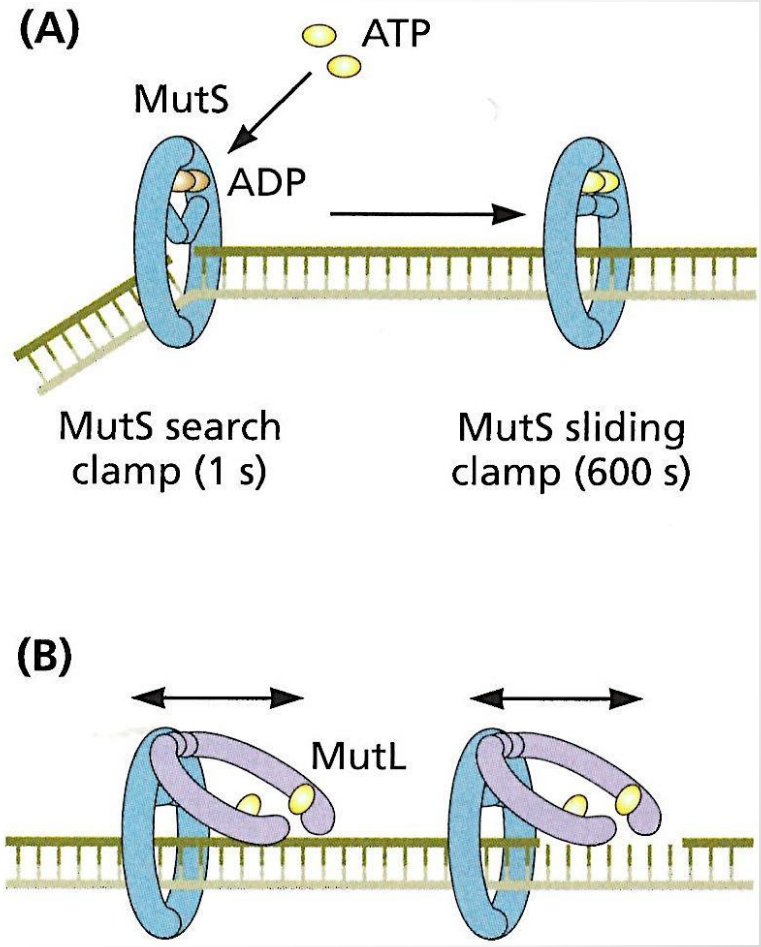
MutS и его активация

Пути и механизмы репарации

Метил-направленная MMR у бактерий в процессе репликации

A) MutS образует временный захват ДНК (1с), которая при этом сканируется на наличие ошибок, перемещение осуществляется посредством одномерной вращательной диффузии на ≈700 п.о. Обнаруженная ошибка обуславливает связывание ATP, кот. индуцирует образование скользящего по ДНК захвата MutS. Этот захват остается стабильным в течение ≈600 с. Это время необходимо для завершения процесса MMR. Стабильность захвата на ДНК не зависит от гидролиза ATP, роль которого пока не ясна.

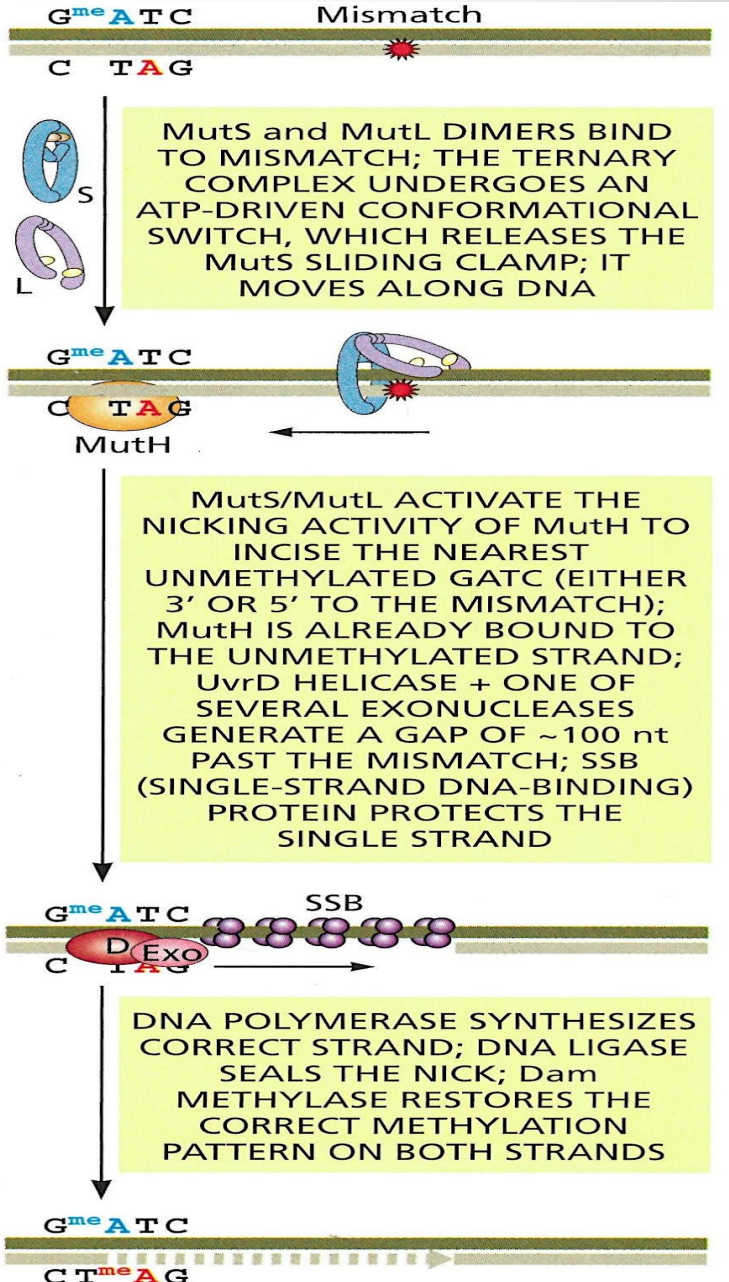
B) Короткие одноцепочечные участки, связанные с MMR, провоцируют отделение комплекса от ДНК, кот. затем может опять присоединиться.



Пути и механизмы репарации

Метил-направленная MMR у бактерий в процессе репликации

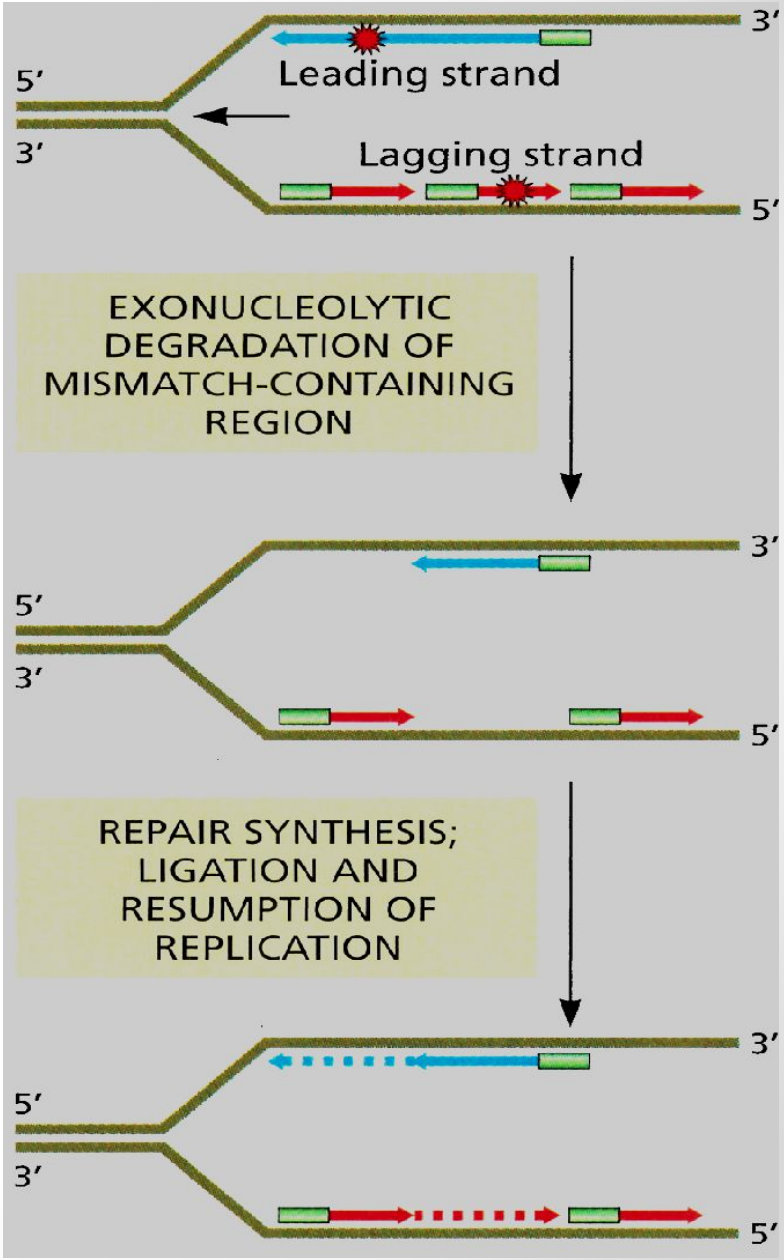
Инициация MMR происходит при связывании комплекса MutS-MutL с ДНК. Связывание ATP приводит к отделению комплекса от сайта ДНК с ошибкой. Когда скользящий захват достигает MutH, связанного с CTAG в новой неметилированной цепи, он активирует его нуклеазную активность. MutH вносит одноцепочечные разрывы в новую цепь при гемимелированных сайтах, расположенных в пределах ≈1 kb от ошибки. Т.о. разрывы (3’ или 5’ по отношению к ошибке) являются отправной точкой для ДНК хеликазы II и SSB белков, образующих одноцепочечную ДНК, кот. расщепляется 3’ или 5’-экзонуклеазами. После чего ДНК полимераза III синтезирует правильную цепь, лигаза завершает MMR.



Пути и механизмы репарации

MMR у эукариот

Как происходит выбор цепи для репарации до сих пор до конца не ясно. MutS и MutL – высоко-консервативные белки, MutH обнаружен только у Грам- бактерий, функциональные гомологи у других организмов не выявлены. Предполагается, что MMR у эукариот может быть направлена одноцепочечными разрывами цепей, происходящими в процессе репликации, таким как 3’-конец лидирующей цепи или концы фрагментов Оказаки. Восстановление лидирующей цепи может происходить по 3’-концу с помощью полимеразы ресинтезирующей фрагмент; в отстающей цепи весь фрагмент Оказаки может быть удален посредством деградации с обоих концов.



Пути и механизмы репарации

MMR у эукариот

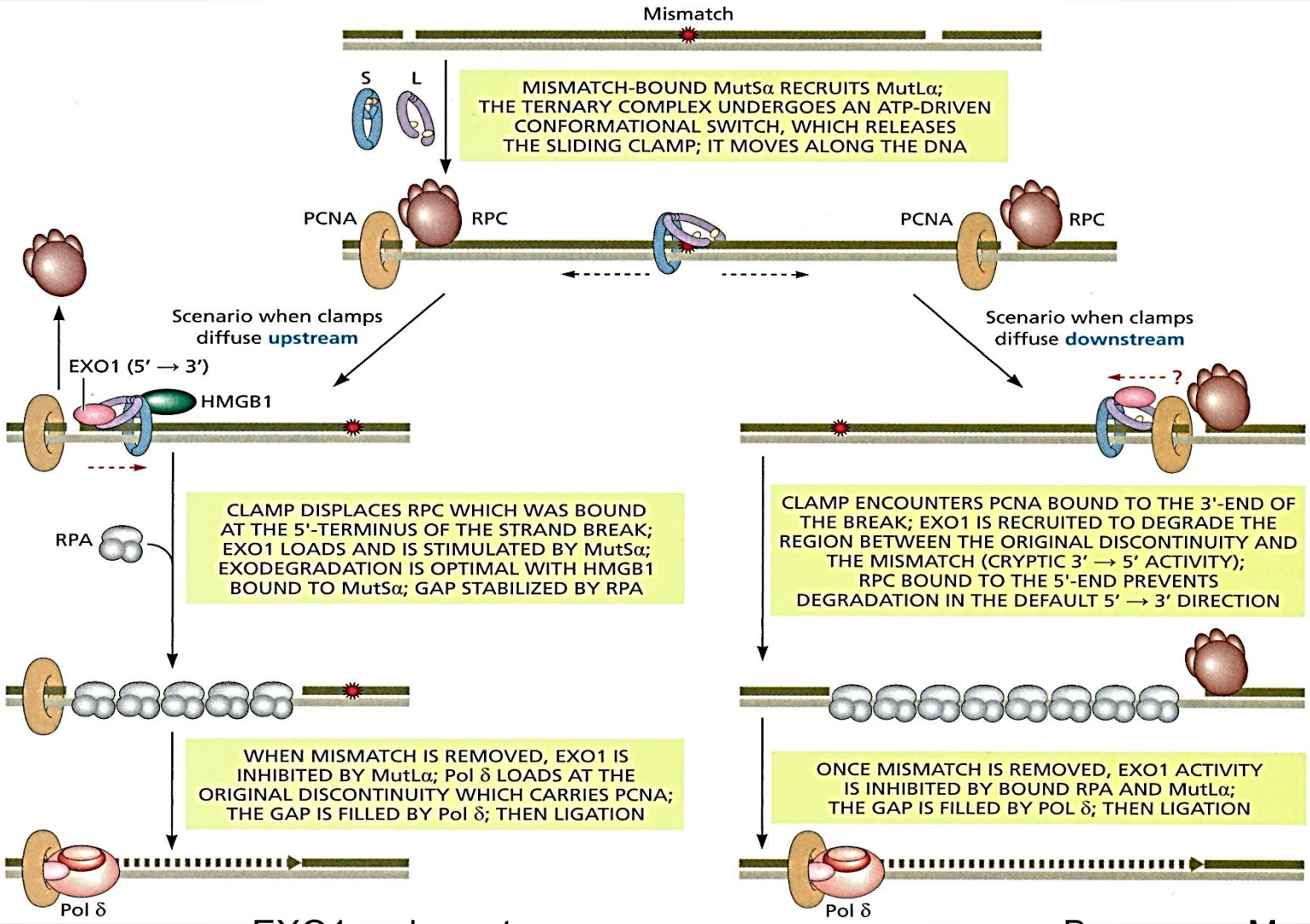
Репарация инициируется при связывании неправильного основания с комплексами MutS гомологов, MSHs, или MSH2-MSH6 (MutSα), или MSH2-MSH3 (MutSβ). Предполагаемый механизм MMR в процессе репликации основан на механизме, осуществляемом с помощью белков рекомбинации: MutSα или MutSβ, белка репликации A (RPA), экзонуклеазы 1 (EXO1), ядерного антигена клеточной пролиферации (PCNA), фактора репликации C (RFC), ДНК полимеразы δ (Pol δ) и ДНК лигазы. Эукариотическая ДНК хеликаза не участвует в подобных механизмах репарации.

У E.coli в MMR вовлечено более одной экзонуклеазы, а также некоторые другие белки. Ресинтенз ДНК катализируется афидиколин-чувствительной полимеразой, возможно Pol δ.

Афидиколин – фермент, ингибитор синтеза ДНК у эукариот.

Пути и механизмы репарации

MMR у эукариот



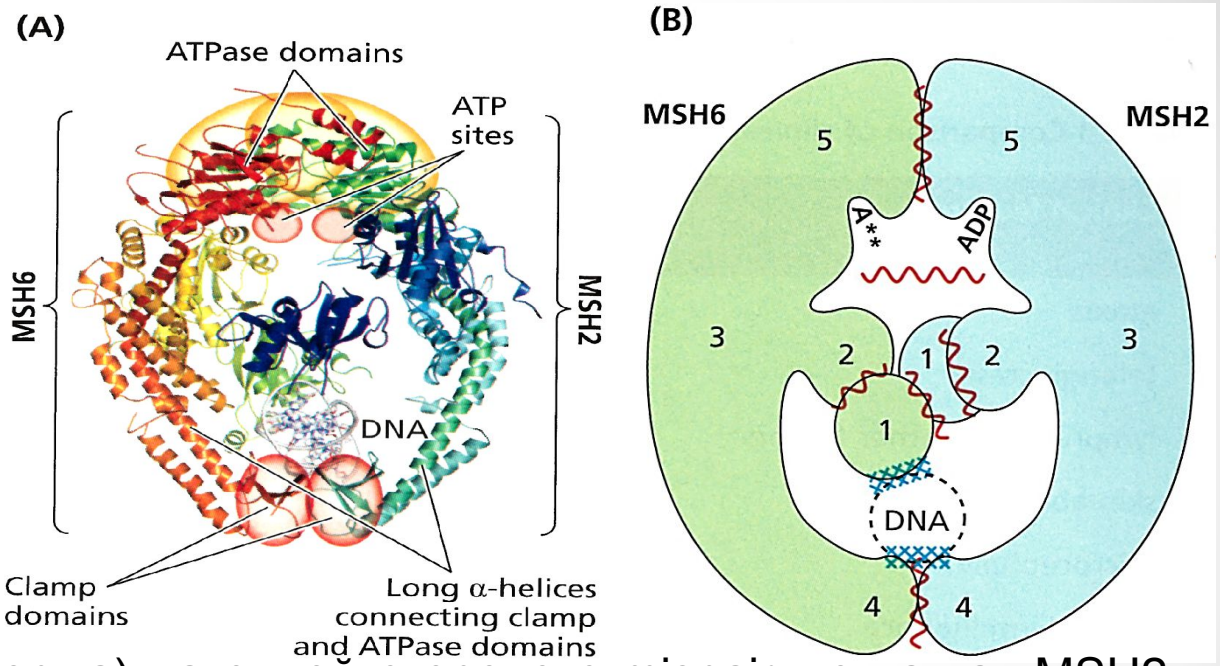
Скрытая активность EXO1 в downstream сценарии не вызывается. Возможно Mre11 или MutSα, RFC и PCNA активируют латентную эндонуклеазную активность MutLα ATP- и mismatch-зависимым образом.

Пути и механизмы репарации

MMR у эукариот

Структура MutSα-ADP-G-T mispair комплекса человека.

А) Кристаллическая структура при рарешении в 3Å. MutSα - ассиметричный димер из MSH2 и MSH6. Домен захвата контактирует с ошибкой на цепи ДНК. MSH6 контактирует с участком в 6 п.о. ДНК (B-форма) на одной стороне с mispair, тогда как MSH2 контактирует с обеих сторон от mispair. Длинные α-спирали соединяют захват с АТФазным доменом MutSα для осуществления перекрестного взаимодействия между сайтом связывания ДНК и ATP-связывающим сайтом. Связывание ATP приводит к отсоединению белка от mispair и его перемещению по цепи.



В) Схема, основанная на кристаллической структуре. Отдельные домены в обоих белках пронумерованы. Синяя штриховка – ДНК-белковые взаимодействия, красные линии – позиции вероятных конформационно-зависимых междоменных интерфейсов.

Семинар 26.01.2018

Syndrome	Clinical features	Mutated genes
Cockayne syndrome (CS)	neuronal degeneration, loss of retinal cells, cachexia or wasting syndrome: loss of appetite and weight, muscle atrophy, fatigue, weakness	*CSA, CSB*
trichothiodystrophy	neurological and skeletal degeneration, cachexia, ichthyosis or dry, rough, scaly skin, characteristic brittle hair and nails	*XPB, XPD, TTDA*
xeroderma pigmentosum (XP)	hypersensitivity to sun exposure, pigmentary alterations and premalignant lesions in sun-exposed skin areas, extremely high incidence of skin cancer	*XPA–D, XPF, XPG*
Fanconi anemia (FA)	pancytopenia or low number of blood cells, bone marrow failure and renal dysfunction, abnormal pigmentation, short stature, cancer	*FANC, BRCA2*
Nijmegen breakage syndrome (NBS)	immunodeficiency, increased cancer risk, growth retardation	*NBS1*
Bloom syndrome (BLS)	immunodeficiency, growth retardation, genomic instability, cancer	*BLM helicase*
Werner syndrome (WS)	atrophic skin, thin gray hair, osteoporosis, type II diabetes, cataracts, arteriosclerosis, cancer	*WRN helicase*
Rothmund–Thomson syndrome (RTS)	growth deficiency, graying hair, juvenile cataracts, skin and skeletal abnormalities, osteosarcoma, skin cancers	*RECQL4 helicase*
ataxia telangiectasia (AT)	progressive cerebellar degeneration leading to severe ataxia or lack of voluntary coordination of muscle movements, telangiectasia or dilated blood vessels, immunologic defects, cancer	*ATM*

Спасибо за внимание!

Пути и механизмы репарации

Репарация двухцепочечных разрывов (DSB)

DSB – наиболее опасное ДНК повреждение, поскольку: 1) очень сложны для репарации без внесения ошибок или мутаций в последовательность ДНК; 2) нарушение непрерывности в молекуле приводит к большому количеству хромосомных транслокаций и др. перестроек, кот. угрожают геномной целостности клетки. Репарация DSB осуществляется с помощью механизма, известного как **ответ на повреждение ДНК (DDR)**.

DDR – основной фактор, контролирующий контрольную точку клеточного цикла