

# Курс «Молекулярная биология клетки»

Основные концепции современной молекулярной биологии.

- Структура и стабильность генома. Структура ДНК, процессы репликации ДНК, репарации и пространственной организации генома.
- Реализация наследственной информации. Процессы, лежащие в основе "работы" (экспрессии) генов — транскрипция, трансляция. Жизненный цикл мРНК и посттрансляционная судьба белковых молекул.
- Клетка и окружающая среда. Взаимодействие клетки с окружающими её клетками через прямые межклеточные контакты и химические сигналы. Обмен веществ (метаболизм) и клеточный цикл.

## **Лекция 4.**

### **Исправление повреждений ДНК**

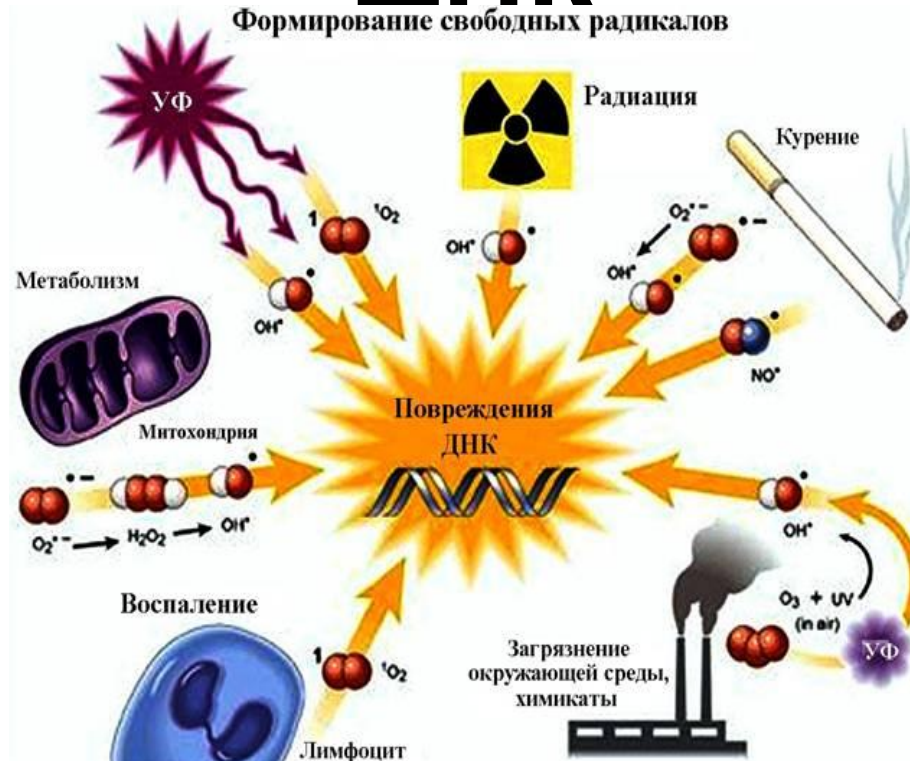
- какие основные виды процессов исправления повреждений (репарации) бывают;
- что такое прямая и эксцизионная репарация;
- как происходит коррекция ошибок ДНК-полимеразы и как с этим связано метилирование ДНК.

**База данных о человеке**

**<http://humbio.ru/>**

# Источники повреждения

## ДНК



- У *E.coli* более 50 генов контролируют процесс репарации
- Ежедневно в клетке человека в ДНК повреждается более 100 тыс звеньев
- Менее 1 повреждения из 1000 превращается в мутацию

# Репарация ДНК (DNA repair)

[лат. *reparatio* —  
восстановление]

- **Репарация** генетических повреждений – свойство живых организмов восстанавливать нарушения и повреждения, возникшие в ДНК в результате ошибок репликации, а также при воздействии разнообразных эндогенных и внешних мутагенных факторов.
- **Повреждение ДНК** – это не мутация.
- **Мутация** – это наследственное (фиксированное) изменение в

# Основные повреждения ДНК



# Наследственные заболевания

## (Online Mendelian Inheritance in Man)



Number of Entries in OMIM (Updated 22 March 2013) :

Prefix	Autosomal	X Linked	Y Linked	Mitochondrial	Totals
* Gene description	13,451	655	48	35	14,189
+ Gene and phenotype, combined	124	4	0	2	130
# Phenotype description, molecular basis known	3,433	272	4	28	3,737
% Phenotype description or locus, molecular basis unknown	1,627	133	5	0	1,765
Other, mainly phenotypes with suspected mendelian basis	1,757	124	2	0	1,883
Totals	20,392	1,188	59	65	21,704

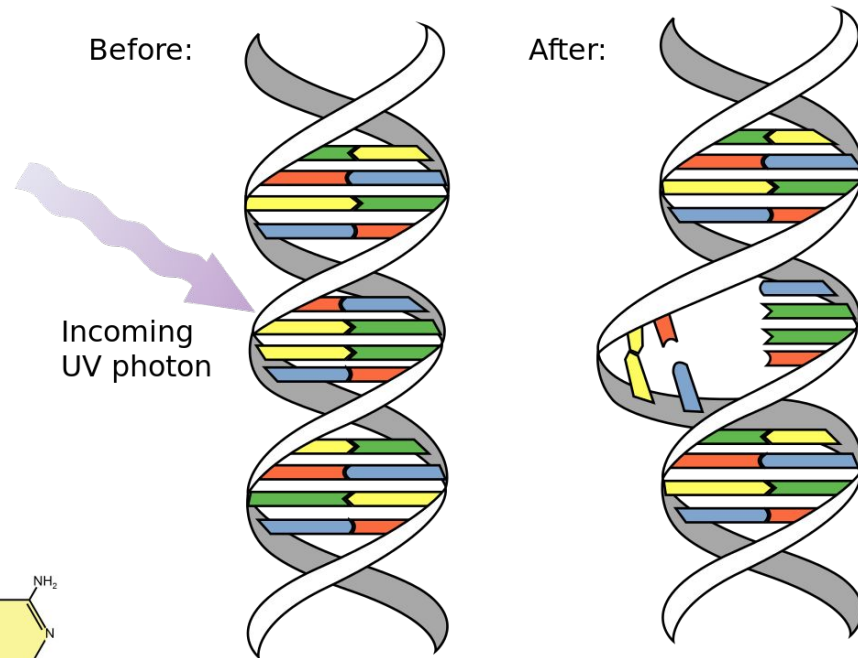
- Частота генетических заболеваний варьируется от 1:10 000 до 1:1 000 000
- Бывают и уникальные заболевания, 1 на 6 000 000 000
- Общая частота генетических заболеваний в популяции составляет около 3%
- В арабских странах около 6% (за счет близкородственных браков)

## Генетический груз популяции

каждый человек является носителем в среднем трех аутосомно-рецессивных аллелей

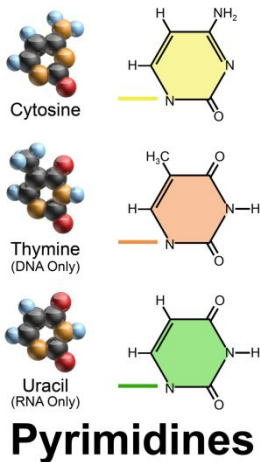


# Болезни связанные с дефектами системы репарации



**Меланома — одна из злокачественных опухолей кожи**

**Пиримидиновые димеры вызывают локальные конформационные нарушения в структуре ДНК**



# Болезни связанные с дефектами системы репарации

## Genetic diseases associated with defects in DNA repair systems

Disease	Symptoms	Genetic defect
Xeroderma pigmentosum	Frecklelike spots on skin, sensitivity to sunlight, predisposition to skin cancer	Defects in nucleotide-excision repair
Cockayne syndrome	Dwarfism, sensitivity to sunlight, premature aging, deafness, mental retardation	Defects in nucleotide-excision repair
Trichothiodystrophy	Brittle hair, skin abnormalities, short stature, immature sexual development, characteristic facial features	Defects in nucleotide-excision repair
Hereditary nonpolyposis colon cancer	Predisposition to colon cancer	Defects in mismatch repair
Fanconi anemia	Increased skin pigmentation, abnormalities of skeleton, heart, and kidneys, predisposition to leukemia	Possibly defects in the repair of interstrand cross-links
Ataxia telangiectasia	Defective muscle coordination, dilation of blood vessels in skin and eyes, immune deficiencies, sensitivity to ionizing radiation, predisposition to cancer	Defects in DNA damage detection and response
Li-Fraumeni syndrome	Predisposition to cancer in many different tissues	Defects in DNA damage response



Общая проблема репарации состоит в том, что ограниченным набором ферментов и механизмов клетка должна справиться со многими повреждениями вызванными самыми различными химическими и физическими агентами.



# Репарация ДНК

**В процессе репликации поврежденные основания могут быть исправлены различными путями:**

- 1) Прямое химическое исправление повреждений.**
- 2) Эксцизионная репарация (ER), поврежденное основание удаляется и заменяется новым.**

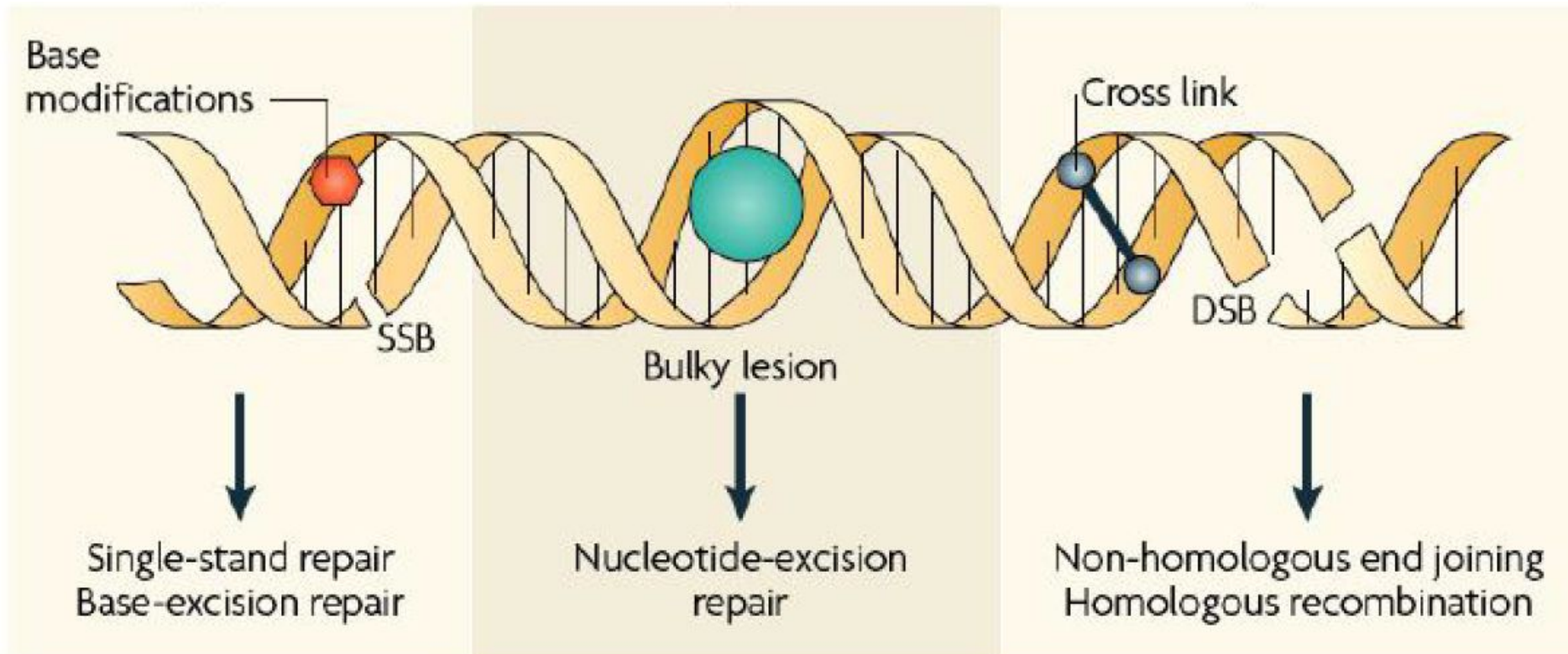
**Три модели эксцизионной репарации, в каждой из которых используется свой собственный набор ферментов:**

- Эксцизионная репарация оснований (BER).**
- Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER).**
- Мисмэтч репарация (MMR).**

## **Пострепликативная репарация**

- 1) Рекомбинационная репарация**
- 2) SOS-репарация – мутагенный или «ошибочный» путь репарации**

# Репарация ДНК



**BER**

**NER**

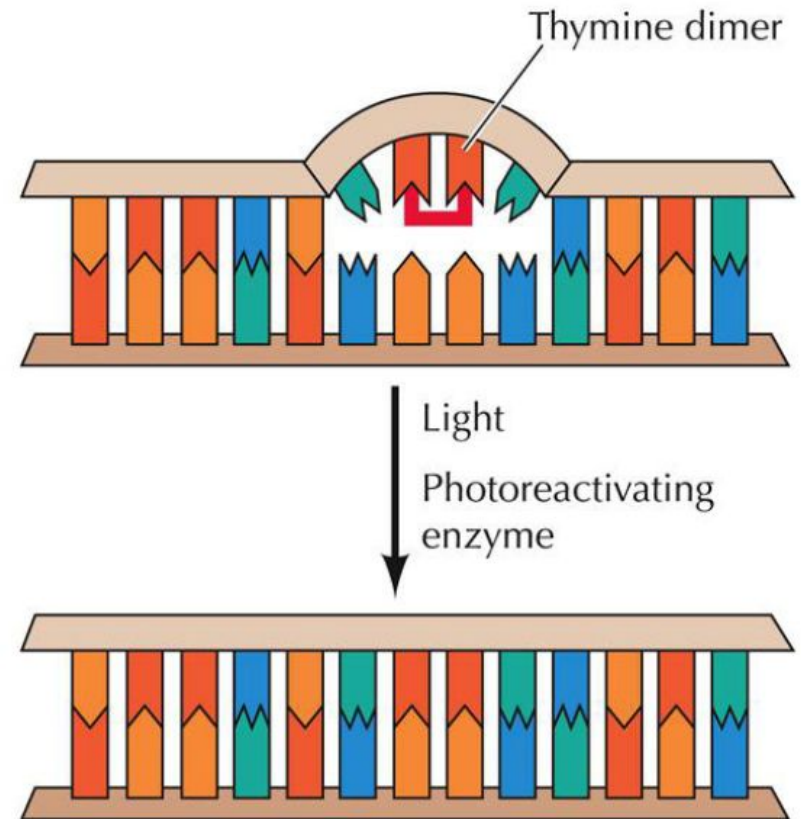
**NHEJ**

**HRR**

# Прямая репарация повреждений

## повреждений

- Прямая репарация исправляет повреждения ДНК, напрямую восстанавливая исходную структуру
- Один из примеров прямой репарации - фотореактивация (коррекция тиминовых димеров)



# Фотореактивация

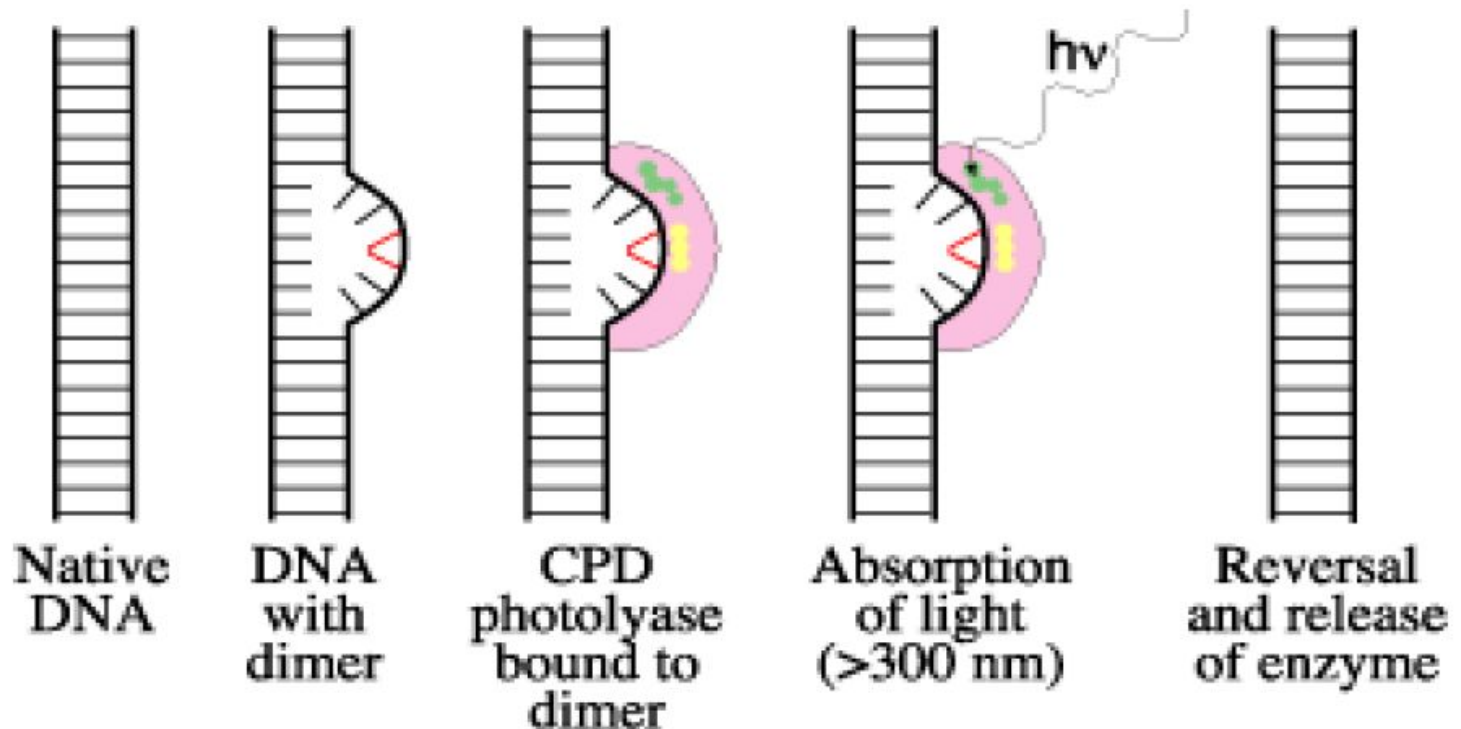
В фотореактивации участвует фермент фотолиаза, мономерный флавин-зависимый фермент, и кофакторы : FADH- и 5,10-метенилтетрагидрофолат (5,10-MTHF)

Фотолиаза связывается в темноте с димерами ТТ

На свету кофактор поглощает фотон

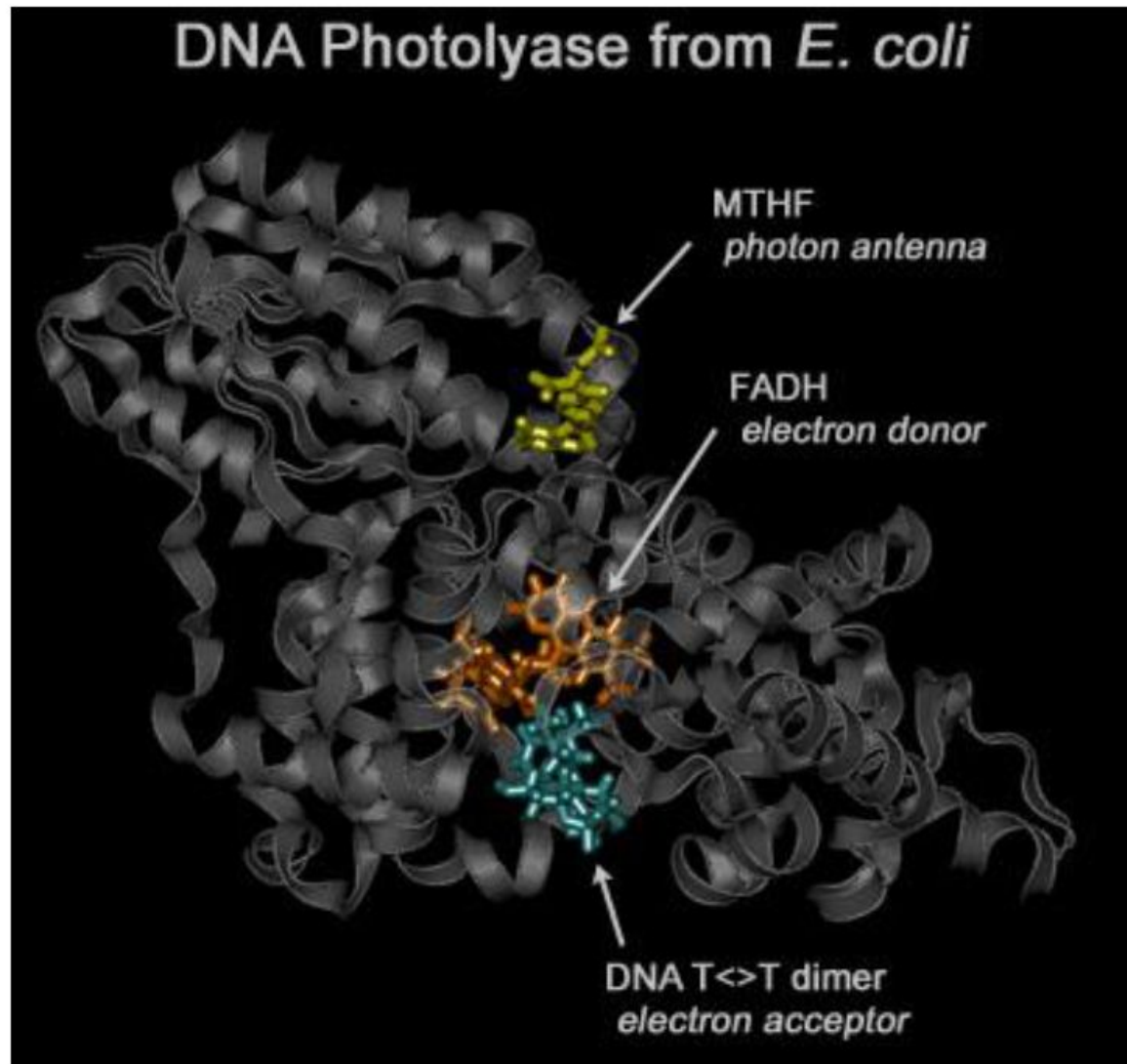
Используя эту энергию фотолиаза расщепляет ТТ димер

Фотолиаза освобождает ДНК



# Фотолиазы

- Принадлежат большому семейству фотолиаз-криптохромов.
- Представители этого семейства широко распространены во всех царствах
- У растений криптохромы регулируют рост, регулируемый синим светом, а у животных – циркадные ритмы.





# Эксцизионная репарация



**Mismatch repair**



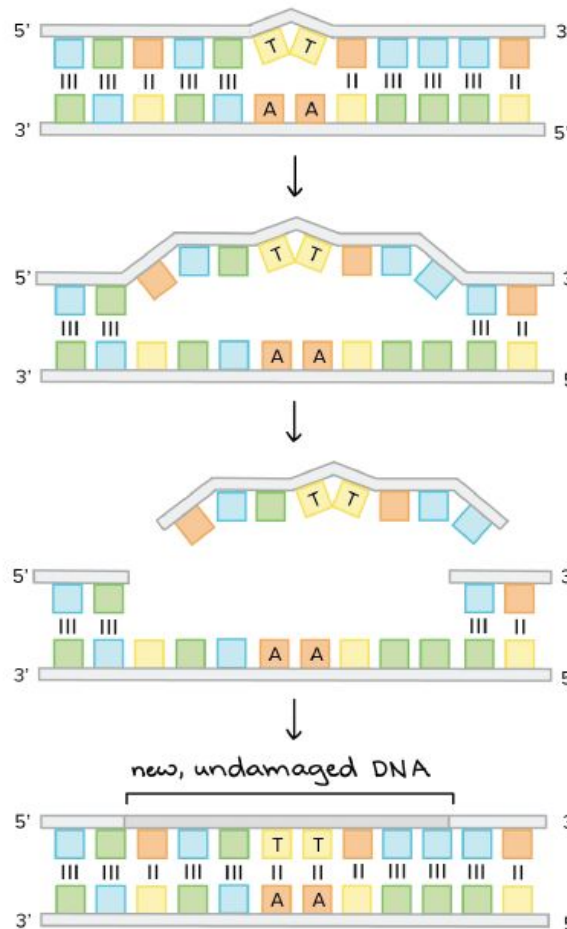
**Nucleotide excision repair (NER)**



**Base excision repair (BER)**

# Общий принцип эксцизионной репарации ДНК

- Эксцизионная репарация - процесс починки ДНК через вырезание поврежденного участка
- Репаративный синтез (заполнение бреши) осуществляется специальными ДНК-полимеразами



UV radiation produces a thymine dimer.

Once the dimer has been detected, the surrounding DNA is opened to form a bubble.

Enzymes cut the damaged region out of the bubble.

A DNA polymerase replaces the excised (cut-out) DNA, and a ligase seals the backbone.

# Эксцизионная репарация оснований (BER)

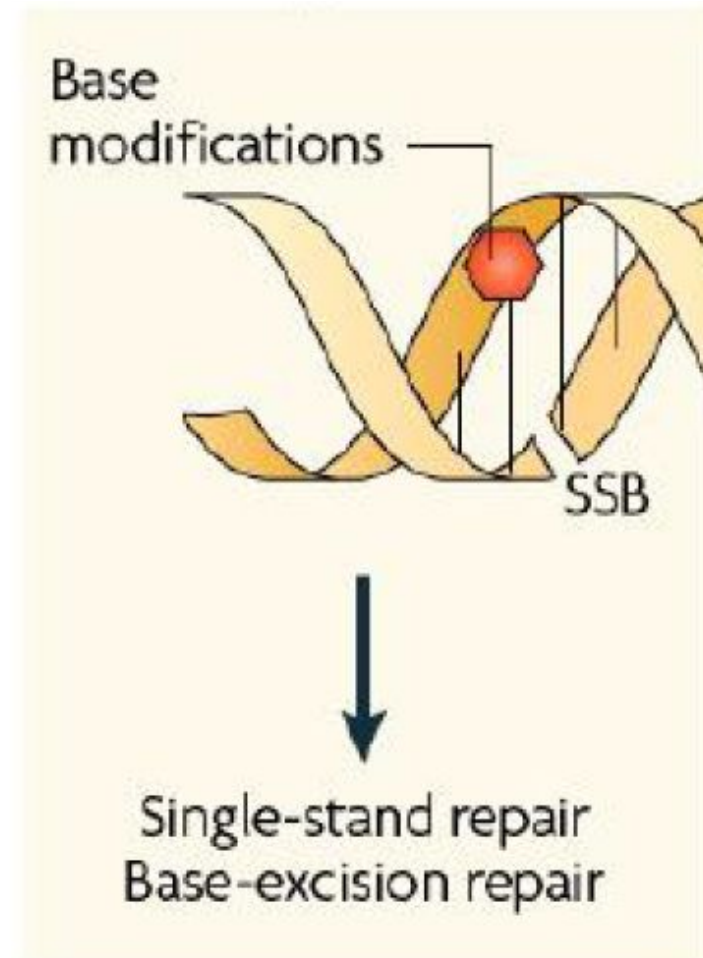
1) Поврежденные основания ДНК удаляют ферменты *гликозилазы*.

У человека в каждой клетке 20 тыс. замен в сутки; 8 генов кодирующих различные ДНК гликозилазы.

2) Удаление дезоксирибофосфата приводит к образованию пустоты в ДНК.

3) Замена правильным нуклеотидом.

4) Лигирование разрыва цепи



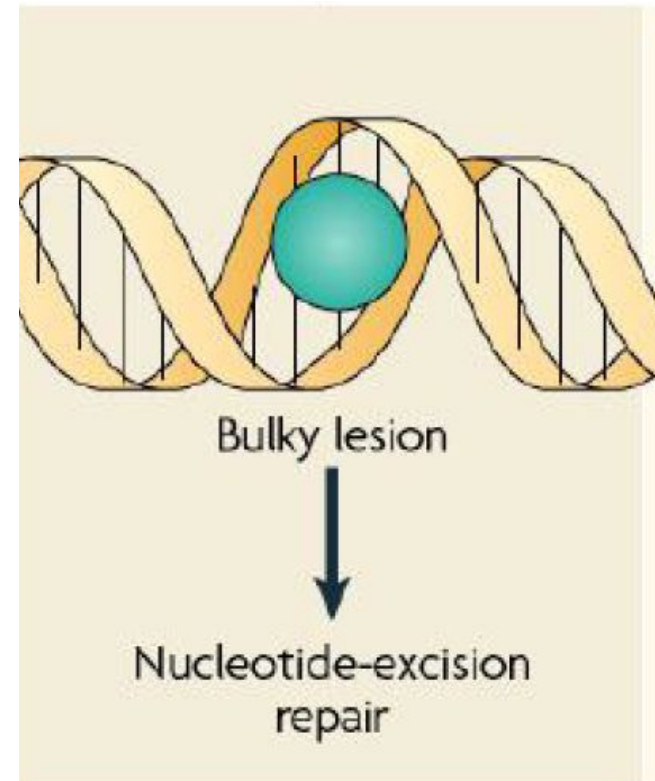
# ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗЫ И ЭНДОНУКЛЕАЗЫ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ И ЧЕЛОВЕКА, УЧАСТВУЮЩИЕ В BER

Фермент	Источник	Ген
Урацил-ДНК-гликозилаза	<i>E. coli</i>	ung
	<i>S. cerevisiae</i>	UNG
	Человек	UDG
3-Метиладенин-ДНК-гликозилаза	<i>E. coli</i>	tag
	<i>S. cerevisiae</i>	MAG
	Человек	MPG

Некоторые препараты используемые в химиотерапии также повреждают ДНК путем алкилирования

# Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER)

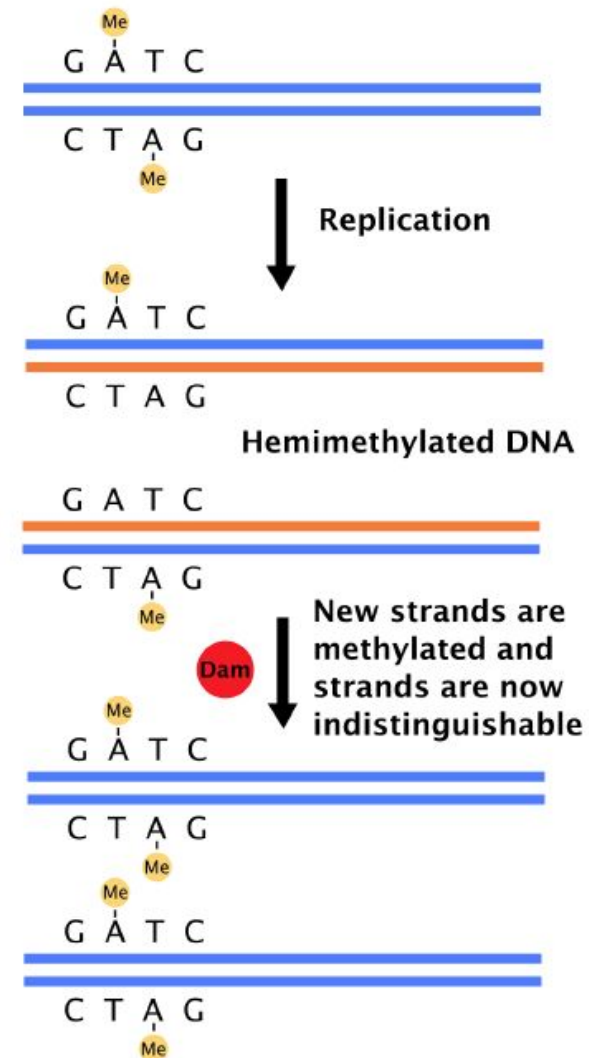
- 1) Повреждение распознается одним или несколькими факторами связывающимися с местом повреждения.
- 2) ДНК раскручивается в месте повреждения. В этом процессе участвуют различные транскрипционные факторы IIH, TFIIH.
- 3) Разрез ДНК происходит с 3' и 5'-конца от повреждения, в результате чего удаляется фрагмент ДНК содержащий поврежденный нуклеотид.
- 4) Новая цепь ДНК достраивается по матрице неповрежденной цепи ДНК полимеразы дельта или эпсилон.
- 5) Ф





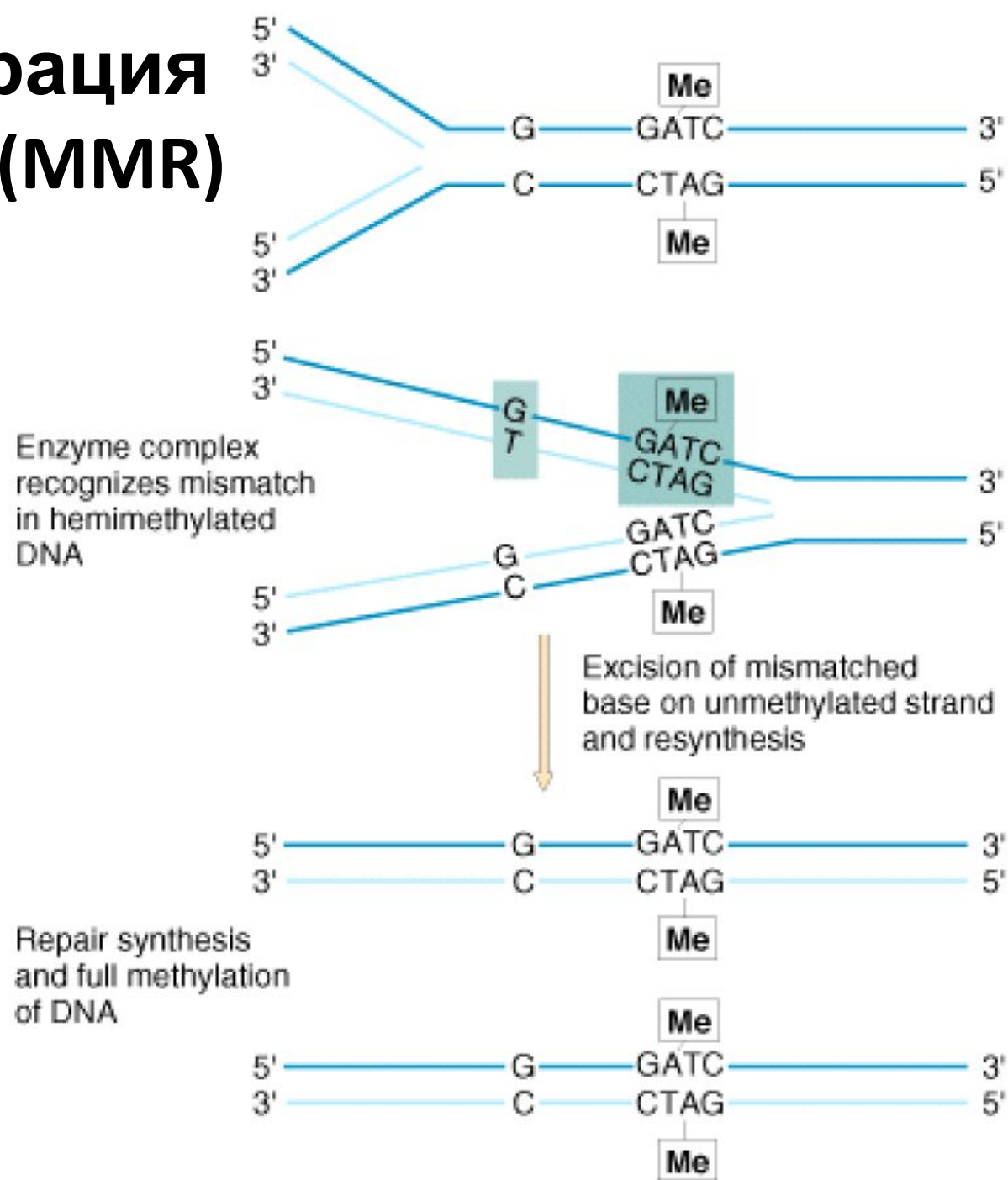
# Метилирование ДНК

- Метилирование ДНК - присоединение метильных групп к азотистым основаниям в ДНК
- Наиболее часто метилируется цитозин (C → 5mC)
- Метилирование играет роль как в регуляции работы генов, так и в процессах репарации



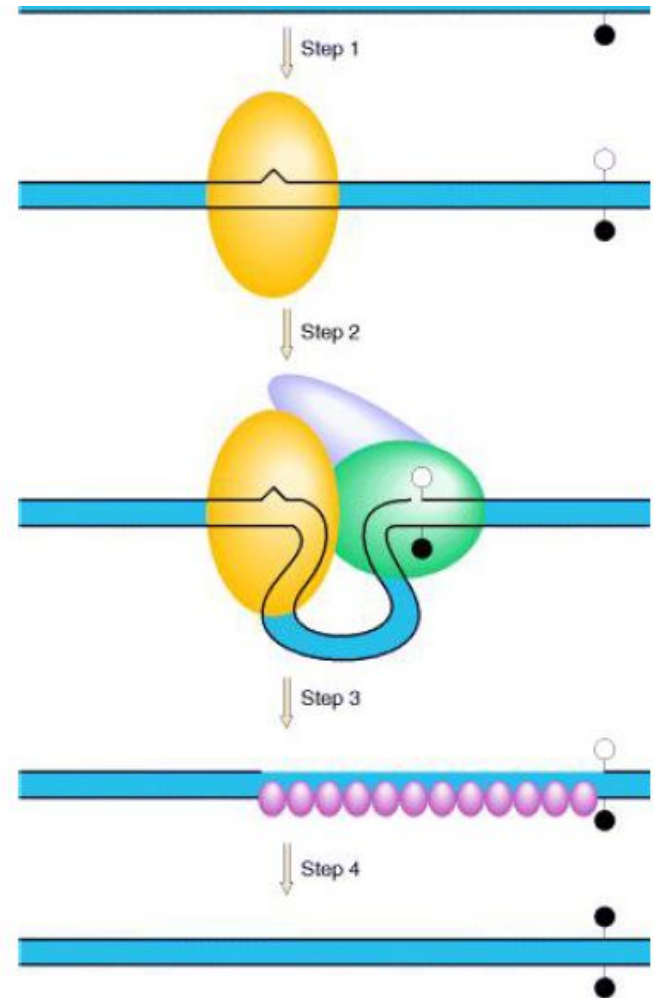
# Мисметч-репарация Mismatch Repair (MMR)

- Выявляется некомплементарная пара только на дочерней цепи
- Производится замена неправильного основания



# Мисметч-репарация Mismatch Repair (MMR)

- Мисмэтч-репарация (mismatch repair, MMR) исправляет ошибки ДНК-полимеразы (неспаренные основания)
- MMR проходит по принципу, схожему с эксцизионной репарацией



# Мисметч-репарация у эукариот

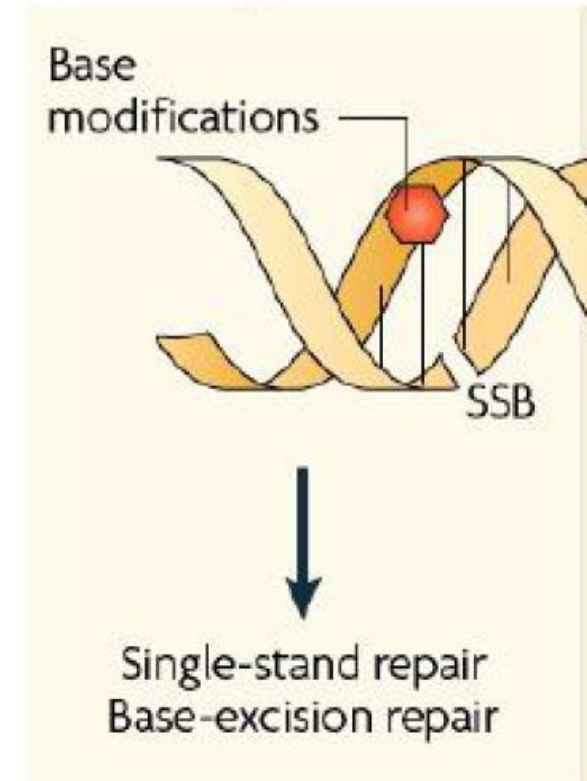
- Система MMR у эукариот организована сложнее функционирует эффективнее по сравнению с бактериями.
- У эукариот MMR исправляет все некоплементарные пары оснований и, кроме того, репарирует делеции или инсерции в рекомбинационных гетеродуплексах размером до 12 н.
- У бактерий MMR неспособна исправлять пары C\*С и репарирует делеции/инсерции не более 3 н. в рекомбинационных гетеродуплексах.
- Ключевые белки MMR – MutL и MutS высококонсервативны, их гомологи обнаружены у всех организмов от *E.coli* до человека.
- Если у *E.coli* эти белки (и кодирующие их гены) уникальны, то у эукариот имеется по несколько их гомологов (паралогов). Например, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* обнаружены 3 гомолога MutL и 6 гомологов MutS, у человека – 11 гомологов MutL и 4 MutS.



# Репарация разрывов ДНК

Ионизирующая радиация, химические вещества способны разорвать одну или две цепи ДНК.

- **Одноцепочечные разрывы (SSB)**  
Разрывы одной из цепей ДНК часто исправляются ферментами участвующими в BER репарации.



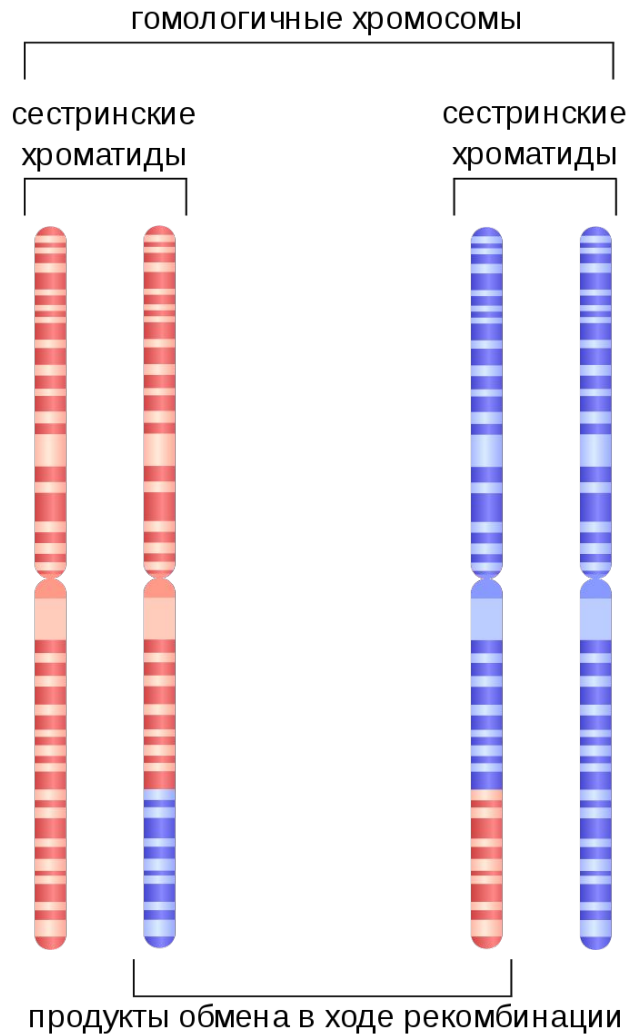


# Репарация разрывов ДНК

Двухцепочечные разрывы (DSB) могут быть ликвидированы с помощью гомологичной рекомбинации (HRR) и негомологичным соединением концов (NHEJ).



# Гомологичная рекомбинация (HRR)

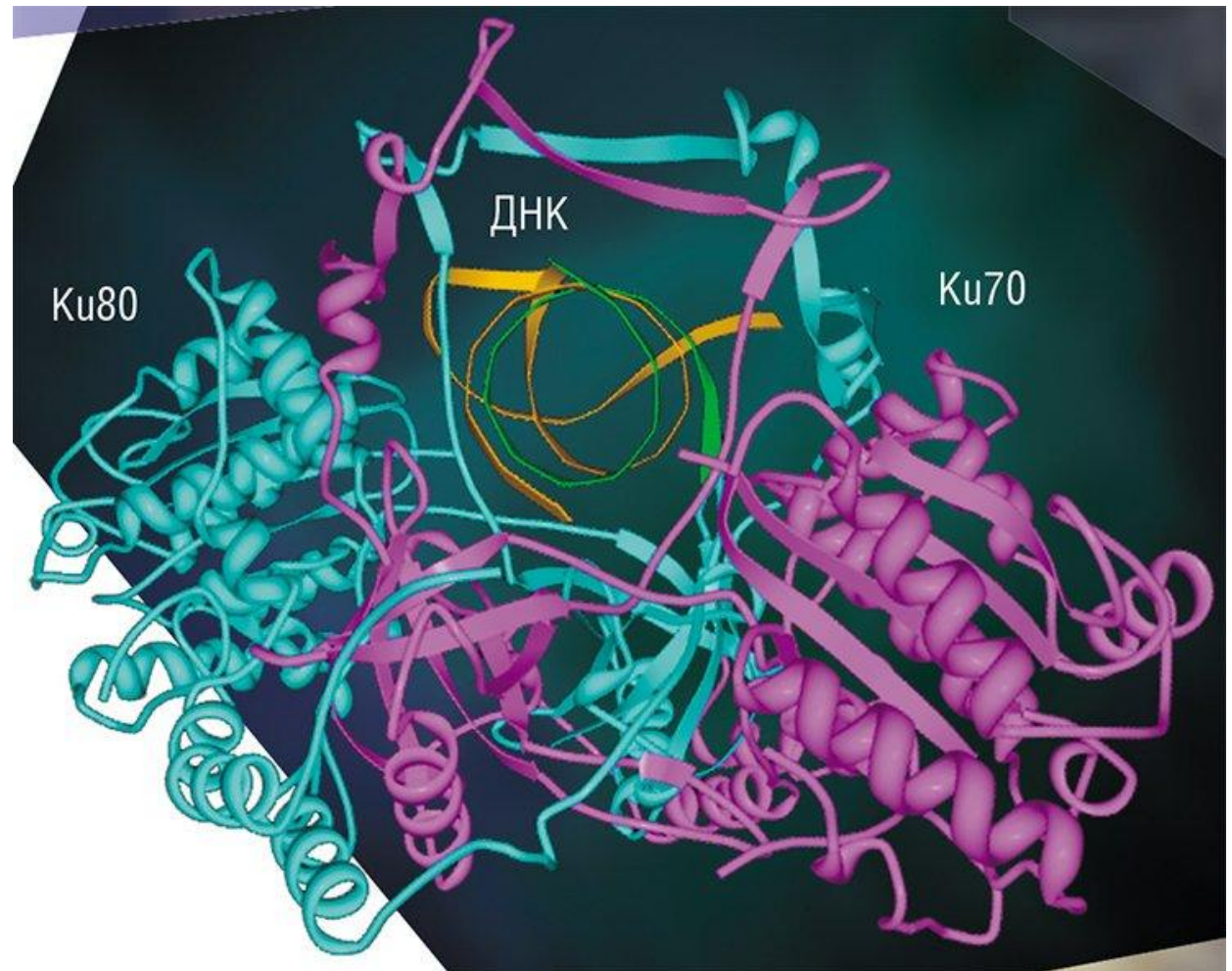


**Нокаут гена** - метод молекулярной генетики, при котором из организма удаляют или делают неработоспособными определенные гены. Нокаутные организмы помогают узнать функции генов

**В ходе мейоза гомологичные хромосомы обмениваются участками, что позволяет получить**

# Негомологичное соединение концов (NHEJ)

**Связывание  
Ku-антигена с  
ДНК по типу  
«бусина на  
нитке»  
позволяет  
белку  
беспрепятст  
венно  
скользить по  
ДНК.**





# NHEJ



Двухцепочечная ДНК

Возникновение двухцепочечного разрыва

Начало репарации: Ku-антиген узнает двухцепочечные концы ДНК

Ku-антиген сближает двухцепочечные концы

Нуклеазы «подрезают» концы ДНК

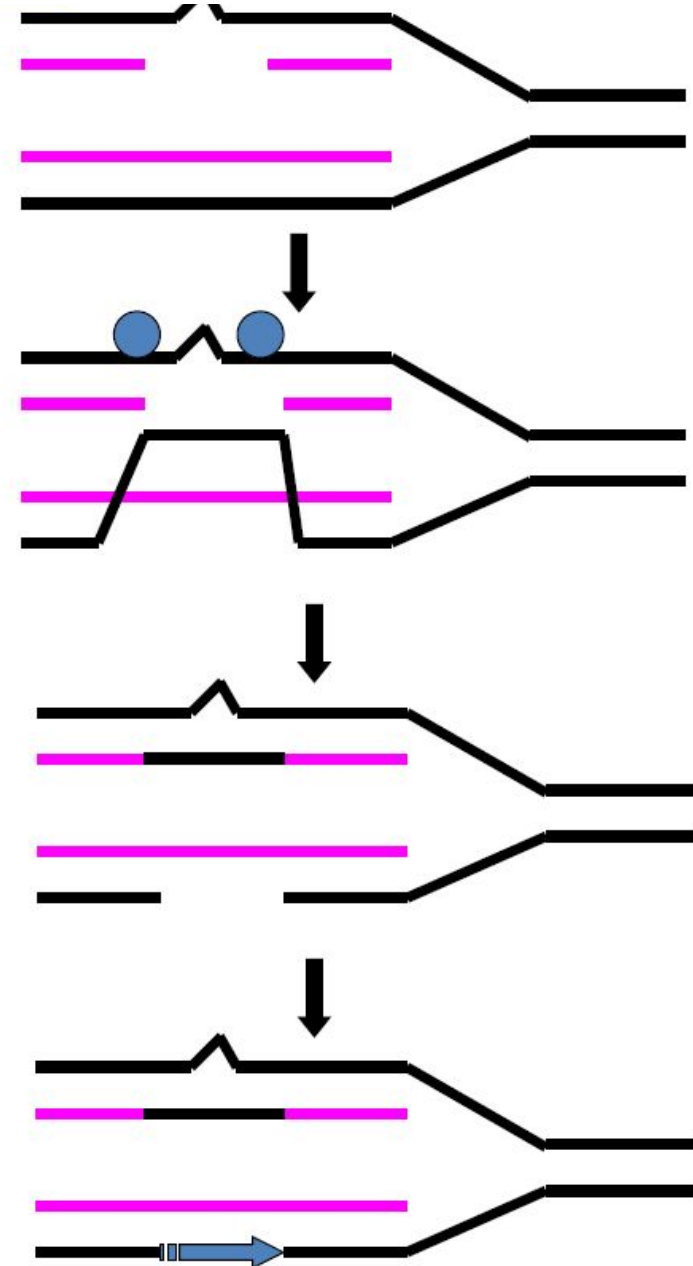
ДНК-полимеразы заново синтезируют участки ДНК

ДНК-лигаза «сшивает» ДНК

# Пострепликативная репарация на базе

## HRR

- Этот способ восстановления целостности ДНК заключается в репарации пробелов, образующихся в дочерних цепях напротив не удаленных в ходе репликации димеров.
- Основная часть таких пробелов репарируется путем рекомбинационных обменов между двумя сестринскими цепями. В процессе используются ферменты ДНК-полимераза I и лигаза, и белок RecA.

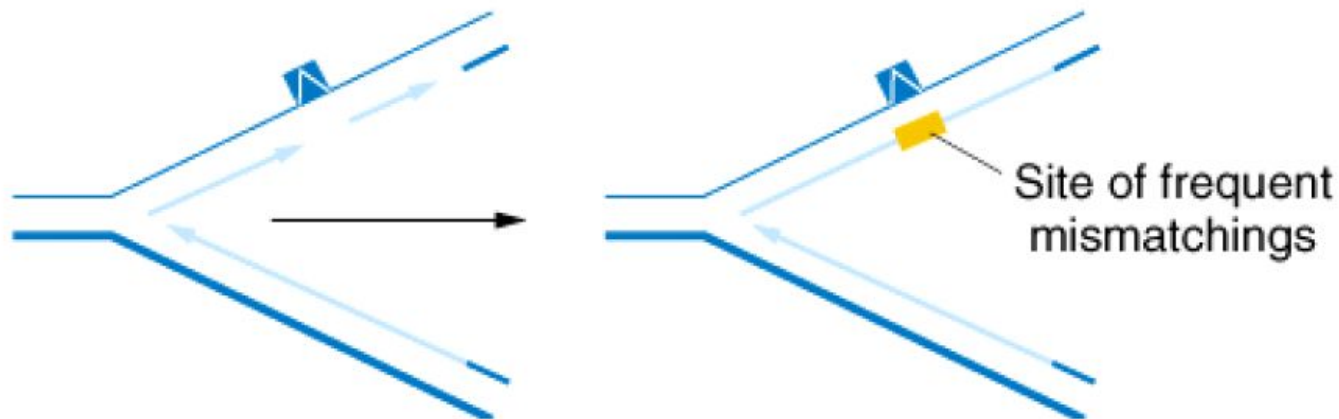




# SOS репарация

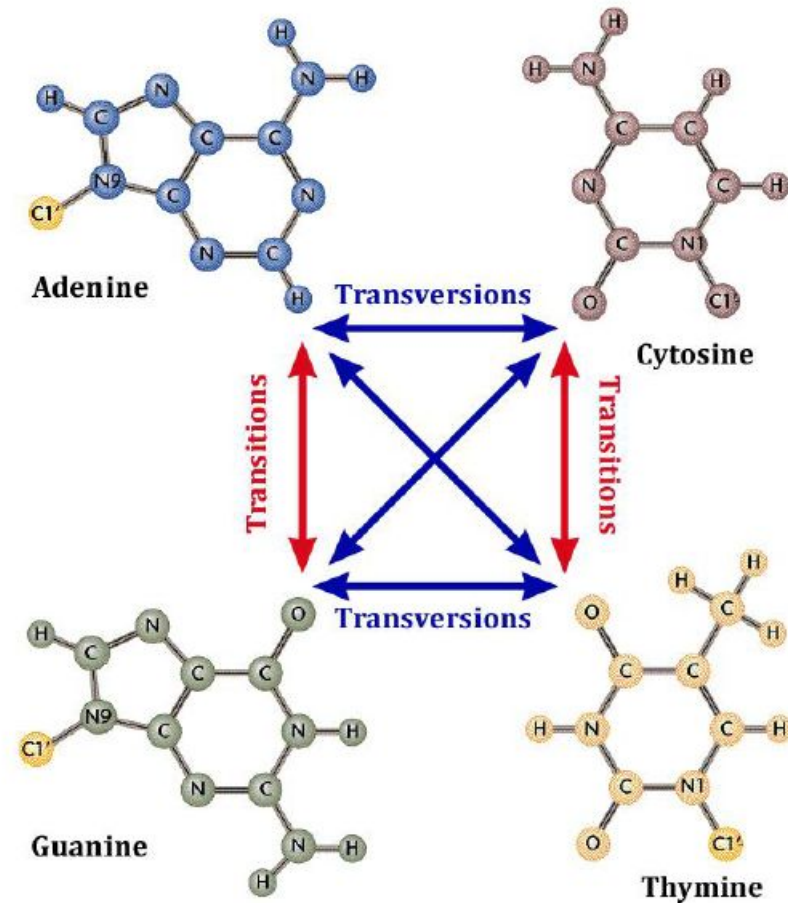
- Ключевая роль в SOS-индукции принадлежит белку RecA. Он связывается с белком SSB и с однонитевой ДНК и образует ДНК-белковые филаменты, представляющие собой активную форму белка, обозначаемую как RecA\*.
- RecA\* является сигналом, запускающим индукцию SOS-регулона (около 30 генов), продукты которых необходимы для выживания клетки при массовых повреждениях ДНК.
- В SOS-регулон входят гены UmuD, UmuC и DinB, продукты которых необходимы для «обходной» (translesion) репликации.
- Обходная репликация является неточной, склонной к ошибкам. В результате повышается частота мутаций.

## (b) Error-prone (SOS) replication (lesion bypass)



# Мутационный процесс

- Неисправленные повреждения в молекуле ДНК дают начало наследуемым изменениям - мутациям
- Мутации могут иметь как негативное, так и нейтральное или положительное проявление



# Резюме

- *Репарация* – это процесс исправления повреждений в молекуле ДНК. Принципиально репарацию можно разделить на два типа: *прямую и непрямую*. Прямая репарация включает непосредственное химическое восстановление поврежденных нуклеотидов. Непрямая репарация предполагает вырезание оснований или более крупных участков ДНК (эксцизионная репарация, мисмэтч-репарация).
- Одним из примеров прямой репарации является *фотореактивация*. Этот процесс представляет собой удаление тиминовых димеров, которые могут возникать в ДНК при воздействии ультрафиолетового излучения. Фотореактивация обеспечивается ферментами *фотолиазами*.

# Резюме

- Эксцизионная репарация представляет собой один из типов непрямой репарации. В основе этого процесса лежит узнавание поврежденного участка, его вырезание и репаративный синтез ДНК специальными полимеразми.
- Метилирование ДНК — присоединение метильных (-CH<sub>3</sub>) групп, чаще всего к цитозину и аденину — играет ключевую роль для регуляции экспрессии генов и репарации. Важную роль в репарации у бактерий играет метилаза Dam, которая осуществляет метилирование аденина в палиндромных сайтах GATC. Такое метилирование позволяет отличать старую и новую цепи ДНК после прохождения репликации.

# Резюме

- Мисмэтч репарация (MMR) является способом коррекции ошибок ДНК-полимеразы, проявляющихся в виде неспаренных оснований. Основу системы MMR составляют белки MutS/L/H. Белок MutS узнаёт неспаренное основание, привлекая белок MutL, который, в свою очередь, стимулирует вырезание фрагмента ДНК с неспаренным участком за счет активности белка MutH.
- Нескорректированные повреждения в структуре ДНК часто дают начало наследуемым изменениям последовательности генома, то есть **мутациям**.



?

**Выберите один или несколько вариантов из списка**

1. Прямая репарация требует удаления и дополнительного синтеза фрагментов ДНК
2. При прямой репарации повреждение устраняется спонтанно, без участия белков
3. Эксцизионная репарация, в отличие от прямой, сопряжена с удалением фрагмента цепи ДНК, несущего повреждение
4. Для прохождения эксцизионной репарации необходим локальный синтез ДНК специальными ДНК-полимеразами

**Спасибо за  
внимание!**